



M2型巨噬细胞外泌体包裹miR-374a促进前列腺癌恶性进展的机制研究

关翰, 孙文衍, 汪盛, 陈志军

引用本文:

关翰,孙文衍,汪盛,陈志军. M2型巨噬细胞外泌体包裹miR-374a促进前列腺癌恶性进展的机制研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2023, 48(6): 701-711.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.06.001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[基于CRISPR/Cas9技术的miR-374a低表达细胞系的构建及鉴定](#)

Constructing and identifying of cell line with low-expression miR-374 a based on CRISPR/Cas9 system
蚌埠医学院学报. 2019, 44(5): 561-565 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.05.001>

[外泌体介导的miR-18b-5p调控NEDD9对乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响](#)

Study on the exosome-mediated miR-18b-5p in promoting the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells by regulating NEDD9

蚌埠医学院学报. 2022, 47(2): 141-145 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.02.001>

[紫杉醇耐药乳腺癌细胞外泌体来源的miR-5585-5p诱导乳腺癌细胞产生耐药表型研究](#)

Study on the drug-resistant phenotypes of breast cancer cells induced by exosomal miR-5585-5p derived from paclitaxel-resistant breast cancer cells

蚌埠医学院学报. 2021, 46(8): 989-993 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.08.001>

[lncRNA LINC00173通过调节miR-130a-5p抑制骨肉瘤发生发展的机制研究](#)

Mechanism of lncRNA LINC00173 inhibiting the development of osteosarcoma by regulating miR-130a-5p
蚌埠医学院学报. 2022, 47(12): 1623-1627 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.12.002>

[下调MTHFD2对前列腺癌PC3细胞的侵袭和转移的作用及影响机制](#)

Down-regulation of MTHFD2 inhibits invasion and metastasis in prostate cancer PC3 cells

蚌埠医学院学报. 2023, 48(3): 286-289 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.03.002>

M2 型巨噬细胞外泌体包裹 miR-374a 促进前列腺癌恶性进展的机制研究

关 翰, 孙文衍, 汪 盛, 陈志军

[摘要] **目的:** 探究 M2 型巨噬细胞外泌体包裹 miR-374a 对前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 恶性进展的影响并探讨其分子机制。**方法:** 在成功建立 M2 型巨噬细胞的基础上, 抽提并鉴定其外泌体, 检测外泌体中差异表达的 miRNA, 同时在不同 PCa 细胞中验证, 选取 miR-374a 进行研究; M2 细胞中转染 cy3 荧光标记的 miR-374a 与 PC3 细胞共培养, 荧光显微镜观察 PC3 细胞中 cy3 荧光表达情况; DU145 和 PC3 细胞中转染 miR-374a inhibitor 进行增殖、迁移等细胞功能学实验及裸鼠皮下成瘤实验; 通过数据库筛选叉头盒转录因子 (FOXO1) 作为靶基因, 通过 Western blotting、荧光素酶报告基因实验及免疫荧光实验进行验证; 干扰 FOXO1 后进行细胞功能学实验, 观察是否能逆转 miR-374a inhibitor 对 DU145 及 PC3 细胞功能学的影响。**结果:** 成功建立 M2 细胞并抽提其外泌体, 其中 miR-374a 在 M2 细胞外泌体中高表达; 荧光定量 PCR 实验结果证明 miR-374a 在 PC3 及 DU145 中表达量显著高于 LNCaP, 在 M2 细胞中表达量高于 THP-1 细胞, PC3 细胞与 M2 细胞共培养后, M2 细胞可通过外泌体传递 miR-374a 至 PC3 细胞内; 敲低 PC3 和 DU145 细胞中 miR-374a 的表达量后显著降低其增殖、迁移能力并促进其凋亡, 在 PC3 中敲低 miR-374a 表达后裸鼠皮下成瘤体积显著减小; Western blotting、荧光素酶报告基因实验及免疫荧光实验结果证明 miR-374a 可以直接结合 FOXO1, 抑制 β -catenin 入核并抑制 PCa 细胞 EMT; 挽救实验结果说明转染 si-FOXO1 后可逆转 miR-374a 对 PC3 和 DU145 细胞迁移的抑制作用。**结论:** M2 细胞可通过外泌体传递 miR-374a 进入 PCa 细胞靶向 FOXO1 抑制其恶性进展。**[关键词]** 前列腺肿瘤; M2 型巨噬细胞; 外泌体; miR-374a; 叉头盒转录因子

[中图分类号] R 737.25 [文献标志码] A DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.06.001

Mechanism of miR-374a encapsulation in M2 macrophage exosomes promotes malignant progression of prostate cancer

GUAN Han, SUN Wen-yan, WANG Sheng, CHEN Zhi-jun

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of miR-374a encapsulated by M2 macrophage exosomes on the malignant progression of prostate cancer (PCa) and explore its molecular mechanism. **Methods:** Based on the successful establishment of M2 macrophages, the exosomes were extracted and identified, and the differentially expressed miRNAs in exosomes were detected. MiR-374a was verified in different PCa cells; M2 cells transfected with cy3 fluorescently labeled miR-374a were cocultured with PC3 cells, and the expression of cy3 fluorescence in PC3 cells was observed by fluorescence microscope; DU145 and PC3 cells were transfected with miR-374a inhibitor for cell function experiments. Forkhead box O1 (FOXO1) was selected as the target gene through the database, which was verified by Western blotting, luciferase reporter gene assay and immunofluorescence experiment; after interfering with FOXO1, cell function experiments were carried out to observe whether miR-374a inhibitor could reverse the effects on DU145 and PC3 cells. **Results:** M2 cells were successfully established and their exosomes were extracted, and miR-374a was highly expressed in the exosomes of M2 cells; the results of fluorescence quantitative PCR showed that the expression of miR-374a in PC3 and DU145 cells was significantly higher than that in LNCaP cells, and the expression in M2 cells was higher than that in THP-1 cells. After co culture of PC3 cells and M2 cells, M2 cells could transmit miR-374a to PC3 cells through exosomes; knockdown of miR-374a expression in PC3 and DU145 cells significantly reduced their proliferation, migration ability and promoted their apoptosis. Knockdown of miR-374a expression in PC3 significantly reduced the subcutaneous tumor formation volume of nude mice; the results of Western blotting, luciferase reporter gene assay and immunofluorescence assay demonstrated that miR-374a could directly bind to FOXO1 and inhibit β -catenin enters nucleus and inhibits EMT in PCa cells; the results of rescue experiment showed that transfection of si-FOXO1 could reverse the inhibitory effect of miR-374a on the migration of PC3 and DU145 cells. **Conclusions:** M2 cells can deliver miR-374a into PCa cells through exosomes to target FOXO1 and

[收稿日期] 2022-03-02 [修回日期] 2022-11-13

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(2008085QH358); 安徽高校自然科学基金项目(KJ2019A0355); 蚌埠医学院“512”人才培育计划(by51202306); 蚌埠医学院第一附属医院优秀青年科学基金项目(2019byfyfyq09)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 泌尿外科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 关 翰(1987-), 男, 博士, 副主任医师, 副教授。

[通信作者] 陈志军, 硕士研究生导师, 主任医师, 副教授。E-mail: 1084243167@qq.com

inhibit its malignant progression.

