

# M2型巨噬细胞来源的外泌体 lncRNA NR\_028113.1 通过激活 JAK2/STAT3 通路促进巨噬细胞的极化

张梦莹<sup>1,2</sup>, 李志<sup>3</sup>, 裴维亚<sup>1,2</sup>, 李雪琴<sup>1,2</sup>, 杨辉<sup>1,2</sup>, 朱小龙<sup>1,2</sup>, 吕坤<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>皖南医学院重大疾病非编码RNA转化研究安徽普通高校重点实验室, 皖南医学院弋矶山医院<sup>2</sup>中心实验室, <sup>3</sup>风湿免疫科, 安徽 芜湖 241001

**摘要:**目的 探究M2型巨噬细胞来源的外泌体 lncRNA NR\_028113.1对巨噬细胞极化的影响及机制。方法 体外分离并培养BALB/c小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDMs), IL-4诱导其向M2型巨噬细胞极化后, 提取并鉴定M2细胞上清液所分泌的外泌体 exosome (M2-exo), qRT-PCR检测M2外泌体中 lncRNA 的表达。将100 μg/mL的M2-exo, 对照组用等体积的PBS分别与M0巨噬细胞共孵育48 h后, qRT-PCR及Western blot检测各组细胞中 Arg1、YM-1、FIZZ1、iNOS和TNF-α 的表达, 流式细胞术检测CD206<sup>+</sup>细胞比例, Western blot检测各组细胞JAK2/STAT3蛋白磷酸化水平。设计、合成 lncRNA smart silencer 特异性抑制 lncRNA NR\_028113.1 的表达, 转染M2细胞48 h后提取各组细胞(exo+NC和exo+smart silencer)上清液分泌的外泌体再与M0型巨噬细胞共孵育, 检测孵育后各组细胞中 Arg1、YM-1、FIZZ1、iNOS和TNF-α 的表达以及CD206<sup>+</sup>细胞比例和JAK2/STAT3信号通路蛋白磷酸化水平。**结果** lncRNA NR\_028113.1在M2型巨噬细胞外泌体中高表达( $P<0.05$ )。相比于PBS对照组, 与M2-exo共培养的M0巨噬细胞中 Arg1、YM-1和FIZZ1表达均显著上调( $P<0.05$ ), iNOS和TNF-α 表达显著下调( $P<0.05$ ), CD206<sup>+</sup>细胞所占比例显著增加( $P<0.01$ ), JAK2/STAT3蛋白磷酸化水平显著增加( $P<0.05$ )。抑制M2-exo中 lncRNA NR\_028113.1 的表达后, 共培养的M0巨噬细胞中 Arg1、YM-1和FIZZ1表达显著下调( $P<0.05$ ), iNOS和TNF-α 表达显著上调( $P<0.05$ ), CD206<sup>+</sup>细胞所占比例显著减少( $P<0.05$ ), JAK2/STAT3蛋白磷酸化水平显著减少( $P<0.05$ )。**结论** M2型巨噬细胞来源的外泌体 lncRNA NR\_028113.1 可显著促进巨噬细胞向M2型极化, 其机制可能与激活JAK2/STAT3信号通路相关。

**关键词:**外泌体; lncRNA; 巨噬细胞极化; JAK2; STAT3

## M2 macrophage-derived exosomal lncRNA NR\_028113.1 promotes macrophage polarization possibly by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway

ZHANG Mengying<sup>1,2</sup>, LI Zhi<sup>3</sup>, PEI Weiya<sup>1,2</sup>, LI Xueqin<sup>1,2</sup>, YANG Hui<sup>1,2</sup>, ZHU Xiaolong<sup>1,2</sup>, LÜ Kun<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Non-coding RNA Transformation Research of Anhui Higher Education Institution, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China; <sup>2</sup>Central Laboratory, <sup>3</sup>Department of Rheumatology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**Abstract: Objective** To explore the effect of M2 macrophage-derived exosomal lncRNA NR\_028113.1 on macrophage polarization and its possible mechanism. **Methods** Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from BALB/c mice were isolated and cultured *in vitro*. After IL-4 treatment to induce M2 macrophage polarization, exosomes (M2-exo) were extracted from the supernatant of M2 macrophages and identified. The expression of lncRNA in M2-exo was detected by qRT-PCR. BMDMs were co-cultured with M2-exo (100 μg/mL) or PBS for 48 h, and the changes in cellular expression levels of Arg1, YM-1, FIZZ1, iNOS and TNF-α were detected using qRT-PCR and Western blotting. The percentage of CD206<sup>+</sup> cells was analyzed using flow cytometry, and the phosphorylation levels of JAK2/STAT3 proteins were detected using Western blotting. A lncRNA smart silencer was designed to specifically inhibit the expression of lncRNA NR\_028113.1 in the M2 macrophages, from which exosomes were extracted and co-cultured with BMDMs for 48 h. The mRNA expression levels of Arg1, YM-1, FIZZ1, iNOS and TNF-α, CD206<sup>+</sup> cell percentage and the phosphorylation levels of JAK2/STAT3 proteins were detected using qRT-PCR, flow cytometry and Western blotting. **Results** lncRNA NR\_028113.1 was highly expressed in the exosomes of M2 macrophages ( $P<0.05$ ). Co-culture with M2-exo significantly increased mRNA expressions of M2 macrophage marker genes Arg1, YM-1 and FIZZ1 ( $P<0.05$ ), lowered the expressions of iNOS and TNF-α ( $P<0.05$ ), and increased CD206<sup>+</sup> cell percentage and JAK2/STAT3 protein phosphorylation level in BMDMs ( $P<0.05$ ). After inhibiting the expression of lncRNA NR\_028113.1 in M2

