

肿瘤源外泌体 miR-3173-5p 靶向抑制 FBXW11 促进 CAFs 活化调控 NSCLC 进展的机制研究

任瑾卓^a, 张华^a, 吴海永^b (张家口市第一医院 a. 呼吸与危重症医学三科; b. 胸外科, 河北张家口 075000)

摘要: 目的 研究肿瘤源外泌体 miR-3173-5p 促进肿瘤相关成纤维细胞 (CAFs) 活化调控非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞增殖、侵袭、凋亡的潜在作用机制。方法 提取 NSCLC 细胞 A549 的外泌体 (Exo), 透射电镜观察 Exo 形态, Western blot 法检测 Exo 标志蛋白表达。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 miR-3173-5p 在 A549 细胞和 Exo 中的表达。利用 Starbase 数据库预测 miR-3173-5p 与 F-box/WD-40 结构域蛋白 11 (FBXW11) 的结合, 通过荧光素酶报告基因分析进行验证。采用 Exo 与 Exo 抑制剂 GW4869 或 NC inhibitor/mimic 或 miR-3173-5p inhibitor/mimic 和 (或) FBXW11 过表达 / 空载体共处理人肺成纤维细胞系 (MRC-5), 分别设置 NC 组、Exo 组、Exo+GW4869 组、Exo-NC inhibitor 组、Exo-miR-3173-5p inhibitor 组、Exo-NC mimic 组、Exo-miR-3173-5p mimic 组、Exo-miR-3173-5p mimic+Vector 组及 Exo-miR-3173-5p mimic+FBXW11 组。通过 Western blot 检测各组细胞中 CAFs 标志蛋白 [基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、趋化因子 12 (CXCL12)、纤维连接蛋白 (Fibronectin)、波形蛋白 (Vimentin)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 和白细胞介素 8 (IL-8)] 水平, 分析外泌体 miR-3173-5p 及 FBXW11 表达对 CAFs 活化的影响。分离 Exo 及 Exo-miR-3173-5p mimic, Exo-FBXW11 孵育 MRC-5 细胞的培养上清液作为条件培养液 (CM), 培养 A549 细胞, 分别设置 NC-CM 组、Exo-CM 组、Exo-miR-3173-5p mimic-CM 组及 Exo-FBXW11-CM 组。采用 MTT 法、Transwell 实验及流式细胞术分别检测 CAFs 活化对 NSCLC 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。结果 透射电镜显示, NSCLC 细胞来源外泌体囊泡直径 30~100 nm; Western blot 检测外泌体标记蛋白均呈阳性。NSCLC 来源外泌体中 miR-3173-5p (33.45 ± 3.16) 表达显著高于肿瘤细胞 (1.01 ± 0.07), 差异具有统计学意义 ($t=1.263$, $P<0.001$)。miR-3173-5p 靶向结合 FBXW11 并抑制其表达。与 NC 组相比, Exo 组细胞中 CAFs 标志蛋白水平均显著升高 ($t=12.214\sim 24.908$), Exo+GW4869 组 CAFs 标志蛋白表达均较 Exo 组显著抑制 ($t=13.160\sim 25.143$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.01$)。与 Exo 组相比, miR-3173-5p inhibitor 可抑制 Exo 诱导的 CAFs 标志蛋白表达 ($t=11.059\sim 21.094$), miR-3173-5p mimic 则促进 CAFs 标志蛋白表达 ($t=12.943\sim 18.671$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.01$)。过表达 FBXW11 能够逆转 miR-3173-5p mimic 对 CAFs 活化的诱导作用。与 NC-CM 组相比, Exo-CM 组 A549 细胞增殖活力 ($168.57\% \pm 8.14\%$ vs $100.18\% \pm 7.26\%$)、侵袭率 ($49.69\% \pm 7.17\%$ vs $38.52\% \pm 3.18\%$) 能力明显增强, 细胞凋亡率 ($3.15\% \pm 0.43\%$ vs $6.03\% \pm 0.61\%$) 明显抑制 ($t=10.207, 2.359, 3.001$), miR-3173-5p mimic 可增强 Exo-CM 对 A549 细胞增殖、侵袭的促进作用和对细胞凋亡的抑制作用 ($t=9.399, 3.438, 3.208$), 过表达 FBXW11 可拮抗 Exo-CM 对 A549 细胞增殖、侵袭的促进作用和对细胞凋亡的抑制作用 ($t=18.868, 7.070, 9.813$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。结论 肿瘤源外泌体 miR-3173-5p 通过靶向抑制 FBXW11 表达促进 CAFs 活化, 进一步促进 NSCLC 细胞增殖和侵袭, 抑制细胞凋亡, 调控 NSCLC 的发生发展。

关键词: 非小细胞肺癌; 外泌体; miR-3173-5p; F-box/WD-40 结构域蛋白 11; 癌相关成纤维细胞

中图分类号: R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 04-067-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.04.012

Study on the Mechanism of Targeted Inhibition of FBXW11 by Tumor-Derived Exosome miR-3173-5p to Promote CAFs Activation and Regulate NSCLC Progression

REN Jinzhuo^a, ZHANG Hua^a, WU Haiyong^b (a. Department of Respiratory and Critical Care Medicine; b. Thoracic Surgery, Zhangjiakou First Hospital, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the potential mechanism of tumor-derived exosome miR-3173-5p promoting the activation of cancer-associated fibroblasts (CAFs) and regulating the proliferation, invasion and apoptosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods** Exosome (Exo) of NSCLC cell A549 was extracted, the morphology of Exo was observed by

