DOI:10.16016/j.1000-5404.202104189

骨髓间充质干细胞外泌体调控肾癌细胞胆固醇代谢及其增殖、侵袭和迁移

王和西,刘学洋,柳 明,聂东梓,张 尧 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科

[摘要] **目的** 探讨骨髓间充质干细胞外泌体(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs-Exos)对肾癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响,明确骨髓间充质干细胞外泌体对肾癌细胞脂质代谢的影响及分子机制。**方法** 通过透射电镜和免疫印迹对提取的骨髓间充质干细胞外泌体进行鉴定,摄取实验验证肾癌细胞对骨髓间充质干细胞外泌体的摄取情况。将肾癌细胞 Renca 分为对照组(常规培养+PBS)和实验组(小鼠 BMSCs-Exos 20 μg/mL 处理 Renca 细胞),采用 CCK-8 实验观察两组细胞的增殖能力;Transwell 实验观察两组细胞的侵袭和迁移能力。液相色谱质谱联用的脂质组学分析肾癌细胞脂质代谢物差异,采用 Western blot 和 qRT-PCR 检测胆固醇代谢途径关键酶的表达。**结果** 在骨髓间充质干细胞上清液中成功提取分离骨髓间充质干细胞外泌体,透射电镜下呈典型的"杯口状"囊泡,Western blot 检测结果发现外泌体标志性蛋白 CD63、CD9 高表达,且摄取实验表明骨髓间充质干细胞外泌体可被肾癌细胞摄取。细胞功能实验发现,与对照组比较,骨髓间充质干细胞外泌体处理后肾癌细胞的增殖($P<0.05$)、侵袭和迁移能力($P<0.01$)均增加。液相色谱质谱联用脂质组学分析显示,外泌体处理后肾癌细胞中牛磺熊去氧胆酸明显降低($P<0.05$),胆固醇升高($P<0.05$)。骨髓间充质干细胞外泌体可调控 HMGCR、CYP7A1、CYP7B1 表达以影响肾癌细胞胆固醇代谢,促进肾癌细胞增殖和迁移。**结论** 骨髓间充质干细胞外泌体可通过调控肾癌细胞内胆固醇代谢关键酶的表达,影响细胞胆固醇代谢,以调控肾癌的增殖、侵袭和迁移能力。

[关键词] 肾细胞癌;骨髓间充质干细胞;外泌体;胆固醇代谢;细胞增殖;肿瘤侵袭;细胞迁移
[中图法分类号] Q591.5; R329.2; R737.11 [文献标志码] A

Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promote proliferation, invasion and migration of renal cancer cells by regulating cholestanol metabolism

WANG Hexi, LIU Xueyang, LIU Ming, NIE Dongzi, ZHANG Yao Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)-derived exosomes on the proliferation, invasion and migration and lipid metabolism of renal cell carcinoma (RCC) cells, and investigate the possible mechanism. **Methods** Firstly, the exosomes derived from mouse BMSCs were identified by transmission electron microscopy and Western blotting. The exosomes uptake experiment of BMSCs was subsequently used to verify whether the derived exosomes could be absorbed by renal cancer cells. RCC Renca cells were divided into control (PBS) and experiment group (20 μg/mL derived exosomes). The proliferation, invasion and migration were measured by CCK-8 assay and Transwell assay, respectively. Metabolite levels were measured with liquid chromatography-mass spectrometry for the differences between the 2 groups of cells. Finally, Western blotting and real-time PCR (qRT-PCR) were utilized to detect the expression of key enzymes of cholesterol metabolism. **Results** Exosomes were successfully derived from the supernatant of mouse BMSCs. Transmission electron microscopy displayed that the mBMSC-derived exosomes showed typical cup-shaped vesicles. Western blotting showed that the levels of exosome-specific

[通信作者] 张 尧, zhangyao07407@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

proteins CD63 and CD9 were highly expressed after exosome treatment. And the obtained exosomes could be uptaken by RCC cells. The derived exosome treatment significantly promoted proliferation ($P<0.05$) and invasion and migration ($P<0.01$) in RCC cells. Liquid chromatography-mass spectrometry indicated that the treatment also resulted in decreased level of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) ($P<0.05$) and elevated level of cholesterol ($P<0.05$) in RCC cells. Moreover, the treatment could affect the cholesterol metabolism of RCC cells *via* regulating the expression levels of HMGCR, CYP7A1 and CYP7B1, and thus promote the cell proliferation and invasion and migration. **Conclusion** BMSCs-derived exosomes can affect the cholesterol metabolism by regulating the key enzymes, and thus promote the proliferation, invasion and migration of RCC cells.

