

· 基础研究 ·

基于外泌体 miRNA 测序探讨肝癌在脾虚状态下转移增强机制

莫灼锚 李 攀 陈秋霞 张诗军

摘要 **目的** 探索脾虚状态下外泌体促肝癌转移的机制。**方法** 使用随机数字表法将 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组: 正常对照组、脾虚组、肝癌组、脾虚肝癌组, 每组 10 只, 正常对照组腹腔注射生理盐水, 脾虚组腹腔注射利血平, 肝癌组采用肝癌原位移植术, 脾虚肝癌组采用腹腔注射利血平加肝癌原位移植术。利血平腹腔注射共持续 21 天, 确定脾虚模型建立后再行肝癌原位移植术, 术后 14 天取材。基于模型血浆提取小鼠外泌体并使用电镜、颗粒分析及纳米流式鉴定。以外泌体为变量使用划痕实验、Transwell 迁移与侵袭实验、尾静脉肺转移裸鼠模型验证脾虚状态下外泌体促肝癌转移的表型。随后对肝癌组和脾虚肝癌组外泌体进行 miRNA 测序鉴定差异 miRNAs, 并分析 miRNAs 靶向的 mRNAs 的通路富集结果。**结果** 与肝癌组比较, 脾虚肝癌组小鼠的脾虚积分更高 ($P < 0.0001$) 及肿瘤体积更大。电镜、颗粒分析及纳米流式结果成功鉴定外泌体。划痕实验、Transwell 迁移及侵袭实验结果表明脾虚肝癌组外泌体在体外促进了肝癌细胞的转移能力 ($P < 0.0001$)。尾静脉肺转移裸鼠模型的活体成像结果表明脾虚肝癌组外泌体在体内促进了肝癌细胞的转移能力。外泌体 miRNA 测序结果表明 15 个 miRNAs 在脾虚肝癌组差异表达, 其中 9 个上调 (miR-183-3p, miR-1247-5p, miR-543-3p, miR-495-3p, miR-466i-5p, miR-540-5p, miR-125b-5p, miR-214-3p, miR-499-5p), 6 个下调 (miR-6516-5p, miR-450a-3p, let-7g-3p, miR-103-5p, miR-5129-3p, miR-301b-3p)。差异表达 miRNAs 靶向的 mRNAs 富集的通路与转移相关 (Wnt signaling pathway)。**结论** 脾虚内环境来源的状态下外泌体通过 miRNA-mRNA 轴促进肝癌转移。

关键词 脾虚; 肝癌; 外泌体; 微小 RNA

Exploring the Mechanism of Enhanced Metastasis of Hepatocellular Carcinoma in Pi-deficiency State Based on Exosome miRNA Sequencing MO Zhuo-mao, LI Pan, CHEN Qiu-xia, and ZHANG Shi-jun *Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou (510080)*

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanism of Pi deficiency symptom (PDS) internal environment derived exosome promoting hepatocellular carcinoma (HCC) metastasis. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups by random number table: healthy control group, PDS group, HCC group, and HCC-PDS group, with 10 mice in each group. The healthy control group was intraperitoneally injected with normal saline as control. The PDS group was intraperitoneally injected with reserpine. The HCC group was treated with orthotopic HCC transplantation. The HCC-PDS group was treated with intraperitoneal injection of reserpine plus orthotopic HCC transplantation. Reserpine was injected intraperitoneally for 21 days. HCC orthotopic transplantation was performed after the establishment of PDS model, and the materials were taken after 14 days. The electron microscope, nanoparticle tracking analysis, and NanoFCM were performed to identify exosomes. Based the different exosomes, the wound healing assay, Transwell assay, and caudal vein lung metastasis model were

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81873248, No.82174173); 广东省名中医传承工作室项目 (No. 粤中医办函 [2020]1 号); 广东省高校教师特色创新研究课题 (No.2020SWYY03)

作者单位: 中山大学附属第一医院中医科 (广州 510080)

通讯作者: 张诗军, Tel: 020-87332200 转 8385, E-mail: zshjun@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20220921.022

performed. The miRNA sequencing was performed based on the exosomes, and the target genes of differentially expressed miRNAs were used to predict the pathways. **Results** Compared with HCC group, the mice in HCC-PDS group presented the higher SD score ($P < 0.0001$) and larger tumor size. The extracted exosomes were successfully identified and proved to promote the HCC metastasis *in vitro* ($P < 0.0001$) and *in vivo* experiments. The results of miRNA sequencing demonstrated that 15 miRNAs differentially expressed in HCC-PDS group, which 9 miRNAs (miR-183-3p, miR-1247-5p, miR-543-3p, miR-495-3p, miR-466i-5p, miR-540-5p, miR-125b-5p, miR-214-3p, miR-499-5p) were up-regulated and 6 miRNAs (miR-6516-5p, miR-450a-3p, let-7g-3p, miR-103-5p, miR-5129-3p, miR-301b-3p) were down-regulated. Their related target genes enriched in the pathways associated with metastasis (Wnt signaling pathway). **Conclusion** Pi-deficiency internal environment derived exosomes may promote the HCC metastasis by miRNA-mRNA axis.

