

乳腺癌来源细胞外泌体通过miR-374a-5p/ARRDC3轴促进肿瘤免疫逃逸

夏如意* 石元朝 郑晓璐

(首都医科大学附属北京友谊医院, 肿瘤科, 北京 102209)

摘要 该研究旨在探究乳腺癌(BC)来源外泌体(Exo)通过miR-374a-5p靶向抑制蛋白结构域蛋白3(ARRDC3)的分子机制,及其在促进肿瘤免疫逃逸中的作用,为乳腺癌免疫治疗提供新靶点。研究采用qRT-PCR检测乳腺癌细胞中miR-374a-5p和ARRDC3的表达水平。提取MDA-MB-231细胞的外泌体,并将其与MDA-MB-231细胞共培养48 h。将MDA-MB-231细胞分为6组:Con组、Exo-NC组、NC inhibitor组、miR-374a-5p inhibitor组、miR-374a-5p inhibitor+sh-NC组和miR-374a-5p inhibitor+sh-ARRDC3组。通过平板克隆、划痕实验和Transwell实验分别检测细胞增殖、迁移和侵袭能力。与CD8⁺T细胞共培养,检测CD8⁺T细胞凋亡水平及对癌细胞的杀伤率。ELISA法检测细胞上清中细胞因子水平,qRT-PCR和蛋白免疫印迹法检测PD-L1表达情况。结果显示,与正常乳腺上皮细胞MCF-10A相比,在MDA-MB-231、Hs578T、MDA-MB-468和MDA-MB-453等乳腺癌细胞中,miR-374a-5p表达显著上调,ARRDC3表达显著下调($P<0.05$)。GEPIA数据库分析显示,ARRDC3在乳腺癌组织中表达水平显著降低($P<0.05$)。与Con组相比,Exo-NC组和NC inhibitor组的miR-374a-5p表达量、平板克隆数、穿膜细胞数显著增加,划痕修复率、CD8⁺T细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),TNF- α 、IFN- γ 、IL-4水平,CD8⁺T细胞的杀伤率以及ARRDC3表达水平显著降低($P<0.05$);与Exo-NC组和NC inhibitor组相比,miR-374a-5p inhibitor组miR-374a-5p表达量、平板克隆数、穿膜细胞数显著减少,划痕修复率、CD8⁺T细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),TNF- α 、IFN- γ 、IL-4水平,CD8⁺T细胞的杀伤率以及ARRDC3表达水平显著升高($P<0.05$);与miR-374a-5p inhibitor+sh-NC组相比,miR-374a-5p inhibitor+sh-ARRDC3组的ARRDC3表达下调,TNF- α 、IFN- γ 、IL-4水平以及CD8⁺T细胞的杀伤率显著降低($P<0.05$),平板克隆数、穿膜细胞数显著增加,划痕修复率、CD8⁺T细胞凋亡率和PD-L1表达水平显著升高($P<0.05$)。综上所述,乳腺癌细胞来源的外泌体可通过miR-374a-5p/ARRDC3轴上调PD-L1表达,抑制肿瘤微环境中CD8⁺T细胞的活性,进而促进癌细胞的免疫逃逸。

关键词 外泌体; miR-374a-5p; ARRDC3; CD8⁺T细胞; PD-L1

Breast Cancer-Derived Exosomes Promote Tumor Immune Escape Through the miR-374a-5p/ARRDC3 Axis

XIA Ruyi*, SHI Yuanchao, ZHENG Xiaolu

(Oncology Department, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 102209, China)

收稿日期: 2025-12-21 接受日期: 2026-04-21

北京市科技计划(批准号: Z220100000146236)资助的课题

*通信作者。Tel: 010-81609320, E-mail: Xry820709@163.com

Received: December 21, 2025 Accepted: April 21, 2026

This work was supported by the Beijing Science and Technology Project (Grant No.Z220100000146236)

*Corresponding author. Tel: +86-10-81609320, E-mail: Xry820709@163.com

Abstract This study aimed to investigate the molecular mechanism by which breast cancer-derived exosomes promote tumor immune escape through the miR-374a-5p/ARRDC3 axis, and to explore its potential as a novel target for breast cancer immunotherapy. In the study, qRT-PCR (quantitative real-time PCR) was used to detect the expression levels of miR-374a-5p and *ARRDC3* in breast cancer cells. Exosomes were isolated from MDA-MB-231 cells and co-cultured with recipient MDA-MB-231 cells for 48 h. MDA-MB-231 cells were divided into six groups: control group, exosome-negative control (Exo-NC) group, negative control inhibitor (NC inhibitor) group, miR-374a-5p inhibitor group, miR-374a-5p inhibitor+shRNA negative control (sh-NC) group, and miR-374a-5p inhibitor+sh-ARRDC3 group. Cell proliferation, migration, and invasion were evaluated by colony formation, wound healing, and Transwell assays, respectively. Co-culture with CD8⁺ T cell was performed to assess CD8⁺ T cell apoptosis and cytotoxic activity against tumor cells. Cytokine levels in the supernatant were determined by ELISA, and PD-L1 expression was detected by qRT-PCR and Western blot. Compared with the normal mammary epithelial cell line MCF-10A, miR-374a-5p expression was significantly upregulated, while *ARRDC3* expression was downregulated in breast cancer cell lines (MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-468, and MDA-MB-453) ($P<0.05$). Analysis of the GEPIA database also revealed significantly reduced *ARRDC3* expression in breast cancer tissues ($P<0.05$). Compared with the Con group, the expression of miR-374a-5p, the number of plate clones, the scratch repair rate, the number of penetrating cells, and the apoptosis rate of CD8⁺ T cells in the Exo-NC group and the NC inhibitor group were significantly increased ($P<0.05$), and the levels of TNF- α , IFN- γ and IL-4, and the expression level of *ARRDC3* were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with Con group, the expression of miR-374a-5p, the number of plate clones, the rate of scratch repair, the number of transmembrane cells and the apoptosis rate of CD8⁺ T cells in Exo-NC group and NC inhibitor group were significantly increased ($P<0.05$), and the levels of TNF- α , IFN- γ and IL-4, the killing rate of CD8⁺ T cells and the expression level of *ARRDC3* were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with Exo-NC group and NC inhibitor group, miR-374a-5p expression, plate clone number, scratch repair rate, transmembrane cell number and CD8⁺ T cell apoptosis rate in miR-374a-5p inhibitor group were significantly decreased ($P<0.05$), and TNF- α , IFN- γ and IL-4 levels, CD8⁺ T cell killing rate and *ARRDC3* expression level were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the miR-374a-5p inhibitor+sh-NC group, the expression level of *ARRDC3*, the levels of TNF- α , IFN- γ and IL-4, and the killing rate of CD8⁺ T cells in the miR-374a-5p inhibitor+sh-ARRDC3 group were significantly decreased ($P<0.05$), and the plate clone number, scratch repair rate, transmembrane cell number, CD8⁺ T cell apoptosis rate and PD-L1 expression level were significantly increased ($P<0.05$). In summary, BC-derived Exo can up-regulate the expression of PD-L1 through the miR-374a-5p/ARRDC3 axis, inhibit the activity of CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment, and promote the immune escape of cancer cells.