macrophages, the extracted M2-exo caused significant down-regulation of the mRNA expressions of Arg1, YM-1 and FIZZ1 and up-regulation of iNOS and TNF-α mRNA ( $P<0.05$ ), resulting also in significantly reduced CD206<sup>+</sup> cell percentage and lowered phosphorylation levels of JAK2/STAT3 proteins in co-cultured BMDM ( $P<0.05$ ). **Conclusions** M2 macrophage-derived exosomal lncRNA NR\_028113.1 can significantly promote M2 polarization of macrophages possibly by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway.

**Keywords:** exosomes; long non-coding RNA; macrophage polarization; JAK2; STAT3

收稿日期: 2022-09-15

基金项目: 国家自然科学基金(82072370, 82100019, 81802503); 安徽省自然科学基金(2108085J44, 2108085QH307); 皖南医学院重点科研项目培育基金(WK2021ZF05)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82072370, 82100019, 81802503).

作者简介: 张梦莹, 助理研究员, E-mail: 51591569@qq.com

通信作者: 吕坤, 博士, 研究员, 教授, E-mail: lvkun315@126.com

巨噬细胞作为免疫系统的重要组成部分,对组织修复和维持组织稳态<sup>[1]</sup>具有重要影响。在体内外微环境<sup>[2]</sup>影响下,极化成不同的表型,呈现出不同的功能,即经典激活(M1)和替代激活(M2)巨噬细胞。巨噬细胞的极化分型与多种疾病相关,如肿瘤、感染、肥胖等<sup>[3-5]</sup>。深入研究调控巨噬细胞极化的分子机制,设计基于巨噬细胞极化调控的细胞或分子策略,已成为感染性疾病、炎症性疾病和肿瘤治疗的新兴领域。然而,调控巨噬细胞极化的机制仍有待于进一步阐明。外泌体是由直径为50~100 nm的脂质双层膜囊泡组成。它们由多种活细胞从多泡核内体分泌而存在几乎所有的生物液体中以及在大多数细胞培养基中<sup>[6]</sup>。外泌体内包含蛋白质、脂质、DNA、非编码RNA等携带遗传信息的多种生物活性分子,可被供体细胞吸收并转移至受体细胞后可导致靶细胞的功能变化而发挥重要作用<sup>[7,8]</sup>。目前,关于外泌体调控巨噬细胞极化的研究主要聚焦于肿瘤细胞、骨髓间充质干细胞等其他细胞来源的外泌体或外泌体内容物调控巨噬细胞极化参与疾病的进程,而有关巨噬细胞来源的外泌体对巨噬细胞本身的极化调控少见报道。最新研究发现,M1巨噬细胞来源的外泌体可以将M2极化的促肿瘤相关巨噬细胞(TAM)重新编程为M1样巨噬细胞,进而抑制肿瘤生长<sup>[9]</sup>。可见,巨噬细胞来源的外泌体也可调控巨噬细胞本身的极化。然而,巨噬细胞来源的外泌体lncRNA在巨噬细胞极化中的作用仍有待于进一步研究。本研究我们通过对M2巨噬细胞来源的外泌体中lncRNA表达测序发现,lncRNA NR\_028113.1在M2巨噬细胞来源的外泌体中表达升高,并且正向调控M2巨噬细胞极化。然而其具体机制尚未完全阐明。因此,本研究旨在探索M2巨噬细胞外泌体来源的lncRNA对巨噬细胞极化的影响以及可能的信号通路调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胎牛血清、高糖DMEM培养液(Gibco),胰蛋白酶-EDTA消化液、青霉素及链霉素(碧云天生物技术公司),IL-4(Peprotech),Trizol(Invitrogen),逆转录试剂盒(Thermo),SYBR Green PCR试剂盒(Qiagen),lncRNA smart silencer(由3条siRNA和3条ASO混合组成)、PCR引物(锐博生物科技有限公司),UR52302外泌体红色荧光标记染料PKH26(Umibio),GenMute siRNA Transfection Reagent(SignaGen),BCA蛋白浓度测定试剂盒(索莱宝科技有限公司),YM-1、FIZZ1、CD206、CD63、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、F4/80、 $\beta$ -actin单克隆抗体(Abcam),Arg1(CST),辣根过氧化物酶标记的二抗(biosharp),ECL化学发光试剂盒(Millipore)。

