

黄芪多糖调控乳腺癌细胞来源的外泌体及其对巨噬细胞极化和抗肿瘤效应的影响

关晨娟¹, 解彩霞², 郑晓娇², 包娜娜², 王露², 白文慧², 乔姝², 张浩楠³

(¹ 内蒙古科技大学包头医学院, 包头 014040;

内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院² 输血科、³ 药剂科, 包头 014010)

摘要 **目的** 探讨黄芪多糖(APS)调控乳腺癌细胞来源的外泌体中 miR-107 和 miR-346 介导的巨噬细胞极化对乳腺癌细胞增殖和转移的影响及机制。**方法** 选取 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 40 只, 分别构建乳腺癌异种移植瘤模型和 4T1 移植肿瘤模型。分为对照组和 APS 组, APS 组裸鼠每日 APS 灌胃治疗共 25 d, 对照组裸鼠分别给予等量的生理盐水, 在完成所有治疗后, 对裸鼠实施安乐死, 分离肿瘤组织。采用 Western blot 和流式细胞术检测增殖细胞核抗原(PCNA)、Ki-67、CD206、CD163、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 CD86 的表达, 分析肿瘤组织中单细胞悬液的凋亡情况。人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞培养并使用 APS 刺激, 收集细胞培养基外泌体, 采用 CCK-8 法、划痕法、透孔室细胞侵袭实验、qRT-PCR 检测细胞的增殖、迁移和侵袭情况。生物信息学筛选差异基因。**结果** 通过测定与乳腺癌细胞增殖和转移相关的分子表达, 显示 APS 治疗降低了 MDA-MB-231 异种移植瘤组织中增殖相关蛋白(PCNA 和 Ki-67)和转移相关蛋白(波形蛋白)的表达; 并观察到肿瘤相关巨噬细胞的极化情况, APS 处理 4T1 移植肿瘤组织可降低 M2 巨噬细胞的数量, 增加 M1 巨噬细胞的数量, 致使 M2/M1 巨噬细胞数量的比例降低, 增加了 4T1 移植肿瘤组织的细胞凋亡。且相关蛋白的表达情况是 iNOS 和 CD86 增加, CD206 和 CD163 降低。MDA-MB-231 产生的外泌体经 APS 处理降低了 M2 巨噬细胞的极化, 并且影响 miR-107 和 miR-346 表达。**结论** APS 通过调节乳腺癌细胞来源的外泌体中 miR-107 或 miR-346 的表达来抑制 M2 巨噬细胞极化, 最终抑制乳腺癌细胞的增殖和转移。

关键词 乳腺癌; 黄芪多糖; 外泌体; 巨噬细胞极化; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 319

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)10-1790-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.10.003

研究中药治疗乳腺癌的机制至关重要。黄芪多糖(astragalus polysacharin, APS)为中药黄芪的主要活性成分之一, 是辅助抗肿瘤的免疫调节剂。然而, 乳腺癌的发生和转移是一个极其复杂的过程, 每个环节都会受到诸多因素的精密调控。研究^[1]显示, miRNA 的异常表达与乳腺癌的发生发展密切相关。本研究通过生物信息学方法筛选乳腺癌患者血清外泌体中异常表达的 miRNAs, 最终选择 miR-107 外泌体和 miR-346 作为 APS 的潜在靶点, 通过动物实验和细胞实验, 研究 APS 通过乳腺癌细胞来源的外泌体 miRNAs 来调节巨噬细胞的极化, 并在

抑制乳腺癌的增殖和转移中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

1.1.1 实验动物 实验用 40 只 8 周龄健康雌性 BALB/c 裸鼠, 体质量为 190~210 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.1.2 实验细胞 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、4T1、THP-1(美国 HyClone 公司)。所有的细胞都在 37℃ 和 5% 二氧化碳的环境中培养。THP-1 和 4T1 细胞在含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI-1640 培养基(美国 HyClone 公司)中培养, MDA-MB-231 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司)中培养。APS 纯度>98.0% 的干粉(上海继生化技术有限公司, C64600), 用生理盐水溶解。佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(德国 MedChemExpress 公司, HY-18739)。蛋白测定试剂(上海赛默飞世尔科学公司), 流式细胞术细胞凋亡检测试剂盒(北京索莱宝

2025-07-07 接收

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目(编号: 2021GG0401); 包头医学院“临床医学+X 学科”联合科研基金项目(编号: BYJJ-DXK 2022029)

作者简介: 关晨娟, 女, 硕士研究生;

乔姝, 女, 主任技师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: qiaoshulili@163.com;

张浩楠, 男, 博士研究生, 通信作者, E-mail: zhnzczy@163.com

科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 体内抗增殖分析 采用20只8周龄健康雌性BALB/c裸鼠,构建乳腺癌异种移植瘤模型。将 1×10^6 个/mL浓度的MDA-MB-231细胞置于100 μ L无菌生理盐水中,接种于每只小鼠的右腋窝皮下。10 d后,用手触摸MDA-MB-231疫苗接种部位,可触及到硬结节表明模型建立成功。所有成功构建的小鼠模型均分为对照组和APS组。APS组小鼠从10周开始每日500 mg/kg APS灌胃治疗,共处理25 d。对照组小鼠分别给予等量的生理盐水。在完成所有治疗后,对小鼠实施安乐死,分离肿瘤组织称重,用多聚甲醛固定,制作石蜡切片,然后进行免疫荧光抗体染色。

1.2.2 Western blot 组织、细胞或外泌体蛋白通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分解,然后转移到聚偏氟乙烯上。将膜封闭,用磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline,PBS)洗涤,用相应的一抗:增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、Ki-67、CD206、CD163、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric-oxide synthase,iNOS)和CD86孵育,然后用与辣根过氧化物酶结合的二抗孵育。使用ECL试剂盒进行蛋白条带的可视化,并使用Image J软件分析蛋白带的灰度值。