[Key words] prostate neoplasms; M2 macrophage; exosome; miR-374a; Forkhead box O1

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是男性常见的恶性肿瘤, 在导致男性癌症死亡的原因里名列前茅^[1]。早期 PCa 的治疗方案为去雄激素治疗, 随着病情的进展, 多数会进展为去势抵抗型 PCa (castration-resistant prostate cancer, CRPC), 这一阶段的 PCa 已对雄激素不敏感, 是目前的治疗难题^[2]。同时, 有 50% ~ 70% 的 CRPC 病人最终发生远处转移, 成为导致死亡的主要原因^[3], 探究促使 PCa 发生恶性进展的机制, 使病人获得更好的预后显得尤为重要。近年来 PCa 的肿瘤微环境受到越来越多的关注, 因其在调节肿瘤进展和转移扮演着重要角色^[4]。肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 是肿瘤微环境中最丰富的免疫细胞群, 在肿瘤转移过程中具有广泛的促肿瘤作用。巨噬细胞在局部微环境中可能会对不同的刺激表现出不同的表型。一般说来, 在各种外界因素刺激下, 巨噬细胞可以分化为经典的促炎型 M1 巨噬细胞和抗炎型 M2 巨噬细胞, M2 型巨噬细胞能促进肿瘤进展^[5], 因此, TAMs 似乎更有可能被归类为 M2 巨噬细胞, 尽管其具有同时表达 M1 和 M2 标志的混合表型。M2 型巨噬细胞释放的细胞因子或蛋白与肿瘤细胞的耐药、侵袭和转移密切相关。外泌体是直径在 20 ~ 200 nm 之间的脂质双层膜囊泡。外泌体可以包裹微小 RNA、长非编码 RNA、蛋白质和其他生物活性物质, 调控生理和病理条件下细胞的活动^[6], 可以由癌细胞或非癌细胞分泌, 并可以被微环境中的其他细胞吸收, 从而影响到其他细胞的生物学功能^[7]。在前期研究^[8]中, 笔者发现在 PCa 组织中 M2 型巨噬细胞含量比前列腺增生组织高, 并鉴定了一些在 M2 型巨噬细胞外泌体和 THP-1 外泌体中差异标的 miRNA, 其中 miR-374a 在 M2 型巨噬细胞外泌体内高表达。本研究进一步体外和体内实验表明, miR-374a 可通过 M2 外泌体传递至 PCa 细胞内, 并可靶向叉头盒转录因子 1 (FOXO1) 增强 PCa 细胞的增殖、侵袭和上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的能力。现作报道。

1 材料与方法

1.1 细胞的获取 PC3、DU145 和 LNCaP 三种前列腺癌细胞以及前列腺上皮细胞 RWPE-1 购自 ATCC 细胞库, 细胞培养液为 RPMI1640 (Gibco), 含 10% 的胎牛血清以及双抗 (Gibco)。细胞培养在 37 °C、

5% CO₂、95% 饱和湿度的细胞培养箱中进行。人单核细胞系 THP-1 购自广州赛库, 在含有 10% 胎牛血清 (Gibco)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 中培养。为了诱导 THP-1 细胞向 M2 型巨噬细胞转化, 在 THP-1 细胞中加入 200 ng/mL PMA (南京春秋生物) 24 h, 然后再与 20 ng/mL IL-4 和 20 ng/mL IL-13 培养 48 h。流式细胞仪检测 M1、M2 标志物的表达。

1.2 外泌体的抽提与鉴定 THP-1 细胞和 M2 型巨噬细胞在 RPMI1640 中培养 48 h 后, 将条件培养液 350 g 离心 10 min, 再 2 000 g 离心 30 min, 去除细胞和细胞碎片。将离心后的上清液以 10 000 g 离心 30 min 和 100 000 g 离心 70 min。离心后的外泌体悬浮于 50 ~ 100 μL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。超速离心机型号为 Beckman Optima L-80XP。透射电镜观察外泌体形态, 使用纳米粒子跟踪分析 (Particle Metrix's ZetaView) 证明外泌体 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{10}$ /mL, 并且进一步使用 Western blotting 检测外泌体标志物。使用红色亲脂荧光染料 Dil 标志通过高速离心法抽提的外泌体。将 Dil 标记的外泌体分别与 PC3 和 DU145 细胞孵育 24 h, 使用荧光显微镜 (Olympus FV1200, Japan) 观察 PC3 和 DU145 细胞对 Dil 标记的外泌体的摄取情况。

1.3 细胞的共培养 cy3 荧光标记的 miR-374a 购买自西安瑞禧生物科技有限公司, GW4869 购买自 MCE 公司。将前列腺癌细胞 PC3 种入 24 孔板中, 小室内种入转染过 cy-3-miR-374a 的 M2 型巨噬细胞, 共培养 24 ~ 48 h 后使用荧光显微镜进行观察, 对照组加入外泌体抑制剂 GW4869。

1.4 荧光定量 PCR 实验 Trizol 提取细胞中的 RNA, 使用外泌体 RNA 提取试剂盒 (BIOG Exosome RNA Easy Kit) 按照说明书进行操作获取外泌体中的 RNA。逆转录试剂盒 (Thermo Fisher) 按照说明书进行操作。miRNA 逆转录引物为 RT-Primer, 内参和 mRNA 的逆转录引物为 Random Hexamer Primer。将 RNA 逆转录为 cDNA。荧光试剂盒购买自罗氏公司。八连管中加入引物, cDNA 模板、荧光染料, 无菌去离子水补足体积至 20 μL。上机检测仪器 PCR 条件设置为 95 °C 10 min, 40 个循环, 循环条件 95 °C 15 s, 60 °C 1 min。循环结束后在 60 °C 时收集数据, 绘制扩增曲线。以 U6 作为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-183-5p 的相对含量。

1.5 细胞的转染 基于 miRBase 数据库,从上海吉玛公司购买获得 miR-374a-5p mimic (UUA UAA UAC AAC CUG AUA AAG UG)、miR-374a-5p mimic control (UUU GUA CUA CAC AAA AGU ACU G)、miR-374a-5p inhibitor (CAC UUA UCA GGU UGU AUU AUA A) 和 miR-374a-5p inhibitor control (CAG UAC UUU UGU GUA GUA CAA A) 以及 FOXO1 siRNA (si-FOXO1) 和具有非特异性序列的阴性对照 siRNA (si-NC)。将 DU145 和 PC3 细胞接种在 6 孔板中,并按照制造商的方案使用 Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) 进行转染。在转染后 48 h,使用细胞进行功能测定。慢病毒颗粒的包装如下:3 个慢病毒表达质粒由上海吉玛公司构建,含有针对 miR-374a 的 siRNA,并用于在 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene 存在下感染 PC3 细胞。通过嘌呤霉素筛选细胞,并通过 qRT-PCR 确认 miR-374a 的敲低。miR-374a 的 stem-loop RT 引物如下:5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG CAC TTA GC-3'; miR-374a-5p 上下游引物序列: Forward, 5'-3' CCT GAT AAG TGG TCG TAT CCA GT; Reverse, 5'-3' GTA TCC AGT GCG TGT CGT GG。

1.6 CCK8 实验 细胞转染 48 h 后,均匀接种于 96 孔板(1 000 个细胞/孔)中。然后将细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的潮湿环境中培养 24、48、72 和 96 h。在每个时间点,将细胞与 20 μL 细胞计数试剂盒溶液(碧云天)孵育,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 中孵育 4 h,以评估细胞的增殖能力。用分光光度计在 495 nm 波长处测定吸光度。每次实验重复 3 次。

1.7 EdU 及 TUNEL 实验 EdU 和 TUNEL 试剂盒均购买自罗氏公司,实验步骤简述如下。EdU 实验:将处理完毕的细胞接种到 24 孔板中,加入 EdU 培养基后在细胞培养箱中培养 2 h。用 4% 多聚甲醛固定,甘氨酸孵育,根据说明书加入试剂后使用荧光显微镜观察细胞图像;TUNEL 实验:每组转染细胞接种于密度为 $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的培养皿中 24 h。弃去培养基,用 PBS 洗涤 3 次。然后用 4% 的多聚甲醛固定细胞,用 0.5% 的 Triton X 进行透膜,按照说明书操作完成剩余步骤后使用荧光显微镜观察。

1.8 Western blotting 实验 收集细胞进行裂解,提取总蛋白。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE 分离蛋白,随后使用 PVDF 膜 (Millipore) 进行转膜。转膜完毕后使用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,使用一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤后二抗(1:2 000)孵育 1~2 h,用 TBST 洗涤 PVDF 膜,随后用 ECL 发光检测试剂盒(碧云天)在化学发光检测系统进行显色。