KEYWORDS Pi deficiency; hepatocellular carcinoma; exosome; miRNA

作为全球常见的恶性肿瘤之一,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)已成为癌症相关的第二大死因^[1],其高转移的特征是预后不良的主要原因之一^[2]。脾虚证是肝癌主要的证候之一,已有研究表明脾虚能促进HCC的发生发展^[3, 4]。外泌体是一种由细胞分泌的直径30~150 nm的纳米级囊泡并携带各种生物分子,当外泌体被受体细胞吸收时,其携带的生物分子被转移并影响受体细胞的表型^[5]。研究表明外泌体携带的miRNA能够促进肿瘤的转移^[6-8],但脾虚状态下外泌体对HCC转移影响仍有待进一步探索。本研究通过建立脾虚肝癌小鼠模型并提取外泌体,从体内及体外实验进一步验证脾虚状态下外泌体对肝癌转移的影响。

材料与方法

1 细胞株与动物 鼠源性肝癌细胞Hep1-6由中山大学肿瘤防治中心提供;人源性肝癌细胞MHCC97H及Luciferase-GFP质粒购于广州辉园苑医药科技有限公司;293t细胞由中山大学中山医学院提供;小鼠品系为SPF级C57BL/6健康小鼠(雄性,周龄4~6周,体重18~22 g,40只)和裸鼠(雌性,周龄4周,体重约20 g,9只),小鼠合格证号为No.320727201100265823。小鼠购于中山大学附属第一医院动物实验中心,生产许可证:SCXK(粤)2020-0056,小鼠的饲养、造模及取材均在中山大学附属第一医院实验动物中心SPF级动物房[动物使用许可证:SYXK(粤)2020-0108]进行,饲养环境为:温度25℃,光照12 h/d,相对湿度60%,时间1周。本研究方案已通过中山大学附属第一医院临床实验和动物伦理委员会审查(No.伦审[2020]402)。

2 主要试剂及仪器 利血平粉末1 g(纯度>98.0%,货号:R817202)和冰醋酸500 mL,浓度为17.5 mol/L(货号:A801295)购于上海麦

克林生化科技有限公司;胎牛血清(货号:10270-106)、DMEM高糖培养基(货号:C11995500BT)、0.25% EDTA胰酶(货号:25200056)购于赛默飞世尔科技公司(美国);血浆外泌体提取试剂盒(货号:EIQ3-02001)购于上海华盈生物医药科技有限公司。超净工作台(新加坡艺思高科技有限公司,新加坡),细胞恒温培养箱(赛默飞世尔科技公司,美国),AniView100多模式动物活体成像系统(广州博鹭腾生物科技有限公司,中国)。

3 造模方法 小鼠经过检疫后进入动物房,按照随机数字表方法分为4组:正常对照组、脾虚组、单纯肝癌组、脾虚肝癌组,每组10只。正常对照组与单纯肝癌组小鼠腹腔注射生理盐水,脾虚组与脾虚肝癌组小鼠腹腔注射利血平[0.1 mg/(kg·d)],共持续14天,每天观察小鼠状态、体重和饲料消耗,第15天使用脾虚评分量表^[9]评价模型脾虚程度(表1),符合脾虚标准才可进行下一步操作;随后对单纯肝癌组和脾虚肝癌组小鼠进行肝癌原位移植术。原位移植术过程为:取对数生长期的Hep1-6细胞消化重悬后注射到裸鼠腋下,每只裸鼠约注射 10^6 个细胞,待裸鼠体表出现肿瘤时处死裸鼠,取肿瘤并分切成1 mm×1 mm大小的瘤块备用;采用异氟烷气体吸入麻醉小鼠,暴露胸腹部皮肤,切开腹腔,分离出肝脏,并于肝右叶制造小切口,把事先备好的瘤块塞进切口内,随即使用可吸收性海绵明胶按压切口防治大量出血,最后使用可吸收性手术缝线逐层闭合切口。单纯肝癌组和脾虚肝癌小鼠模型建立后以眼球摘除法取血,正常对照组和脾虚组小鼠先吸入乙醚后以颈椎脱臼作安乐死处理。取单纯肝癌组及脾虚肝癌组血清提取外泌体用作外泌体鉴定实验,两组造模成功率为100%。

4 检测指标及方法

4.1 脾虚评分 脾虚模型建立和肝癌原位移植

表 1 脾虚评分量化表

指标	0 分	1 分	2 分	3 分
气味	无异味	淡臭	臭	恶臭
精神状态	正常	倦怠	朦胧欲睡	易于激怒
畏寒程度	正常	蜷缩	畏寒	拱背发抖
呼吸状况	正常	气喘	喘急	呼吸微弱
毛发	正常	无光泽	竖毛蓬松	枯黄稀少
大便情况	正常	偏湿	湿烂	黏液便
进食量	正常	进食减少 50%	进食减少 75%	基本不进食

术后, 密切关注小鼠的生命体征、进食量、大便、毛色及体重变化、呼吸频率、寒热等。使用脾虚评分量表评价小鼠模型脾虚程度。按照该表观察小鼠的气味、精神状态、寒热情况、呼吸频率、毛色改变、大便稀干及每日进食量并进行评分。各指标按严重程度评分, 其总分即为每项指标的评分相加。总分 ≤ 3 分为无脾虚, 4~7 分为轻度脾虚, 8~14 分为典型脾虚, 15~21 分为重度脾虚。若小鼠荷瘤 >1 cm 或者小鼠处于濒死状态时, 及时处死小鼠并取材。

4.2 外泌体形态 使用多聚甲醛重悬外泌体后将外泌体转移到载样铜网上, 室温干燥 10 min 后加 10 μ L 4% 磷钨酸溶液负染 15 min, 然后吸干染液自然干燥, 在透射电子显微镜下观察 ($\times 25\ 000$)。