1.2.3 流式细胞术 根据Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒说明,收集处理后的THP-1细胞中的M0巨噬细胞,预冷PBS洗涤2次,加入指定的抗体,在冰下孵育半小时,然后使用流式细胞术分析巨噬细胞表型抗体:PE-CD163(12-1639-42,)、AlexaFluor®594抗iNOS抗体(ab311641,abcam)、FITC-CD86(MHCD8601)、APC-CD206(17-2061-82,),评估肿瘤组织中单细胞悬液的凋亡情况。

1.2.4 外泌体的收集、颗粒分析和蛋白浓度检测 使用超离心法从乳腺癌细胞培养基中分离外泌体:在4 $^{\circ}$ C条件下按照离心程序:1 600 r/min 3 min,4 700 r/min 20 min,9 500 r/min 30 min,然后用0.2 μ m过滤器过滤上清液,32 000 r/min离心90 min。用PBS重悬外泌体颗粒,32 000 r/min离心90 min。最后,用PBS沉淀纯化外泌体,使用微型BCA溶液(micro BCA solution,microBCA)检测外泌体的蛋白浓度。同时使用纳米颗粒跟踪分析仪NanoSight LM10装置分析含有外泌体的细胞培养上清液,以测量颗粒大小和浓度。

1.2.5 增殖和细胞毒性试验 将 1×10^6 个/mL

MDA-MB-231细胞接种于6孔细胞培养板中,每3天观察1次细胞,直到观察到细胞增殖。收集不同处理方法后的细胞进行计数,用结晶紫色染色后,计算新增殖细胞数量。

1.2.6 RNA提取和qRT-PCR 根据试剂盒说明从细胞中提取总RNA,并制备cDNA,设计qRT-PCR的引物。

1.2.7 细胞划痕、侵袭试验 将 1.5×10^6 个/mL MDA-MB-231细胞接种于6孔细胞培养板中。细胞培养24 h后,首先用记号笔在培养板的背面画一条直线、染色,形成划痕。使用PBS清除刮伤的细胞,并分别于0 h和24 h在光学显微镜下拍照。然后收集细胞培养物,用PBS缓冲液洗涤细胞2次,结晶紫染色细胞并细胞计数,评估乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。

1.2.8 筛选差异表达miRNAs 从公共基因表达数据库(gene expression omnibus,GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)中下载了40例健康人和56例乳腺癌患者的血清外分泌体中的miRNAs表达数据(GSE197020),过滤出差异表达的miRNA,使用R包中的“gplots”命令来绘制火山地图。

1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism 9绘制柱状图和散点图,统计分析模块为本研究的数据进行统计分析。本研究中的数据显示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),每个测试独立重复至少3次或特殊说明。两组间差异比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APS对乳腺癌细胞增殖和转移的影响 通过对裸鼠MDA-MB-231皮下移植瘤模型灌胃APS治疗后,移植瘤组织质量的测定结果显示,APS处理显著降低了裸鼠MDA-MB-231异种移植瘤组织的质量,即APS抑制了体内MDA-MB-231细胞的增殖(图1A)。同时测定与乳腺癌细胞增殖和转移相关的分子的表达水平,如PCNA和Ki-67,e-钙黏蛋白和波形蛋白。结果显示,通过Western blot法对MDA-MB-231肿瘤组织进行分析(图1B)。APS治疗显著降低了MDA-MB-231异种移植瘤组织中增殖相关蛋白(PCNA和Ki-67)(图1C)和转移相关蛋白(波形蛋白)(图1D)的表达。

