

学校代码: 10589

分 类 号:

学 号: 21220952000007

密 级:



海南大学

硕士学位论文

犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

作者 姓 名: 姜恒

导 师 姓 名: 刘萌萌/张红 迟庆安

学 科 专 业: 兽医

培 养 院 系: 热带农林学院

2024 年 3 月 20 日

**A Thesis Submitted to Hainan University for
the Degree of Master**

**Exploration of the Expression of miR-9 in
Exosomes Derived from Canine Mammary
Tumors and Its Role in Promoting Migration of
Canine Endothelial like Cells**

By: Jiang Heng

Supervisor: Liu Mengmeng, Zhang Hong, Chi Qingan

Major: Veterinary Medicine

Department: School of Tropical Agriculture and Forestry

Submitted time: May, 2024

摘要

背景: 犬乳腺肿瘤是母犬中最常见的肿瘤,超过半数的犬乳腺肿瘤属于恶性肿瘤,对母犬的健康和生命构成严重威胁。*miR-9* 的表达水平在人乳腺肿瘤中被发现与肿瘤恶性程度呈正相关关系。而在犬乳腺肿瘤中 *miR-9* 的调控作用还知之甚少。内皮细胞迁移是血管生成的初始阶段,本研究旨在揭示犬乳腺肿瘤外泌体中 *miR-9* 的表达情况及其对犬内皮细胞迁移的调节作用。

方法: 提取犬乳腺肿瘤细胞系外泌体,检测其 *miR-9* 的表达水平。收集胚胎犬心肌组织,诱导分化为内皮样细胞(ELCs)。通过犬乳腺肿瘤外泌体与犬内皮样细胞共培养,检测犬内皮样细胞对犬乳腺肿瘤外泌体的摄取能力。通过转染 *miR-9-5p* 模拟物,Transwell 迁移和侵袭试验检测犬乳腺肿瘤外泌体中 *miR-9* 对犬内皮样细胞迁移能力的影响。最后经荧光素酶报告试验、Western blot、转录组测序和 RT-qPCR 法探究 *miR-9* 的作用靶点。

结果: 本研究成功地提取了犬乳腺肿瘤细胞外泌体,并将犬心脏胚胎组织来源的原代细胞诱导为犬内皮样细胞。高表达 *miR-9* 的肿瘤外泌体能够被该内皮样细胞摄入,且 *miR-9* 的过表达促进了犬内皮样细胞的迁移和侵袭能力,调控了与细胞迁移相关的多个信号通路和八个基因,进一步研究发现 *miR-9* 靶向 *COL15A1* 基因,在蛋白质翻译过程中抑制血管生成抑制因子 collagen XV 的表达。

结论: 犬乳腺肿瘤的 *miR-9* 可通过外泌体进入犬内皮样细胞中,促进犬内皮样细胞的迁移和侵袭能力。因此, *miR-9* 可作为犬内皮细胞迁移和血管生成相关疾病的潜在诊断和治疗靶点,具有作为犬乳腺肿瘤生物标志物和临床治疗靶点的潜力,但尚需进一步研究。

关键词: 犬乳腺肿瘤; 犬内皮细胞; *miR-9*; 细胞迁移与侵袭; 外泌体

ABSTRACT

Background: Mammary gland tumor is the most commonly diagnosed tumor in female dogs, and more than half of them are diagnosed as malignant, posing a serious threat to the health and life of female dogs. The level of miR-9 expression in human breast tumors is directly linked to the severity of the cancer. However, we know little about the regulatory role of miR-9 in canine mammary gland tumors. Endothelial cell migration is the initial stage of angiogenesis. The objective of this study is to uncover the expression of miR-9 in exosomes derived from canine mammary gland tumors and investigate its regulatory influence on the migration of canine endothelial cells.

Methods: Exosomes were extracted from canine mammary gland tumor cell lines, and their miR-9 expression levels were detected. Embryonic canine myocardial tissues were collected and induced to differentiate into endothelial-like cells (ELCs). Through co-culture of canine mammary gland tumor exosomes and canine endothelial-like cells, the ability of canine endothelial-like cells to ingest canine mammary gland tumor exosomes was detected. The effect of miR-9 in canine mammary gland tumor exosomes on the migration ability of canine endothelial-like cells was detected by transfection of miR-9-5p mimics, Transwell migration and invasion assays. Finally, luciferase reporter assay, Western blot, transcriptome sequencing, and RT-qPCR were used to explore the target of miR-9.

Results: In this study, exosomes were successfully extracted from canine mammary gland tumor cells, and primary cells derived from canine embryonic heart tissues were induced to differentiate into canine endothelial-like cells. Tumor exosomes with high expression of miR-9 can be ingested by endothelial-like cells, and overexpression of miR-9 promotes the migration and invasion ability of canine endothelial-like cells, regulating multiple signaling pathways and eight genes related to cell migration. Further studies found that miR-9 targets the COL15A1 gene and inhibits the

expression of angiogenesis inhibitor collagen XV during protein translation.

Conclusion: miR-9 in canine mammary gland tumors can enter canine endothelial-like cells through exosomes and promote their migration and invasion ability. Therefore, miR-9 can be a potential diagnostic and therapeutic target for canine endothelial cell migration and angiogenesis-related diseases, and has the potential to be a biomarker and clinical therapeutic target for canine mammary gland tumors, but further research is needed.

Key Words: Canine mammary tumor; Canine endothelial cell; MiR-9; Cell migration and invasion; Exosome

目 录

1 前言.....	1
1.1 犬乳腺肿瘤概述.....	1
1.2 血管生成研究进展.....	2
1.2.1 血管生成与肿瘤发展.....	2
1.2.2 血管生成与内皮细胞迁移.....	4
1.2.3 miR-9 参与调控血管生成.....	5
1.3 外泌体是肿瘤疾病液体活检的潜在标志物.....	7
1.3.1 肿瘤外泌体通过 miRNA 影响受体细胞.....	7
1.3.2 外泌体用于肿瘤体液活检.....	9
1.4 miR-9 对乳腺肿瘤在临床应用上的前景.....	9
2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究.....	12
2.1 试验材料.....	12
2.1.1 主要试验材料.....	12
2.1.2 主要试剂材料.....	12
2.1.3 主要仪器设备.....	14
2.2.....	15
2.2.1 细胞培养.....	15
2.2.2 血管生成试验.....	15
2.2.3 逆转录-聚合酶链式反应(RT-qPCR).....	15
2.2.4 蛋白质免疫印迹(Western Blot).....	18
2.2.5 免疫荧光染色试验.....	19
2.2.6 细胞转染.....	20
2.2.7 细胞外泌体提取与鉴定.....	20
2.2.8 迁移和侵袭试验.....	21
2.2.9 miR-9 生物信息学分析.....	22
2.2.10 双荧光素酶试验.....	22
2.2.11 数据统计与分析.....	23
2.3 试验结果.....	23
2.3.1 犬内皮样细胞的培养和鉴定.....	23
2.3.2 乳腺肿瘤外泌体的提取和鉴定.....	26
2.3.3 犬乳腺肿瘤细胞外泌体具有将 miR-9 递送至犬内皮样细胞内的潜能.....	27
2.3.4 miR-9 促进了犬内皮样细胞的迁移和侵袭能力.....	28

2.3.5 miR-9 靶向 COL15A1 基因并抑制 collagen X V 蛋白表达	30
2.3.6 miR-9 影响蛋白翻译相关通路及血管生成相关基因	33
2.3.7 miR-9 影响犬内皮样细胞的血管生成相关基因	35
2.4 讨论	36
2.4.1 犬内皮样细胞的培养	36
2.4.2 犬乳腺肿瘤外泌体对内皮细胞的影响	37
2.4.3 肿瘤外泌体 miRNA 促进肿瘤发展	38
2.4.4 miR-9 促进内皮细胞的迁移与侵袭能力	39
3 结论	43
4 参考文献	44
缩略语表	50

1 前言

1.1 犬乳腺肿瘤概述

犬乳腺肿瘤（CMT）是母犬中最常被诊断出的肿瘤，母犬的乳腺肿瘤可占据母犬生殖系统疾病的 83%。犬体内出现乳腺肿块为本病的典型症状特征，瘤块一般无痛，常伴有皮肤损伤、乳房肿胀等症状，因此它们是一个不得不去注意的临床问题。在犬乳腺肿瘤中，大约 50%是恶性的恶性犬乳腺肿瘤包括一种肿瘤细胞类型（单纯癌）或两种细胞类型（由恶性上皮成分和良性上皮成分组成的复合癌），这意味着这些肿瘤有可能对母犬的健康和生命构成严重威胁^[1]。因此，对于兽医和宠物主人来说，了解和识别犬乳腺肿瘤的症状、早期发现并采取适当的治疗措施至关重要。其中最常见的肿瘤类型是管状癌（腺癌），其次是乳头状癌、实性癌、复合癌和肉瘤癌，良性乳腺肿瘤主要是纤维腺瘤、导管乳头状瘤、良性混合瘤和单纯腺瘤^[2]。恶性肿瘤的分级不仅基于肿瘤类型，还取决于是否存在显著的细胞核和细胞多形性、有丝分裂指数、坏死区的存在、肿瘤周围和淋巴浸润以及区域淋巴结转移；犬乳腺肿瘤的预后评估通常基于临床分期、肿瘤大小、淋巴结状况、影像学显示的远端转移证据、淋巴或血管浸润，以及按照世界卫生组织（WHO）指南在肿瘤切除后对肿瘤进行的组织病理学检查^[4]。犬乳腺肿瘤主要发生在老年母犬中，通常年龄在 8 至 10 岁之间^[3]。犬乳腺肿瘤的致病原因并未完全知晓，然而，已经指出了一些风险因素，例如荷尔蒙、营养和遗传因素，性激素是导致乳腺肿瘤生长的主要风险因素之一，如果母犬在第一次发情前进行卵巢切除，乳腺肿瘤生长的风险为 0.5%，但如果母犬在发情后立即进行切除或在任何其他时间进行切除，风险分别为 8%和 26%^[5-6]。并且，多项研究表明，某些品种具有遗传倾向患上 CMT，例如迷你贵妇犬、腊肠犬、马尔济斯犬、约克夏梗、可卡犬和德国牧羊犬^[6]。

目前为止，对于犬乳腺肿瘤最有效的治疗方法是手术，包括切除病变的腺体和局部淋巴结，通常也会进行卵巢子宫切除术^[7]。然而，有研究表明，并非所有犬乳腺肿瘤病例都能从卵巢子宫切除术中受益^[8]。在大多数恶性犬乳腺肿瘤病例中，会进行化疗或放疗，但化疗和放疗的成本都很高，而且关于它们在治疗中的疗效常常有限^[9]。因此，犬乳腺肿瘤的早期检测对患者的预后至关重要。生物标志物是可以在血液或其他组织（如：肿瘤组织）中测量的蛋白质，可以提供有关疾病存在、治疗结果或患者

进一步预后的信息,对于犬类乳腺肿瘤而言,寻找最合适的生物标志物是有利于改善其诊断和预后窘况的关键方向。在之前的研究中指出,miRNA 在癌症发生发展的各个方面,如增殖、侵袭和血管生成中,都发挥着重要的作用。并且,某些异常表达的miRNA 往往预示着恶性肿瘤的发生发展或预后不良。总之,作为肿瘤生物标志物的生物标志物,miRNA 表现出了巨大的潜力,以 miRNA 的异常表达反映肿瘤的发生、发展、转移和恶化等过程。因此,miRNA 作为犬乳腺肿瘤生物标志物是可行的。

1.2 血管生成研究进展

1.2.1 血管生成与肿瘤发展

血管生成(Angiogenesis)是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管。血管生成在肿瘤转移过程中起着重要的作用,在人医上有研究发现乳腺肿瘤过度表达血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF),并且抑制血管生成有利于乳腺肿瘤的治疗和预后^[10-11]。肿瘤的发展与新生血管的形成密切相关,肿瘤细胞持续分裂和增殖,消耗大量的氧气和营养物质。当实体瘤的体积小于 2 mm^3 时,可以通过扩散获得氧气和营养物质^[12]。随着肿瘤组织的逐渐生长,肿瘤需要形成新的血管来获取营养和氧气,以确保肿瘤呈指数增长,当肿瘤生长到一定大小时,需要通过足够的新生血管来供应营养和氧气^[12]。肿瘤细胞还可以释放血管生成因子,如 VEGF,来诱导周围组织和血管内皮细胞的增殖和迁移,从而促进肿瘤血管的形成^[13-14]。血管生成还可以促进肿瘤转移过程,通过释放血管生成因子,调节肿瘤转移前生态位的微环境。这些血管生成因子可以促进周围组织和血管内皮细胞的增殖和迁移,进一步促进肿瘤血管的形成^[15]。从人肾癌干细胞释放的 CD105 阳性微囊还通过赋予正常人内皮细胞激活的血管生成表型来刺激血管生成,以形成肺转移前的利基,从而显著促进肺转移^[16]。此外,血管生成还与肿瘤转移前生态位中的其他细胞类型相互作用,如免疫细胞、成纤维细胞等。这些细胞通过释放细胞因子、生长因子等物质,参与到血管生成和肿瘤转移的调控过程中。而肿瘤转移前生态位可以通过相互作用和调节周围组织和细胞的信号通路来促进血管生成,这为肿瘤细胞的转移提供了必要的支持^[14]。

转移前生态位可以被定义为支持和接受的组织微环境,经历一系列的分子和细胞变化,形成转移指定的位置,或肥沃的土壤,为转移的肿瘤细胞种子定植做准备,从

而支持肿瘤在远处器官的定居，促进肿瘤的转移^[17]。这个概念类似于生理学的“生态位”，因为建立了一个范例，赋予这个生态位内的细胞特定的功能^[17]。转移前的生态位可以通过不同的机制在未来的转移部位启动和建立，使远处的器官适合于扩散肿瘤细胞以进行定植^[18]。原发肿瘤衍生的成分、肿瘤动员的骨髓来源细胞（BMDCs）和宿主的局部基质微环境（或未来转移器官成分）是形成转移前生态位的三个主要因素，这些促进预转移灶形成的分子成分，除了由肿瘤细胞分泌外，还可以由髓系细胞和基质细胞产生，它们与细胞成分共同工作，以启动、极化和建立未来转移器官中的预转移灶^[19]。

内皮细胞起源于中胚层细胞的连续分化过程，产生造血干细胞，随后形成原始血岛结构，随着外周血岛的形成，造血干细胞逐渐分化为内皮细胞的前体细胞——血管母细胞^[19]。在血管内皮生长因子的作用下，血管母细胞和新生内皮细胞在主要由胶原蛋白和透明质酸构成的基质上进行迁移，从而促使血岛融合并形成最初的血管丛，这些丛状结构会进一步发育成较大的血管，并在此过程中引发胚胎的血管化^[20]。血管生成是指在已存在的血管基础上形成新的血管，这个过程与血管发生不同，肿瘤在转移前的生态位可能会增加血管生成和血管通透性，促进转移过程，高转移性肿瘤在形成转移前生态位时会招募 TIE2+单核细胞和内皮祖细胞，形成高水平的前血管生成微环境，包括血管内皮生长因子和其他前血管生成因子，并触发血管生成的过程，从而促进癌症进展后期转移的形成^[20]。黑色素瘤的外泌体可通过促发血管渗漏和由受体酪氨酸激酶诱导利基内骨髓前体细胞再编程为促血管生成表型，以促进原发肿瘤的转移过程^[21]。转移性乳腺癌细胞外泌体中的 miR-105 有可能透过调控细胞间紧密连接蛋白，干扰形成转移前生态位的宿主体内的血管内皮屏障，引发远处器官血管通透性的增加，从而助长癌细胞的转移^[22]。此外，乳腺肿瘤细胞表达的表皮生长因子受体配体表型调节蛋白、环氧合酶-2、基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-2 共同重建多功能血管重塑程序，以增加血管通透性和促进肺转移进展^[23]。有研究表明，通过抑制血管生成来调节肿瘤转移前生态位的形成对乳腺肿瘤细胞的生长具有抑制作用^[13]。

综上所述，血管生成和肿瘤转移前生态位之间存在着密切的联系。肿瘤转移前生态位的形成和血管生成密不可分，其中血管生成是肿瘤转移前生态位中不可或缺的一步。这一过程通常是通过促进内皮细胞的迁移侵袭能力以及增强血管通透性等方式实现的，从而导致血管渗漏等现象，进而促进肿瘤转移前生态位的形成并对肿瘤转移起到促进作用。因此，深入研究血管生成和肿瘤转移前生态位的关系对于防治肿瘤的转

移与生长具有重要的意义。

1.2.2 血管生成与内皮细胞迁移

传统观点认为肿瘤的血管生成模式主要包括血管发生和血管新生,它们的共同特点是依赖内皮细胞。内皮细胞是构成血管内壁的单层细胞,它是血管生成的主体细胞,在血管生成过程中,内皮细胞通过增殖、迁移和分化等过程,形成新的血管结构^[24]。血管壁内皮细胞的紧密对接和排列导致它们能够形成一种屏障,限制水、蛋白质和血细胞在血管内和间质之间的运动,这些新生成的血管可以为肿瘤提供必要的营养和氧气,促进肿瘤的生长和转移。因此,内皮细胞的正常功能和活性对于维持血管生成的平衡和稳定至关重要^[25]。细胞因子、生长因子、凝血酶等多种生物活性物质在维持血管屏障完整性和调节血管张力方面发挥重要作用。内皮细胞在炎症反应和血液凝固等生理和病理过程中,可以通过与白细胞互动的方式发挥作用,因此,研究血管内皮细胞的生理功能、分子调控机制及其与多种疾病的关系,对于深入了解和预防多种疾病具有重要意义^[15]。其次,内皮细胞还参与调控血管生成的信号通路。内皮细胞表面存在多种受体,可以响应各种生长因子、细胞因子等信号分子的刺激,从而调控内皮细胞的分化、增殖和迁移这些过程^[15]。例如,血管内皮生长因子是血管生成过程中最重要的生长因子之一,它通过与内皮细胞表面的血管内皮生长因子受体结合,激活一系列信号通路,促进内皮细胞的增殖和迁移^[15]。