Western blotting 定量分析采用 Image-Pro Plus 软件进行(Media Cybernetics)。抗体信息: anti-FOXO1 antibody (ab207204, Abcam), anti-E-cadherin antibody (ab1416, Abcam), anti-N-cadherin antibody (ab18203, Abcam), anti-Vimentin antibody (ab92547, Abcam)。

1.9 流式细胞凋亡检测 细胞铺 6 孔板,待生长至 70% 分别转染,3 d 后可进行实验。PBS 洗涤细胞 2 次,采用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,计数调整浓度,PI/AV 染色(吉凯生物),流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.10 细胞迁移和侵袭检测 分别使用不带有 Matrigel 和预铺 Matrigel 的 Transwell 小室进行细胞迁移和侵袭实验。小室上层为无血清培养基,下层为含 10% 血清的培养基。加入细胞培养 7~12 h 后固定,结晶紫染色,去除上层细胞,显微镜下计数穿过薄膜的细胞。

1.11 划痕实验 将细胞接种在 6 孔板中用丝裂霉素 C(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理 1 h 排除增殖的影响。使用无菌移液管尖端在孔中形成直伤口,并使用 PBS 去除漂浮细胞。倒置显微镜在 0 和 36 h 拍摄细胞迁移图像,并通过 Image J 分析软件测量细胞迁移距离,选择了 3 个距离并取平均值。

1.12 平板克隆实验 细胞以每孔 500 个细胞的密度接种于 6 孔板中,在培养箱中培养 12 d。处理时细胞用 PBS 清洗 3 次,甲醇固定 15 min,室温下用 300 μL 0.1% 结晶紫染色 20 min。用 ImageJ 2X 软件计数含有 50 个以上细胞的集落。

1.13 裸鼠皮下成瘤实验 6 周龄 BALB/C 裸鼠购自扬州大学比较医学中心。所有动物实验均经蚌埠医学院第一附属医院机构动物爱护使用委员会和伦理委员会批准。实验根据美国国家实验动物护理和使用研究所健康指南进行。将转染慢病毒的 PC3 细胞胰酶消化后悬浮在 PBS 中,将细胞(4×10^6 个)注射到裸鼠侧腹皮下种植 7 周。7 周后,通过颈椎脱位处死裸鼠。用游标卡尺测量肿瘤最长直径和最短直径,体积 = $1/2$ (长径 \times 短径²) 计算肿瘤体积。部分切除组织用于 Western blotting 检测。

1.14 免疫荧光实验 将细胞用 PBS 洗涤 3 次,用 4% 多聚甲醛固定,使用 0.2% Triton X-100 透膜。向细胞中加入抗体并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。第 2 天将在室温下孵育 15 min 的细胞与二抗一起孵育。随后的实验在黑暗中进行。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min 并用 PBS 清洗 3 次后,使用荧光共聚焦显微镜(Carl Zeiss LSM800 型)进行观察。

1.15 荧光素酶报告基因实验 由上海吉玛基因合成了 FOXO1 3'-非翻译区(3'-UTR)片段,其中包含可能的 miR-374a 结合序列。将野生型和突变型 FOXO1 3'-UTR 亚克隆到 psiCHECK-2™ 载体中,获得 psi-check-FOXO1-wt 和 psi-check-FOXO1-mut。将 DU145 和 PC3 细胞接种于 24 孔板中,在 37 °C 下用 Lipofectamine2000 试剂分别与 miR-374a 模拟物或 NC、FOXO1-WT 或 FOXO1-mut 质粒共转染,48 h 后用双荧光素酶报告分析系统进行检测。采用化学发光法检测荧光素酶活性。重复测量 3 次,计算平均值。

1.16 统计学方法 采用 *t* 检验、方差分析及 *q* 检验。

2 结果

2.1 成功构建 M2 型巨噬细胞并抽提鉴定其外泌体 通过流式细胞仪检测 CD68、CD86 及 CD206 的表达量,结果可见 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 表达量较 M0 和 M1 型巨噬细胞相比均明显升高(见图 1A 和表 1)。同时抽提 M2 型巨噬细胞进行电镜观察,可见抽提的外泌体呈典型的茶托形状(见图 1B)。纳米粒子跟踪分析显示外泌体粒径的集中趋势在 110 nm 左右。Western blotting 检测外泌体膜标志物 CD63 及 TSG101 阳性,同时不表达 GM130(见图 1C),结合外泌体电镜照片、粒径分析及 Western blotting 检测外泌体膜标志物,确定抽提物质为 M2 型巨噬细胞外泌体。

表 1 M0、M1、M2 型巨噬细胞标志物 CD86 和 CD206 阳性率比较($\bar{x} \pm s$;%)

分组	<i>n</i>	CD86 阳性率	CD206 阳性率
M0	5	2.20 ± 0.83	3.04 ± 0.97
M1	5	84.40 ± 4.82*	3.22 ± 1.80
M2	5	7.20 ± 1.92**	83.40 ± 4.61**
<i>F</i>	—	1 153.82	1 263.39
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	—	9.203	8.500

q 检验:与 M0 比较 **P* < 0.05; 与 M1 比较 #*P* < 0.05

2.2 M2 型巨噬细胞外泌体包裹 miR-374a 传递至 PCa 细胞内 荧光定量 PCR 结果显示,与人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 相比,miR-374a 在前列腺癌细胞系 DU145、PC3 和 LNCaP 中均高表达(*P* < 0.05),与 THP-1 细胞相比,miR-374a 在 M2 型巨噬细胞中显著高表达(*P* < 0.05 和 *P* < 0.01)(见表 2~3)。转染 cy3 荧光标志的 miR-374a 后的 M2 型巨噬细胞与 PC3 细胞在非接触共培养体系中共培养

后 PC3 中 miR-374a 表达量显著升高(*P* < 0.05),但在共培养体系中加入外泌体抑制剂 GW4869,共培养后 PC3 中 miR-374a 表达无明显变化(*P* > 0.05)(见表 4)。使用红色 DiI 荧光标志外泌体,并与 PC3 细胞共培养,荧光显微镜可观察到外泌体被 PC3 细胞吸收,蓝色 DAPI 荧光为细胞核,红色为 DiI 荧光(见图 2A~2C)。转染 cy3 荧光标志的 miR-374a 后的 M2 型巨噬细胞与 PC3 细胞非接触共培养,荧光显微镜观察到 PC3 中存在 cy3 的绿色荧光,在共培养体系中加入 GW4869 则荧光显微镜在 PC3 中无法观察到绿色荧光。抽提 cy3 荧光标志的 miR-374a 后的 M2 型巨噬细胞外泌体与 PC3 细胞共培养,亦可在细胞中观察到 cy3 的绿色荧光(见图 2D~2H),代表 miR-374a 可通过 M2 型巨噬细胞外泌体传递至 PC3 细胞内。