2.2 APS对M1巨噬细胞及M2巨噬细胞极化的影响 通过分析APS治疗对4T1移植肿瘤组织中

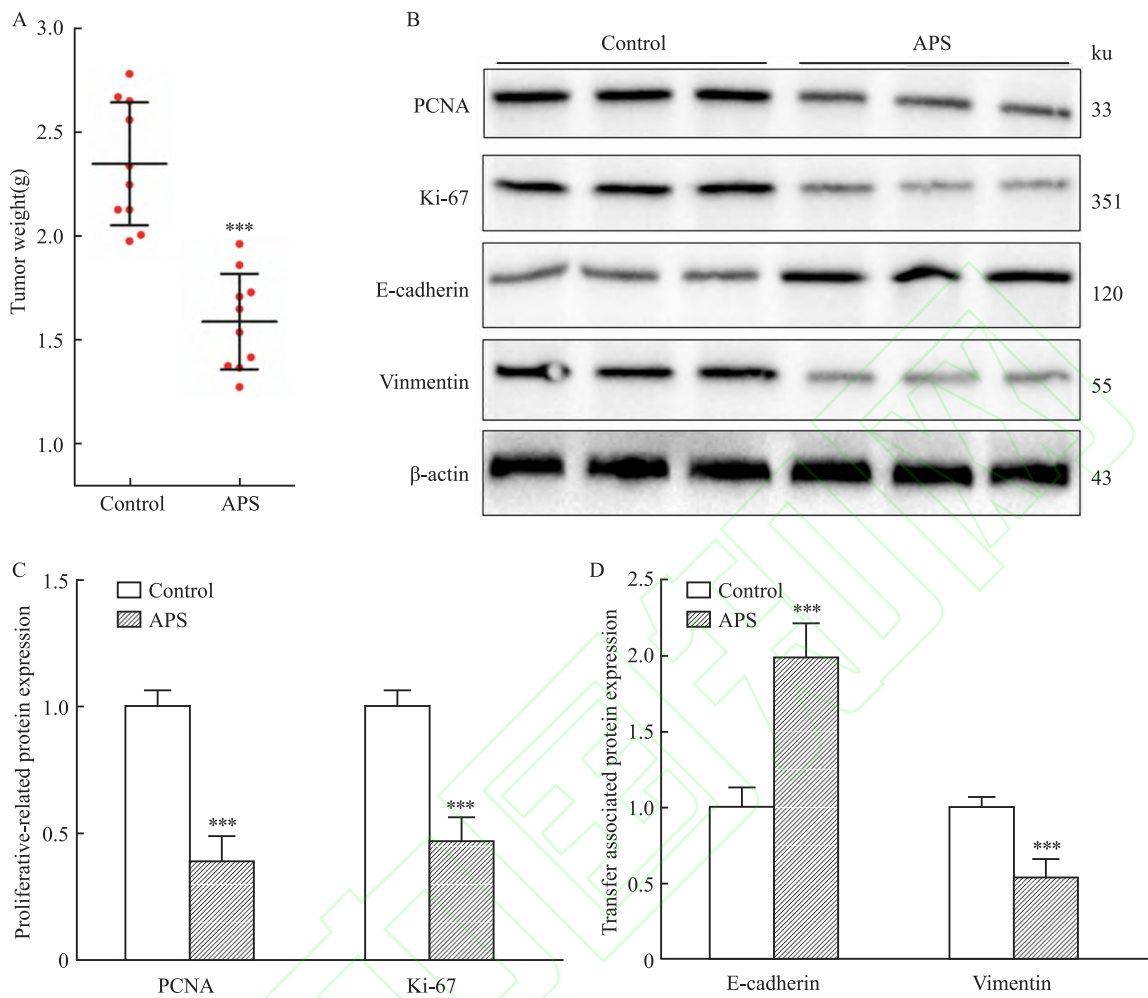


图1 APS抑制了乳腺癌细胞的增殖和肺转移($n=10, \bar{x} \pm s$)

Fig. 1 APS effectively inhibited the proliferation and pulmonary metastasis of breast cancer cells($n=10, \bar{x} \pm s$)

A: Comparison of MDA-MB-231 xenograft tumors weight with or without 500 mg/(kg·d) APS treatment; B: Western blot detection of the expression of PCNA, Ki-67, E-cadherin and Vimentin in MDA-MB-231 cell xenograft tumor tissues; C, D: Comparison of expression of proliferative-related proteins in MDA-MB-231 cell xenograft tumor tissues; *** $P < 0.001$ vs Control group.

M1和M2巨噬细胞比例的影响,结果显示,APS处理增加了4T1移植肿瘤组织中M1巨噬细胞的数量,降低了M2巨噬细胞的数量(图2A),降低了M2/M1巨噬细胞数量的比例(图2B)。同时,Western blot结果显示,APS处理显著增加了4T1移植肿瘤组织中iNOS和CD86蛋白的表达(图2C),而降低了CD206和CD163蛋白的表达(图2D、2E)。此外,通过流式细胞术分析及凋亡图像(图2G)显示,APS处理显著增加了4T1移植肿瘤组织的细胞凋亡(图2F)。

2.3 miR-107或miR-346外泌体调节巨噬细胞的极化 本研究选择从GSE197020数据库下载的原始数据中筛选出的乳腺癌患者血清外泌体中差异表达的miRNAs(图3A)前20个高表达(图3B)或低表

达(图3C)的miRNAs进行进一步研究,测定了MDA-MB-231来源的外泌体中的这些miRNAs,结果显示,APS处理改变了miR-379-5p、miR-107、miR-340-5p、miR-650和miR-346的表达(图3D)。

为了研究上述miRNAs的功能,通过将指定的miRNAs模拟物或抑制剂转移到MDA-MB-231中,上调或下调了MDA-MB-231细胞外泌体中miRNAs的表达(图3E)。转移到指定的miRNA产物48h后,替换MDA-MB-231培养基,继续培养24h,从培养基中收集细胞外囊泡,并使用上述外泌体处理M0巨噬细胞。结果显示,只有miR-107-miRNAs模拟物、miR-650-miRNAs模拟物和miR-346抑制剂的外泌体显著改变了M2巨噬细胞生物标志物如CD206(图3F)和CD163(图3G)的表达,也改变了M2巨