[**Key words**] renal cell carcinoma; bone marrow mesenchymal stem cells; exosome; cholesterol metabolism; cell proliferation; neoplasm invasiveness; cell migration

Corresponding author:ZHANG Yao, E-mail: zhangyao07407@126.com

肾细胞癌(renal cell carcinoma,RCC)是泌尿系统肿瘤中常见的恶性肿瘤,其发病率为(5~10)/10 万[1],仅次于膀胱癌,占人类所有恶性肿瘤的 2%~3%[2]。其中肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma,ccRCC)是肾细胞癌主要的病理类型,约占所有 RCC 病例的 80%[3]。然而,目前肾细胞癌发病的分子机制还不明确,有研究表明高危因素如吸烟、饮酒等不良习惯可能导致其发病[4]。由于患者早期无特异症状,肾癌的早期诊断相当困难,而且大多数患者在诊断时已发生远处转移,导致远期生存率下降[5]。手术切除目前仍然是肾癌主要的治疗方式,但仍有 1/4 的患者术后会发生复发或者远处转移。此外,肾癌对放化疗不敏感。目前临床上虽普遍使用靶向治疗,使肾癌患者的总生存期有所提高,但是此类治疗存在耐药和不良反应等不足[6],只有为数不多的患者能够从中获益。因此,亟需研究出新的有效的治疗方法。

近年来,干细胞治疗为肿瘤的治疗开辟了新的方向。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是具有多种分化潜能的非造血前体细胞,主要以旁分泌方式发挥功能[7],而外泌体(exosomes,Exos)是旁分泌的主要物质[8]。外泌体是体内多种细胞通过出芽方式向外分泌的一种囊泡状小体。研究表明,间充质干细胞源性外泌体(MSCs-Exos)作用于乳腺癌、胃癌、骨肉瘤等肿瘤细胞,调控肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移[9-11]。然而,MSCs-Exos 对肾癌细胞的影响尚不清楚,有待进一步探索。

研究证实,能量代谢,尤其是脂代谢的重新分配能够满足肿瘤细胞大量增殖所需的细胞膜结构以及第二信使需要,是导致人类肿瘤发生的关键原因之一[12-13]。肾癌的发生、发展伴随着磷脂、中性脂质和胆固醇等脂类的沉积[14]。其中,胆固醇代谢异常可影响肾癌的进展。LIU 等[15]发现,在肾透明细胞癌中,胆固醇可通过 KLF5/miR-27a/FBXW7 轴促进肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭。此外,胆固醇调节元件结合蛋白(sterol-regulated element-binding protein, SREBP)等可通过调节胆固醇的合成,影响肾癌的进展[14]。然而,调控肿瘤细胞胆固醇代谢的分子机制尚未完全阐明。最近研究表明,外泌体可通过调控胆固醇代谢影响肿瘤的发生、发展。肿瘤细胞源性外泌体通过释放非编码 RNA NONHSAT105177 下调胆固醇代谢途径相关酶 HMGCR、CYP51A1 等表达,抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和上皮间充质转化[16]。我们猜测,骨髓间充质干细胞源性外泌体(bone marrow mesenchymal stem cells, mBMSCs-Exos)可通过调控胆固醇代谢关键酶的表达,影响肿瘤细胞胆固醇代谢,从而影响肾癌进展。因此,本研究探讨骨髓间充质干细胞外泌体对肾癌细胞增殖、侵袭与迁移能力的影响,通过液相色谱质谱联用的脂质组学分析骨髓间充质干细胞外泌体处理后的肾癌细胞中的差异代谢物,旨在为研究肾癌进展的调控及分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠肾癌细胞系 Renca 细胞与小鼠骨髓间充质干细胞(mouse bone mesenchymal stem cells,mBMSCs)均在含 10% 胎牛血清+1% 青霉素、链霉素溶液+89% RPMI1640 细胞培养液的 37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养。

Renca 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司(货号:CL-0568);mBMSCs 购于深圳豪地华拓生物科技有限公司(货号:HTX2114);RPMI 1640 培养基购于美国 GIBCO 公司;胎牛血清购于乌拉圭 ABW(货号:AB-FBS0500);无外泌体血清购于上海素尔生物科技