Keywords exosomes; miR-374a-5p; ARRDC3; CD8⁺ T cell; PD-L1

乳腺癌 (breast cancer, BC) 是一种异质性疾病, 存在不同亚型。其中, 在乳腺癌病例里, 三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 占比达 15%~20%, 其侵袭性高、转移能力强、复发率高, 且预后较差^[1]。研究表明, 肿瘤治疗失败主要源于 TNBC 广泛的瘤内异质性及其特有的免疫抑制性肿瘤微环境^[2]。肿瘤生长与免疫逃逸过程高度依赖肿瘤细胞与肿瘤微环境内各类细胞间的信号交流。细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 已被证实是局

部和远处肿瘤环境中细胞间通信的介导载体^[3]。外泌体 (exosome, Exo) 是所有细胞分泌的微小细胞外囊泡中的一个亚群, 其携带脂质、蛋白质和非编码 RNA 等多种物质, 广泛存在于各类体液中。尤其是肿瘤衍生的外泌体, 在肿瘤组织中大量生成并释放, 作为重要的信号转导分子和细胞间信使, 参与肿瘤微环境的通信调控。癌细胞可利用外泌体促进肿瘤的生长、侵袭和扩散, 并借此逃避免疫系统的识别与清除^[4]。miRNA (microRNA) 是一组小非编码 RNA

分子,可通过切断 mRNA 或抑制翻译过程来抑制基因表达^[5]。研究显示,癌细胞来源的外泌体通过转移 miRNA 参与癌间质串扰,进而诱导致癌表型、介导免疫逃逸和化疗耐药^[6]。miR-374a-5p 被鉴定为 TNBC 特异性 miRNA,在 TNBC 中特异性上调,抑制 miR-374a-5p 可减弱癌细胞的生长和迁移能力^[7]。抑制蛋白结构域蛋白 3 (arrestin-domain containing protein 3, ARRDC3) 是一种新兴的高转移性乳腺癌肿瘤抑制因子,ARRDC3 表达缺失与乳腺癌转移增加、肿瘤复发及预后不良相关^[8]。然而,目前尚不明确 miR-374a-5p 是否能够靶向作用于 ARRDC3 进而影响乳腺癌免疫逃逸。本研究聚焦于探究肿瘤细胞来源的外泌体中 miR-374a-5p 对乳腺癌细胞增殖及免疫逃逸的影响,并深入阐明其内在作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 细胞与主要试剂 人正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A、乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、Hs578T、MDA-MB-468、MDA-MB-453) 购自美国 ATCC; RPMI 1640 (货号分别为 11875093)、胎牛血清 (货号分别为 A5256701) 购自美国 Gibco 公司; HSP70 抗体、CD81 抗体、CD63 抗体、PD-L1 抗体和 GAPDH 抗体 (货号分别为 ab5439、ab79559、ab134045、ab205921、ab181602) 购自美国 Abcam 公司; PKH67 标记试剂盒和 Ficoll 试剂盒 (货号分别为 MINI67-1KT、341691) 购自美国 Sigma 公司; miR-374a-5p inhibitor、sh-ARRDC3、miR-374a-5p mimic 及其阴性对照由美国 Invitrogen 公司设计合成; Lipofectamine 3000 (货

号为 L3000150)、TRIzol 试剂 (货号为 15596026CN) 和总外泌体分离试剂 (货号为 4478359) 购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒、双荧光素酶活性检测试剂盒 (货号分别为 A5002、E2920) 购自美国 Promega 公司; UltraSYBR 和 miRNA qRT-PCR 试剂盒 (货号分别为 C11096-1、C10712-1) 购自苏州瑞博生物技术股份有限公司; 膜相关蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI) 凋亡试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 试剂盒 (货号分别为 C1383M、PT518、PI511、PI618) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 野生型 WT-ARRDC3、突变型 MUT-ARRDC3 报告载体由南京建成生物有限公司设计并合成。

1.1.2 仪器 透射电子显微镜 (型号: Talos L120C)、酶标仪 (型号: Varioskan LUX) 购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; 荧光共聚焦显微镜 (型号: AX R MP)、倒置相差显微镜 (型号: Eclipse Ti2-E) 购自日本 Nikon 公司; 流式细胞仪 (型号: CytoFLEX) 购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 qRT-PCR

参照试剂说明书,采用 TRIzol 试剂提取总 RNA。mRNA 经反转录试剂盒逆转录后,使用 UltraSYBR 混合液行 qRT-PCR 检测; miRNA 采用专用 miRNA qRT-PCR 试剂盒同步完成反转录与定量扩增。实验以 GAPDH 为 mRNA 内参、U6 为 miRNA 内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
miR-374a-5p	F: GCG CTT ATA ATA CAA CCT GA R: AGA GCA GGG TCC GAG GT
ARRDC3	F: ACA TGC GAA AGT ACG CTG GA R: GGT GTC TGT GGA AGC TCG AA
PD-L1	F: CCT ACT GGC ATT TGC TGA ACG CAT R: CAA TAG ACA ATT AGT GCA GCC AGG TC
U6	F: CAG CAC ATA TAC TAA AAT GGA ACG R: ACG AAT TTG CGT GTC ATC C
GAPDH	F: TGT GGG CAT CAA TGG ATT TGG R: ACA CCA TGT ATT CCG GGT CAA T

1.3 生信分析

利用 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) 检测乳腺癌中的 *ARRDC3* 表达情况。

1.4 外泌体的提取、鉴定

MDA-MB-231 细胞在正常培养基中培养, 待融合度达 80% 后, 更换为去外泌体培养基 (含 10% 去外泌体胎牛血清的 RPMI 1640)。培养 2 d 后, 收集各培养皿中的条件培养基 (约 15 mL), 采用差速离心、超滤浓缩联合试剂盒纯化法分离外泌体。具体步骤如下: 条件培养基依次经 4 °C、1 000 ×g 离心 10 min, 4 °C、2 000 ×g 离心 10 min, 4 °C、18 000 ×g 离心 30 min, 逐级去除细胞碎片及大细胞外囊泡。随后, 利用超滤管浓缩上清至 <3 mL (4 000 ×g、4 °C、15 min), 分离外泌体与可溶性成分。后续严格按照外泌体提取试剂盒说明书完成外泌体纯化, 再将纯化产物置于 -80 °C 保存备用。取 10 μL 该外泌体样本, 运用透射电子显微镜对其形态展开观察, 同时采用动态光散射技术检测外泌体的直径大小。

1.5 蛋白免疫印迹法

在预冷的细胞裂解缓冲液中裂解细胞 20~30 min。13 000 r/min、4 °C 离心 10 min 后, 收集上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。等量的蛋白质样品与样品缓冲液混合, 煮沸 5 min。样品在 120 V 下通过 SDS-PAGE 电泳分离, 然后用半干转移法将其转移到硝化纤维素膜上。用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭膜 1 h, 然后在 4 °C 孵育过夜, 一抗: HSP70、CD81、CD63、PD-L1, 稀释比例均为 1:1 200。用 PBS 洗涤膜 3 次, 每次 5 min, 在室温条件下用二抗 (稀释比例均 1:2 000) 孵育 1 h。用 ECL 底物试剂电化学发光系统显示蛋白条带, 以 GAPDH 为内参, 检测蛋白的相对表达水平。

1.6 外泌体的摄取

取已分离的外泌体, 向其中加入 100 μL PKH67 染色工作液, 轻柔颠倒使其充分混匀, 随后将其置于 4 °C 环境中孵育 30 min。孵育结束后, 将样品加入洗涤液 (含 0.1% BSA 的 PBS 或外泌体稀释液), 于 120 000 ×g、4 °C 超速离心 90 min 进行洗涤, 并将其重悬。把 MDA-MB-231 细胞按照每孔 1×10^5 个的密度接种到 6 孔板中。设置实验组 and 对照组, 实验组加入经 PKH67 标记的外泌体来处理细胞, 对照组则加入等体积的 PBS 缓冲液。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后采用 DAPI 对细胞核进行染色, 利用荧光共聚焦显

微镜观察并记录 MDA-MB-231 细胞对外泌体的摄取状况。

1.7 细胞分组及处理

将 MDA-MB-231 细胞分为 6 组: Con 组, 常规培养; Exo-NC 组, 在培养液中添加 10 mg/L MDA-MB-231 来源的外泌体处理 24 h; NC inhibitor 组, 先经相同外泌体处理 24 h 后转染 NC inhibitor; miR-374a-5p inhibitor 组, 经外泌体处理 24 h 后转染 miR-374a-5p inhibitor; miR-374a-5p inhibitor+sh-NC 组, 经外泌体处理 24 h 后共转染 miR-374a-5p inhibitor 与 sh-NC; miR-374a-5p inhibitor+sh-ARRDC3 组, 经外泌体处理 24 h 后共转染 miR-374a-5p inhibitor 与 sh-ARRDC3。采用 Lipofectamine 3000 试剂进行转染, 48 h 后进行后续实验分析。