内皮细胞的移动是血管生成过程不可或缺的一部分,这需要对细胞的收缩和非收缩状态进行严密的调节,当内皮细胞受到血管生成刺激因子的作用时,会发生形态学改变,如细胞骨架重组、细胞间连接松散等,从而具备迁移能力^[14]。内皮细胞迁移是血管生成过程中的一个关键步骤,它涉及到内皮细胞从已有的血管结构中脱离出来,并向新的血管生长点迁移的过程。这一过程对于新血管的形成和肿瘤的生长、转移具有重要意义^[14]。内皮细胞迁移是血管生成的基础。在血管生成过程中,内皮细胞通过迁移和增殖,形成新的血管结构^[15]。内皮细胞从其原位迁移的行为可分为三种主要机制,分别为趋化性、趋触性以及机械性。其中,趋化性指的是内皮细胞向可溶性趋化剂梯度方向迁移;趋触性包括了细胞向固定化配体梯度方向选向迁移的情况;机械性是指内皮细胞在机械作用下发生的定向迁移现象,也就是说,内皮细胞迁移是一个机械集成的分子过程,涉及信号转导、细胞黏附等过程^[26]。

迁移能力是内皮细胞对于新血管的形成至关重要的一部分,它决定了血管生成的

速度和效率^[27]。此外,内皮细胞迁移还与肿瘤的生长和转移密切相关。肿瘤细胞可以通过释放血管生成因子等物质,诱导内皮细胞的迁移和血管生成,从而为肿瘤的生长和转移提供必要的血供和营养支持^[27]。同时,内皮细胞迁移也参与了肿瘤的侵袭和转移过程,例如在肿瘤转移前生态位中,内皮细胞迁移可以促进肿瘤细胞的侵袭和迁移,为肿瘤细胞的转移提供便利^[27]。

内皮细胞迁移和血管生成在肿瘤的生长和转移过程中扮演着关键的角色。内皮细胞迁移参与调节了肿瘤形成和血管生成这些过程,其中血管生成成为肿瘤生长和转移提供了获得肿瘤形成所需要的大量营养和氧气。因此,研究内皮细胞迁移和血管生成的相关机制,可以为揭示肿瘤生长和转移的分子机制提供理论基础,为开发新的治疗策略提供指导思路。

1.2.3 miR-9 参与调控血管生成

肿瘤组织的血管生成是一个复杂且多步骤的过程,涉及众多信号通路以及细胞间的相互作用。恶性肿瘤细胞需要营养物质和氧气来维持生存以及进行增殖,因此它们需要血管参与作用,通过血管中的血液循环系统获取这些必需的营养物质。早期观察发现,快速生长的肿瘤血管化程度很高,而处于休眠状态的肿瘤则不然,这一现象表明,肿瘤血管生成(即肿瘤血管的新生)的启动是肿瘤进展所必需的^[27]。肿瘤发展必须依靠新的血管供应,因此肿瘤细胞可以通过刺激血管生成过程来满足其能量需求。该过程受到多种细胞因子的调节,如刺激血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等。肿瘤血管的形成方式与正常血管有所区别,其血管壁薄、不规则,常处于异常扩张状态,使之易发生渗漏、破裂等情况。因此,抑制肿瘤新血管生成成为了目前研究重点之一,可通过药物干预和注射抑制血管成生的蛋白等方式,取得肯定的抗肿瘤效果^[28]。该理论在探究肿瘤增殖过程机制研究方面起到了巨大的作用。在开始生长的早期,肿瘤细胞需要获取大量的氧气和营养物质,用来维持其快速增殖,但随着肿瘤细胞的发展,其与周围现有血管的距离逐渐增大,导致营养和氧气的供应无法满足其需求。因此,为了应对这一问题,肿瘤细胞会释放一系列的生长因子和信号分子来刺激新血管的生成,进而形成新的血管网络。2003年,一项临床试验显示,与单独使用化疗相比,将化疗与针对抗血管内皮生长因子的人源化中和抗体联合使用时,转移性结直肠癌患者的生存期得到了延长,这一结果证实了抗血管生成疗法在治疗癌症方面的有效性^[29]。自这项研究以来,抗血管生成疗法在癌症治疗中的应用得到了广

1 前言

泛的研究和关注。该领域得到了广泛的关注和探索。目前,越来越多的临床试验正在致力于探究抗血管生成疗法在不同类型癌症中的疗效,以期为患者提供更全面有效的治疗方案。抑制血管生成是抗血管生成疗法的主要作用机制,其能够有效地限制肿瘤细胞的生长和扩散,并提高患者的生存期。总之,这项临床试验的成功不仅为抗血管生成疗法在癌症治疗中的应用提供了坚实的证据,也为未来的研究和发展奠定了坚实的基础。但到目前为止,抗血管生成治疗的成功相当有限,在耐药发生之前只能提供肿瘤生长的短期缓解,通常会带来适度的生存好处^[30]。肿瘤抗血管生成治疗的机制多种多样,其中包括缺氧直接作用、周围组织正常血管的共择以及血管拟态等;此外,基质细胞也发挥着重要贡献,其中包括招募肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)、内皮祖细胞(EPC)以及促血管生成髓系细胞,同时上调替代性促血管生成因子等^[31-32]。

近年来,越来越多的研究表明 miRNA 在肿瘤血管生成中发挥着关键的作用,有研究发现,miR-9 可以通过 AKT 自噬途径促进内皮细胞的生成与分化,并且肿瘤来源的 miR-9 还可以激活 JAK-STAT 通路,促进内皮细胞迁移和血管生成,导致肿瘤恶化以及抗血管疗法失效^[34]。在体外试验中,miR-9 过表达可以促进人类内皮细胞的迁移和侵袭能力^[35]。通过 EndoDB 数据库,可以发现 miR-9 及其不但在胶质母细胞瘤中过表达,还能通过促进血管生成水平来促进肿瘤进展^[36]。在心肌细胞模型中已经存在了关于 miR-9 和 PDGFR- β 的负调控的描述^[37]。miR-9 在 PDGFR- β 介导的三阴性乳腺癌的血管生成特性中起到了直接抑制 STARD13,导致血管生成被促进^[38]。而在神经母细胞瘤中,miR-9 通过直接靶向 3'UTR 区来减弱基质金属蛋白酶-14 的表达,并在体内外抑制神经母细胞瘤细胞的侵袭、转移和血管生成^[39]。miR-9 正是通过调节 VEGF-A 的表达来影响肿瘤新生血管生成的。研究表明,在多种类型的肿瘤中,包括乳腺癌、肺癌等,miR-9 的表达水平往往与肿瘤的血管密度呈正相关^[40]。当 miR-9 表达增加时,它抑制 VEGF-A 的表达,从而抑制肿瘤的新生血管生成。相反,当 miR-9 表达降低时,VEGF-A 的表达增加,进而促进肿瘤血管的形成。除了直接调节 VEGF-A 的表达外,miR-9 还可能通过其他途径影响肿瘤血管生成,例如,它可能参与调节内皮细胞的增殖、迁移和分化,或者影响血管生成相关基因的表达^[41]。这些复杂的相互作用使得 miR-9 在肿瘤血管生成中发挥着多面性的角色。

通过之前的研究可知,miR-9 在恶性肿瘤中常常发挥促进血管生成的作用,从而加速肿瘤的转移过程。但是,在犬内皮细胞中 miR-9 的具体影响机制目前仍未能够得到深入的探究。因此,未来的研究可以结合各种试验手段,进一步开展 miR-9 的功能

与调控机制研究，以期为恶性肿瘤的治疗提供新的治疗策略和治疗途径。

1.3 外泌体是肿瘤疾病液体活检的潜在标志物

1.3.1 肿瘤外泌体通过 miRNA 影响受体细胞

外泌体是一种由细胞分泌的微小囊泡，最初是在网织红细胞转变为成熟红细胞的过程中被发现的，其具有脂质双层膜，直径在 30~150 nm 之间，现今特指直径在 40~100 nm 的杯状囊泡^[42]。早期的研究发现，外泌体携带着各种生物活性分子，如蛋白质、脂类和非编码的 RNA，它们可以传递到受体细胞，并对这些细胞产生生理或病理效应。随着相关领域研究的不断深入，学者们已经发现外泌体所参与的不仅仅是细胞间物质与信息的传递，同时也存在于多种活细胞中，包括肿瘤细胞等，且相对而言，肿瘤细胞分泌的外泌体量远高于非肿瘤细胞的分泌量^[43]。MicroRNA (miRNA) 是一小类内源性非编码 RNA，是肿瘤来源的外泌体携带的主要生物活性成分。外泌体包裹的 miRNA 调节受体细胞中的基因表达，从而促进肿瘤的侵袭性，如 Caveolin-1 阳性的大肿瘤体可以介导 miR-1227 从致瘤性前列腺细胞向癌症相关成纤维细胞 (CAF) 的细胞间转移，促进 CAF 向转移前生态位形成的次级部位的迁移^[42]。此外，含有 DNA 片段的肿瘤源性外泌体一旦转移，可能会影响靶向肿瘤细胞的转移行为。这些突变的 DNA 片段有可能被肿瘤细胞摄取，从而改变其遗传特性，影响其增殖、迁移和侵袭等能力，进而促进肿瘤细胞的转移和扩散^[42]。

肿瘤来源的细胞外囊泡可能会远离其原始部位，作为潜在的信使来诱导转移前的微环境形成。其中，外泌体作为细胞外囊泡，它囊泡内部含有蛋白质、mRNA、miRNA、小 RNA 和 DNA 片段，它通过调节肿瘤细胞与周围成分之间的通信或通过水平将其内容物转移到受体细胞来促进转移前生态位的形成^[43]。肿瘤来源的外泌体 miRNA 和蛋白质对接受外泌体的受体细胞进行重新编程或培养，使其向有利于转移和促炎的表型转变，从而产生肿瘤转移前生态位^[44]。有研究表明，来自转移性肿瘤的外泌体有助于在肺内建立良好的局部微环境，支持播散性乳腺癌的生存和生长^[45-46]。肿瘤来源的外泌体可能介导肿瘤细胞和宿主细胞之间的串联，在肿瘤转移前生态位形成的次级微环境中。肿瘤来源的外泌体中的骨桥蛋白已被发现有助于 BMDC 动员和肿瘤细胞的定植^[47]。同样，乳腺肿瘤细胞分泌的外泌体也通过招募免疫细胞和影响基质细胞的代谢重新编程来促进脑内转移前生态位的形成^[48]。

1 前言

因此, 针对肿瘤的转移机制从肿瘤源性外泌体的角度进行深入研究, 在其中探究 DNA/RNA 片段的存在形式、分布规律、物质特性及功能表现等, 对于揭示肿瘤细胞的转移能力、预测肿瘤转移的风险、筛选肿瘤靶向治疗药物等具有重要意义。此外, 通过对外泌体中含有的生物学信息进行分析和整合, 也可能为肿瘤的诊断和治疗提供新的思路和方法, 为临床转化研究提供了新的途径和可能性。因此, 肿瘤源性外泌体中的 DNA/RNA 片段的研究具有非常重要的临床意义和研究价值。

在 miRNA 被发现之后, 人们就致力于探究 miRNA 的调控机制以及其与恶性肿瘤疾病之间的关系。通过临床研究和构建癌症与基因相关数据库 (如: The Cancer Genome Atlas, TCGA 数据库), 人们发现 miRNA 往往伴随着肿瘤的恶化而异常表达。在以往的研究中, Ki-67 和 PCNA 是肿瘤细胞增殖的生物标志物, 而 p53 是肿瘤转化和凋亡的标志物。作为生物标志物, 它们常用于评估肿瘤的增殖潜能对于确定肿瘤的恶性程度具有重要意义。高增殖率与肿瘤快速生长及其引起局部和远处转移的能力相关。上皮间质转化 (EMT) 作为肿瘤侵袭、转移和发展过程中的一个重要环节, 其对于转化阶段间皮细胞极性和细胞间密集连接的丧失, 以及其后获得的浸润性和游走迁移能力, 从而促使其转变为具有间质细胞形态和特性的细胞在此过程中具有重要作用^[49]。EMT 的发生使癌细胞得以更便捷地渗透到邻近间质, 甚至有可能发生远处转移, 造成严重危害。有研究表明, miRNA 通过调节某些关键干细胞, 调控基因的表达和调节 EMT 过程^[50]。由此, MiRNA 在临床应用上展现出巨大的潜力, 许多肿瘤相关的研究中将其视为早期诊断方向。MiRNA 作为一种新型的生物标志物, 其组织特异性和在生物体液中的稳定性使得它成为肿瘤非侵入性诊断的理想选择, 其长期异常表达往往预示着肿瘤的发生、发展或者转移。因为肿瘤来源的 miRNA 可以存在于血液中, 并且似乎稳定地受到循环中内源性核糖核酸酶活性的保护, 所以通过血浆或血清中的 miRNA 表达谱分析, 医学研究人员有可能筛选出与乳腺肿瘤发生、发展密切相关的 miRNA 生物标志物, 并通过对这个生物标志物机制的探究以及其与乳腺肿瘤恶化程度之间的关系, 实现对肿瘤的早期筛查和诊断^[52]。血清中 miRNA 作为肿瘤诊断和预后的生物标志物, 在人类肿瘤学研究中得到了广泛的应用, 如: 血清中 miR-21 作为结直肠癌诊断和预后的生物标志物, 血清和组织中 miR-21 的高表达与肿瘤大小、远处转移和生存不良显著相关, 并得以证明血清 miR-21 是结直肠癌的独立预后指标^[53]。

1.3.2 外泌体用于肿瘤体液活检

肿瘤微环境（Tumor micro-environment, TME）是一个复杂的细胞内环境，它围绕着癌细胞，包含多种细胞成分和非细胞成分，包括癌症相关成纤维细胞、血管、神经纤维、免疫细胞、其他间质细胞，以及含有各种遗传信号的外泌体等胞外囊泡，以及肿瘤来源外泌体。肿瘤来源的外泌体可能参与肿瘤免疫逃逸过程，帮助肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击^[54]。外泌体在细胞间的通讯中扮演着信号传导者或信使的角色，在一项关于小鼠和人类细胞系外周血的研究中，观察到了肿瘤来源外泌体在不同类型的癌症中起到的作用。其通过携带特定的生物活性物质，包括蛋白质、核酸，来影响目标器官的微环境。这些物质可以被受体细胞所接收并解读，进而改变其生物学行为，促进肿瘤转移灶的形成^[55]。这项试验不仅探究了肿瘤来源外泌体在肿瘤微环境重大重用，其作者还认为，肿瘤的转移并非完全随机，而是有迹可循的，可以通过循环系统中的外泌体找到肿瘤发展和转移的相关证据。在随后的几年里，研究者们纷纷踏足外泌体作为肿瘤标志物的领域，在一项研究中发现，通过鉴定尿液来源的外泌体中的基因签名，可以评估高级别和低级别前列腺癌以及良性前列腺增生^[56]。这种非侵入性的尿检意味着在前列腺癌临床诊断中可以避免许多不必要的侵入性的诊断，如直肠活检。在后续的研究中，研究者们通过探寻体液外泌体作为肿瘤生物标志物中取得了一定的成就，包括乳腺肿瘤、胰腺癌和食管鳞状细胞癌等，作为样本的体液往往是血清或血浆，有时根据肿瘤部位的不同，也可以提取唾液和尿液^[57-59]。尽管这一研究取得了显著的成果，但仍需要进一步的验证和临床应用研究来证实其准确性和可靠性。未来，期待能够开展更多前瞻性的临床试验，以验证这些纳米颗粒生物标志物的性能，并进一步探究其在提升临床上整体癌症诊断能力方面的潜在作用，充分发挥外泌体作为肿瘤疾病液体活检标志物的潜力。

1.4 miR-9 对乳腺肿瘤在临床应用上的前景

在治疗给药方面，miRNA 可以通过特异性靶向多个基因实现对基因网络的调节，以达到更全面影响癌症相关基因表达的治疗效果，还可通过抑制促癌基因等方式来实现对癌症进程的调控。此外，一个靶基因也可能被多个 miRNA 靶向，这种多对多的调控方式可以增加治疗的灵活性和精度，多个 miRNA 联合调节抑癌基因，可以发挥事半功倍的作用。同时，RNA 分子递送技术的改进也使基于 miRNA 的疾病治疗变得

1 前言

更加现实,在肿瘤治疗领域,已经投入临床试验的 miRNA 有 miR-34-mimics,它已用于治疗原发性肝癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤和肾癌患者的 I 期临床试验,取得了良好的治疗效果^[60]。miR-16-mimics 在恶性胸膜间皮瘤或非小细胞肺癌患者中的 I 期临床试验也已进行,其使用表皮生长因子受体(EGFR)抗体包裹的 EDV 纳米粒将 miR-16 输送到癌症组织中^[61]。基于 miR-9 在乳腺癌中过表达的事实,有研究者以 miR-9 作为乳腺癌特异性 miRNA 之一,设计了一个级联的 miRNA 识别系统,通过激活报告基因(荧光蛋白)或抗癌基因 p53 的表达来选择性杀死癌细胞。这项试验在小鼠体内肿瘤试验中,裸鼠体内的肿瘤体积和重量仅为对照组的 58%,这表明 miRNA 可能被用作癌症相关基因调控药物,在癌症治疗中具有巨大的潜力^[62]。另外,有报道称 miR-9 可使急性髓系白血病对柔红霉素增敏^[63]。化疗可诱导乳腺癌细胞分泌基于细胞外囊泡的 miR-9,导致化疗耐药^[64]。这提出了一个猜想:miR-9 是否可以与其他药物联合使用来提高治疗效果和减轻耐药性,或者作为乳腺癌化疗反应的预测指标。

犬乳腺肿瘤是世界范围内母犬发病率较高的恶性疾病,严重威胁犬类健康。MiRNA 在乳腺癌的发生发展和预后中起着关键作用。由于单个 miRNA 可以特异性调控多个靶基因,因此 miRNA 具有多靶点、准确调控的特点。针对 miRNA 的治疗策略可能成为一种新的、多渠道的癌症治疗策略。