有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、免疫印迹(Western blot)所用一抗(兔单克隆抗体 CD63、CD9、PCNA、β-tubulin、GAPDH)购于上海碧云天生物技术有限公司,Western blot 所用一抗(CYP27A1、HSD3B7)购于上海生工生物工程股份有限公司,HMGCR 一抗购于美国 Abcam 公司,CYP7A1 购于美国 Affinity 公司,CYP7B1 和 SM 购于武汉三鹰生物技术有限公司;用于 Western blot 的二抗(horseradish peroxidase, HRP 兔抗羊 IgG)购于北京中杉金桥生物公司;外泌体荧光标记试剂盒购于美国赛默飞世尔科技有限公司;CCK-8 试剂盒购于博士德公司;逆转录试剂盒购于日本 TaKaRa 公司。

1.2 mBMSCs-Exos 的提取分离及鉴定

将 mBMSCs 于 RPMI1640 完全培养基中培养,镜下观察细胞形态,当细胞融合度达 80%~90%时,将胎牛血清换为无外泌体血清处理 48 h 后收集上清液。在低温离心机中 300×*g* 和 2 000×*g* 条件下离心 10 min;10 000×*g* 条件下离心 30 min,最后 100 000×*g* 离心 70 min,2 次,沉淀用 PBS 重悬。用 BCA 浓度法测定蛋白浓度,-80 ℃保存。采用透射电镜观察收集的 Exos 并拍照。Western blot 检测 Exos 表面标志蛋白 CD9、CD63 的表达。

1.3 细胞分组与处理

将 Renca 细胞分为对照组、实验组,其中对照组为 Renca 细胞常规培养+PBS,实验组为 mBMSCs-Exos 20 μg/mL 处理 Renca 细胞。

1.4 Western blot 实验

将外泌体裂解后提取总蛋白,用 BCA 试剂盒测定提取蛋白的浓度。按 4∶1 蛋白质加入 loading buffer(5×),100 ℃水浴进行蛋白变性 10 min。通过十二烷基磺酸钠-丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离不同分子量大小的蛋白质,再将它们转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)。室温,摇床封闭 2 h,4 ℃孵育,一抗过夜。次日,复温 30 min,回收一抗,洗膜后,室温孵育二抗 1 h,洗膜后进行显影。PCNA 与 β-tubulin 内参进行对照,而其余蛋白的表达与 GAPDH 内参进行对照。

1.5 外泌体摄取实验

首先将 Renca 细胞接种于 24 孔板中,底部放入无菌爬片。将 mBMSCs-Exos 从-80 ℃中取出,置于冰上融化,待 mBMSCs-Exos 融化后,加入 200 μL Diluent C,充分混匀,为 A 管。同时在无菌 1.5 mL EP 管中加入 300 μL Diluent C 和 4 μL 外泌体绿色荧光标记染料 PKH67,上下颠倒进行充分摇匀后标记为 B 管,紧接着将 A、B 两管混合,常温下孵育 5 min,再向混合液中加入 1%BSA 染色液(600 μL,孵育 1 min),终止染色,用 1%BSA 增加混合液体积至 20 mL 超高速离心机 120 000×*g* 离心 60 min,弃上清,用无菌 PBS 溶解 PKH67-Exos 沉淀。弃上清,用 PBS 润洗细胞 3 次,每次 3 min,再加不含外泌体的 FBS 完全培养基,取新鲜制备的 PKH67-Exos,加到细胞中,使终浓度为 10 μg/mL(对照组使用等量染料加入到无菌 PBS 内,再与细胞共孵育),充分混匀后,将其置于细胞培养箱中孵育 12 h。孵育结束后,用预热的 PBS 漂洗 2 次,再通过 4%多聚甲醛进行细胞固定 10 min,PBS 漂洗后,加入 PBST(PBS 含 0.1% Triton X-100)室温处理细胞 5 min,PBS 漂洗 2 次。加入 DAPI 染色细胞核,共聚焦荧光显微镜下观察肿瘤细胞外泌体摄取情况。

1.6 透射电镜观察外泌体形态

将离心获得的 mBMSCs-Exo 100 μL 用戊二醛固定过夜,然后取 10 μL 加入铜网上沉淀 5 min。取醋酸双氧铀染色,待干后上机观察拍摄。

1.7 CCK-8 细胞增殖实验

将 Renca 细胞计数后接种于 96 孔板,每组至少 3 个复孔。细胞贴壁后根据实验分组加入 mBMSCs-Exo,在细胞培养箱中培养 0、24、48、72、96 h。在 CCK-8 检测前,向每孔中加入 CCK-8 试剂 10 μL 及培养基 200 μL,继续孵育 2~4 h。随后在 450 nm 波长处测定光密度值 *D*(450)。