4.3 外泌体颗粒大小 使用 PBS 稀释外泌体, 稀释比例为 1:200, 稀释后的外泌体注射到 Nanosight300 的检测槽中, 观察镜下出现大量颗粒时, 分别选取 4 个视野计算颗粒半径。

4.4 外泌体标志物蛋白 取 30 μ L 外泌体稀释至 90 μ L 并平均分为 3 份, 每份加入 20 μ L 荧光标记的抗体 (IgG, CD9, CD81), 混匀避光孵育 30 min, 随后加入 1 mL 预冷 PBS, 4 度 110 000 $\times g$ 离心 70 min, 取上清重复离心步骤, 最后加入 50 μ L 预冷 PBS 重悬并上样。

4.5 划痕实验 分别把 Hep1-6 及 MHCC97H 肝癌细胞种植到伤口愈合插件中, 细胞量可灵活调整, 过夜贴壁后密度接近 100% 即可。然后加入不同组别的外泌体 (2 μ g/mL) 刺激并换无血清培养基, 记录 0、24 及 48 h 的结果。最后结果基于划痕面积四等分, 记录 5 条线段的长度。

4.6 Transwell 迁移实验 两种肝癌细胞分别消化重悬计数, 按 3×10^5 孔种植到小室内, 加入外泌体并补充无血清培养基到 200 μ L; 下室加入 600 μ L 含血清培养基, 培养 24 h 后使用结晶紫对上室底部染色并于镜下拍照观察, 最后计算迁移细胞数量。

4.7 Transwell 侵袭实验 取溶解后的基质胶按

1:8 比例稀释并提前加到上室, 放入培养箱 4~5 h, 待基质胶凝固后进行细胞种植。细胞种植及染色步骤与 Transwell 迁移实验一致。

4.8 MHCC97H-luciferase-GFP 细胞构建 基于慢病毒转染的方法将 luciferase-GFP 质粒转进 293t 细胞, 取其病毒上清对 MHCC97H 细胞进行感染, 最后使用嘌呤霉素筛选目标细胞。

4.9 尾静脉肺转移模型建立 为了进一步模拟外泌体在体内对肝癌细胞转移能力的影响, 本研究建立了尾静脉肺转移裸鼠模型。裸鼠按照随机数字表法随机分为 3 组, 每组 3 只。对照组注射肝癌细胞及 PBS 缓冲液, 肝癌组注射肝癌细胞及肝癌组外泌体, 脾虚肝癌组注射肝癌细胞及脾虚肝癌组外泌体。将构建好的细胞系与外泌体混合并通过尾静脉注射到裸鼠体内, 细胞数量为 $10^6/100\ \mu$ L, 外泌体剂量为 10 μ g/ (只 $\cdot$ 周)。首次注射为外泌体与细胞的混合物, 随后每周只注射外泌体。于第 15、30 及第 45 日拍照记录肿瘤生长情况。成像时先向裸鼠腹腔注射荧光素钠盐, 剂量为 150 mg/kg, 气体麻醉后基于 AniView100 多模式动物活体成像系统检测裸鼠体内肿瘤生长情况。

4.10 外泌体 miRNA 测序分析 提取后的外泌体 (10 份, 肝癌组及脾虚肝癌组各 5 份) 送往联川生物技术有限公司进行 miRNA 测序。使用 T 检验筛选表达差异的 miRNA, 筛选标准为 $|\log_2(\text{Foldchange})| > 1$ (即两倍差异倍数) 且 $P < 0.05$; 然后基于 TargetScan 5.0 及 miRanda 3.3 对差异 miRNA 进行靶基因预测 (TargetScan_score ≥ 50 且 miranda_energy < -10); 基于 GO 和 KEGG 数据库使用 “clusterprofiler” 软件包对靶基因进行通路富集分析。

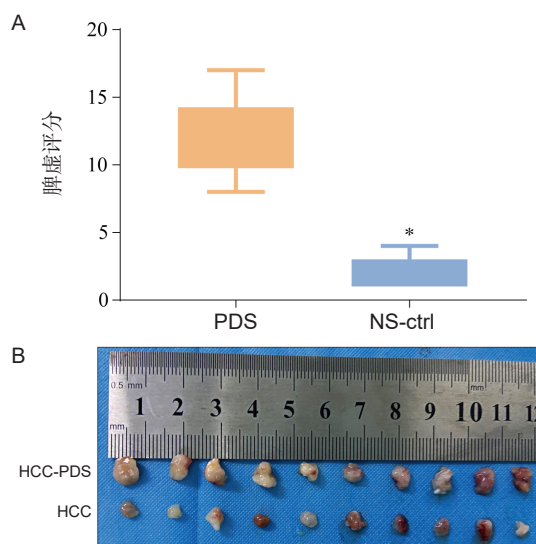
5 统计学方法 统计分析基于 GraphPad Prism 7, 使用 Shapiro-Wilk normality 检验检测样本是否符合正态分布, 服从正态分布的数据使用参数 t 检验, 不服从正态分布的数据使用非参数 t 检验; 使用参数 t 检验时, 基于 F 检验检测方差齐性, $P > 0.05$ 认为两组数据方差相同, 方差齐使用非配对 t 检验, 方差不齐则使用 Welch's 校正非配对 t 检验。本研究基于 t 检验用于两组间独立样本数据的差异比较, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本比较基于 One-way ANOVA 检验。 $P_{\text{双侧}} < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况观察 造模后第 14 天, 正常对照组

