

缺氧肝癌源性外泌体 *miR-1260b* 对肿瘤相关巨噬细胞 M2 亚型的影响及其机制

杨晔妮¹ 赵梓吟² 王有鹏¹ 孙洪发¹ 张顺¹ 韩冰¹

(青岛大学附属医院, 山东 青岛 266003 1 肝胆胰外科; 2 器官移植中心)

[摘要] 目的 探究缺氧肝癌源性外泌体 *miR-1260b* 对肿瘤相关巨噬细胞 M2 亚型的影响及其机制。方法 人肝癌细胞 97H(MHCC97H)细胞经 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 24 h 后获得缺氧 97H 细胞。利用丙二醇甲醚醋酸酯 (PMA) 处理 THP-1 细胞 24 h 后获得 M0 巨噬细胞, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测 THP-1 细胞中 *CD11b* 的相对表达量。将常氧/缺氧 97H 细胞与 M0 巨噬细胞共培养 48 h 后, 采用 RT-qPCR 方法检测巨噬细胞中 *CD163*、*CD206* 和 *TNF- α* 基因相对表达量。通过低温差速离心法提取常氧/缺氧 97H 细胞的外泌体, 通过生物透射电子显微镜观察外泌体的形态, 采用纳米颗粒跟踪分析仪 (NTA) 分析粒子直径, 采用 Western blot 法检测外泌体中凋亡诱导因子 6 相互作用蛋白 (Alix) 和钙联蛋白相对表达量。外泌体与 M0 巨噬细胞共培养 48 h 后, 采用 RT-qPCR 方法检测 M0 巨噬细胞中 *CD206* 相对表达量。用携带 Dil 染料的外泌体与 M0 巨噬细胞共培养 24 h, 采用荧光显微镜观察 M0 巨噬细胞内的荧光反应。采用 RT-qPCR 方法检测外泌体中 *miR-1260b* 相对表达量, 并向 M0、M2 巨噬细胞内转染 *miR-1260b* Mimic/Inhibitor 后, 采用 RT-qPCR 方法检测细胞内 *CD206*、肿瘤坏死因子- α (*TNF- α*) 相对表达量。将转染了 *miR-1260b* Inhibitor 的常氧/缺氧 97H 细胞共培养 M0 巨噬细胞, 采用 RT-qPCR 方法检测 M0 巨噬细胞 *CD206*、*TNF- α* 相对表达量。结果 PMA 处理 THP-1 细胞 24 h 后所获得的 M0 巨噬细胞 *CD11b* 显著高表达 ($t=78.14, P<0.05$)。缺氧 97H 细胞与 M0 巨噬细胞共培养可以使巨噬细胞 *CD163* 以及 *CD206* 的表达升高, *TNF- α* 的表达降低 ($t=14.23\sim 46.88, P<0.05$)。成功分离并提取缺氧 97H 细胞分泌的外泌体颗粒, 其可以被 M0 巨噬细胞吞噬。Western blot 结果显示, 外泌体颗粒高表达 Alix 蛋白且基本不表达钙联蛋白。RT-qPCR 检测显示, 缺氧肝癌源性外泌体共培养 M0 巨噬细胞后可以使 M0 巨噬细胞高表达 *CD206* ($t=17.06, P<0.05$); 缺氧肝癌源性外泌体高表达 *miR-1260b* ($t=12.09, P<0.05$); 转染 *miR-1260b* Mimic 后, M0 巨噬细胞可以高表达 *CD206*, 低表达 *TNF- α* ($t=8.82, 8.22, P<0.05$), 转染 Inhibitor 后, M2 巨噬细胞可以高表达 *TNF- α* ($t=16.88, P<0.05$)。常氧 97H 细胞预先转染 *miR-1260b* Mimic 可以高表达 *CD206*, 低表达 *TNF- α* ($t=26.95, 21.45, P<0.05$); 而缺氧 97H 细胞预先转染 *miR-1260b* Inhibitor 后显著影响了 *CD206*、*TNF- α* 的表达 ($t=9.09, 12.54, P<0.05$)。结论 缺氧肝癌细胞源性的外泌体可以诱导 M2 巨噬细胞极化, *miR-1260b* 是缺氧肝癌细胞源性外泌体对巨噬细胞产生极化影响的关键靶分子, 该机制进而促进了肝癌细胞免疫逃逸。