越来越多的研究证实 miR-9 在乳腺癌中异常表达。在恶性程度较高的乳腺癌的转移中,miR-9 往往起着促进作用。循环系统中的 miRNA 具有体积小、稳定性好、非侵入性等优点,可以作为一种简便、经济、临床可获得的分子标志物用于诊断和判断预后,miRNA 在肿瘤标志物的研究中引起了越来越多的关注。此外,随着外泌体研究的深入,未来有可能利用外泌体作为药物递呈载体,向乳腺肿瘤组织输送 miRNA-9 抑制剂。最后,进一步的 miR-9 基因敲除小鼠模型也许可用于分析 miR-9 在乳腺癌进展中的作用,如 miR-9 基因敲除小鼠结合自发性乳腺癌模型可以更好地用于评估 miR-9 在乳腺癌中的功能。这也许是一个很好的未来课题研究方向。在本研究中,发现 miR-9 可以与 COL15A1 基因的 3'UTR 端结合,导致 mRNA 翻译为 collagen XV 蛋白受到抑制,并影响与细胞迁移和血管生成相关的多种信号通路和基因。这表明,miR-9 可能成为犬内皮细胞迁移和血管生成相关疾病的潜在诊断和治疗靶点。

关于 miR-9 与乳腺肿瘤,有许多研究发现 miR-9 在乳腺肿瘤发生发展中具有促癌作用,主要是增强乳腺肿瘤的转移能力^[65]。MiRNA 在癌细胞和组织中呈现出特定

的表达特征，它们能够进入体液循环，并展现出较高的化学稳定性，这些特性使 miRNA 成为潜在的、非侵入性的肿瘤标志物^[66]。MiRNA 已被证明在细胞间通讯中发挥作用^[67]。研究表明，大约 90% 的循环中的 miRNA 与包括 Ago2、NPM1 和高密度脂蛋白的蛋白质形成复合体^[68]。循环中的另外 10% 的 miRNA 分泌在外泌体中，这是一种内体衍生的微囊泡与质膜融合的形式^[69-70]。外泌体将 miRNA 包裹住，以保护 miRNA 不被体液中的 RNA 酶消化^[71]。包裹 miRNA 的外泌体可以利用内吞、膜融合或与细胞表面特定受体结合等方式进入相邻细胞，影响那些远离 miRNA 来源的信使核糖核酸靶点^[71]。因此，可以利用循环中的 miRNA 进行无创性诊断和预后。自 2008 年以来，miRNA 已被确定为癌症的生物标志物^[72]。从那时起，它们作为生物标志物的假定效用已被提出用于许多人类疾病^[73]。

Bertoli 论证了与乳腺肿瘤发生和发展有关的 miRNA，并证明 miR-9 正在成为一种诊断和预后的生物标志物，基于 miR-9 的药物是一种有前途的乳腺肿瘤治疗方法^[74]。人医临床研究数据也表明：miR-9-5p 对乳腺肿瘤的诊断具有较高的敏感性和特异性，乳腺肿瘤患者血清 miR-9-5p 表达水平往往显著高于正常人，人表皮生长因子受体 2（HER2）阳性乳腺肿瘤患者血清 miR-9-5p 水平也明显高于 HER2 阴性患者，这表明血清 miR-9-5p 水平与乳腺肿瘤的发生呈正相关^[75]。这足以说明 miRNA 具有作为肿瘤诊断标志物的潜力，而 miR-9 具有作为乳腺肿瘤诊断标志物的应用前景。

觅瑞生物科技公司已经成功生产基于血液 miRNA 的分子诊断试剂盒产品^[76]。因此，基于之前的研究，本课题组认为 miR-9 也具有作为犬乳腺肿瘤临床诊断标志物的潜力。综上所述，miR-9 是一种参与调节内皮样细胞的重要因子，能够影响肿瘤细胞的发展和转移，同时调节肿瘤转移前生态位的形成。这一系列研究揭示了 miR-9 在犬乳腺肿瘤发展中的潜在作用，具有重要的研究价值，为犬乳腺肿瘤的预防和治疗提供新的思路和方法。

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

2.1 试验材料

2.1.1 主要试验材料

CMT-7364 和 CIPp 细胞系均为来源于本研究室的犬乳腺肿瘤细胞系，CMT-7364 细胞系为犬三阴性乳腺癌细胞，CIPp 细胞系为恶性犬乳腺肿瘤细胞系。另外，本研究室还从犬胚胎心肌组织分离得到了犬内皮样细胞，犬胚心肌组织样本是通过海之大宠物医院获得了，来源为安乐死的终止妊娠的犬只，样本的收集符合动物福利，且得到了其主人的同意。

2.1.2 主要试剂材料

本研究所用的主要试剂材料见表 2.1。

表 2.1 本研究所用的主要试剂

Table 2.1 Main reagents used in this experiment.

试剂	批号	厂家
Trizol	W9201	北京天根
胎牛血清 (FBS)	FBS-S500	NEWZERUM
0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA)	2193154	Gibco
50×TAE 溶液	——	上海生工
D2000 DNA maker	——	北京天根
DMEM 高糖培养基	8121553	Gibco
miRNA 荧光定量试剂盒	——	上海吉玛基因
防荧光淬灭剂(含 DAPI)	H-1200-10	Vector Laboratories
Tween-20	680661	北京中科瑞泰
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	20201202-1	广州化学
氯化钾 (KCl)	1803051	西陇科学
PKH67 染料	PKH67GL	Sigma

表 2.1 本研究所用的主要试剂（续表）

Table 2.1 Main reagents used in this experiment (continued).

试剂	批号	厂家
氯化钠 (NaCl)	2021040113	广州化学
逆转录试剂盒	AL61920A	TaKaRa
质粒小提试剂盒	20210608	索莱宝
十二水合磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O)	2021030215	广州化学
青霉素-链霉素	15140122	Gibco
琼脂粉	11171022	索莱宝
无水乙醇	1280340117898	西陇科学
异丙醇	C12928231	上海麦克林
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNAEraser (Perfect Real Time)	RR047A	TaKaRa
BCA 蛋白质浓度测定试剂盒	P0010S	碧云天
5×蛋白上样缓冲液	202111223	索莱宝
Anti-β-actin 抗体	AH11286487	北京博奥森
ECL 化学发光底物	——	Biosharp
HRP 标记山羊抗兔 IgG	BJ08079044	北京博奥森
RIPA (强)	CR2107001	索莱宝
SWE 快速高分辨电泳缓冲液 (干粉)	CR2105176	Servicebio
TEMED	——	西亚化学
甘氨酸	202104	Biotopped
过硫酸铵 (APS)	C11577298	默克
甲醇	B2107091	西亚化学
Tris-HCl	929H071	索莱宝
SDS	20210202	西亚化学
预染蛋白 Marker	26616	Thermo
蛋白酶抑制剂混合物 (通用型 100×)	P1005	碧云天
1×PBS	G4202	武汉赛维尔
RPMI 1640 培养基	855011262	Biochannel
DEPC 处理水	B501005-0005	上海生工

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

表 2.1 本研究所用的主要试剂（续表）

Table 2.1 Main reagents used in this experiment (continued).

试剂	批号	厂家
Anti-collagen XV 抗体	bs-0547R	北京博奥森
Anti-vimentin 抗体	V6389	Sigma-Aldrich
Anti- α -SMA 抗体	A2547	Sigma-Aldrich
Anti-TSG101 抗体	EPR7130(B)	Abcam
Anti-CD31 抗体	bs-0195R	北京博奥森
Anti-CD63 抗体	EPR21151	Abcam
WB 专用一抗二抗稀释液	AR1017	武汉博士德

2.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备见表 2.2。

表 2.2 本研究所用主要仪器

Table 2.2 The instruments used in this experiment.

仪器	型号	厂家
电子天平	FA2004C	上海佑科仪器仪表有限公司
电热恒温水浴锅	DK-S22	上海精宏试验设备有限公司
荧光定量 PCR 仪	Q2000B	杭州朗基科学仪器有限公司
荧光倒置显微镜	IX71	日本 OLYMPUS
移液枪	——	德国 Eppendorf
微量振荡器	XK96-3	江苏新康医疗器械有限公司
微量分光光度计	Nano-300	杭州奥盛仪器有限公司
台式高速离心机	5418	德国 Eppendorf
核酸电泳仪	DYY-6C	北京六一生物科技有限公司
全自动制冰机	IMS-20	常熟市雪科电器有限公司
全波长酶标仪	Infinite M200 PRO	瑞士 TECAN
普通 PCR 仪	S100TMThermal Cycler	美国 Bio-Rad
高压蒸汽灭菌锅	YXQKL-75	鸡西辰丰
蛋白电泳仪	PowerPacTM Basic	美国 Bio-Rad
台式高速冷冻离心机	5418R	德国 Eppendorf
纯水仪	Milli-Q Direct 8	上海君翼
全自动制冰机	IMS-20	常熟市雪科电器有限公司

2.2.1 细胞培养

CMT-7364 细胞系使用含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 培养基培养, 培养环境为 5% CO₂ 37°C; CIPp 使用含 10% FBS、1% 双抗的 1640 培养基培养, 培养环境为 5% CO₂ 37°C; 犬内皮样细胞分离自犬的胚胎心肌组织, 通过无菌手术切除胚胎的心肌组织, 用预冷过的 PBS 溶液冲洗, 置于冰块上, 将组织切成约 1 mm³ 的小块, 去除血液、脂肪和纤维结缔组织, 并将小块置于 5% CO₂ 37°C 环境中使用犬内皮细胞生长培养液 (Canine endothelial cell growth medium, CECGM) 培养。当细胞密度达到 90% 时, 使用 TrypLE Express 酶将其分离, 并转移至预涂有 2% 明胶的平板上, 用含 1% ECGS 的犬内皮细胞生长培养液培养。

细胞传代: 在细胞密度达到 80% 以上时, 弃去培养皿中旧培养基, PBS 溶液轻柔清洗细胞三次。使用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶进行细胞的消化, 加入完全培养基终止消化, 1000 rpm 离心 5 min。将细胞悬浮按照 1:3 进行细胞的传代。

2.2.2 血管生成试验

基质胶置于 4°C 预冷过夜, 并用 CECGM 稀释至 50% 浓度, 将稀释液加入 96 孔板的孔中, 在 37°C 孵育 30 min 使其凝固。

使用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 对犬内皮样细胞进行 3 次洗涤, 用胰蛋白酶消化细胞, 收集细胞悬液至离心管中。将离心机转速设为 1000 rpm, 离心 10 min 后, 用 PBS 重悬细胞沉淀, 并进行细胞计数。同时, 在 96 孔板中铺设 50 μ L 基质胶, 置于 37°C 孵育 30 min。使用 CECGM 培养基重新将细胞悬浮, 对获得的悬浮液进行细胞计数, 之后加入总体积为 200 μ L 的 2×10^4 个细胞至孵育结束的基质胶上。每个样品设置 3 个重复孔。在 37°C, 5% CO₂ 条件孵育, 每隔 2 h 观察一次小管形成情况, 并记录照片。

2.2.3 逆转录-聚合酶链式反应(RT-qPCR)

2.2.3.1 总 RNA 提取

以 12 孔板接种细胞为例, 将 12 孔板中上清液吸出弃去, PBS 清洗 3 次, 每孔加入 600 μ L TRIZOL, 静置至细胞完全裂解后, 使用移液枪将细胞吹打混匀。充分吹打混匀后吸取裂解液至 1.5 mL 无菌无酶离心管中, 使用移液枪吸取氯仿向离心管中加

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

入氯仿，氯仿体积为 200 μL 并且是预冷过后的，加入完毕后将离心管盖子盖紧后剧烈震荡 30 s，室温（25 $^{\circ}\text{C}$ 左右）静置 5 min。上述操作完成后使用预冷好的 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 1000 g 离心，离心时间为 5 min。离心机停止工作后，取出样品，此时通过观察可以发现样品已经分为三层，取上层水相，水相的体积一般为加入 TRIZOL 的体积的一半。RNA 处于水相中，保留水相，转移水相后加入 300 μL 异丙醇，室温条件下静置 10 min。静置结束后，将通过上述操作获得的样本放入遇冷好的 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机进行离心，离心速度为 10000 g，离心时间为 10 min，离心结束后，尽可能将上清吸取丢弃，只保存管底的白色沉淀即可。使用移液枪吸取 75%乙醇（DEPC 水配置）溶液加入至白色沉淀上进行洗涤，每管缓慢地加入 1mL 即可，加入后盖紧盖子，使用上下颠倒的方法进行洗涤。洗涤结束后，使用 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 7500 g 进行离心，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心所需要的时间为 5 min，离心结束后将离心管内的上清弃去仅保留沉淀，室温条件下将离心管倒置晾干，重复洗涤晾干操作两次。随后，取 50 μL RNA 溶解液溶解沉淀。溶解完毕后测定其浓度，准备进行逆转录。RNA 保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，备用。

2.2.3.2 总 RNA 逆转录与 miRNA 特异性逆转录

依据逆转录试剂盒的标准操作程序，将总 RNA 转录为 cDNA；而对于 miRNA 的逆转录过程，则需按照 miRNA 反转录荧光定量试剂盒的标准操作程序进行。

2.2.3.3 实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）

根据标准试剂说明书，每个样品进行三次重复试验。引物序列详见表 2.3，根据表 2.4 的组成，在冰上配制出反应混合液，并使用荧光 PCR 仪进行扩增。扩增反应程序见表 2.5 和表 2.6。根据结果计算各基因的相对表达量。

表 2.3 引物序列

Table 2.3 The primer sequence.

基因名称	引物序列（5'-3'）	目标产物大小
RPS19	CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG	95 bp
	GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG	
GAPDH	GTAGTGAAGCAGGCATCGGA	108 bp
	GTCGAAGGTGGAAGAGTGGG	
CD31	AGCCTCTGACGTTGGATGTG	87 bp
	GAGCCTTCCGTTCTCTTGGT	

表 2.3 引物序列 (续表)

Table 2.3 The primer sequence (continued).

基因	引物序列 (5'-3')	目标产物大小
NBL1	TCCACCGCCCATCAACA	193 bp
	GCAGTGAACCAGGGACTCTGTA	
PDGFD	GTACCTGCACTTCGGGGAAA	144 bp
	AGATGCAATCACACCGCTCA	
PPARGC1B	CACCAAGCACTTTGGGGCTTC	96 bp
	CTGCTGTCCTCAAAGACCGT	
RPS6KB2	GGCTATGGCAAGGTGTTCCA	97 bp
	GTGAAAAGCTCACCGCCTTT	
TGIF2	CTGGGGTGGGACTTCCTTTC	239 bp
	TTTGACGAAAGACAAAAACAAAAGT	
SCN5A	CCTGTCGCATCGGAGCAAAT	114 bp
	GACTCAGCCTCATTGACCCG	
PTPRF	CAGCAGAGACCTGGTTGACT	260 bp
	ATCCATGTGATGCGTGGCTT	
DNMT3A	TTCATCCAGGCTCACGCAAT	199 bp
	TTTGCTCCAGGTGGGGTTTT	
α -SMA	ATGTGCGACGAGGAAGACAC	98 bp
	AATACGGCCCTTGGAGCATC	
DIAPH2	AGCGTGAGATGGTTGTCCAG	84 bp
	TGCTGTTTTTCAGACCTCCCATA	
FZD5	ACAGCCACATCCACTACGAGAC	121 bp
	AGGAACCAGGTGAGCGACAG	
HGF	CAAGGGAAGGTGACACTGAATGAG	145 bp
	GACCAGGAACAATGACGCCAAG	
INHBB	GCAGCTGACAGGTCATTCAT	202 bp
	TCCTCTGGGCTCATTCCCTT	

表 2.4 RT-qPCR 反应体系成分配比

Table 2.4 The composition ratio of RT-qPCR reaction system.

组分	用量
TB Green Premix Ex Taq II	5 μ L
引物	4 μ M $\times$ 2
DNA	1 μ L
ddH ₂ O	3.2 μ L

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

表 2.5 RT-qPCR 反应程序 (mRNA 扩增)

Table 2.5 RT-qPCR reaction program for mRNA amplification.

温度	时间
95 °C	30 s
95 °C	5 s
60 °C	34 s
95 °C	15 s
60 °C	60 s
95 °C	15 s

表 2.6 RT-qPCR 反应程序 (miRNA 扩增)

Table 2.6 RT-qPCR reaction program for miRNA amplification.

