

肺癌 A549 细胞源性外泌体中 lncRNA DUXAP8 对肺癌细胞生长和肿瘤免疫逃逸的作用及其机制

何小双¹, 徐丽娜¹, 崔 梅², 赵 宇³, 王 蓓¹, 黄 征¹, 王玉超¹, 辛雯艳¹, 鄢 超¹

(1. 石河子大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 新疆 石河子 832099; 2. 新疆维吾尔自治区人民医院病理科, 新疆 石河子 830001; 3. 石河子大学第一附属医院胃肠外科, 新疆 石河子 832099)

[摘 要] **目的:** 探讨肺癌 A549 细胞源性外泌体 (Exo) 中长链非编码 RNA (lncRNA) DUXAP8 对肺癌细胞生长和免疫逃逸的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 培养人肺癌细胞系 A549 细胞, 提取其 Exo 并鉴定。采用 PKH67 标记的 Exo 处理 A549 细胞, 观察 A549 细胞摄取 Exo 情况。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 Exo 处理前后 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平。将 A549 细胞分为对照组 (不处理)、Exo 组 (Exo 处理 A549 细胞)、Exo+sh-NC 组 (Exo 处理 A549 细胞后, 转染 sh-NC 至 A549 细胞) 和 Exo+sh-DUXAP8 组 (Exo 处理 A549 细胞后, 转染 sh-DUXAP8 至 A549 细胞)。RT-qPCR 法检测各组 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平, 平板集落形成实验检测各组 A549 细胞克隆形成能力, 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 法检测各组 A549 细胞增殖能力。各组 A549 细胞与人外周血淋巴细胞共培养后, 流式细胞术检测各组人外周血淋巴细胞中活化的 CD8+T 淋巴细胞百分率, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 法检测各组人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率。**结果:** Exo 囊泡直径为 50~150 nm, 且分化簇 63 (CD63)、分化簇 9 (CD9)、肿瘤易感基因 101 (TSG101) 和热休克蛋白 70 (HSP70) 外泌体特异性标志物蛋白表达阳性, 说明 Exo 提取成功。A549 细胞能够很好地摄取 PKH67 标记的 Exo。RT-qPCR 法, 与单独培养的 A549 细胞比较, Exo 处理后, A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平升高 ($P<0.05$)。与对照组比较, Exo 组 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平升高 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo+sh-DUXAP8 组 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平降低 ($P<0.05$), Exo+sh-NC 组 lncRNA DUXAP8 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。平板集落形成实验, 与对照组比较, Exo 组 A549 细胞中集落形成数增加 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo+sh-DUXAP8 组 A549 细胞中集落形成数减少 ($P<0.05$), Exo+sh-NC 组 A549 细胞中集落形成数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。EdU 染色, 与对照组比较, Exo 组 A549 细胞中 EdU 阳性细胞率升高 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo+sh-DUXAP8 组 A549 细胞中 EdU 阳性细胞率降低 ($P<0.05$), Exo+sh-NC 组 A549 细胞中 EdU 阳性细胞率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。流式细胞术, 与对照组比较, Exo 组人外周血淋巴细胞中活化 CD8+T 淋巴细胞百分率降低 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo+sh-DUXAP8 组人外周血淋巴细胞中活化 CD8+T 淋巴细胞百分率升高 ($P<0.05$), Exo+sh-NC 组人外周血淋巴细胞中活化的 CD8+T 淋巴细胞百分率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。MTT 法, 与对照组比较, Exo 组人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率降低 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo+sh-DUXAP8 组人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率升高 ($P<0.05$), Exo+sh-NC 组人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论:** 肺癌 A549 细胞源性 Exo lncRNA DUXAP8 促进肺癌细胞增殖和肿瘤免疫逃逸。

[收稿日期] 2024-12-24 [录用日期] 2025-02-17

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅“天山英才”培养计划项目 (2022TSYCCX0036)

[作者简介] 何小双 (1988—), 女, 四川省南充市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事呼吸系统疾病诊治方面的研究。

[通信作者] 鄢 超, 主任医师 (E-mail: mail@healthy.vip)

©《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.

[关键词] 肺肿瘤; 外泌体; 长链非编码 RNA; DUXAP8; 细胞增殖; 免疫逃逸

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A

Effects of lncRNA DUXAP8 in lung cancer A549 cells-derived exosomes on lung cancer cell growth and its mechanism

HE Xiaoshuang¹, XU Lina¹, CUI Mei², ZHAO Yu³, WANG Bei¹, HUANG Zheng¹, WANG Yuchao¹,
XIN Wenyan¹, WU Chao¹