[关键词] 肝肿瘤; 细胞低氧; 外泌体; 微 RNAs; 转染; 巨噬细胞; 肿瘤逃逸

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

EFFECTS OF HYPOXIC HEPATOMA-DERIVED EXOSOME *miR-1260b* ON M2 MACROPHAGES AND MECHANISM YANG Yeh-
ni, ZHAO Ziyin, WANG Youpeng, SUN Hongfa, ZHANG Shun, HAN Bing (Department of Hepatobiliary Surgery, The
Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effects of the hypoxic hepatoma-derived exosome *miR-1260b* on the M2 subtype of tumor-associated macrophages and the underlying mechanism. **Methods** MHCC97H (97H) cells were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 for 24 h to obtain hypoxic 97H cells. THP-1 cells were treated with propylene glycol methyl ether acetate (PMA) for 24 h to derive M0 macrophages. The relative expression of *CD11b* in THP-1 cells was measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). After co-culture with normoxic/hypoxic 97H cells for 48 h, the relative gene expression of *CD163*, *CD206*, and *TNF- α* in M0 macrophages was measured by RT-qPCR. The exosomes of normoxic/hypoxic 97H cells were extracted by low temperature differential centrifugation. A transmission electron microscope was used to observe the shape of the exosomes. The particle diameter was measured using a nanoparticle tracking analyzer. Western blot was used to determine the relative expression of apoptosis-inducing factor 6-interacting protein (Alix) and calnexin in the exosomes. After co-culture with the exosomes for 48 h, the relative expression of *CD206* in M0 macrophages was measured by RT-qPCR. The exosomes labeled with Dil stain were co-cultured with M0 macrophages for 24 h, and then M0 macrophages were examined for the fluorescence reaction using a fluorescence microscope. The expression of *miR-1260b* in the exosomes was measured by RT-qPCR. After M0 and M2 macrophages were transfected with *miR-1260b* Mimic/Inhibitor, the expression of *CD206* and *TNF- α* in the cells was determined by RT-qPCR. After co-culture with nor-

moxic/hypoxic 97H cells transfected with *miR-1260b* Inhibitor, M0 macrophages were measured for the relative expression of *CD206*

[收稿日期] 2023-01-17; **[修订日期]** 2023-03-26

[通讯作者] 韩冰, Email: hanbing@qduhospital.cn

and *TNF- α* by RT-qPCR. **Results** There was significantly high expression of *CD11b* in M0 macrophages derived from THP-1 cells after 24 h PMA treatment ($t=78.14, P<0.05$). M0 macrophages co-cultured with hypoxic 97H cells showed significantly increased expression of *CD163* and *CD206* and significantly decreased expression of *TNF- α* ($t=14.23-46.88, P<0.05$). The exosome particles secreted by hypoxic 97H cells were successfully isolated and extracted, which could be phagocytized by M0 macrophages. Western blot showed that the exosome particles had high expression of Alix protein and very little expression of calnexin. The results of RT-qPCR showed that co-culture with hypoxic hepatoma-derived exosomes significantly increased the expression of *CD206* in M0 macrophages ($t=17.06, P<0.05$). The expression of *miR-1260b* was significantly increased in hypoxic hepatoma-derived exosomes ($t=12.09, P<0.05$). M0 macrophages highly expressed *CD206* and lowly expressed *TNF- α* after transfection with *miR-1260b* Mimic ($t=8.82, 8.22, P<0.05$), and highly expressed *TNF- α* after transfection with the Inhibitor ($t=16.88, P<0.05$). Pre-transfection of *miR-1260b* Mimic into normoxic 97H cells significantly increased the expression of *CD206* and significantly decreased the expression of *TNF- α* ($t=26.95, 21.45, P<0.05$). Pre-transfection of *miR-1260b* Inhibitor into hypoxic 97H cells significantly changed the expression of *CD206* and *TNF- α* ($t=9.09, 12.54, P<0.05$). **Conclusion** Hypoxic hepatoma-derived exosomes can induce M2 macrophage polarization. *miR-1260b* is a key target for macrophage polarization by hypoxic hepatoma cell-derived exosomes, which promotes the immune escape of hepatoma cells.

[KEY WORDS] Liver neoplasms; Cell hypoxia; Exosomes; MicroRNAs; Transfection; Macrophages; Tumor escape

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发病率在全球人群中位居第 6 位^[1], 确诊时间晚、高复发率和高死亡率是造成 HCC 患者不良预后的重要原因。研究显示瘤内缺氧是进展期 HCC 的关键特征, 缺氧除可通过调节缺氧诱导因子 (HIF) 引起肝癌细胞适应性缺氧等的一系列变化, 还具有影响肿瘤细胞分泌的外泌体对免疫细胞中的巨噬细胞传递信号的作用^[2-3]。

外泌体是一类粒径 30~150 nm 的含有 RNA 和蛋白的盘状囊泡, 可在不同类型细胞之间起通讯作用^[4]。研究发现, 外泌体中膜蛋白凋亡诱导因子 6 相互作用蛋白 (Alix) 高表达, 而基本不表达钙连接蛋白。缺氧环境可以影响肝癌细胞分泌和传递外泌体, 从而影响肿瘤细胞与肿瘤微环境中其他细胞, 包括肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 的通讯^[5-7]。

本课题组先前的实验发现, SOCS5 可以调节 *HIF-1 α* 依赖性的线粒体损伤, 进一步促进 HCC 的进展^[3]。但是在缺氧环境下, 肝癌细胞是如何通过外泌体转运核酸物质到达巨噬细胞, 以及诱导免疫抑制的具体机制目前尚不清楚。本研究通过构建人 HCC97H (MHCC97H) 细胞缺氧模型, 探讨缺氧肝癌细胞源性外泌体 *miR-1260b* 对巨噬细胞 M2 亚型的影响及其机制, 旨在为 HCC 的免疫治疗提供新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

MHCC97H 细胞和人单核白血病细胞 (THP-1) 均购自中国科学院上海生命科学研究院, 并通过短串联重复序列 (STR) 分析验证了细胞的真实性; 2.5 g/L 胰蛋白酶溶液、高效 RIPA 裂解液、蛋白酶

