[文章编号] 1671-587X(2026)04-0987-12 DOI：10.13481/j.1671-587X.20260411

外泌体调控巨噬细胞极化对人食管鳞状细胞癌细胞增殖和转移的促进作用及其机制

李疆芬，房新志
（新疆医科大学第四附属医院病理科，新疆 乌鲁木齐 830000）

[摘 要] **目的：**探讨外泌体诱导巨噬细胞向M2型极化对人食管鳞状细胞癌（ESCC）细胞生物学行为的影响，并阐明其作用机制。**方法：**基于癌症基因组图谱（TCGA）数据库中食管癌和正常食管组织数据，应用基因表达谱交互式分析（GEPIA）鉴定不同亚型肿瘤相关巨噬细胞（TAMs）在食管癌和正常组织中的富集情况及食管癌组织中缺氧诱导因子1α（HIF-1α）与相关分子表达的相关性，采用肿瘤免疫估计资源（TIMER）软件分析TAMs对食管癌患者生存指标的影响、单样本基因集富集分析（ssGSEA）筛选M2型TAMs极化相关基因。在基因表达综合（GEO）数据库中以“ESCC”和“外泌体”为关键词进行检索，获得GSE104926数据集，包括ESCC患者和非ESCC患者血浆外泌体基因表达谱数据。利用GEO2R分析差异基因，采用外泌体分离试剂盒提取和纯化人ESCC细胞系EC109产生的外泌体。采用透射电子显微镜（TEM）和纳米颗粒跟踪分析技术（NTA）检测外泌体形态表现和粒径，Western blotting法检测提纯的外泌体和纯化后的EC109上清液中外泌体相关蛋白分化簇（CD）9和CD63的表达情况。应用佛波酯诱导人外周血单核细胞THP-1为M0型巨噬细胞，免疫荧光实验观察外泌体被巨噬细胞内化的过程，流式细胞术检测EC109外泌体处理后的巨噬细胞和未处理的M0型巨噬细胞的表型标记物CD80和CD206表达。缺氧条件下，采用实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法和Western blotting法检测EC109外泌体处理前后巨噬细胞中*HIF-1α* mRNA和蛋白表达水平。将外泌体诱导前后的巨噬细胞与EC109细胞共培养，采用细胞计数盒8（CCK-8）法检测EC109细胞增殖活性，流式细胞术检测EC109细胞凋亡率，Transwell小室实验检测EC109细胞的侵袭细胞率，划痕实验检测EC109细胞迁移能力，并计算划痕愈合率。**结果：**TCGA和GEO数据分析，与正常食管组织比较，食管癌组织中各亚型TAMs浸润数均明显增加（$P<0.05$）；M2型TAMs浸润数与食管癌患者无疾病间隔时间（DFI）有关联（$P<0.05$）。双糖链蛋白聚糖（BGN）为在ESCC患者血浆外泌体中表达水平升高，且与M2型TAMs极化有关联（$P<0.05$）。在食管癌组织中，M2型TAMs中标记物巨噬细胞清道夫受体1（MSR1）、BGN与HIF-1α表达水平存在明显正相关关系（$r>0$，$P<0.05$）。分离的EC109衍生的外泌体形态呈茶托状，大小为（127.17±0.90）nm。与提取后的EC109上清液比较，提取的EC109外泌体中CD9和CD63表达水平明显升高（$P<0.05$）。EC109外泌体可被巨噬细胞摄取并内化。与未处理的M0型巨噬细胞比较，EC109外泌体处理后的巨噬细胞中CD80和CD206阳性细胞数明显增多（$P<0.05$）；细胞中*HIF-1α* mRNA和蛋白表达水平均明显升高（$P<0.05$）。与M_0型巨噬细胞处理的EC109细胞比较，外泌体诱导的巨噬细胞与EC109细胞共培养后，EC109细胞增殖活性升高（$P<0.05$），细胞凋亡率升高（$P<0.05$），侵袭细胞率升高（$P<0.05$），划痕愈合率升高（$P<0.05$）。**结论：**ESCC细胞衍生的外泌体可能通过BGN激活HIF-1α调控巨噬细胞极化，

[收稿日期] 2025-07-16 [录用日期] 2025-11-10
[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目（2022D01C820）
[作者简介] 李疆芬（1995－），女，新疆维吾尔自治区伊宁市人，主治医师，医学硕士，主要从事食管鳞癌肿瘤微环境方面的研究。
[通信作者] 李疆芬，主治医师（E-mail：1427252351@qq.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

从而促进ESCC增殖和侵袭，并抑制凋亡，其机制与外泌体在ESCC和TAMs之间的相互作用中发挥信号传递作用有关。

[关键词] 食管肿瘤；外泌体；肿瘤相关巨噬细胞；巨噬细胞极化；缺氧诱导因子1α；双糖链蛋白聚糖

[中图分类号] R735 [文献标志码] A

Promotion effect of exosome-regulated macrophage polarization on proliferation and metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma cells and its mechanism

LI Jiangfen, FANG Xinzhi

(Department of Pathology, Fourth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT **Objective**: To discuss the effect of exosome-induced macrophage polarization to M2 type on the biological behavior of human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells, and to clarify its molecular mechanism. **Methods**: The data of esophageal cancer and normal esophageal tissue from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database were analyzed; Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) was used to identify the enrichment of different subtypes of tumor-associated macrophages (TAMs) in esophageal cancer and normal tissues and the correlation between hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and related molecule expression in esophageal cancer; Tumor Immune Estimation Resource (TIMER) software was used to analyze the impact of TAMs on the survival indicators of esophageal cancer patients; single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) was used to screen genes related to M2-type TAMs polarization. The Gene Expression Omnibus (GEO) database was searched with the keywords "ESCC" and "exosome" to obtain the GSE104926 dataset, which included plasma exosome gene expression profile data from ESCC patients and non-ESCC patients. GEO2R was used to analyze differential genes, exosome isolation kit was used to extract and purify exosomes produced by human ESCC cell line EC109. Transmission electron microscope (TEM) and nanoparticle tracking analysis (NTA) were used to detect the morphology and particle size of exosomes; Western blotting method was used to detect the expression of exosome-related proteins cluster of differentation (CD) 9 and CD63 in the purified exosomes and the purified EC109 supernatant. Human peripheral blood mononuclear cell line THP-1 was induced into M0 macrophages using phorbol ester; immunofluorescence staining was used to observe the internalization process of exosomes by macrophages; flow cytometry was used to detect the expression of phenotypic markers CD80 and CD206 in macrophages after treated with EC109 exosomes and untreated M0 macrophages. Under hypoxic conditions, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of *HIF-1α* mRNA and protein in macrophages before and after EC109 exosome treatment. The macrophages before and after exosome induction were co-cultured with EC109 cells; cell counting kit 8 (CCK-8) method was used to detect the proliferation activity of the EC109 cells; flow cytometry was used to detect the apoptotic rate of the EC109 cells; Transwell chamber assay was used to detect the rate of invasion EC109 cells; scratch wound healing assay was used to detect the migration ability of the EC109 cells and the wound closure rate was calculated. **Results**: The TCGA and GEO data analysis results showed that compared with normal esophageal tissue, the infiltration numbers of various subtypes of TAMs in esophageal cancer were significantly increased ($P<0.05$); the infiltration number of M2-type TAMs was closely related to the disease-free interval (DFI) of

