

# JAG1 影响单核-巨噬细胞重塑三阴性乳腺癌转移前微环境:基于外泌体中的 LncRNA MALAT1

徐梦歧, 石宇彤, 刘俊平, 吴敏敏, 张凤梅, 何志强, 唐敏

重庆医科大学检验医学院//临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016

**摘要:**目的 探讨JAG1对单核-巨噬细胞在三阴性乳腺癌(TNBC)中肿瘤转移前微环境(PMN)中作用的影响及其可能的调控机制,以期为TNBC诊疗提供新的思路和靶点。方法 人TNBC细胞MDA-MB-231,MDA-MB-231B体外培养,qRT-PCR检测JAG1的表达。动物实验将雌性裸鼠分为MDA-MB-231组和MDA-MB-231B组,5只/组,分别往乳腺脂肪垫注射细胞 $5 \times 10^6$ ,6周取肿瘤组织进行免疫组化分析。人源单核细胞THP-1为研究对象,分别经人源JAG1重组蛋白(rhJAG1)直接处理或经TNBC条件培养基(CM)处理,通过单核-内皮粘附、Transwell、qRT-PCR和Western blot实验检测JAG1对单核细胞的直接作用和PMN中的影响。实验分为5组:Control组:THP-1正常培养;231-CM组:THP-1+231-CM;231-JAG1-CM组:THP-1+rhJAG1处理后231-CM;231B-CM组:THP-1+231B-CM;231-DAPT-CM组:THP-1+DAPT处理后231-CM。透射电镜(TEM)、纳米颗粒跟踪分析(NTA)检测JAG1对TNBC外泌体分泌影响。生物信息学筛选与LncRNA MALAT1相互作用的miRNA并行qRT-PCR验证。结果 与MDA-MB-231相比,侵袭株MDA-MB-231B的JAG1表达更高( $P < 0.01$ ),肝转移面积更大;rhJAG1直接处理和TNBC条件培养基处理均能促进单核细胞的黏附、迁移,并影响其分化(均 $P < 0.05$ );透射电镜和NTA检测显示JAG1能促进MDA-MB-231外泌体分泌数量增多( $P < 0.01$ ),外泌体中LncRNA MALAT1含量升高( $P < 0.0001$ )。生物信息学分析得到与LncRNA MALAT1和JAG1相关的5个候选miRNA,实验证实miR-26a-5p在TMN中的单核-巨噬细胞中受到MALAT1的靶向调控( $P < 0.0001$ )。结论 JAG1能促进TNBC的外泌体分泌并影响其中Lnc MALAT1的表达,从而靶向PMN中单核-巨噬细胞miR-26a-5p的表达,从而使单核-巨噬细胞中JAG1表达升高,进而影响单核-巨噬细胞在PMN中的黏附、迁移和破骨分化作用。

**关键词:**JAG1;三阴性乳腺癌;单核-巨噬细胞;外泌体;肿瘤转移前微环境;LncRNA MALAT1

## JAG1 affects monocytes-macrophages to reshape the pre-metastatic niche of triple-negative breast cancer through LncRNA MALAT1 in exosomes

XU Mengqi, SHI Yutong, LIU Junping, WU Minmin, ZHANG Fengmei, HE Zhiqiang, TANG Min

Key Laboratory of Clinical Laboratory and Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of JAG1 on the activities of monocytes-macrophages in pre-metastatic niche (PMN) of triple-negative breast cancer (TNBC) and explore the possible regulatory mechanism. **Methods** JAG1 expression in human TNBC MDA-MB-231 and MDA-MB-231B cells was detected using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Ten female nude mice were inoculated with MDA-MB-231 cells ( $n=5$ ) or MDA-MB-231B cells ( $n=5$ ) in the mammary fat pad, and 6 weeks later, the tumor tissues were collected for immunohistochemistry. Human monocytes THP-1 cells were treated with rhJAG1 or conditioned media (CM) of TNBC MDA-MB-231 and MDA-MB-231B cells to assess the direct effect of JAG1 on monocytes and its effect on monocytes in the PMN using monocyte-endothelial adhesion, Transwell assay, qRT-PCR and Western blotting. Transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analyses were used to identify the effect of JAG1 on exosome release from the TNBC cells. MiRNAs interacting with LncRNA MALAT1 were identified by bioinformatics and validated using qRT-PCR. **Results** Compared with MDA-MB-231 cells, the invasive strain MDA-MB-231B cells showed significantly higher JAG1 expression and greater liver metastasis potential ( $P < 0.01$ ). Both direct treatment with rhJAG1 and treatment with the conditioned media promoted adhesion and migration and affected differentiation of the monocytes ( $P < 0.05$ ). Transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis showed that JAG1 strongly enhanced exosome secretion from MDA-MB-231 cells ( $P < 0.01$ ) and increased MALAT1 content in the exosomes ( $P < 0.0001$ ). Five candidate miRNAs related to MALAT1 and JAG1 were identified by bioinformatics analysis, and miR-26a-5p was identified as a potential target of MALAT1 in monocytes-macrophages in TMN ( $P < 0.0001$ ). **Conclusion** JAG1 can promote exocrine secretion of TNBC and increase the expression of MALAT1 to cause targeted downregulation of miR-26a-5p in monocytes-macrophages in the PMN, which in turn increases JAG1 expression in monocytes-macrophages to affect their adhesion, migration and osteoclast differentiation in the PMN.

**Keywords:** JAG1; triple-negative breast cancer; monocytes-macrophages; exosomes; pre-metastatic niche; long non-coding RNA MALAT1

收稿日期:2023-02-17

基金项目:重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0542)

作者简介:徐梦歧,在读硕士研究生,E-mail: xumengqi@stu.cqmu.edu.cn

通信作者:唐敏,教授,硕士生导师,E-mail: tangmin@cqmu.edu.cn

三阴性乳腺癌(TNBC)是乳腺癌中最具侵袭性的分子亚型,具有复发率高、存活率低和转移潜能大<sup>[1]</sup>,缺乏治疗靶点和预后差的特点<sup>[2,3]</sup>。尽管目前临床治疗取得一定的进展<sup>[4-7]</sup>,但在转移性环境中,TNBC仍然是致

命的<sup>[8-10]</sup>。因此,明确TNBC转移过程中关键分子和细胞成分对早期发现和控制TNBC转移至关重要。

研究表明,肿瘤转移前微环境(PMN)形成是乳腺癌等肿瘤远处转移的关键步骤<sup>[11,12]</sup>。肿瘤来源的外泌体作为重要的媒介介导肿瘤细胞与受体细胞之间的串扰<sup>[13,14]</sup>并影响受体细胞的表型促进转移前微环境的形成<sup>[15,16]</sup>。而单核-巨噬细胞是肿瘤微环境中的重要组成部分。Notch信号在肿瘤微环境中广泛分布<sup>[17]</sup>,在包括TNBC在内的多种肿瘤中被激活,在肿瘤细胞生存、进展、转移和侵袭中发挥重要作用<sup>[18-20]</sup>,但不同肿瘤间及同一肿瘤不同亚型内的异质性较大<sup>[21,22]</sup>,这可能与微环境有关。研究显示Notch信号通路经典的膜配体之一JAG1是TNBC的侵袭分子<sup>[23,24]</sup>,能对单核-巨噬细胞有直接的招募作用<sup>[25]</sup>,与TNBC的复发转移有关。但既往研究揭示的仅仅是膜配体JAG1对单核-巨噬细胞的直接作用,肿瘤上JAG1能否通过外泌体的方式对远处单核-巨噬细胞发挥作用,从而促进PMN形成,促进TNBC转移,相关研究尚未见报道。因此,本研究拟通过以TNBC细胞株MDA-MB-231为研究对象,初步研究JAG1对TNBC转移前微环境中单核-巨噬细胞的影响及其可能机制,以期以TNBC诊疗提供新的思路和靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和动物

三阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-231(231)、侵袭株MDA-MB-231B(231B),人脐静脉内皮细胞HUVEC,人源单核细胞THP-1由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保藏。SPF级雌性裸鼠,6~7周龄,体质量15 g左右,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0008。本实验通过重庆医科大学动物伦理专业委员会批准(审批号2021023)。MDA-MB-231、MDA-MB-231B, HUVEC均用含10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素/链霉素(P/S)的DMEM完全培养基进行培养;人源单核细胞THP-1用含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素(P/S)的RPMI 1640完全培养基培养,以上细胞均放置于37℃、5%饱和度CO<sub>2</sub>的无菌恒温培养箱中。

### 1.2 主要试剂

DMEM、RPMI 1640和胎牛血清(上海源培生物科技有限公司);RNA快速提取试剂盒(上海奕杉生物科技有限公司);Real-time PCR试剂盒、SYBR Green I及人源JAG1重组蛋白试剂(MCE);CD68抗体(CST),兔抗鼠JAG1抗体(沈阳万类生物公司);Dil荧光染料(上海碧云天公司);佛波酯(PMA)(杭州联科生物公司);IL-4和IL-13(北京神州义翹公司);DAPI染料(北京博奥森公司);0.2 μm过滤器(Millipore);小干扰RNA

(siRNA)及其转染试剂GP-transfect-Mate(上海吉玛基因公司);所有引物由上海生工生物工程公司设计合成(表1)。

### 1.3 方法

1.3.1 裸鼠原位乳腺癌移植瘤模型的构建 选取6~7周龄,体质量为15 g左右的雌性裸鼠,分为2组(MDA-MB-231,MDA-MB-231B),5只/组,用10%的水合氯醛注射入腹腔进行麻醉;往裸鼠乳房脂肪垫处使用注射器注射100 μL细胞悬液(约 $5 \times 10^6$  MDA-MB-231或MDA-MB-231B细胞),使用镊子和缝合线,缝合其皮肤;6周后处死裸鼠,观察原位肿瘤及其肝转移灶情况,取肿瘤组织进行免疫组化分析。

1.3.2 qRT-PCR 使用RNA快提试剂盒按照说明书进行RNA提取,检测RNA浓度,进行逆转录。逆转录反应体系首先在25℃下,反应5 min;随后在55℃下反应15 min;最后在85℃,反应2 min,所得产物在4℃保存。PCR扩增体系为10 μL,92℃ 20 s,56℃ 30 s,72℃ 20 s,重复40个循环。引物序列见表1)。

1.3.3 Western blot 收集细胞和外泌体,使用RIPA裂解后提取总蛋白,BCA法测其浓度。用SDS-PAGE分离蛋白质,并转移到PVDF膜。用5%脱脂牛奶封闭后,将膜与各一抗在4℃下孵育过夜,β-actin以1:1000稀释,Jagged1、NICD、ALIX以1:500稀释。在37℃下分别与以1:5000的稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG或山羊抗小鼠IgG孵育1 h,使用ECL底物显影并统计。

1.3.4 细胞条件培养基(CM)收集及实验分组 待MDA-MB-231细胞贴壁后加入人源JAG1重组蛋白(rhJAG1,150 ng/mL),长至70%视野,更换为无血清无双抗的DMEM培养基进行饥饿处理,37℃培养24 h,收集细胞上清液。其余条件培养基收集与上述类似,均待细胞长至70%视野后,更换为双无培养基,37℃培养24 h,收集细胞上清液。细胞上清液放置于-80℃保存以待使用。根据处理情况分为5组:Control组:不进行CM处理;231-CM组:使用231细胞上清液处理;231-JAG1-CM组:使用JAG1处理24 h之后的231细胞上清液处理;231B-CM组:使用231B细胞上清液处理;231-DAPT-CM组:使用DAPT处理后的231细胞上清液处理。

1.3.5 单核-内皮黏附实验 首先将HUVEC细胞接种于六孔板中,待生长至单层,移除DMEM完全培养基,加入无血清DMEM培养基进行饥饿处理1 h。使用无血清RPMI 1640培养基配置Dil工作液,加入TNBC条件培养基与无血清RPMI 1640培养基1:1混合预处理24 h的THP-1细胞, $5 \times 10^4$ /孔,使Dil工作液终浓度为2 μg/mL。放置于37℃孵箱,孵育5 min,之后置于4℃冰箱15 min。800 r/min离心,5 min,去除上清液,用适量

PBS重悬,重复此步骤3次。用无血清RPMI 1640培养基重悬,加入六孔板中,每孔细胞悬液 500  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 移去培养基, PBS轻轻洗涤3遍, 去除未黏附细胞。倒置荧光显微镜下拍照, 计数每孔3个视野单核细胞黏附数量, 平均后即得到每个视野单核细胞黏附数。

**1.3.6 Transwell 实验** 单核细胞迁移实验使用 10  $\mu\text{m}$  孔径小室系统进行。在显微镜下进行计数,  $2 \times 10^4$ /孔, 均匀悬于无血清 RPMI 1640 培养基与条件培养基 1:1 混合培养液中, 然后加入上室, 每孔 200  $\mu\text{L}$ 。在下室加入有血清的 RPMI 1640 培养基 500  $\mu\text{L}$ , 与上室形成血清浓度梯度。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h 后, 在倒置显微镜下拍照, 计数每孔下室内3个视野的细胞数量, 取其平均值。

**1.3.7 巨噬细胞极化与破骨分化实验** 使用 PMA (0.1 mg/mL) 处理 THP-1 细胞 24 h, 诱导其分化为巨噬细胞 (M0 型)。此后在 TNBC 条件培养基与无血清 RPMI 1640 1:1 混合处理条件下, 加入 IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) 和 LPS (100 ng/mL) 孵育 48 h, 使其向 M1 型巨噬细胞极化; 加入 IL-4 (50 ng/mL) 和 IL-13 (50 ng/mL) 孵育 48 h, 使其向 M2 型巨噬细胞极化。使用 TNBC 条件培养基与 RPMI 1640 1:1 混合处理 THP-1 48 h, qRT-PCR 检测破骨相关分子的表达情况。

**1.3.8 外泌体提取与鉴定** TNBC 细胞分泌的外泌体采用超高速差速离心法提取。将细胞上清液在 4  $^{\circ}\text{C}$ , 300 g 离心 10 min, 2000 g 离心 20 min, 10 000 g 离心 30 min。每次离心后, 收集上清, 弃沉淀。最后的上清液用 0.2  $\mu\text{m}$  的孔过滤器过滤以去除大囊泡。收集的过滤液  $10 \times 10^4$  g 离心 70 min, 用无菌 PBS 重悬沉淀, 再次离心,  $10 \times 10^4$  g, 70 min。每次超高速离心后, 用移液管尽量去除多余的上清。离心结束后, 将外囊泡溶于 50~100  $\mu\text{L}$  无菌 PBS 中, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存 2 周, 以备后续实验使用。采用透射电子显微镜 (TEM) 分析外泌体形态。取出 10  $\mu\text{L}$  外泌体样品, 加入铜网沉淀 1 min, 然后用滤纸吸去浮液。将 10  $\mu\text{L}$  的醋酸二氧铀加入铜丝中沉淀 1 min, 用滤纸吸附浮液。10  $\mu\text{L}$  外泌体被吸附在碳膜支撑的铜丝上。外泌体用磷钨酸负染 2 min, PBS 洗涤并干燥。在室温下干燥几分钟, 在 100 kV 透射电镜下观察成像结果。采用纳米颗粒跟踪分析 (NTA) 来确定外泌体颗粒大小和数量。使用 Zeta 视图处理软件对数据进行处理。外泌体样品用 PBS 1:300 稀释, 然后上机测试。分析样品 60 s, 重复 5 次。得到待测样品的粒径和浓度, 根据稀释浓度计算出原样品浓度。