温度	时间
95 °C	3 min
95 °C	12 s
62 °C	40 s
95 °C	15 s
60 °C	60 s
95 °C	15 s

2.2.4 蛋白质免疫印迹(Western Blot)

2.2.4.1 样品的制备

细胞培养至发育状态稳定,形态良好,汇合度约 80%时,吸取培养液并弃去,PBS 清洗三次,加入胰蛋白酶,使其充分消化脱落,收集至无菌 EP 管中,按照说明书要求的量,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,加入完毕后置于 4℃冰箱,4℃裂解 30 min,充分裂解后,加入 5×SDS 上样缓冲液,随后 100℃,10 min 处理样本,使其变性,处理完毕后立即分装冻存于-80℃备用。外泌体蛋白变性采用与细胞蛋白变性相同方式。

2.2.4.2 SDS 凝胶电泳

取用两块 1.0 mm 玻璃板,使用 dd H₂O 清洗玻璃板,清洗完毕后待其自然风干,随后夹板捡漏。确保套板之间不漏液后开始制备分离胶。分离胶浓度选用 10%的分离胶,配制体积为 8 mL,将分离胶灌入两块玻璃板之间,随后使用乙醇(或其他有机溶剂)封胶。等待至胶凝后,将乙倒出,随后加入浓缩胶。浓缩胶浓度选用 5%,配

制体积为 3 mL。灌入浓缩胶后插上梳子,等待胶凝。胶凝后将所配胶板装载到电泳装置上并加入足量的电泳液,随后垂直将梳子拔出,拔出梳子后应使用注射器吹打上样孔,防止胶丝干扰试验。随后开始上样,上样体积均为 20 μ L, Marker 泳道为 3 μ L 蛋白 Marker+17 μ L 1 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液。上样完毕后开始跑胶。当样品处于浓缩胶时电压应该使用 80 V 进行电泳,在 Marker 进入分离胶开始分层时应将电压设置为 120 V 直至电泳结束。跑胶结束后取出玻璃板,用尺子量取好和胶体面积相同的 PVDF 膜,取好膜后开始活化,一般活化条件为将其泡入甲醇 30 s。切胶时,应注意保持胶体湿润,将取好的 PVDF 膜与胶体夹紧放置在电泳槽中,随后将电泳槽放置在冰盒中,加入转膜液,200 mA,90 min 转膜。

2.2.4.3 封闭

转膜结束后取出 PVDF 膜,将其放置在带有盖子的盒子中使用 PBST 洗涤 5 min,随后加入 5%脱脂奶粉室温孵育 1 h。封闭结束后使用 PBST 洗涤 5 次,每次 5 min。

2.2.4.4 抗体孵育

使用 WB 专用一抗二抗稀释液浓度稀释抗体: anti- β -actin (1:5000); anti-CD31 (1:500); anti-Vimentin (1:2000); anti- α -SMA (1:1500); anti-HRP-山羊抗兔 IgG (1:10000); anti- β -actin (1:5000); anti-CD63 (1:1000); anti-TSG101 (1:2000)。按照一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜;二抗常温 1 h 的条件对转膜后的 PVDF 膜进行抗体孵育。

2.2.4.5 显影

孵育结束后对 PVDF 膜洗涤,洗涤结束后沥干。使用 ECL 化学发光液进行显影,计算各目的蛋白条带的灰度比值。

2.2.5 免疫荧光染色试验

为了定位原代细胞中内皮细胞的标志物,进行了免疫荧光染色。将含有 1×10^3 个细胞的细胞悬液添加到预先涂有 2%明胶的 Biologix 细胞培养载玻片上,孵育 24 h。随后,载玻片在 -20 $^{\circ}$ C 下用丙酮固定 10 min,用 10%山羊血清/0.1%吐温 20/PBS 封闭,并在室温下孵育 1 h。接下来,载玻片在 4 $^{\circ}$ C 下与 CD31 (1:100)、vimentin (1:1600) 和 α -SMA (1:400) 的一抗孵育过夜,然后在室温下避光与 100 μ L 的山羊抗兔 IgG

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究
(1:500) 或山羊抗小鼠 IgG (1:500) 的二抗孵育 1 h。最后, 细胞用一滴含有 DAPI 的 Vectashield 抗褪色封片剂染色, 在荧光显微镜下观察并拍照记录。

2.2.6 细胞转染

细胞接种至 24 孔板中, 加入不含抗生素的培养基, 细胞培养至密度 30-50% 时进行转染。转染分为 NC 组和 miR-9 组。使用 50 μ L 不含血清的培养基分别稀释各分组的小 RNA。按说明书要求, 取 **RFect** 加入不含血清的培养基中进行稀释。摇匀, 室温孵育 5 min, 将模拟物稀释液加入到 **RFect** 稀释液中并混匀。继续在室温孵育 20 min。将混合液加入到相应的培养孔中并混匀, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 48 小时, 检测相关基因的表达情况。

2.2.7 细胞外泌体提取与鉴定

2.2.7.1 收集细胞上清

当 CMT-7364 细胞系/CIPp 细胞系密度到 80% 左右时, 将细胞中的普通培养基换成无外泌体血清配置的培养基。24h 后收集培养基于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.7.2 提取外泌体

初始离心: 300 g, 10 min 对细胞培养液进行离心, 目的是去除其中的细胞和大颗粒物质。收集得到的上清液

中等速度离心: 接着, 2000 g, 10 min 离心上一步得到的上清液。以去除上清液中的大细胞碎片和脱落的整个细胞收集上清液。10000 g, 30 min 继续离心得到的上清液, 以去除小的细胞碎片和破碎的细胞器, 小心去除上清。此时得到的沉淀包含外泌体。

高速离心: 100000 g, 70 min, 收集沉淀, 并用 PBS 重悬, 100000 g, 70 min, 收集沉淀, 此时沉淀成分为外泌体。由于外泌体的尺寸和密度特性, 它们可以在这种高速离心条件下被有效地沉淀和分离出来。

2.2.7.3 鉴定外泌体

形态观察: 在透射电镜下, 对外泌体样品进行观察。取 10 μ L 外泌体样品滴加于

铜网上，并在其上沉淀 1 min，随后使用滤纸将滤网侧边的液体吸干。接着，取 10 μL 3% 磷钨酸滴加于铜网上，并在其上沉淀 1 min，同样使用滤纸将滤网侧边的液体吸干。样品在室温下晾干后，采用 100 kV 电镜进行检测和成像。外泌体在电镜下呈现明显的膜边界，大小在 30-100 nm 之间，形态呈杯状。

Western blot 检测外泌体蛋白标志物：取外泌体 3 μL ，用 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液和超纯水稀释至 10 μL ，100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min，将样本进行 Western blot 检测。抗体浓度：anti- β -actin (1:5000)；anti-CD63 (1:1000)；anti-TSG101 (1:2000)；anti-HRP-山羊抗兔 IgG (1:10000)。

纳米粒径分析：所收集到的外泌体样本经稀释处理，使用 PBS 稀释至总蛋白浓度为 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 。将稀释后的样本注入到一个容量为 1 mL 的注射器中，以便纳米颗粒跟踪分析仪进行进一步实验。通过显微镜装置上搭载的摄像头，激光光束能够透过外泌体颗粒进行可视化观察，记录布朗运动的情况。运用方程式，推导出外泌体的浓度和直径等相关参数。

2.2.7.4 外泌体浓度的测定

使用无菌 0.45 μm 滤器过滤后的 PBS 稀释外泌体样本（无菌操作）。每种外泌体各取一部分作为样本加入对应体积的 RIPA 裂解液（含蛋白酶抑制剂），混匀，将其放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱裂解 30 min。裂解液配方：100 μL RIPA+1 μL 蛋白酶抑制剂。每种外泌体样本均为 15 μL ，分为两组：1 μL 样本+19 μL PBS（20 $\times$ 稀释）；4 μL 样本+16 μL PBS（5 $\times$ 稀释）剩余样本放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取适量标准品稀释为 0.5 mg/mL 的工作液。按照 BCA 试剂盒说明书操作进行加样，随后加入 BCA 工作液（BCA 工作液：A 液：B 液=50：1），配置完成后加入 96 孔细胞培养皿中，每孔 200 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min 后测定 A562 nm 波长的吸光度。按照说明书进行标准曲线绘制，计算外泌体各个样本的浓度。

2.2.8 迁移和侵袭试验

为了研究 miR-9 对犬内皮样细胞迁移和侵袭的影响，我们在 Transwell 板的每个上室中添加了 100 μL 含有 1×10^4 个细胞的 DMEM 培养基。下室则填充了 CECGM。对于迁移试验，在孵育 24 h 后，采用棉签对未完成迁移过程的上层细胞进行清除，然后使用多聚甲醛将迁移到小室底部的细胞进行固定处理，时间为 10 min。接着，使

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究
用 1%的结晶紫染料对样本进行染色处理, 时间为 15 min。对于侵袭试验, 我们将基质胶用 CECGM 稀释至 3%的浓度, 并将 50 μ L 的混合物涂在上室, 37 $^{\circ}$ C 条件下凝固 3 h, 其余操作与迁移试验相同。孵育 24 h 后, 移除多余的培养基, 然后按照迁移试验相同的步骤进行操作。

2.2.9 miR-9 生物信息学分析

2.2.9.1 miR-9 靶基因预测

使用 TargetScan 8.0 (https://www.targetscan.org/vert_80/) 数据库进行犬种属的 miRNA-mRNA 结合分析, 使用 miRDB 数据库 (<https://mirdb.org/>) 的靶基因搜索功能, 进行犬种属的 miRNA 靶基因分析。将得到的两个结果进行重叠分析, 并结合先前的研究, 筛选出与血管生成相关的 miRNA 的潜在靶基因。

2.2.9.2 RNA 测序分析与基因功能富集分析

为了进一步确定 miR-9 促进犬内皮样细胞迁移和侵袭的调控机制, 采用了 RNA 测序技术 (Novogene Bioinformatics Technology)。通过 Bioanalyzer 2100 系统 (Agilent Technologies) 评估了转染了 miR-9 模拟物 (miR-9-5p-mimic 或阴性对照 (NC)) 的细胞中提取的 RNA 完整性。通过连接 poly-T 寡核苷酸的磁珠, 从总 RNA 中纯化 mRNA。随后, 对 PCR 产物进行纯化 (AMPure XP system), 并评估文库的质量。接着, 在 Illumina NovaSeq 6000 (Illumina) 上进行 150 bp 的配对末端测序。数据已存储在 Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>), 访问号为 PRJNA973936。将调整后的 p 值 <0.05 的基因视为差异表达基因。使用 DAVID62 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 KEGG 富集分析和 GO 分析, 结果通过 Bioinformatics 在线网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制弦图进行可视化。通过 RT-qPCR 验证所选的差异基因。

2.2.10 双荧光素酶试验

将 COL15A1-WT/MT 结合位点附近约 200 bp 序列构建到 pmirGLO 载体上。pmirGLO 载体含 Firefly luciferase 和 Renilla luciferase, Renilla luciferase 作为对照。重组 pmirGLOCOL15A1-MUT (突变体) 和 pmirGLO-COL15A1-WT (野生型) 原核表

达载体购买自武汉金开瑞生物工程有限公司。

用 Lipofectamine® 2000 Reagent 转染试剂，通过脂质体法将 50 pmol/mL miR-9-5p 模拟物或模拟物阴性对照质粒（NC）与 4 ng/μL pmirGLO-COL15A1-MUT 或 pmirGLO-COL15A1-WT 共转染到犬内皮样细胞中。48 h 后用双荧光素酶报告分析系统（Promega）检测荧光强度。

2.2.11 数据统计与分析

使用 GraphPad Prism 5.0（GraphPad 软件）对数据进行分析 and 可视化。每个试验至少进行三次生物学重复，所有结果均以均数±标准差表示。采用单因素方差分析进行统计学处理。

2.3 试验结果

2.3.1 犬内皮样细胞的培养和鉴定

收集了犬胚胎心肌组织，通过培养小组织块来分离细胞。并在培养基中加入内皮细胞生长因子（ECGS）来调控其分化，旨在利用具有全能性的犬胚胎心肌细胞诱导分化为具有内皮细胞特征的犬内皮样细胞

在接种一天后，细胞开始贴壁，经过两到三代的培养，得到的犬内皮样细胞呈鹅卵石状均匀分布，这是内皮细胞的一个典型的形态特征（图 2.1 A）。为进一步探讨原代细胞能否成功诱导分化为内皮样细胞，检测到了它具有体外小管形成能力（图 2.1 B）。并通过 RT-qPCR 检测到原代细胞表达 *CD31*、*α-SMA* 和 *Vimentin* 基因（图 2.2 A）。此外，这些细胞表达 *Vimentin* 和 *CD31* 蛋白，但几乎不表达 *α-SMA* 蛋白（图 2.2 B）。免疫荧光染色显示细胞膜表达 *CD31* 蛋白，胞浆表达 *Vimentin* 蛋白，但不表达 *α-SMA*（图 2.2 C）。*CD31* 是内皮细胞的标志蛋白，体外的小管形成能力属于内皮细胞的一个经典特征。这些结果表明，本课题组成功地获得了犬内皮样细胞。

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

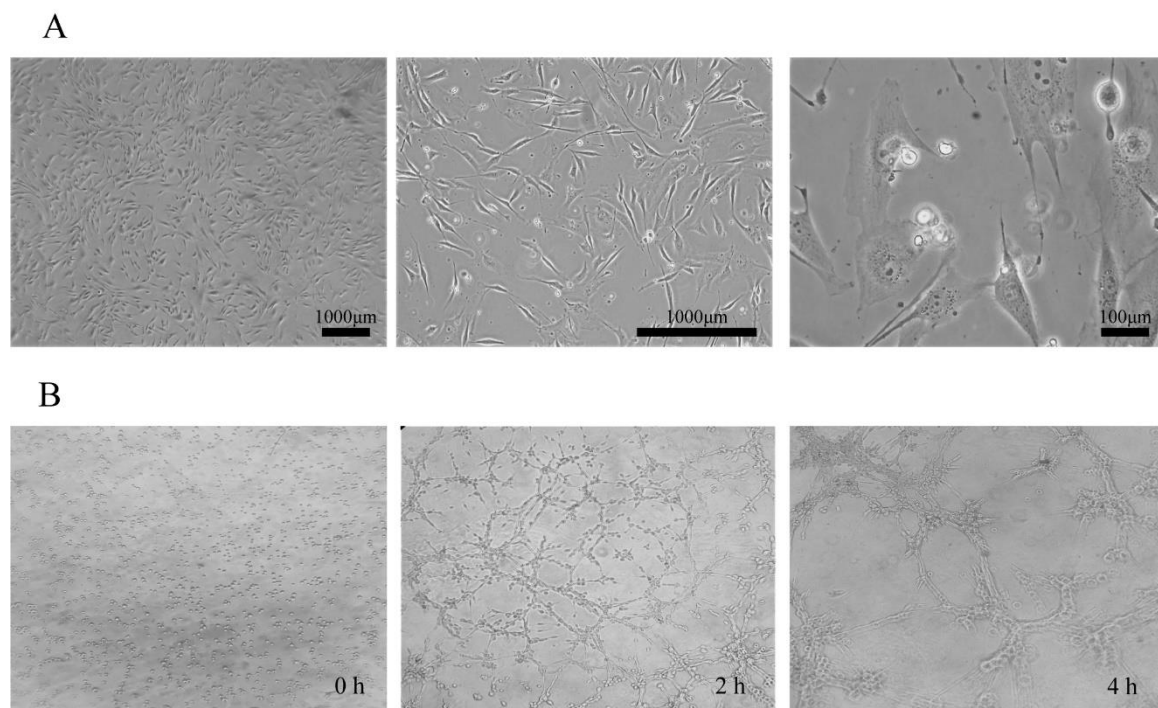


图 2.1 犬内皮样细胞的形态和成管能力。(A) 从胚胎犬心肌组织中提取的细胞在第 3 代时大部分细胞呈鹅卵石状, 在 40×、100×和 400 倍放大条件下可观察到细胞形态。(2) 犬内皮样细胞在 0、2、4 h 的血管生成。培养 2 h 后, 细胞呈致密的管状结构。4 h 时, 管状结构开始坍塌。

Fig. 2.1 Morphology and Tubulogenesis of Canine Endothelial-like Cells. (A) Cells extracted from canine embryonic myocardial tissue mainly exhibited a cobblestone-like morphology at passage 3, and their morphology could be observed under 40×, 100×, and 400× magnification. (B) Vasculogenesis of canine endothelial-like cells at 0, 2, and 4 hours. After 2 hours of culture, the cells formed dense tubular structures. At 4 hours, the tubular structures began to collapse.

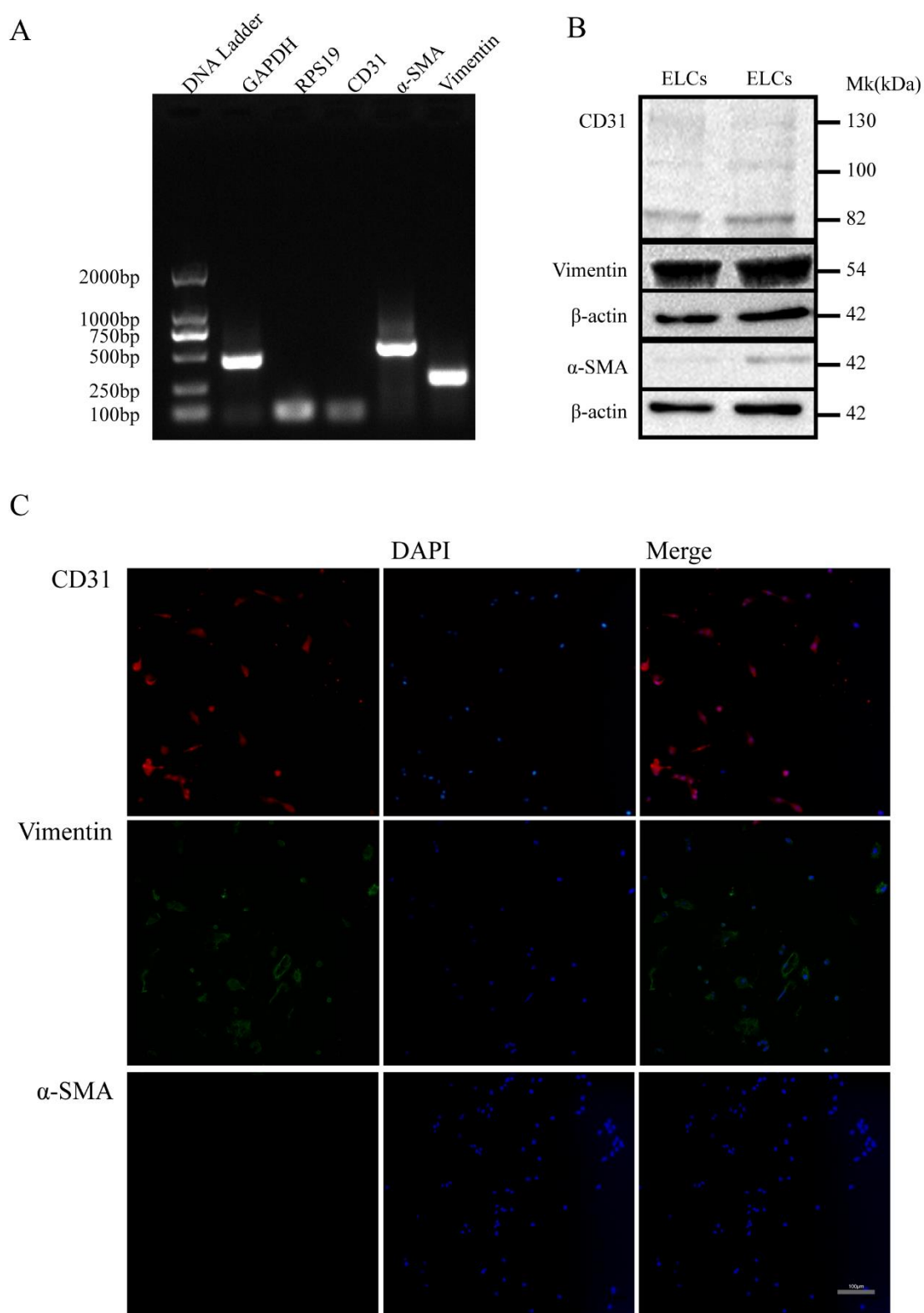


图 2.2 用 CD31（内皮细胞标志蛋白）、 α -SMA（肌纤维母细胞标志蛋白）和 Vimentin（间质细胞标志蛋白）对诱导分化后的原代细胞进行鉴定。（A）RT-PCR 结果。细胞表达 CD31、 α -SMA 和 Vimentin。GAPDH 和 RPS19 为内参。（B）Western-blot 结果。这些细胞表达 Vimentin

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究
蛋白和 CD31 蛋白, 但几乎不表达 α -SMA 蛋白。 β -actin 为内参。(C) 免疫荧光染色结果。

CD31 (红色)、Vimentin (绿色) 阳性, α -SMA 阴性。DAPI (蓝色) 染色的细胞核。

Fig. 2.2 The induced differentiated primary cells were identified using CD31 (endothelial cell marker), α -SMA (smooth muscle actin marker), and Vimentin (mesenchymal cell marker). (A) RT-PCR results showed that the cells expressed CD31, α -SMA, and Vimentin. GAPDH and RPS19 were used as internal controls. (B) Western blot results indicated that these cells expressed Vimentin and CD31 proteins but almost did not express α -SMA protein. β -actin served as an internal control. (C) Immunofluorescence staining revealed positive staining for CD31 (red) and Vimentin (green), while α -SMA was negative. The cell nuclei were stained with DAPI (blue).