esophageal cancer patients ($P<0.05$). Biglycan (BGN) was a gene with increased expression in plasma exosomes of ESCC patients and significantly associated with M2-type TAMs polarization ($P<0.05$). In esophageal cancer tissue, there were significant positive correlations between the expression levels of M2-type TAMs markers macrophage scavenger receptor 1 (MSR1), biglycan(BGN) and HIF-1α ($r>0$, $P<0.05$). The isolated EC109-derived exosomes exhibited a cup-shaped morphology with a size of (127.17±0.90) nm. Compared with extracted EC109 supernatant, the expression levels of CD9 and CD63 in the extracted EC109 exosomes were significantly increased ($P<0.05$). The EC109 exosomes could be taken up and internalized by macrophages. Compared with untreated M_0 macrophages, the number of $CD80^-$ and $CD206^+$ cells in macrophages treated with EC109 exosomes was significantly increased ($P<0.05$), and the expression levels of *HIF-1α* mRNA and protein in the cells were significantly increased ($P<0.05$). Compared with M0 macrophage treatment group, after co-culture of exosome-induced macrophages with EC109 cells, the proliferation activity of the EC109 cells was increased ($P<0.05$), the apoptotic rate was increased ($P<0.05$), the rate of invasion cells was increased ($P<0.05$), and the migration area was increased ($P<0.05$). **Conclusion**: The ESCC cell-derived exosomes may regulate macrophage polarization by activating HIF-1α through BGN, thereby promoting ESCC proliferation and invasion, and inhibiting apoptosis; its mechanism is related to the role of exosomes in signal transmission in the interaction between ESCC and TAMs.

KEYWORDS Esophageal neoplasm; Exosome; Tumor-associated macrophage; Macrophage polarization; Hypoxia-inducible factor 1α; Biglycan

食管癌在全球癌症发病率中排名第11位，死亡率中排名第7位[1]。在中国病例数较多，并且以食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma，ESCC）为主，疾病发展迅速，患者5年生存率低[2]。探讨ESCC进展的分子机制对患者治疗和改善预后有重要意义。肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages，TAMs）是ESCC组织中主要的免疫细胞之一[3]。TAMs主要分为2种类型：经典激活的M1型（抑癌表型）和交替激活的M2型（促癌表型）[4]。ESCC中主要以M2型为主，与ESCC患者多种不良临床病理因素如血管、淋巴管转移、淋巴结转移和远处转移等显著相关，并且与ESCC患者不良预后密切相关[5-6]。了解ESCC如何诱导TAMs极化的分子机制，是阐明ESCC细胞和免疫细胞间相互作用的重要方向之一。

源自肿瘤细胞的外泌体主要发挥细胞间信号传递作用，参与免疫微环境的重塑和肿瘤细胞的迁移及侵袭[7-8]。外泌体是否是ESCC驯化TAMs成为促癌表型这一过程的重要“传递员”尚不清楚。在肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）中，ESCC可能通过外泌体驯化TAMs向M2型极化，进而正反馈促进ESCC的侵袭和转移。探讨外泌体介导巨噬细胞极化促进ESCC浸润转移的分子机制可为ESCC免疫治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 生物信息学分析

1.1.1 数据集来源 生物信息学分析数据来自：①癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）中食管癌数据；②在基因表达综合（Gene Expression Omnibus，GEO）数据库，以“ESCC”和“外泌体”为关键词进行检索，获得GSE104926数据集，包括6例ESCC患者和12例正常患者血浆外泌体的mRNA测序数据[9]。

1.1.2 生物信息学方法 采用基因表达谱交互式分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis，GEPIA)（http：//gepia. cancer-pku. cn/）在线分析网站[10]分析食管癌组织和正常组织中不同亚型TAMs的浸润差异。此外，还用于分析双糖链蛋白聚糖（biglycan，BGN）、巨噬细胞清道夫受体1（macrophage scavenger receptor 1，MSR1）和缺氧诱导因子1α（hypoxia-inducible factor 1α，HIF-1α）表达的相关性。

应用肿瘤免疫估计资源（Tumor Immune Estimation Resource，TIMER）网站（https：//cistrome. shinyapps. io/timer/）分析TCGA食管癌数据[11]，评估不同亚型TAMs浸润对食管癌患者生存的影响，包括总体生存期（overall survival，OS）、无进展间隔期（progression free interval，

PFI）、无进展生存期（progression free survival，PFS）、疾病特异性生存期（disease specific survival，DSS）和无疾病间隔期（disease free interval，DFI）。同时，分析BGN表达与食管癌TME中多种免疫相关分子浸润的相关性。

利用单样本基因集富集分析（single-sample Gene Set Enrichment Analysis，ssGSEA）对TCGA中食管癌数据根据M2型TAMs极化相关的基因集[12]进行评分，以$P<0.05$且评分>1为M2型TAMs相关基因。利用GEO2R鉴定GSE104926中ESCC与正常组织血浆外泌体中的差异表达基因，计算变换倍数（fold chenge，FC），以$P<0.05$且$\log_2FC>1$为该基因表达显著上调。二者取交集为ESCC外泌体中高表达且与M2型TAMs极化相关的基因。

1.2 细胞、主要试剂和仪器

人ESCC细胞系（EC109）购自武汉普诺赛生命科技有限公司，人单核细胞白血病细胞系（THP-1）购自中国科学院细胞库（中国上海）。佛波酯购自美国MCE公司，外泌体提取试剂盒（货号：DL21082-20T-20mL）和Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡检测试剂盒（货号：DL21036）均购自中国多莱泌公司，PKH26染色工作液（货号：UR52302）购自中国宇玫博生物，Hoechst 33342（货号：P0133）和放射免疫沉淀实验裂解液（radio immunoprecipitation assay，RIPA）（货号：P0013B）均购自中国碧云天公司，PE抗人分化簇（cluster of differentiation，CD）80抗体（货号：E-AB-E-AB-F1232D）和FITC抗人CD206/MMR抗体（货号：E-AB-E-AB-F1232D）均购自中国伊莱瑞特公司，RNA提取试剂盒（货号：220011）购自上海飞捷生物技术有限公司，逆转录qPCR试剂盒（货号：FSQ-101）购自日本TOYOBO公司，高灵敏度SYBR荧光定量PCR预混液（货号：E099-01B）购自中国Novoprotein公司，抗体CD63（货号：sc-5275）、CD9（货号：sc-13118）和鼠二抗体（货号：sc-516102）均购自美国圣克鲁斯生物有限公司，抗体HIF-1α（货号：20960-1-AP）和β-tublin（货号：10094-1-AP）均购自美国三鹰公司，抗体β-actin（货号：12620S）购自美国细胞信号转导公司，兔二抗体（货号：SA00001-2）购自美国赛默飞公司，ECL Western特异发光检测试剂盒（货号：170-5060）购自美国伯乐公司，细胞计数试剂盒（cell counting kit-8，CCK-8）（货号：CA1210）购自中国索莱宝公司。缺氧培养箱（型号：SQ110B）购自上海川纳公司，透射电子显微镜（型号：HT7700）购自日本日立公司，纳米颗粒跟踪分析仪系统（型号：PMX-120）购自德国Particle Metrix公司，激光共聚焦显微镜（型号：UltraVIEW VoX和IX81）分别使用美国珀金埃尔默公司和日本奥林巴斯公司，流式细胞仪（CytoFLEX S）购自美国贝克曼库尔特公司，显微镜（型号：TE200-U）购自德国尼康公司。