1.8 平板克隆实验

将细胞按每孔 5×10^2 个的密度接种于 6 孔板中, 于 37 °C 条件下孵育 14 d。随后, 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。弃去 PBS 后, 加入适量结晶紫染色液, 在室温避光条件下染色 30 min。染色完成后, 用流水轻轻冲洗细胞表面, 直至背景变为无色, 晾干后在显微镜下计数并拍照记录克隆形成情况。

1.9 细胞划痕实验

将细胞按每孔 5×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 待其形成均匀单层且细胞融合度达到约 85% 时, 使用 200 μL 规格的移液器吸头尖端在细胞层表面垂直划出直线型缺口。分别于划痕操作后即刻 (0 h) 及培养 24 h 后, 使用倒置相差显微镜在相同放大倍数下对划痕区域进行定位观察并拍摄记录。划痕修复率 (%) 通过以下公式计算: $SR = [(W_{\text{初始}} - W_{24\text{h}}) / W_{\text{初始}}] \times 100\%$ 。其中 SR 代表划痕修复率, W 代表划痕宽度。

1.10 Transwell 实验

将 60 μL 稀释后的基质胶 (matrigel) 均匀涂布于 Transwell 小室顶膜表面, 置于 37 °C 培养箱中固化。转染处理后, 收集各组 COC1 和 A2780 细胞, 用无血清培养基重悬制成单细胞悬液。将细胞悬液接种至 Transwell 上室, 下室添加含 10% 胎牛血清的完全培养基。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中经 24 h 孵育后, 用湿润棉签轻柔擦除上室侧未迁移的细胞。迁移至下室侧的细胞以 4% 多聚甲醛在室温固定 10 min, 结晶紫染色 20 min, 再用 PBS 轻柔清洗 2~3 次 (每次 1 min) 以去除浮色。随后将小室在室温下自然风干 10 min,

最后于显微镜下计数并拍照。

1.11 CD8⁺ T细胞的分离和共培养

采集健康志愿者的血液样本(所有受试者均签署书面知情同意书),按照Ficoll试剂盒说明书步骤进行操作,分离并纯化得到人外周血单个核细胞(human peripheral blood mononuclear cells, hPBMCs)。随后,参照先前参考文献[9]中的方案,使用流式细胞仪(Partec)从hPBMCs中分选出CD8⁺ T细胞。共培养采用Transwell系统:上腔接种MDA-MB-231细胞,下腔接种纯化后的CD8⁺ T细胞。培养24 h后,收集CD8⁺ T细胞,采用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒,在避光条件下用Annexin V-FITC/PI染色15 min。染色后立即通过流式细胞术检测细胞凋亡率。本实验经首都医科大学附属北京友谊医院医学科研伦理委员会批准(批准号:20241253)。

1.12 流式细胞术

细胞用0.25%胰蛋白酶在37 °C下消化2 min,用预冷PBS清洗并重悬。采用Annexin V-FITC/PI双染试剂盒,并使用FACSCalibur流式细胞仪进行凋亡检测,通过分析所得数据计算细胞凋亡率(%): $AR=A_{early}+A_{late}$ 。其中AR代表细胞凋亡率; A_{early} 代表早期细胞凋亡率,即Annexin V⁺/PI⁻细胞占全部细胞的百分比; A_{late} 代表晚期细胞凋亡率,即Annexin V⁺/PI⁺细胞占全部细胞的百分比。

1.13 ELISA检测

共培养24 h后,收集底部培养皿中的上清液用于检测。使用ELISA试剂盒测定共培养细胞上清中TNF- α 、IFN- γ 和IL-4的浓度。

1.14 检测活化CD8⁺ T细胞对各组MDA-MB-231细胞的杀伤率

将活化CD8⁺ T细胞按20:1比例与各实验组细胞共同接种于96孔板培养,同时另设一组96孔板接种等量人外周血CD8⁺ T细胞作为单独培养组,以MDA-MB-231细胞单培养组为对照靶细胞。各组细胞经24 h培养后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂继续孵育1.5 h,随后用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(D)值。根据公式计算细胞活力: $CV=[(D_{实验组}-D_{空白组})/(D_{对照组}-D_{空白组})]\times 100\%$ 。其中CV代表细胞活力。同时依据吸光度值计算活化CD8⁺ T细胞对MKN-45细胞的杀伤率(%),计算公式为: $KR=[1-(D_{共培养组}-D_{效应细胞对照组})/D_{靶细胞对照组}]\times 100\%$ 。其中KR代表杀伤率。

1.15 双荧光素酶实验

利用StarBase数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)检索miR-374a-5p与ARRDC3相互作用位点。将WT-ARRDC3及MUT-ARRDC3与miR-374a-5p mimic及阴性对照共转染至MDA-MB-231细胞系,在37 °C、5% CO₂培养箱中孵育48 h后,裂解细胞,采用双荧光素酶活性检测试剂盒定量检测荧光素酶活性。

1.16 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行数据分析。所有定量数据均服从正态分布且方差齐性,数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用双尾Student's *t*检验。多组样本均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间差异进一步通过SNK-*q*检验确定。两组间比较采用独立样本*t*检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-374a-5p和ARRDC3在乳腺癌中的表达情况

与正常的乳腺上皮细胞系MCF-10A相比,在乳腺癌细胞系MDA-MB-231、Hs578T、MDA-MB-468和MDA-MB-453中,miR-374a-5p表达显著上调,ARRDC3表达显著下调($P<0.05$),见图1A和图1B。进一步使用GEPIA数据库对乳腺癌中的ARRDC3表达情况进行初步研究,发现其在乳腺癌中表达显著下调($P<0.05$),见图1C。在MDA-MB-231中,miR-374a-5p表达水平最高,因此选择该细胞系进行后续实验。

2.2 外泌体的提取、鉴定和摄取

电镜观察可见MDA-MB-231分泌的外泌体呈均匀杯状,其直径约在100 nm,见图2A和图2B。蛋白免疫印迹法检测到外泌体相关标志物HSP70、CD81和TSG101在外泌体中显著高表达,但在全细胞裂解物中不表达,见图2C。显微镜观察结果显示,MDA-MB-231细胞质内大量摄取了外泌体,见图2D。

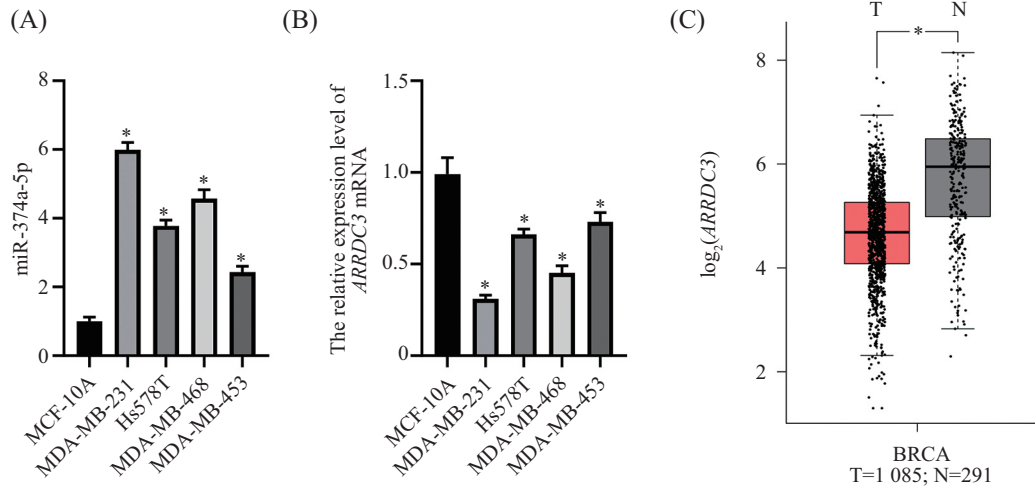
2.3 外泌体介导miR-374a-5p对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