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832099, China; 2. Department of Pathology, People's Hospital, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Shihezi 830001, China; 3. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832099, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of long non-coding RNA (lncRNA) DUXAP8 in exosomes (Exo) derived from the lung cancer A549 cells on the growth and immune escape of the lung cancer cells, and to clarify the mechanism. **Methods:** The human lung cancer cell line A549 was cultured, and its exosomes were extracted and identified. The A549 cells were treated with PKH67-labeled Exo to observe the uptake of Exo by A549 cells. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression level of lncRNA DUXAP8 in A549 cells before and after Exo treatment. The A549 cells were divided into control group (no treatment), Exo group (A549 cells treated with Exo), Exo+sh-NC group (A549 cells treated with Exo and then transfected with sh-NC), and Exo+sh-DUXAP8 group (A549 cells treated with Exo and then transfected with sh-DUXAP8). RT-qPCR method was used to detect the expression level of lncRNA DUXAP8 in A549 cells in various groups; colony formation assay was used to detect the colony formation abilities of the A549 cells in various groups; 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining method was used to detect the proliferation abilities of the A549 cells in various groups. After co-culturing A549 cells in various groups with human peripheral blood lymphocytes, flow cytometry was used to detect the percentages of activated CD8⁺ T lymphocytes in the human peripheral blood lymphocytes in various groups; 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method was used to detect the killing rates of human peripheral blood lymphocytes on the A549 cells in various groups. **Results:** The diameter of Exo vesicles was 50—150 nm, and the exosome-specific marker proteins cluster of differentiation 63 (CD63), cluster of differentiation 9 (CD9), tumor susceptibility gene 101 (TSG101), and heat shock protein 70 (HSP70) were positively expressed, indicating successful exosome extraction. A549 cells efficiently took up PKH67-labeled Exo. The RT-PCR results showed that compared with A549 cells cultured alone, the expression level of lncRNA DUXAP8 in the A549 cells was increased after treatment with Exo derived from A549 cells ($P < 0.05$). compared with control group, the expression level of lncRNA DUXAP8 in the A549 cells in Exo group was increased ($P < 0.05$); compared with Exo group, the expression level of lncRNA DUXAP8 in the A549 cells in Exo+sh-DUXAP8 group was decreased ($P < 0.05$), while there were no significant difference in the expression level of lncRNA DUXAP8 in the cells in Exo+sh-NC group ($P > 0.05$). The colony formation assay results showed that compared with control group, the number of colony formation of the A549 cells in Exo group was increased ($P < 0.05$); compared with Exo group, the number of colony formation of the A549 cells in Exo+sh-DUXAP8 group was decreased ($P < 0.05$), while there was no significant difference in the number of colony formation of the A549 cells in Exo+sh-NC group ($P > 0.05$). The EdU staining results showed that compared with control group, the EdU-positive rate of the

A549 cells in Exo group was increased ($P<0.05$); compared with Exo group, the EdU-positive rate in A549 cells in Exo+sh-DUXAP8 group was decreased ($P<0.05$), while there was no significant difference in the EdU-positive rate in the cells in Exo+sh-NC group ($P>0.05$). The flow cytometry results showed that compared with control group, the percentage of activated CD8+T lymphocytes in the human peripheral blood lymphocytes in Exo group was decreased ($P<0.05$); compared with Exo group, the percentage of activated CD8+T lymphocytes in the human peripheral blood lymphocytes in Exo+sh-DUXAP8 group was increased ($P<0.05$), while there was no significant difference in the percentage of activated CD8+T lymphocytes in Exo+sh-NC group ($P>0.05$). The MTT assay results showed that compared with control group, the killing rate of human peripheral blood lymphocytes on the A549 cells in Exo group was decreased ($P<0.05$); compared with Exo group, the killing rate of human peripheral blood lymphocytes on A549 cells in Exo+sh-DUXAP8 group was increased ($P<0.05$), while no significant difference was observed in Exo+sh-NC group ($P>0.05$). **Conclusion:** The lncRNA DUXAP8 in exosomes derived from the lung cancer A549 cells promotes the proliferation of lung cancer cells and tumor immune escape.

KEYWORDS Lung neoplasms; Exosomes; Long non-coding RNA; DUXAP8; Cell proliferation; Immune escape

肺癌是全球癌症相关疾病发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,每年可导致数百万人死亡^[1]。非小细胞肺癌是肺癌中最常见的组织类型,占所有肺癌患者的80%~85%^[2]。在肺癌早期阶段,手术切除有助于患者获得良好的治疗效果,但由于早期癌症的症状难以识别,多数患者在诊断时已处于晚期或已发生转移,并且很难从全身化疗中获益。近年来,免疫治疗已成为肿瘤治疗的新型疗法,在肺癌患者的临床治疗中取得了良好效果^[3]。然而,肿瘤细胞可通过改变其周围微环境、抑制免疫细胞功能和改变细胞表面分子结构等途径来逃避免疫系统的识别及攻击,从而继续分裂生长,称为免疫逃逸^[4]。免疫逃逸是治疗后肿瘤细胞存活的关键,因此,阐明参与免疫逃逸的分子机制有助于开发新的免疫治疗策略。肿瘤细胞与肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中各种细胞之间的信息传递在肿瘤生长和免疫逃逸中发挥重要作用,外泌体(exosome, Exo)是细胞间通讯的重要媒介之一。Exo是由不同类型的细胞分泌的直径为30~120 nm的囊泡,其携带多种物质,如脂质、蛋白质和非编码RNA,广泛分布于体液中,在多种生理和病理过程中发挥重要作用^[5-6]。长链非编码RNA(long non coding RNA, lncRNA)是一组异质的非蛋白质编码转录本,长度大于200个核苷酸。lncRNA是参与基因表达、生理和病理过程的调节因子。研究^[7-8]显示:lncRNA通常在TME中表现为表达水平改变,并具有促肿瘤或抗肿瘤特性。lncRNA