1.3 细胞培养和分组

THP-1细胞使用THP-1专用培养基（RPMI-1640＋10％胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）＋0.05 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇）培养。EC109细胞使用RPMI-1640＋10％ FBS培养基培养。培养基均含有100 mg·L^{-1} 1％青-链霉素。将细胞置于含5％ CO_2、37 ℃培养箱中，待细胞生长至对数生长期，进行后续实验。100 μg·L^{-1}佛波酯（美国MCE公司）处理24 h，将THP-1细胞诱导为M0型巨噬细胞。50 mg·L^{-1} EC109细胞外泌体或PBS缓冲液处理M0型巨噬细胞24 h。检测HIF-1α水平时，将细胞置于37 ℃、1％ O_2和5％ CO_2缺氧培养箱中培养。将外泌体诱导后的M0型巨噬细胞或M0型巨噬细胞接种于Transwell小室的上室，EC109细胞接种于共培养下室，非接触共培养24 h。

1.4 外泌体的提取和纯化

收集EC109细胞换液后的培养上清液至所需体积，使用外泌体提取试剂盒提取外泌体。样品10 000 g离心10 min，去除细胞碎片后加入浓缩液，静置2 h。10 000 g离心1 h，沉淀后重悬，转入外泌体纯化过滤器柱上室中，3 000 g离心10 min，收集纯化过滤器柱底部的液体，即为纯化后的外泌体颗粒。纯化后的外泌体以50～100 μL分装，保存于－80 ℃低温冰箱中备用。

1.5 外泌体的鉴定

透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM）观察方法：采用移液器吸取10 μL外泌体悬液滴于封口膜上，再吸取10 μL 2％磷钨酸溶液滴于封口膜上。将铜网正面朝向染色液，静置5 min。于TEM下观察拍照。纳米颗粒跟踪分析技术（nanoparticle tracking analysis，NTA）检测法：使用纳米颗粒跟踪分析仪系统，经校准后检测外泌体粒径。

1.6 免疫荧光实验检测ESCC细胞衍生的外泌体形态表现

将“PKH26 linker”与“Diluent C”按照1∶9比例混匀，配置PKH26染色工作液。外泌体中加入PKH26染色工作液，充分混匀后静置孵育10 min。120 000 g离心90 min，去除游离工作液。将外泌体与M0型巨噬细胞共孵育12 h。PBS缓冲液清洗，4%多聚甲醛固定。采用0.2% Triton X-100孵育样品破膜。加入鬼笔环肽孵育30 min。弃去鬼笔环肽工作液，PBS缓冲液避光洗涤细胞。采用Hoechst 33342复染细胞核后封片。于激光共聚焦显微镜下拍照。

1.7 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

免疫细胞分选采用PE抗人分化簇（cluster of differention，CD）80抗体和FITC抗人CD206/MMR抗体进行孵育，采用流式细胞术检测CD80和CD206阳性细胞百分率。细胞凋亡率检测采用Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡检测试剂盒处理，室温下孵育15 min，计算细胞凋亡率。细胞凋亡率＝凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.8 实时荧光定量PCR反应(real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR)法检测各组细胞中*HIF-1α* mRNA表达水平

使用RNA提取试剂盒（RNAfast200，220011，上海飞捷，中国）提取EC109外泌体诱导的巨噬细胞和M0型巨噬细胞总RNA，并使用逆转录试剂盒将其逆转录为cDNA。采用SYBR High-Sensitivity qPCR Supermix进行RT-qPCR反应，引物序列由生工生物(上海)工程股份有限公司合成。以*β-actin*为内参，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算各组细胞中*HIF-1α* mRNA表达水平。引物序列：*HIF-1α*上游引物为5′-GAAAGCGCAAGTCCTCAAAG-3′，*HIF-1α*下游引物为5′-TGGGTAGGAGATGG-AGATGC-3′；*β-actin*上游引物为5′-TGGACTT-CGAGCAAGAGATG-3′，*β-actin*下游引物为5′-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3′。

1.9 Western blotting法检测各组细胞中目的蛋白表达水平

采用放射免疫沉淀测定（radio-immunoprecipitation assay，RIPA）裂解液提取细胞总蛋白。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE)分离蛋白质，并转移至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜上，室温封闭1 h。将膜与CD63抗体、CD9抗体、HIF-1α抗体、β-tubulin抗体及β-actin抗体于4℃孵育过夜。洗涤后，分别与辣根过氧化物酶标记的鼠二抗和兔二抗室温孵育2 h。使用增强型化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）试剂盒显影。以β-tubulin或β-actin为内参，采用Image J软件分析目的蛋白条带灰度值，计算目的蛋白表达水平，目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.10 细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8，CCK-8)法检测各组细胞增殖活性

细胞消化后计数，以每孔1 000个细胞的密度接种于96孔细胞培养板中，置于37 ℃培养箱中培养。待细胞贴壁后，每孔加入10 μL CCK-8溶液，孵育1～2 h。采用酶标仪检测波长450 nm处的吸光度（A）值，以A值代表为组细胞增殖活性。

1.11 Transwell小室实验检测各组侵袭细胞率

在Transwell小室上室中加入100 μL稀释的基质胶，再加入100 μL无血清培养基水化。取1×10^4个细胞接种于上室，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。4%多聚甲醛固定，结晶紫染色，于显微镜下拍照，计数各组细胞侵袭细胞数，并计算侵袭细胞率。侵袭细胞率＝侵袭细胞数/细胞总数×100%。

1.12 划痕实验检测各组细胞划痕愈合率

将5×10^5个细胞接种于6孔细胞培养板板中，待细胞贴壁后，采用200 μL移液器吸头在孔中划直线。置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，于0和24 h分别在显微镜下拍照记录，计数各组划痕愈合率，并计算细胞划痕愈合率，细胞划痕愈合率＝迁移细胞所占面积/细胞总面积×100%。

1.13 统计学分析

采用GraphPad Prism 9软件进行统计学分析。所有实验均独立重复3次。计量资料均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，2组间样本均数比较采用两独立样本t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