**1.3.9 外泌体摄取实验** 外泌体使用 Dil (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 染色, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。将标记的外泌体添加到 THP-1 细胞中, 共同孵育 24 h 后, 移去多余外泌体, 使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, DAPI 染色 5 min, 通过共聚焦显微镜观察 THP-1 细胞内的外泌体摄取情况。

**1.3.10 siRNA 转染实验** 待 THP-1 长至每个视野至少有 60% 的细胞时进行转染。按照试剂说明使用无血清培养基进行转染, 每次转染的 siRNA 浓度为 100 nmol/L。转染 4~6 h 后, 更换为含血清的完全培养基, 24~96 h 后收集细胞进行下一步实验。siRNA-NC 和 siRNA-MALAT1 序列见 (表 1)。

**1.3.11 生物信息学分析** 使用 Human Protein Atlas (HPA) 数据库 (<https://www.proteinatlas.org>) 中的 “Pathology” 模块, 可以用来分析蛋白质在不同肿瘤中的表达水平。Kaplan-Meier Plotter ([kmplot.com/analysis](http://kmplot.com/analysis)) 是一个基于 GEO, TCGA, EGA 数据的生存分析网站, 利用其中的 “Breast RNA-seq” 模块, 分析三阴性乳腺癌中基因表达与患者生存率之间的关系。在 Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) 数据库中, 利用 “Correlation Analysis” 模块, 分析肿瘤中两个基因表达之间的相关性。ENCORI (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 数据库和 RNAInter (<http://www.rnainter.org/>) 数据库可以用于研究 RNA 相互作用。在 ENCORI 中的 “miRNA-Target” 模块, 查找与 MALAT1 有相互作用的 miRNA。在 RNAInter 的 “Search” 模块, 查找与 MALAT1 有相互作用的 miRNA。使用 R 包在 7 个 RNA 靶向数据库 (DIANA, EIMMo, miRanda, miRDB, PicTar, PITA, TargetScan) 中进行筛选, 确定在 3 个及 3 个以上数据库中靶向调控 JAG1 的 miRNA 为候选目标。miRCancer (<http://mirccancer.ecu.edu/index.jsp>) 数据库一个肿瘤相关的 miRNA 数据库。该数据库通过收集和整理文献, 给出各种肿瘤相关的 miRNA 以及 miRNA 在肿瘤中的表达趋势。通过 “Search miRCancer” 模块筛选出在乳腺癌中低表达的 miRNA。将以上得到的 miRNA 取交集, 得到目标 miRNA。

#### 1.4 统计学处理

数据采用均数 $\pm$ 标准差表示。图形绘制和统计学分析采用 GraphPad Prism 6 软件。两组间均数比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。所有的实验都独立重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 Notch 经典膜配体 JAG1 为 TNBC 侵袭分子

首先对人类蛋白质表达谱数据库 (HPA) 中 JAG1 蛋白表达进行分析, 结果显示与正常组织相比, 乳腺癌组织中 JAG1 的蛋白表达显著升高 (图 1A)。随后, 在 Kaplan-Meier Plotter 数据库中, 观察 JAG1 mRNA 表达与 TNBC 患者总体生存率 (OS) 的关系, 结果显示, 高表达 JAG1 的 TNBC 患者 OS 低于低表达 JAG1 患者组 ( $P < 0.05$ , 图 1B), 这提示 JAG1 的高表达与 TNBC 的不良预后密切相关。qRT-PCR 和 Western blot 检测 MDA-MB-231 和 MDA-MB-231B 中的 JAG1 表达情况。结果

表1 引物信息

Tab.1 Sequences of the primers

| Gene         | Primer sequence 5'-3'  |
|--------------|--|
| GAPDH        | F: GATTTGGTCGTATTGGGCGC<br>R: TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC   |
| JAG1         | F: AACTGGTACCGGTGCGAA<br>R: TGATGCAAGATCTCCCTGAAAC   |
| ICAM-1       | F: TTCCTCACCGTGTACTGGAC<br>R: CGAGAAGGAGTCGTTGCCAT   |
| CCL2         | F: TCCCAAAGAAGCTGTGATCTTCA<br>R: TTTGCTTGTCAGGTGGTCC   |
| RANKL        | F: CAACATATCGTTGGATCACAGCA<br>R: GACAGACTCACTTTATGGGAACC   |
| PTHrP        | F: CATCAGCTACTGCATGACAAGG<br>R: GGTGGTTTTTGGTGTGGGAG   |
| TGF-β        | F: GGCCAGATCCTGTCCAAGC<br>R: GTGGGTTTCCACATTAGCAC  |
| OPG          | F: GCGCTCGTGTCTGGACA<br>R: AGTATAGACACTCGTCACTGGTG   |
| CD206        | F: AGCCAACACCAGCTCCTC<br>R: AACGCTCGCGCATTGTC  |
| MALAT1       | F: GTTCTGATCCCGCTGCTATT<br>R: TCCTCAACACTCAGCCTTTATC   |
| SNHG16       | F: GAAGCGAGCTGAGAGGCTTT<br>R: GGGGAAACCATGGCATTCTG   |
| siRNA-NC     | F: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT<br>R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT   |
| siRNA-MALAT1 | F: GGGCUUCUCUUAACAUUUATT<br>R: UAAAUGUUAAGAGAAGCCCTT   |
| miR-26a-5p   | F: GCGCTTCAAGTAATCCAGGA<br>R: GCAGGGTCCGAGTATTCG<br>RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCCTA                     |
| miR-124-3p   | F: TAAGGCACGCGGTGAATG<br>R: CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTGGA<br>RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTGGA |
| miR-140-5p   | F: CAGTGGTTTTACCTATGGTAG<br>R: TGGTGTCGTGGAGTCG<br>RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTACCA                      |
| miR-448      | F: GCAGGTTGCATATGTAGGA<br>R: CTCAACTGGTGTCTGGGA<br>RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATGGGA                      |
| miR-590-5p   | F: TGAAGACGTGATGGCACAC<br>R: CTTCCATTTTGGGGTTTTTGG<br>RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTGCAC                   |
| U6           | F: CTCGCTTCGCGCAGCACA<br>R: AACGCTTACGAATTTGCGT  |

F: Forward primer; R: Reverse primer; RT: Reverse transcription.