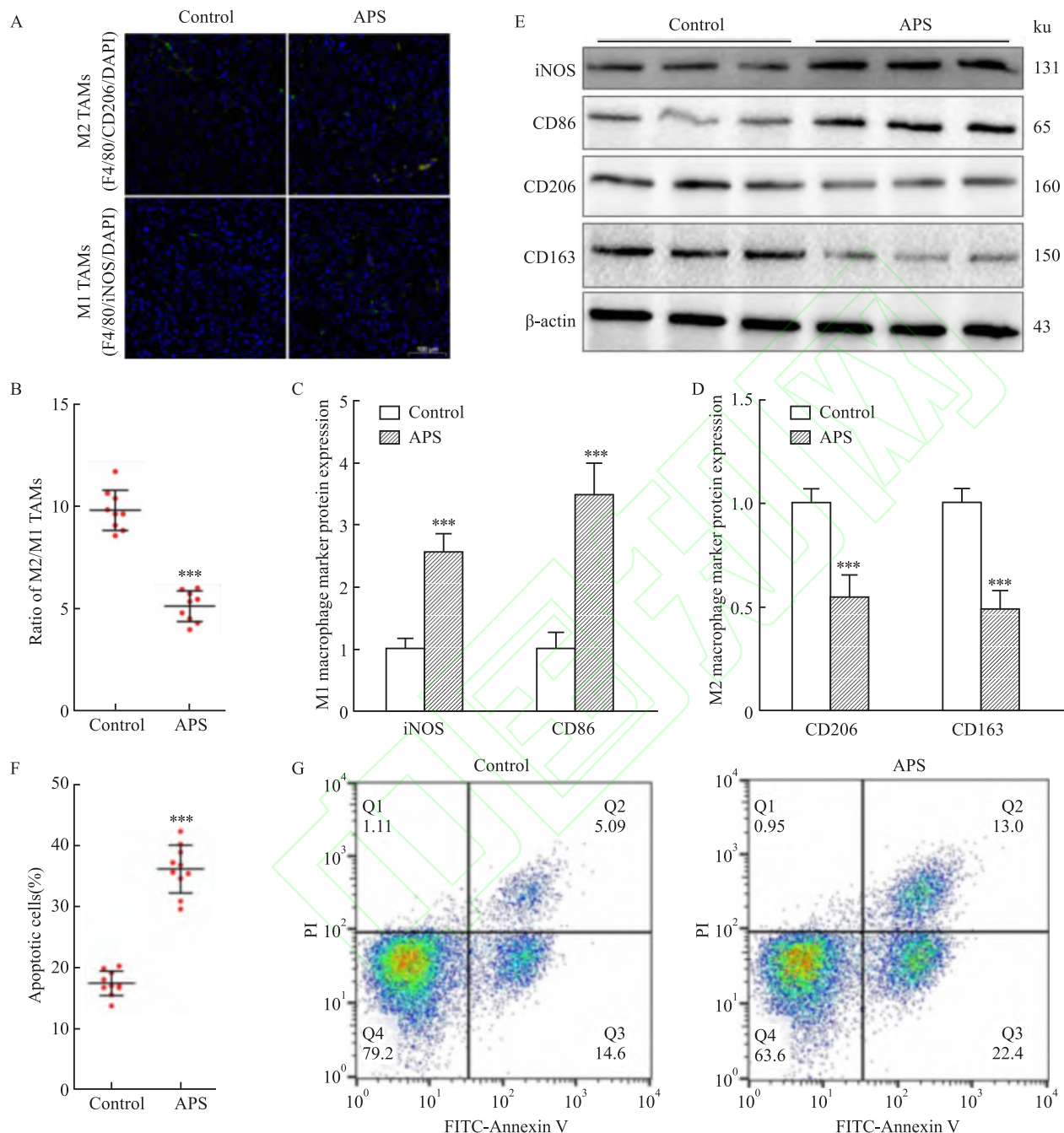


图2 APS 调控乳腺癌巨噬细胞极化和细胞凋亡 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 APS regulated the macrophage polarization and the apoptosis of breast cancer cells ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

A: Immunofluorescence staining was performed on the M1 macrophage markers (F4/80, iNOS) and M2 macrophage markers (F4/80, CD206) in the 4T1 transplanted tumor tissues, scale bar = 100 μm ; B: Comparison of the M2/M1 macrophage ratio in 4T1 transplanted tumors with the treatment of 500 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ APS; C, D: Comparison of the expression of M1 macrophage biomarkers iNOS and CD86, and CD206 and CD163 in different groups of 4T1 transplanted tumors; E: Western blot detection of the expression of iNOS, CD86, CD206 and CD163 proteins in 4T1 transplanted tumor tissues; F: Comparison of apoptotic cells in different groups of MDA-MB-231 xenograft tumors; G: Apoptosis images of 4T1 transplanted tumor tissues; *** $P < 0.001$ vs Control group.

噬细胞的比例 (图 3H 和图 3I)。然而,APS 处理上调了 MDA-MB-231 衍生的外泌体中 miR-650 的表达 (图 3D),而 miR-650 在乳腺癌患者的血清外泌体中表达上调 (图 3C),该实验选择了 miR-107 和 miR-