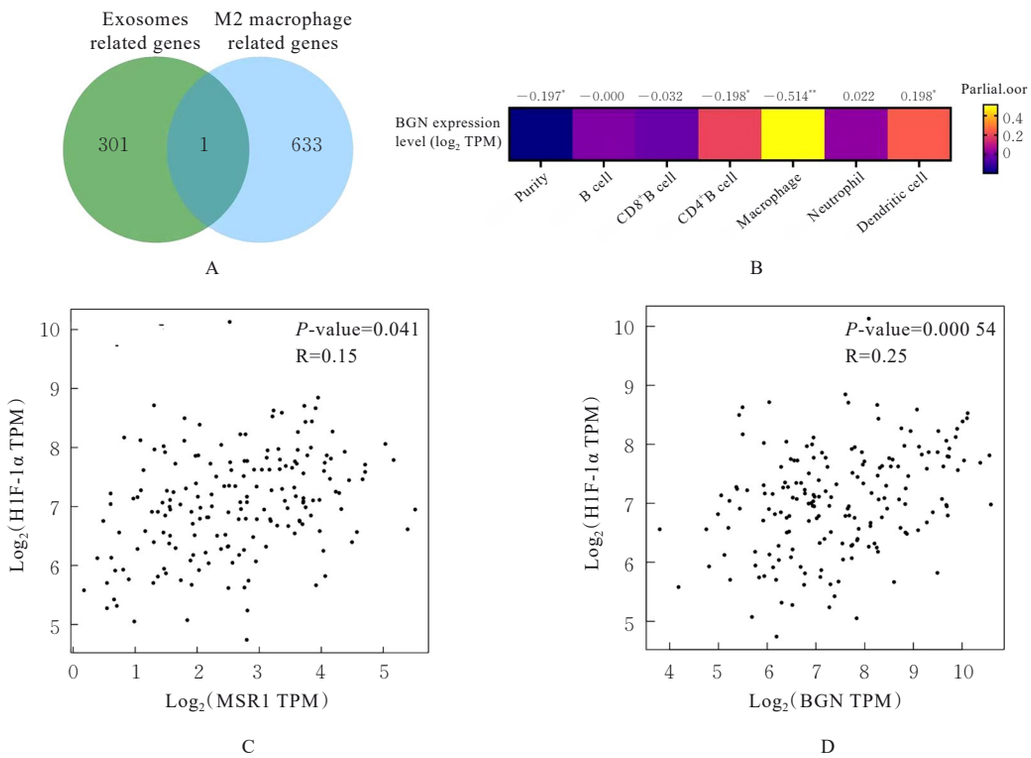
2.1 生物信息学分析ESCC衍生外泌体中BGN与巨噬细胞M2极化的关系

通过GSE104926测序数据分析ESCC患者血浆外泌体中表达显著上调的分子。同时，应用ssGSEA根据基因集进行评分，筛选食管癌组织中

与 M2 型 TAMs 高度相关的分子。二者取交集为 BGN，即 BGN 在 ESCC 患者血浆外泌体中表达上调且与 M2 型 TAMs 极化相关（$P<0.05$），见图 1A。进一步验证 BGN 在食管癌 TME 中的作用，BGN 表达上调与 TAMs 聚集密切相关（$P<0.05$），见图 1B。TCGA 数据分析结果显示：在食管癌组织中 M2 型 TAMs 标记物 MSR1 和 BGN 与 HIF-1α 表达水平均呈正相关关系（$P<0.05$）。见图 1C 和 1D。上述结果提示 ESCC 组织中外泌体可能通过 BGN/HIF-1α 轴诱导 M2 型巨噬细胞极化。

2.2 食管癌中 M2 型 TAMs 的聚集与患者不良的关系

对 TCGA 数据库中食管癌组织免疫细胞富集情况进行分析。与正常食管组织比较，食管癌组织中 M0、M1 和 M2 型 TAMs 浸润水平均明显升高（$P<0.05$），见图 2A。进一步分析不同亚型 TAMs 与食管癌 OS、PFI、PFS、DSS 及 DFI 的关系，xCell 和 Consensus TME 免疫细胞浸润分析结果显示：M2 型 TAMs 高浸润水平与患者更短的 DFI 有关（$P<0.05$），而其他亚型 TAMs 均未见明显生存相关性（$P>0.05$），见图 2B。



A：Venn diagram of genes upregulated in ESCC exosomes and associated with M2 TAMs；B：Relationship between BGN expression and immune cell infiltration in ESCC tissues(n=184)；C，D：Correlations between MSR1，BGN，and HIF-1α in ESCC tissue (n=182). *$P<0.01$，**$P<0.001$.

图 1 ESCC 衍生外泌体中 BGN 与巨噬细胞 M2 极化的关系

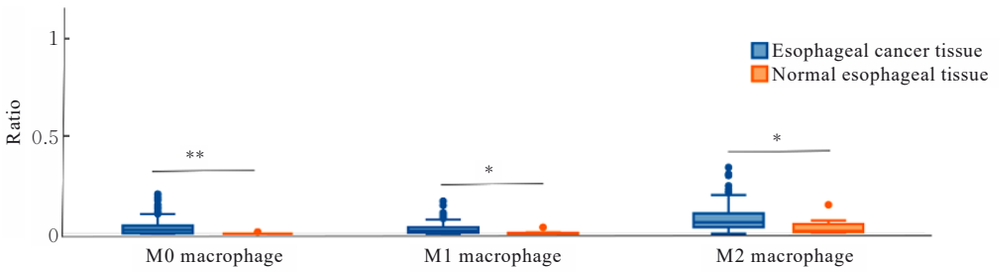
Fig. 1 Relationship between BGN and M2 polarization of macrophages in ESCC-derived exosomes

2.3 ESCC 细胞衍生的外泌体的分离和鉴定

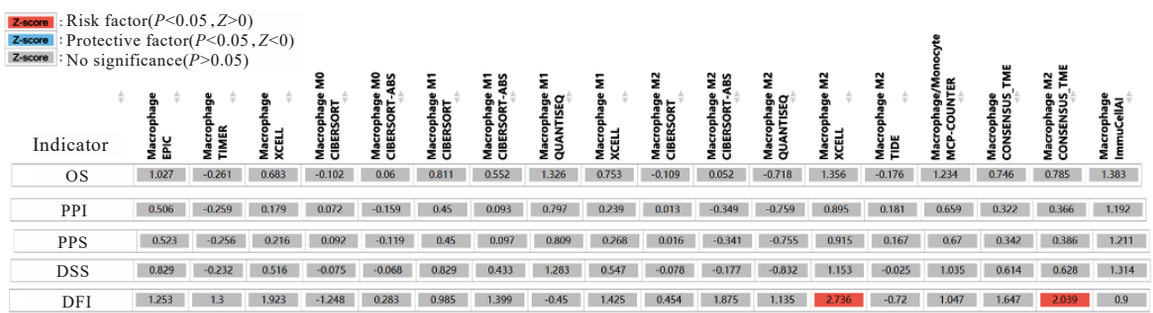
收集 EC109 细胞培养基上清分离外泌体。TEM 观察显示结果：外泌体呈典型茶托状。NTA 分析证实：囊泡大小为（127.17±0.90）nm。Western blotting 法检测结果显示：与提取后的 EC109 细胞上清液比较，提取的外泌体样本中 CD9 和 CD63 蛋白表达水平明显升高（$P<0.05$）。将 PKH26 标记的外泌体与巨噬细胞共孵育，在巨噬细胞胞质中观察到明显红色荧光，表明外泌体被成功内化。见图 3。