基金项目: 张家口市重点研发项目 (2322126D)。

作者简介: 任瑾卓 (1986-), 男, 本科, 研究方向: 肺癌, E-mail: QiZH10328@163.com。

通讯作者: 吴海永 (1987-), 男, 本科, 研究方向: 肺癌, E-mail: LLF200411@163.com。

transmission electron microscopy, and the expression of Exo marker protein was detected by Western blot. Real-time quantitative fluorescent PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-3173-5p in A549 cells and Exo. The binding of miR-3173-5p to F-box/WD-40 domain protein11 (FBXW11) was predicted by Starbase database, and verified by luciferase reporter gene analysis. Human lung fibroblast cell line (MRC-5) was treated with Exo and Exo inhibitor GW4869 or NC inhibitor/mimic or miR-3173-5p inhibitor/mimic and/or FBXW11 overexpression/empty vector, NC group, Exo group, Exo+GW4869 group, Exo-NC inhibitor group, Exo-miR-3173-5p inhibitor group, Exo-NC mimic group, Exo-miR-3173-5p mimic group, Exo-miR-3173-5p mimic+Vector group and Exo-miR-3173-5p mimic+FBXW11 group were set up respectively. The level of CAFs marker protein [Matrix metalloproteinase-9(MMP-9), α -Smooth muscle aorta(α -SMA), Chemokine (C-X-C motif) ligand 12(CXCL12), Fibronectin, Vimentin, Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6(IL-6), Interleukin-8(IL-8)] in cells of each group was detected by Western blot analysis, and the influence of exosome miR-3173-5p and FBXW11 expression on CAFs activation was analyzed. Exo and Exo-miR-3173-5p mimic were separated and the supernatant of MRC-5 cells incubated with Exo-FBXW11 was used as conditioned medium (CM) to culture A549 cells. The NC-CM group, Exo-CM group, Exo-miR-3173-5p mimic-CM group and Exo-FBXW11-CM group were set up respectively. MTT assay, Transwell assay and flow cytometry were used to detect the effects of CAFs activation on proliferation, invasion and apoptosis of NSCLC cells. **Results** Transmission electron microscopy showed that the diameter of exosomal vesicles derived from NSCLC cells was about 30~100 nm. Western blot analysis showed that all exosome labeled proteins were positive. The expression of miR-3173-5p (33.45 ± 3.16) in NSCLC-derived exosomes was significantly higher than that in tumor cells (1.01 ± 0.07), and the difference was statistically significant ($t=1.263$, $P<0.001$). MiR-3173-5p targets FBXW11 and inhibits its expression. Compared with NC group, CAFs marker protein levels in Exo group were significantly increased ($t=12.214\sim 24.908$), the expression of CAFs marker protein in Exo+GW4869 group was significantly inhibited compared with Exo group ($t=13.160\sim 25.143$), the differences were statistically significant (all $P<0.01$), respectively. Compared with Exo group, miR-3173-5p inhibitor inhibited EXO-induced CAFs marker protein expression($t=11.059\sim 21.094$), and miR-3173-5p mimic promoted the expression of CAFs marker protein ($t=12.943\sim 18.671$),the differences were statistically significant (all $P<0.01$), respectively. Overexpression of FBXW11 reversed the induction of CAFs activation by miR-3173-5p mimic. Compared with the NC-CM group, the proliferation activity and invasion rate of A549 cells in the Exo-CM group were significantly enhanced, and the apoptosis rate was significantly inhibited ($t=10.207, 2.359, 3.001$), miR-3173-5p mimic enhanced the promoting effect of Exo-CM on proliferation and invasion of A549 cells and the inhibitory effect on apoptosis ($t=9.399, 3.438, 3.208$), while overexpression of FBXW11 can antagonize the promotion effect of Exo-CM on proliferation and invasion of A549 cells and the inhibition effect on apoptosis($t=18.868, 7.070, 9.813$), the differences were statistically significant (all $P<0.05$), respectively. **Conclusion** Tumor-derived exosome miR-3173-5p promotes CAFs activation through targeted inhibition of FBXW11 expression, further promotes proliferation and invasion of NSCLC cells, inhibits cell apoptosis, and regulates the occurrence and development of NSCLC.

Keywords: non-small cell lung cancer; exosomes; miR-3173-5p; FBXW11; cancer-associated fibroblasts

非小细胞肺癌(NSCLC)是肺癌重要的亚型,占全部肺癌的80%~85%,发病率、死亡率较高,患者5年生存率仍较低^[1]。因此,深入了解肺癌发生发展机制及探索更有效的分子靶标对开发新的治疗策略意义显著。癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤微环境中最主要的细胞类型,可分泌多种微小RNA(miRNA)、蛋白质,重塑细胞外基质,参与调控肿瘤微环境及肿瘤发生进展^[2]。CAFs活化与肿瘤发生的关系受到关注,但其作用机制尚不完全清楚。外泌体是包含蛋白质、DNA和RNA等分子的微小(30~100 nm)膜泡,可由各种类型的细胞产生,并作为细胞间通信的介质运输信息物质,通过与细胞膜融合将外泌体释放到细胞外环境^[3-4]。研究报道,外泌体可介导肿瘤微环境的调控,促进肿瘤进展和转移^[5]。外泌