346 进行进一步研究。

2.4 APS 通过调节 miR-107 或 miR-346 外泌体可影响 M2 巨噬细胞极化 首先用 miR-107 抑制剂转染 MDA-MB-231 来下调外泌体 miR-107 的表达或用

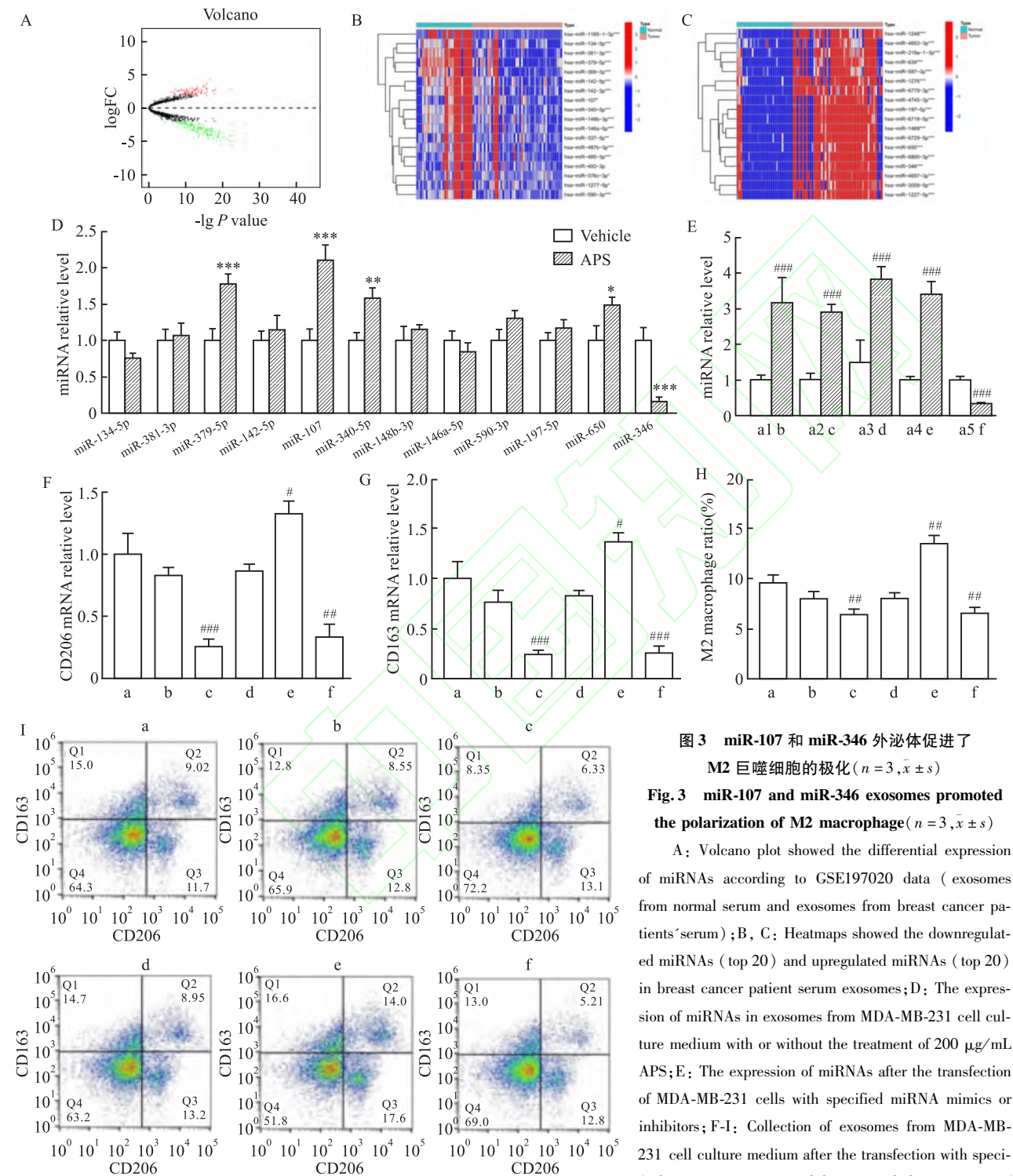


图3 miR-107 和 miR-346 外泌体促进了 M2 巨噬细胞的极化 (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

Fig.3 miR-107 and miR-346 exosomes promoted the polarization of M2 macrophage (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

A: Volcano plot showed the differential expression of miRNAs according to GSE197020 data (exosomes from normal serum and exosomes from breast cancer patients' serum); B, C: Heatmaps showed the downregulated miRNAs (top 20) and upregulated miRNAs (top 20) in breast cancer patient serum exosomes; D: The expression of miRNAs in exosomes from MDA-MB-231 cell culture medium with or without the treatment of 200 $\mu\text{g/mL}$ APS; E: The expression of miRNAs after the transfection of MDA-MB-231 cells with specified miRNA mimics or inhibitors; F-I: Collection of exosomes from MDA-MB-231 cell culture medium after the transfection with specified miRNA mimics or inhibitors, and the treatment of M0 macrophages. Comparison of CD206 mRNA (F) and CD163 mRNA (G) expression in macrophages, and comparison of M2 macrophage proportion (H) by flow cytometry (I); a: miR-NC group, 1-5: miR-379-5p, miR-107, miR-340-5p, miR-650 and miR-346; b: miR-379-5p-mimic group; c: miR-107-mimic group; d: miR-340-5p-mimic group; e: miR-650-mimic group; f: miR-346-inhibition group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Vehicle group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs miR-NC group.

miR-346-miRNAs 模拟物来上调 miR-346 的表达,然后用 APS 刺激 24 h,最终从不同来源的 MDA-MB-231 培养基收集这些外泌体来处理 M0 巨噬细胞

(图4A)。APS 处理增加了 MDA-MB-231 衍生外泌体中 miR-107 的表达,降低了 miR-346 的表达,而 miR-107 抑制剂或 miR-346 模拟物可以逆转 APS 处

理对 miR-107 或 miR-346 来自 MDA-MB-231 衍生外泌体表达的影响(图 4B、4C)。经 APS 处理的 MDA-MB-231 产生的外泌体显著降低了巨噬细胞中 CD206 和 CD163 mRNA 的表达水平,但 miR-107 抑制或 miR-346-miRNAs 模拟物也可以逆转 APS 的这些功能(图 4D、4E)。同样,APS 处理的 MDA-MB-231 产生的外泌体抑制了 M2 巨噬细胞的极化,而 miR-107 抑制或 miR-346 增加削弱了 APS 抑制 M2 巨噬细胞极化的功能(图 4F、4G)。APS 治疗可能通过改变 MDA-MB-231 的外泌体 miR-107 或

miR346 来抑制 M2 巨噬细胞的极化。

2.5 APS 通过外泌体 miR-107 或 miR-346 影响乳腺癌细胞的增殖和转移 从不同乳腺癌细胞培养基收集外泌体治疗 M0 巨噬细胞,研究 MDA-MB-231 生物学特性的改变(图 5A)。研究表明,APS 组 MDA-MB-231 的细胞活力低于未干预组,与 APS 组相比,抑制 miR-107 或 miR-346-miRNAs 模拟物可提高 MDA-MB-231 的细胞活力(图 5B)。同时,在细胞增殖形成试验(图 5C、5D)、细胞划痕试验(图 5E、5F)和转染细胞侵袭实验(图5G、5H)中也观察