### 1.2 方法

**1.2.1 M2型巨噬细胞来源的外泌体的提取及鉴定** 将BALB/c小鼠颈椎脱臼处死,75%酒精消毒除菌10 min,无菌分离双侧胫骨和股骨,剪开两端,打开骨髓腔,用5 mL注射器吸取L929条件培养液(含有20%胎牛血清、20% L929小鼠成纤维细胞株培养3 d的上清液、100 U/mL青霉素/链霉素),从骨干的一端刺入骨髓腔冲出骨髓至无菌培养皿中,并将细胞反复轻柔吹打制成单个悬细胞,分种于6孔培养板中。置37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养。2 d后首次换液,使用PBS洗去未贴壁细胞,并更换新鲜的L929条件培养基,继续培养4 d后置于含IL-4(20 ng/mL)的完全培养基,诱导分化48 h后,即得M2型巨噬细胞。采用超速离心法分离M2-exo:收集M2型巨噬细胞培养的上清液,4 °C、3000×g离心10 min,去除死细胞及细胞碎片,收集上清液,4 °C、110 000×g第1次超速离心70 min,弃尽上清液,加入PBS反复冲洗全管内壁,4 °C、110 000×g第2次超速离心70 min,弃尽上清液,加入100  $\mu$ L PBS重悬收集外泌体。经透射电镜(TEM)及纳米颗粒分析仪对提取的外泌体形态、粒径大小及表面标志蛋白CD63、CD9、HSP70进行鉴定。BCA法测定外泌体总蛋白含量。

**1.2.2 lncRNA微阵列测序** 采用Trizol从外泌体中进行总RNA提取,总RNA经NanoDrop ND-2000分光光度计及Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent technologies, USA)进行质检,质检合格的RNA先后连接3'端和5'的接头,反转录成cDNA,Illumina HiSeq™ 2500上机测序(锐博生物科技有限公司)。

**1.2.3 外泌体的摄取** 将M2巨噬细胞( $2 \times 10^5$ /mL)接种于24孔板中,根据PKH26红色荧光染料试剂盒说明书对M2-exo进行染色标记,4 °C、100 000×g超速离心70 min清去除多余染料,取200  $\mu$ L PBS重悬沉淀物,沉淀即为PKH26标记的M2-exo,将其与M0型巨噬细胞37 °C下共培养4 h后,用4%多聚甲醛固定10 min,PBS洗涤3次,并用DAPI标记细胞核,使用激光扫描共聚焦显微镜(蔡司LSM800)观察并拍照。

**1.2.4 细胞转染** 将M0型巨噬细胞( $1 \times 10^6$ /mL)接种于6孔培养板中随机分成2组:exo+NC组和exo+smart silencer组,转染前吸出6孔板中的培养基,PBS洗涤2遍,每孔加入1 mL新鲜完全培养基,使用转染试剂盒进行转染,转染成功后再加IL-4(20 ng/mL)刺激48 h后,收集得到的细胞上清液用于提取外泌体后续研究。

**1.2.5 qRT-PCR** 将M0型巨噬细胞与外泌体(100  $\mu$ g/mL)共孵育48 h后,采用Trizol提取RNA,按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成cDNA,行qRT-PCR检测。以GAPDH作为内参,实验数据以BIO-RAD CFX Manager分析软件进行自动分析。使用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算相对表达量。引物序列如表1。

表1 RT-qPCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
GAPDH	Forward	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA
	Reverse	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC
Arg1	Forward	TGACTGAAGTAGACAAGCTGGGGAT
	Reverse	CGACATCAAAGCTCAGGTGAATCGG
YM-1	Forward	ATGAAGCATTGAATGGTCTGAAAAG
	Reverse	TGAATATCTGACGGTTCTGAGGAG
FIZZ1	Forward	AGGTCAAGGAACCTTCTTGCCAATCC
	Reverse	AAGCACACCCAGTAGCAGTCATCCC
NOS2	Forward	ATCTTTGCCACCAAGATGGCCTGG
	Reverse	TTCTGTGCTGTGCTACAGTTCGG
Tnf- $\alpha$	Forward	CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT
	Reverse	AAGCAAAAGAGGAGGCAACA

1.2.6 流式细胞术 将M0型巨噬细胞分别于各组外泌体(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )共孵育48 h后,取细胞 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 于离心管中,加入anti-CD206-PE抗体,避光共孵育30 min,用PBS清洗2次,并用500  $\mu\text{L}$  PBS重悬,流式细胞仪检测CD206<sup>+</sup>细胞表达。

1.2.7 免疫印迹法 用4  $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS缓冲液洗涤板中细胞3次,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA蛋白裂解液于冰上裂解30 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心20 min,取上清,BCA蛋白浓度测定试剂盒定量后,取各组蛋白进行SDS-PAGE电泳分离转膜至PVDF膜上,分别加一抗,用含5%脱脂奶粉封闭后4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育缓慢摇动过夜,经TBST洗涤3次,5 min/次;室温用二抗(辣根过氧化物酶标记,稀释比例为1:2000)孵育1~2 h,TBST清洗后,使用ECL发光试剂盒曝光,拍照,并进行蛋白定量。

### 1.3 统计学分析

采用统计分析软件GraphPad Prism 4.0,各组数据以均数 $\pm$ 标准差表示,多组间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 M2型巨噬细胞的诱导结果

BMDMs体外诱导7 d后,再给予IL-4刺激48 h后,利用免疫荧光染色对细胞进行鉴定(图1A)。再提取总RNA对巨噬细胞相关标志基因进行RT-qPCR检测,结果显示,M2型巨噬细胞相关标志基因Arg1、YM-1和FIZZ1的mRNA表达水平明显增高(图1B,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 外泌体鉴定结果