DUXAP8是一种在不同类型肿瘤中过表达的致癌lncRNA。已有研究^[9]证实:lncRNA DUXAP8高表达与非小细胞肺癌患者的不良预后有关,能够促进肺癌细胞的增殖、上皮-间质转化和有氧糖酵解,在肺癌的诊断和治疗中显示出应用潜力。但其是否影响肺癌细胞的免疫逃逸目前尚不明确。本研究探讨肿瘤细胞源性Exo中lncRNA DUXAP8对肺癌细胞生长和免疫逃逸的影响,并阐明其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人肺癌细胞系A549细胞购自中国科学院上海细胞资源中心。高糖/低糖Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基购自美国Corning公司,特级胎牛血清、青霉素、链霉素及Exo PKH67标记试剂盒购自美国Sigma公司,ExoQuick-TC细胞上清Exo提取试剂盒购自日本SBI公司,蛋白裂解液购自上海贝博生物科技有限公司,增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL) Prime发光液购自北京中源合聚生物科技有限公司,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染料与结晶紫染料购自北京康瑞纳生物科技有限公司,总RNA提取试剂盒、PrimeScript RT试剂盒和SYBR Green定量试剂盒购自日本TaKaRa公司,5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)法细胞增殖成像分析试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司,人外周血淋巴细胞分离液和3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,

5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 细胞毒性检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,分化簇 63 (cluster of differentiation 63, CD63)、分化簇 9 (cluster of differentiation 9, CD9)、肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101)、热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 和分化簇 8 (cluster of differentiation 8, CD8) 抗体及辣根过氧化物酶偶联的 IgG 抗体均购自英国 Abcam 公司。靶向干扰 lncRNA DUXAP8 表达的 sh-DUXAP8 载体及其阴性对照 sh-NC 载体由广州锐博生物科技有限公司设计构建。Nikon 倒置光学显微镜和荧光共聚焦显微镜购自日本 Nikon 公司, Thermo Scientific 酶标仪、透射电子显微镜和 Invitrogen 流式细胞仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 A549 细胞来源 Exo 的提取和检测 将 A549 细胞复苏后,使用 DMEM 培养基(10% 特级胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和 100 μg·L⁻¹链霉素双抗)培养,培养条件为 37℃、5%CO₂,并进行常规传代。取对数生长期的 A549 细胞,收集细胞上清液,3 000 g 离心 15 min,去除细胞碎片。在上清中加入 ExoQuick 试剂,混匀后 4℃静置过夜。次日,1 500 g 离心 30 min,吸除上清、留沉淀。1 500 g 再次离心 5 min,吸除残留上清,加入磷酸盐缓冲液(phosphated buffer saline, PBS)重悬 Exo 沉淀, -20℃保存。将分离的 Exo 置于透射电子显微镜平台进行形态观察,并采用米粒子跟踪分析技术检测其粒径分布。

1.3 Western blotting 法检测 Exo 标志物蛋白表达水平 在 Exo 中加入蛋白裂解缓冲液,冰上静置 30 min,12 000 g 离心 15 min。收集含有蛋白质的上清液,金属浴 100℃加热 10 min,通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳分离,转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上,在室温下浸入 5% 脱脂牛奶封闭后,将膜与稀释的一抗 CD63、CD9、TSG101 和 HSP70 抗体共置于 4℃下孵育过夜。次日,含吐温-20 的 Tris 缓冲盐溶液(tris-buffered saline with tween-20, TBST)溶液洗膜,采用辣根过氧化物酶偶联的二抗在室温下再与膜孵育 1 h。ECL 化学发光底物显影,通过凝胶成

像系统采集膜上的蛋白质条带图,观察 Exo 标志物蛋白表达情况。

1.4 PKH67 荧光染料示踪法检测 A549 细胞摄取 Exo 的情况 在分离的 Exo 中加入 100 μL PKH67 染色工作液,颠倒混匀,4℃孵育 30 min, PBS 缓冲液洗涤并重悬 Exo。将 A549 细胞按每孔 1×10⁵ 个添加至 6 孔细胞培养板中,加入 PKH67 标记的 Exo 处理细胞,对照组加入等体积 PBS 缓冲液处理细胞。24 h 后,采用 DAPI 染细胞核,通过 Nikon 荧光共聚焦显微镜观察并拍摄 A549 细胞摄取 Exo 情况。

1.5 细胞转染和分组 将 A549 细胞分为 4 组:①对照组,细胞常规培养;②Exo 组,在细胞培养液中添加 10 mg·L⁻¹ A549 细胞来源的 Exo 处理细胞 24 h;③Exo+sh-NC 组,在细胞培养液中添加 10 mg·L⁻¹ A549 细胞来源的 Exo 处理细胞 24 h 后,将 sh-NC 转染至细胞;④Exo+sh-DUXAP8 组,在细胞培养液中添加 10 mg·L⁻¹ A549 细胞来源的 Exo 处理细胞 24 h 后,将 sh-DUXAP8 转染至细胞。细胞转染步骤:将 A549 细胞以每孔 5×10³ 个的密度接种至 96 孔细胞培养板中,过夜培养后,采用 Lipofectamine 3000 试剂进行转染,6 h 后更换为新鲜完全培养基,48 h 后进行后续实验。