2.4 ESCC 细胞衍生的外泌体处理后巨噬细胞极化情况

未处理的 M0 型巨噬细胞呈圆形、椭圆形或煎饼状，细胞刺样突起较少。而外泌体诱导后的巨噬细胞形态伸长，更大更扁平，可见明显细胞刺样突起。流式细胞术检测结果显示：与未处理 M0 巨噬细胞比较，外泌体处理后 $CD80^+CD206^+$ 的 M2 型巨噬细胞百分率明显升高（$P<0.05$）。见图 4。



A



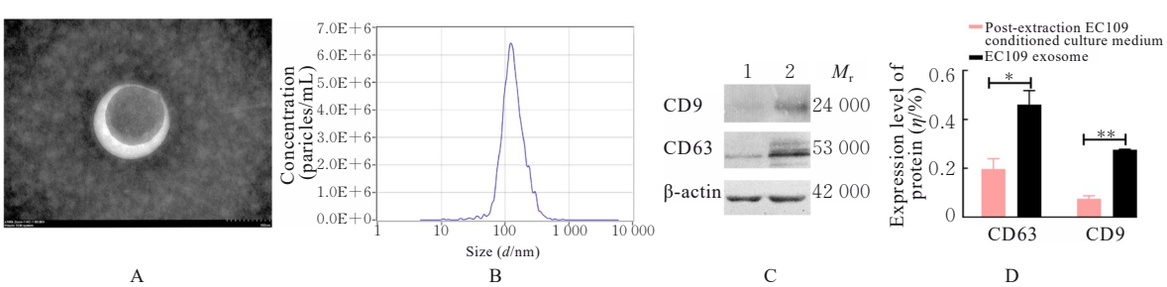
Indicator	Macrophage EPIC	Macrophage TIMER	Macrophage XCELL	Macrophage M0 CIBERSORT	Macrophage M0 CIBERSORT-ABS	Macrophage M1 CIBERSORT	Macrophage M1 CIBERSORT-ABS	Macrophage M1 QUANTISEQ	Macrophage M1 XCELL	Macrophage M2 CIBERSORT	Macrophage M2 CIBERSORT-ABS	Macrophage M2 QUANTISEQ	Macrophage M2 XCELL	Macrophage M2 TIDE	Macrophage/Monocyte MCP-COUNTER	Macrophage CONSENSUS_TME	Macrophage M2 CONSENSUS_TME	Macrophage ImmuCellAI
OS	1.027	-0.261	0.683	-0.102	0.06	0.811	0.552	1.326	0.753	-0.109	0.052	-0.718	1.356	-0.176	1.234	0.746	0.785	1.383
PPI	0.506	-0.259	0.179	0.072	-0.159	0.45	0.093	0.797	0.239	0.013	-0.349	-0.759	0.895	0.181	0.659	0.322	0.366	1.192
PPS	0.523	-0.256	0.216	0.092	-0.119	0.45	0.097	0.809	0.268	0.016	-0.341	-0.755	0.915	0.167	0.67	0.342	0.386	1.211
DSS	0.829	-0.232	0.516	-0.075	-0.068	0.829	0.433	1.283	0.547	-0.078	-0.177	-0.832	1.153	-0.025	1.035	0.614	0.628	1.314
DFI	1.253	1.3	1.923	-1.248	0.283	0.985	1.399	-0.45	1.425	0.454	1.875	1.135	2.736	-0.72	1.047	1.647	2.039	0.9

B

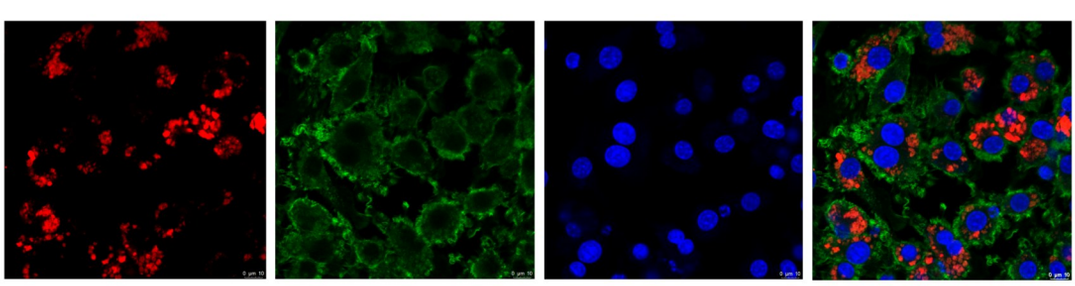
A：Immune enrichment analysis on different subtypes of macrophages in esophageal cancer (n=182) and normal esophageal tissues (n=13)；B：Impact of infiltration quantity of different subtypes of macrophages on survival of esophageal cancer patients (n=184). $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

图2 食管癌中各亚型TAMs的分布差异和预后分析

Fig. 2 Distribution differences and prognostic analysis on various subtypes of TAMs in esophageal cancer