与Con组相比,Exo-NC组和NC inhibitor组的miR-374a-5p表达量、平板克隆数和穿膜细胞数显著增加,划痕修复率显著升高($P<0.05$);与Exo-NC组和NC inhibitor组相比,miR-374a-5p inhibi-

tor组的miR-374a-5p表达量、平板克隆数和穿膜细胞数显著减少, 划痕修复率显著降低 ($P < 0.05$), 见图3。

2.4 外泌体介导miR-374a-5p对乳腺癌细胞CD8⁺ T细胞免疫应答的影响

与Con组相比, Exo-NC组和NC inhibitor组的

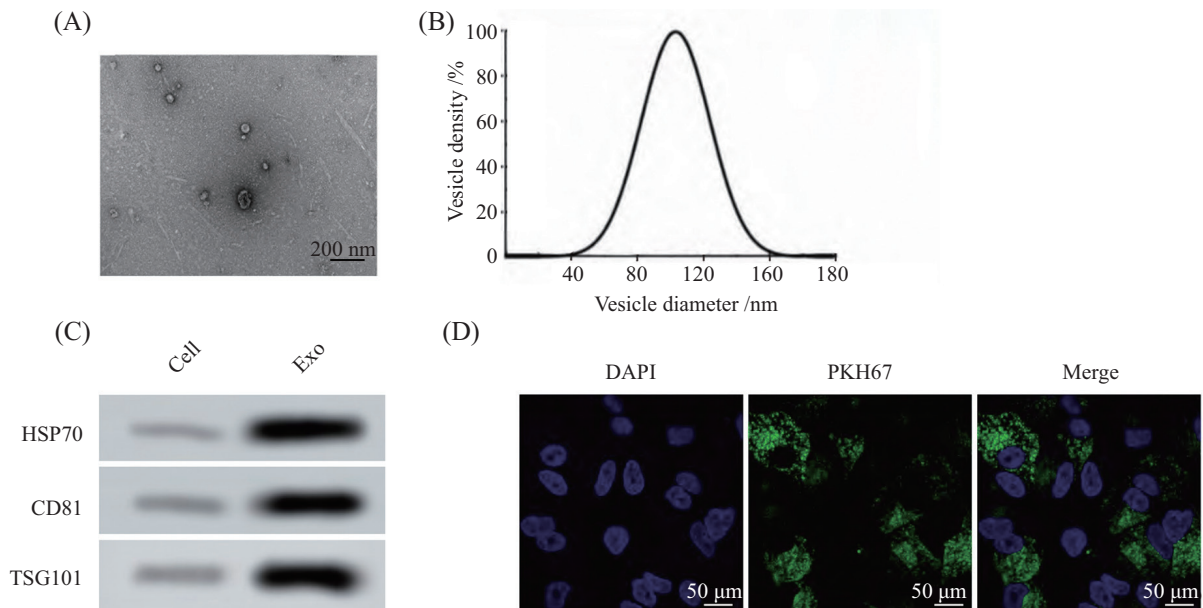


A: miR-374a-5p在乳腺癌细胞系中的表达情况; * $P < 0.05$, 与MCF-10A组相比; B: *ARRDC3*在乳腺癌细胞系中的表达情况; * $P < 0.05$, 与MCF-10A组相比; C: GEPIA数据库分析*ARRDC3*在乳腺癌中的表达情况(T: 肿瘤; N: 正常对照); * $P < 0.05$ 。

A: the expression of miR-374a-5p in breast cancer cell lines; * $P < 0.05$ compared with MCF-10A group; B: the expression of *ARRDC3* in breast cancer cell lines; * $P < 0.05$ compared with MCF-10A group; C: GEPIA database was used to analyze the expression of *ARRDC3* in breast cancer (T: tumor; N: normal control); * $P < 0.05$.

图1 miR-374a-5p和*ARRDC3*在乳腺癌中表达情况

Fig.1 Expression of miR-374a-5p and *ARRDC3* in breast cancer

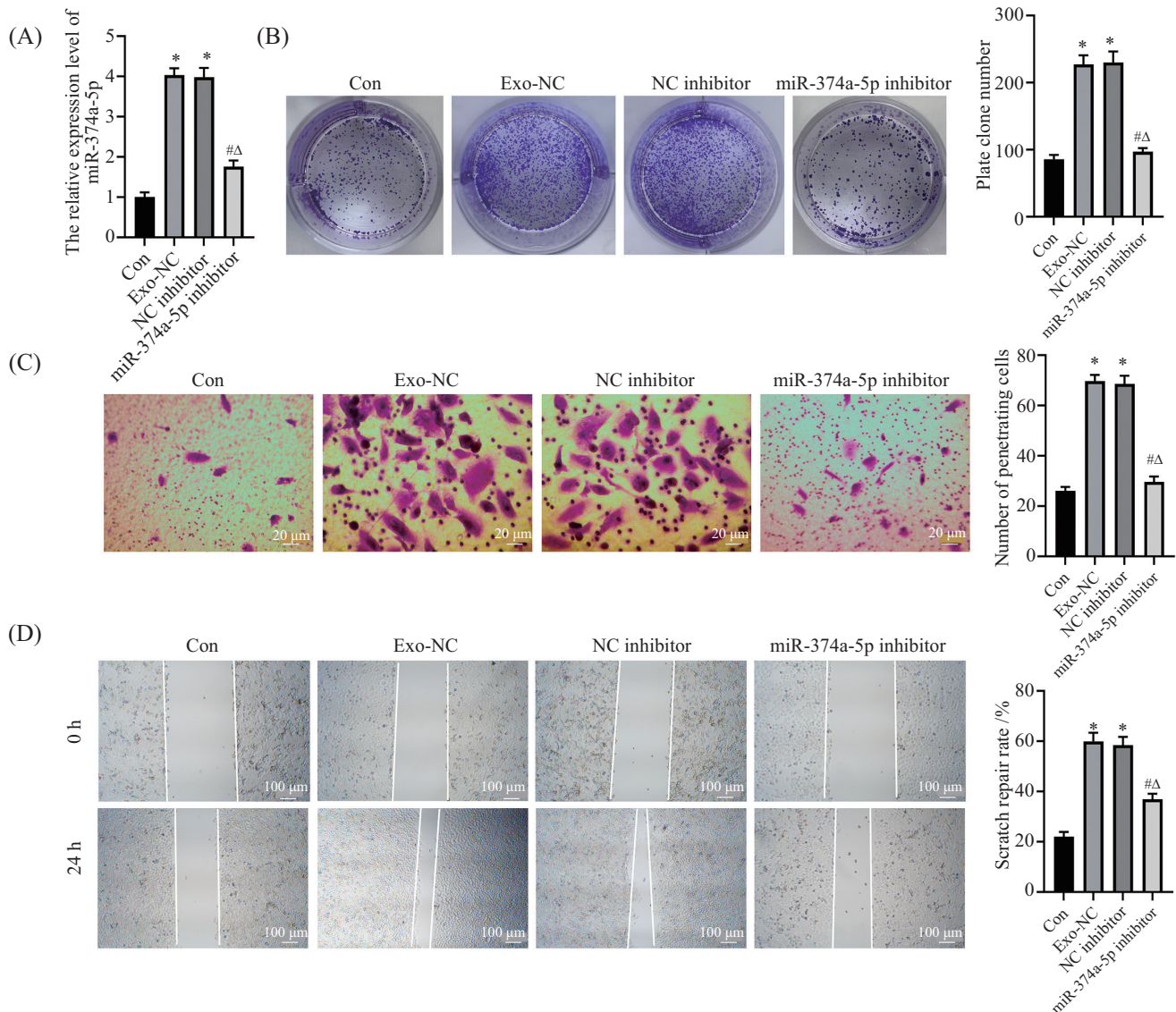


A: 透射电子显微镜观测外泌体形态; B: 用纳米颗粒示踪技术分析外泌体粒径; C: HSP70、CD81和TSG101蛋白表达水平(点样量: 20 μg/样品); D: PKH67荧光染料示踪法检测MDA-MB-231对外泌体的摄取作用。

A: observe the morphology of exosomes by transmission electron microscopy; B: the particle size of exosomes was analyzed by nanoparticle tracer technique; C: HSP70, CD81 and TSG101 protein expression levels (spot volume: 20 μg/sample); D: PKH67 fluorescent dye tracer method was used to detect the uptake of MDA-MB-231 on exosomes.