与肝癌组小鼠毛色有光泽,活动自如,反应灵活,体重增加,二便如常,无明显脾虚症状;脾虚组与脾虚肝癌组小鼠进食量减少,体重明显下降,精神不振,懒动扎堆,毛发枯槁,便溏(肛周不洁),脾虚症状明显。各组小鼠在造模期间均无死亡。

2 两组脾虚评分及肿瘤大小比较(图 1) 利血平腹腔注射组(12.2 ± 2.8)分比正常对照组(2.1 ± 0.9)分表现出更高分的脾虚积分($P < 0.0001$),表明脾虚小鼠建模成功(图 1A);而肝癌原位移植模型结果显示两组小鼠均长出大小不一的肿瘤,表明脾虚肝癌小鼠造模成功(图 1B)。全部小鼠并未出现意外死亡情况。



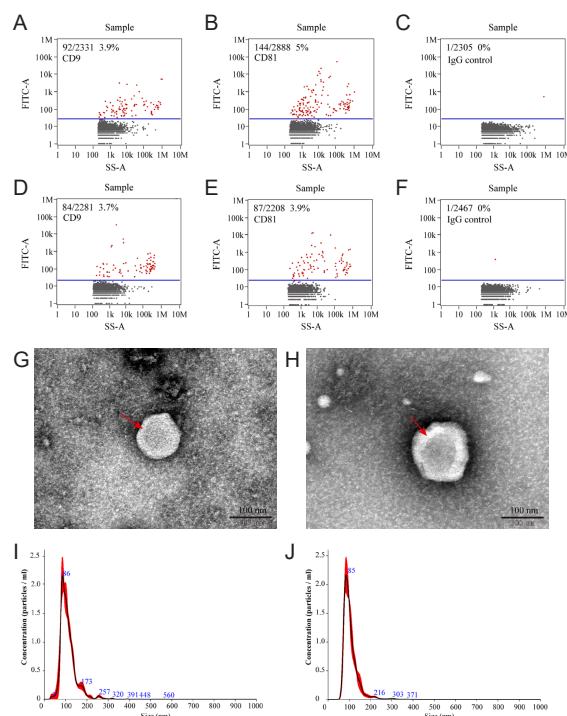
注: A 为脾虚积分对比箱式图, B 为肝癌组及脾虚肝癌组肿瘤大小比较; PDS 为利血平注射组, NS-ctrl 为正常对照组, 与利血平注射组比较, HCC-PDS 为脾虚肝癌组, HCC 为肝癌组, $*P < 0.0001$

图 1 两组小鼠模型脾虚积分及肿瘤大小比较

3 两组外泌体形态、半径大小及标志物比较(图 2) 纳米检测流式显示肝癌组与脾虚肝癌组外泌体均表达外泌体表面特异性蛋白 CD9、CD81; 纳米颗粒分析与透射电镜可观察到外泌体粒径在 30~100 nm, 呈典型“杯托状”结构。

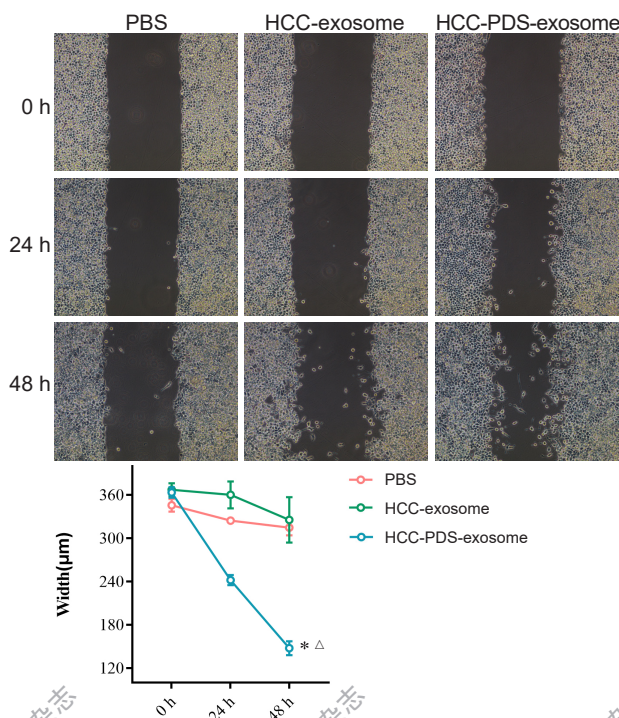
4 各组体外转移能力比较(划痕实验)(图 3、4) 对于 Hep1-6 和 MHCC97H 细胞而言, PBS 对照组、肝癌外泌体组及脾虚肝癌外泌体组在基线比较差异无统计学意义; 24 h 后, 与其他两组比较, 脾虚肝癌外泌体组的肝癌细胞产生了一定的迁移; 48 h 后, 与其他两组比较, 脾虚肝癌外泌体组的肝癌细胞产生明显的迁移, 差异有统计学意义($P < 0.0001$)。