表 2 miR-374a 在不同细胞中的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	miR-374a 相对表达量
DU145	3	2.82 ± 1.10*
PC3	3	3.00 ± 0.31*
LNCaP	3	1.31 ± 0.70*
RWPE-1	3	1.00 ± 0.25
<i>F</i>	—	6.77
<i>P</i>	—	<0.05
<i>MS</i> 组内	—	0.465

q 检验:与 RWPE-1 比较 **P* < 0.05

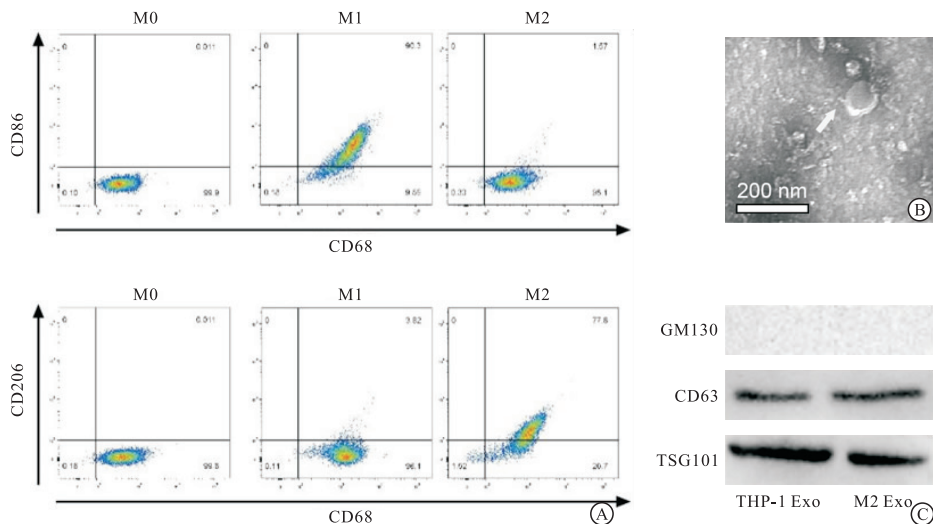
表 3 miR-374a 在 M2 和 THP-1 中的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	miR-374a 相对表达量
M2	5	9.24 ± 1.01
THP-1	5	1.82 ± 1.15
<i>t</i>	—	10.84
<i>P</i>	—	<0.01

表 4 不同分组外泌体与 PC3 细胞共培养后 miR-374a 相对表达量的变化($\bar{x} \pm s$)

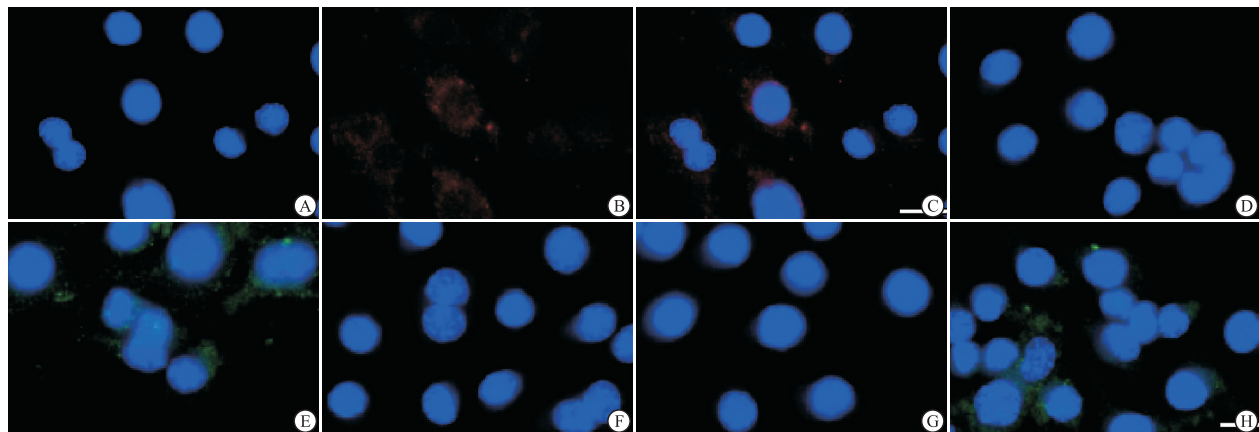
分组	<i>n</i>	miR-374a 相对表达量
PC3	5	1.00 ± 0.10 [#] ▲
M2-NC Exo	5	1.41 ± 0.20 [▲]
M2-miR-374a-cy3 Exo	5	2.14 ± 0.22 [#]
M2-miR-374a-cy3 Exo + GW4869	5	1.09 ± 0.08
<i>F</i>	—	49.58
<i>P</i>	—	<0.01
<i>MS</i> 组内	—	0.026

q 检验:与 M2-miR-374a-cy3 Exo 比较 #*P* < 0.05; 与 M2-NC Exo 比较 ▲*P* < 0.05



A: M2型巨噬细胞标志物CD206表达量较M0和M1型巨噬细胞相比均明显升高, CD206阳性细胞率>80%; B: 外泌体电镜图片, 呈典型的茶托形状; C: Western blotting检测外泌体膜标志物CD63及TSG101阳性, 同时不表达GM130, 代表成功抽提外泌体

图1 成功构建M2型巨噬细胞并抽提鉴定其外泌体



A: DAPI; B: DiI; C: Merge; D: M2-NC; E: M2-miR-374a-cy3; F: GW4869; G: M2-NC Exo; H: M2-miR-374a-cy3 Exo; A~C: DiI荧光标志的外泌体与PC3细胞共培养后, 荧光显微镜可观察到外泌体被PC3细胞吸收; D~H: 转染cy3荧光标志的miR-374a后的M2型巨噬细胞与PC3细胞非接触共培养, 荧光显微镜观察到PC3中存在cy3的绿色荧光, 共培养体系中存在GW4869则无荧光; 抽提cy3荧光标志的miR-374a后的M2型巨噬细胞外泌体于PC3细胞共培养, 亦可在细胞中观察到cy3荧光