体中miRNA在转录后水平可抑制靶mRNA,使这些mRNA不稳定或阻止其翻译,被证实参与调控人类多种肿瘤的发生发展^[6-7],展现出良好的研究及应用前景。但肿瘤源性外泌体miRNA与CAFs驱动肺癌进展的相关性尚未阐明。miR-3173-5p是近年发现与胆管癌^[8]、前列腺癌^[9]、胰腺癌^[10]和NSCLC^[11]等相关的差异miRNA,miR-3173-5p是否可通过影响CAFs活化,介导肿瘤微环境促进肿瘤恶性进展,尚未见相关报道。因此,本研究拟探究肿瘤源性外泌体miR-3173-5p对CAFs活化的影响及其调控NSCLC进展的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人非小细胞肺癌细胞系(A549,货号CL-0016)和人肺成纤维细胞系(MRC-5,货号CL-0161)购自中国科学院细胞库(中国上海)。

将 A549 细胞放在含 10g/dl 胎牛血清的 1640 培养液中培养, MRC-5 细胞放在含 10g/dl 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养。所有细胞均在 37 °C, 5ml/dl 的 CO₂ 条件下培养, 当细胞密度达到 70%~80% 时进行转染处理。

1.2 试剂和仪器 DMEM 培养液、胎牛血清、TRIzol 试剂和 miScript SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (美国 Life Technologies 公司); 细胞转染试剂 Lipofectamine 3000™ (美国 Invitrogen 公司); 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司); RIPA 裂解缓冲液、BCA 蛋白测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Anti-CD63, Anti-HSP70, Anti-TSG101, Anti-FBXW11, Anti-GAPDH 和羊抗鼠 IgG 抗体 (Abcam 公司); Anti-IL-1 β , Anti-IL-6, Anti-IL-8 (R&D Systems 公司); NC mimic/inhibitor, miR-3173-5p mimic/inhibitor, FBXW11 空载体 (Vector) 和过表达载体 [GeneChem (中国上海)]; MTT 试剂盒、膜联蛋白 FITC/PI 双重染色试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司)。MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Multizoom AZ100 型光学生物显微镜 [尼康仪器 (上海) 有限公司]; Centrifuge5804R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Tanno 5200 型化学发光凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司); SpectraMaxi3x 型多功能酶标仪 (美国 MD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 外泌体的分离和鉴定: 当 A549 细胞达到 80% 汇合时, 将培养液更换为无外泌体培养液, 48h 后收集细胞培养上清液, 3 000 r/min 离心 10min, 0.22 μ m 滤膜过滤, 去上清液, 10 000 r/min 离心 30min, 重悬于 PBS 中, 再次 100 000 r/min 离心 70min, 去除任何残留的 RNA, 收集的白色沉淀即为外泌体 (Exo), -80 °C 保存。通过透射电镜观察外泌体的形态, Western blot 法检测外泌体标志蛋白表达。

1.3.2 外泌体处理: 将 MRC-5 细胞 (1×10^4 个/孔) 接种到 6 孔板中, 当细胞密度达到 70%~80% 时, 向每孔中加入 300 μ g 提取的外泌体, 对照组加入 PBS 对照, 培养 48h, 收集细胞用于后续实验。

1.3.3 细胞转染处理: ① MRC-5 细胞处理: 分别采用 Exo 与 Exo 抑制剂 GW4869 或 NC inhibitor/mimic 或 miR-3173-5p inhibitor/mimic 和 (或) FBXW11 过表达/空载体共处理 MRC-5 细胞 48h, 分别设为 Exo 组、Exo+GW4869 组、Exo-NC inhibitor 组、Exo-miR-3173-5p inhibitor 组、Exo-NC mimic 组、Exo-miR-3173-5p mimic 组、Exo-miR-3173-5p mimic+Vector 组及 Exo-miR-3173-5p mimic+FBXW11 组, 并设置阴性对照 (NC)

组, 收集细胞进行实验检测。② A549 细胞处理: 分别采用 Exo 及 Exo-miR-3173-5p mimic, Exo-FBXW11 处理 MRC-5 细胞 48h, 分离上清液作为条件培养液 (CM), 并设置阴性对照条件培养液 (NC-CM), 培养 A549 细胞 48h, 设为 NC-CM 组、Exo-CM 组、Exo-miR-3173-5p mimic-CM 组及 Exo-FBXW11-CM 组, 收集细胞进行实验检测。

1.3.4 双荧光素酶报告基因测定 miR-3173-5p 与 FBXW11 结合关系: 使用 Starbase 数据库检索 miR-3173-5p 的下游靶基因 F-box/WD-40 结构域蛋白 11 (F-box and WD-40 domain protein 11, FBXW11), 将包含 miR-3173-5p 结合位点的 FBXW11 野生型或突变型 3'UTR 进行 PCR 扩增并插入 pMIR 报告质粒中, 将质粒分别转染到 A549 细胞中, 并共转染 miR-3173-5p mimic 或 NC mimic。根据制造商说明, 使用双荧光素酶检测试剂盒在转染后 48h 测量荧光值。

1.3.5 qRT-PCR 检测 miR-3173-5p 相对表达: 使用 Trizol 提取细胞总 RNA, Prime Script RT 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。在 ABI 7500 实时 PCR 系统上, 使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒进行 PCR 分析, 反应条件: 95 °C 1 min, 95 °C 20s, 56 °C 10s 和 72 °C 15s, 进行 30 个循环。引物序列: miR-3173-5p 上游 5'-GCGACGGGACGGACAAAAGAGG-3', 下游 5'-GCCCCGCTCGTCGTTAAGTACA-3'; GAPDH 上游 5'-GAGCGAAGCCGTCGTGT-3', 下游 5'-TTGCGAAGTGCTTAAACGCA-3'。以 GAPDH 作为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-3173-5p mRNA 相对表达水平。