1.6 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平 收集各组 A549 细胞,采用总 RNA 提取试剂盒抽提细胞总 RNA,采用 PrimeScript RT 试剂盒将其逆转录为 cDNA。以 GAPDH 作为内参。lncRNA DUXAP8,上游引物 5'-ACCAGCCTCACTAGCACTCT-3',下游引物 5'-GGCTTAGCTTGCACTTTTGGA-3'; GAPDH,上游引物 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游引物 5'-GGCTGTTGTGTCATACTTCTCATGG-3'。采用 SYBR Green 法进行 RT-qPCR 扩增反应,检测 lncRNA DUXAP8 表达水平。反应参数:95℃热启动 10 min;95℃变性 20 s,60℃退火/延伸 30 s,共进行 35 个循环,实验重复 6 次。采用 2^{-ΔΔCt} 法检测各细胞样本中 lncRNA DUXAP8 表达水平。

1.7 平板克隆形成实验检测各组 A549 细胞增殖能力 常规消化各组 A549 细胞,制成单细胞悬液。按照每皿含 100 个细胞的密度分别接种至无菌培养皿中,轻轻晃动使细胞均匀分散。置于 37℃、

5%CO₂条件中培养3周,期间适时更换培养液。当培养皿中生成肉眼可见集落时,终止培养。PBS缓冲液浸洗,固定,采用0.1%结晶紫染液染色10 min,流水冲洗干净。在Nikon倒置光学显微镜下观察并拍摄各组细胞集落形成图片,随机选择6个视野计数细胞集落数,结果取平均值。

1.8 EdU 法检测各组 A549 细胞 EdU 阳性细胞率 以 EdU 阳性细胞率代表细胞增殖能力。将各组 A549 细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种至 24 孔细胞培养板中,在 37℃、5%CO₂ 条件中过夜培养。每孔加入 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EdU 染色工作液,孵育 2 h,再采用 DAPI 染核,通过 Nikon 荧光共聚焦显微镜观察并拍摄各组细胞 EdU 阳性标记情况,随机选择 6 个视野,计数总细胞数和 EdU 标记的阳性细胞数,计算 EdU 阳性细胞率。EdU 阳性细胞率=EdU 标记的阳性细胞数目/总细胞数 $\times 100\%$,结果取平均值。

1.9 流式细胞术检测各组人外周血淋巴细胞中活化 CD8+T 淋巴细胞百分率 本研究申报石河子大学第一附属医院伦理委员会审核通过(伦理审批号:2023-131-04),采集健康志愿者外周血,采用人外周血淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,加入 DMEM 培养液重悬并测定其密度。参考文献 [10] 方法,将淋巴细胞与各组 A549 细胞分别按照 1:1 的比例共培养 24 h。收集各组培养基中悬浮生长的淋巴细胞, $1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,加入 PBS 缓冲液清洗并重悬细胞,取 100 μL 悬液移入流式管,再加入 10 μL FITC 标记的抗 CD8 抗体,室温避光孵育 20 min,清洗细胞后再次以 PBS 缓冲液重悬,流式细胞术检测各组淋巴细胞中活化的 CD8+T 淋

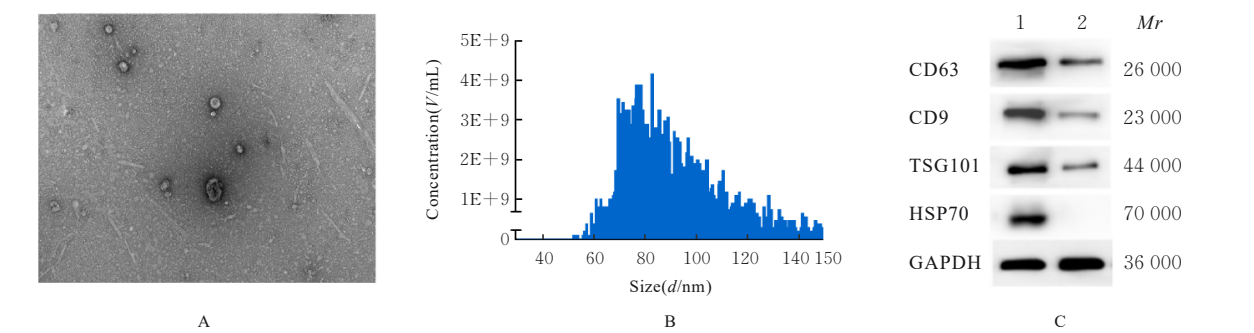
巴细胞百分率。

1.10 MTT 法检测各组人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率 将淋巴细胞与各组 A549 细胞共同接种至 96 孔细胞培养板中,按照“1.9”中的方法建立共培养体系,以单独培养的 A549 细胞作为空白对照组。培养 24 h 后,弃去悬浮生长的淋巴细胞,保留贴壁生长的 A549 细胞,在 A549 细胞中加入 DMEM 培养液,并加入 MTT 工作液,孵育 2 h 后,按照试剂盒说明书,应用酶标仪在 490 nm 处检测各组 A549 细胞吸光度(A)值,计算人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率。细胞杀伤率=(1-实验组 A 值/空白对照组 A 值) $\times 100\%$ 。实验重复 6 次。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析,GraphPad Prism 8.30 软件绘图。各组细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平、各组 A549 细胞克隆形成数和 EdU 阳性细胞率、各组人外周血淋巴细胞中活化 CD8+T 淋巴细胞百分率及各组人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率均呈正态分布,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,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Exo 的鉴定结果 从 A549 细胞中分离的颗粒物通过透射电镜下观察其形态,可见磷脂双分子层包裹的小囊泡,直径为 50~150 nm,见图 1A 和图 1B。CD63、CD9、TSG101 和 HSP70 等 Exo 特异性标志物蛋白均呈阳性表达,见图 1C。表明已成功从 A549 细胞培养物上清液中获得 Exo。



A: Morphology of Exo under transmission electron microscope ($\times 10\text{ }000$); B: Exo particle size; C: Expression of Exo marker protein(Lane 1: A549 Exo;Lane 2: A549 cells).