显示,侵袭性株MDA-MB-231B细胞中JAG1 mRNA和蛋白均显著升高( $P<0.01$ ,图1C、D)。裸鼠原位乳腺癌模型结果显示JAG1升高的侵袭性株MDA-MB-231B与MDA-MB-231细胞株相比:原位肿瘤的大小无显著性差异(图1E),但231B组肝脏转移结节数量增加,面积增大(图1F)。此外,免疫组化显示,JAG1升高的侵袭性株MDA-MB-231原位肿瘤中单核巨噬细胞标志物CD68表达显著增多(图1G)。

### 2.2 JAG1促进单核细胞黏附、迁移,影响单核细胞的分化

通过GEPIA数据库进一步证实乳腺癌中JAG1表达与单核细胞标志CD68表达之间的相关性,结果显示JAG1表达与CD68表达呈现显著正相关( $R=0.18$ ,

$P<0.05$ ,图2A)。进一步采用rhJAG1处理单核细胞,观察JAG1对单核细胞的影响。Western blotting检测显示rhJAG1处理单核细胞后单核细胞内Jagged1蛋白的表达显著增加(图2B)。黏附方面:与对照组相比,JAG1组单核细胞的黏附数量显著升高( $P<0.05$ ,图2C)。qRT-PCR也证实单核细胞内黏附分子ICAM-1的表达显著升高( $P<0.01$ ,图2D)。迁移方面:Transwell结果显示,JAG1组细胞迁移数量显著多于对照组( $P<0.05$ ,图2E)。qRT-PCR显示单核相关趋化因子CCL2 mRNA表达显著上调( $P<0.0001$ ,图2F)。破骨分化方面:qRT-PCR结果显示,rhJAG1处理后单核细胞内破骨促进因子RANKL( $P<0.01$ ),PTHrP( $P<0.05$ ),TGF-β( $P<0.05$ ) mRNA表达显著上升,破骨抑制因子OPG( $P<0.01$ )

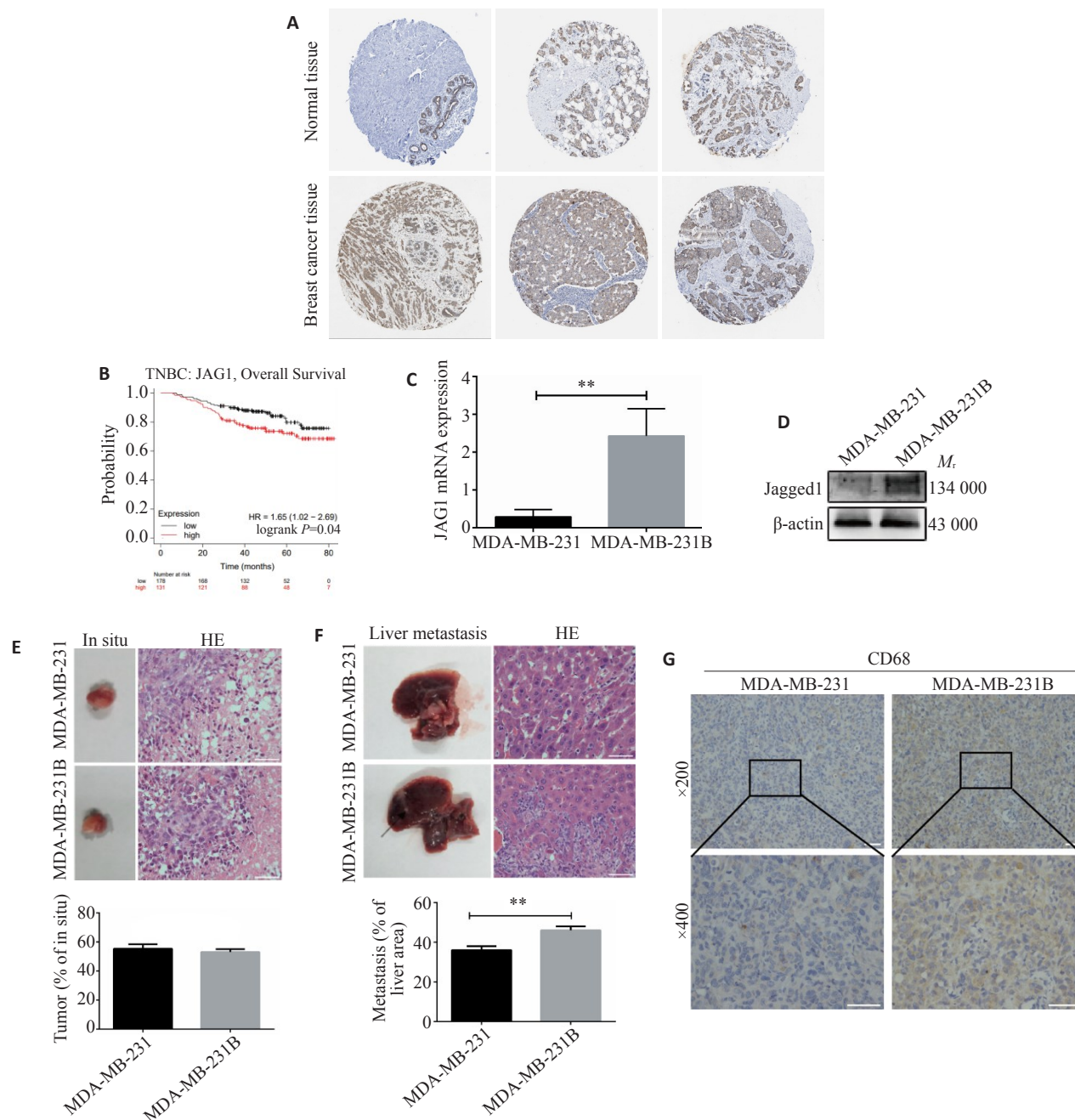


图1 侵袭性TNBC中JAG1表达增高

Fig.1 Triple-negative breast cancer (TNBC) with high expression of JAG1 show greater metastatic potential. A: Immunohistochemistry of JAG1 expression in normal and breast cancer tissues from HPA database. B: Analysis of TNBC patients' overall survival in relation to JAG1 expression. C: Expression of JAG1 in MDA-MB-231 and MDA-MB-231B cells detected by qRT-PCR. D: Expression of Jagged1 in MDA-MB-231 and MDA-MB-231B cells detected by Western blotting. E: HE staining of TNBC tumor in situ. F: HE staining for liver metastases of TNBC tumor. G: Immunohistochemistry of CD68 expression in TNBC tumor in situ. E, F, G: Scale bar=50  $\mu$ m. \*\* $P$ <0.01.

mRNA 表达则显著下降(图2G)。

### 2.3 JAG1 升高的 TNBC 条件培养基促进单核细胞黏附、迁移,影响单核细胞分化

采用 TNBC 条件培养基探讨 TNBC 中 JAG1 对 PMN 中单核细胞的影响。分别用 231-CM, 231-JAG1-CM, 231B-CM, 231-DAPT-CM 处理单核细胞后从 3 个方面进行检测。Western blotting 和 qRT-PCR 结果显示 DAPT 处理后 Notch 活化效应因子 NICD 表达减少

(图3A), Notch 活化靶基因 HEY1 表达减少( $P$ <0.01, 图3B)。黏附方面: 单核-内皮黏附实验和 qRT-PCR 结果显示, 231-JAG1-CM 组( $P$ <0.001)和 231B-CM 组( $P$ <0.01)单核细胞的黏附数量(图3C)和黏附分子 ICAM-1 表达( $P$ <0.05, 图3D)相比 231-CM 组显著增加, 231-DAPT-CM 组单核细胞的黏附数量相比 231-CM 组显著减少( $P$ <0.05, 图3C)。迁移方面: Transwell 实验和 qRT-PCR 结果显示, 231-JAG1-CM 组( $P$ <0.0001)和