5 各组体外转移能力比较(图 5、6) Transwell 迁移实验及侵袭实验结果显示, 无论是 Hep1-6 细胞



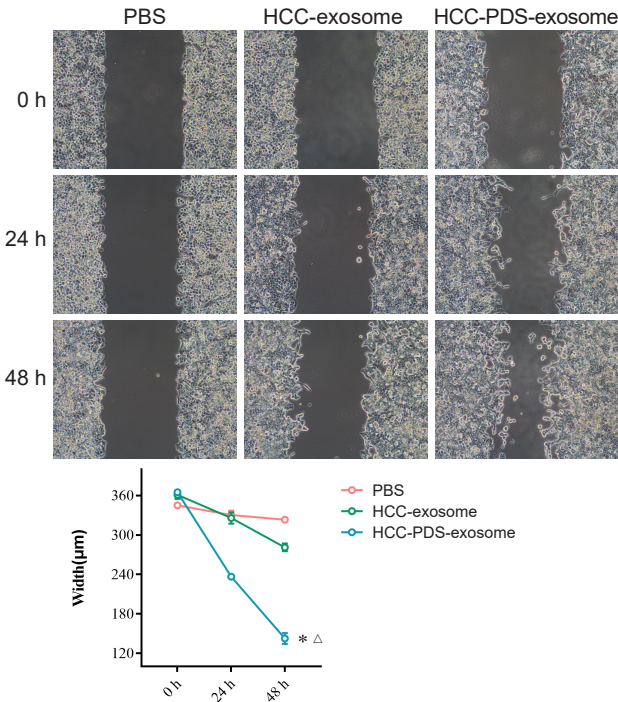
注: A~F 为外泌体表面蛋白纳米检测流式图; A、B、C 为肝癌组, D、E、F 为脾虚肝癌组, A、D 为 CD9 蛋白, B、E 为 CD81 蛋白, C、F 为 IgG 对照; G、H 电镜结果; I、JNTA 颗粒分析结果; HCC 为肝癌组, HCC-PDS 为脾虚肝癌组; 图 G、F 中红色箭头所指为外泌体经典的杯托状形态

图 2 两组外泌体形态、半径大小及标志物比较



注: PBS 为 PBS 对照组, HCC-exosome 为肝癌外泌体组, HCC-PDS-exosome 为脾虚肝癌外泌体组, 图 4~7 同; 与 PBS 组比较, $*P < 0.0001$; 与肝癌外泌体组比较, $\Delta P < 0.0001$

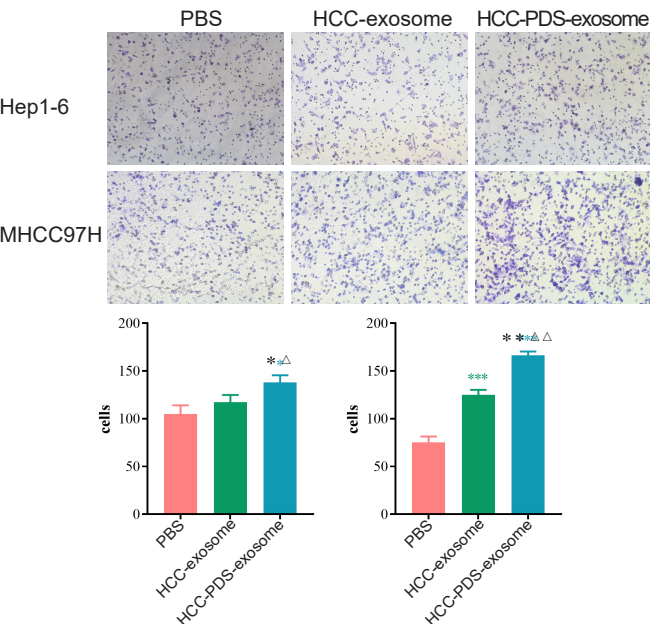
图 3 各组 Hep1-6 细胞划痕实验结果比较



注: 与 PBS 组比较, $*P<0.0001$; 与肝癌外泌体组比较, $\Delta P<0.0001$

图 4 各组 MHCC97H 细胞划痕实验结果比较

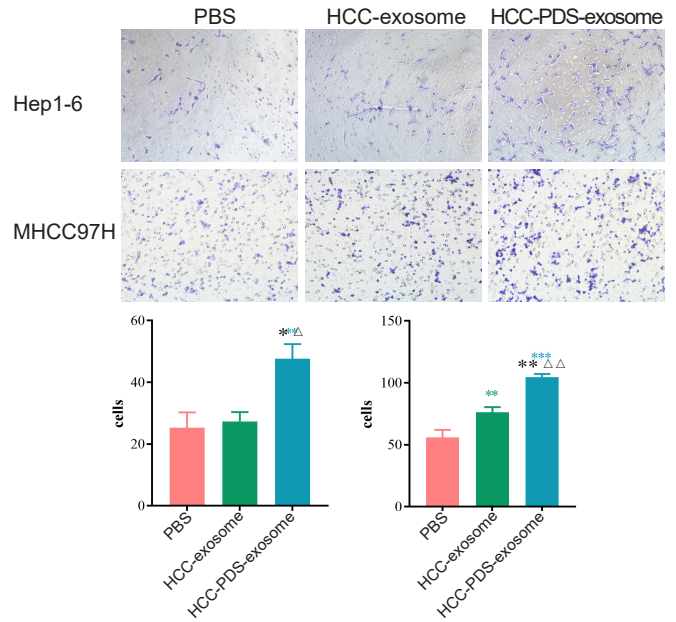
还是 MHCC97H 细胞, 脾虚肝癌外泌体组都能明显促进细胞的迁移及侵袭, 迁移及侵袭细胞的个数明显多于其他两组 ($P<0.01$)。



注: 与 PBS 组比较, $*P<0.01$, $**P<0.0001$; 与肝癌组比较, $\Delta P<0.05$, 与肝癌组比较, $\Delta\Delta P<0.001$