1.8 Transwell 实验

侵袭实验:提前 3 h 在 Transwell 小室中铺上稀释后的 Matrigel 基质胶,待凝固后,进行后续实验。将 Renca 细胞消化离心并计数。在 24 孔板的下室滴加入 500 μL 完全培养基,随后放入 Transwell 小室,在内室中加入双无培养基,并加入外泌体。细胞培养箱中孵育 12 h。取出小室,用棉签轻柔擦洗小室,在 PBS 中清洗 3 次。随后 4%多聚甲醛固定 15 min,室温下控干水分。结晶紫染色,染色结束后用 PBS 清洗,室温下自然晾干。迁移实验与侵袭实验步骤相同,只是不用提前配置 Matrigel 基质胶。倒置相差显微镜下观察并拍照(×100),随机选择至少 6 个视野进行侵袭和迁移细胞的计数。

1.9 质谱检测代谢底物

1.9.1 样本采集与处理

在收集的 Renca 细胞中加入 300 μL 水,使用超声破碎细胞。BSA 方法进行蛋白定量,确定细胞相对数量,取等量的细胞,加入 0.9 mL 水,2 mL 甲醇和 0.9 mL 氯仿,摇匀,再加入 1 mL 水和

0.9 mL 氯仿,摇匀,3 000 r/min 离心 5 min,取出下层有机相,在剩余水相中加入 2 mL 氯仿,3 000 r/min 离心 5 min,合并 2 次的下层有机相,并吹干,使用流动相 B 复融样本,进行 LC-MS/MS 系统检测分析。在各个样本中,各取 20 μL 混匀,制作质控(quality control,QC)样本。

1.9.2 色谱条件 色谱柱:C18 CSH column;柱温:45 ℃;流速:0.3 mL/min;进样量:2 μL,流动相 A:水:乙腈(6:4)+10 mmol/L 甲酸铵+0.1%甲酸;流动相 B:异丙醇:乙腈(9:1)+10 m× 甲酸铵+0.1%甲酸。色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 色谱梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	Curve(线性)
开始	60	40	5
1.5	60	40	5
14.0	5	95	5
16.0	5	95	5
16.1	60	40	5
20.0	60	40	5

1.9.3 质谱条件 在正负离子模式下,鞘气流量:50 个任意单位;扫气:2 个任意单位;辅助气体:15;喷雾电压:2.5 kV(负模式:3 kV),毛细管温度:325 ℃;加热器温度:350 ℃;S-Lens RF 水平:50;扫描范围:150~1 500 m/z;分辨率(MS):120 000;注射时间:50 ms;目标自动增益控制:4e5;分辨率(MS^2):6 000;归一化碰撞能量:30;目标自动增益控制:5e4;注射时间:118 ms。

1.10 细胞总胆固醇水平测定

采用组织细胞总胆固醇酶法测定试剂盒(普利莱 E1015)测定。具体步骤见产品说明书。

1.11 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

通过在线数据库(NCBI)获取目的基因序列,并设计引物序列,由生工生物工程公司合成,见表 2。将上述步骤中提取的 RNA 取 1 μg,逆转录成 cDNA,于 -20 ℃保存(在冰上操作完成实验)。按照 TaKaRa 的 qRT-PCR 试剂盒说明书配制反应体系。将混匀的反应体系加入八联管中,并标记上样的顺序。qRT-PCR 的反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃退火延伸 30 s,共 40 个循环。每个组合有 3 个重复 qRT-PCR 反应。采用相对定量方法 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因 mRNA 相对于内参 GAPDH 的表达量。

1.12 统计学分析

采用 Graph Pad prism 8.0 进行统计分析。质谱数据与人类代谢组数据库(human metabolome database,HMDB)(http://www.hmdb.ca)和脂质代谢数据库(http://www.lipidmaps.org)进行对比,对脂质数据结果进行定性和定量分析。每个实验重复至少 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mBMSCs-Exos 的鉴定