抑制剂混合液、蛋白磷酸酶抑制剂混合物购自北京索莱宝科技有限公司, TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养和处理 97H 细胞置于完全培养基 (含体积分数 0.10 的胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的高糖 DMEM) 中, 在 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 培养箱当中进行培养。待 97H 细胞融合度达 70%~80% 后, 在完全培养基中分别加入 0、100 μ mol/L 浓度的 CoCl₂, 培养 24 h 后提取 RNA, 实时荧光定量 PCR 方法 (RT-qPCR) 方法检测细胞中 *HIF-1 α* 的相对表达量, 若 *HIF-1 α* 稳定高表达且两种浓度间有显著差异时, 则为细胞缺氧模型构建成功^[8-9], 可用于后续实验。

将 THP-1 细胞置于 THP-1 专用培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司) 中, 和 97H 细胞相同条件进行培养, 培养至对数生长期以后进行实验。取 THP-1 细胞计数并接种于含有专用培养基的 6 孔板中, 每孔约 1×10^6 个细胞, 分别向专用培养基中加入浓度 0、100 μ g/L 的丙二醇甲醚醋酸酯 (PMA) (美国 MedChemExpress 生物科技有限公司), 分别为 THP-1 组和 THP-1+PMA 组, 继续培养 24 h, 然后使用 RT-qPCR 方法检测两组 THP-1 细胞中 *CD11b* 相对表达量, 此时在 THP-1+PMA 组中得到的细胞即为 M0 巨噬细胞。然后于培养了 24 h 的 THP-1+PMA 组培养基中再加入 100 μ g/L 的 IL-4/IL-13, 继续培养 72 h 以后, 得到 M2 巨噬细胞 (M2 组)^[10]。

1.2.2 细胞共培养 将 M0 巨噬细胞铺至孔径为 0.4 μ m 的共培养板的上室内, 分别将融合度达到 70%~80% 的 97H 细胞, 以及细胞缺氧模型构建

功 97H 细胞铺至共培养板的下室,分别为 97H-N+M0 组和 97H-H+M0 组,共培养 48 h 以后,采用 RT-qPCR 方法检测上述两组以及 M2 组巨噬细胞中 *TNF- α* 、*CD163* 和 *CD206* 的相对表达量。

将 M0 巨噬细胞铺至孔径为 0.4 μm 的共培养板上室内,待 97H 细胞融合度达 70%~80% 时,分别转染 *miR-1260b NC*(97H-NC+M0 组)和 *miR-1260b Mimic*(97H-Mimic+M0 组),并将其铺至共培养板下室,共培养 48 h,采用 RT-qPCR 方法检测两组细胞中 *TNF- α* 和 *CD206* 相对表达量。

将融合度达到 70%~80% 的 97H 细胞转染 *miR-1260b Inhibitor* 后,再加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 缺氧处理 24 h,即为 97H-H-1260 IN 组细胞。将 M0 巨噬细胞铺至孔径为 0.4 μm 的共培养板上室内,将上面获得的 97H-H-1260 IN 组细胞(97H-H-1260 IN+M0 组)以及融合度达到 70%~80% 的 97H 细胞(97H-N+M0 组)和细胞缺氧模型构建成功 97H 细胞(97H-H+M0 组)铺至共培养板下室,继续培养 48 h,RT-qPCR 方法检测上述 4 组 M0 巨噬细胞中 *TNF- α* 和 *CD206* 相对表达量。

1.3 外泌体的提取、鉴定及示踪

将 97H 细胞置于完全培养基中,待细胞融合度达到 70%~80% 时,分别向完全培养基中加入 0、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 ,培养 24 h 后,将培养基更换为 DMEM 培养基(含体积分数 0.10 无外泌体胎牛血清),分别为 *exo-N* 组和 *exo-H* 组,培养 48 h 后,采用低速差速离心方法^[11]提取 *exo-N* 组和 *exo-H* 组细胞上清液中的外泌体,并重悬于 50~100 μL 的 PBS 中。

取浓度为 100 g/L 的 *exo-N* 组外泌体颗粒,以 Dil 橙红色荧光染料进行标记。加至没有染料标记的 M0 巨噬细胞培养基中,共同孵育 24 h 后,利用荧光显微镜观察 M0 巨噬细胞内的荧光反应,若外泌体被巨噬细胞吞噬则出现橙红色荧光颗粒。

取 *exo-N* 组和 *exo-H* 组的 20 μL 的外泌体颗粒悬液滴至电镜铜网栅中,停留 1 min,磷酸铝溶液负染固定 1~10 min,滤纸吸干后室温自然晾干,在生物透射电子显微镜下观察外泌体的大小和形状,并拍照。使用纳米颗粒跟踪分析仪(NTA)的 ZetaVIEW S/N 252 软件分析外泌体颗粒的大小。

取 *exo-N* 组和 *exo-H* 组外泌体颗粒,设置浓度 100 g/L,加至 M0 细胞培养基中,分别为 *exo-N+M0* 组和 *exo-H+M0* 组,培养 48 h 以后,通过 RT-qPCR 方法检测两组细胞中 *CD206* 相对表达量。