图 5 各组 Transwell 迁移实验结果比较

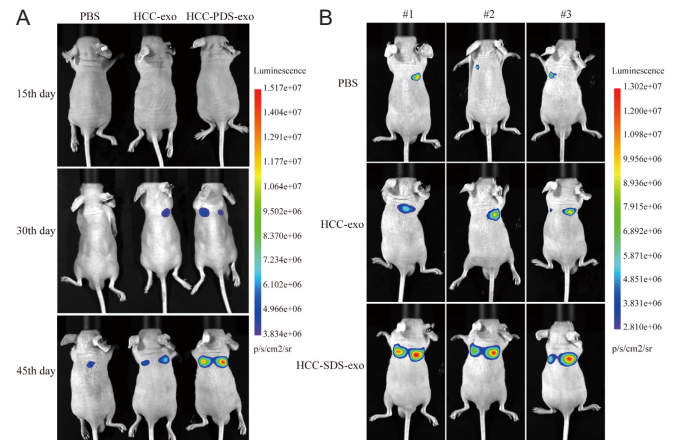
6 各组尾静脉肺转移裸鼠活体成像比较 (图 7) 模型活体成像结果显示, 15 天后三组裸鼠均无发现转移灶; 30 天后肝癌外泌体组裸鼠右侧肺部出现较小



注: 与 PBS 组比较, $*P<0.01$, $**P<0.001$, Δ 与肝癌组比较, $\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta P<0.001$

图 6 各组 Transwell 侵袭实验结果比较

的转移灶, 而脾虚肝癌外泌体组裸鼠双侧肺部均发现较小的转移灶; 45 天后 PBS 对照组裸鼠右侧肺部出现较小的转移灶, 肝癌外泌体组裸鼠双侧肺部发现较小的转移灶, 脾虚肝癌外泌体组双侧肺部发现较大的转移灶 (图 7A); 与其他两组比较, 末次活体成像时脾虚肝癌外泌体组裸鼠的肺部转移灶明显大于其他两组 (图 7B)。



注: A 为 3 个时间点连续观察的活体成像结果, B 为第 45 天三组裸鼠活体成像比较

图 7 各组裸鼠活体成像结果比较

7 两组外泌体差异 miRNA 比较 (图 8、9) 与肝癌外泌体组比较, 脾虚肝癌外泌体组中有 15 个差异表达的 miRNAs (图 8), 其中 9 个上调 (miR-183-3p、miR-1247-5p、miR-543-3p、miR-495-3p、miR-

466i-5p、miR-540-5p、miR-125b-5p、miR-214-3p、miR-499-5p), 6 个下调 (miR-6516-5p、miR-450a-3p、let-7g-3p、miR-103-5p、miR-5129-3p、miR-301b-3p)。通过对差异 miRNAs 的靶基因进行通路功能分析, GO 数据库结果显示差异 miRNAs 靶向的 mRNAs 主要富集在转移酶活性, 蛋白磷酸化, 蛋白结合, RNA 聚合物转录的正向调节及质膜等相关通路上 (图 9A), 而 KEGG 数据库以 Wnt 信号, T 细胞受体, 多能干细胞的调节, 肾透明细胞癌及肌动蛋白细胞骨架等相关通路为主 (图 9B)。

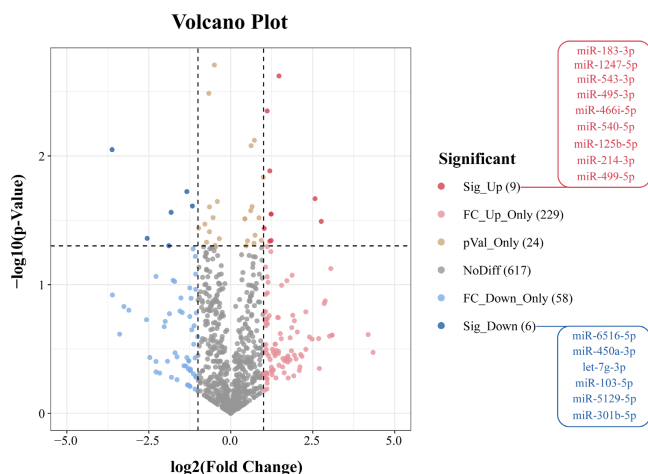
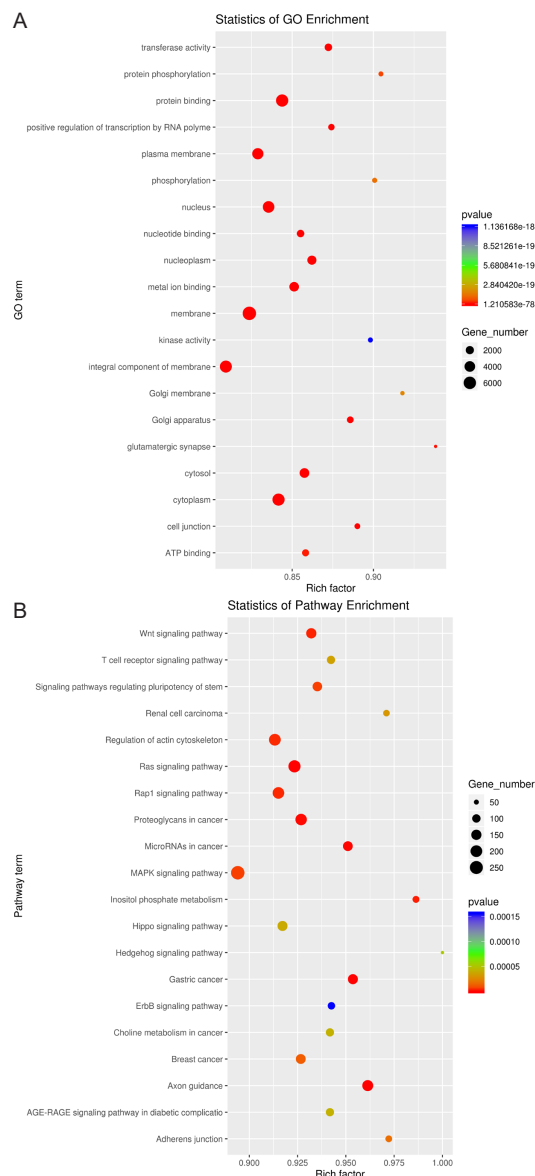