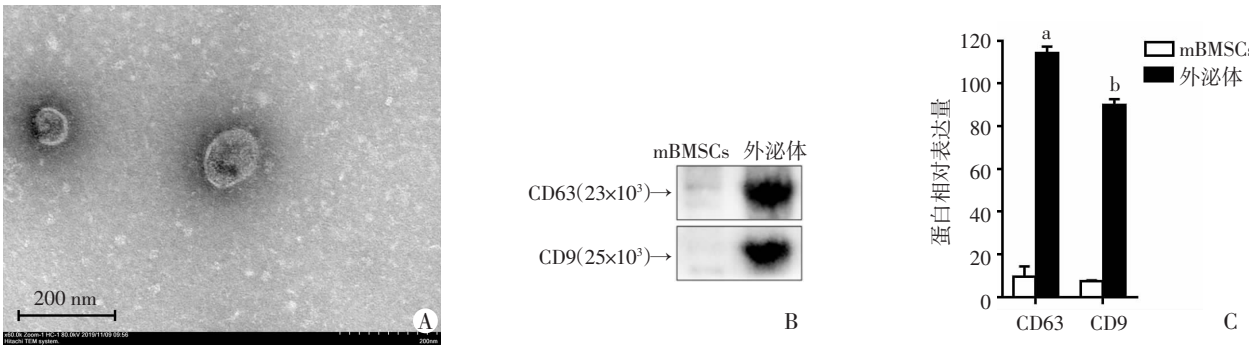
从 mBMSCs 上清液中通过超高速梯度离心法分离提取外泌体,透射电镜观察结果显示,外泌体呈典型的“杯口状”囊泡,直径 50~110 nm(图 1A)。Western blot 结果显示,mBMSCs-Exos 可表达 CD9、CD63 特异性标志蛋白,与 mBMSCs 内比较,CD63 与 CD9 在外泌体中的表达均显著升高($P<0.05$,图 1B、C)。

2.2 Renca 细胞对 mBMSCs 外泌体的摄取

为了明确 mBMSCs-Exos 在处理 Renca 细胞后能否被 Renca 细胞所摄取,采用 PKH67(绿色)标记的 mBMSCs-Exos(图 2A),与 Renca 细胞在细胞培养箱中共同培养 24 h,再行 DAPI 细胞核染色(图 2B),通过共聚焦显微镜观察发现:Renca 细胞胞浆内出现了许多绿色颗粒物(图 2C),表明 mBMSCs-Exos 能被 Renca 细胞摄取。

表 2 qRT-PCR 引物序列

基因名称	前引物(5′→3′)	后引物(5′→3′)
HMGCR	GACCAACCTTCTACCTCAGCAAGC	CCAGCCATCACAGTGCCACATAC
SQLE	TCGGCGTGCAATACAAGGACAAG	AACGAAGTGGGAAGAAACGGAGAC
CYP7A1	AGCAGCCTCTGAAGAAGTGAATGG	AGAGCCGCAGAGCCTCCTTG
CYP7B1	AGCCCTGCGTGACGAAATTGAC	GAGCACAGCCTCAGAACCTCAAG
CYP27A1	CACCGATGGCTGAGGAAGAAAGAG	ACCCAGGCAAGACCGAACCC
HSD3B7	GTGCTGCTGGCTACCCTCAATG	ATGCCGCTGTGCCTTGTTGG
GAPDH	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT



A:透射电镜下观察外泌体的形态;B、C:Western blot 检测外泌体表面分子蛋白 CD9 和 CD63 的表达及半定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 mBMSCs 比较