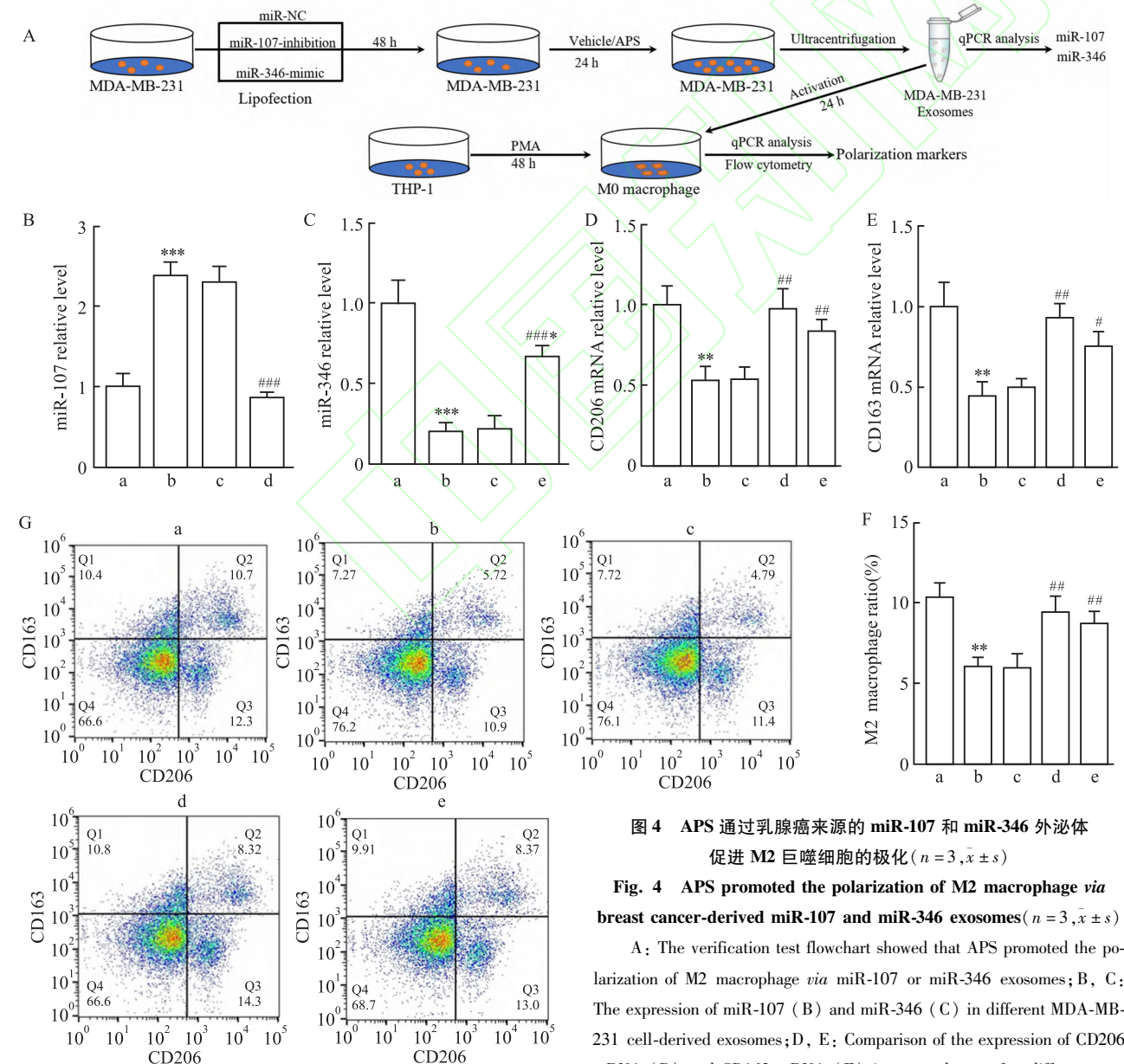


图 4 APS 通过乳腺癌来源的 miR-107 和 miR-346 外泌体促进 M2 巨噬细胞的极化 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 4 APS promoted the polarization of M2 macrophage via breast cancer-derived miR-107 and miR-346 exosomes ($n=3, \bar{x} \pm s$)

A: The verification test flowchart showed that APS promoted the polarization of M2 macrophage via miR-107 or miR-346 exosomes; B, C: The expression of miR-107 (B) and miR-346 (C) in different MDA-MB-231 cell-derived exosomes; D, E: Comparison of the expression of CD206 mRNA (D) and CD163 mRNA (E) in macrophages after different exosome treatments; F, G: Comparison of the ratio of M2 macrophages (F) analyzed by flow cytometry (G); a: Vehicle group; b: APS group; c: miR-NC group; d: miR-107-inhibition group; e: miR-346-mimic group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Vehicle group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs APS group.