图1 Exo 的鉴定
Fig. 1 Identification of Exo

2.2 A549 细胞摄取 Exo 情况和细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平 采用 PKH67 标记的 Exo 与

A549 细胞共培养后, 在荧光显微镜下观察到 A549 细胞的细胞质中摄取了大量的 Exo。见图 2。

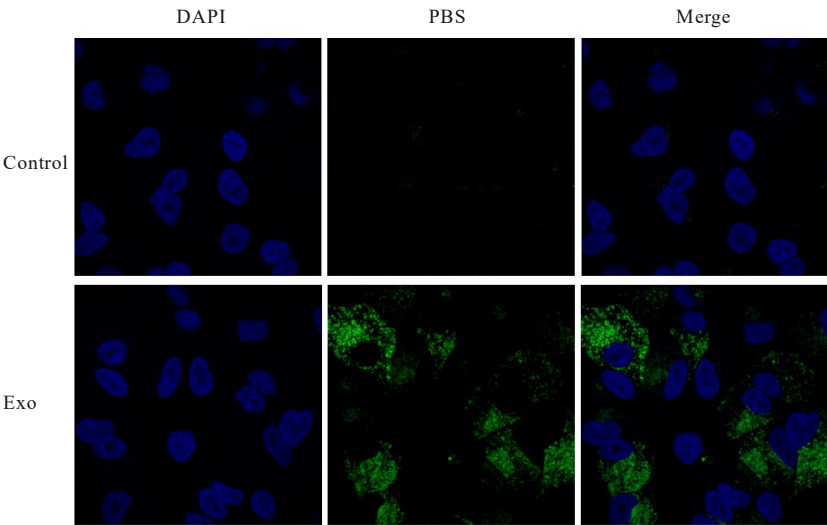


图2 荧光共聚焦显微镜观察 Exo 摄取情况(PKH67 荧光染料示踪法, ×100)
Fig. 2 Exo uptaken observed by confocal fluorescent microscope (PKH67 fluorescence dye tracer, ×100)

与单独培养的 A549 细胞比较, 使用 A549 细胞来源的 Exo 处理 A549 细胞后, 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平升高 ($P<0.05$)。见表 1。

表1 Exo 处理前后 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平
Tab. 1 Expression level of lncRNA DUXAP8 in A549 cells before and after treated with Exo ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Expression level of lncRNA DUXAP8
A549	1.00 ± 0.14
Exo + A549	3.12 ± 0.26
<i>t</i>	17.59
<i>P</i>	<0.001

* $P<0.01$ compared with A549 cells.

2.3 各组 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平

与对照组比较, Exo 组和 Exo + sh-NC 组 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平升高 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo + sh-DUXAP8 组 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平降低 ($P<0.05$), Exo + sh-NC 组 lncRNA DUXAP8 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.4 各组 A549 细胞中集落形成数和 EdU 阳性细胞率 与对照组比较, Exo 组 A549 细胞中集落形成数增加 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo + sh-DUXAP8 组 A549 细胞中集落形成数减少 ($P<0.05$), Exo + sh-NC 组 A549 细胞中集落形成数差

表2 各组 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平
Tab. 2 Expression levels of lncRNA DUXAP8 in A549 cells in various groups ($n=6, \bar{x} \pm s$)

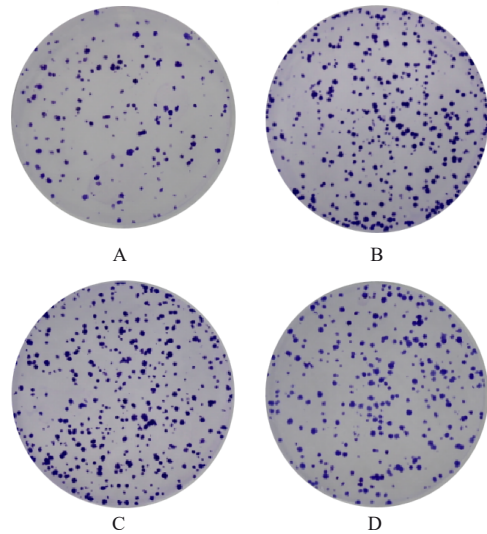
Group	Expression level of lncRNA DUXAP8
Control	1.00 ± 0.13
Exo	$3.37 \pm 0.26^*$
Exo + sh-NC	$3.42 \pm 0.21^*$
Exo + sh-DUXAP8	$1.17 \pm 0.11^\Delta$
<i>F</i>	304.30
<i>P</i>	<0.001

* $P<0.05$ compared with control group; $^\Delta P<0.05$ compared with Exo group.