图 1 mBMSCs-Exos 的鉴定

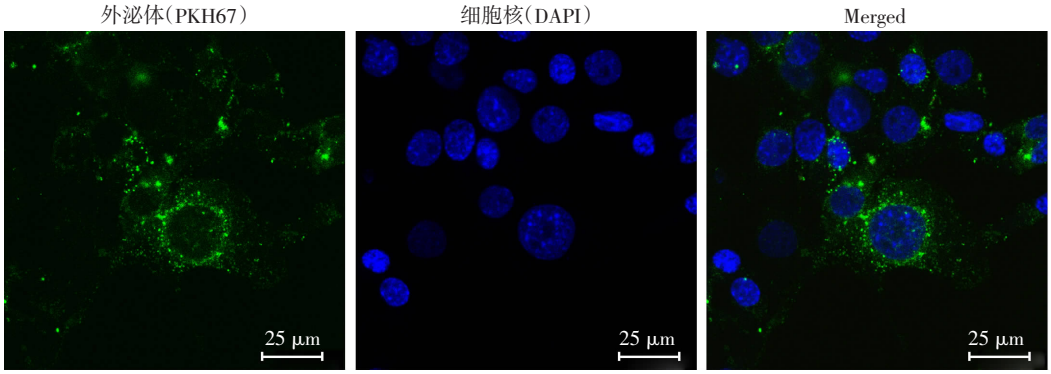
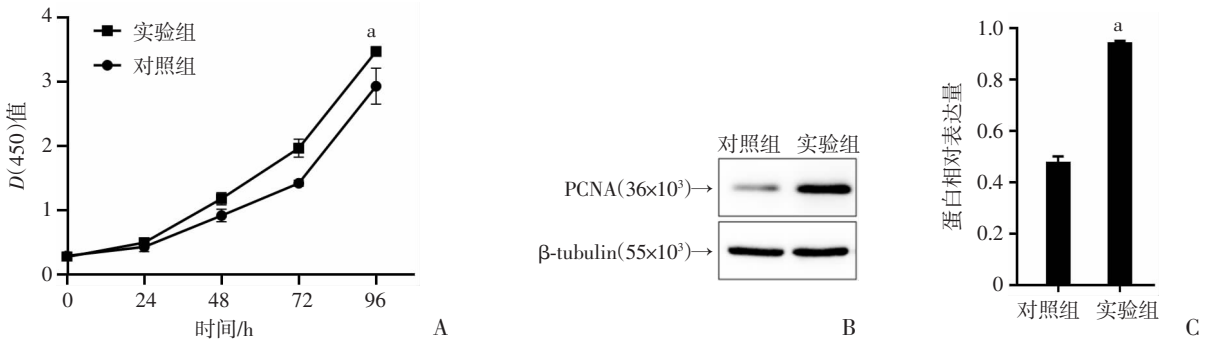


图 2 Renca 细胞对 mBMSCs-Exos 的摄取



A:CCK-8 检测 mBMSCs-Exos 处理 Renca 细胞后不同时间点相对光密度值;B、C:Western blot 检测 PCNA 蛋白的表达及半定量分析 a:$P<0.05$,与对照组比较