A B C D



E F G H

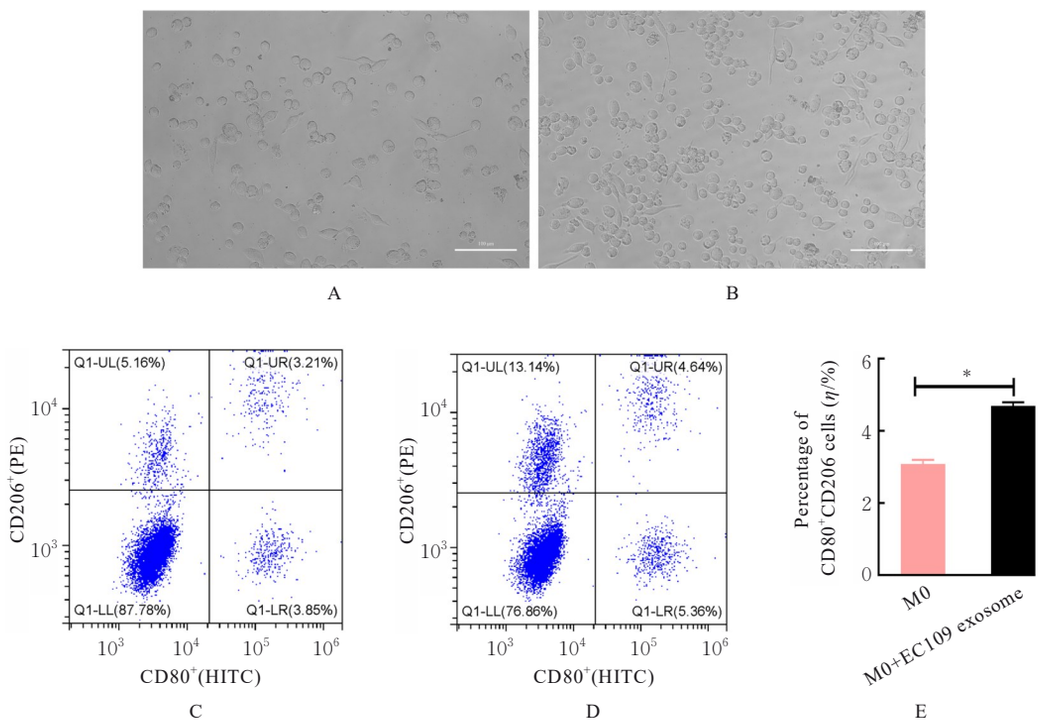
A：TEM image of exosomes showing a teacup-like morphology；B：Identification of exosome particle size by NTA；C，D：Extracted exosomes highly expressed CD9 and CD63 compared with the extracted EC109 cell culture medium；C：Electrophoregram(Lane 1：Post-extraction EC109 conditioned culture medium；Lane 2：EC109 exosome)；D：Histogram ($^{*}P<0.05$)；E－H：Exosomes internalized by macrophages(Immunofluorescence staining，×400)；E：Exosomes；F：488-labeled phalloidin for cytoskeleton；G：Hoechst 33342 for nuclei；H：Merged image.

图3 EC109细胞衍生的外泌体的分离和鉴定

Fig. 3 Isolation and identification of exosomes derived from EC109 cells

2.5　各组巨噬细胞中 *HIF-1α* mRNA 和蛋白表达水平

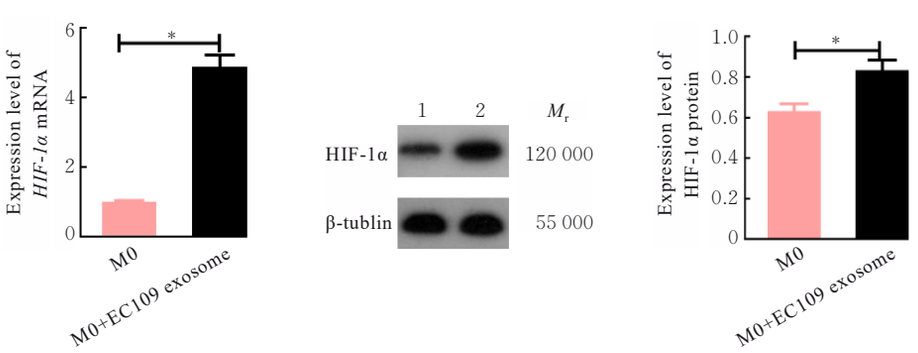
RT-qPCR 法和 Western blotting 法检测结果显示：与未处理的 M0 型巨噬细胞比较，外泌体诱导后巨噬细胞中 *HIF-1α* mRNA 和蛋白表达水平均明显升高（$P<0.05$）。见图 5。



A, B: Morphology of macrophages after treated with exosomes derived from EC109 cells; A, C: Control group; B, D: Experiment group; C, D: Proportion of M2-type macrophages; E: Percentages of $CD80^+CD206^+$ cells ($^*P<0.05$).

图 4　外泌体处理后巨噬细胞极化情况

Fig. 4　Polarization status of macrophages after treated with exosomes



A: Expression of *HIF-1α* mRNA; B, C: Expression of HIF-1α protein; A, C: Histograms ($^*P<0.05$); B: Electrophoregram (Lane 1: M0 macrophage; Lane 2: M0+EC109 exosome).

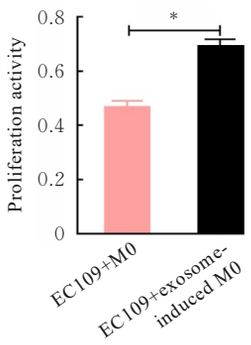
图 5　ESCC 细胞衍生外泌体作用前后巨噬细胞中 *HIF-1α* mRNA 和蛋白表达情况

Fig. 5　Expressions of *HIF-1α* mRNA and protein in macrophages before and after treated with ESCC cell-derived exosomes

2.6　外泌体诱导前后 ESCC 细胞的增殖活性、细胞凋亡率、侵袭细胞数和划痕愈合率

与 M0 型巨噬细胞共培养的 EC109 细胞比较，外泌体诱导后巨噬细胞共培养的 EC109 细胞增殖活性明显升高（$P<0.01$），见图 6；细胞凋亡率明显降低（$P<0.05$），见图 7；侵袭细胞数明显增多，侵袭

细胞率升高（$P<0.05$），见图8；细胞划痕愈合率明显增大（$P<0.05$），见图9。



*$P<0.01$.

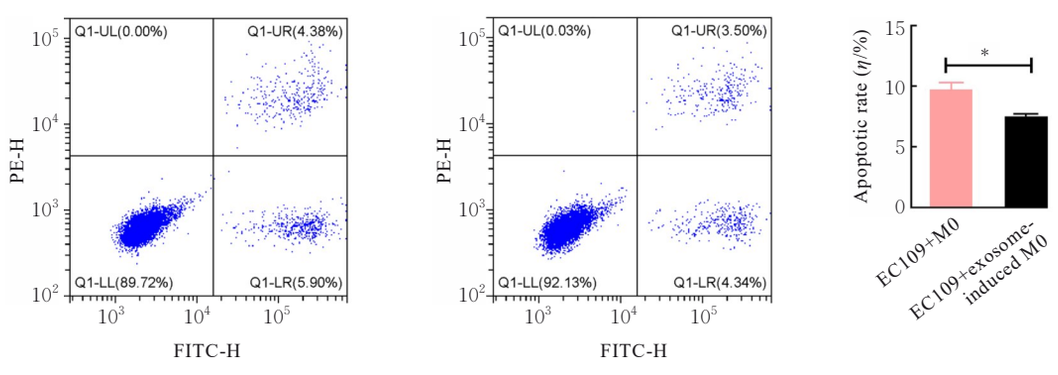
图6 外泌体诱导前后巨噬细胞增殖活性

Fig. 6 Proliferation activities of macrophages before and after exosome induction

3 讨 论

本研究首先应用TCGA食管癌数据进行免疫分析，结果显示：食管癌组织中TAMs聚集，且M2型TAMs与食管癌患者预后不良密切相关。研究[13-15]显示：在卵巢癌、肺癌和乳腺癌肿瘤组织中M2型TAMs浸润数量与患者不良预后关系密切，是导致患者生存率低和肿瘤转移的重要因素。此外，本课题组前期研究[6]也证明：在ESCC组织中TAMs与ESCC患者预后无显著相关性，而M2型TAMs与ESCC患者不良预后密切相关。本文通过生物信息学分析进一步验证了TAMs极化的意义。临床研究[16-17]显示：集落刺激因子1受体（colony-stimulating factor 1 receptor，CSF-1R）抑制剂（如培西达替尼）抑制TAMs向M2型极化具有延长晚期实体瘤患者生存期的潜力。