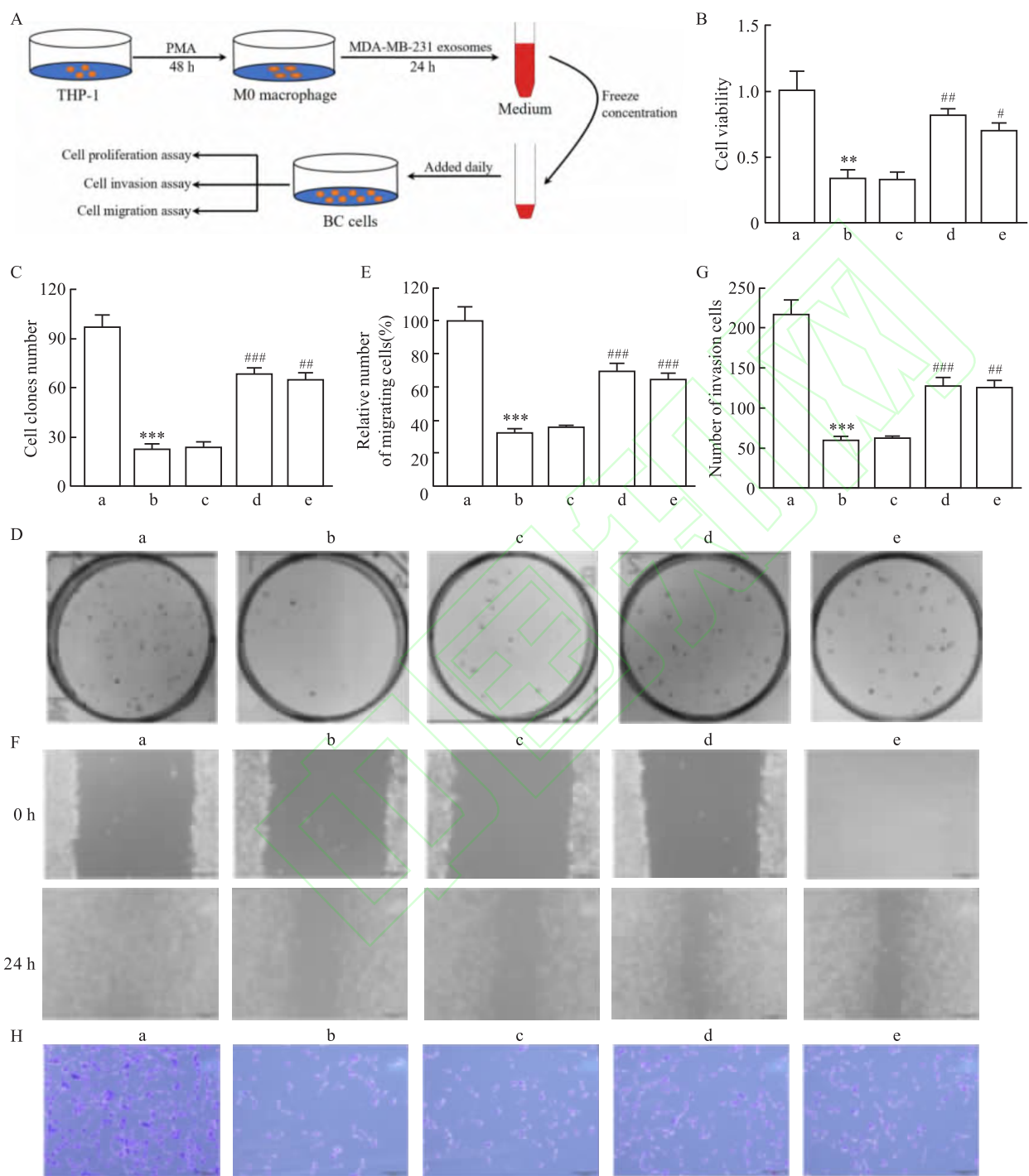


图5 APS 通过乳腺癌来源的 miR-107 和 miR-346 外泌体抑制乳腺癌细胞的增殖和转移 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 5 APS inhibited the proliferation and metastasis of breast cancer cells via breast cancer-derived miR-107 and miR-346 exosomes ($n=3, \bar{x} \pm s$)

A: The differences in cell activity, proliferation, invasion and migration of MDA-MB-231 cells after the treatment with APS was analyzed; B: The cell viability after culturing MDA-MB-231 cells under different conditions was compared; C, D: Compare the cell clone number of MDA-MB-231 after media treatment with different conditions (C) analyzed by cell clonal formation test (D) and light microscope at $\times 100$; E, F: Compare the migrating cell number of MDA-MB-231 after media treatment with different conditions (E) analyzed by cell scratch test (F) and light microscope at $\times 100$; G, H: Compare the invading cell number of MDA-MB-231 after media treatment with different conditions (G) analyzed by transwell invasion test (H) and light microscope at $\times 100$; a: Vehicle group; b: APS group; c: miR-NC group; d: miR-107-inhibition group; e: miR-346-mimic group; * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Vehicle group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs APS group.

到同样的趋势。研究表明,APS 可能通过调控乳腺癌细胞来源外泌体的 miR-107 或 miR-346 而影响乳腺癌增殖和转移。

3 讨论

全世界每年有 230 万女性乳腺癌新发病例,约有 70 万患者死于乳腺癌^[2-3]。手术治疗、放疗和化疗是乳腺癌患者最常见的 3 种治疗方法。然而。许多乳腺癌治疗药物的副作用严重影响患者的生活质量。APS 是中药黄芪的主要活性成分,通过 Wnt/ β -Catenin 通路^[4]的多个靶标抑制乳腺癌细胞的增殖和转移而发挥抗肿瘤活性,并通过激活巨噬细胞活性^[5-6],增强宿主免疫功能直接诱导肿瘤细胞凋亡或影响癌基因的表达^[7-8],因此,研究其治疗效果和治疗靶点是非常有必要的。

外泌体是由细胞内溶酶体衍生的纳米级囊泡,在肿瘤微环境中介导肿瘤细胞与 TAMs 间信息传递中发挥着重要作用^[9],研究^[10-11]表明肿瘤来源的外泌体 miRNAs 可使巨噬细胞极化,并靶向多种信号通路影响肿瘤进展^[12-13],且 miR-107、miR-346 的表达可以影响巨噬细胞黏附^[14-15],在改变巨噬细胞功能中发挥重要作用^[16]。而乳腺癌来源的外泌体中 miR-107 和 miR-346 影响巨噬细胞极化的可能机制,目前鲜有报道。本研究表明 APS 调节 TAMs 极化增强了肿瘤微环境中免疫细胞的抗肿瘤活性。通过上调乳腺癌来源外泌体 miR-107 或下调 miR-346 可以促进 M1 巨噬细胞极化、抑制 M2 巨噬细胞极化,并抑制了乳腺癌细胞的增殖和迁移。

本实验结果显示,APS 治疗增加了乳腺癌移植组织中的 M1 TAMs,减少了 M2 TAMs,在体外改变了乳腺癌细胞来源的外泌体数量和质量,并通过调节外泌体的质量来调节巨噬细胞的极化,促使乳腺癌来源的外泌体 miR-107 或 miR-346 介导巨噬细胞极化来抑制乳腺癌细胞的增殖和转移。研究表明,乳腺癌来源的外泌体 miR-107 或 miR-346 影响巨噬细胞极化可能是 APS 发挥抗肿瘤效应的机制之一。

参考文献

[1] Moutinho C, Esteller M. microRNAs and epigenetics[J]. Adv Cancer Res, 2017, 135: 189 – 220. doi:10.1016/bs.acr.2017.06.003.

[2] Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern[J]. Br J Radiol, 2022, 95(1130): 20211033. doi:10.1259/bjr.20211033.

[3] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023

[J]. CA A Cancer J Clin, 2023, 73(1): 17 – 48. doi:10.3322/caac.21763.

[4] Ben-Dror J, Shalamov M, Sonnenblick A. The history of early breast cancer treatment[J]. Genes, 2022, 13(6): 960. doi:10.3390/genes13060960.

[5] Li C X, Liu Y, Zhang Y Z, et al. Astragalus polysaccharide: a review of its immunomodulatory effect[J]. Arch Pharm Res, 2022, 45(6): 367 – 89. doi:10.1007/s12272 – 022 – 01393 – 3.