2.3.2 乳腺肿瘤外泌体的提取和鉴定

为了探究犬乳腺肿瘤细胞外泌体对犬内皮样细胞的影响, 通过超速离心法提取了犬乳腺肿瘤细胞 CMT-7364, CIPp 的外泌体。它们在电镜下呈杯状结构, 粒径大小约 40-100 纳米, 并且表达外泌体蛋白标志物 CD63 和 TSG101 (图 2.3)。外泌体的粒径大小在 30-100 纳米之间, 形状呈杯托状, 类似于哺乳动物红细胞两面内凹的扁平圆形。CD63 和 TSG101 是外泌体的蛋白标志物, 通过结果发现细胞样本表达外泌体蛋白标志物以及肌动蛋白 β -actin, 外泌体样本表达外泌体蛋白标志物, 但不表达参与形成细胞骨架的肌动蛋白 β -actin, 这些结果说明提取到了纯度很高的犬乳腺肿瘤外泌体, 可用于后续试验。

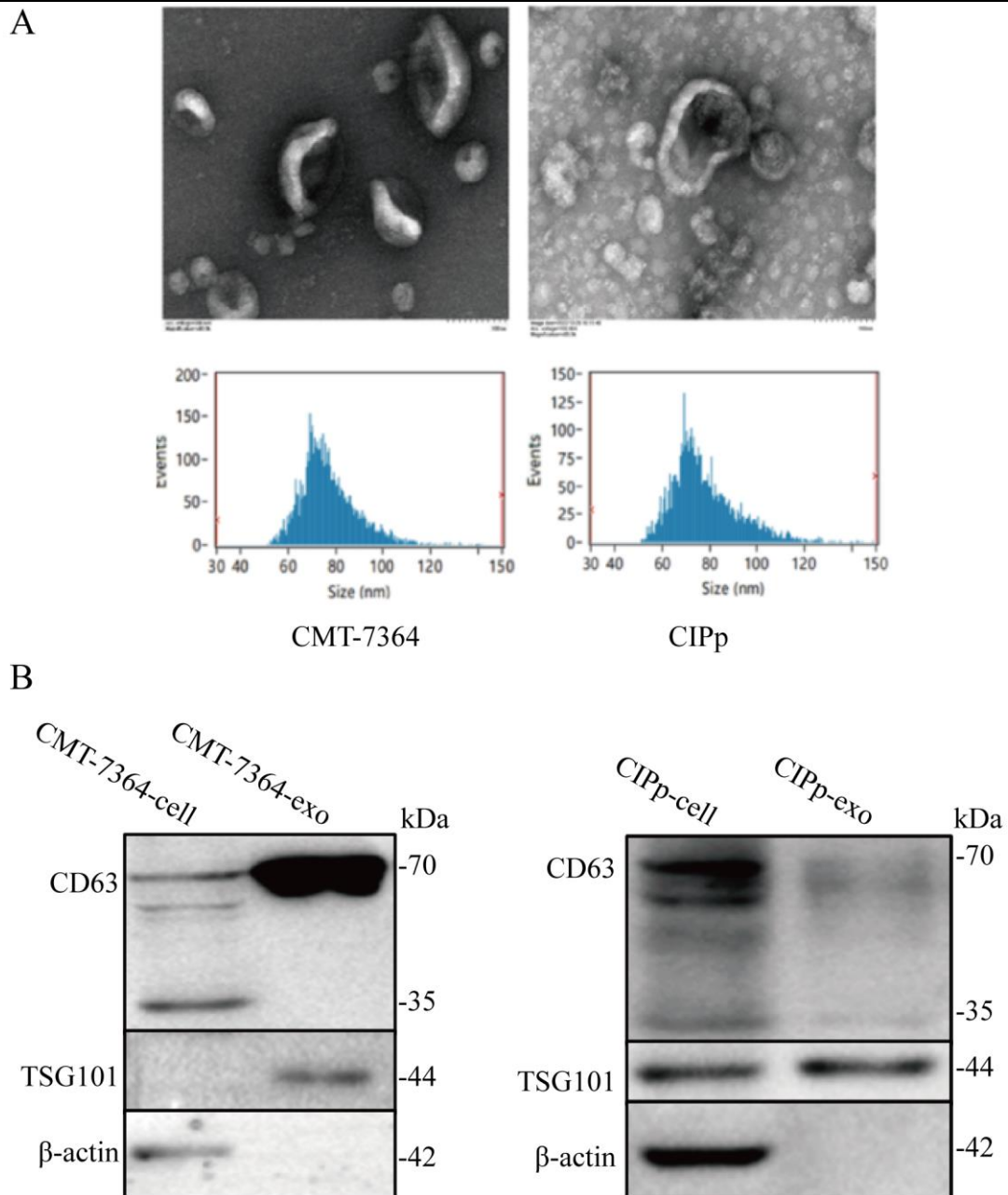


图 2.3 犬乳腺肿瘤外泌体的提取与鉴定。(A) 透射电镜图与粒径分析。(C) 外泌体蛋白标志物的 western blot 结果。

Fig. 2.3 Extraction and Identification of Exosomes from Canine Mammary Tumors. (A) Transmission electron microscopy images and particle size analysis. (B) Western blot results of exosomal protein markers.

2.3.3 犬乳腺肿瘤细胞外泌体具有将 miR-9 递送至犬内皮样细胞内的潜能

为了检测两种不同的犬乳腺肿瘤细胞系中 miR-9 的表达情况, 通过 RT-qPCR, 发现 CIPp 细胞内和外泌体内 miR-9 的表达量均远大于 CMT-7364 (图 2.4 A)。为了后

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究
续试验探究 miR-9 对犬内皮样细胞的影响，选择高表达 miR-9 的 CIPp 细胞系作为后续试验的研究对象。

外泌体是细胞膜结构的一种，它可以通过细胞的胞吞作用，将体内携带的生物活性物质携带进入受体细胞中，起到影响受体细胞生理功能的效果。为了探究犬内皮样细胞对犬乳腺肿瘤细胞外泌体的吞噬能力，用 DAPI 染料处理犬内皮样细胞，用 PHK67 染料处理 CIPp 的外泌体，将二者共培养，结果显示犬乳腺肿瘤细胞分泌的外泌体能被犬内皮样细胞摄入（图 2.4 B），这说明犬乳腺肿瘤细胞 CIPp 的外泌体具有将 miR-9 递送至犬内皮样细胞内的潜能。

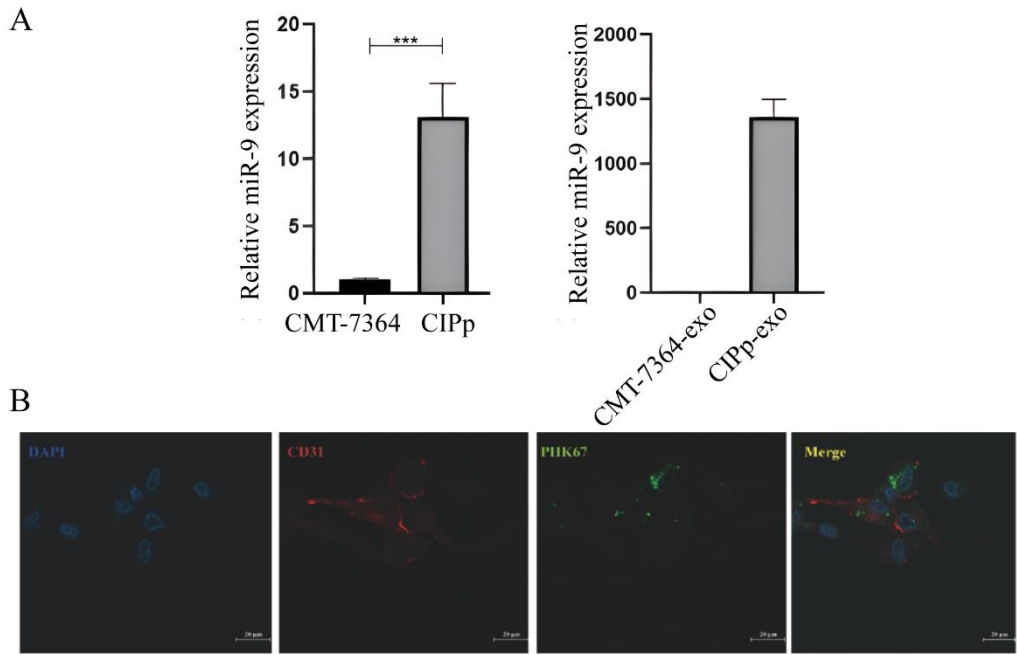


图 2.4 犬内皮样细胞吞噬犬乳腺肿瘤来源的外泌体。（A）犬乳腺肿瘤细胞系和外泌体中 miR-9 的表达。（B）吞噬试验（DAPI 是细胞核的染料，CD31 是血管内皮细胞的表面标志物，PHK67 是外泌体的染料）。***p<0.001。

Fig. 2.4 Phagocytosis of Exosomes Derived from Canine Mammary Tumors by Canine Endothelial-like Cells. (A) Expression of miR-9 in canine mammary tumor cell lines and exosomes. (B) Phagocytosis assay (DAPI stains the cell nuclei, CD31 is a surface marker of vascular endothelial cells, and PHK67 is a dye for exosomes). ***p<0.001.

2.3.4 miR-9 促进了犬内皮样细胞的迁移和侵袭能力

为了探究 miR-9 对犬内皮样细胞的影响，用 miR-9-5p 模拟物转染犬内皮样细胞。RT-qPCR 结果显示，转染的犬内皮样细胞过表达 miR-9（图 2.5）。这表明转染试验是成功的。为了探究高表达的 miR-9 对犬内皮样细胞的影响，进行了 transwell 侵袭

迁移试验, 试验结果显示: miR-9 组的犬内皮样细胞侵袭能力和迁移能力都显著高于 NC 组 (图 2.6)。这说明 miR-9 过表达显著增加了犬内皮样细胞的迁移和侵袭能力。

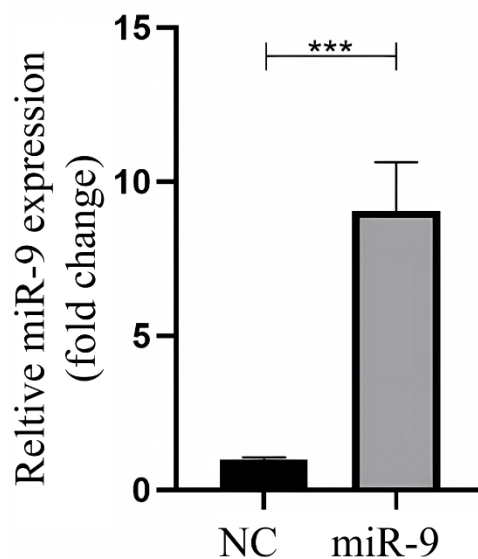
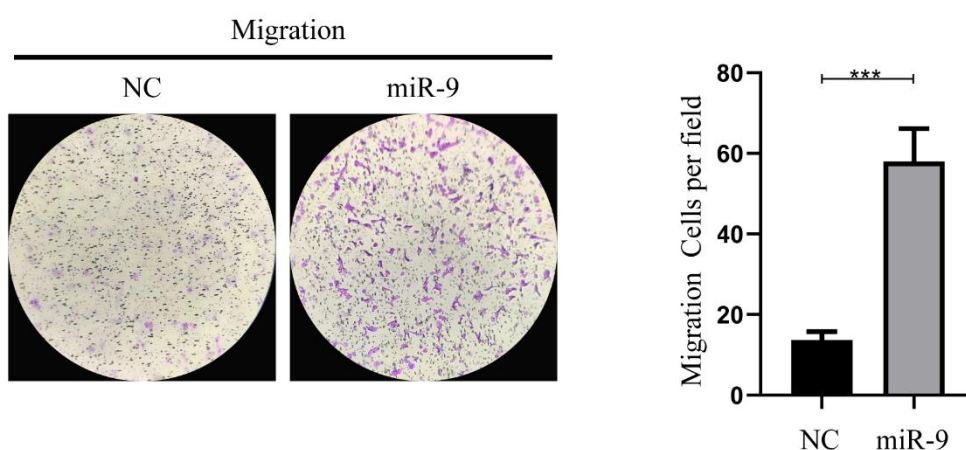


图 2.5 犬内皮样细胞转染 miR-9-5p 模拟物后 miR-9 的表达水平。*** $p < 0.001$ 。

Fig. 2.5 Expression Level of miR-9 after Transfection of miR-9-5p Mimic into Canine Endothelial-like Cells. *** $p < 0.001$.

A



B

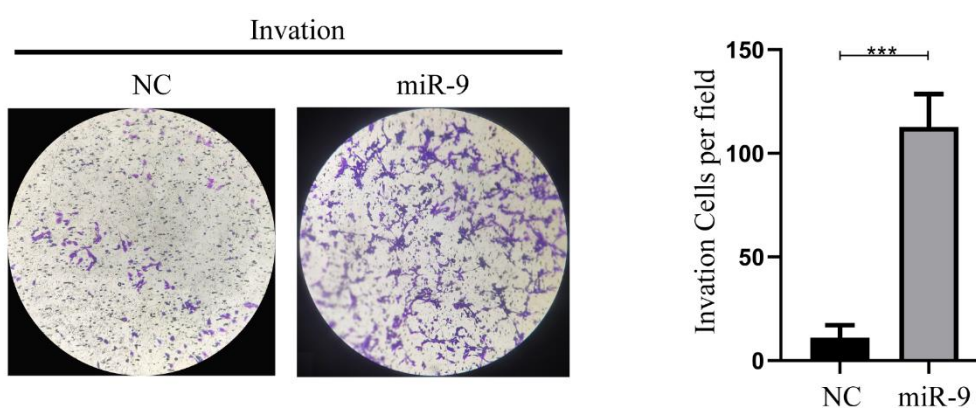


图 2.6 MiR-9 过表达促进犬内皮样细胞的迁移和侵袭。Transwell 试验中跨膜迁移（A）和侵袭（B）的细胞数。*** $p<0.001$ 。

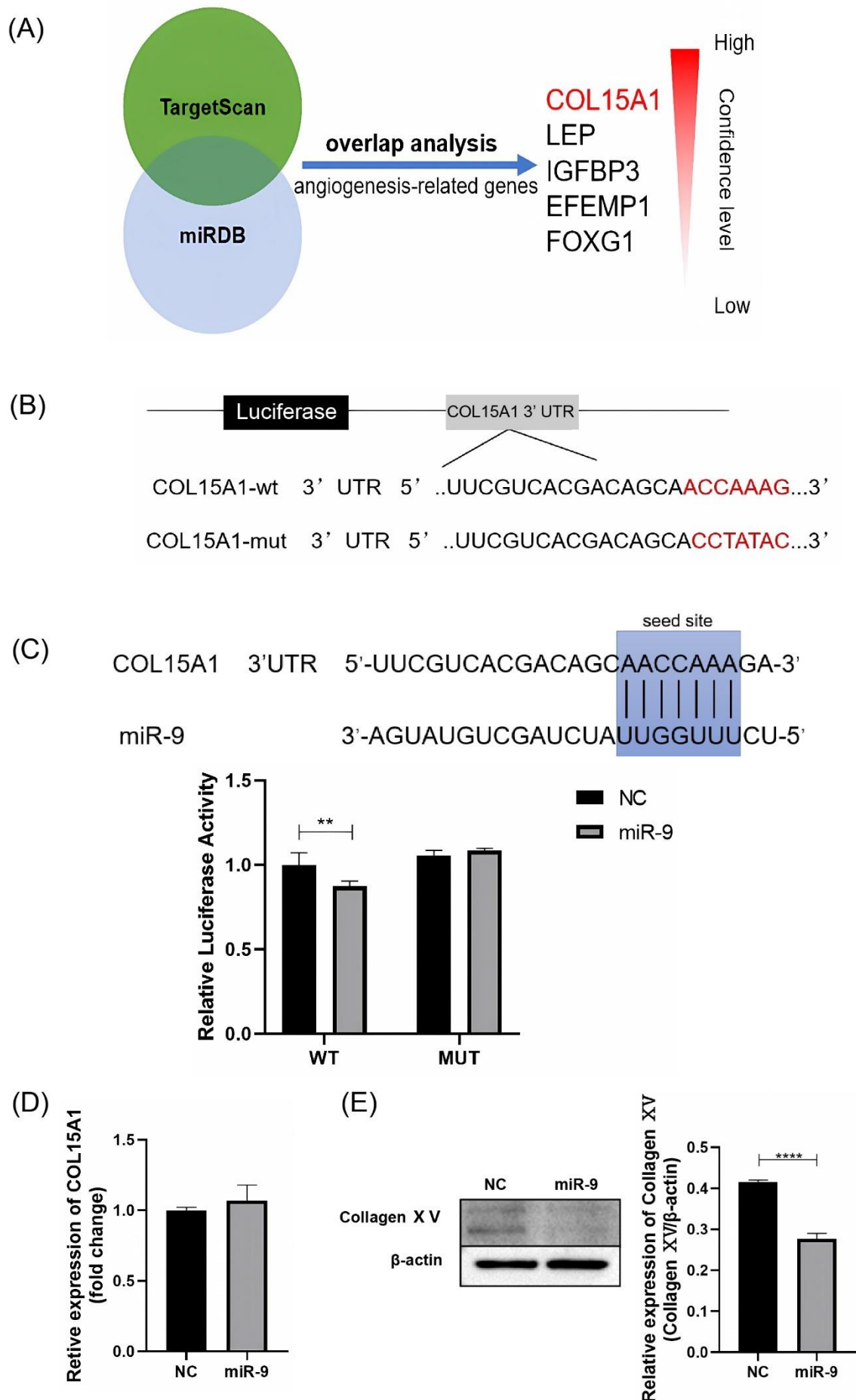
Fig. 2.6 Overexpression of miR-9 Promotes Migration and Invasion of Canine Endothelial-like Cells. Number of cells migrating across the membrane in Transwell assays for migration (A) and invasion (B). *** $p<0.001$.