异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 3 和 4。

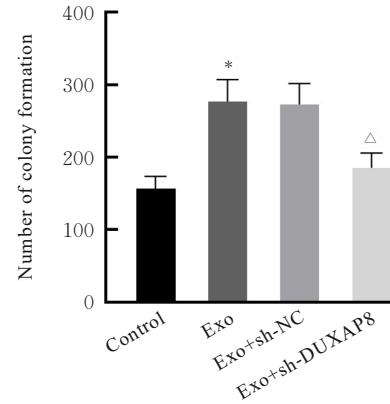
与对照组比较, Exo 组 A549 细胞中 EdU 阳性细胞率升高 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo + sh-DUXAP8 组 A549 细胞中 EdU 阳性细胞率降低 ($P<0.05$), Exo + sh-NC 组 A549 细胞中 EdU 阳性细胞率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 5 和 6。

2.5 各组人外周血淋巴细胞中活化 CD8 + T 淋巴细胞百分率 与对照组比较, Exo 组人外周血淋巴细胞中活化 CD8 + T 淋巴细胞百分率降低 ($P<0.05$); 与 Exo 组比较, Exo + sh-DUXAP8 组人外周血淋巴细胞中活化 CD8 + T 淋巴细胞百分率升高 ($P<0.05$), Exo + sh-NC 组人外周血淋巴细胞中活化的



A: Control group; B: Exo group; C: Exo+sh-NC group; D: Exo+sh-DUXAP8 group.

图3 各组A549细胞中集落形成情况(结晶紫)
Fig. 3 Colony formation in A549 cells in various groups (Crystal violet)



* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with Exo group.

图4 各组A549细胞中集落形成数
Fig. 4 Numbers of colony formation in A549 cells in various groups

CD8+T淋巴细胞百分率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图7和8。

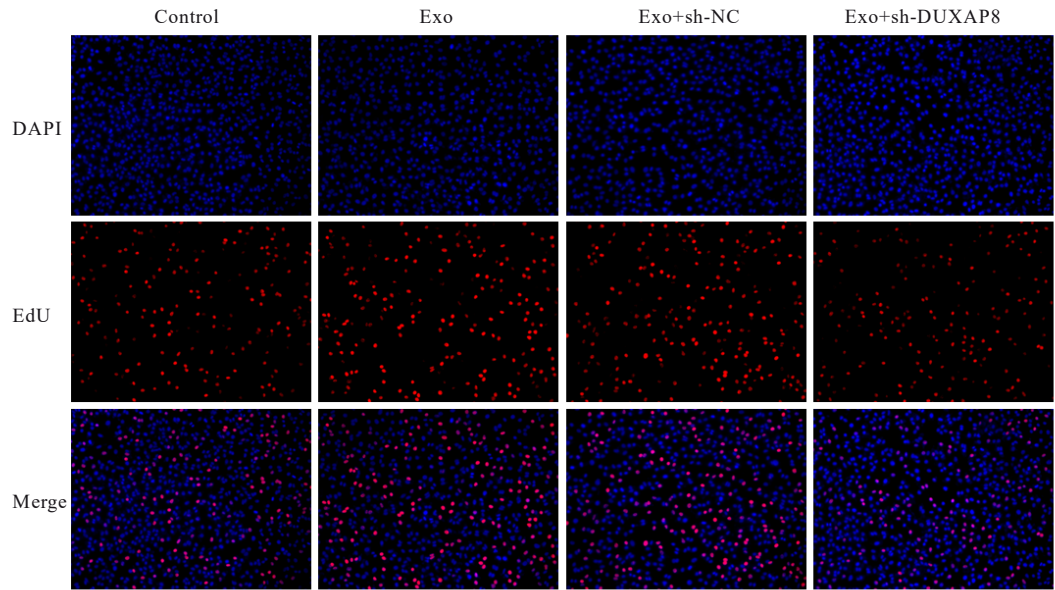
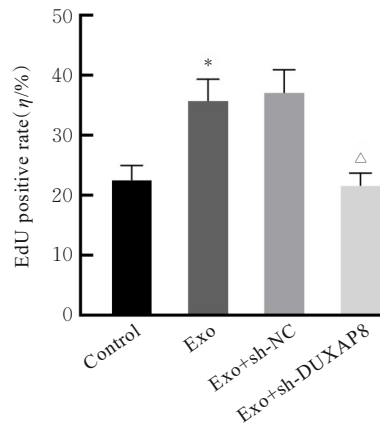


图5 各组A549细胞增殖情况(EdU染色法,×100)
Fig. 5 Proliferation of A549 cells in various groups (EdU staining method, ×100)

2.6 各组人外周血淋巴细胞对A549细胞的杀伤率 与对照组比较,Exo组人外周血淋巴细胞对A549细胞的杀伤率降低 ($P<0.05$);与Exo组比较,Exo+sh-DUXAP8组人外周血淋巴细胞对A549细胞的杀伤率升高 ($P<0.05$),Exo+sh-NC组人外周血淋巴细胞对A549细胞的杀伤率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表3。

3 讨论 肿瘤细胞与TME中各种细胞之间的信息传递在肿瘤转移和免疫逃逸过程中起重要作用,Exo是细胞间信息传递的重要媒介之一^[11]。肿瘤细胞Exo携带多种物质,包括脂质、核酸和蛋白质,在肿瘤环境中,可以促进癌变、增殖、迁移、侵袭、免疫抑制、血管生成和TME重塑^[12]。lncRNAs作为基



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with Exo group.