图 8 差异表达 miRNAs 火山图

讨 论

脾虚通过影响 HCC 的肿瘤微环境而促进肝癌的发展^[10]。前期研究发现, 脾虚湿浊转运障碍导致的机体内环境变化与肝癌发生发展密切相关; 脾虚肝癌大鼠 T 细胞受体 β 链超变区第 3 互补决定区 (TCRV β CDR3) 谱系的多样性的下降、准高斯分布的减少、偏峰寡克隆和单克隆型的增加, 提示脾虚状态加重了肝癌免疫识别功能的异常; 脾虚肝癌大鼠中, ATP 结合家族亚家族 C 成员 2 (ABCC2) and Oatp1b2 在肝组织中均表达明显下降, 恶液质程度也较重, 生存时间明显降低^[3], 提示脾虚是通过影响肝癌微环境——“土壤”的变化来调控肝癌发展^[11]。外泌体作为细胞与细胞之间通讯的介质, 在肿瘤微环境中扮演着重要的角色。但脾虚是否通过外泌体调节肿瘤微环境从而促进 HCC 进展仍有待探索。本研究表明脾虚状态下的外泌体能够促进 HCC 的转移。前期研究表明酸性微环境通过诱导 HCC 释放带有 exo-miR-21 和 exo-miR-10b 的外泌体从而促进肿瘤的增殖和转移^[12], 脾失健运, 进而导致痰湿内蕴, 而现代研究表明这种因代谢失常凝结而成的“痰”相



注: 图中颜色代表 P 值大小, 颜色越红 P 值越小; 圆点代表富集基因数目, 圆点越大数目越多

图 9 差异 miRNAs 靶向 mRNAs 通路富集结果

当于肿瘤微环境的酸性代谢物^[13, 14], 脾虚与酸性微环境密不可分。外泌体是机体湿浊的重要组成部分, 有学者提出外泌体是脏腑之间的信使, 有望进一步成为中医脏腑相关理论的物质基础^[15]; 同时前期研究发现脾虚肝癌小鼠癌组织中有机阴离子转运肽 (organic anion transporter polypeptide, Oatp) 相关亚家族的蛋白表达水平明显升高^[16, 17], 提示以脾为中心的湿浊转运失常在肝癌发生发展中扮演着重要的角色。因此笔者推测脾虚能诱导肝癌细胞的自分泌行为, 其分泌的外泌体进一步促进了自身的转移能力, 但具体机制仍有待进一步验证。

脾虚小鼠模型是研究中医脾胃学说的重要模型

之一,建立符合脾虚特征的模型对探讨中医脾虚证型有深刻的影响。目前建立脾虚小鼠模型的方法主要包括单因素造模和多因素造模方法,单因素造模方法包括劳倦过度法、饮食失节法、苦寒泻下法及利血平注射法等^[18],而前期研究表明利血平注射法建立的模型呈现出宏观指标和理化指标的明显变化,是短期造模的首选方法^[18]。根据脾主运化水液和水湿的生理功能来看,利血平注射会引起小鼠黏膜下的严重水肿^[19],符合脾虚证型下水液代谢障碍的特征;从脾主统血的生理功能而言,利血平注射会引起犬类模型中的红细胞数、血红蛋白及红细胞平均容积的明显下降^[20],提示其损害血液质量的特征;从脾主四肢肌肉的生理功能而言,前期研究也表明利血平注射会导致小鼠肌肉组织中糖原的减少^[21]。此外,基于肝病实脾理论,肝脾两脏在生理和病理上相互影响,有研究表明利血平注射所致的大鼠模型呈现出肝细胞体积减少、脂肪空泡增多及血清 ALT 明显上升等多种肝脏损伤的特征^[22]。以上证据均表明利血平注射法在单因素造模方法中具有明显的优越性,同时,基于利血平模型所致脾虚模型的水液代谢障碍特点及外泌体属于机体湿浊组成部分的观点,笔者认为利血平注射所致的脾虚模型是研究脾虚状态下外泌体对肝癌影响的合理的模型。

外泌体转运的 RNA 种类主要包括 miRNAs 和 lncRNAs^[5],miRNA 是一类长度为 17-24nt 的保守的非编码 RNA,其通过与靶向的 mRNA 互补碱基互对,降解 mRNA 或切断其翻译,抑制蛋白质的表达^[23]。外泌体携带的 miRNAs 已被证实促进了 HCC 的发展。Fang T 等^[24]发现 HCC 相关成纤维细胞来源的外泌体中 exo-miR-1247-3p 促进 HCC 的肺转移;在另一项研究中,Liu G 等^[25]发现巨噬细胞可以通过分泌含有 exo-miR-92a-2-5p 的外泌体从而促进 HCC 细胞的侵袭。笔者前期研究发现,与肝癌组比较,脾虚肝癌组肝癌组织和外泌体中细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4,CTLA-4)、程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein1,PD-1) 蛋白表达明显上调,其机制可能通过调节 PTEN/CD44 通路有关^[26]。本研究对脾虚状态下的外泌体进行 miRNA 测序,发现 15 个差异表达的 miRNAs,这些 miRNAs 靶向的 mRNAs 同时也富集在与转移相关的通路上(如 Wnt/ β -catenin 通路),表明脾虚状态下外泌体通过 miRNA-mRNA 轴促进肝癌的转移。然而,本研究未深入探索 miRNA-mRNA 轴的调控机制,仍有待进一步