透射电镜观察结果显示:M2-exo具有双层包膜,“杯托”样囊状结构(图2A),纳米颗粒追踪仪检测结果显示:粒径50~100 nm(图2B),Western blot检测外泌体表达标志蛋白CD63、CD9、HSP70(图2C),分离提取M2-Exo可用于后续实验。

### 2.3 巨噬细胞摄取外泌体检测结果

用外泌体PKH26红色荧光标记染料标记M2-exo,再以DAPI蓝色荧光染料标记巨噬细胞胞核,将标记后的M2-exo与巨噬细胞培养箱共孵育,外泌体进入到巨噬细胞胞浆当中可检测到红色荧光(图3)。

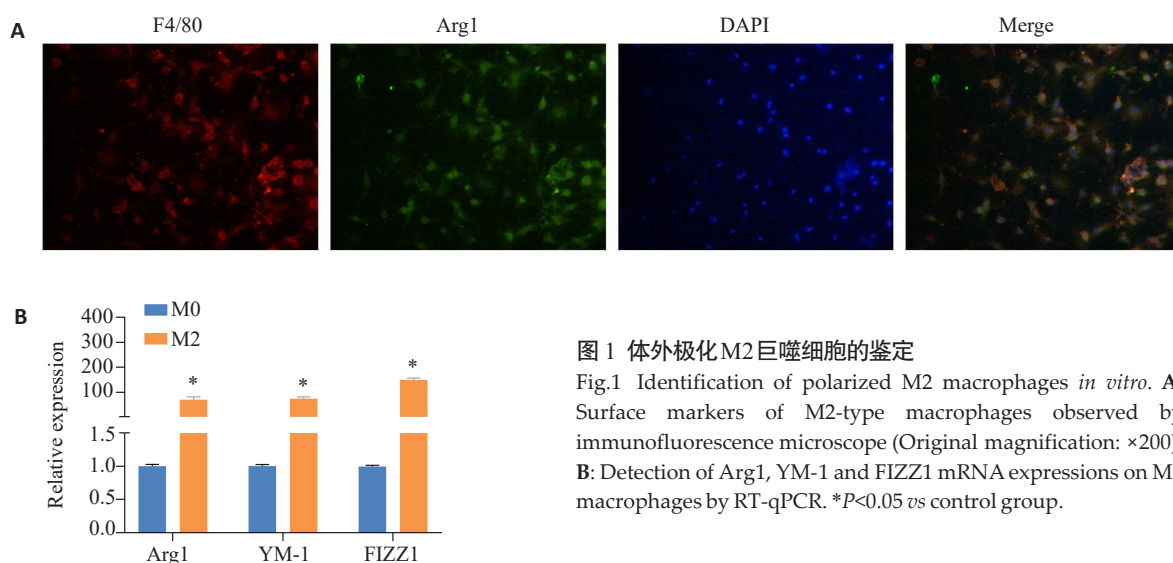


图1 体外极化M2巨噬细胞的鉴定

Fig.1 Identification of polarized M2 macrophages *in vitro*. A: Surface markers of M2-type macrophages observed by immunofluorescence microscope (Original magnification:  $\times 200$ ). B: Detection of Arg1, YM-1 and FIZZ1 mRNA expressions on M2 macrophages by RT-qPCR. \* $P < 0.05$  vs control group.



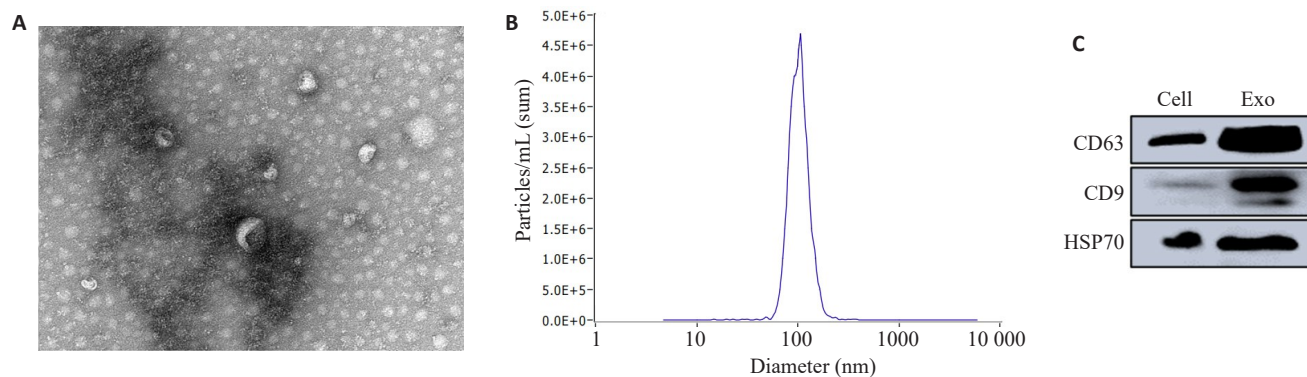


图2 M2-Exo外泌体的鉴定

Fig.2 Identification of M2 exosomes. A: Morphology of exosomes observed by transmission electron microscope (×30 000). B: Particle size distribution of M2 exosomes measured by nanoparticle tracking analysis. C: Western blotting of expressions of exosome marker proteins.