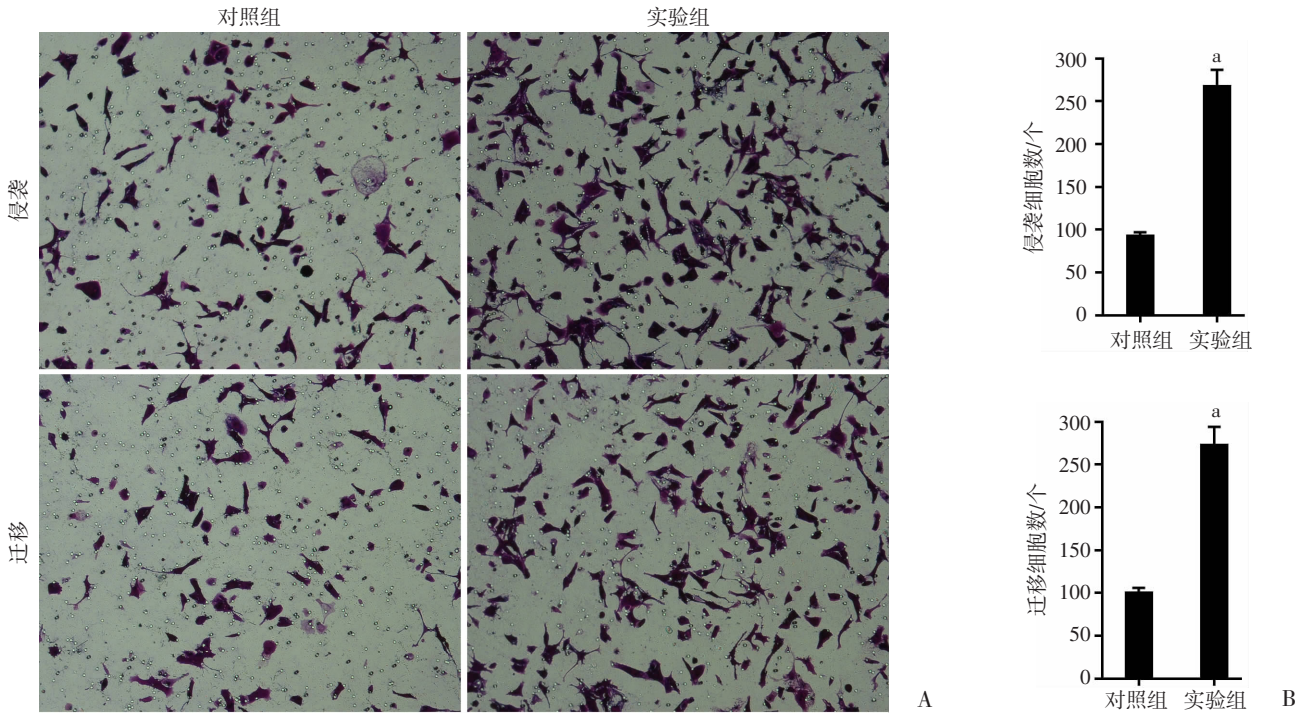
图 3 mBMSCs-Exos 促进 Renca 细胞的增殖

2.3 mBMSCs-Exos 促进 Renca 细胞的增殖

CCK-8 实验结果显示,与对照组比较,实验组 Renca 细胞 0、24、48、72、96 h 的光密度 $D(450)$ 值逐渐升高,表明 mBMSCs-Exos 促进 Renca 细胞的增殖(图 3A)。Western blot 检测 PCNA 蛋白的表达,结果发现,与对照组比较,实验组的 PCNA 蛋白高表达,差异有统计学意义($P<0.05$,图 3B、C)。

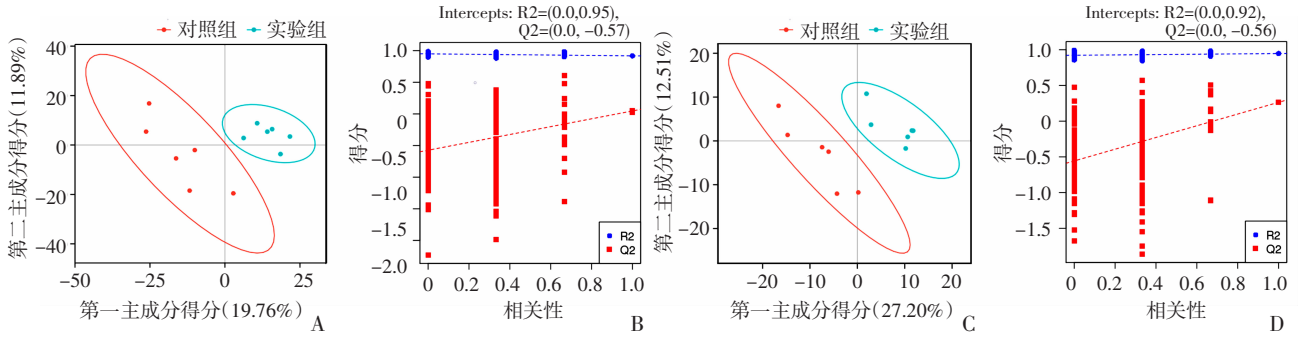
2.4 mBMSCs-Exos 促进 Renca 细胞的侵袭和迁移

采用 Transwell 实验检测 mBMSCs-Exos 对 Renca 细胞迁移能力影响,结果显示,实验组穿过的细胞数显著多于对照组($P<0.01$)。Transwell 实验检测 mBMSCs-Exos 对 Renca 细胞侵袭能力影响,结果显示,实验组穿过的细胞数目显著多于对照组($P<0.01$,图 4)。结果表明 mBMSCs-Exos 使得 Renca 细胞的侵袭和迁移能力明显增加。