1.3.6 Western blot 检测 α -SMA, MMP9, CXCL12, Fibronectin, Vimentin, IL-1 β , IL-6, IL-8, FBXW11 蛋白表达: 采用 RIPA 提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到 PVDF 膜上。将膜在 5g/dl 脱脂奶粉中室温封闭 2h, 然后分别加入 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、趋化因子 12 (CXCL12)、纤维连接蛋白 (Fibronectin)、波形蛋白 (Vimentin)、白细胞介素 -1 β (IL-1 β)、IL-6, IL-8, FBXW11 蛋白一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜。次日加入二抗室温孵育 2h, 采用 ECL 试剂盒在增强化学发光系统中将蛋白条带可视化, Bio-Rad 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.3.7 MTT 法检测细胞增殖活力: 将细胞以 1×10^3 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板中, 在每孔中加入 10 μ l 的 MTT 试剂, 37 °C 孵育 4h, 用甲酰胺溶剂处理, 测量 570 nm 波长处的吸光度值。

1.3.8 Transwell 检测细胞侵袭能力: 将细胞悬液 (1×10^5 个/ml) 添加至 Transwell 板的上室, 下室加 500 μ l 含 10g/dl 胎牛血清的 DMEM 培养液, 孵育 48h 后, 去除上室内侧的细胞和培养液, 将下室

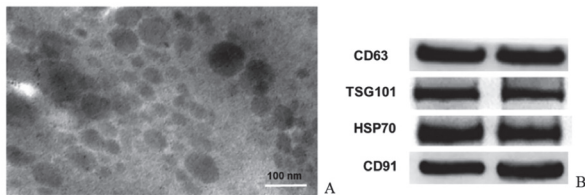
中的细胞采用 4ml/dl 多聚甲醛和 0.1g/dl 结晶紫进行染色、固定，倒置光学显微镜下计数细胞数量。

1.3.9 流式细胞术检测细胞凋亡能力：采用膜联蛋白 V-FITC/PI 双重染色在流式细胞仪上分析细胞凋亡。细胞处理 48h 后，用不含 EDTA 的胰蛋白酶分离并收集细胞，4℃ 下以 1 000r/min 离心 5min，弃上清液。将细胞悬浮在膜联蛋白 V-FITC 和结合缓冲液的混合物中，室温孵育 30min，后加入 PI 和结合缓冲溶液混匀，继续室温温育 15min，通过流式细胞仪检测荧光，并计算细胞凋亡率。

1.4 统计学分析 所有数据均用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 22.0 进行统计学分析，Student's *t* 检验分析两组之间的差异性，单因素方差分析比较多组之间的差异性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 细胞来源外泌体鉴定 透射电镜显示，NSCLC 细胞来源的外泌体囊泡直径约 30~100 nm 见图 1A；Western blot 检测显示外泌体标记蛋白 CD63，TSG101，HSP70 和 CD91 均呈阳性，见图 1B，提示成功分离获得 NSCLC 细胞外泌体。



A. 透射电镜观察外泌体形态大小；B. Western blot 检测外泌体标志蛋白 CD63，TSG101，HSP70 和 CD91 表达。

图 1 NSCLC 细胞外泌体鉴定

2.2 NSCLC 细胞和外泌体中 miR-3173-5p 表达水平 qRT-PCR 分析显示，与 NSCLC 细胞 (1.01 ± 0.07) 相比，NSCLC 细胞源外泌体中 miR-3173-5p 表达水平 (33.45 ± 3.16) 显著上调，差异具有统计学意义 ($t=1.263$, $P < 0.001$)。

2.3 miR-3173-5p 靶向调节 FBXW11 表达 Starbase

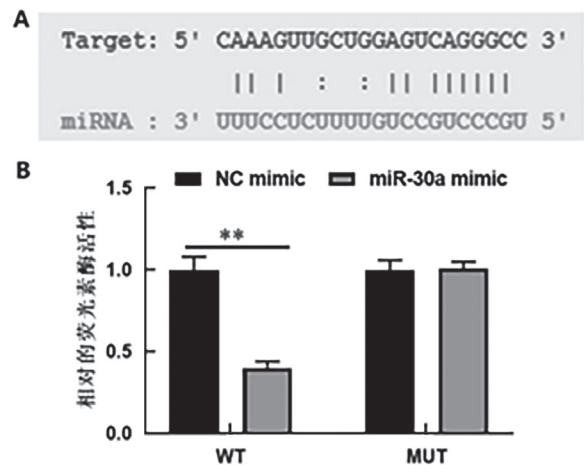
表 1 NSCLC 细胞源外泌体对 CAFs 标志蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