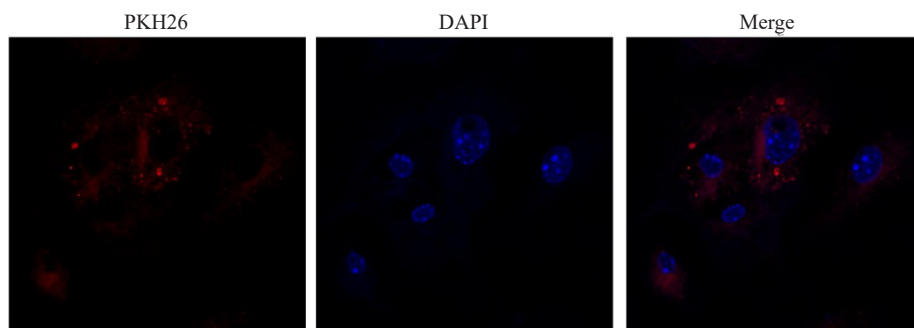


图3 激光共聚焦显微镜下观察外泌体的摄取

Fig.3 Uptake of exosomes observed under laser confocal microscope (×400).

#### 2.4 M2-exo促进M2型巨噬细胞极化

根据微阵列芯片测序结果,我们挑选了6个差异表达上调的lncRNA进行qRT-PCR验证(lncRNA NR\_028113.1, lncRNA NR\_015468.1, lncRNA NR\_131969.1, lncRNA NR\_040400.1, lncRNA XR\_001782547.1, lncRNA Gm19705),结果发现, lncRNA NR\_028113.1在M2-exo中上调表达较明显( $P < 0.05$ ,图4A)。将PBS、M2-exo分别与M0型巨噬细胞共孵育48 h后,qRT-PCR和Western blot检测结果显示,相比于PBS对照组,M2-exo组巨噬细胞中M2型巨噬细胞标志物Arg1、YM-1和FIZZ1表达均显著上调( $P < 0.05$ ),而M1型巨噬细胞标志物iNOS和TNF- $\alpha$ 表达均显著下调( $P < 0.05$ ,图4B、C)。流式细胞术检测结果显示,与M2-exo孵育后巨噬细胞中CD206<sup>+</sup>表达显著增加( $P < 0.01$ ,图4D)。

#### 2.5 抑制M2巨噬细胞外泌体lncRNA NR\_028113.1对巨噬细胞极化的影响

在M2巨噬细胞中转染lncRNA NR\_028113.1特异性抑制剂 smart silencer和阴性对照(NC),然后提取转染后各组细胞所分泌的外泌体(记为exo+NC和

exo+Smart silencer)再与M0型巨噬细胞共孵育48 h后,qRT-PCR和Western blot检测结果显示,相比于NC组,lncRNA NR\_028113.1特异性抑制剂 smart silencer组巨噬细胞中Arg1、YM-1和FIZZ1表达显著下调( $P < 0.05$ ),而M1型巨噬细胞标志物iNOS和TNF- $\alpha$ 表达均显著上调( $P < 0.05$ ,图5A、B)。流式细胞术检测结果显示,相比于NC组,lncRNA NR\_028113.1特异性抑制剂 smart silencer组CD206<sup>+</sup>细胞所占比例显著降低( $P < 0.05$ ,图5C)。

#### 2.6 M2巨噬细胞外泌体lncRNA NR\_028113.1激活JAK2/STAT3信号通路

Western blot结果显示,相比于PBS组,与M2-exo共孵育后,巨噬细胞中JAK2、STAT3磷酸化水平显著高于PBS组( $P < 0.05$ ,图6A);而抑制外泌体中lncRNA NR\_028113.1表达后,与其共孵育的M0细胞中JAK2/STAT3磷酸化水平显著低于NC组( $P < 0.05$ ,图6B)。