2.3.5 miR-9 靶向 *COL15A1* 基因并抑制 collagen XV 蛋白表达

MiRNA 通常通过靶向结合目的基因的 3'UTR 区，导致靶基因的 mRNA 表达水平下降或翻译过程受阻，起到调控受体细胞生理状态的作用。为了进一步确定 miR-9 促进犬内皮样细胞迁移和侵袭能力的调控机制，使用 TargetScan 和 miRDB 数据库进行重叠分析，以确定潜在的靶基因。结果表明，有 408 个基因可能是 miR-9 的靶基因。其中，*COL15A1* 是从五个与血管生成和细胞迁移相关的基因中筛选出来的，因为它与 miR-9 的结合潜力最强（图 2.7 A）。在双荧光素酶试验中，miR-9+WT 处理组细胞荧光素酶活性明显强于 NC+WT 处理组，而 miR-9+MUT 处理组与 NC+ MUT

处理组无差异（图 2.7 B, C），这说明 *COL15A1* 是 miR-9 的靶基因。且在 miR-9 组和 NC 组之间，*COL15A1* 基因的表达没有差异（图 2.7 D）。但转染 miR-9-5p 模拟物的犬内皮样细胞中 collagen XV 蛋白的表达明显低于 NC 处理组（图 2.6 E）。推测 miR-9 可能与 *COL15A1* 基因结合，通过调控翻译进程，进而抑制 collagen XV 蛋白的表达。

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究



miRDB 数据库重叠分析预测 miR-9 的潜在靶基因。*COL15A1* 基因是从 5 个与 miR-9 结合能力最强的血管生成相关基因中筛选出来的。(B) 野生型 (Wt) 或突变型 (Mut) 的 *COL15A1* 3'UTR 端与 miR-9 结合序列。(C) 双荧光素酶试验测定 miR-9 与 *COL15A1* 结合情况。 $**p<0.01$ 。(D) miR-9 组与 NC 组 *COL15A1* 基因表达水平无明显差异。(E) miR-9 组中 collagen XV 的蛋白表达受到抑制。 $****p<0.0001$ 。

Fig. 2.7 miR-9 Targets the *COL15A1* Gene to Inhibit the Expression of Collagen XV Protein. (A) Overlapping analysis using the TargetScan and miRDB databases to predict potential target genes of miR-9. *COL15A1* was selected from among five angiogenesis-related genes with the strongest binding affinity to miR-9. (B) Binding sequence of miR-9 with the 3'UTR of wild-type (Wt) or mutant (Mut) *COL15A1*. (C) Dual-luciferase assay to determine the binding of miR-9 to *COL15A1*. $**p<0.01$. (D) No significant difference in *COL15A1* gene expression levels between the miR-9 group and the NC group. (E) Inhibition of collagen XV protein expression in the miR-9 group. $****p<0.0001$.

2.3.6 miR-9 影响蛋白翻译相关通路及血管生成相关基因

为了进一步研究 miR-9 促进 ELCs 迁移和侵袭的机制,对 miR-9 组犬内皮样细胞进行了转录组测序。结果显示,miR-9 组 185 个基因的表达与 NC 组比较有显著差异(图 2.8 A)。KEGG 富集分析表明,富集到最多 miR-9 组上调或下调差异基因的信号通路分别是 TGF- β signalling pathway 和 regulation of the actin cytoskeleton (图 2.8 B, C)。GO 富集分析发现,许多参与调节蛋白质翻译过程的基因都下调了表达(图 2.9)。因此,miR-9 可能通过调节翻译过程来抑制相关蛋白的表达。

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

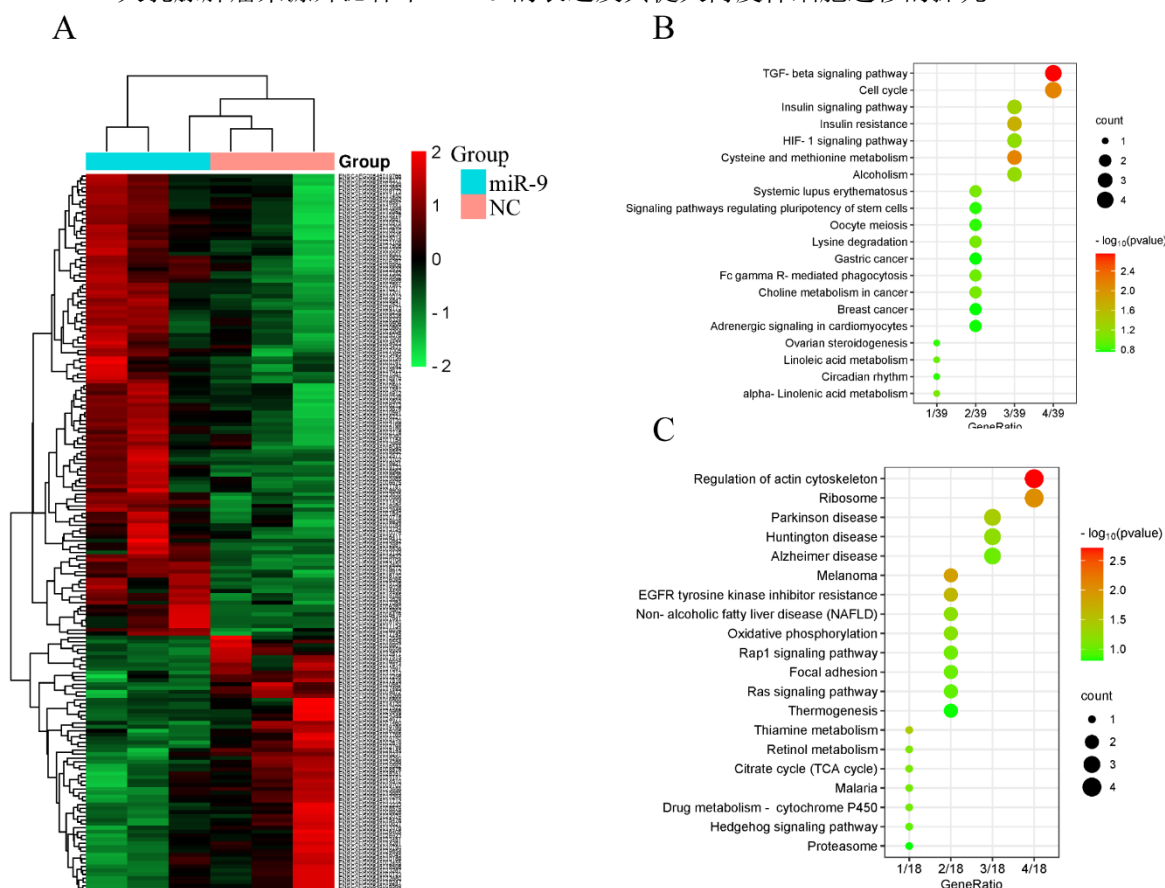


图 2.8 转染 miR-9-5p 模拟物和 NC 的犬内皮样细胞转录组测序分析 (n=3)。(A) miR-9 组与 NC 组之间 185 个差异表达基因的系统聚类热图。对这些差异表达基因的 KEGG 富集分析表明, 富集到最多 miR-9 组上调差异基因的信号通路是 TGF- β signalling pathway (B), 最多 miR-9 组下调差异基因的信号通路是 regulation of the actin cytoskeleton (C)。

Fig. 2.8 Transcriptome Sequencing Analysis of Canine Endothelial-like Cells Transfected with miR-9-5p Mimic and NC (n=3). (A) Systematic clustering heatmap of 185 differentially expressed genes between the miR-9 group and the NC group. KEGG enrichment analysis of these differentially expressed genes revealed that the most enriched signaling pathway for upregulated genes in the miR-9 group was the TGF- β signaling pathway (B), while the most enriched signaling pathway for downregulated genes in the miR-9 group was the regulation of the actin cytoskeleton (C).

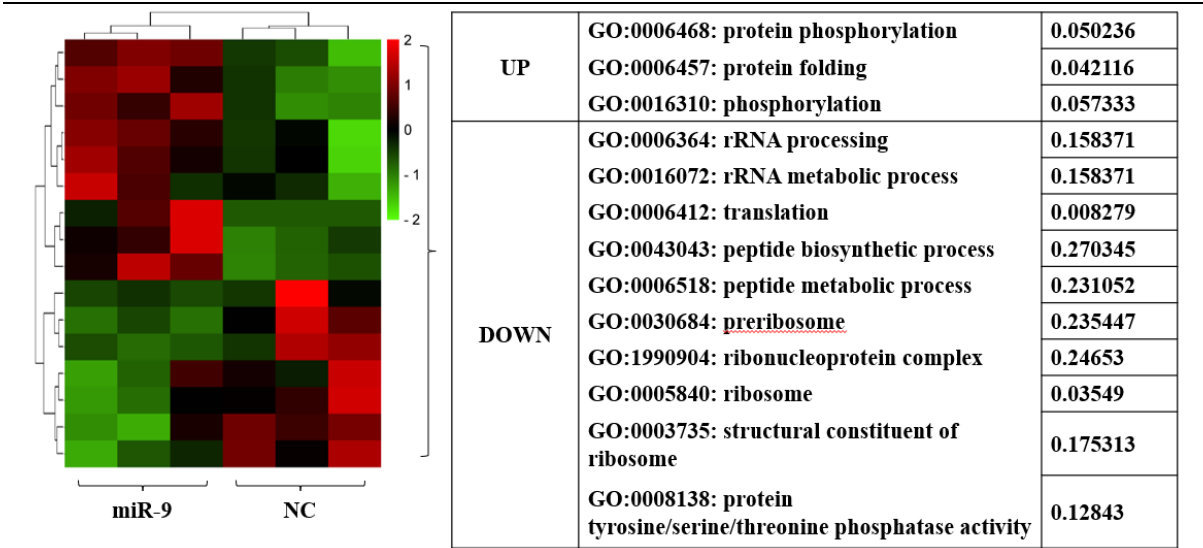


图 2.9 GO 富集分析结果，许多差异基因参与了抑制蛋白质翻译过程，左侧为这些差异基因的表达热图，右侧为其被富集到的 GO terms。

Fig. 2.9 GO Enrichment Analysis Results, Revealing Multiple Differential Genes Involved in Inhibiting Protein Translation Processes. The expression heatmap of these differential genes is shown on the left, and the GO terms they are enriched in are presented on the right.

2.3.7 miR-9 影响犬内皮样细胞的血管生成相关基因

在前人研究的基础上，筛选了 KEGG 信号通路中与细胞迁移和血管生成相关的信号通路，发现了 13 个差异表达基因。RT-qPCR 结果证实，与 NC 组相比，miR-9 组有 8 个基因表达上调（图 2.10 A），分别是：*DIAPH2*、*DNMT3A*、*Fzd5*、*HGF*、*PDGFD*、*PPARGC1B*、*SCN5A* 和 *PTPRF*。这些基因参与了与细胞迁移和血管生成相关的多个信号通路，如 KEGG 弦图所示（图 2.10 B）。这表明 miR-9 可能通过调节与细胞迁移和血管生成相关的几个基因和信号通路来控制细胞迁移。

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

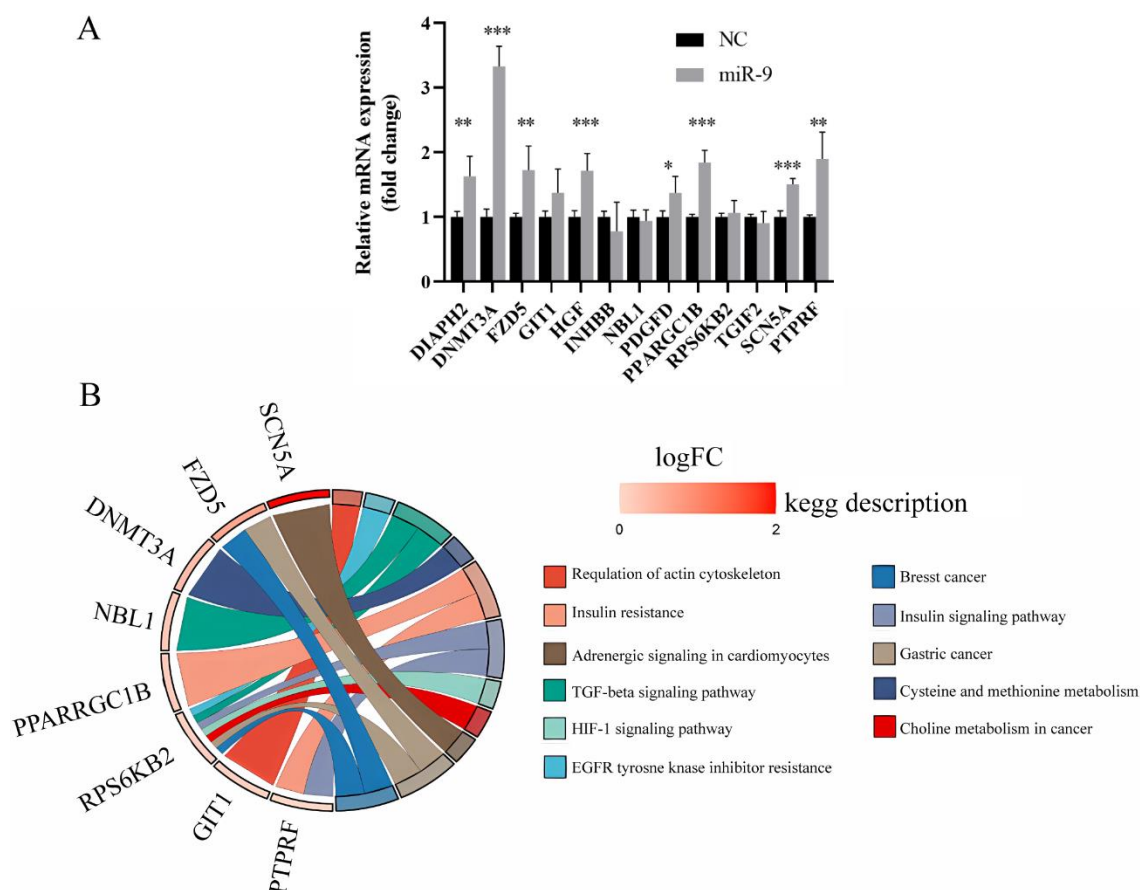


图 2.10 miR-9 的过表达增加了细胞迁移和血管生成相关基因的表达。(A) 发现了 13 个差异表达基因，它们与细胞迁移和血管生成信号通路相关。用 RT-qPCR 验证。8 个基因上调 (*DIAPH2*、*DNMT3A*、*Fzd5*、*HGF*、*PDGFD*、*PPARGC1B*、*SCN5A* 和 *PTPRF*)。(B) 上述 8 个上调基因的 KEGG 富集弦图，以及 miR-9 组与 NC 组的相对表达量。

Fig. 2.10 Overexpression of miR-9 Increases the Expression of Genes Related to Cell Migration and Angiogenesis. (A) Thirteen differentially expressed genes were identified that are associated with cell migration and angiogenesis signaling pathways. These genes were validated using RT-qPCR. Eight genes were upregulated (*DIAPH2*, *DNMT3A*, *Fzd5*, *HGF*, *PDGFD*, *PPARGC1B*, *SCN5A*, and *PTPRF*). (B) KEGG enrichment chord diagram of the eight upregulated genes mentioned above, along with the relative expression levels in the miR-9 group compared to the NC group.