项目	NC 组	Exo 组	Exo+GW4869 组	F 值	P 值
α -SMA	1.01 ± 0.07	2.16 ± 0.12	0.97 ± 0.07	169.847	<0.001
MMP9	1.03 ± 0.07	3.15 ± 0.14	1.01 ± 0.09	417.534	<0.001
CXCL12	1.05 ± 0.12	2.87 ± 0.14	1.07 ± 0.16	164.919	<0.001
Fibronectin	1.03 ± 0.13	3.34 ± 0.27	1.02 ± 0.05	174.192	<0.001
Vimentin	1.02 ± 0.11	2.67 ± 0.16	1.01 ± 0.12	157.722	<0.001
IL-1 β	1.03 ± 0.09	3.69 ± 0.24	1.03 ± 0.10	280.407	<0.001
IL-6	1.04 ± 0.11	3.41 ± 0.31	1.06 ± 0.11	138.900	<0.001
IL-8	1.07 ± 0.15	2.36 ± 0.09	0.97 ± 0.14	107.755	<0.001

2.5 外泌体 miR-3173-5p 促进肿瘤相关成纤维细胞的形成 见表 2。与 Exo 组相比，Exo-miR-3173-5p inhibitor 组 MRC-5 细胞中 α -SMA，MMP9，

数据库预测 FBXW11 与 miR-3173-5p 存在结合靶点，见图 2A。双荧光素酶报告基因检测显示，与 NC mimic 组相比，转染 miR-3173-5p mimic 组显著降低 FBXW11 野生型 (0.44 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.11) 质粒的荧光素酶活性 ($t=8.507$, $P < 0.01$)；但对 FBXW11 突变型 (1.00 ± 0.06 vs 1.01 ± 0.04) 质粒荧光素酶活性没有显著影响 ($t=0.240$, $P > 0.05$)，见图 2B。表明 miR-3173-5p 靶向抑制 FBXW11 表达。

2.4 NSCLC 细胞源外泌体可促进肿瘤相关成纤维细胞的形成 见表 1。与 NC 组相比，Exo 组 MRC-5 细胞中 α -SMA，MMP-9，CXCL12，Fibronectin，Vimentin，IL-1 β ，IL-6，IL-8 蛋白水平均显著升高，差异具有统计学意义 ($t=15.682$, 24.908 , 15.814 , 16.129 , 15.335 , 20.509 , 14.373 , 12.214 , 均 $P < 0.01$)；与 Exo 组相比，Exo+GW4869 组 MRC-5 细胞中上述蛋白表达均被显著抑制，差异具有统计学意义 ($t=16.227$, 25.143 , 15.641 , 16.199 , 15.427 , 20.509 , 14.495 , 13.160 , 均 $P < 0.01$)，说明肿瘤细胞源外泌体可促使 MRC-5 向 CAFs 转化。



A. Starbase 预测 miR-3173-5p 与 FBXW11 mRNA 结合位点；B. 荧光素酶活性检测。* $P < 0.01$ 。

图 2 miR-3173-5p 靶向调节 FBXW11 表达

CXCL12，Fibronectin，Vimentin，IL-1 β ，IL-6，IL-8 蛋白水平均显著降低，差异具有统计学意义 ($t=11.059$, 21.094 , 17.100 , 12.836 , 12.052 ,

14.602, 11.658, 12.216, 均 $P < 0.01$), 说明敲低外泌体中 miR-3173-5p 表达可抑制 MRC-5 向 CAFs 转化。

表 2 外泌体 miR-3173-5p 对 CAFs 标志蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	Exo 组	Exo-NC inhibitor 组	Exo-miR-3173-5p inhibitor 组	F 值	P 值
α -SMA	2.16 \pm 0.12	2.10 \pm 0.16	0.97 \pm 0.11	77.637	<0.001
MMP9	3.15 \pm 0.14	3.21 \pm 0.13	1.05 \pm 0.09	305.354	<0.001
CXCL12	2.87 \pm 0.14	2.91 \pm 0.17	1.03 \pm 0.06	199.278	<0.001
Fibronectin	3.34 \pm 0.27	3.51 \pm 0.21	1.08 \pm 0.15	118.725	<0.001
Vimentin	2.67 \pm 0.16	2.61 \pm 0.19	1.05 \pm 0.14	93.387	<0.001
IL-1 β	3.69 \pm 0.24	3.72 \pm 0.23	1.12 \pm 0.17	143.821	<0.001
IL-6	3.41 \pm 0.31	3.65 \pm 0.25	1.09 \pm 0.14	100.956	<0.001
IL-8	2.36 \pm 0.09	2.81 \pm 0.17	0.99 \pm 0.14	142.892	<0.001

2.6 外泌体 miR-3173-5p 靶向 FBXW11 促进肿瘤相关成纤维细胞的形成 见表 3。与 Exo-NC mimic 组相比, Exo-miR-3173-5p mimic 组 FBXW11 蛋白水平显著降低 ($t=11.442, P<0.01$); 与 Exo-miR-3173-5p mimic+Vector 组相比, Exo-miR-3173-5p mimic+FBXW11 组 FBXW11 蛋白水平显著升高 ($t=15.255, P<0.01$)。此外, 与 Exo-NC mimic 组相比, Exo-miR-3173-5p mimic 组 MRC-5 细胞中 α -SMA, MMP9, CXCL12, Fibronectin, Vimentin, IL-1 β , IL-6, IL-8 蛋白水平显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=13.089, 15.325, 16.195, 12.943, 14.517, 18.671, 16.496, 13.134$, 均 $P<0.01$); 而与 Exo-miR-3173-5p mimic+Vector 组相比, Exo-miR-3173-5p mimic+FBXW11 组 MRC-5 细胞中 CAFs 标志蛋白水平均显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=12.769, 15.651, 16.454, 13.096, 14.016, 18.758, 16.001, 12.736$, 均 $P<0.01$)。