### 3 讨论

巨噬细胞作为免疫系统的重要组成部分,是一类功能异质性细胞具有高度可塑性的细胞群。在微环境不同刺

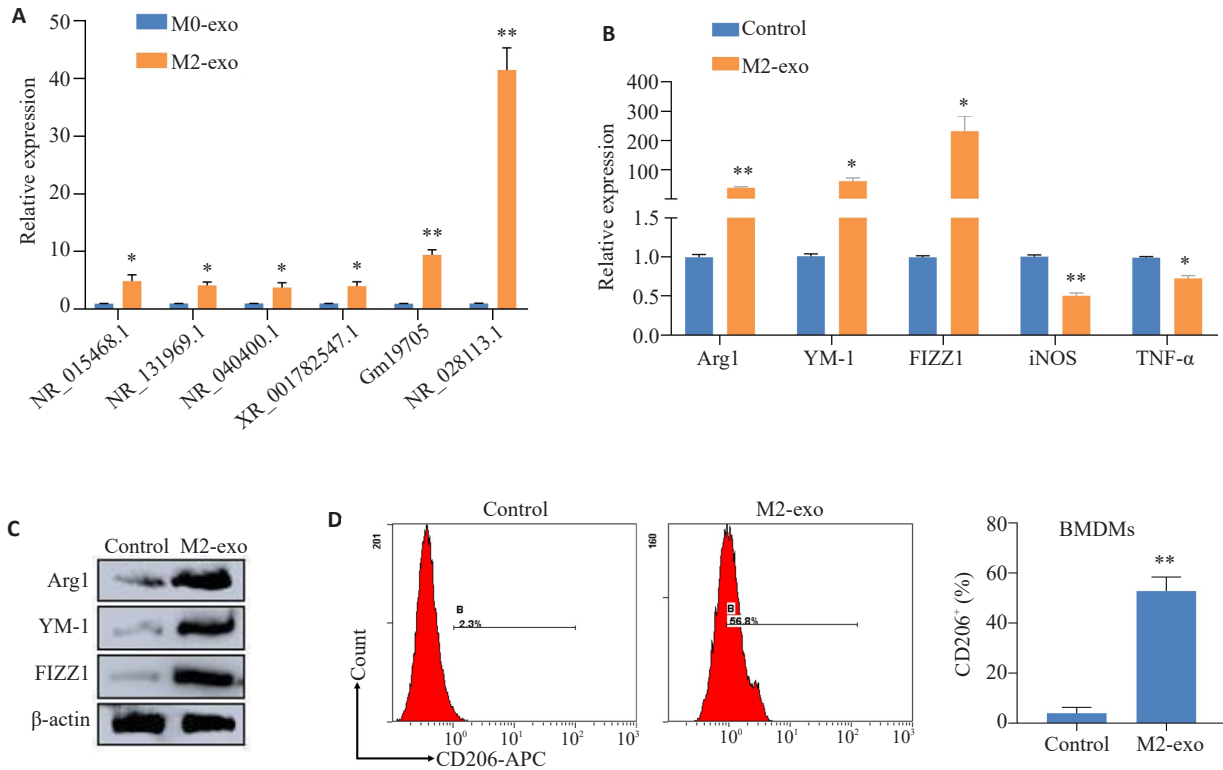


图4 M2外泌体对巨噬细胞极化的影响

Fig.4 Effect of M2 exosomes on polarization of macrophages. A: Expression of lncRNA in M2 exosomes detected by RT-qPCR. B: Detection of Arg1, YM-1, FIZZ1, iNOS, and TNF-α mRNA expressions in M2 macrophages by RT-qPCR. C: Detection of Arg1, YM-1, and FIZZ1 protein expression in M2 macrophages by Western blotting. D: Expression levels of CD206 detected by flow cytometry. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

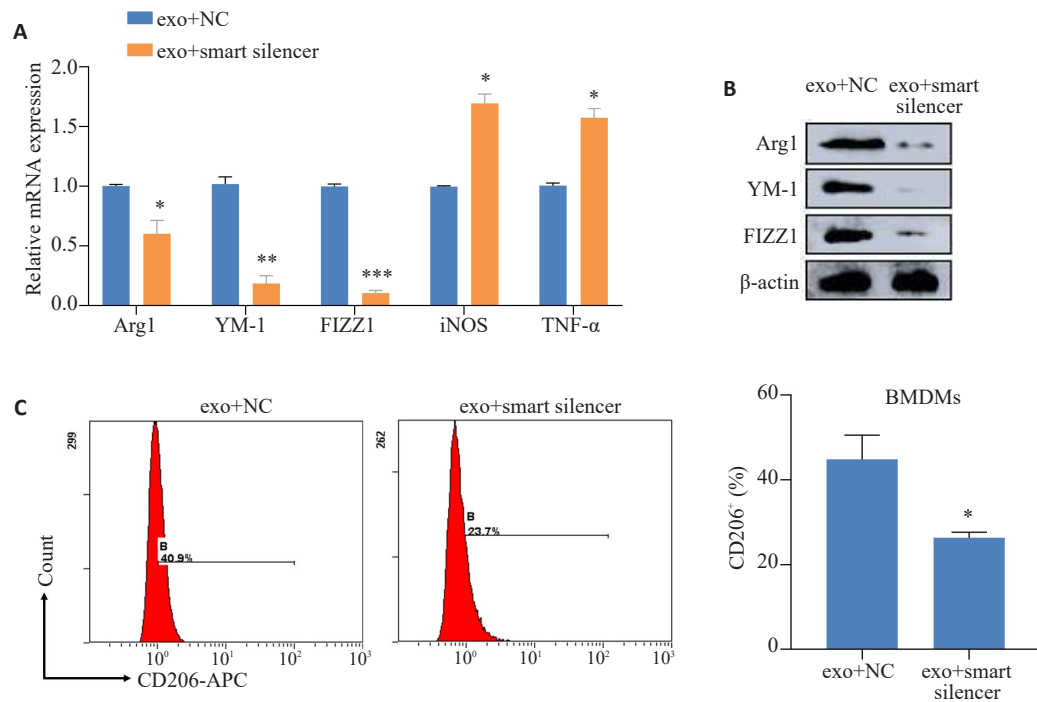


图5 M2外泌体lncRNA NR\_028113.1对巨噬细胞极化的影响

Fig.5 Effect of M2 exosome-derived lncRNA NR\_028113.1 on polarization of macrophages. A: Detection of M2 macrophage Arg1, YM-1, FIZZ1, iNOS, and TNF-α mRNA expressions by RT-qPCR. B: Detection of M2 macrophage Arg1, YM-1, and FIZZ1 protein expressions by Western blotting. C: Expression levels of CD206 detected by flow cytometry. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs exo+NC group.