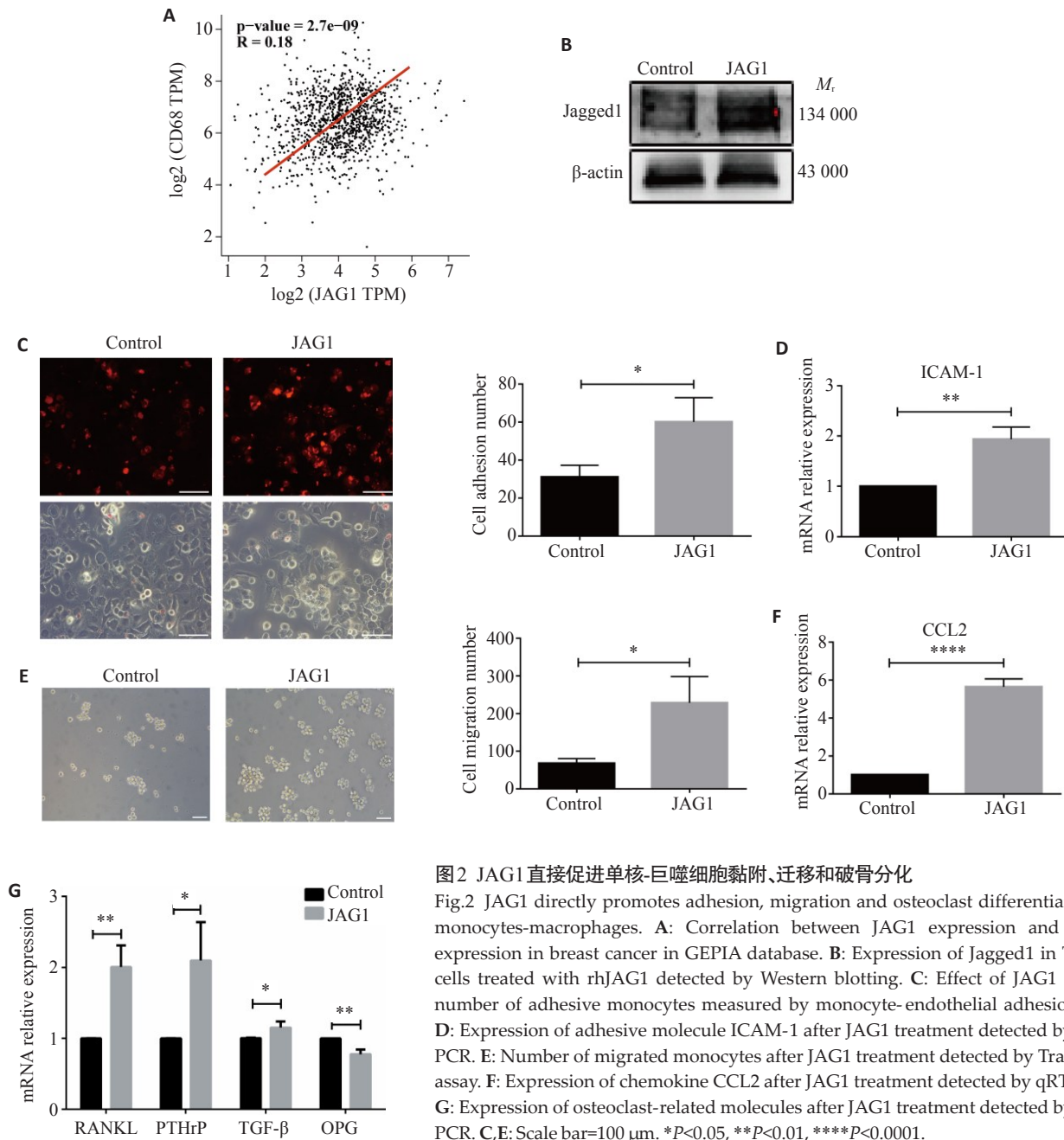


图2 JAG1 直接促进单核-巨噬细胞黏附、迁移和破骨分化

Fig.2 JAG1 directly promotes adhesion, migration and osteoclast differentiation of monocytes-macrophages. A: Correlation between JAG1 expression and CD68 expression in breast cancer in GEPIA database. B: Expression of Jagged1 in THP-1 cells treated with rhJAG1 detected by Western blotting. C: Effect of JAG1 on the number of adhesive monocytes measured by monocyte-endothelial adhesion test. D: Expression of adhesive molecule ICAM-1 after JAG1 treatment detected by qRT-PCR. E: Number of migrated monocytes after JAG1 treatment detected by Transwell assay. F: Expression of chemokine CCL2 after JAG1 treatment detected by qRT-PCR. G: Expression of osteoclast-related molecules after JAG1 treatment detected by qRT-PCR. C, E: Scale bar=100 μm. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

231B-CM组( $P < 0.001$ )能显著增加单核细胞迁移的数量(图3E)和趋化因子CCL2的表达( $P < 0.01$ ,图3F),231-DAPT-CM组单核细胞迁移数量相比231-CM组减少( $P < 0.05$ ,图3E)。破骨分化方面:qRT-PCR结果显示,231-JAG1-CM处理单核细胞后,破骨促进因子RANKL( $P < 0.001$ ),PTHrP( $P < 0.001$ ),TGF- $\beta$ ( $P < 0.05$ )mRNA表达显著增加(图3G)。231-JAG1-CM组中M2型巨噬细胞标志物CD206表达均显著上调( $P < 0.01$ ,图3H)。

2.4 JAG1 通过 TNBC 外泌体中 LncRNA MALAT1 靶向 miR-26a-5p 影响单核细胞中 JAG1 表达

首先检测 JAG1 对 TNBC 外泌体分泌的影响。透射电镜、NTA、Western blot 证实,与 231-Exosome 组相比,231-JAG1-Exosome 组外泌体数量显著增多

( $P < 0.01$ ,图4A~D),而231-DAPT-Exosome组外泌体数量显著减少( $P < 0.05$ ,图4A~D)。然而 Western blot 没有检测到外泌体中 JAG1 蛋白(图4E)。但 qRT-PCR 结果显示,231-JAG1-Exosome 组中靶向调控 JAG1 的 LncRNA MALAT1 显著上调( $P < 0.0001$ ,图4F)。摄取实验提示外泌体能被单核细胞所摄取(图4G)。

231-JAG1-CM 处理后单核细胞内 JAG1 mRNA 显著升高( $P < 0.0001$ ,图4H);进一步检测显示 231-JAG1-CM 处理后单核细胞内 LncRNA MALAT1 表达显著增高( $P < 0.01$ ,图4I);siMALAT1 处理后单核细胞 JAG1 表达下降( $P < 0.001$ ),同时 ICAM-1( $P < 0.05$ )、CCL2( $P < 0.05$ )、TGF- $\beta$ ( $P < 0.01$ )表达下降,OPG( $P < 0.01$ ) mRNA 表达水平显著升高(图4J、K)。