2.7 肿瘤相关成纤维细胞活化促进 NSCLC 细胞增

表 3 外泌体 miR-3173-5p 靶向 FBXW11 对 CAFs 标志蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	Exo-NC mimic 组	Exo-miR-3173-5p mimic 组	Exo-miR-3173-5p mimic +Vector 组	Exo-miR-3173-5p mimic +FBXW11 组	F 值	P 值
FBXW11	1.01 \pm 0.06	0.41 \pm 0.04	0.40 \pm 0.07	1.21 \pm 0.08	125.352	<0.001
α -SMA	1.03 \pm 0.04	2.67 \pm 0.21	2.81 \pm 0.17	1.07 \pm 0.14	121.728	<0.001
MMP9	1.01 \pm 0.15	2.89 \pm 0.14	2.91 \pm 0.11	0.97 \pm 0.19	161.643	<0.001
CXCL12	1.04 \pm 0.12	2.91 \pm 0.16	2.93 \pm 0.12	1.01 \pm 0.16	179.584	<0.001
Fibronectin	1.05 \pm 0.18	2.74 \pm 0.17	2.69 \pm 0.11	1.03 \pm 0.17	109.759	<0.001
Vimentin	1.02 \pm 0.18	2.76 \pm 0.12	2.79 \pm 0.13	1.08 \pm 0.15	138.184	<0.001
IL-1 β	1.03 \pm 0.12	3.19 \pm 0.21	3.22 \pm 0.13	1.02 \pm 0.07	236.757	<0.001
IL-6	1.01 \pm 0.08	3.01 \pm 0.19	3.05 \pm 0.21	1.07 \pm 0.04	179.714	<0.001
IL-8	1.04 \pm 0.15	2.69 \pm 0.12	2.61 \pm 0.17	1.09 \pm 0.17	106.301	<0.001

表 4 CAFs 活化对 NSCLC 细胞增殖、侵袭、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	NC-CM 组	Exo-CM 组	Exo-miR-3173-5p mimic-CM 组	Exo-FBXW11-CM 组	F 值	P 值
细胞活力 (%)	100.18 \pm 7.26	168.57 \pm 8.14	231.55 \pm 11.07	42.14 \pm 5.28	301.165	<0.001
细胞侵袭 (%)	38.52 \pm 3.18	49.69 \pm 7.17	65.97 \pm 7.94	16.21 \pm 3.16	38.930	<0.001
细胞凋亡 (%)	6.03 \pm 0.61	3.15 \pm 0.43	1.21 \pm 0.31	18.91 \pm 3.85	49.294	<0.001
Caspase-3 活性	100.03 \pm 9.24	61.51 \pm 4.16	28.35 \pm 3.15	168.47 \pm 12.46	162.323	<0.001

3 讨论

近年越来越多研究发现,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肿瘤发生发展中起着非常重要

的调控作用^[12]。ECM 的异常,如组织中断、细胞外基质基本成分或形态的改变,可以调节基质细胞的行为,促进肿瘤相关的血管生成和炎症反应,与增殖和侵袭,抑制细胞凋亡 研究采用 Exo, Exo-miR-3173-5p mimic 和 Exo-FBXW11 分别处理 MRC-5 细胞 48h, 分离上清液作为条件培养液 (CM), 对 A549 细胞进行培养, 检测结果见表 4。与 NC-CM 组相比, Exo-CM 组 A549 细胞活力升高, 侵袭细胞数增多, 凋亡细胞减少, Caspase-3 活性降低 ($t=10.207, 2.359, 3.001, 5.855$, 均 $P<0.05$)。与 Exo-CM 组相比, Exo-miR-3173-5p mimic-CM 组 A549 细胞活力显著升高, 侵袭细胞数显著增多, 凋亡细胞显著减少, Caspase-3 活性显著降低 ($t=9.399, 3.438, 3.208, 4.963$, 均 $P<0.05$); 而 Exo-FBXW11-CM 组细胞活力降低, 侵袭细胞数减少, 凋亡细胞增多, Caspase-3 活性升高 ($t=18.868, 7.070, 9.813, 16.008$, 均 $P<0.05$)。结果提示, 外泌体 miR-3173-5p 通过促进 CAFs 活化诱导 NSCLC 细胞增殖、侵袭, 抑制细胞凋亡。

的调控作用^[12]。ECM 的异常,如组织中断、细胞外基质基本成分或形态的改变,可以调节基质细胞的行为,促进肿瘤相关的血管生成和炎症反应,与

癌症的发生和转移密切相关^[13]。肿瘤细胞与基质细胞相互作用,动态调节肿瘤微环境,可诱导肿瘤细胞凋亡或进展^[14]。

肿瘤微环境是由细胞间通讯调控的动态系统,负责肿瘤进展和转移^[14]。因此,研究外泌体介导的肿瘤与基质之间的相互作用十分必要。CAFs是肿瘤基质中含量最高的细胞成分之一,具有很强的重塑细胞外基质的能力,还可通过诱导基质细胞纤维化、增加基质张力来促进肿瘤进展^[2,13]。本研究发现NSCLC来源外泌体能够促进成纤维细胞(MRC-5)中CAFs标志蛋白表达,给予外泌体抑制剂则降低了各蛋白表达,提示肿瘤来源外泌体可促进成纤维细胞向CAFs转化。NSCLC细胞外泌体中miR-3173-5p显著高表达,说明肿瘤细胞可通过外泌体转运miR-3173-5p到肺转移前微环境的成纤维细胞中,并通过降低其靶标FBXW11表达将成纤维细胞转化为CAFs。本研究结果阐明了NSCLC进展的可能分子机制。