1.4 细胞转染

参考文献[12]的方法,向 M0 巨噬细胞内转染 *miR-1260b NC*、*miR-1260b Mimic*、*miR-1260b NC-Inhibitor*、*miR-1260b Inhibitor*,分别为 M0-NC 组、M0-Mimic 组、M0-NC IN 组、M0-IN 组,向 M2 巨噬细胞转染 *miR-1260b NC*、*miR-1260b Inhibitor*,分别为 M2-NC IN 组和 M2-IN 组。采用 RT-qPCR 方法检测以上各组巨噬细胞中 *TNF- α* 以及 *CD206* 的表达。*miR-1260b NC* 引物的序列为:5'-UUCU-CCGAACGUGUCACGUTT-3';*miR-1260b Mimic* 引物的序列为:5'-AUCCCACCACUGCCACCAU-GGUGGCAGUGGUGGGAUUU-3。*miR-1260b NC-Inhibitor* 引物的序列为:5'-CAGUACUUUUGUG-UAGUACAA-3';*miR-1260b Inhibitor* 引物的序列为:5'-AUGGUGGCAGUGGUGGGAU-3'。

1.5 RT-qPCR 方法检测外泌体中 *miR-1260b* 相对表达量

按照试剂盒说明书的要求,用 TRIzol 试剂提取 *exo-N* 组和 *exo-H* 组外泌体颗粒中的 RNA,利用 Nano Drop 分光光度计检测提取的 RNA 浓度以及纯度,用 TaKaRa(日本宝日医生物技术有限公司)的 SYBR[®] Premix Ex Taq TM II 进行 RT-qPCR。PCR 反应体系共 20 μL ,包括 10 μL 的 PCR Master Mix、1 μg cDNA 以及适宜浓度的 DEPC 水和引物。以 U6 为内参。引物委托由上海生工生物工程有限公司合成,*miR-1260b* 的特异性引物为:5'-GTCG-TATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT-GGATACGACAAAATA-3',正向引物为:5'-CG-CGATCCCACCACTGC-3',反向引物为:5'-AGT-GCAGGGTCCGAGGTATT-3';U6 的特异性引物为:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA-GG-TATTCGCACTGGATACGACAAAATA-3',正向引物为:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物为:5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'。

1.6 Western blot 方法检测 97H 细胞和外泌体中 Alix 和钙连接蛋白的表达水平

97H 细胞融合度达到 70%~80% 时,使用 RIPA 裂解液、蛋白酶和磷酸酶抑制剂裂解 97H 细胞(97H 组),提取蛋白混合物。对新鲜提取的 *exo-N* 组和 *exo-H* 组的外泌体颗粒同时使用上述试剂进行裂解,提取蛋白混合物。采用 BCA-蛋白定量法对样品中的蛋白进行定量以后,使用 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,利用电场装置将分离的蛋白转移至 PVDF 膜上,严格膜封闭后,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。

与同种酶偶联的山羊抗兔 IgG-HRP(上海爱必信生物科技有限公司)抗体结合后,加入 ECL 发光溶液显色后,采用成像仪检测目标蛋白的相对表达量。所用的抗体有抗-Alix、抗-Calnexin(1 : 1 000,上海艾博抗贸易有限公司)、抗-GAPDH(1 : 1 000,上海爱必信生物科技有限公司)。

1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。所有实验均重复 3 次,结果取平均值。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 ANOVA 分析,进一步两两比较采用 MANOVA 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 缺氧 97H 细胞对巨噬细胞极化的影响

RT-qPCR 技术检测结果显示,THP-1 组以及 THP-1+PMA 组细胞中 *CD11b* 基因的相对表达量分别为 1.001 ± 0.059 、 3.931 ± 0.027 ,两组比较差异具有显著性($t = 78.14, P < 0.05$)。

M2 组、97H-N+M0 组及 97H-H+M0 组巨噬细胞中 *CD163*、*CD206* 和 *TNF- α* 基因的相对表达量比较,差异均有显著性($F = 319.90 \sim 494.20, P < 0.05$),各组间两两比较差异均有显著性($t = 14.23 \sim 46.88, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组细胞中 *CD163*、*CD206* 和 *TNF- α* 基因相对表达量比较($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>CD163</i>	<i>CD206</i>	<i>TNF-α</i>
M2 组	3.033 ± 0.126	4.426 ± 0.215	0.017 ± 0.001
97H-N+M0 组	1.000 ± 0.007	1.002 ± 0.076	1.001 ± 0.058
97H-H+M0 组	5.509 ± 0.344	2.420 ± 0.045	0.707 ± 0.062

2.2 缺氧肝细胞癌分泌的外泌体对巨噬细胞的摄取和极化产生的影响

Western blot 方法结果显示,与 97H 组比较,exo-N 组和 exo-H 组提取的蛋白混合物中高表达 Alix,基本不表达钙联蛋白(图 1)。生物透射电子显微镜以及 NTA 结果显示,外泌体颗粒呈双凹圆盘状微小囊泡,直径 30~150 nm,见图 2。

RT-qPCR 检测的结果显示,exo-N+M0 组和 exo-H+M0 组 M0 巨噬细胞中 *CD206* 基因的相对表达量分别为 1.000 ± 0.010 、 2.852 ± 0.188 ,两组比较差异具有显著性($t = 17.06, P < 0.05$)。荧光显微镜下观察显示 M0 巨噬细胞内出现带有橙红色荧光的颗粒(图中白色箭头指示处),表示外泌体被 M0