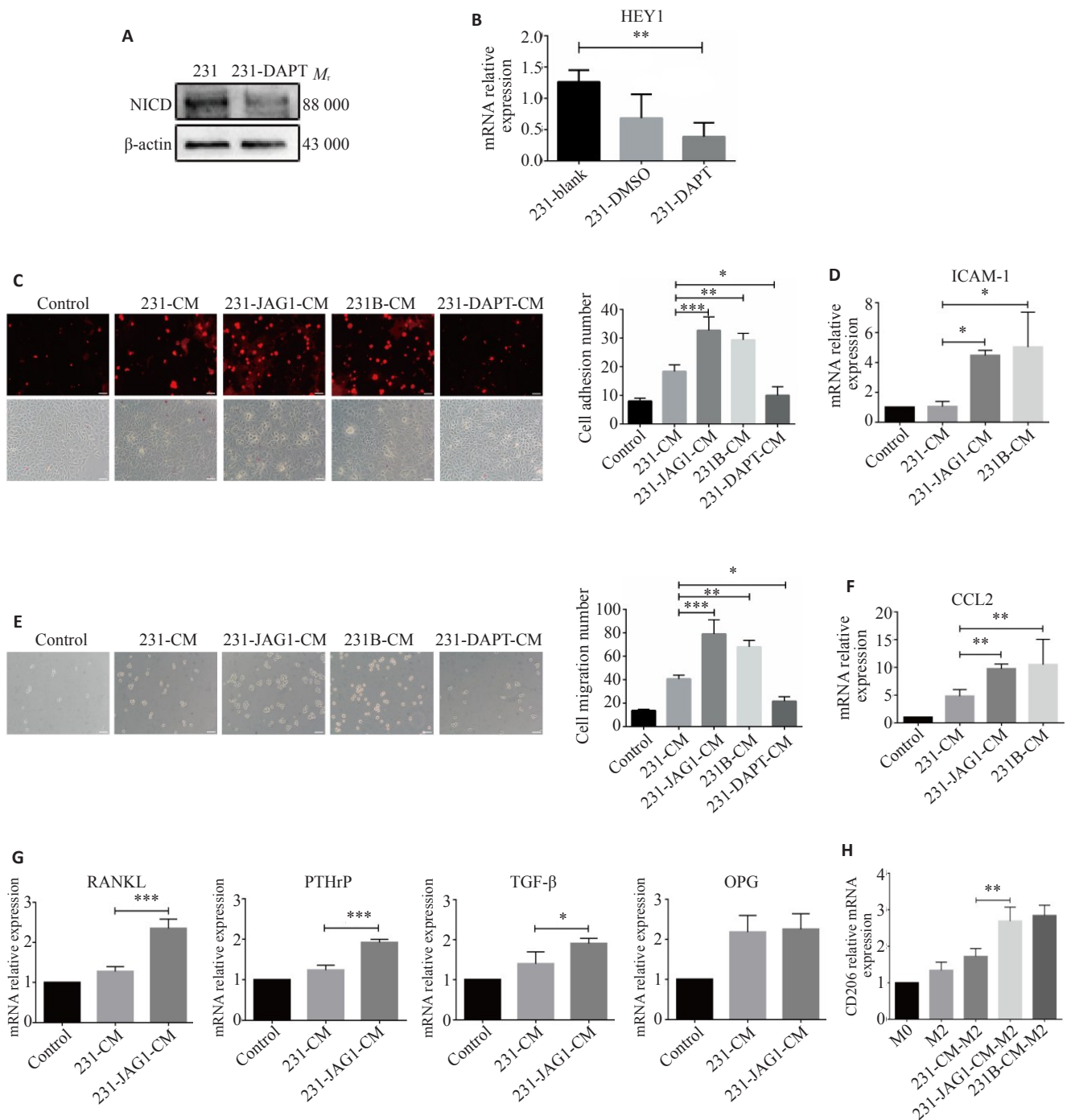


图3 JAG1升高的TNBC条件培养基促单核细胞黏附、迁移和破骨分化

Fig.3 Conditioned medium of TNBC with increased JAG1 promotes adhesion and migration of monocytes and affects differentiation of macrophages. A: Expression of NICD in MDA-MB-231 and MDA-MB-231-DAPT cells detected by Western blotting. B: Expression of HEY1 in MDA-MB-231 and MDA-MB-231-DAPT cells by qRT-PCR. C: Monocyte adhesion number after CM treatment measured by monocyte adhesion test. D: Expression of adhesive molecule ICAM-1 after CM treatment detected by qRT-PCR. E: Number of migrated of monocytes after CM treatment in Transwell assay. F: Expression of chemokine CCL2 after CM treatment detected by qRT-PCR. G: Expression of osteoclast-related molecules after CM treatment detected by qRT-PCR. H: Expression of M2 macrophage marker CD206 after CM treatment detected by qRT-PCR. C,E: Scale bar=100 μm. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.

进一步通过ENCORI数据库和RNAInter数据库共找到381个与MALAT1相互作用的miRNA;在miRcancer数据库中筛选出227个在乳腺癌中表达下调的miRNA;使用R语言在7个miRNA靶向数据库中筛选到在3个及以上数据库中存在的且靶向调控JAG1

的miRNA共55个。三者取交集,结果显示有5个候选miRNA,分别是miR-26a-5p,miR-124-3p,miR-140-5p,miR-448,miR-590-5p(图4L),但qRT-PCR显示siMALAT1处理单核细胞后仅miR-26a-5p表达显著增加(*P*<0.0001,图4M)。