的实验验证。本研究基于脾虚状态探索外泌体对肝癌转移影响,其研究结果有助于阐释脾虚影响肝癌转移的具体机制。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究及文章撰写过程中不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70 (1): 7-30.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127 (12): 2893-2917.
- [3] 徐诗画, 罗浩轩, 项婷, 等. 脾虚内环境对诱导型肝癌小鼠胃组织中 oatp2a1、oatp2b1、oatp4a1、oatp1b2 表达的影响 [J], 中华中医药学刊, 2019, 37 (10): 2358-2362.
- [4] 陈燕, 胡浩, 戴敏, 等. 基于脾虚肝癌小鼠 Oatp2b1 的表达探讨“因湿致瘀”的内涵 [J], 时珍国医国药, 2017, 28 (6): 1407-1409.
- [5] Wortzel I, Dror S, Kenific CM, et al. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance [J]. Dev Cell, 2019, 49 (3): 347-360.
- [6] Chen J, Zhang K, Zhi Y, et al. Tumor-derived exosomal miR-19b-3p facilitates M2 macrophage polarization and exosomal LINC00273 secretion to promote lung adenocarcinoma metastasis via Hippo pathway [J]. Clin Transl Med, 2021, 11 (9): e478.
- [7] Liu T, Li P, Li J, et al. Exosomal and intracellular miR-320b promotes lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 23: 163-180.
- [8] Ma Z, Wei K, Yang F, et al. Tumor-derived exosomal miR-3157-3p promotes angiogenesis, vascular permeability and metastasis by targeting TIMP/KLF2 in non-small cell lung cancer [J]. Cell Death Dis, 2021, 12 (9): 840.
- [9] 陈燕, 项婷, 孙保国, 等. 脾虚小鼠原位移植肝癌模型的建立及评价 [J], 中西医结合肝病杂志, 2016, 26 (1): 30-34, 47.
- [10] 张书侨, 胡浩, 罗绍驹, 等. 肝癌脾虚内环境免疫机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31 (8): 1961-

- 1963.
- [11] Sun B, Meng J, Xiang T, et al. Effect of the herbal formulation Jianpi jiedu on the TCRV β CDR3 repertoire in rats with hepatocellular carcinoma and subjected to food restriction combined with laxative[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11 (3): 818–826.
- [12] Tian XP, Wang CY, Jin XH, et al. Acidic microenvironment up-regulates exosomal miR-21 and miR-10b in early-stage hepatocellular carcinoma to promote cancer cell proliferation and metastasis [J]. *Theranostics*, 2019, 9 (7): 1965–1979.
- [13] 蒋明. 关于痰饮与细胞间质液体 pH 的相关性 [J]. *中医杂志*, 2003, 44 (9): 645–646.
- [14] 张慈安, 魏品康, 李勇进. 痰浊与肿瘤微环境的相关性探讨 [J]. *中西医结合学报*, 2010, (3): 215–219.
- [15] 李勇敏, 谭小宁, 马荣丽, 等. 中医脏腑相关理论新释——外泌体与脏腑相关理论之联系探微 [J]. *湖南中医杂志*, 2017, 33 (2): 1–4.
- [16] 陈燕, 胡浩, 戴敏, 等. 基于脾虚肝癌小鼠 *Oatp2b1* 的表达探讨“因湿致瘀”的内涵 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28 (6): 1407–1409.
- [17] 张诗军, 潘爱珍, 孙保国, 等. 脾虚内环境湿浊转运机理研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32 (3): 455–457.
- [18] 王启航, 陆瑞敏, 陈萌, 等. 4 种脾虚造模法的横向对比研究 [J]. *天津中医药*, 2022, 39 (2): 238–243.
- [19] 李晨, 王垂杰. 3 种脾虚证模型大鼠胃黏膜损伤情况的比较 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2013, 21 (3): 127–130.
- [20] 刘静. 犬脾虚模型的建立及中药制剂的治疗效果 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- [21] 张霞, 程富胜, 魏彦明. 实验性脾虚证大鼠肝脏和肌肉组织中糖原变化的组织学观察 [J]. *中兽医医药杂志*, 2007, 26 (1): 9–11.
- [22] 王宁, 郭凯军, 甘静宜, 等. 四君子汤对脾虚大鼠肝脏结构与功能的影响 [J]. *北京农学院学报*, 2010, 25 (2): 40–44.
- [23] Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2009, 4: 199–227.
- [24] Fang T, Lyu XH, Lv G, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 191.
- [25] Liu G, Ouyang X, Sun Y, et al. The miR-92a-2-5p in exosomes from macrophages increases liver cancer cells invasion via altering the AR/PHLPP/p-AKT/ β -catenin signaling [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27 (12): 3258–3272.
- [26] Wang Y, Li P, Mao S, et al. Exosome CTLA-4 regulates PTEN/CD44 signal pathway in spleen deficiency internal environment to promote invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 20 (12): 757–194.
- (收稿: 2022-05-04 在线: 2022-11-17)
- 责任编辑: 赵芳芳