2.4 讨论

2.4.1 犬内皮样细胞的培养

人脐静脉内皮细胞，简称 HUVECs，是一种来源于脐带组织的干细胞，是脐静脉的重要组成部分之一，它们具有高度的增殖能力和多分化潜能，能够模拟体内血管内

皮细胞的结构和功能,形成血管网络^[77]。1937年,人脐静脉内皮细胞首次成功培养,这一成就为后续的医学研究提供了重要的细胞模型,引发了现代血管生物学的研究^[78]。人脐静脉内皮细胞具有高度的增殖能力和多分化潜能,能够模拟体内血管内皮细胞的结构和功能,形成血管网络。其常被用以体外增殖,培养的方式获得血管内皮细胞,而非采用直接从静脉或动脉血管获取的内皮细胞。血管内皮细胞在机体正常生理活动中扮演着至关重要的角色,特别是在维持血管生成和调节方面。它们在组织工程领域也具有广阔的应用前景。它们可以与其他细胞和生物材料一起用于构建人工组织和器官,为医学研究和治疗提供了新的可能性,比如牙髓再生^[79]。在后续的探索中,有研究者证明内皮细胞可以从胚胎干细胞中分化而来^[80]。在本研究中,本课题组成功地将犬胚心肌细胞培养并分化为具有内皮细胞关键特征的犬内皮样细胞(ELCs),它不但能稳定增殖传代,还表达内皮细胞的标志蛋白:CD31蛋白,并具有体外小管形成的能力。在逆转录-聚合酶链式反应试验中发现,犬内皮样细胞基因表达中间质细胞标记物(α -SMA),这是间质细胞污染和内皮-间质转变(Endothelial-Mesenchymal Transition, EMT)存在的特征,是在使用酶消化法进行原代培养时经常出现的问题,间质细胞污染可能来源于培养物中混合的其他细胞类型,这些细胞可能在培养过程中增殖并干扰目标细胞的生长和特性。而内皮-间充质转化则是指内皮细胞在特定条件下转化为具有间充质特征的细胞,这种转化可能影响细胞的生长和分化模式,进而干扰试验结果^[81-82]。Western blot结果表明, α -SMA蛋白在ELCs中有显著的表达,但细胞免疫荧光染色却几乎未检测到,这表明原代细胞得到了高度纯化。因此,本研究获得的犬内皮样细胞可用于未来对犬类内皮细胞的研究。

因此,本研究获得的犬内皮样细胞可用于今后对犬内皮细胞的研究。然而,还存在一个不可忽视的问题是:犬内皮样细胞的培养需要一个特殊的培养环境,这可能与未查明的生物体内的生长因子有关,它在传统的细胞培养条件下不能无限期地代代相传,当传代次数过多,其细胞干性会降低,并失去体外小管形成能力,这是亟待解决的问题。

2.4.2 犬乳腺肿瘤外泌体对内皮细胞的影响

外泌体是由细胞分泌的小囊泡,存在于所有的生物体液中,具有携带和传递蛋白质、miRNA、脂质等多种生物分子的能力,因此在细胞间通信和疾病进程中起着至关重要的作用。在疾病诊断方面,外泌体的独特性质使其成为液体活检的理想候选者。

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究

人类医学中,许多研究探究了外泌体作为生物标志物的潜力^[83]。MiRNA 是转录后调节因子,通常与一个或多个靶 mRNA 的 3'UTR 中的互补序列结合,以抑制翻译或降解靶基因^[84]。同时,miRNA 是外泌体内部存在的生物分子之一,它们可以被邻近或远处的细胞摄取,并随后调节受体细胞^[85]。外泌体 miRNA 在疾病进展中起重要作用,可以刺激肿瘤血管生成,促进肿瘤转移^[86]。尤其在癌症领域,外泌体 miRNA 特异性表达往往象征着癌症的潜伏期或预后不良,比如人体血清的 miR-9-5p 在肾透明细胞癌患者中高表达,并可作为其的生物标志物^[87]。

本研究成功将犬胚胎原代心肌细胞诱导分化为犬内皮样细胞,并证明了犬乳腺肿瘤细胞分泌的外泌体能被犬内皮样细胞摄入。这表明犬乳腺肿瘤细胞 CIPp 的外泌体具有将 miR-9 递送至犬内皮样细胞内的潜能。在本研究中,成功使用超速离心法分离了犬乳腺肿瘤细胞系 CIPp 的外泌体,它不但具有正常外泌体普遍拥有的半径和茶杯状结构,还能稳定表达外泌体标志蛋白:CD63 和 TSG101。这说明提取的外泌体可用于今后对犬乳腺肿瘤细胞外泌体的研究。并且当它与犬内皮样细胞共培养时,荧光显微镜下可观察到犬乳腺肿瘤外泌体能够被犬内皮样细胞吸收,这符合本课题组的假设,证明了外泌体可以作为生物信息的传递信使,将犬乳腺肿瘤中高表达的 miR-9 传递至犬内皮样细胞中,以此影响受体细胞。在本次试验开始之前,本课题组讨论了 miRNA 与肿瘤转移前生态位的关系,认为,犬乳腺肿瘤中高表达的 miR-9 对犬内皮样细胞的影响属于构建肿瘤转移前生态位的一部分,它有利于犬乳腺肿瘤的转移和恶性发展。

2.4.3 肿瘤外泌体 miRNA 促进肿瘤发展

癌症的发展涉及一系列事件,其中正常细胞首先通过一系列遗传事件转变为快速生长的细胞^[88]。然而,这些快速生长的细胞需要一个有利的环境才能进展为癌症。这种有利于肿瘤细胞生长、生长和转移的环境称为肿瘤微环境^[89]。MiRNA 是肿瘤微环境中的关键信使,影响免疫抑制、肿瘤进展、转移和耐药的各种过程。在 TME 中调节 miRNA 的战略对克服这些挑战具有重要意义。

外泌体 miRNA 在癌症发生中扮演着重要的角色,尤其是对于远距离预转移灶的形成具有驱动作用,然而其具体的作用机制尚不完全清楚。据报道,miR-25-3p 被发现能够促进结直肠癌细胞的转移,并经由外泌体的方式传递至内皮细胞。进一步研究发现 miR-25-3p 通过靶向 KLF2 和 KLF4 基因,在内皮细胞内调控血管内皮细胞相关

的蛋白表达如 VEGFR2、ZO-1、occludin 和 Claudin5, 从而增加血管通透性和血管生成, 此外, 结直肠癌细胞外泌体 miR-25-3p 的存在也能显著促进血管渗漏, 并进一步促进了小鼠肝、肺结直肠癌的转移过程^[90]。在临床方面, 循环系统外泌体中的 miR-25-3p 表达水平在发生转移的结直肠癌患者中显著高于未发生转移的患者, 这说明外泌体中的 miR-25-3p 参与了预转移灶的形成, 并具有作为结直肠癌转移的血液生物标志物的潜力^[90]。MiRNA 可以在癌细胞和间质细胞之间转移, 从而有效地沉默 mRNA, 重新编程靶细胞转录^[91]。例如: 来源于肝癌细胞外泌体的 miR-1247-3p 可以传递到癌症相关成纤维细胞, 并启动癌症相关成纤维细胞的激活, 从而促进肝细胞癌的转移^[92]。通过外泌体介导的、从星形胶质细胞转移到肿瘤细胞的 miR-19a 抑制了 PTEN 的表达, 并促进了脑部肿瘤的恶性增殖^[93]。这些研究表明, 外泌体介导的 miRNA 在癌细胞和间质细胞之间的转移对于癌症的进展是具有推动作用的, 它通过参与构建受体细胞中适合癌细胞转移的肿瘤细胞转移前生态位达到促进肿瘤转移的作用, 参与的方式通常表现为增加血管通透性、促进内皮细胞迁移与侵袭等方式^[91-93]。

在本研究中, 探究了在犬乳腺肿瘤背景下肿瘤细胞外泌体携带的 miR-9 对内皮细胞迁移侵袭能力的促进作用以及调控机制, 这为 miR-9 在犬乳腺肿瘤临床诊断和预后检测方面的应用提供了基础。在人医方面, 乳腺肿瘤患者的传统治疗方法包括放疗、化疗和辅助化疗, 即使最近批准的几种骨骼特效药也只能缓解骨骼相关的并发症, 但由于获得了治疗耐药性, 死亡率保持在较高水平^[94]。乳腺肿瘤的骨转移仍然是乳腺肿瘤患者最常见的威胁, 因此需要进一步的研究来阐明乳腺肿瘤骨转移的详细机制, 并为临床诊断和治疗寻找新的潜在生物标志物。最近的研究表明, 乳腺肿瘤细胞分泌大量的分子, 如血管细胞黏附分子 1、细胞间黏附分子 1、赖氨酰氧化酶和白介素 6, 它们直接或间接地刺激破骨细胞的活性^[95]。这些细胞外通讯促进了骨的降解, 并塑造了肿瘤转移前适宜微环境的, 从而促进了乳腺肿瘤的进展, 提示形成了骨转移的反馈环路^[96-97]。过去的研究表明: 乳腺肿瘤来源的外泌体可以破坏远处器官中的血管内皮屏障, 从而增加脑和肺转移的发生率^[98-99]。然而, 犬乳腺肿瘤分泌的外泌体是否通过形成肿瘤转移前生态位来影响乳腺肿瘤的发展, 目前尚不清楚。这些机制的识别可能会为开发犬乳腺肿瘤的新治疗靶点提供新的途径。

2.4.4 miR-9 促进内皮细胞的迁移与侵袭能力

肿瘤血管形成是实体瘤进展的基本步骤。在现代肿瘤血管领域, 研究者普遍认为

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究
肿瘤血管生成由不同的血管生成途径协调,而不是这一过程仅依赖于现有内皮血管生成。事实上,在这一过程中,肿瘤细胞的作用越来越重要^[100]。更重要的是,肿瘤介导的血管形成的非规范机制(如血管拟态、肿瘤向内皮样细胞分化、血管共选)的存在是强侵袭性的癌症所特有的,并且与肿瘤进展和生存率下降有关^[100]。

MiR-9 在人类乳腺肿瘤中具有公认的促进肿瘤转移的功能,它与预后不良、EMT 和干细胞特征有关^[101-102]。并且,过去研究显示它与人乳腺肿瘤的预后不良、EMT 水平呈正相关。在以往的研究中,miR-9 常常与肿瘤发展和转移联系起来,并且,miR-9 的异常表达也与肿瘤的产生和恶化息息相关,在先前的研究中,miR-9 展现出它作为各类肿瘤相关生物标志物的潜力。在脑癌中,miR-9 的表达量显著上升,并且可用于区分原发或转移的脑肿瘤,作为其生物标志物,具有非常高的准确性^[103]。基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMP-14, 也被称为膜型基质金属蛋白酶-1 (Membrane type-1 MMP, MT1-MMP)),在促进肿瘤细胞重塑和穿透细胞外基质(ECM)方面发挥着至关重要的作用,MMP-14 通过作为周细胞胶原酶和 proMMP-2 的激活剂来促进肿瘤侵袭,并且与肿瘤发生、转移和血管生成直接相关。先前的研究表明,miR-9 通过直接靶向结合 3'UTR 区域来减弱 MMP-14 的表达,并在体外和体内抑制神经母细胞瘤细胞的侵袭、转移和血管生成^[104]。另外,miR-9 的异常表达也与乳腺肿瘤有关,研究表明 miR-9 的高表达表明乳腺肿瘤患者预后较差,并与高组织学分级相关^[104]。本课题组确实证明了 miR-9 本身能够在体外和体内增强血管生成特性,这与人乳腺肿瘤的结果呈现一致的趋势。本研究运用生物信息学方法,依据 miR-9 和 COL15A1 的生物学特性及相互关系推测 miR-9 可能通过结合 COL15A1 基因的靶点,介导 mRNA 的降解、抑制蛋白的翻译进程,从而发挥抑制 collagen XV 蛋白表达的作用。这一发现为研究 collagen XV 表达调控机制提供了理论基础,对于深入探究肿瘤细胞发生、转移、侵袭的分子机制及治疗具有重要的意义。TGF- β signalling pathway 信号通路涉及激活或抑制多种癌症、免疫性疾病,regulation of the actin cytoskeleton 信号通路参与调节肌动蛋白细胞骨架,与细胞的运动性异常、形态改变等方面有关^[103]。GO 富集分析发现,miR-9 组中许多参与调节蛋白质翻译过程的基因下调(图 2.9),这与本课题组之前的推测:miR-9 与 COL15A1 基因结合,通过调控翻译进程,进而抑制 collagen XV 蛋白的表达是一致的。miR-9 可以抑制靶向 mRNA 翻译为 collagen XV 蛋白,而不是影响 COL15A1 的基因表达,通过抑制 collagen XV 蛋白的翻译,促进犬内皮样细胞的迁移能力,但 collagen XV 蛋白对细胞迁移的分子

机制尚不清楚, 值得进一步研究。

在本研究中, 犬内皮样细胞中 miR-9 过表达调控了 8 个与细胞迁移和血管生成相关的基因。人类 DIAPH2 是透明果蝇的同源物, 是果蝇一组蛋白质中的一员, 这些蛋白质可以建立细胞极性并重组果蝇的肌动蛋白细胞骨架。此外, 多项研究表明, DIAPH2 可以调节细胞的运动和黏附, 在细胞学研究领域, DIAPH2 主要在细胞骨架动态调控方面展示其功能。DIAPH2 结合肌动蛋白单体, 并协同促进肌动蛋白的聚合, 起着细胞迁移和形态维持的重要作用。此外, DIAPH2 还介入细胞生命周期的调控和细胞信号传递等过程, 这些过程对于细胞的正常增长和分化来说至关重要^[104-105]。DNA 甲基化是哺乳动物基因组的主要表观遗传修饰, 它能在不改变 DNA 序列的情况下, 通过添加甲基基团来影响基因的表达, 其中包括三种 DNA 甲基转移酶, 包括 DNMT1、DNMT3a 和 Dnmt3b^[106]。DNMT3Ab 是 DNMT3A 异构体家族中的一员, 之前的研究表明它可以增强胃癌细胞的迁移和侵袭能力^[107]。FZD5 是 Wnt/FZD 家族的一员, 具有调节细胞周期和促血管生成作用, 并参与内皮细胞内皮小管的形成和细胞的迁移^[108-109]。HGF, 即肝细胞生长因子 (Hepatocyte Growth Factor), 是一种大小为 92 kDa 的无生物活性的单链多肽链前体, 它可以促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭, 从而加速肿瘤的生长和转移, 还可以诱导血管平滑肌细胞和人成肌细胞迁移^[110-112]。PDGF, 即血小板衍生生长因子 (Platelet-Derived Growth Factor), 其最初是作为血小板的一种成分被发现的, 它在细胞增殖、迁移、分化以及血管生成等方面发挥关键作用。在正常的循环系统的血管里, PDGF 的配体低水平表达, 而它们在许多血管和心血管疾病中高表达, 包括 PDGF-C 和 PDGF-D, 以促进平滑肌细胞迁移^[113]。PDGF-D 过表达还可以促进巨噬细胞迁移^[114]。PPARGC1B, 即过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 β (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta), 其参与 PPAR 信号网络, 通过血管内皮细胞生长因子信号通路促进内皮细胞迁移, 显著增加肌肉血管密度^[113-115]。SCN5A 基因是钠通道 α 亚基的编码基因, 其主要功能是离子传递和门控功能, 编码心脏主要钠通道 NaV1.5 的 α 亚基, 它在心脏电生理功能调节中起关键作用^[116]。PTPRF 是一种蛋白酪氨酸磷酸酶受体, 蛋白酪氨酸磷酸酶通过与酪氨酸激酶协同配合, 调控细胞的存活、迁移和侵袭^[117]。

在临床实践中, 已有研究表明 miR-9 高水平表达是与患者无病生存率较低相关的一种独立预后因素^[97]。本研究旨在通过对 miR-9 在犬乳腺肿瘤细胞中的体外表达水平以及 miR-9 在犬内皮样细胞中的调控作用的探究, 进一步揭示 miR-9 在犬乳腺

2 犬乳腺肿瘤来源外泌体中 miR-9 的表达及其促犬内皮样细胞迁移的探究
肿瘤发生发展中的生物学作用及其作用机制，为探讨 miR-9 在犬乳腺肿瘤的应用奠定基础。研究结果将为临床诊断和预后的精准预测与治疗提供新思路和新方法，为犬乳腺肿瘤的治疗提供重要的参考。

3 结论

1 本研究成功提取了犬胚胎心肌原代细胞，并将其诱导分化培养为具有内皮细胞特征的犬内皮样细胞，该细胞呈现内皮细胞关键特征。

2 本研究证明了犬内皮样细胞能够摄取犬乳腺肿瘤细胞外泌体。且 miR-9 的过表达增加了犬内皮样细胞的迁移与侵袭，其与 *COL15A1* 基因的 3'UTR 区域结合，影响与细胞迁移和血管生成相关的多种通路和基因。

因此，miR-9 具有成为肿瘤性疾病诊断和治疗的靶点的潜力。

4 参考文献

- [1] 冯会利,贺丽欣,Talha Umar,等.犬乳腺肿瘤的诊断与治疗综述[J].河南农业, 2023(30):63-64.
- [2] Im K S, Kim N H, Lim H Y,et al.Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia.[J]. Veterinary Pathology, 2014, 51(3):549-59.
- [3] Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R,et al.Classification and grading of canine mammary tumors.[J].Veterinary Pathology, 2011, 48(1):117-126.
- [4] Beauvais W, Cardwell J M, Brodbelt D C .The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs – a systematic review[J]. Journal of Small Animal Practice, 2012, 53(6):314-322.
- [5] Sorenmo K U, Shofer F S, Goldschmidt M H .Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs with Mammary Carcinoma[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2000, 14(3):266-270.
- [6] Chang C C, Tsai M H, Liao J W, et al. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2009, 235(4):391-331.
- [7] 迟庆琳,梁晚枫.一例老年犬乳腺肿瘤的诊治[J]. 云南畜牧兽医, 2023(5):22-24.
- [8] Kristiansen V M, Pea L, L Díez Córdova, et al. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial [J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2015, 30(1):230-241.
- [9] Sorenmo, Karin. Canine mammary gland tumors. The Veterinary clinics of North America. [J]. Small animal practice, 2003, 33(3):573-596.
- [10] Al Kawas, Hivin, Saaïd, et al. How VEGF-A and its splice variants affect breast cancer development - clinical implications. [J]Cellular oncology (Dordrecht), 2022, 45(2):227-239.
- [11] Sohn E J, Jung D B, Han I, et al.CNOT2 promotes proliferation and angiogenesis via VEGF signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells (vol 412, pg 88, 2018)[J].Cancer letters, 2018 431-438.
- [12] Linlin Tang, Xiaowen Ma, Qi Tian, et al.Inhibition of angiogenesis and invasion by \{DMBT\ is mediated by downregulation of \{VEGF\ and MMP-9 through Akt pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells[J].Food and Chemical Toxicology, 2013. 536-547
- [13] Luo Qingxi, Wang Jun, Zhao Wenyan et al. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications.[J].J Hematol Oncol, 2020, 13-19.
- [14] Folkman J . Tumor angiogenesis: therapeutic implications.[J].New England Journal of Medicine, 1971, 285(21):1182-1194.
- [15] 刘晨,成姣,刘烨等.内皮细胞衰老与血管功能障碍[J/OL].中国动脉硬化杂志,1-7[2024-03-20].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1262.R.20240314.1319.002.html>.
- [16] Grange Cristina, Tapparo Marta,Collino Federica et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche.[J].Cancer Res, 2011, 71: 5346-5356.
- [17] Kaplan, Rosandra N, Riba, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. [J]Nature, 2005, 438(7069):820-827.
- [18] Sceneay, Jaclyn, Smyth, et al. The pre-metastatic niche: finding common ground. [J]Cancer metastasis reviews, 2013, 323-342.
- [19] Liu, Yang, Cao, Xue tao. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. [J]Cancer cell, 2016, 30(5):668-681.
- [20] 丁海涛,赵凯,郭青龙等.肿瘤转移前微环境的特征及其作用[J].世界最新医学信息文

摘,2017,17(14):43-45.