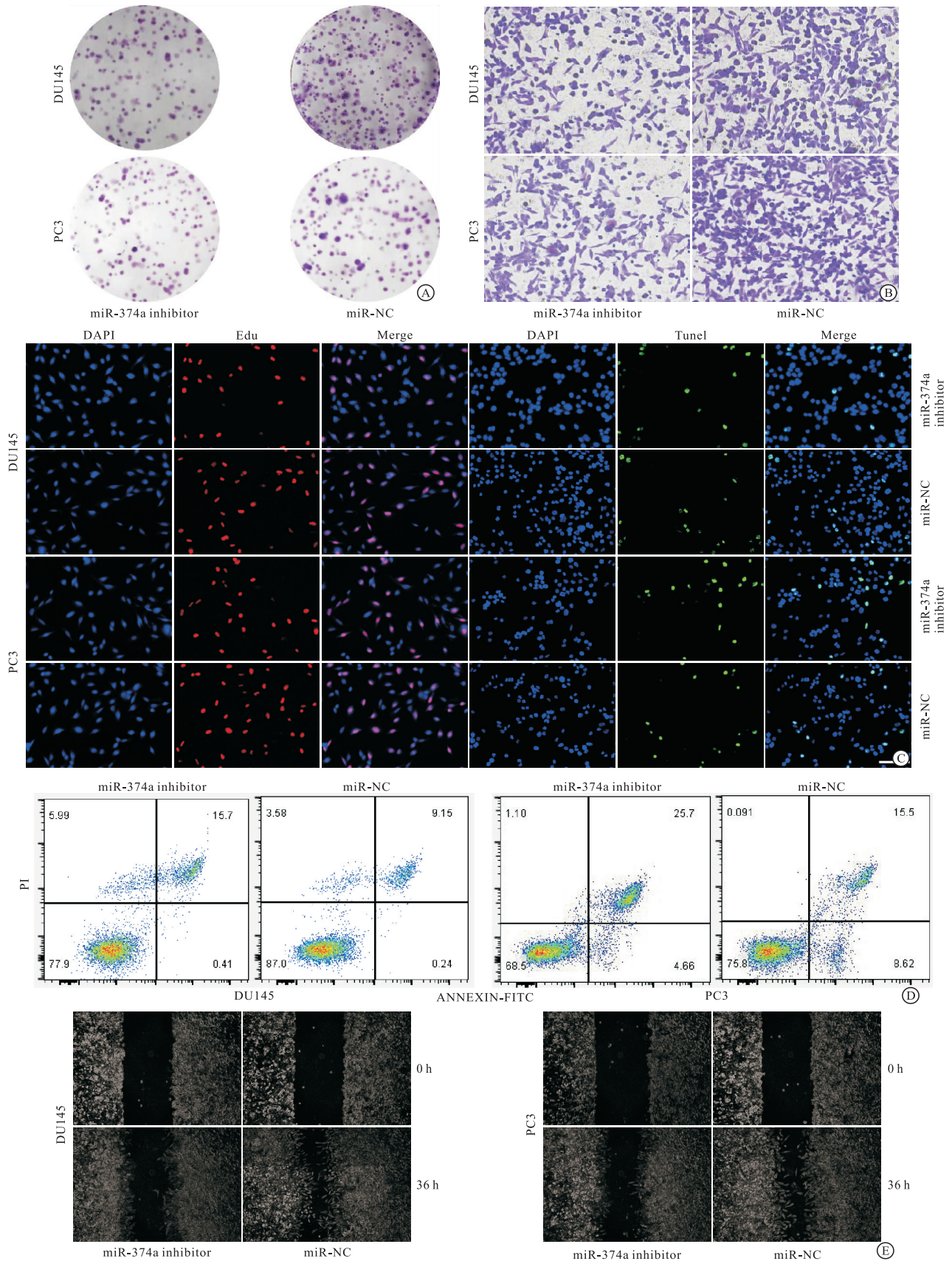
图2 M2型巨噬细胞外泌体包裹miR-374a传递至Pca细胞内

2.3 miR-374a 可促进 PC3 和 DU145 细胞的增殖、侵袭迁移能力并抑制其凋亡 通过瞬时转染 miR-374a 进行细胞功能学实验, 克隆形成实验、EdU 实验结果验证抑制 miR-374a 后细胞增殖能力减弱 ($P < 0.01$) (见表 5 及图 3A ~ 3C); TUNEL 实验、凋亡

实验证实抑制 miR-374a 后促进细胞凋亡 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 5 ~ 6 及图 3C ~ 3D); 侵袭实验、细胞划痕实验证实抑制 miR-374a 后抑制细胞侵袭及迁移能力 ($P < 0.01$) (见表 7 及图 3B ~ 3E)。

表 5 转染 miR-374a inhibitor 后细胞增殖能力的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	克隆数量		Edu 阳性细胞率/%		TUNEL 阳性细胞率/%	
		DU145	PC3	DU145	PC3	DU145	PC3
miR-374a inhibitor	3	225.00 ± 18.02	201.66 ± 12.58	37.66 ± 2.51	40.00 ± 5.00	26.66 ± 4.16	24.00 ± 3.60
miR-NC	3	376.33 ± 21.22	323.33 ± 25.16	50.66 ± 5.13	62.33 ± 4.93	12.33 ± 2.51	13.66 ± 2.08
t	—	9.42	7.49	3.94	5.50	5.10	4.29
P	—	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05



A: 克隆形成实验结果显示转染miR-374a inhibitor后DU145及PC3细胞克隆形成能力下降; B: EdU及Tunel实验结果显示转染miR-374a inhibitor后抑制了PC3和DU145的EdU阳性细胞率并增加Tunel阳性细胞率; C: 转染miR-374a inhibitor后DU145及PC3细胞凋亡数量显著增高; D: 转染miR-374a inhibitor后DU145及PC3侵袭细胞数量下降; E: 转染miR-374a inhibitor后DU145及PC3细胞划痕愈合面积下降, 迁移能力下降

图3 miR-374a可促进PC3和DU145细胞的增殖、侵袭迁移能力并抑制其凋亡

2.4 miR-374a inhibitor 可抑制 PC3 细胞裸鼠皮下成瘤的瘤体生长 转染慢病毒稳定干扰 PC3 细胞内 miR-374a 的表达,进行裸鼠皮下成瘤实验,通过小动物成像仪观察瘤体 Luc 荧光(见图 4A),处死裸

鼠后测量瘤体体积,干扰 miR-374a 后可明显抑制瘤体生长(见图 4B),Western blotting 实验检测干扰 miR-374a 组瘤体组织中 FOXO1 对比对照组表达显著升高($P < 0.05$)(见图 4C、表 8)。

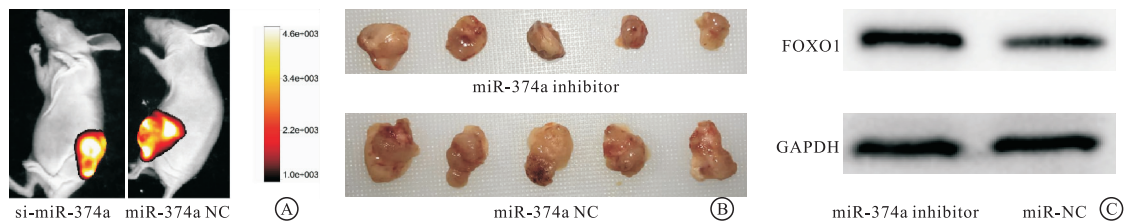


图4 miR-374a inhibitor可抑制PC3细胞裸鼠皮下成瘤的瘤体生长
A: 小动物成像仪观察裸鼠皮下成瘤荧光情况; B: 瘤体离体后测量大小,稳定转染miR-374a inhibitor后瘤体体积显著小于对照组; C: miR-374a inhibitor组瘤体组织中FOXO1对比对照组表达显著升高

图4 miR-374a inhibitor可抑制PC3细胞裸鼠皮下成瘤的瘤体生长

表 6 流式细胞凋亡实验验证转染 miR-374a inhibitor 后细胞凋亡能力变化($\bar{x} \pm s$; %)

分组	n	DU145	PC3
miR-374a inhibitor	5	21.00 ± 3.00	24.00 ± 2.64
miR-NC	5	10.00 ± 2.00	13.03 ± 1.06
t	—	5.28	5.88
P	—	<0.01	<0.01

表 7 转染 miR-374a inhibitor 后细胞迁移及侵袭能力的变化($\bar{x} \pm s$)

分组	n	划痕愈合比例/%		侵袭细胞数量	
		DU145	PC3	DU145	PC3
miR-374a inhibitor	3	35.33 ± 8.74	30.67 ± 6.02	238.33 ± 45.36	255.66 ± 24.00
miR-NC	3	74.00 ± 7.93	67.33 ± 5.50	429.33 ± 21.00	423.00 ± 49.66
t	—	5.67	5.50	6.61	5.25
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 8 转染 miR-374a inhibitor 后细胞成瘤能力变化($\bar{x} \pm s$)

分组	n	瘤体质量/g
miR-374a inhibitor	5	3.11 ± 0.96
miR-NC	5	4.96 ± 0.76
t	—	3.34
P	—	<0.05

2.5 miR-374a 靶向 FOXO1 促进 β -catenin 入核,促进前列腺细胞 EMT 预测网站结合文献选取 FOXO1 作为 miR-374a 潜在下游靶基因进行验证,荧光素酶报告基因实验结果提示 miR-374a 序列能直接结合到 FOXO1 3'UTR 区($P < 0.01$)(见表 9)。Western blotting 实验结果显示转染 miR-374a inhibitor 后可抑制 DU145 及 PC3 细胞 EMT 进展,同时 FOXO1 表达量升高,核内 β -catenin 表达量减低

(见图 5A),为进一步直观验证,免疫荧光实验观察到转染 miR-374a inhibitor 后 FOXO1 荧光强度减低,同时 β -catenin 荧光向细胞核外转移(见图 5B)。在前列腺增生及 PCa 组织中验证 FOXO1 表达量,提示增生组织中 FOXO1 表达量较高($P < 0.05$)(见表 10)。

表 9 荧光素酶报告基因实验各组荧光比值变化($\bar{x} \pm s$)

分组	n	DU145	PC3
miR-NC + p-FOXO1 WT	3	1.96 ± 0.12	1.75 ± 0.25
miR-374a + p-FOXO1 MUT	3	1.75 ± 0.17	1.63 ± 0.13
miR-374a + p-FOXO1 WT	3	1.12 ± 0.22 ^{**}	0.78 ± 0.10 ^{**}
F	—	18.76	28.15
P	—	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	0.031	0.030

q 检验:与 miR-NC + p-FOXO1 WT 组比较 * $P < 0.05$;与 miR-374a + p-FOXO1 MUT 组比较# $P < 0.05$