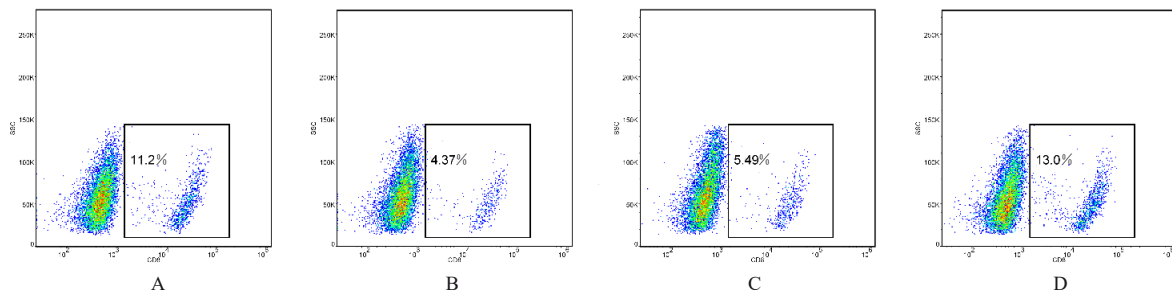
图6 各组 A549 细胞 EdU 阳性细胞率

Fig. 6 EdU positive rates of A549 cells in various groups

因表达的重要调控因子, 与多种肿瘤细胞行为有关, 如细胞增殖、凋亡和分化。lncRNA DUXAP8 与多种肿瘤细胞恶性行为和化疗耐药相关, 如 lncRNA DUXAP8 在肝癌中高表达, 与预后不良有关, 通过抑制肝癌细胞铁死亡导致其对索拉非尼耐药^[13]。lncRNA DUXAP8 在放疗抗性乳腺癌细胞中表达上调, 并通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase b/mammalian target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR) 信号通路和与增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 相互作用抑制上皮钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin) 和 Ras 同源家族成员 B (Ras homolog family member B, RHOB) 的表达, 增强乳腺癌细胞放疗抗性^[14]。lncRNA DUXAP8 作为海绵体抑制微小 RNA 20b-5p

(microRNA 20b-5p, miR-20b-5p) 可上调 Son of Sevenless 同源物 1 (Son of Sevenless homolog 1, SOS1), 抑制甲状腺乳头状癌细胞凋亡^[15]。在肺癌中 lncRNA DUXAP8 抑制 miR-26b-5p 促进肺腺癌进展^[16]。lncRNA DUXAP8 促进非小细胞肺癌细胞增殖、上皮-间质转化和有氧糖酵解^[9]。本研究结果显示: 与对照组比较, Exo 组 A549 细胞中 lncRNA DUXAP8 表达水平升高, 集落形成数增加, EdU 阳性细胞率升高, 细胞增殖能力增强。

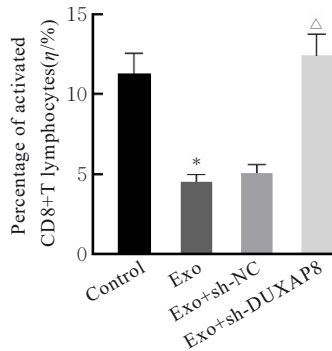
TME 在癌症的发生发展中起重要作用。免疫系统失调可能是癌症发展的主要原因, 免疫疗法已成为一种很有应用前景的癌症治疗策略。lncRNAs 在免疫系统的调控中发挥重要作用。长链非编码 RNA NeST (long non-coding RNA NeST, lncRNA NeST) 被发现是促炎细胞因子干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 的正调节因子, 负责调节抗肿瘤免疫特性, 促进肿瘤免疫逃逸^[17]。在膀胱癌中长链非编码 RNA NRON (long non-coding RNA NRON, lncRNA NRON) 被证明作为活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 的抑制因子, 维持 T 淋巴细胞的静息状态, 促进膀胱癌上皮-间质转化和恶性进展^[18]。胰腺癌患者血浆中长链非编码 RNA LINK-A (long non-coding RNA LINK-A, lncRNA LINK-A) 和 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1) 水平升高, 促进癌细胞侵袭和转移, 并与患者不良预后有关^[19]。因此, 进一步研究 lncRNAs 及其在免疫调节中的作用对于确定肺癌的免疫治疗靶点至关重要。本研究结果显示: 与对照组比较, Exo 组人外周血淋巴细胞中活化 CD8+T 淋巴细胞百分率降



A: Control group; B: Exo group; C: Exo+sh-NC group; D: Exo+sh-DUXAP8 group.

图7 流式细胞术检测各组人外周血淋巴细胞中活化 CD8+T 淋巴细胞百分率

Fig. 7 Percentages of CD8+T lymphocytes in peripheral blood lymphocytes in various groups detected by flow cytometry assay



* $P<0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P<0.05$ compared with Exo group.