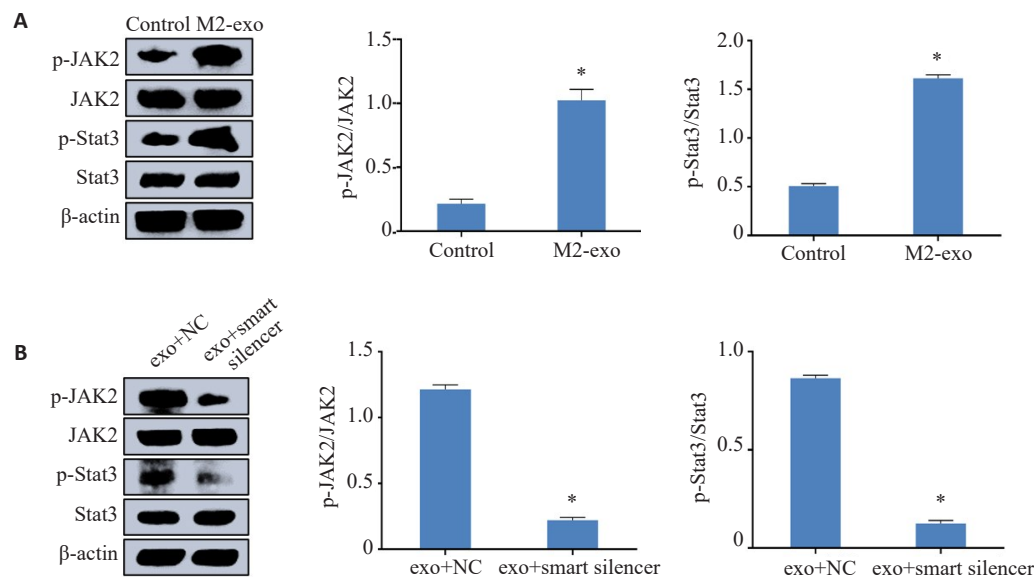


图6 M2巨噬细胞外泌体lncRNA NR\_028113.1 激活 JAK2/STAT3 信号通路

Fig.6 M2 macrophage exosomal lncRNA NR\_028113.1 activates JAK2/STAT3 signaling pathway. **A:** Effect of macrophage exosomes on JAK2 and STAT3 phosphorylation detected by Western blotting (\* $P < 0.05$  vs control group). **B:** Effect of inhibition of exosomal lncRNA NR\_028113.1 on phosphorylation of JAK2 and STAT3 detected by Western blotting (\* $P < 0.05$  vs exo+NC group).

激因子作用下,巨噬细胞可极化为为两大类亚型:经典激活的促炎亚型M1型细胞以及替代激活的抗炎亚型M2型细胞<sup>[10]</sup>,M1和M2细胞可以在特定的微环境下动态地相互转换<sup>[11]</sup>。

外泌体是由几乎所有类型的细胞衍生而来的50~150 nm膜包裹的囊泡,可在各种体液中识别<sup>[12,13]</sup>,同时外泌体包含多种生物分子,包括DNA、RNA、蛋白等<sup>[46,15]</sup>。研究表明,外泌体具有亲本细胞的一些特征,在信号转导、疾病诊断、免疫应答调节和药物传递、治疗等方面发挥重要的作用<sup>[16-18]</sup>。

长链非编码RNA(lncRNA)属于非编码RNA的重要组成部分,一般是指长度>200 nt、无蛋白编码功能的RNA分子,参与体内多项生物学过程。研究证实,lncRNA在巨噬细胞极化过程中发挥重要作用<sup>[19,20]</sup>。近年来,关于外泌体lncRNA调控巨噬细胞极化在肿瘤等疾病中的作用研究不断被报道。但是目前的研究主要集中于肿瘤细胞自身或骨髓间充质干细胞等其他细胞来源的外泌体lncRNA调控巨噬细胞极化参与疾病的进程<sup>[21-23]</sup>,而巨噬细胞亲本来源的外泌体lncRNA对巨噬细胞本身的极化调控研究少见报道。最近研究发现,M1巨噬细胞来源的外泌体miR-511-3p可以将M2表型的TAM细胞重编程为M1样巨噬细胞<sup>[9]</sup>。可见,巨噬细胞来源的外泌体可以调控巨噬细胞自身极化。

本研究通过提取M2巨噬细胞的外泌体进行lncRNA测序,筛选并验证M2巨噬细胞外泌体中显著

差异表达的lncRNA分子,并探讨M2巨噬细胞来源的外泌体lncRNA对巨噬细胞本身M2极化的影响。根据测序结果,我们发现lncRNA NR\_028113.1在巨噬细胞外泌体中的显著高表达,提示lncRNA NR\_028113.1对巨噬细胞的极化有可能有一定影响。为了探究lncRNA NR\_028113.1是否有助于巨噬细胞极化的可塑性,我们利用qPCR验证了lncRNA NR\_028113.1在M0和M2极化激活的巨噬细胞外泌体中的表达,发现M2巨噬细胞外泌体中lncRNA NR\_028113.1的水平明显高于M0巨噬细胞。接下来,我们将M2巨噬细胞所分泌的外泌体与M0巨噬细胞共孵育,检测M2巨噬细胞标志基因的表达水平。实验结果表明,M2巨噬细胞所分泌的外泌体可显著促进巨噬细胞向M2型极化;而抑制M2巨噬细胞外泌体lncRNA NR\_028113.1的表达再与M0巨噬细胞共孵育,可显著抑制M0巨噬细胞的M2表型基因的表达水平。综上所述,我们的数据表明,M2巨噬细胞外泌体可通过转运lncRNA NR\_028113.1而促进巨噬细胞向M2表型极化中发挥重要作用。