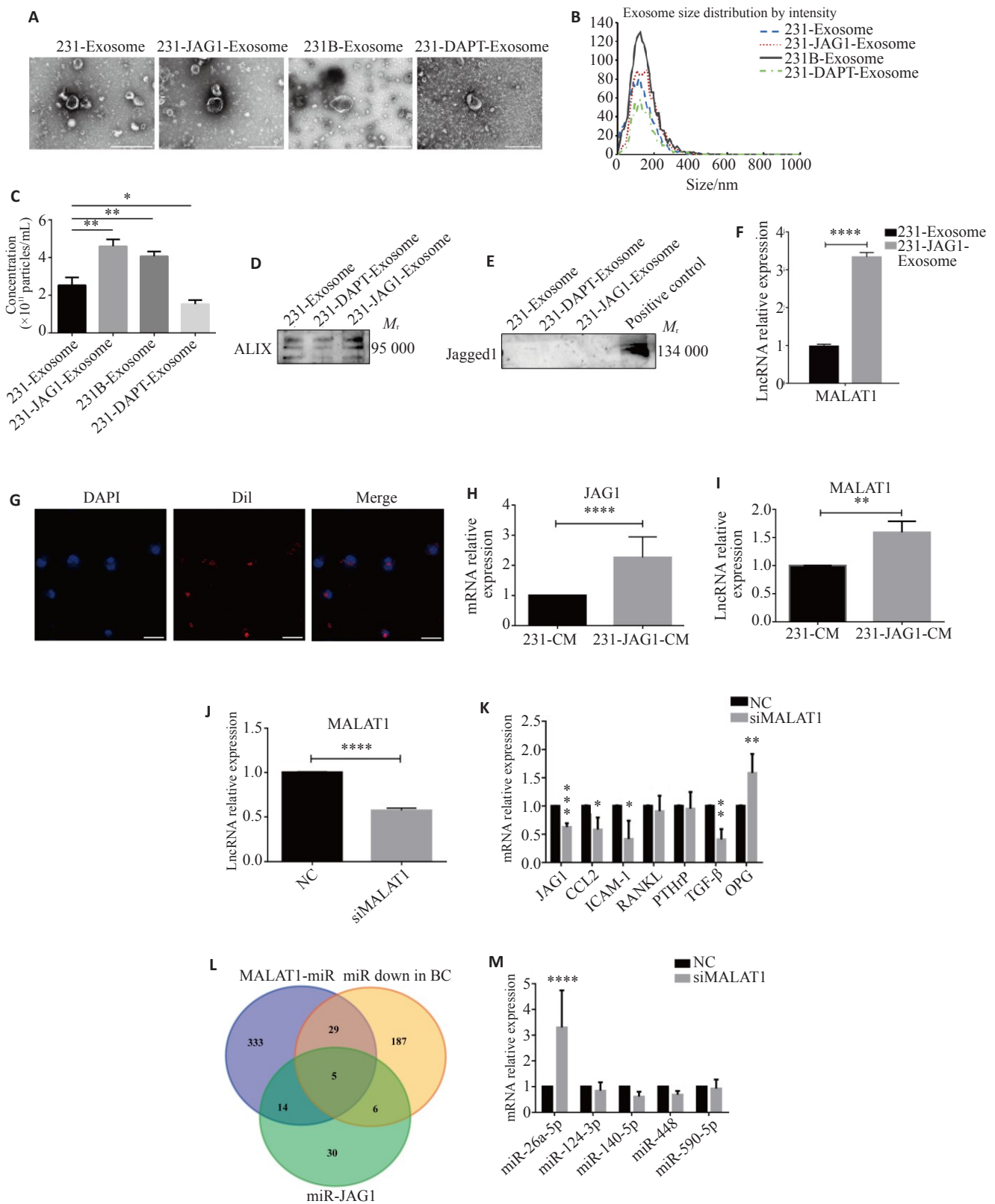


图4 JAG1通过TNBC外泌体中LncRNA MALAT1靶向miR-26a-5p影响单核细胞中JAG1表达

Fig.4 JAG1 affects the expression of JAG1 in monocytes by targeting miR-26a-5p through LncRNA MALAT1 in TNBC exosomes. **A**: Exosome morphology observed under TEM. **B**, **C**: Diameter and number of exosomes analyzed by NTA. **D**: ALIX protein expression in exosomes detected using Western Blot. **E**: JAG1 protein expression in exosomes detected using Western blotting. **F**: LncRNA MALAT1 expression in exosomes detected using qRT-PCR. **G**: Monocyte exosome uptake assay. **H**, **I**: Expression of JAG1 and MALAT1 in monocytes treated with CM detected by qRT-PCR. **J**: Verification of interference effect of MALAT1. **K**: Expression of JAG1, CCL2, ICAM-1, RANKL, PTHrP, TGF- $\beta$  and OPG after siMALAT1 transfection detected by qRT-PCR. **L**: Down-regulated miRNAs targeted by MALAT1 and JAG1 in breast cancer searched in RNA interaction databases. **M**: Expression of miRNAs in monocytes after siMALAT1 transfection detected by qRT-PCR. **A**: Scale bar=500 nm. **G**: Scale bar=50  $\mu$ m. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*\*P<0.0001.



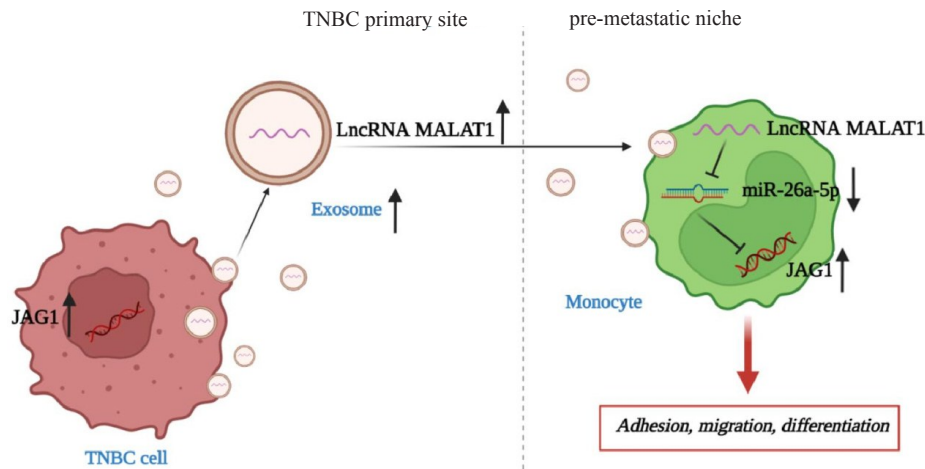


图5 JAG1 高表达的TNBC促进单核细胞黏附、迁移和巨噬细胞分化的假想机制示意图模型

Fig.5 Schematic model of the hypothesized mechanism by which TNBC with high expression of JAG1 promotes monocyte adhesion, migration, and macrophage differentiation.

### 3 讨论

TNBC 占乳腺癌的 10%~20%，其特征为雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及人表皮生长因子受体 2(HER-2)均阴性，缺乏治疗靶点和伴随多器官转移是其预后差的主要原因<sup>[1,26]</sup>。PMN 形成是乳腺癌等肿瘤远处转移的关键，其包括巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞等细胞以及多种可溶性分子；外泌体直径为 40~160 nm，被证实可以在细胞间转移大量的核酸和蛋白质从而介导细胞间的通讯，在 PMN 的形成中发挥重要作用<sup>[27]</sup>，其建立支持性和接受性的肿瘤微环境，促进肿瘤细胞定植和转移<sup>[28]</sup>。另一方面，Notch 信号的激活是包括乳腺癌在内的多种肿瘤的特点，其与肿瘤的生长、迁移和侵袭密切相关，是潜在的治疗靶点<sup>[29]</sup>。然而 Notch 信号具有明显的异质性，需要进一步探讨其在不同肿瘤亚型中的作用和机制。有研究者提出 JAG1 能促进 TNBC 的远处转移<sup>[30,31]</sup>，其还能通过直接接触调控肿瘤微环境中的血管内皮细胞、巨噬细胞、Treg 细胞等<sup>[32-34]</sup>，但 JAG1 与 PMN 是否有关尚未见报导。本研究中，我们拟在明确 JAG1 为 TNBC 侵袭分子的基础上，进一步研究 JAG1 升高的 TNBC 对 PMN 中单核-巨噬细胞的影响及其可能机制。

我们对公共数据库资料分析结果，一方面证实乳腺癌中 JAG1 表达高于癌旁组织，同时还证实 JAG1 mRNA 高表达水平与 TNBC 的不良预后相关，我们动物体内实验证实 JAG1 表达更高的侵袭株 MDA-MB-231B，更容易发生远处转移，这与 Yoneda 等<sup>[35]</sup>的结果一致，结合国内外相关研究<sup>[36-38]</sup>，我们认为 JAG1 为 TNBC 较为确定的侵袭分子；那么 JAG1 对单核巨噬细胞有什么影响呢？我们首先采用 rhJAG1 处理相关细胞，通过单核-内皮黏附实验和 Transwell 等实验了解 JAG1 对单

核细胞黏附和迁移的作用，研究结果显示 JAG1 可招募单核细胞，并影响单核细胞的分化；我们还发现 JAG1 能促进巨噬细胞向破骨分化，这与 Ashley 等<sup>[39]</sup>的研究结果一致，支持 JAG1 可通过招募肿瘤微环境中单核细胞，影响其分化，促进肿瘤发生发展观点<sup>[40]</sup>。那么膜配体 JAG1 是否会影响 PMN 中的单核-巨噬细胞呢？我们使用 TNBC 条件培养基处理单核-巨噬细胞，结果显示：JAG1 升高的 MDA-MB-231-CM 可以影响 PMN 中单核细胞的黏附、迁移和分化。由于外泌体已经被公认为是肿瘤细胞远处转移主要媒介，那么 JAG1 升高的 MDA-MB-231-CM 是否是通过外泌体影响 PMN 中的单核-巨噬细胞呢？我们首先通过透射电镜、NTA、Western blot 等多种方式证实 JAG1 的确能促进 MDA-MB-231 外泌体的分泌，这与 Lin 等<sup>[41]</sup>认为 Notch 信号能促进外泌体分泌的结论相符合；我们首先考虑高表达 JAG1 的 TNBC 通过外泌体包裹 JAG1 相关分子影响 PMN 中的单核细胞，然而我们在 MDA-MB-231 和 JAG1 升高的 MDA-MB-231 外泌体中没有检测到 JAG1 蛋白的表达；但是在 JAG1 升高的 MDA-MB-231 外泌体中检测到靶向调控 JAG1 的 LncRNA MALAT1 显著上调，因此，我们猜测高表达 JAG1 的 TNBC 是通过外泌体核酸形式影响 PMN 中单核细胞 JAG1 表达。为了证实这一猜想，我们进一步证实 231-JAG1-CM 处理后单核细胞内 JAG1 mRNA 显著升高，同时 LncRNA MALAT1 表达也显著增高，而 siMALAT1 处理后单核细胞 JAG1 表达下降，这一实验结果支持我们关于高表达 JAG1 的 TNBC 通过外泌体中 LncRNA 上调靶细胞单核细胞中 JAG1 表达的猜想。由于 LncRNA 主要通过 miRNA 影响基因调控，因此，我们进一步通过生信分析筛选出能与 LncMALAT1 相互作用、在乳腺癌中表达下调，同时