[6] Yang S, Sun S, Xu W, et al. Astragalus polysaccharide inhibits breast cancer cell migration and invasion by regulating epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(4): 1819 – 32. doi:10.3892/mmr.2020.10983.

[7] Tian X, Wu Y, Yang Y, et al. Long noncoding RNA LINC00662 promotes M2 macrophage polarization and hepatocellular carcinoma progression via activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. Mol Oncol, 2020, 14(2): 462 – 83. doi:10.1002/1878 – 0261.12606.

[8] Liu Y, Li X, Zhang Y, et al. An miR-340-5p-macrophage feedback loop modulates the progression and tumor microenvironment of glioblastoma multiforme[J]. Oncogene, 2019, 38(49): 7399 – 415. doi:10.1038/s41388 – 019 – 0952 – x.

[9] 黎劭潇, 陆枢枢, 张佳宁, 等. 肿瘤微环境中细胞外囊泡释放对肿瘤免疫的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(8): 1302 – 6. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2024.08.002.

[9] Li J X, Lu S Y, Zhang J N, et al. Effect of extracellular vesicle release on tumor immunity in tumor microenvironment[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(8): 1302 – 6. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2024.08.002.

[10] Li W, Hu X, Li Y, et al. Cytotoxicity and growth-inhibiting activity of Astragalus polysaccharides against breast cancer via the regulation of EGFR and ANXA1[J]. J Nat Med, 2021, 75(4): 854 – 70. doi:10.1007/s11418 – 021 – 01525 – x.

[11] Li X, Guo X, Li J, et al. Preventing effect of Astragalus polysaccharide on cardiotoxicity induced by chemotherapy of epirubicin: a pilot study[J]. Medicine, 2022, 101(32): e30000. doi:10.1097/MD.00000000000030000.

[12] Diotallevi A, De Santi M, Buffi G, et al. Leishmania infection induces microRNA hsa-miR-346 in human cell line-derived macrophages[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1019. doi:10.3389/fmicb.2018.01019.

[13] Xiang Y, Guo Z, Zhu P, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science[J]. Cancer Med, 2019, 8(5): 1958 – 75. doi:10.1002/cam4.2108.

[14] Zhang X, Qiu H, Li C, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer[J]. Biosci Trends, 2021, 15(5): 283 – 98. doi:10.5582/bst.2021.01318.

[15] Pan Y, Yu Y, Wang X, et al. Tumor-associated macrophages in

tumor immunity[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 583084. doi: 10.3389/fimmu.2020.583084.

[16] Dai X, Lu L, Deng S, et al. USP7 targeting modulates anti-tumor

immune response by reprogramming Tumor-associated Macrophages in Lung Cancer[J]. *Theranostics*, 2020, 10(20): 9332 – 47. doi:10.7150/thno.47137.

Astragalus polysaccharide regulates exosomes derived from breast cancer cells and its effects on macrophage polarization and antitumor effects

Guan Chenjuan¹, Xie Caixia², Zheng Xiaojiao², Bao Nana², Wang Lu², Bai Wenhui², Qiao Shu², Zhang Haonan³

(¹Inner Mongolia University of Science and Technology Baotou Medical College, Baotou 014040;

²Dept of Blood Transfusion, ³Dept of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010)

Abstract Objective To investigate the effects and mechanisms of Astragalus Polysaccharin (APS) on the proliferation and metastasis of breast cancer cells by regulating miR-107 and miR-346-mediated macrophage polarization in breast cancer-derived exosomes. **Methods** Forty 8-week-old female BALB/c mice were selected and breast cancer xenograft models and 4T1 transplanted tumor models were established. The mice were divided into the control group and the APS group. The APS group mice received daily intragastric administration of APS for 25 days, while the control group mice were given the same amount of normal saline. After all treatments were completed, the mice were euthanized, and tumor tissues were isolated. Western blot and flow cytometry were used to detect the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67, CD206, CD163, inducible nitric-oxide synthase (iNOS), and CD86. The apoptosis of single-cell suspensions in tumor tissues was analyzed. Human breast cancer cell line MDA-MB-231 was cultured and stimulated with APS, and exosomes from the cell culture medium were collected. The proliferation, migration, and invasion of cells were detected by CCK-8 assay, scratch assay, permeability chamber cell invasion assay, and qRT-PCR. Differentially expressed genes were screened by bioinformatics. **Results** By measuring the expressions of molecules related to breast cancer cell proliferation and metastasis, it was shown that APS treatment reduced the expressions of proliferation-related proteins (PCNA and Ki-67) and metastasis-related proteins (Vimentin) in MDA-MB-231 xenograft tumor tissues; and the polarization of tumor-associated macrophages was observed. APS treatment of 4T1 transplanted tumor tissues could reduce the number of M2 macrophages and increase the number of M1 macrophages, resulting in a decrease in the ratio of M2/M1 macrophages and an increase in cell apoptosis in 4T1 transplanted tumor tissues. The expressions of related proteins iNOS and CD86 increased, and CD206 and CD163 decreased. After APS treatment, the exosomes produced by MDA-MB-231 reduced the polarization of M2 macrophages and affected the expressions of miR-107 and miR-346. **Conclusion** APS inhibits the polarization of M2 macrophages by regulating the expression of miR-107 or miR-346 in breast cancer cell-derived exosomes, ultimately inhibiting the proliferation and metastasis of breast cancer cells.

Key words breast cancer; astragalus polysaccharide; exosome; macrophage polarization; migration; invasion

Fund programs Science and Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2021GG0401); “Clinical Medicine + X Multidisciplinary” Joint Research Fund of Baotou Medical College (No. BYJJ-DXK 2022029)

Corresponding authors Qiao Shu, E-mail: qiaoshulili@163.com; Zhang Haonan, E-mail: zhnzczy@163.com