巨噬细胞吞噬。见图 3。

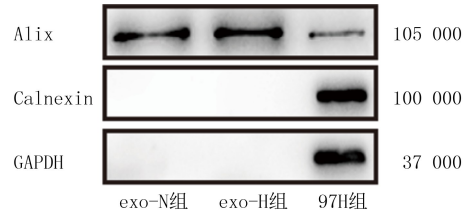


图 1 缺氧肝癌细胞源性外泌体中 Alix 和钙联蛋白表达情况

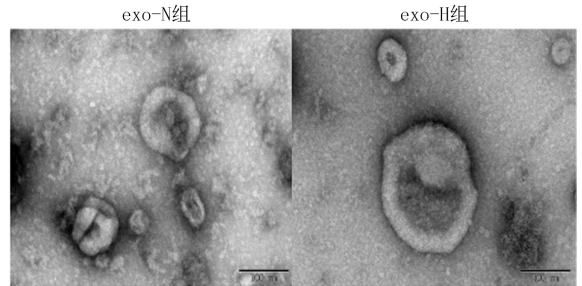


图 2 缺氧肝癌细胞源性外泌体的形态(200 倍)

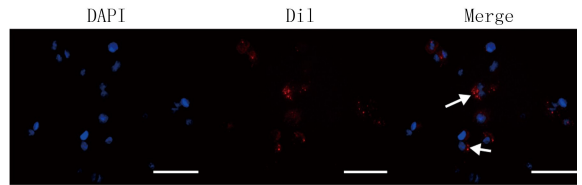


图 3 缺氧肝癌细胞源性外泌体 Dil 荧光染色(50 倍)

2.3 缺氧 97H 细胞来源的外泌体 *miR-1260b* 对 M2 巨噬细胞极化的影响

RT-qPCR 技术检测结果显示,exo-N 和 exo-H 组外泌体中的 *miR-1260b* 基因的相对表达量分别为 1.000 ± 0.007 、 2.133 ± 0.162 ,两组比较差异具有显著性($t = 12.09, P < 0.05$)。M0-NC 组与 M0-Mimic 组的 *miR-1260b* 基因的相对表达量分别为 1.000 ± 0.038 、 32.903 ± 0.570 ,*CD206* 基因的相对表达量分别为 1.001 ± 0.049 、 1.325 ± 0.337 ,*TNF- α* 基因的相对表达量分别为 1.000 ± 0.021 、 0.705 ± 0.058 ,M0-Mimic 组与 M0-NC 组比较,*miR-1260b*、*CD206* 基因的相对表达量显著高表达($t = 96.70, 8.82, P < 0.05$),而 *TNF- α* 基因的相对表达量显著降低($t = 8.22, P < 0.05$)。

M2-NC IN 组与 M2-IN 组中 *miR-1260b* 基因的相对表达量分别为 1.000 ± 0.035 、 0.052 ± 0.002 ,*CD206* 基因的相对表达量分别为 1.002 ± 0.069 、 1.000 ± 0.021 ,*TNF- α* 基因的相对表达量分别为 1.000 ± 0.008 、 3.428 ± 0.249 ,M2-IN 与 M2-NC IN 组比较,*miR-1260b* 基因的相对表达量显著降低,*TNF- α* 基因的相对表达量则显著增高($t = 47.31, 16.88, P < 0.05$),*CD206* 基因的相对表达量比较无显著差异($P > 0.05$)。

2.4 miR-1260b Mimic/Inhibitor 对缺氧 97H 细胞诱导 M2 巨噬细胞的调节作用

RT-qPCR 检测结果显示, M0-NC+M0 组与 97H-Mimic+M0 组 M0 巨噬细胞中的 *CD206* 基因的相对表达量分别为 1.005 ± 0.125 、 5.037 ± 0.227 , *TNF- α* 基因相对表达量则分别为 1.001 ± 0.056 、 0.278 ± 0.017 , 两组比较, *CD206* 和 *TNF- α* 相对表达量具有显著差异 ($t=26.95$ 、 21.45 , $P<0.05$)。

97H-N+M0 组、97H-H+M0 组以及 97H-H-1260 IN+M0 组 M0 巨噬细胞中的 *CD206* 基因的相对表达量则分别为 1.001 ± 0.053 、 3.209 ± 0.576 、 0.652 ± 0.038 , *TNF- α* 基因的相对表达量分别为 1.003 ± 0.049 、 0.456 ± 0.025 、 1.089 ± 0.026 , 各组间 *CD206* 和 *TNF- α* 比较差异均有显著性 ($F=36.50$ 、 44.07 , $P<0.05$), 其中, 与 97H-H+M0 组比较, 97H-H-1260 IN+M0 组 M0 巨噬细胞中 *CD206* 基因的相对表达量显著降低, *TNF- α* 基因的相对表达量显著升高 ($t=9.09$ 、 12.54 , $P<0.05$)。