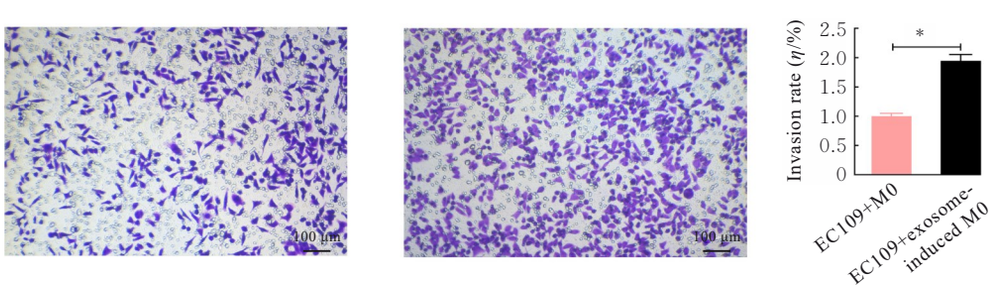
BGN可能是ESCC外泌体中上调HIF-1α诱导巨噬细胞极化，进而促进ESCC血管生成和转移的分子之一。研究[18]显示：胃癌细胞衍生的外泌体中的BGN可传递至巨噬细胞，与不含POU结构域八聚体结合蛋白（non-pou domain-containing octamer-binding protein，NONO）蛋白结合，驱动



A,B: Flow cytometry diagram; A:EC109+M0; B:EC109+exosome-induced M0; C: Histogram of apoptotic rate (*$P<0.05$).

图7 外泌体诱导前后巨噬细胞凋亡情况

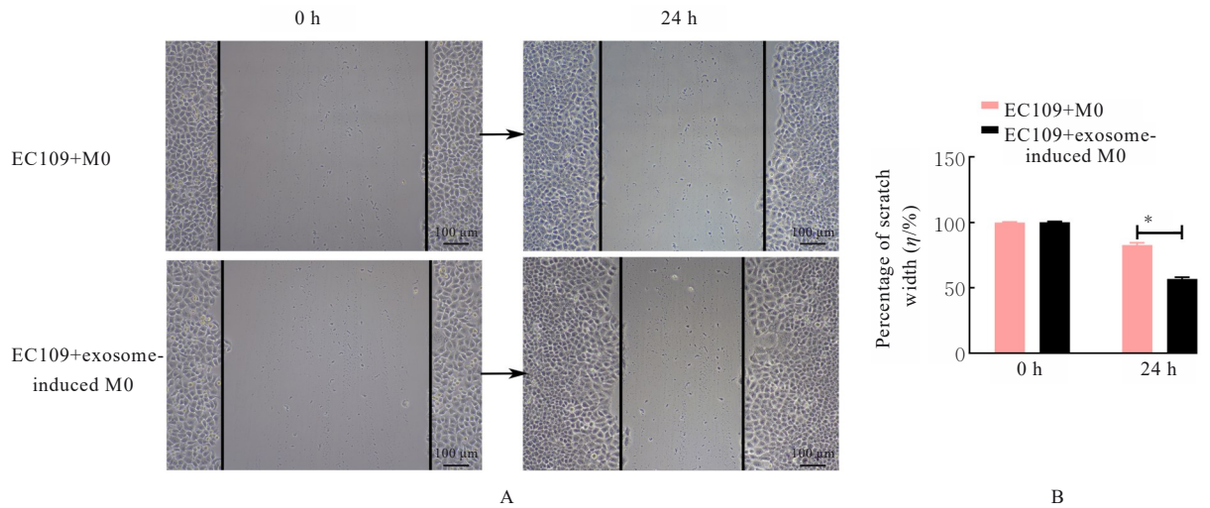
Fig. 7 Apoptosis of macrophages before and after exosome induction



A,B: Morphology; A:EC109+M0; B:EC109+exosome-induced M0; C: Histogram of invasion rate (*$P<0.05$).

图8 外泌体诱导前后巨噬细胞侵袭情况

Fig. 8 Invasion of macrophages before and after exosome induction



A：Morphology；B：Histogram（$^*P<0.05$）.

图 9 外泌体诱导前后巨噬细胞迁移情况

Fig. 9 Migration of macrophages before and after exosome induction

巨噬细胞向M2型极化，并上调趋化因子配体10的表达，最终促进胃癌细胞的增殖、侵袭和转移，该结果与本研究结果一致。研究[19]显示：在弥漫性大B细胞淋巴瘤中，*HIF-1α*与*BGN*基因表达存在相关性。此外，在胃癌中，BGN可通过强化核因子κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）与HIF-1α启动子的结合效率，启动下游级联反应，激活HIF-1α启动子活性，上调其mRNA转录水平，增强HIF-1α蛋白活性，最终促进血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）表达[20]。同时，在糖尿病中BGN亦可上调*HIF-1α* mRNA和蛋白表达，显著增强血管生成[21]。ESCC外泌体中其他分子的作用亦不容忽视，多种分子在TAMs极化中的作用仍需进一步实验研究分析。外泌体在TME中发挥着关键作用。研究[22]显示：肿瘤衍生的外泌体可介导TME内的细胞间信号传递，并调节各种周围“非肿瘤”细胞的生物学特性（如TAMs的驯化效应），进而促进肿瘤的侵袭和转移。外泌体被认为是肿瘤诊断的新兴标志物，以及药物及疫苗研制的重要靶点[23]。本研究证实了外泌体是ESCC驯化TAMs的重要途径之一，靶向抑制外泌体可能是ESCC免疫治疗的潜在靶点。基于外泌体的生物合成递送系统被广泛用于破坏TME并放大抗癌免疫反应[24]。如何更好地应用外泌体的“通讯”作用，同时抑制免疫逃逸效应和脱靶效应，是目前外泌体临床转化的难点。

在多种肿瘤组织中，TAMs和HIF-1α表达均呈正相关关系，共同促进肿瘤的侵袭和进展[25-26]。本研究结果也表明：在食管癌组织中，HIF-1α表达水平与TAMs存在明显正相关关系。上调HIF-1α表达可通过改变细胞代谢方式和调节炎性因子分泌等方式调节巨噬细胞表型[27]。通过靶向巨噬细胞中HIF-1α抑制下游通路，可有效抑制巨噬细胞向M2型极化[28]。ESCC细胞分泌的外泌体能有效促进M2型TAMs中HIF-1α的稳定表达，HIF-1α是正反馈环路中介导这一系列反应的关键分子之一。本研究重点关注ESCC细胞与巨噬细胞的交互作用，分子机制研究仍有待未来深入研究。