表 10 PCa 及前列腺增生组织中 FOXO1 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

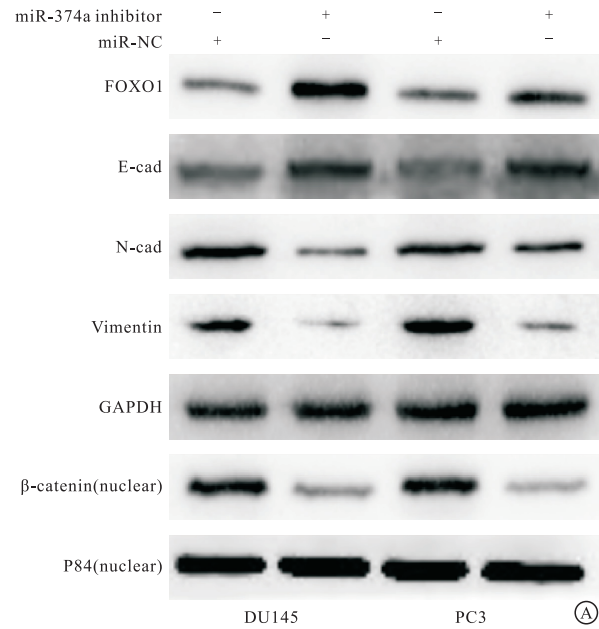
分组	n	FOXO1 相对表达量
增生组织	5	3.60 ± 1.26
PCa 组织	5	1.32 ± 0.30
t	—	3.91
P	—	<0.05

2.6 功能回复实验验证 si-FOXO1 可逆转 miR-374a inhibitor 对细胞侵袭能力及 EMT 造成的影响

为验证 si-FOXO1 效率,通过 Western blotting 实验检测干扰 FOXO1 后的表达,结果证明干扰后 PCa 细胞中的 FOXO1 表达量显著减低(见图 6A),同时干扰 FOXO1 表达后 PCa 细胞侵袭能力下降(见图 6B),为进一步探究 miR-374a 与 FOXO1 的关系,共转染后进行侵袭实验及 Western blotting 检测 EMT 相关指标,结果说明 si-FOXO1 可逆转 miR-374a

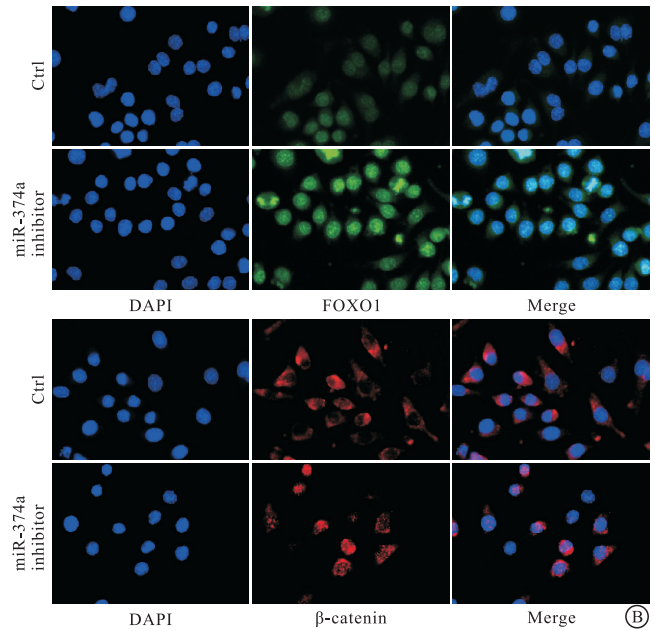
inhibitor 对细胞侵袭能力及 EMT 造成的影响 ($P <$

0.05 ~ $P < 0.01$) (见图 6C ~ 6D 及表 11)。



A: Western blotting 实验检测 FOXO1、EMT 相关指标及 β -catenin 变化, 结果显示转染 miR-374a inhibitor 后可抑制 DU145 及 PC3 细胞 EMT 进展, 同时 FOXO1 表达量升高, 核内 β -catenin 表达量减低; B: 免疫荧光显示转染 miR-374a inhibitor 后 FOXO1 荧光强度增高, 同时转染 miR-374a inhibitor 后 β -catenin 在细胞核内的表达增加

图5 miR-374a 靶向 FOXO1 促进 β -catenin 入核, 促进前列腺细胞 EMT



3 讨论

近年来越来越多的学者将注意力集中在肿瘤微环境中的细胞相互作用上^[8-9], 其中肿瘤相关巨噬细胞是研究的重点和热点。肿瘤相关巨噬细胞衍生的趋化因子和细胞因子, 如 CCL5、CCL17 和转化生长因子- β , 显著影响癌症进展的各个方面, 包括免疫逃逸、肿瘤扩散和治疗耐药等^[10]。此外有研究^[11]表明, 浸润的巨噬细胞群与癌细胞的生物学行为呈正相关关系, 并与病人预后不良密切相关。在本课题组前期研究^[12]中发现, 前列腺肿瘤组织中肿瘤相关巨噬细胞数量高于前列腺增生组织, 提示肿瘤相关巨噬细胞可能在 PCa 恶性进展中发挥作用。

大多数研究都集中在巨噬细胞分泌的细胞因子、分子或其他蛋白质上, 但考虑到 miRNAs 对癌细胞进展的调节作用, 还需要更多地关注 miRNAs。miRNAs 是一种非编码的单链 RNA 分子, 与靶基因的 3'-UTR 结合, 在转录后调节 mRNA 的表达。以往的研究仅局限于细胞或组织的 miRNA 差异表达, 而忽略细胞外泌体的作用, 它们也可能通过包裹运输 miRNA 来介导细胞与细胞之间的相互作用。例如, 外显子介导的载脂蛋白 E (ApoE) 的穿梭参与了 PI3K-Akt 信号通路的激活, 从而促进了胃癌细胞的迁移^[13]。此外, 膀胱癌细胞分泌的转化生长因子- β 可诱导成纤维细胞表型转化为与癌症相关的成纤维

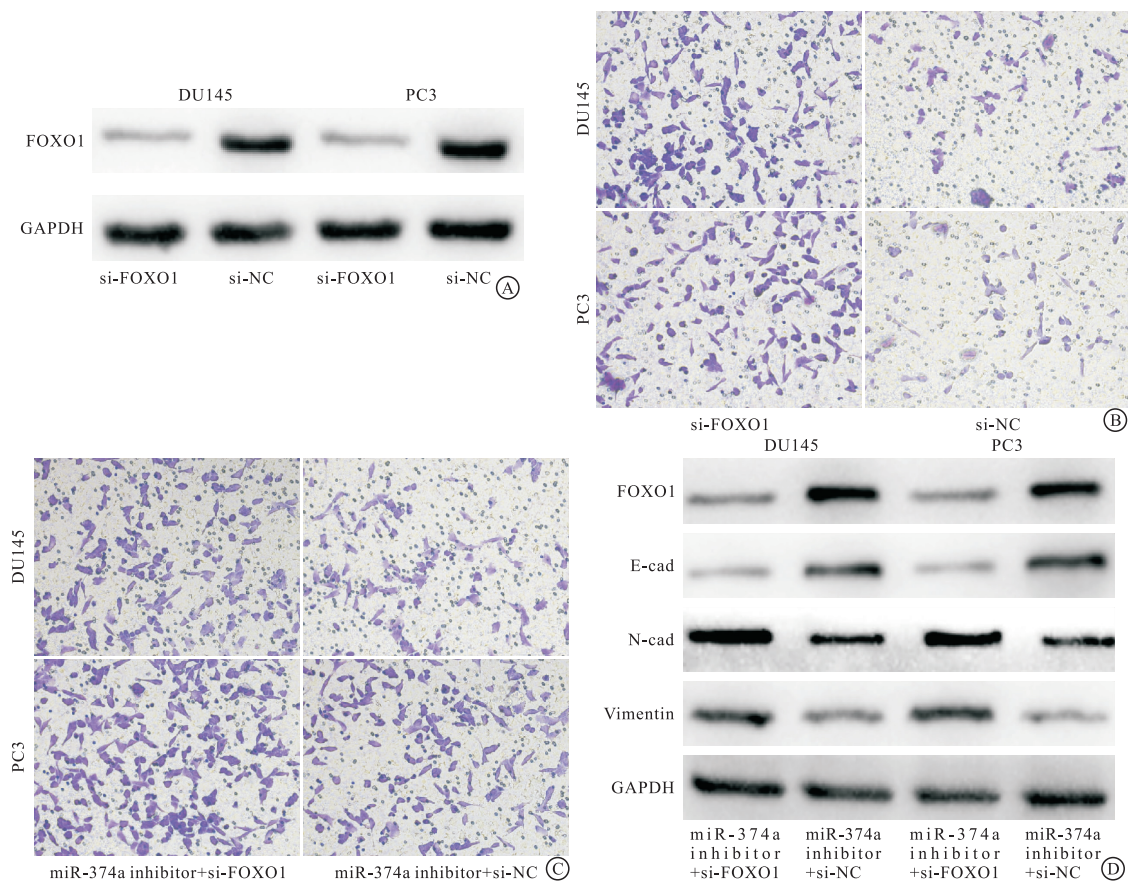
细胞^[14]。有研究团队^[15]发现 TAM 衍生的外切体中包含的 miR-21 和 miR-155 通过靶向 BRG1 表达促进结肠癌细胞的迁移和侵袭。有研究^[16]报道, 上皮性卵巢癌中 Treg/Th17 细胞的失衡主要归因于 TAM 外切体产生的 miRNA 水平异常, 因此, 笔者推测 TAM 外体释放的 miRNAs 影响 PCa 细胞的恶性行为。为了验证笔者的假设, 笔者进行了微阵列分析, 从 THP-1 和 M2 型巨噬细胞的外体中筛选出差异常表达的 miR-374a 并进行进一步实验。