3 讨 论

我国是 HCC 高发国家, 据统计人群中 HCC 发病率高达 18.2/10 万^[13-14]。TAM 是肿瘤微环境中主要的免疫细胞, 可以极化为 M1 或 M2 亚型, M2 巨噬细胞具有促进肿瘤细胞进展的作用^[15]。不同的巨噬细胞亚型均具有特异性标志物, 例如 M0 巨噬细胞以 *CD11b* 基因高表达为特征, M1 巨噬细胞高表达 *TNF- α* , 而 M2 巨噬细胞则高表达 *CD206*、*CD163*^[10,16]。研究发现, 缺氧环境下肿瘤细胞的外泌体中富含免疫调节蛋白和趋化因子^[17], 还包含有能促进 M2 巨噬细胞极化的 miRNA 分子。

研究发现, 免疫细胞中的 M2 巨噬细胞可以通过上调 PD-L1 或者是分泌抗炎细胞因子 IL-10 抑制 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞等免疫细胞活性, 以此重塑免疫微环境, 从而促进肝癌细胞的免疫逃逸^[18-20]。除此之外, M2 巨噬细胞有促进血管和淋巴管生成、肿瘤细胞的增殖和转移等作用, 有促癌的作用, 而 M1 巨噬细胞则具有抗癌的作用。因此探索缺氧肿瘤细胞通过分泌外泌体诱导 M2-TAM 极化的具体机制, 找到控制 TAM 由 M2 转化为 M1 表型的具体靶向分子, 对于提高 HCC 患者的预后至关重要。目前在黑色素瘤、胶质瘤、胰腺癌、肺癌多种肿瘤中, 均被证实缺氧肿瘤细胞可以通过诱导 M2 巨噬细胞极化调节肿瘤进展^[17,21-23]。本研究结果显示, 缺氧 97H 细胞可以促进 M2 巨噬细胞极

化, 并高表达基因 *CD206*、*CD163*, 与 WANG 等^[24] 研究结果一致。同时本研究通过体外实验首次证实, 在 M0 巨噬细胞中转染 miR-1260b Mimic 可以有效地诱导 M2 巨噬细胞极化, 而靶向抑制 miR-1260b 的表达则可以有效控制巨噬细胞 M2 亚型转化为 M1 亚型。总之, 本研究发现缺氧肝癌细胞来源的 miR-1260b 可以诱导 M2 巨噬细胞极化。

miRNA 是一类不具有蛋白质编码功能的内源性小分子 RNA, 主要通过特异性识别 mRNA 的 3' 非编码区靶向降解 mRNA, 从而影响基因的表达水平, 发挥调节细胞稳态的作用^[25]。研究发现, 相较于癌旁组织, miR-1260b 在 HCC 组织当中高表达, miR-1260b 可以通过抑制 G 蛋白信号调节因子从而促进肝癌细胞的增殖, 即 miR-1260b 具有促癌效应^[26-27]。体外研究发现, 向巨噬细胞培养基中加入 ERK 抑制剂后, 巨噬细胞内 miR-1260b 表达显著上调, miR-1260b 可能是影响 M2 巨噬细胞极化的重要分子^[28]。由此可以推测, 在缺氧 97H 细胞影响巨噬细胞极化的这一过程中, miR-1260b 可能是促进巨噬细胞 M2 标记物 *CD206* 基因高表达的原因。并且, miR-1260b 还被发现是缺氧肝癌细胞分泌的外泌体中的差异性分子^[29]。因此可以推断, 外泌体源性 miR-1260b 可能是缺氧环境下肝癌细胞调节 M2 巨噬细胞极化的主要分子。本研究通过提取以及分离缺氧 97H 细胞的外泌体, 探究了 miR-1260b 对 M2 巨噬细胞极化的影响机制。本研究成功提取了外泌体颗粒, 此颗粒已经过 NTA 分析、生物透射电子显微镜观察和 Western blot 方法验证。然后, 本研究将缺氧肝癌源性外泌体颗粒与巨噬细胞共培养后, RT-qPCR 检测结果显示, 缺氧肿瘤源性外泌体可以诱导 M0 巨噬细胞高表达 M2 巨噬细胞标志物 *CD206*。本研究还发现缺氧 97H 细胞来源的外泌体高表达 miR-1260b 基因, 由此可以推测, miR-1260b 极有可能是缺氧 97H 细胞通过外泌体诱导 M2 巨噬细胞极化的关键靶分子。

miRNA Mimic/Inhibitor 是通过化学合成的方法合成的特定 miRNA 模拟物/抑制剂, 可利用细胞转染的方式进入细胞内增强或削弱内源 miRNA 的调控作用, 以此进行功能获得性/缺失性研究。为了进一步探究 miR-1260b 在诱导 M2 巨噬细胞亚型极化中的作用, 本研究向 M0 巨噬细胞内转染 miR-1260b Mimic, 结果显示 M2 巨噬细胞亚型标志物 *CD206* 高表达, 然而在 M2 巨噬细胞内转染 miR-1260b Inhibitor 后, 结果显示, 可以显著上调 M1 巨