ESCC细胞来源外泌体诱导后的巨噬细胞可促进肿瘤细胞增殖和迁移。研究[29]显示：高度转移的结直肠癌细胞释放富含*miR-106a-5p*的外泌体，通过抑制SOCS6和激活Janus激酶2/信号转导与转录激活因子3（Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3，JAK2/STAT3）信号通路，促进TAMs向M2型极化，进而促进结直肠癌的肝转移。研究[30]显示：将肺癌细胞外泌体与M0型巨噬细胞共孵育后，再与肺癌细胞共培养，可诱导M2型巨噬细胞极化，进而促进肿瘤的迁移和侵袭。TAMs能够通过分泌多种细胞因子，直接或间接作用于肿瘤细胞，抑制其凋亡并加速细胞周期进程[31]。外泌体诱导后的巨噬细胞促进ESCC进展的分子机制仍有待进一步研究。

本研究验证了ESCC与TAMs之间的正反馈环路，即ESCC和TAMs通过外泌体作为介质相互作

用，促进ESCC进展。此外，外泌体中BGN可能通过促进HIF-1α稳定表达诱导M2型TAMs极化。破坏TAMs与ESCC的交互作用将是未来肿瘤研究的热点，外泌体和HIF-1α可能是ESCC治疗的潜在免疫靶点。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

李疆芬参与研究设计、实验操作、数据分析和论文撰写，房新志参与数据验证和论文审阅。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] JIANG W, ZHANG B, XU J Q, et al. Current status and perspectives of esophageal cancer: a comprehensive review[J]. Cancer Commun (Lond), 2025, 45(3): 281-331.

[3] ZHENG Y X, CHEN Z Y, HAN Y C, et al. Immune suppressive landscape in the human esophageal squamous cell carcinoma microenvironment [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6268.

[4] LI Q, XU J W, HUA R J, et al. Nano-strategies for targeting tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy[J]. J Cancer, 2025, 16(7): 2261-2274.

[5] HU J M, LIU K, LIU J H, et al. CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predicte aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 21526-21538.

[6] LI J F, XIE Y F, WANG X L, et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in esophageal cancer: a meta-analysis[J]. Future Oncol, 2019, 15(19): 2303-2317.

[7] DEB A, GUPTA S, MAZUMDER P B. Exosomes: a new horizon in modern medicine [J]. Life Sci, 2021, 264: 118623.

[8] SONWANE S, TELRANDHE U, CHAMBHARE N, et al. Unraveling exosome-mediated cancer therapy resistance: pathways and therapeutic challenges[J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2025, 37(1): 30.

[9] TIAN L, YANG L, ZHENG W J, et al. RNA sequencing of exosomes revealed differentially expressed long noncoding RNAs in early-stage esophageal squamous cell carcinoma and benign esophagitis [J]. Epigenomics, 2020, 12(6): 525-541.

[10] LI C W, TANG Z F, ZHANG W J, et al. GEPIA2021: integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(W1): W242-W246.

[11] LI T W, FAN J Y, WANG B B, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. Cancer Res, 2017, 77(21): e108-e110.

[12] MURRAY P J, ALLEN J E, BISWAS S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines[J]. Immunity, 2014, 41(1): 14-20.

[13] XU C C, CHEN J Y, TAN M, et al. The role of macrophage polarization in ovarian cancer: from molecular mechanism to therapeutic potentials [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1543096.

[14] LIAO L, WANG Y X, FAN S S, et al. The role and clinical significance of tumor-associated macrophages in the epithelial-mesenchymal transition of lung cancer[J]. Front Oncol, 2025, 15: 1571583.

[15] CHEN Z P, ZHAO B Z. The role of tumor-associated macrophages in HPV induced cervical cancer[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1586806.

[16] REN B X, LIANG J N, LIU Y H, et al. Proguanil inhibits proliferation and migration in glioblastoma development through targeting CSF1R receptor [J]. Cell Signal, 2025, 127: 111550.

[17] YU M J, WU Y M, LI Q F, et al. Colony-stimulating factor-1 receptor inhibition combined with paclitaxel exerts effective antitumor effects in the treatment of ovarian cancer[J]. Genes Dis, 2024, 11(3): 100989.

[18] LI W C, WEI H F, LIU J J, et al. Exosomal Biglycan promotes gastric cancer progression *via* M2 polarization and CXCL10-mediated JAK/STAT1 activation [J]. Cancer Lett, 2025, 626: 217758.

[19] EVENS A M, SEHN L H, FARINHA P, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(6): 1017-1024.

[20] HU L, ZANG M D, WANG H X, et al. Biglycan stimulates VEGF expression in endothelial cells by activating the TLR signaling pathway [J]. Mol Oncol, 2016, 10(9): 1473-1484.

[21] GAO W D, JIN W W, LI Y N, et al. A highly bioactive bone extracellular matrix-biomimetic

nanofibrous system with rapid angiogenesis promotes diabetic wound healing[J]. J Mater Chem B, 2017, 5(35): 7285-7296.

[22] HUANG Y J, KANADA M, YE J X, et al. Exosome-mediated remodeling of the tumor microenvironment: From local to distant intercellular communication [J]. Cancer Lett, 2022, 543: 215796.

[23] JAHAN S, MUKHERJEE S, ALI S, et al. Pioneer role of extracellular vesicles as modulators of cancer initiation in progression, drug therapy, and vaccine prospects[J]. Cells, 2022, 11(3): 490.

[24] YONG T Y, WEI Z H, GAN L, et al. Extracellular-vesicle-based drug delivery systems for enhanced antitumor therapies through modulating the cancer-immunity cycle[J]. Adv Mater, 2022, 34(52): e2201054.

[25] 赵 乐. HIF-1表达及CD206功能状态的相关性及其对肝移植术后肿瘤复发的影响[D]. 青岛：青岛大学，2019.

[26] 刘苗苗，邱 刚，房保栓，等. 肿瘤相关巨噬细胞和缺氧诱导因子-1α在宫颈鳞癌中表达及其临床意义[J]. 现代中西医结合杂志，2018，27(3)：264-266.

[27] COLEGIO O R, CHU N Q, SZABO A L, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid [J]. Nature, 2014, 513(7519): 559-563.

[28] LIANG J J, RAN Y Y, HU C B, et al. Inhibition of HIF-1α ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing M2 macrophage polarization through PRMT1/STAT6 signals[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 146: 113931.

[29] LIANG Y H, LI J Y, YUAN Y L, et al. Exosomal miR-106a-5p from highly metastatic colorectal cancer cells drives liver metastasis by inducing macrophage M2 polarization in the tumor microenvironment [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 281.

[30] 王子奇，张晓菊. 早期肺癌新型分子诊断的意义及评价[J]. 中国实用内科杂志，2025，45(6)：449-453.

[31] JIAOJIAO X, ZHE L, QINLI T, et al. $CD133^{+}PD\text{-}L1^{+}$ cancer cells confer resistance to adoptively transferred engineered macrophage-based therapy in melanoma [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 895.