先前研究表明,miR-3173-5p异常表达在不同癌症中发挥不同作用,如胆管癌中miR-3173-5p过表达可通过抑制ETS相关基因(ETS-related gene, ERG)表达,抑制癌细胞增殖和迁移,阻断胆管癌进展^[8]。CAFs外泌体衍生的miR-3173-5p通过调节长链酯酰辅酶A合成酶4(long-chain acyl-CoA synthetases, ACSL4)抑制胰腺癌细胞铁死亡,促进了胰腺癌进展^[10]。前列腺癌中LINC00893通过靶向调控miR-3173-5p抑制了癌细胞增殖、侵袭,缓解肿瘤进展^[9]。值得关注的是,IU等^[11]人的报道发现miR-3173-5p在NSCLC中差异表达,与NSCLC的免疫微环境调节密切相关。本研究发现,miR-3173-5p作为癌基因发挥作用,在NSCLC细胞来源的外泌体中显著高表达,敲低miR-3173-5p可抑制Exo诱导的成纤维细胞向CAFs转化,而过表达miR-3173-5p则可促进CAFs活化,促进NSCLC细胞增殖、侵袭,抑制细胞凋亡。

为明确miR-3173-5p在CAFs活化和NSCLC进展中的可能作用,研究通过在线数据库Starbase预测并证实miR-3173-5p与下游靶标FBXW11靶向结合。FBXW11是F-box蛋白家族的一个成员,FBXW11被报道通过调节多种信号转导途径,参与多种肿瘤发生的病理过程,如WANG等^[15]报道,淋巴细胞白血病中FBXW11显著上调,通过激活核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)和 β -连环蛋白(β -catenin)/转录因子(transcription factor, TCF)信号通路促进肿瘤进展。TAN等^[16]研究显示,FBXW11作为一种炎症生物标志物,在胰腺癌中表达显著上调,并且与巨噬细胞浸润和

NF- κ B信号通路活化呈显著正相关。YAO等^[17]报道,FBXW11作为致癌因子参与调控了结直肠癌的干细胞样特征和肝转移。CHEN等^[18]研究发现,人类软组织瘤标本中FBXW11明显下调,上调FBXW11表达可显著抑制软组织瘤细胞生长并诱导细胞凋亡;且发现与高级别软组织瘤和不良预后显著相关,被认为是软组织瘤患者的独立预后因素。本研究中,FBXW11作为外泌体miR-3173-5p的靶标基因在NSCLC中显著下调,过表达FBXW11能够拮抗外泌体诱导的成纤维细胞向CAFs转化,抑制NSCLC细胞增殖、侵袭,诱导细胞凋亡。本研究证实了NSCLC细胞与基质CAFs细胞之间存在外泌体介导的通讯,肿瘤外泌体miR-3173-5p可通过靶向调控FBXW11表达促进成纤维细胞向CAFs转化,促进NSCLC细胞增殖和侵袭,最终导致NSCLC进展。本研究从肿瘤微环境角度为NSCLC的迁移和侵袭提供了理论依据,也为NSCLC的临床治疗提供了新的思路和靶点。但本研究也存在一些不足,第一,没有深入探究FBXW11激活CAFs的具体途径及其与FAP, α -SMA的关系;第二,miR-3173-5p和FBXW11的作用及相应机制仅在细胞实验中得到证实,尚缺乏动物实验的进一步验证。但无论如何,还是初步发现了肿瘤源外泌体miR-3173-5p在NSCLC进展中的作用及其潜在调控机制。

综上所述,miR-3173-5p在NSCLC细胞外泌体中表达显著上调,肿瘤源外泌体miR-3173-5p可能通过靶向抑制FBXW11表达促使CAFs活化,进而促进肿瘤细胞增殖、侵袭,抑制细胞凋亡,从而调控NSCLC进展。

参考文献:

- [1] ALDUAIS Y, ZHANG H J, FAN F, et al. Non-small cell lung cancer (NSCLC): a review of risk factors, diagnosis, and treatment[J]. *Medicine*, 2023, 102(8): e32899.
- [2] KENNEL K B, BOZLAR M, DE VALK A F, et al. Cancer-associated fibroblasts in inflammation and antitumor immunity[J]. *Clinical Cancer Research*, 2023, 29(6): 1009-1016.
- [3] WANG H B, MENG Q H, QIAN J J, et al. Review: RNA-based diagnostic markers discovery and therapeutic targets development in cancer[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2022, 234: 108123.
- [4] ENTEZARI M, GHANBARIRAD M, TAHERIAZAM A, et al. Long non-coding RNAs and exosomal lncRNAs: potential functions in lung cancer progression, drug resistance and tumor microenvironment remodeling[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 150: 112963.
- [5] HE J, REN W H, WANG W, et al. Exosomal targeting and its potential clinical application[J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2022, 12(10): 2385-2402.
- [6] 张筱东, 谢星星, 李佳, 等. 血清外泌体miR-221和

(下转第78页)