噬细胞亚型标志物 $TNF-\alpha$ 的表达,而对 CD206 的调节作用不明显,提示 $miR-1260b$ 可能是缺氧 97H 细胞源性外泌体中导致 M2 巨噬细胞极化的主要调节分子,并且在 M2 巨噬细胞中抑制 $miR-1260b$ 的表达以后可以有逆转 M2 巨噬细胞亚型转化为 M1 亚型的可能性。同时,本研究还发现,转染了 $miR-1260b$ Mimic 的肝癌细胞共培养 M0 巨噬细胞后,可以诱导 M0 巨噬细胞向 M2 巨噬细胞的极化。而转染了 $miR-1260b$ Inhibitor 的缺氧 97H 细胞,相较于缺氧 97H 细胞共培养 M0 巨噬细胞后,可以有效逆转缺氧 97H 细胞诱导 M2 巨噬细胞极化。

综上所述,本研究结果显示,缺氧 97H 细胞可以通过外泌体诱导 M2 巨噬细胞极化,并且缺氧肝癌细胞源性外泌体中的 $miR-1260b$ 被首次发现是导致 M2 巨噬细胞极化发生免疫抑制的关键分子,为 HCC 免疫治疗方面的研究提供了理论支持。

作者声明:韩冰、杨晔妮、赵梓吟参与了研究设计;杨晔妮、王有鹏、孙洪发和张顺参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] XING M T, WANG X Z, KIKEN R A, et al. Immunodiagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma (HCC): The first step in detection and treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11):6139.

[2] QIAN M Y, WANG S B, GUO X F, et al. Hypoxic glioma-derived exosomes deliver microRNA-1246 to induce M2 macrophage polarization by targeting $TERF_2IP$ via the STAT3 and $NF-\kappa B$ pathways[J]. *Oncogene*, 2020, 39(2):428-442.

[3] LUO D A, WANG Y P, ZHANG M, et al. $SOCS_5$ knock-down suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma by ameliorating HIF-1 α -dependent mitochondrial damage[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11):918.

[4] YANG D B, ZHANG W H, ZHANG H Y, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8):3684-3707.

[5] KUMAR A, DEEP G. Hypoxia in tumor microenvironment regulates exosome biogenesis: Molecular mechanisms and translational opportunities[J]. *Cancer Lett*, 2020, 479:23-30.

[6] JING X M, YANG F M, SHAO C C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):157.

[7] SHAO X J, HUA S H, FENG T, et al. Hypoxia-regulated tumor-derived exosomes and tumor progression: A focus on immune evasion[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19):11789.

[8] 翁苓苓,高玲,张闽光. $CoCl_2$ 化学模拟肝癌体外缺氧模型的建立及对 HIF-1 α 、VEGF 基因的影响[J]. *肝脏*, 2019, 24(9):

1049-1052.

[9] 李英,王兴,李永宁,等. 缺氧诱导 Caveolin-1 靶向 Vimentin 调控肝癌细胞迁移及侵袭[J]. *贵州医科大学学报*, 2022, 47(8): 879-886.

[10] 王文芮,李海燕,常江. 佛波酯诱导 THP-1 分化为 M0 型巨噬细胞的条件优化[J]. *生物医学工程学进展*, 2020, 41(2): 74-78,97.

[11] THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter(3):Unit3.22.

[12] 赵金璇. 间充质干细胞外泌体对心肌缺血再灌注后巨噬细胞极化的影响及作用机制研究[D]. 南京:南京大学, 2019.

[13] The Society of Liver Cancer, China Anti-Cancer Association. 中国肿瘤整合诊治指南(CACA)-肝癌部分[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2022, 8(3):31-63.

[14] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Faculty Opinions recommendation of Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424.

[15] YANG C G, DOU R Z, WEI C, et al. Tumor-derived exosomal microRNA-106b-5p activates EMT-cancer cell and M2-subtype TAM interaction to facilitate CRC metastasis[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(6):2088-2107.

[16] XIAO L, HE Y M, PENG F, et al. Endometrial cancer cells promote M2-like macrophage polarization by delivering exosomal miRNA-21 under hypoxia condition[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020:9731049.

[17] PARK J E, DUTTA B, TSE S W, et al. Hypoxia-induced tumor exosomes promote M2-like macrophage polarization of infiltrating myeloid cells and microRNA-mediated metabolic shift[J]. *Oncogene*, 2019, 38(26):5158-5173.

[18] MARTINEZ-USATORRE A, KADIOGLU E, BOIVIN G, et al. Overcoming microenvironmental resistance to PD-1 blockade in genetically engineered lung cancer models[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(606):eabd1616.

[19] SHIMA T, SHIMODA M, SHIGENOBU T, et al. Infiltration of tumor-associated macrophages is involved in tumor programmed death-ligand 1 expression in early lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(2):727-738.

[20] YAMAGUCHI H, HSU J M, YANG W H, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression in cancers and associated opportunities for novel small-molecule therapeutics[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(5):287-305.

[21] XU J Y, ZHANG J, ZHANG Z P, et al. Hypoxic glioma-derived exosomes promote M2-like macrophage polarization by enhancing autophagy induction[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):373.

[22] WANG X, LUO G, ZHANG K, et al. Hypoxic tumor-derived exosomal miR-301a mediates M2 macrophage polarization via PTEN/PI3K γ to promote pancreatic cancer metastasis[J]. *Cancer Research*, 2018, 78(16):4586-4598. (下转第 115 页)

Asian Pac J Cancer Prev, 2016,17(1):381-386.