图 8 各组人外周血淋巴细胞中活化 CD8+T 淋巴细胞百分率

Fig. 8 Percentages of CD8+T lymphocytes in peripheral blood lymphocytes in various groups

表 3 各组人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率

Tab. 3 Killing rates of peripheral blood lymphocytes to A549 cells in various groups ($n=6, \bar{x}\pm s, \eta/\%$)

Group	Killing rate
Control	13.34±2.23
Exo	6.28±1.41*
Exo+sh-NC	6.44±1.05*
Exo+sh-DUXAP8	15.46±2.73 [△]
F	34.49
P	<0.001

* $P<0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P<0.05$ compared with Exo group.

低，人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率降低；Exo+sh-DUXAP8 组人外周血淋巴细胞对 A549 细胞的杀伤率升高，表明 lncRNA DUXAP8 介导抑制 CD8+T 淋巴细胞的活化及其抗肿瘤细胞杀伤活性。抑制 lncRNA DUXAP8 可能激活 CD8+T 淋巴细胞，调节抗肺癌免疫微环境。

综上所述，肺癌源性 Exo 中 lncRNA DUXAP8 高表达，其可促进肺癌细胞增殖，减少人外周血淋巴细胞中 CD8+T 淋巴细胞活化比例，抑制其对肺癌细胞的杀伤功能，而敲低 lncRNA DUXAP8 表达能够抑制肺癌细胞生长，促进 CD8+T 淋巴细胞活化并增强其对肺癌细胞的杀伤力。肺癌 A549 细胞源性 Exo lncRNA DUXAP8 促进肺癌细胞增殖和肿瘤免疫逃逸。

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：

何小双参与研究方案设计和论文撰写，徐丽娜和崔梅参与文献收集及整理，赵宇参与数据统计学分析，王蓓、黄征和王玉超参与实验操作，辛雯艳和邬超参与论文审阅。

[参考文献]

[1] YAO J, NOVOSEL M, BELLAMPALLI S, et al. Lung cancer supportive care and symptom management[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2023, 37(3): 609-622.

[2] JHA S K, DE RUBIS G, DEVKOTA S R, et al. Cellular senescence in lung cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. Ageing Res Rev, 2024, 97: 102315.

[3] SATHISH G, MONAVARSHINI L K, SUNDARAM K, et al. Immunotherapy for lung cancer[J]. Pathol Res Pract, 2024, 254: 155104.

[4] KALLINGAL A, OLSZEWSKI M, MACIEJEWSKA N, et al. Cancer immune escape: the role of antigen presentation machinery [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149(10): 8131-8141.

[5] ROCHA K C E, YING W, OLEFSKY J M. Exosome-mediated impact on systemic metabolism[J]. Annu Rev Physiol, 2024, 86: 225-253.

[6] KWANTWI L B. Exosome-mediated crosstalk between tumor cells and innate immune cells: implications for cancer progression and therapeutic strategies [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149(11): 9487-9503.

[7] REGGIARDO R E, MAROLI S V, KIM D H. LncRNA biomarkers of inflammation and cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1363: 121-145.

[8] YAO Z T, YANG Y M, SUN M M, et al. New insights into the interplay between long non-coding RNAs and RNA-binding proteins in cancer [J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42(2): 117-140.

[9] WU C, SONG W, WANG Z N, et al. Functions of lncRNA DUXAP8 in non-small cell lung cancer[J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(3): 2531-2542.

[10] 姜 怡, 蔡雨晴, 张 朋, 等. 益气养阴解毒方及黄芪甲苷体外对 CTLA-4 介导的肺癌免疫逃逸的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(8): 2173-2177.

[11] MASHOURI L, YOUSEFI H, AREF A R, et al. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 75.

[12] ZHANG L, YU D H. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019, 1871(2): 455-468.

- [13] SHI Z H, LI Z M, JIN B, et al. Loss of lncRNA DUXAP8 synergistically enhanced sorafenib induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma *via* SLC7A11 de-palmitoylation[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(6): e1300.
- [14] LEI C J, LI S T, FAN Y, et al. lncRNA DUXAP8 induces breast cancer radioresistance by modulating the PI3K/AKT/mTOR pathway and the EZH2-E-cadherin/RHOB pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2022, 23(1): 1-13.
- [15] PANG R Z, YANG S. lncRNA DUXAP8 inhibits papillary thyroid carcinoma cell apoptosis *via* sponging the miR-20b-5p/SOS1 axis[J]. Oncol Rep, 2021, 45(5): 64.
- [16] LIU Y, ZHANG G M, CHEN H, et al. Silencing lncRNA DUXAP8 inhibits lung adenocarcinoma progression by targeting miR-26b-5p[J]. Biosci Rep, 2021, 41(1): BSR20200884.
- [17] ROSTAMI S, NABI M, NAGHAVI P, et al. Overexpression of the long non-coding RNA NeSt and FOXCUT in early stages of prostate cancer samples as promising biomarkers[J]. Clin Lab, 2019, 65(11): 2063-2069.
- [18] XIONG T F, HUANG C C, LI J F, et al. lncRNA NRON promotes the proliferation, metastasis and EMT process in bladder cancer[J]. J Cancer, 2020, 11(7): 1751-1760.
- [19] ZHANG M, WANG R J, ZHAO X, et al. lncRNA LINK-a regulates ROCK1 expression in early-stage pancreatic adenocarcinoma[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1933-1939.