图2 外泌体的提取、鉴定和摄取

Fig.2 Extraction, identification and uptake of exosomes



A: 各组细胞miR-374a-5p表达水平; B: 平板克隆实验; C: Transwell实验; D: 细胞划痕实验。* $P < 0.05$, 与Con组相比; # $P < 0.05$, 与Exo-NC组相比; Δ $P < 0.05$, 与NC inhibitor组相比。

A: the expression level of miR-374a-5p in each group; B: plate cloning experiment; C: Transwell experiment; D: cell scratch test. * $P < 0.05$ compared with Con group; # $P < 0.05$ compared with Exo-NC group; Δ $P < 0.05$ compared with NC inhibitor group.

图3 外泌体介导miR-374a-5p对乳腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

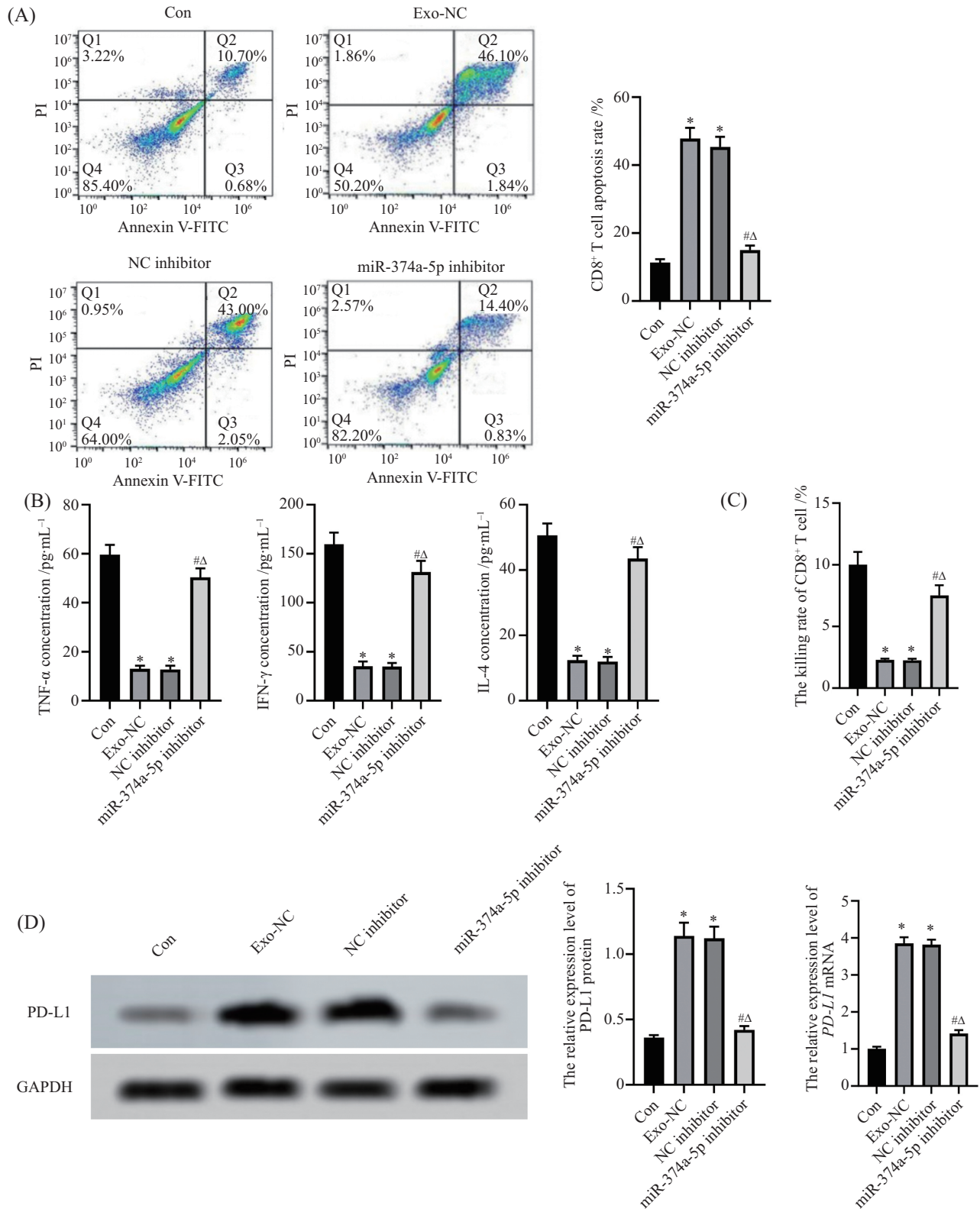
Fig.3 Effects of exosome-mediated miR-374a-5p on proliferation, invasion and apoptosis of breast cancer cells

CD8⁺ T细胞凋亡率显著升高, 细胞上清液中TNF- α 、IFN- γ 和IL-4水平以及CD8⁺ T细胞的杀伤率显著降低($P < 0.05$); 与Exo-NC组和NC inhibitor组相比, miR-374a-5p inhibitor组的CD8⁺ T细胞凋亡率显著降低, 细胞上清液中TNF- α 、IFN- γ 和IL-4水平以及CD8⁺ T细胞的杀伤率显著升高($P < 0.05$), 见图4A和图4B。进一步检测各组MDA-MB-231的PD-L1蛋白表达水平, 结果显示: 与Con组相比, Exo-NC组和NC inhibitor组的PD-L1表达水平显著升高($P < 0.05$); 与Exo-NC组和NC inhibitor组相比, miR-374a-5p inhibitor

组的PD-L1表达水平显著降低($P < 0.05$), 见图4C。

2.5 miR-374a-5p靶向调控ARRDC3

本研究采用StarBase 3.0对miR-374a-5p与ARRDC3 3'-UTR的结合靶点进行预测, 预测结果见图5A。为进一步验证该结合作用, 开展双荧光素酶实验。结果显示, 相较于NC mimic组, 转染miR-374a-5p mimic后, WT-ARRDC3活性显著降低($P < 0.05$), 而MUT-ARRDC3活性无显著变化($P > 0.05$), 见图5B。与Con组相比, Exo-NC组和NC inhibitor组的ARRDC3表达显著下调($P < 0.05$);