靶向JAG1的5个miRNA,最后通过qRT-PCR等实验证实LncMALAT1可能通过miR-26a-5p调控单核细胞中JAG1基因表达,进而影响单核细胞黏附、迁移和分化。

综上所述,本研究在证实文献中报道的高表达JAG1的TNBC可能通过直接影响肿瘤微环境中单核细胞数量和分化等影响肿瘤侵袭性的基础上,进一步探讨高表达JAG1的TNBC是否通过外泌体影响PMN的单核细胞及其可能的机制。我们研究结果提示JAG1升高的MDA-MB-231细胞可以通过外泌体中LncRNA MALAT1,调控PMN中单核细胞中的miR-26a-5p,使单核-巨噬细胞的JAG1表达升高,从而影响单核细胞的黏附、迁移和分化,进而重塑PMN达到远处转移的目的。这一结果进一步丰富了JAG1促进TNBC转移的可能机制,为TNBC诊疗提供了新思路 and 靶点。但因各种原因,本研究仅使用了重组蛋白JAG1和DAPT进行相关研究,且LncMALAT1/miR-26a-5p/JAG1的调控轴尚需要更多的实验加以证实,我们将在后继研究加以完善,并探讨相关外泌体核酸是否有早期诊断TNBC远处转移的价值。

#### 参考文献:

- [1] Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(11): 674-90.
- [2] Shi-Ping, Luo, MD, et al. Validation of the prognostic significance of the prognostic stage group according to the eighth edition of American cancer joint committee on cancer staging system in triple-negative breast cancer: an analysis from surveillance, epidemiology, and end results 18 database[J]. *J Surg Res*, 2020, 247: 211-9.
- [3] Prat A, Lluch A, Albanell J, et al. Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(8): 1532-41.
- [4] Spring LM, Fell G, Arfe A, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy and impact on breast cancer recurrence and survival: a comprehensive meta-analysis[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(12): 2838-48.
- [5] Jhan JR, Andrechek ER. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy[J]. *Pharmacogenomics*, 2017, 18(17): 1595-609.
- [6] Takai TK, Le AN, Weaver VM, et al. Targeting the cancer-associated fibroblasts as a treatment in triple-negative breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82889-901.
- [7] Afghahi A, Timms KM, Vinayak S, et al. Tumor BRCA1 reversion mutation arising during neoadjuvant platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer is associated with therapy resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(13): 3365-70.
- [8] Savas P, Loi S. Metastatic breast cancer: TIL it is too late[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(3): 526-8.
- [9] Schmid P, Rugo HS, Adams S, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(1): 44-59.
- [10] Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial [J]. *Lancet*, 2020, 396(10265): 1817-28.
- [11] Yang, Liu. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(5): 668-81.
- [12] Peinado H, Zhang HY, Matei IR, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(5): 302-17.
- [13] Fremder E, Munster M, Aharon A, et al. Tumor-derived micro-particles induce bone marrow-derived cell mobilization and tumor homing: a process regulated by osteopontin [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(2): 270-81.
- [14] Pasquier J, Thawadi HA, Ghiabi P, et al. Microparticles mediated cross-talk between tumoral and endothelial cells promote the constitution of a pro-metastatic vascular niche through Arf6 up regulation[J]. *Cancer Microenviron*, 2014, 7(1/2): 41-59.
- [15] Liu YF, Gu Y, Cao XT. The exosomes in tumor immunity [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(9): e1027472.
- [16] Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 816-26.
- [17] Meurette O. Shaping of the tumor microenvironment by Notch signaling [M]//*Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2020: 1-16.
- [18] Tu JJ, Guo YW, Hong WM, et al. The regulatory effects of paeoniflorin and its derivative paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate CP-25 on inflammation and immune diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 57.
- [19] Sales-Dias J, Silva G, Lamy M, et al. The Notch ligand DLL1 exerts carcinogenic features in human breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0217002.
- [20] Zhang Y, Xie zi-yan, Guo xuan-tong, et al. Notch and breast cancer metastasis: current knowledge, new sights and targeted therapy (Review)[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3): 2743-55.
- [21] Xiao Y, Ma D, Yang YS, et al. Comprehensive metabolomics expands precision medicine for triple-negative breast cancer[J]. *Cell Res*, 2022, 32(5): 477-90.
- [11] Kontomanolis EN, Kalagasidou S, Pouliliou S, et al. The Notch pathway in breast cancer progression[J]. *Sci World J*, 2018, 2018: 1-11.
- [23] Han GH, Bai XD, Jiang HC, et al. microRNA-598 inhibits the growth of triple negative breast cancer cells by targeting JAG1 [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 235.
- [24] Strati TM, Kotoula V, Kostopoulos I, et al. Prognostic subcellular Notch2, Notch3 and Jagged1 localization patterns in early triple-negative breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(5): 2334.
- [25] Geng Y, Fan J, Chen L, et al. A Notch-dependent inflammatory feedback circuit between macrophages and cancer cells regulates pancreatic cancer metastasis[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(1): 64-76.
- [26] Neophytou C, Boutsikos P, Papageorgis P. Molecular mechanisms

- and emerging therapeutic targets of triple-negative breast cancer metastasis[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 31.
- [27] Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling[J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 47.
- [28] Yang XY, Zhang Y, Zhang YG, et al. The key role of exosomes on the pre-metastatic niche formation in tumors [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 703640.
- [29] Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. The varied roles of Notch in cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12: 245-75.
- [30] Jingjing, Meng. Tumor-derived Jagged1 promotes cancer progression through immune evasion[J]. *Cell Rep*, 2022, 38(10): 110492.
- [31] Zhu Q, Li YS, Dong XM, et al. Linc-OIP5 loss regulates migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells by inhibiting YAP1/JAG1 signaling[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 103-12.
- [32] Bridges E, Oon CE, Harris A. Notch regulation of tumor angiogenesis [J]. *Future Oncol*, 2011, 7(4): 569-88.
- [33] Liu H, Wang JX, Zhang MH, et al. Jagged1 promotes aromatase inhibitor resistance by modulating tumor-associated macrophage differentiation in breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 166(1): 95-107.
- [34] Cahill EF, Tobin LM, Carty F, et al. Jagged-1 is required for the expansion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells by murine mesenchymal stromal cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 19.
- [35] Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, et al. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone *in vivo* and *in vitro*[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(8): 1486-95.
- [36] Qiao XJ, Ma BH, Sun WT, et al. JAG1 is associated with the prognosis and metastasis in breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 21986.
- [37] Zohny SF, Zamzami MA, Al-Malki AL, et al. Highly expressed DLL4 and JAG1: their role in incidence of breast cancer metastasis [J]. *Arch Med Res*, 2020, 51(2): 145-52.
- [38] Sethi N. Tumor-derived Jagged1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging Notch signaling in bone cells [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(2): 192-205.
- [39] Ashley JW, Ahn J, Hankenson KD. Notch signaling promotes osteoclast maturation and resorptive activity [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(11): 2598-609.
- [40] Tao SF, Chen Q, Lin C, et al. Linc00514 promotes breast cancer metastasis and M2 polarization of tumor-associated macrophages *via* Jagged1-mediated Notch signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 191.
- [41] Lin QS, Chen XS, Meng FZ, et al. ASPH-notch axis guided exosomal delivery of prometastatic secretome renders breast cancer multi-organ metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):156.

(编辑:余诗诗)