- [21] Saleem S N, Abdel-Mageed A B . Tumor-derived exosomes in oncogenic reprogramming and cancer progression[J].Cellular & Molecular Life Sciences Cmls, 2014, 72(1):1-10.
- [22] Zhou Weiyang, Fong Miranda Y,Min Yongfen, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis.[J].Cancer Cell, 2014, 25: 501-515.
- [23] Gupta G P, Nguyen D X, Chiang A C, et al.Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis[J].Nature, 2024, 3-20.
- [24] Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, et al. Pathophysiology of tumor neovascularization[J]. Vasc Health Risk Manag, 2005, 1 (4) : 277-290.
- [25] Rodrigues, Stephen F, Granger. Blood cells and endothelial barrier function. [J]Tissue barriers, 2015, 72-78.
- [26] Li S, Huang N F, Hsu S . Mechanotransduction in endothelial cell migration [J]. J Cell Biochem, 2005(6)103-124.
- [27] Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. [J]New England Journal of Medicine, 285(21), 11-22.
- [28] Sleenckx, N, Van Brantegem, L, et al. Angiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. [J]Journal of comparative pathology, 2013, 1502-1513.
- [29] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al.Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. [J]. The Journal of Evidence-Based Medicine, 2004, 350(23):2335-2342.
- [30] Kuczynski E A, Vermeulen P B, Pezzella F,et al.Vessel co-option in cancer [J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2019, 16-21.
- [31] Fathallah-Shaykh H M, Zhao L J, Kafrouni A I,et al.Gene Transfer of IFN- γ into Established Brain Tumors Represses Growth by Antiangiogenesis [J]. Journal of Immunology, 2000, 164(1): 217-222.
- [32] Friesel R, Komoriya A, Maciag T . Inhibition of endothelial cell proliferation by γ -interferon [J]. The Journal of Cell Biology, 1987, 104(3): 689-696.
- [33] Fremder E, Munster M, Aharon A, et al. miR-9 and miR-200 Regulate PDGFR beta-Mediated Endothelial Differentiation of Tumor Cells in Triple-Negative Breast Cancer [J]. Cancer research: The official organ of the American Association for Cancer Research, Inc, 2016, 76(18):5562-5572.
- [34] Zhuang G, Wu X, Jiang Z,et al.Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway.[J].Embo Journal, 2013, 31(17): 3513-3523.
- [35] Yi W W. Long noncoding RNA LINC00968 promotes endothelial cell proliferation and migration via regulating miR-9-3p expression [J]. Journal of cellular biochemistry. 2019, 120-125.
- [36] Yao X, Xie L, Zeng Y. MiR-9 Promotes Angiogenesis via Targeting on Sphingosine-1- Phosphate Receptor 1 [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 20-38.
- [37] Zhang J, Chintalgattu V, Shih T, et al. MicroRNA-9 is an activation-induced regulator of PDGFR-beta expression in cardiomyocytes [J]. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2011, 51(3):337-346.
- [38] Fremder E, Munster M, Aharon A, et al. miR-9 and miR-200 Regulate PDGFR beta-Mediated Endothelial Differentiation of Tumor Cells in Triple-Negative Breast Cancer [J]. Cancer research: The official organ of the American Association for Cancer Research, Inc, 2016, 76 (18): 5562-5572.
- [39] Zhang H, Qi M, Li S, et al.microRNA-9 Targets Matrix Metalloproteinase 14 to Inhibit Invasion, Metastasis, and Angiogenesis of Neuroblastoma Cells [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2012, 11 (7): 1454-1466.
- [40] Kara G, Calin G A, Ozpolat B .RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2022, 182: 113-119.

4 参考文献

- [41] Madelaine, Romain, Sloan, , et al. MicroRNA-9 Couples Brain Neurogenesis and Angiogenesis. [J]Cell reports, 2017, 20 (7): 1533-1542.
- [42] Kahlert, C, Melo, et al. Identification of doublestranded genomic dna spanning all chromosomes with mutated KRAS and P53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014,291-306
- [43] Liu, Yanfang, Gu, et al. The exosomes in tumor immunity. [J]Oncoimmunology, 2015, 102-142.
- [44] Costa-Silva, Bruno, Aiello, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. [J]Nature cell biology, 2015, 17(6):816-826.
- [45] Fong, Miranda Y, Zhou, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. [J]Nature cell biology, 2015, 17(2):183-194.
- [46] Qiu X, Li Z, Han X,et al.Tumor-derived nanovesicles promote lung distribution of the therapeutic nanovector through repression of Kupffer cell-mediated phagocytosis [J]. Theranostics, 2019, 9(9): 2618-2636.
- [47] Fremder E, Munster M, Aharon A,et al.Tumor-derived microparticles induce bone marrow-derived cell mobilization and tumor homing: a process regulated by osteopontin. [J]. International Journal of Cancer, 2014, 135(2): 270-281.
- [48] RODRIGUES, GONCALO, HOSHINO, et al. Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis [J]. Nature cell biology,2019,21 (11): 1403-1412.
- [49] Sun X, Jiao X, Pestell TG et al. MicroRNA and cancer stem cells: the sword and the shield. [J]Oncogene 2014; 33: 4967-4977.
- [50] Li S, Huang N F, Hsu S .Mechanotransduction in endothelial cell migration [J]. J Cell Biochem, 2005(6) 229-248.
- [51] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M,et al.Circulating microRNA as stable blood-based markers for cancer detection [J]. National Academy of Sciences, 2008, 30-45.
- [52] Gwak J M, Kim H J, Kim E J, et al. MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2014, 147 (1): 39-49.
- [53] Yuji, Toiyama, Masanobu, et al.Serum miR-21 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2013, 30-45.
- [54] Simona F, Laura S, Simona T, et al. Contribution of proteomics to understanding the role of tumor-derived exosomes in cancer progression: state of the art and new perspectives.[J].Proteomics, 2013, 14(10-11).
- [55] Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. Nature, 2020, 2015, 527, (7578): 329-35.
- [56] Mckiernan J , Donovan M J , O'Neill, Vince,et al.A Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer at Initial Biopsy[J].Jama Oncology, 2016, 281-303.
- [57] Goto T , Fujiya M , Konishi H ,et al.An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, 21, 451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 116-123.
- [58] Li M , Zhou Y , Xia T ,et al.Circulating microRNAs from the miR-106a–363 cluster on chromosome X as novel diagnostic biomarkers for breast cancer [J]. Breast Cancer Research & Treatment, 2018, 231-245.
- [59] Lin Y , Dong H , Deng W ,et al.Evaluation of Salivary Exosomal Chimeric GOLM1-NAA35 RNA as a Potential Biomarker in Esophageal Carcinoma[J].Clinical Cancer Research, 2019, 3169-3181.
- [60] Rupaimoole R, Slack F J .MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2017, 16 (3): 203-222.

- [61] Reid G, Kao S C, Pavlakis N, et al. Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer [J]. *Epigenomics*, 2016, 1079-1085.
- [62] Yu Y, Yao Y, Yan H, et al. A Tumor-specific MicroRNA Recognition System Facilitates the Accurate Targeting to Tumor Cells by Magnetic Nanoparticles [J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2016, 318-328.
- [63] Liu Y, Lei P, Qiao H, et al. miR-9 Enhances the Chemosensitivity of AML Cells to Daunorubicin by Targeting the EIF5A2/MCL-1 Axis [J]. *International journal of biological sciences*, 2019, 15 (3): 579-586.
- [64] Shen M, Dong C, Ruan X, et al. Chemotherapy-induced extracellular vesicle miRNA promote breast cancer stemness by targeting ONECUT2 [J]. *Cancer Res*, 2019, 49-61.
- [65] Gravgaard K H, Lyng M B, Laenkholm A V, et al. The miRNA-200 family and miRNA-9 exhibit differential expression in primary versus corresponding metastatic tissue in breast cancer [J]. *Breast Cancer Research*, 2011, 13-19.
- [66] Naorem L D, Muthaiyan M, Venkatesan A. Identification of dysregulated miRNA in triple negative breast cancer: A meta-analysis approach [J]. *John Wiley & Sons, Ltd*, 2019(7), 78-91.
- [67] Arroyo, Jason D, Chevillet, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNA independent of vesicles in human plasma [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(24), 10324-10329.
- [68] Vickers K C, Palmisano B T, Shoucri B M, et al. MicroRNA are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins [J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 28-39.
- [69] Théry, Clotilde. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. [J] *F1000 biology reports*, 2011, 3-26.
- [70] Weickmann J L, Glitz D G. Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations. [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257 (15): 8705-8710.
- [71] Valadi H, Ekstr M K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNA and microRNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9 (6): 654-659.
- [72] Lawrie C H, Gal S, Dunlop H M, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNA in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. [J]. *Br J Haematol*, 2008, 5-29.
- [73] Ojha, R.; Nandani, R.; Pandey, et al. Emerging role of circulating microRNA in the diagnosis of human infectious diseases. [J] *Cell. Physiol.* 2019, 1030–1043.
- [74] Sporn J C, Katsuta E, Yan L, et al. Expression of MicroRNA-9 is Associated With Overall Survival in Breast Cancer Patients [J]. *Journal of Surgical Research*, 2019, 426-435.
- [75] Yaritza S, Márquez Adelys, Daniel D, et al. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem [J]. *Plos One*, 2015, 73-1.
- [76] Feliciano, Marcus Antônio Rossi, de Miranda, et al. The Importance of Ultrasonography in the Evaluation of Mammary Tumors in Bitches. [J] *Animals : an open access journal from MDPI*, 2023, 27-41.
- [77] Saba, S R, Zucker, W H, Mason, R G.. Some properties of endothelial cells isolated from human umbilical cord vein. *Series haematologica* (1968), 1973, 6(4): 56-68.
- [78] Jaffe E A. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins [J]. *J. Clin. Invest*, 1973, 52-67.
- [79] Khayat A, Monteiro N, Smith E E, et al. GelMA-Encapsulated hDPSCs and HUVECs for Dental Pulp Regeneration [J]. *Journal of Dental Research*, 2017, 96(2):192-201
- [80] Smith, Randall J, Andreadis. Generating Monocyte-Derived Endothelial-like Cells for Vascular Regeneration. [J] *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2022, 2375:13-19.

4 参考文献

- [81] Bischoff, Joyce, Aikawa. Progenitor cells confer plasticity to cardiac valve endothelium. [J]Journal of cardiovascular translational research, 2011, 4-16.
- [82] Nerem B R M . Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology.[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007, 362 (1484): 1445-1457.
- [83] Li, Yuman, Li, Yuman, Wen, Jiahao, et al. Extracellular Vesicles and Their Associated miRNA as Potential Biomarkers in Intracranial Aneurysm. [J]Frontiers in molecular biosciences, 2022,19-31.
- [84] Li Li Sun, Wen Dong Li, Feng Rui Lei, et al.The regulatory role of microRNA in angiogenesis-related diseases[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22 (10): 4568-4587.
- [85] Zhang, Jian, Li, Sha, Li, Lu, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. [J]Genomics, proteomics & bioinformatics, 2015, 13 (1): 17-24.
- [86] Li B, Cao Y, Sun M,et al.Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNA in cancer progression and therapy [J]. The FASEB Journal, 2021, 35-51.
- [87] Qin S, Shi X, Wang C,et al.Transcription Factor and miRNA Interplays Can Manifest the Survival of ccRCC Patients [J]. Cancers, 2019, 11-28.
- [88] Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg.Hallmarks of Cancer: The Next Generation [J]. Cell, 2011.
- [89] Xiao Y, Yu D .Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer[J]. Pharmacology Therapeutics, 2020, 221-241.
- [90] Zhu J, Sun L L, Li W D,et al. Clarification of the Role of miR-9 in the Angiogenesis, Migration, and Autophagy of Endothelial Progenitor Cells Through RNA Sequence Analysis: [J]. Cell Transplantation, 2020, 29(3): 952-958.
- [91] Melo S A, Sugimoto H, O'Connell J T,et al.Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2014 26-35.
- [92] Fang T, Lv H, Lv G,et al.Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer [J]. Nature Communications, 2018, 9(1):191-203.
- [93] Zhang L, Zhang S, Yao J, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth[J]. Nature, 2015, 191-203.
- [94] Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A,et al.Breast cancer [J]. The Lancet, 2005, 365 (9472): 1727-1741.
- [95] Massague J, Obenauf A C .Metastatic colonization by circulating tumour cells [J]. Nature, 2016, 298-323.
- [96] Ren, Guangwen, Esposito, et al.Bone metastasis and the metastatic niche. [J]Journal of molecular medicine (Berlin, Germany), 2015, 93(11):1203-1212.
- [97] Kang, Yibin. Dissecting Tumor-Stromal Interactions in Breast Cancer Bone Metastasis. [J]Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea), 2016, 31(2): 206-212.
- [98] Zhou W, Fong M Y, Min Y,et al. Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis [J]. Cancer Cell, 2014 14-24.
- [99] Maji S, Chaudhary P, Akopova I,et al.Exosomal Annexin II Promotes Angiogenesis and Breast Cancer Metastasis [J]. Molecular Cancer Research, 2016, 15(1): 93-107.
- [100]Cao Z, Shang B, Zhang G,et al. Tumor cell-mediated neovascularization and lymphangiogenesis contrive tumor progression and cancer metastasis. [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2013, 1836(2):273-286.
- [101]Ma L, Young J, Prabhala H, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis[J].Nature Cell Biology 2024, 3-20.
- [102]Gravgaard K H, Lyng M B, Laenholm A V, et al. The miRNA-200 family and miRNA-9 exhibit differential expression in primary versus corresponding metastatic tissue in breast cancer [J]. Breast Cancer Research, 2011, 13-28.

- [103] Nass D, Rosenwald S, Meiri E, et al. MiR-92b and miR-9 Are Specifically Expressed in Brain Primary Tumors and Can Be Used to Differentiate Primary from Metastatic Brain Tumors [J]. Brain Pathology, 2009, 19-27.
- [104] Daou P, Hasan S, Breitsprecher D, et al. Essential and nonredundant roles for Diaphanous formins in cortical microtubule capture and directed cell migration [J]. Molecular Biology of the Cell, 2014, 25 (5): 658-671.
- [105] Shih-Lei L, Tun-Hao C, Meng-Ju L, et al. Diaphanous-Related Formin 2 and Profilin I Are Required for Gastrulation Cell Movements [J]. Plos One, 2008, 41-64.
- [106] Mei Y, Han X, Liu Y, et al. Diaphanous-related formin mDia2 regulates beta2 integrins to control hematopoietic stem and progenitor cell engraftment [J]. Nature Communications 2024, 3-20.
- [107] Cui H, Hu Y, Guo D, et al. DNA methyltransferase 3A isoform b contributes to repressing E-cadherin through cooperation of DNA methylation and H3K27/H3K9 methylation in EMT-related metastasis of gastric cancer. [J]. Oncogene, 2018, 21-40.
- [108] Brandt M M, Van D C G M, Ihsan C, et al. Endothelial loss of Fzd5 stimulates PKC/Ets1-mediated transcription of Angpt2 and Flt1 [J]. Angiogenesis, 2018: 1-17.
- [109] Peterson Y K, Nasarre P, Bonilla I V, et al. Frizzled-5: a high affinity receptor for secreted frizzled-related protein-2 activation of nuclear factor of activated T-cells c3 signaling to promote angiogenesis [J]. Angiogenesis, 2017, 31-45.
- [110] Catlow K R, Deakin J A, Wei Z, et al. Interactions of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor with Various Glycosaminoglycans Reveal an Important Interplay between the Presence of Iduronate and Sulfate Density [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 283 (9): 5235-5248.
- [111] González, Mariela Natacha, De Mello W, Butler-Browne G S, et al. HGF potentiates extracellular matrix-driven migration of human myoblasts: involvement of matrix metalloproteinases and MAPK/ERK pathway [J]. Skeletal Muscle, 2017, 7(1): 20-36.
- [112] Harry, Ma, Tina, et al. Mechanisms of hepatocyte growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration. [J]. Circulation research, 2003, 36-47.
- [113] Folestad E, Kunath A. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2018, 31-48.
- [114] Xiong Z, Wang Q, Li W, et al. Platelet-Derived Growth Factor-D Activates Complement System to Propagate Macrophage Polarization and Neovascularization [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 46-71.
- [115] Rowe G C, Jang C, Patten I S, et al. PGC-1 β regulates angiogenesis in skeletal muscle [J]. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2011, 301-319.
- [116] Wen j, Lei, Yin, et al. SCN5A Variants: Association With Cardiac Disorders. [J]. Frontiers in physiology, 2018, 31-45.
- [117] Xu Y, Fisher G J . Receptor type protein tyrosine phosphatases (RPTPs) – roles in signal transduction and human disease[J]. Journal of Cell Communication & Signaling, 2012, 6 (3): 125-138.

缩略语表

缩写	英文名称	中文名称
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸缓冲液
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM 培养基
TME	Tumor micro-environment	肿瘤微环境
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
ELCs	Endothelial-like cells	内皮样细胞
CMT	Canine mammary tumor	犬乳腺肿瘤
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
EMT	epithelial mesenchymal transition	上皮间质转化
CECGM	Canine endothelial cell growth medium	犬内皮细胞生长培养液