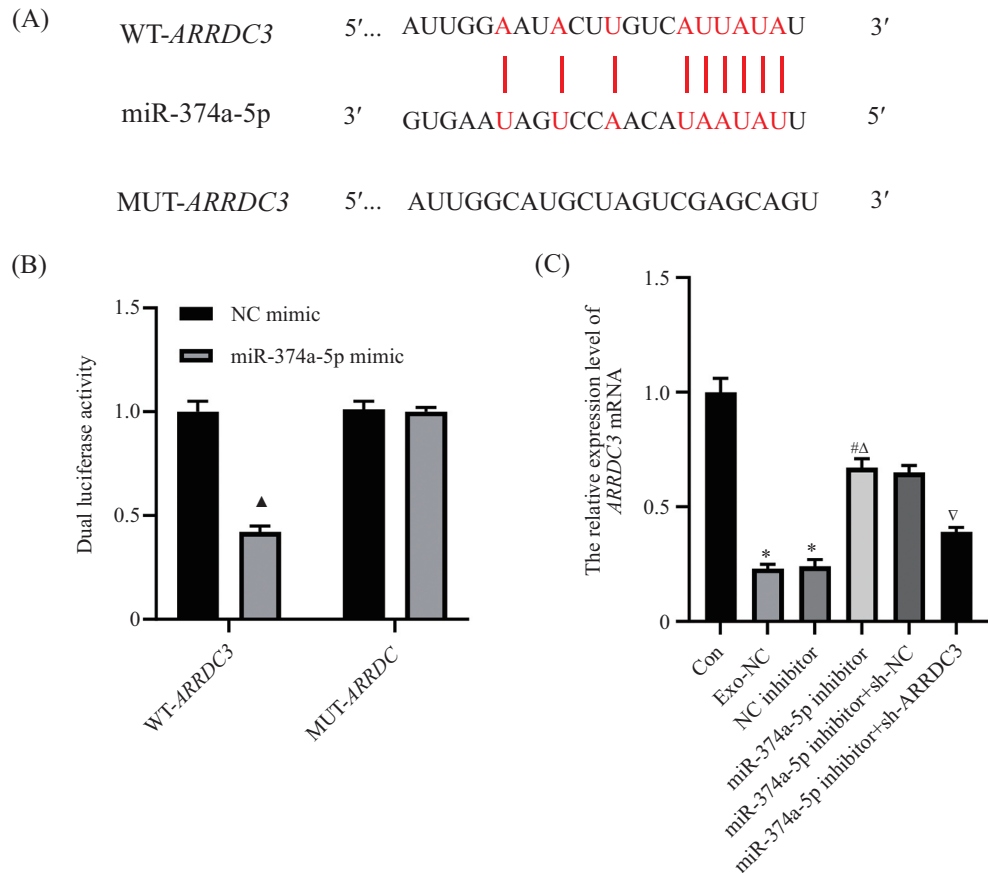


A: CD8⁺ T cell apoptosis rate; B: TNF-α、IFN-γ和IL-4水平; C: CD8⁺ T细胞对乳腺癌细胞杀伤率; D: PD-L1表达水平。*P<0.05, 与Con组相比; #P<0.05, 与Exo-NC组相比; ΔP<0.05, 与NC inhibitor组相比。

A: CD8⁺ T cell apoptosis rate; B: TNF-α, IFN-γ and IL-4 levels; C: the killing rate of breast cancer cells by CD8⁺ T cells; D: PD-L1 expression level. *P<0.05 compared with Con group; #P<0.05 compared with Exo-NC group; ΔP<0.05 compared with NC inhibitor group.

图4 外泌体介导miR-374a-5p对乳腺癌细胞CD8⁺ T细胞免疫应答的影响

Fig.4 Effect of exosome-mediated miR-374a-5p on CD8⁺ T cell immune response of breast cancer cells



A: miR-374a-5p与 $ARRDC3$ 的预测靶点; B: 双荧光素酶实验; C: 各组细胞 $ARRDC3$ 的表达水平。红色碱基表示的是miR-374a-5p与WT- $ARRDC3$ (或MUT- $ARRDC3$)序列之间的互补配对区域。▲ $P<0.05$, 与NC mimic组相比; * $P<0.05$, 与Con组相比; # $P<0.05$, 与Exo-NC组相比; △ $P<0.05$, 与NC inhibitor组相比; ▼ $P<0.05$, 与miR-374a-5p inhibitor+sh-NC组相比。

A: the predicted targets of miR-374a-5p and $ARRDC3$; B: dual luciferase assay; C: the expression level of $ARRDC3$ in each group. The red base represents the complementary pairing region between miR-374a-5p and WT- $ARRDC3$ (or MUT- $ARRDC3$) sequence. ▲ $P<0.05$ compared with NC mimic group; * $P<0.05$ compared with Con group; # $P<0.05$ compared with Exo-NC group; △ $P<0.05$ compared with NC inhibitor group; ▼ $P<0.05$ compared with the miR-374a-5p inhibitor+sh-NC group.

图5 miR-374a-5p靶向调控 $ARRDC3$

Fig.5 miR-374a-5p targeted regulation of $ARRDC3$

与Exo-NC组和NC inhibitor组相比, miR-374a-5p inhibitor组的 $ARRDC3$ 表达显著上调($P<0.05$); 与miR-374a-5p inhibitor+sh-NC组相比, miR-374a-5p inhibitor+sh- $ARRDC3$ 组的 $ARRDC3$ 表达显著下调($P<0.05$), 见图5C。

2.6 外泌体介导miR-374a-5p/ $ARRDC3$ 对乳腺癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响

与miR-374a-5p inhibitor+sh-NC组相比, miR-374a-5p inhibitor+sh- $ARRDC3$ 组的平板克隆数、划痕修复率升高和穿膜细胞数显著增加($P<0.05$), 见图6。

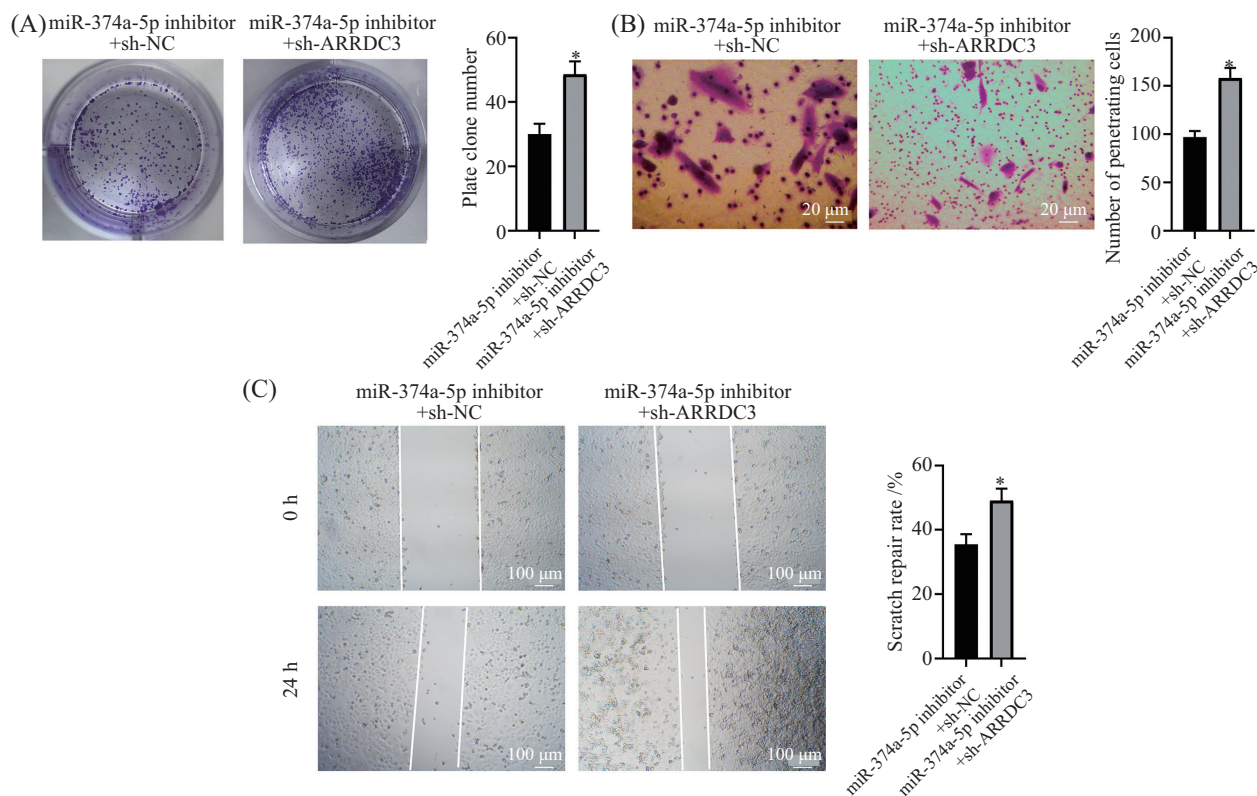
2.7 外泌体介导miR-374a-5p/ $ARRDC3$ 对乳腺癌细胞 $CD8^+$ T细胞免疫应答的影响