[2] MARTINEZ RODRIGUEZ R H, BUISAN RUEDA O, IBARZ L. Bladder cancer: Present and future[J]. Med Clinica Engl Ed, 2017,149(10):449-455.

[3] HAQUE S, MORRIS J C. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer[J]. Hum Vaccines Immunother, 2017,13(8):1741-1750.

[4] ITATANI Y, KAWADA K, SAKAI Y. Transforming growth factor- β signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23):5822.

[5] JIANG Y S, CHEN M, NIE H, et al. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: Clinical implications and future considerations[J]. Hum Vaccin Immunother, 2019,15(5):1111-1122.

[6] NEWSTED D, BANERJEE S, WATT K, et al. Blockade of TGF- β signaling with novel synthetic antibodies limits immune exclusion and improves chemotherapy response in metastatic ovarian cancer models [J]. Oncoimmunology, 2019, 8(2): e1539613.

[7] SUZUKI H I, KIYONO K, MIYAZONO K. Regulation of autophagy by transforming growth factor- β (TGF- β) signaling [J]. Autophagy, 2010,6(5):645-647.

[8] BATLLE E, MASSAGUE J. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer[J]. Immunity, 2019,50(4): 924-940.

[9] LI M O, FLAVELL R A. Contextual regulation of inflammation: A duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10[J]. Immunity, 2008, 28(4):468-476.

[10] PRINCIPE D R, DOLL J A, BAUER J, et al. TGF- β : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis[J]. Natl Cancer Inst, 2014,106(2):369.

[11] COLAK S, TEN DIJKE P. Targeting TGF- β signaling in cancer[J]. Trends Cancer, 2017,3(1):56-71.

[12] AKHURST R J, HATA A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012,11(10): 790-811.

[13] CALON A, LONARDO E, BERENGUER-LLERGO A, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer[J]. Nat Genet, 2015, 47(4):320-329.

[14] AGAJANIAN M, RUNA F, KELBER J A. Identification of a PEAK1/ZEB1 signaling axis during TGF β /fibronectin-induced EMT in breast cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015,465(3):606-612.

[15] STOJNEV S, KRSTIĆ M, ĆUKURANOVIĆ KOKORIS J, et al. Prognostic impact of canonical TGF- β signaling in urothelial bladder cancer [J]. Medicina (Kaunas), 2019, 55(6):302.

[16] THOMA C. Bladder cancer: Mechanisms of anti-PDL1 resistance[J]. Nat Rev Urol, 2018,15(4):201.

[17] HAN Y Y, LIU D D, LI L H. PD-1/PD-L1 pathway: Current researches in cancer[J]. Am J Cancer Res, 2020,10(3):727-742.

[18] COOPER W A, TRAN T, VILAIN R E, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma[J]. Lung Cancer, 2015,89(2):181-188.

[19] SALMANINEJAD A, KHORAMSHAHI V, AZANI A, et al. PD-1 and cancer: Molecular mechanisms and polymorphisms[J]. Immunogenetics, 2018,70(2):73-86.

[20] OHAEGBULAM K C, ASSAL A, LAZAR-MOLNAR E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway[J]. Trends Mol Med, 2015, 21(1):24-33.

[21] SHIMA T, SHIMODA M, SHIGENOBU T, et al. Infiltration of tumor-associated macrophages is involved in tumor programmed death-ligand 1 expression in early lung adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2020,111(2):727-738.

[22] CHATTERJEE S, CHATTERJEE A, JANA S, et al. Transforming growth factor beta orchestrates PD-L1 enrichment in tumor-derived exosomes and mediates CD8 T-cell dysfunction regulating early phosphorylation of TCR signalome in breast cancer[J]. Carcinogenesis, 2021,42(1):38-47.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 110 页)

[23] ZHOU S Y, LAN Y, LI Y Q, et al. Hypoxic tumor-derived exosomes induce M2 macrophage polarization via PKM2/AMPK to promote lung cancer progression [J]. Cell Transplant, 2022,31:9636897221106998.

[24] WANG X, ZHOU Y, DONG K, et al. Exosomal lncRNA HMMR-AS1 mediates macrophage polarization through miR-147a/ARID3A axis under hypoxia and affects the progression of hepatocellular carcinoma[J]. Environ Toxicol, 2022,37(6): 1357-1372.

[25] HILL M, TRAN N. miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer [J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): dmm047662.

[26] LI X Y, SONG H X, LIU Z R, et al. miR-1260b promotes cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma by tar-

geting the regulator of G-protein signaling 22 [J]. Biotechnol Lett, 2018,40(1):57-62.

[27] ZHANG H B, ZHANG X L, YU J Y. Integrated analysis of altered lncRNA, circRNA, microRNA, and mRNA expression in hepatocellular carcinoma carrying TERT promoter mutations[J]. J Hepatocell Carcinoma, 2022,9:1201-1215.

[28] SHEN S, HUANG J, XU C, et al. ERK modulates macrophage polarization and alters exosome miRNA expression in diabetic nephropathy[J]. Clinical Laboratory, 2021,67(12).

[29] YOU Y, ZOU M, ZHOU ZHIHANG, et al. Hypoxia-induced exosomes promote hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis via miR-1273f transfer[J]. Exp Cell Res, 2019,385(1):111649.

(本文编辑 耿波 厉建强)