巨噬细胞极化是多因子相互作用的复杂过程,其极化过程受多种信号通路的调控,其中JAK2/STAT3信号通路具有调控M2型巨噬细胞极化的作用已有多项研究报道<sup>[24,25]</sup>。而本文研究发现,M2巨噬细胞分泌的外泌体可显著促进JAK2和STAT3的磷酸化水平,而抑制M2巨噬细胞外泌体中lncRNA NR\_028113.1的表达可显著抑制JAK和STAT3的磷酸化水平,说明外泌体

lncRNA NR\_028113.1可通过促进JAK2/STAT3的磷酸化而促进M2型巨噬细胞的极化。

综上所述, M2巨噬细胞来源的外泌体lncRNA NR\_028113.1在促进巨噬细胞极化和参与激活JAK2/STAT3信号通路激活中发挥了重要的作用。我们的研究不仅加深了我们对lncRNA调节巨噬细胞极化功能的认识,也阐明了先天免疫微环境之间复杂的相互作用,但具体的作用机制还需进一步探究。

#### 参考文献:

- [1] Wang Y, Chaffee TS, LaRue RS, et al. Tissue-resident macrophages promote extracellular matrix homeostasis in the mammary gland stroma of nulliparous mice[J]. *Elife*, 2020, 9: e57438.
- [2] Liang B, Wang H, Wu D, et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in microenvironment and modulates alveolar bone remodeling after dental implantation [J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 110(3): 433-47.
- [3] Boutilier AJ, ElSawa SF. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6995.
- [4] Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): E1801.
- [5] Liu SQ, Zhang HL, Li YN, et al. S100A4 enhances protumor macrophage polarization by control of PPAR- $\gamma$ -dependent induction of fatty acid oxidation [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(6): e002548.
- [6] Tang YT, Huang YY, Zheng L, et al. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(3): 834-44.
- [7] Kuse N, Kamio K, Azuma A, et al. Exosome-derived microRNA-22 ameliorates pulmonary fibrosis by regulating fibroblast-to-myofibroblast differentiation *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Nippon Med Sch*, 2020, 87(3): 118-28.
- [8] Wang X, Zhang H, Yang H, et al. Exosome-delivered circRNA promotes glycolysis to induce chemoresistance through the miR-122-PKM2 axis in colorectal cancer [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(3): 539-55.
- [9] Gunassekaran GR, et al. M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages[J]. *Biomaterials*, 2021, 278: 121137.
- [10] Yoon J, Um HN, Jang J, et al. Eosinophil activation by toll-like receptor 4 ligands regulates macrophage polarization[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 329.
- [11] Kim H, Wang SY, Kwak G, et al. Exosome-guided phenotypic switch of M1 to M2 macrophages for cutaneous wound healing[J]. *Adv Sci: Weinh*, 2019, 6(20): 1900513.
- [12] Elsharkawi F, Elsabah M, Shabayek M, et al. Urine and serum exosomes as novel biomarkers in detection of bladder cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(7): 2219-24.
- [13] Muraoka S, Jedrychowski MP, Yanamandra K, et al. Proteomic profiling of extracellular vesicles derived from cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: a pilot study [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 1959.
- [14] Sun R, Liu Y, Lu M, et al. ALIX increases protein content and protective function of iPSC-derived exosomes[J]. *J Mol Med: Berl*, 2019, 97(6): 829-44.
- [15] Shi C, Alvarez-Olmedo D, Zhang Y, et al. The heat shock protein 27 immune complex enhances exosomal cholesterol efflux [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(8): E290.
- [16] Zhang L, et al. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer*, 2019, 1871(2): 455-68.
- [17] Liang Y, Duan L, Lu J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-95.
- [18] Zhou Y, Zhang Y, Gong H, et al. The role of exosomes and their applications in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12204.
- [19] Chi X, Ding B, Zhang L, et al. lncRNA GAS5 promotes M1 macrophage polarization *via* miR-455-5p/SOCS3 pathway in childhood pneumonia [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 13242-51.
- [20] Zong S, Dai W, Guo X, et al. lncRNA-SNHG1 promotes macrophage M2-like polarization and contributes to breast cancer growth and metastasis [J]. *Aging: Albany NY*, 2021, 13(19): 23169-81.
- [21] Xin L, et al. Exosome-mediated transfer of lncRNA HCG18 promotes M2 macrophage polarization in gastric cancer [J]. *Mol Immunol*, 2021, 140: 196-205.
- [22] Zhang W, Zheng X, Yu Y, et al. Renal cell carcinoma-derived exosomes deliver lncARSR to induce macrophage polarization and promote tumor progression *via* STAT3 pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8): 3209-22.
- [23] Arabpour M, et al. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107823.
- [24] Zhong Y, et al. JAK2/STAT3 axis intermediates microglia/macrophage polarization during cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neuroscience*, 2022, 496: 119-28.
- [25] Zhang HY, et al. Cucurbitacin B controls M2 macrophage polarization to suppresses metastasis *via* targeting JAK-2/STAT3 signalling pathway in colorectal cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 287: 114915.

(编辑:余诗诗)