与miR-374a-5p inhibitor+sh-NC组相比, miR-374a-5p inhibitor+sh- $ARRDC3$ 组的 $CD8^+$ T细胞凋

亡率和PD-L1表达水平显著升高, 细胞上清液中TNF- α 、IFN- γ 和IL-4水平以及 $CD8^+$ T细胞的杀伤率显著降低($P<0.05$), 见图7。

3 讨论

在肿瘤转移与免疫逃逸过程中, 肿瘤细胞与肿瘤微环境中各类细胞间的信息交流至关重要。其中, 外泌体是细胞间信息传递的重要载体, 可携带脂质、核酸和蛋白质等多种生物分子。在肿瘤微环境中, 肿瘤细胞分泌的外泌体能够促进癌变以及肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 同时诱导免疫抑制、血管生成, 重塑肿瘤微环境^[10]。报道指出, 外泌体介导的癌细胞来源的miR-374a-5p, 可通过调节血脑屏障通透性参与转移前生态位的形成, 进而促进癌症发生



A: 平板克隆实验; B: Transwell实验; C: 细胞划痕实验。* $P < 0.05$, 与miR-374a-5p inhibitor+sh-NC组相比。

A: plate cloning experiment; B: Transwell experiment; C: cell scratch test. * $P < 0.05$ compared with miR-374a-5p inhibitor+sh-NC group.

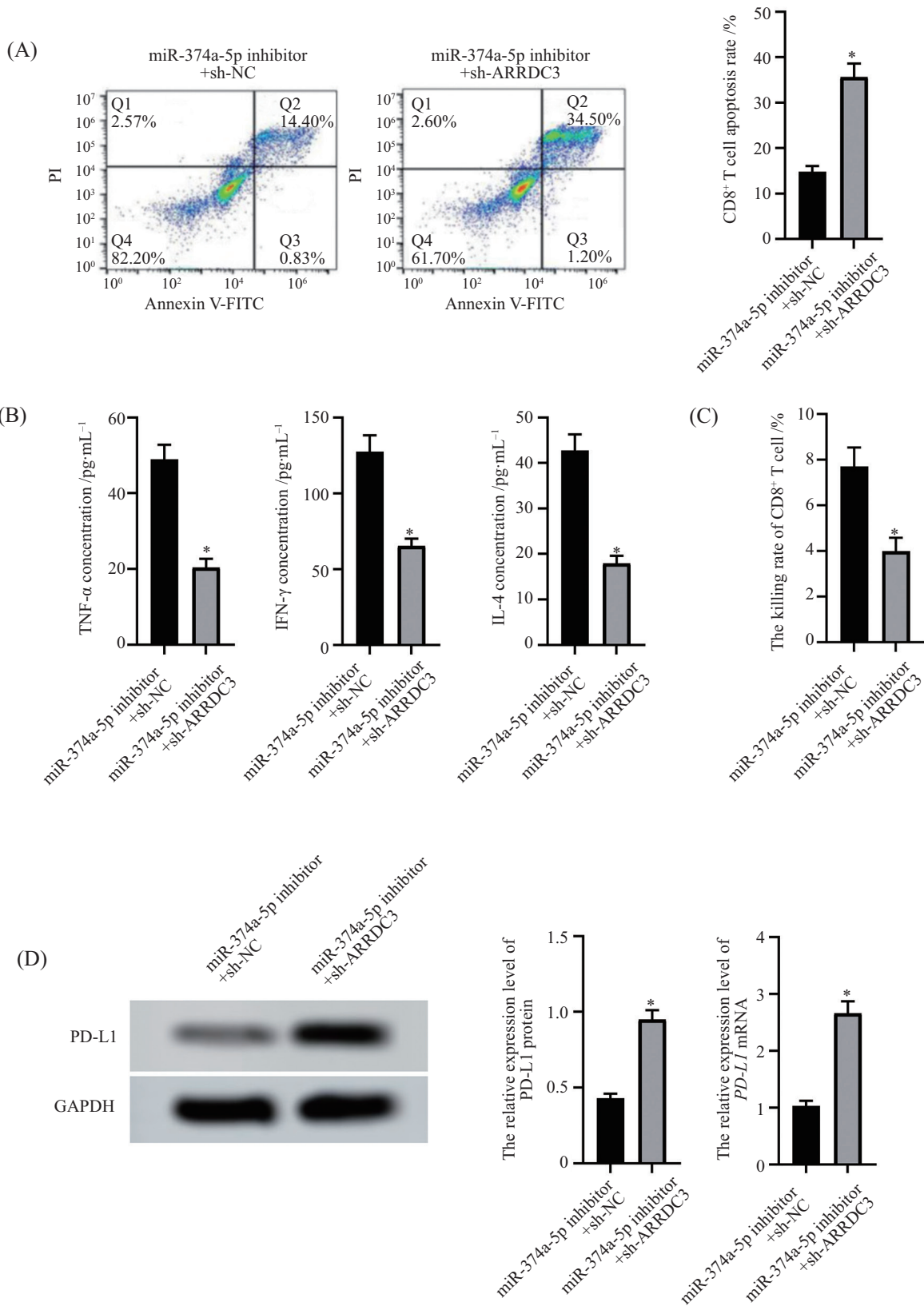
图6 外泌体介导miR-374a-5p/ARRDC3对乳腺癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响

Fig.6 Effects of exosome-mediated miR-374a-5p/ARRDC3 on proliferation, migration and apoptosis of breast cancer cells

发展^[11]。已有研究证实,在肝癌^[12]、非小细胞肺癌^[13]中,miR-374a-5p表达异常且具有促癌作用。而在乳腺癌中,miR-374a-5p可直接靶向TNBC内表达下调的基因*ARRB1*,通过激活腺苷酸活化蛋白激酶信号通路,调控癌细胞的生长和迁移^[7]。本研究结果显示,miR-374a-5p在乳腺癌细胞系中的表达水平显著升高。同时,乳腺癌细胞来源的外泌体可进一步上调miR-374a-5p的表达,并增强乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。当抑制miR-374a-5p表达时,上述恶性表型得到显著逆转。这提示,乳腺癌细胞来源的外泌体可能通过上调miR-374a-5p的表达,促进乳腺癌的发生发展。

肿瘤微环境在癌症的发生与演进过程中发挥关键作用。免疫系统功能失衡可能是驱动癌症进展的核心因素,而基于免疫调控的治疗策略已成为极具潜力的癌症干预方式。研究证实,T细胞,尤其是CD8⁺T细胞,能通过识别肿瘤特异性抗原,在肿瘤消除过程中发挥至关重要的作用^[14]。CD8⁺T细胞功能障碍所导致的抗肿瘤免疫受损,是肿瘤微环境的一

个重要特征。既往研究显示,在接受化疗的宫颈癌患者中,miR-374a-5p的表达情况与肿瘤浸润性CD8⁺T细胞数量呈负相关^[15]。这提示,抑制miR-374a-5p表达可能通过阻断肿瘤免疫逃逸机制发挥抗肿瘤作用。本研究进一步证实,抑制miR-374a-5p后,肿瘤组织中CD8⁺T细胞的比例显著升高,同时TNF- α 、IFN- γ 和IL-4等细胞因子分泌水平升高。这些变化表明机体的抗肿瘤免疫应答作用显著增强,有助于更有效地识别和清除肿瘤细胞^[14]。为进一步探究CD8⁺T细胞杀伤肿瘤细胞的具体效应,本研究开展了体外共培养实验。结果显示,经特定处理的乳腺癌来源外泌体可显著抑制CD8⁺T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,而敲低miR-374a-5p则显著削弱该抑制作用。这表明,miR-374a-5p可能参与乳腺癌来源外泌体对CD8⁺T细胞功能的调控,敲低miR-374a-5p能够打破该抑制效应,恢复CD8⁺T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。研究结果提示,miR-374a-5p可能通过调控肿瘤微环境影响乳腺癌进展。为进一步探究miR-374a-5p对乳腺癌免疫逃逸的作用机制,本研究检测了PD-L1的



A: CD8⁺ T细胞凋亡率; B: TNF- α 、IFN- γ 和IL-4水平; C: CD8⁺ T细胞对乳腺癌细胞杀伤率; D: PD-L1表达水平。* P <0.05, 与miR-374a-5p inhibitor+sh-NC组相比。

A: CD8⁺ T cell apoptosis rate; B: TNF- α , IFN- γ and IL-4 levels; C: the killing rate of breast cancer cells by CD8⁺ T cells; D: PD-L1 expression level. * P <0.05 compared with miR-374a-5p inhibitor+sh-NC group.