miR-374a 在促进或抑制各种恶性肿瘤发展方面的不同作用使其难以达成共识^[17-19]。通过搜索相关文献, 尚未见明确证据表明 miR-374a 在 PCa 发生或进展中的调节作用研究, 这使得笔者值得进行进一步的研究。随后的 qRT-PCR 结果也与基因芯片结果吻合。笔者验证了外泌体释放的 miR-374a 可以直接被受体 PCa 细胞吸收, 并检测到 PCa 细胞中 cy3 标记的 miR-374a 的绿色荧光信号, 而添加外泌体抑制剂时未检测到绿色荧光。

在进行细胞功能学实验后, 笔者发现 miR-374a 在体外和体内可以显著促进 PCa 细胞的增殖并抑制细胞凋亡。为了寻找可能导致 miR-374a 的促肿瘤发生作用的下游靶点, 笔者通过靶基因预测网站选取交集结合文献, 预测 FOXO1 作为 miR-374a 的下游靶基因, 通过荧光素酶报告基因测定和蛋白质印迹验证。FOXO1 是叉头盒转录因子家族

(FOXO1、FOXO3、FOXO4 和 FOXO6)的重要成员,它已被证明为调节肿瘤的恶性过程的重要因子,包括细胞增殖、侵袭和转移^[20]。FOXO1 在促进或抑制多种恶性肿瘤的 EMT 过程中发挥着与不同的作用。一方面,ERK2 与 FOXO1/DOCK10 协同作用以促进细胞迁移和 EMT^[21],同时,FOXO1 参与 PIK3/AKT 通路来参与 IMPDH2 介导的结直肠癌 EMT 进展^[22]。然而另一方面,FOXO1 被发现受到上游 miRNA 的抑制,例如 miR-5188 和 miR-223,从而阻碍了乳腺癌和肺腺癌中的 EMT^[23-24]。在 PCa 发育过程中,绝大多数研究似乎都承认 FOXO1 通过受其

上游 mRNA 和 miRNA 调节或调节下游转录因子(包括 RUNX2)发挥抑制作用^[25-27]。在此基础上笔者发现 FOXO1 的表达可能受到 miR-374a 的抑制,从而促进 PCa 细胞的增殖和侵袭。从理论上讲,FOXO1 可以与细胞质中的 β -catenin 发生功能性相互作用,抑制 β -catenin 在细胞核中的积累并促进其降解,从而抑制已知 EMT 标志物和癌症转移关键调节剂的激活^[28-29]。本研究发现 miR-374a 通过抑制 FOXO1 表达发挥其对 PCa 恶性进展的促进作用,并进一步证明干扰 FOXO1 导致 β -catenin 在 PCa 细胞中的易位并显著增加 EMT 标志物的表达。



A: Western blotting比较转染si-FOXO1和si-NC后DU145和PC3细胞中FOXO1的表达水平,转染si-FOXO1后DU及PC3细胞中FOXO1表达量下降;B:侵袭实验检测转染si-FOXO1可促进DU145和PC3细胞的侵袭能力;C: si-FOXO1可逆转miR-374a inhibitor对细胞侵袭能力的抑制作用;D: miR-374a inhibitor与si-FOXO1或si-NC共转染PC3和DU145细胞,Western blotting分析FOXO1和EMT相关蛋白的表达,采用GAPDH作为内参,可见转染si-FOXO1后DU145及PC3细胞中FOXO1表达量下降,E-cad表达减少,N-cad及Vimentin表达量升高

图6 功能回复实验验证si-FOXO1可逆转miR-374a inhibitor对细胞侵袭能力及EMT造成的影响

表 11 功能回复实验各组细胞侵袭能力变化($\bar{x} \pm s$)

分组	n	DU145		PC3	
si-FOXO1	3	126.66 ± 7.63	129.00 ± 14.73	—	—
si-NC	3	68.33 ± 10.40	71.66 ± 12.58	—	—
miR-374a inhibitor + si-FOXO1	3	—	—	116.33 ± 12.66	147.66 ± 7.50
miR-374a inhibitor + si-NC	3	—	—	75.00 ± 13.00	90.66 ± 13.57
t	—	7.82	5.12	3.95	6.36
P	—	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01