- the RhoA/ROCK pathway[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2023, 27(17): 2495-2506.
- [20] CHENG F, ZHOU Y X, WANG M, et al. A review of pharmacological and pharmacokinetic properties of stachydrine[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 155: 104755.
- [21] ZHOU F, LIU F, LIU J, et al. Stachydrine promotes angiogenesis by regulating the VEGFR2/MEK/ERK and mitochondrial-mediated apoptosis signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2020, 131: 110724.
- [22] ZHENG J L, TIAN J, WANG S N, et al. Stachydrine hydrochloride suppresses phenylephrine-induced pathological cardiac hypertrophy by inhibiting the calcineurin/nuclear factor of activated T-cell signalling pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 883: 173386.
- [23] ZHU X, WU Y B, ZHANG X G, et al. Stachydrine ameliorates hypoxia reoxygenation injury of cardiomyocyte via enhancing SIRT1-Nrf2 pathway[J]. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2023, 18(1): 265.
- [24] 彭文艺, 周喆, 王德琼, 等. YAP对高糖培养大鼠心脏成纤维细胞活化作用的影响及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(1): 34-41.
PENG W Y, ZHOU Z, WANG D Q, et al. Function and mechanism of Yes-associated protein in regulating the activation of rat cardiac fibroblasts cultured with high glucose[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2023, 48(1): 34-41.
- [25] 郎海雷, 曹雷涛, 贵英斌, 等. LncRNANNT-AS1通过调控 miR-582-5p/NCKAP1轴激活 Hippo-YAP/TAZ信号通路促进膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭和干细胞干性影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(4): 27-34, 39.
LANG H L, CAO L T, GUI Y B, et al. LncRNA NNT-AS1 activates Hippo-YAP/TAZ signaling pathway by regulating miR-582-5p/NCKAP1 axis to promote bladder cancer cell proliferation, migration, invasion and stem cell stemness effects[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(4): 27-34, 39.
- [26] FLINN M A, LINK B A, O'MEARA C C. Upstream regulation of the Hippo-Yap pathway in cardiomyocyte regeneration[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2020, 100: 11-19.
- [27] HU M M, WANG H, LI S N, et al. Yes-associated protein is involved in myocardial fibrosis in rats with diabetic cardiomyopathy[J]. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 2021, 14: 2133-2143.
- [28] 叶红伟, 张蔚屏, 胡俊锋, 等. 心肌肥大相关蛋白 YAP在大鼠糖尿病心肌病中的表达[J]. *蚌埠医学院学报*, 2018, 43(10): 1355-1358.
YE H W, ZHANG W P, HU J F, et al. The expression of cardiac hypertrophy associated protein YAP in rat with diabetic cardiomyopathy[J]. *Journal of Bengbu Medical College*, 2018, 43(10): 1355-1358.

收稿日期: 2024-02-28

修回日期: 2024-09-12

(上接第72页)

- miR-378水平检测在胃癌诊断中的应用研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(6): 52-55.
ZHANG X D, XIE X X, LI J, et al. Application study of serum exosome miR-221 and miR-378 detection in the diagnosis of gastric cancer[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(6): 52-55.
- [7] XU Z J, CHEN Y, MA L, et al. Role of exosomal non-coding RNAs from tumor cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(10): 3133-3154.
- [8] SUN Z P, TAN Z G, PENG C, et al. LncRNA SNHG3 facilitates the malignant phenotype of cholangiocarcinoma cells via the miR-3173-5p/ERG axis[J]. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2022, 26(4): 802-812.
- [9] YU C G, FAN Y, ZHANG Y, et al. LINC00893 inhibits the progression of prostate cancer through miR-3173-5p/SOCS3/JAK2/STAT3 pathway[J]. *Cancer Cell International*, 2022, 22(1): 228.
- [10] QIR, BAI Y X, LI K, et al. Cancer-associated fibroblasts suppress ferroptosis and induce gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by secreting exosome-derived ACSL4-targeting miRNAs[J]. *Drug Resistance Updates*, 2023, 68: 100960.
- [11] LIU Z C, WANG T T, SHE Y L, et al. N6-methyladenosine-modified circIGF2BP3 inhibits CD8+ T-cell responses to facilitate tumor immune evasion by promoting the deubiquitination of PD-L1 in non-small cell lung cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 105.
- [12] KARAMANOS N K, THEOCHARIS A D, PIPERIGKOU Z, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix[J]. *the FEBS Journal*, 2021, 288(24): 6850-6912.
- [13] MONGIAT M. Extracellular matrix and cancer: an intricate affair[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(18): 13969.
- [14] MAROZZI M, PARNIGONI A, NEGRI A, et al. Inflammation, extracellular matrix remodeling, and proteostasis in tumor microenvironment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15): 8102.
- [15] WANG L N, FENG W L, YANG X, et al. Fbxw11 promotes the proliferation of lymphocytic leukemia cells through the concomitant activation of NF- κ B and β -catenin/TCF signaling pathways[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(4): 427.
- [16] TAN P, CAI S, HUANG Z W, et al. E3 ubiquitin ligase FBXW11 as a novel inflammatory biomarker is associated with immune infiltration and NF- κ B pathway activation in pancreatitis and pancreatic cancer[J]. *Cellular Signalling*, 2024, 116: 111033.
- [17] YAO J, YANG J, YANG Z, et al. FBXW11 contributes to stem-cell-like features and liver metastasis through regulating HIC1-mediated SIRT1 transcription in colorectal cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(10): 930.
- [18] CHEN C B, ZHOU H, ZHANG X L, et al. Association of FBXW11 levels with tumor development and prognosis in chondrosarcoma[J]. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 2022, 35(4): 429-437.

收稿日期: 2024-07-26

修回日期: 2024-09-19