图7 外泌体介导miR-374a-5p/ARRDC3对乳腺癌细胞CD8⁺ T细胞免疫应答的影响

Fig.7 Effect of exosome-mediated miR-374a-5p/ARRDC3 on CD8⁺ T cell immune response in breast cancer cells

表达水平。结果显示, 外泌体可显著上调乳腺癌细胞中PD-L1的表达, 而下调miR-374a-5p则显著抑制这一过程。PD-L1信号通路是抑制CD8⁺ T细胞活化的关键免疫检查点, 在肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用: 肿瘤细胞通过上调PD-L1的表达, 与T细胞表面的PD-1受体结合, 诱导T细胞功能耗竭, 进而削弱CD8⁺ T细胞对肿瘤细胞的识别与杀伤能力, 最终实现免疫监视的逃逸^[16]。因此, 上述体外实验结果表明, 乳腺癌细胞来源外泌体可通过miR-374a-5p上调PD-L1的表达, 抑制肿瘤微环境中CD8⁺ T细胞的功能, 从而促进癌细胞的免疫逃逸。

当前, 越来越多的证据表明, 肿瘤来源的外泌体常会将miRNA转运至受体细胞, 进而抑制靶基因表达。本研究证实, 在乳腺癌细胞中, *ARRDC3*是miR-374a-5p的直接作用靶点, 并且外泌体能够显著抑制*ARRDC3*的表达。*ARRDC3*属于 α -抑制蛋白家族成员, 也被称为硫氧还蛋白结合蛋白-2样膜诱导蛋白。现有研究显示, *ARRDC3*与多种恶性肿瘤的发生和进展紧密相关, 在卵巢癌、肾细胞癌、前列腺癌以及结直肠癌等肿瘤组织中, 均观察到*ARRDC3*存在异常表达^[17-18]。针对TNBC的研究发现, 当*ARRDC3*表达水平降低时, 肿瘤转移率和复发风险会升高, 且患者预后不良。进一步分析表明, TNBC患者及其细胞系中*ARRDC3*表达缺失或受到抑制, 主要与基因缺失或表观遗传调控异常有关^[19], 这提示*ARRDC3*可能具有肿瘤抑制功能。CHEN等^[18]研究者通过TIMER数据库分析发现, *ARRDC3*表达水平与卵巢癌中CD8⁺ T细胞浸润程度呈正相关, 这表明*ARRDC3*可能参与调控肿瘤免疫微环境。然而, *ARRDC3*在乳腺癌免疫逃逸中的具体作用机制, 仍有待进一步研究阐明。本研究结果显示, 乳腺癌细胞系中*ARRDC3*的表达水平显著降低。进一步研究发现, 下调*ARRDC3*可显著削弱miR-374a-5p抑制剂对乳腺癌细胞恶性表型的抑制作用, 同时会促进肿瘤免疫逃逸。具体表现为: CD8⁺ T细胞凋亡率上升, PD-L1表达水平升高, 而TNF- α 、IFN- γ 和IL-4的分泌水平则显著下降。由此提示, 乳腺癌细胞来源的外泌体可通过miR-374a-5p靶向抑制*ARRDC3*, 促进肿瘤免疫逃逸。

综上所述, 乳腺癌细胞来源的外泌体可通过miR-374a-5p/ARRDC3轴上调PD-L1表达, 抑制肿瘤微环境中CD8⁺ T细胞的活性, 进而促进癌细胞的免

疫逃逸。本研究为开发基于外泌体的诊断标志物和免疫治疗靶点提供了理论依据。未来需进一步探索该轴在不同乳腺癌亚型中的异质性, 并开展临床前和临床试验验证其治疗潜力。

参考文献 (References)

- [1] XIONG X, ZHENG L W, DING Y, et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 49.
- [2] ZHANG Z J, LUO X Y, XUE X X, et al. Engineered exosomes carrying mir-588 for treatment of triple negative breast cancer through remodeling the immunosuppressive microenvironment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 743-58.
- [3] HÁNEĽOVÁ K, RAUDENSKÁ M, MASARÍK M, et al. Protein cargo in extracellular vesicles as the key mediator in the progression of cancer [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 25.
- [4] KOK V C, YU C C. Cancer-derived exosomes: their role in cancer biology and biomarker development [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 8019-36.
- [5] ZHANG Z J, HUANG Q C, YU L C, et al. The role of mirna in tumor immune escape and mirna-based therapeutic strategies [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 807895.
- [6] ZHAO S L, MI Y S, GUAN B J, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 156.
- [7] SON D, KIM Y, LIM S, et al. miR-374a-5p promotes tumor progression by targeting ARRB1 in triple negative breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 454: 224-33.
- [8] ARAKAKI A K S, PAN W A, WEDEGAERTNER H, et al. α -Arrestin *ARRDC3* tumor suppressor function is linked to GPCR-induced TAZ activation and breast cancer metastasis [J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(8): jcs254888.
- [9] WANG X C, HE Q F, SHEN H Y, et al. TOX promotes the exhaustion of antitumor CD8⁺ T cells by preventing PD1 degradation in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 731-41.
- [10] LI Q, HE G P, YU Y F, et al. Exosome crosstalk between cancer stem cells and tumor microenvironment: cancer progression and therapeutic strategies [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 449.
- [11] JIN J, CUI Y M, NIU H C, et al. NSCLC extracellular vesicles containing mir-374a-5p promote leptomeningeal metastasis by influencing blood-brain barrier permeability [J]. *Mol Cancer Res*, 2024, 22(8): 699-710.
- [12] WANG Y, WU W Z, HU Y W, et al. Downregulated TRAF3IP2-AS1 promotes hepatocellular carcinoma progression through the miR-374a-5p/SEL1L1/RPL6 axis to enhance DNA damage repair [J]. *Am J Transl Res*, 2025, 17(4): 2445-66.
- [13] GUO Q, WANG H J, XU Y Z, et al. miR-374a-5p inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and migration via targeting NCK1 [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(3): 943.
- [14] DU N, ZHANG X W, HE C, et al. miR-423-5p mediates LINC00886 regulation of ovarian cancer aggressiveness and immune evasion via the TLR4/Myd88/NF- κ B/PD-L1 pathway [J]. *Hereditas*, 2025, 162(1): 184.

- [15] SOMEYA M, HASEGAWA T, TSUCHIYA T, et al. Predictive value of an exosomal microRNA-based signature for tumor immunity in cervical cancer patients treated with chemoradiotherapy [J]. *Med Mol Morphol*, 2023, 56(1): 38-45.
- [16] MARRA A, CHANDARLAPATY S, MODI S. Management of patients with advanced-stage HER2-positive breast cancer: current evidence and future perspectives [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(3): 185-202.
- [17] TAKEUCHI F, KUKIMOTO I, LI Z, et al. Genome-wide association study of cervical cancer suggests a role for ARRDC3 gene in human papillomavirus infection [J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(2): 341-8.
- [18] CHEN Y L, TIAN D, CHEN X Q, et al. ARRDC3 as a diagnostic and prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer based on data mining [J]. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 967-81.
- [19] WEDEGAERTNER H, PAN W A, GONZALEZ C C, et al. The α -arrestin ARRDC3 is an emerging multifunctional adaptor protein in cancer [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 36(13/14/15): 1066-79.