本研究仍有一定的局限性,EMT 是肿瘤转移的关键步骤,还可以进行体内肺或骨转移测定以确定 miR-374a 是否会影响 PCa 细胞转移。此外,笔者的数据不支持涉及 Wnt/ β -catenin 途径或调节 miR-374a 表达的上游介质的进一步分子探索。除了考虑 miR-374a 和其他潜在靶 mRNA 之间的共同结合位点之外,识别和验证其他靶标及其效果对于提供额外的治疗方案是必不可少的。总之,本研究发现在 M2 型巨噬细胞中分离出的外泌体的驱动下,PCa 细胞在肿瘤微环境恶性行为为进一步发展,此外,笔者说明了 miR-374a/FOXO1/ β -catenin 轴在诱导 EMT 和加速 PCa 恶化中的作用,提示笔者可以通过研究针对 miR-374a/FOXO1/ β -catenin 轴的治疗方法来治疗 PCa 病人。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1):7.
- [2] RYAN CJ, SMITH MR, DE BONO JS, *et al.* Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy[J]. N Engl J Med, 2013, 368(2):138.
- [3] FALLOWFIELD L, PAYNE H, JENKINS V. Patient-reported outcomes in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13(10):643.
- [4] QUAIL DF, JOYCE JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. Nat Med, 2013, 19(11):1423.
- [5] NOY R, POLLARD JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy[J]. Immunity, 2014, 41(1):49.
- [6] BBECKER A, THAKUR BK, WEISS JM, *et al.* Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis[J]. Cancer Cell, 2016, 30(6):836.
- [7] WORTZEL I, DROR S, KENIFIC CM, *et al.* Exosome-mediated metastasis: communication from a distance[J]. Dev Cell, 2019, 49(3):347.
- [8] GUAN H, PENG R, FANG F, *et al.* Tumor-associated macrophages promote prostate cancer progression via exosome-mediated miR-95 transfer[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(12):9729.
- [9] 骆欣敏,何玉,吴凤娇,等. 外泌体 lncRNA MEG3 在子宫内膜癌中表达及其临床意义[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(5):627.
- [10] 杨硕,杨清玲. 外泌体介导的 miR-18b-5p 调控 NEDD9 对乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(2):141.
- [11] PATHRIA P, LOUIS TL, VARNER JA. Targeting tumor-associated macrophages in cancer[J]. Trends Immunol, 2019, 40(4):310.
- [12] FENG Q, CHANG W, MAO Y, *et al.* Tumor-associated macrophages as prognostic and predictive biomarkers for postoperative adjuvant chemotherapy in patients with stage II colon cancer[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(13):3896.
- [13] GUAN H, PENG R, FANG F, *et al.* Tumor-associated macrophages promote prostate cancer progression via exosome-mediated miR-95 transfer[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(12):9729.
- [14] WAN Z, GAO X, DONG Y, *et al.* Exosome-mediated cell-cell communication in tumor progression[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(9):1661.
- [15] RINGUETTE GOULET C, BERNARD G, TREMBLAY S, *et al.* Exosomes induce fibroblast differentiation into cancer-associated fibroblasts through TGF β signaling[J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(7):1196.
- [16] LAN J, SUN L, XU F, *et al.* M2 macrophage-derived exosomes promote cell migration and invasion in colon cancer[J]. Cancer Res, 2019, 79(1):146.
- [17] ZHOU J, LI X, WU X, *et al.* Exosomes released from tumor-associated macrophages transfer miRNAs that induce a Treg/Th17 cell imbalance in epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Immunol Res, 2018, 6(12):1578.
- [18] PAN Z, SHI Z, WEI H, *et al.* Magnetofection based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles weakens glioma stem cell proliferation and invasion by mediating high expression of MicroRNA-374a[J]. J Cancer, 2016, 7(11):1487.
- [19] ZHAO M, XU P, LIU Z, *et al.* Dual roles of miR-374a by modulated c-Jun respectively targets CCND1-inducing PI3K/AKT signal and PTEN-suppressing Wnt/ β -catenin signaling in non-small-cell lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2):78.
- [20] ZHANG J, HE Y, YU Y, *et al.* Upregulation of miR-374a promotes tumor metastasis and progression by downregulating LACTB and predicts unfavorable prognosis in breast cancer[J]. Cancer Med, 2018, 7(7):3351.
- [21] COOMANS DE BRACHÈNE A, DEMOULIN JB. FOXO transcription factors in cancer development and therapy[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(6):1159.
- [22] SHIN S, BUEL GR, NAGIEC MJ, *et al.* ERK2 regulates epithelial-to-mesenchymal plasticity through DOCK10-dependent Rac1/FoxO1 activation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(8):2967.
- [23] DUAN S, HUANG W, LIU X, *et al.* IMPDH2 promotes colorectal cancer progression through activation of the PI3K/AKT/mTOR and PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathways [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1):304.
- [24] ZOU Y, LIN X, BU J, *et al.* Timeless-stimulated miR-5188-FOXO1/ β -catenin-c-jun feedback loop promotes stemness via ubiquitination of β -catenin in breast cancer[J]. Mol Ther, 2020, 28(1):313.
- [25] ZANGARI J, ILIE M, ROUAUD F, *et al.* Rapid decay of engulfed extracellular miRNA by XRN1 exonuclease promotes transient epithelial-mesenchymal transition[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(7):4131.
- [26] WALLIS CJ, GORDANPOUR A, BENDAVID JS, *et al.* MiR-182 is associated with growth, migration and invasion in prostate cancer via suppression of FOXO1 [J]. J Cancer, 2015, 6(12):1295.

原发性干燥综合征小鼠唾液腺组织及唾液的转录组和蛋白质组分析

邱筱婷¹, 巩红校¹, 朱玲¹, 霍星星²

[摘要] **目的:**通过对实验性干燥综合征(ESS)小鼠的唾液腺组织和唾液进行转录组学和蛋白质组学分析,探讨原发性干燥综合征(pSS)的发生机制。**方法:**建立 ESS 模型,留取唾液腺组织和唾液,分别通过高通量转录组测序和基于 LC-MS/MS 的蛋白质组学分析,了解唾液腺组织和唾液中相关 mRNA 和蛋白表达,通路富集分析用于识别异常的调控路径,并进一步进行 RNA 和蛋白质关联分析。**结果:**通过唾液腺病理检查与唾液量测定成功验证 ESS 模型,并鉴定出 3 221 个差异表达基因和 253 个差异表达蛋白。通过对转录组学和蛋白质组学数据的整合分析,发现 61 个蛋白质重叠。对异常调控的基因和蛋白的富集通路分析显示,与肾素-血管紧张素系统(RAS)、溶酶体和细胞凋亡的信号通路显著相关,其中 AGT、Fn1、Klk1b26、Klk1、Klk1b5、Klk1b3 在转录和蛋白水平上具有一致的调控趋势,可能是 pSS 的潜在诊断生物标志物。**结论:**pSS 致病机制可能与 RAS、溶酶体和细胞凋亡信号通路相关,AGT、Fn1、K1ks 可能是 pSS 发病过程的关键分子。

[关键词] 原发性干燥综合征;转录组;蛋白质;唾液腺;小鼠

[中图分类号] R 593.2

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.06.002

Analysis of transcriptome and proteome of salivary gland tissue and saliva in primary Sjogren's syndrome mice

QIU Xiao-ting¹, GONG Hong-xiao¹, ZHU Ling¹, HUO Xing-xing²

(1. Department of Otolaryngology, 2. Clinical Experimental Center, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei Anhui 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the transcriptome and proteome of salivary gland tissue and saliva in experimental Sjögren's syndrome(ESS) mice for further exploring the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome(pSS). **Methods:** The ESS mice model was established, the salivary gland tissue and saliva were harvested, and the relevant mRNA and protein expressions in salivary gland tissue and saliva were detected using high-throughput transcriptome sequencing and proteomic analysis based on LC-MS/MS, respectively. The pathway enrichment analysis was used to identify the abnormal regulatory pathways, and the further association analysis of RNA and protein was conducted. **Results:** The ESS model was successfully verified by pathological examination of salivary glands and saliva volume measurement, and 3 221 differentially expressed genes and 253 differentially expressed proteins were identified. The results of integrated analysis of transcriptomic and proteomic data showed that 61 proteins overlapped. The results of the enrichment pathways of abnormally regulated genes and proteins analysis showed that the renin-angiotensin system(RAS) and lysosome were significantly related to the apoptosis signaling pathways. The transcription and protein levels of AGT, Fn1, Klk1b26, Klk1, Klk1b5 and Klk1b3 were

consistent regulatory trends, which might be a potential diagnostic biomarker of pSS. **Conclusions:** The pathogenesis of pSS may be related to the RAS, lysosome and apoptosis signaling pathway, and the AGT, Fn1 and K1ks may be the key molecules of the pathogenesis of pSS.

[Key words] primary Sjogren's syndrome; transcriptomics; proteomics; salivary gland; mice

[收稿日期] 2022-11-22 [修回日期] 2023-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81803938)

[作者单位] 安徽中医药大学第一附属医院 1. 耳鼻喉科, 2. 临床实验中心, 安徽 合肥 230031

[作者简介] 邱筱婷(1997-), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 霍星星, 主管检验技师。E-mail: hxx0520@ahcm.edu.cn; 朱玲, 硕士研究生导师, 副主任医师。E-mail: 12168788@qq.com

[27] ALWHAIBI A, VERMA A, ARTHAM S, *et al.* Nodal pathway activation due to Akt1 suppression is a molecular switch for prostate cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 168:1.

[28] ZHANG H, PAN Y, ZHENG L, *et al.* FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9):3257.

[29] JAZUREK-CIESIOLKA M, JANIKIEWICZ J, DOBRZYŃ P, *et al.* Oleic acid increases the transcriptional activity of FoxO1 by promoting its nuclear translocation and β -catenin binding in pancreatic β -cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(10):2753.

(本文编辑 刘梦楠)