A:Transwell 检测各组 Renca 细胞的侵袭、迁移(×100);B:各组侵袭、迁移细胞数比较　a:$P<0.01$,与对照组比较

图 4　mBMSCs-Exo 促进 Renca 细胞的迁移



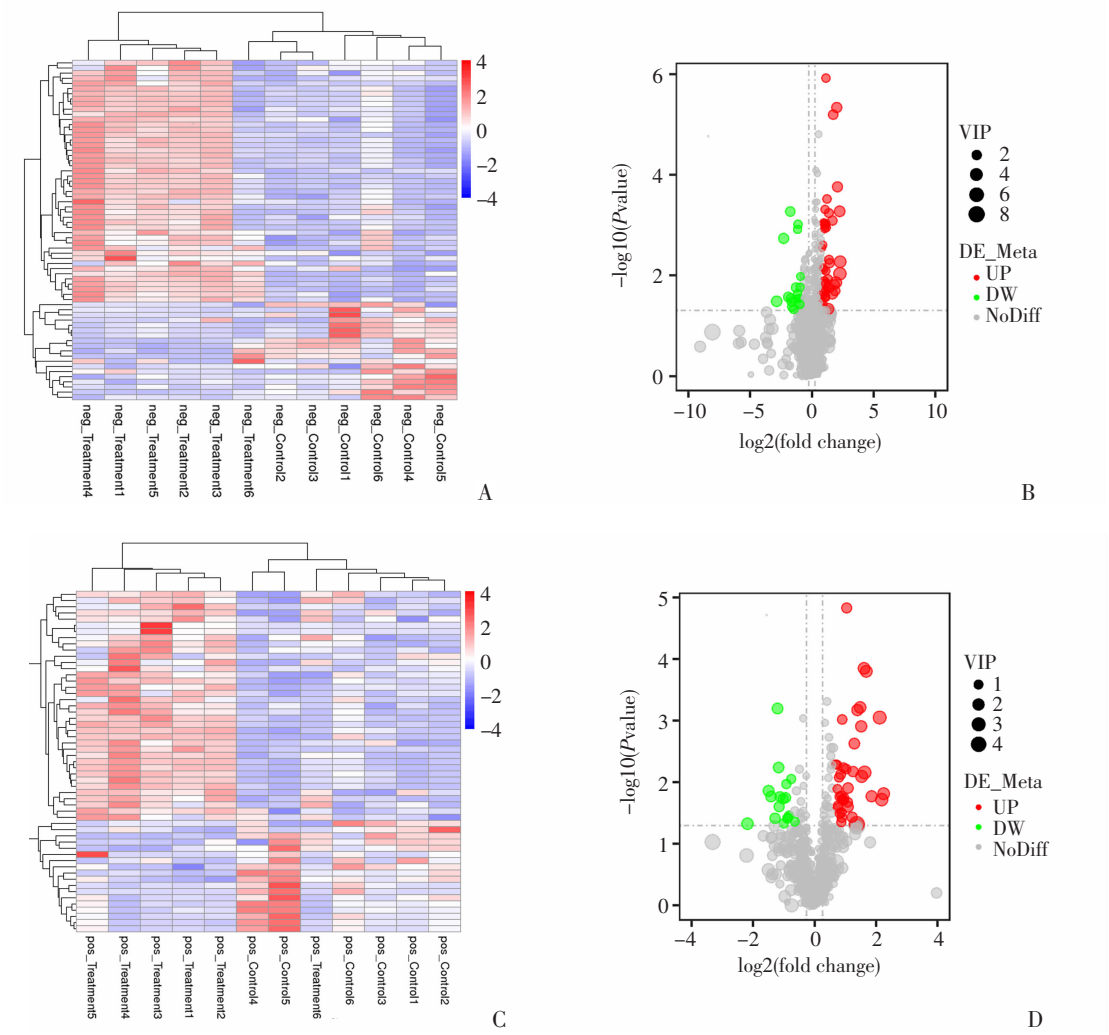
A、B:负离子模式;C、D:正离子模式

图 5　PLS-DA 得分散点图及排序验证图

2.5　mBMSCs-Exos 调控 Renca 细胞脂质代谢

利用液相色谱质谱联用(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)高通量分析技术分析细胞代谢物变化,得到对照组和实验组细胞代谢物的总离子流图。为排除外界因素干扰影响结果,采取数据 QC 的方法,最大化组间分离,并寻找组间的差异代谢物,进一步通过偏最小二乘法判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)进行多元分析,在尽可能保留原始信息的基础上,对已获得的多维数据进行降维和回归分析,再筛选差异代谢物进行后续分析。图 5 是对照组与实验组细胞代谢物数据的 PLS-DA 得分图,其中正离子结果显示:R2=0.92,Q2=−0.56(R2, Q2 为模型评价参数);负离子结果显示:R2=0.95,Q2=−0.57,提示该模型具有较高的稳定性和预测性,未出现"过拟合"现象。

采用 PLS-DA 模型进行差异代谢物的筛选,通过变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP)、差异倍数(fold change,FC),结合 t 检验的 P 值来寻找差异性表达代谢物,设置阈值为 VIP>1.0,FC>1.2 或 FC<0.833,且 $P<0.05$,筛选出差异代谢物,结果见表 3、4(按照差异倍数进行排序,取前 10 位)。结果提示,共鉴定出 121 个显著差异的代谢物,其中显著上调 86 个,如米那普仑、磷脂酰乙醇胺等;显著下调 35 个,如己基糖仑、牛磺熊去氧胆酸等。主要包括脂肪酸类 3 个,甘油磷脂类 13 个,鞘磷脂类 2 个,固醇脂类 3 个,如图 6 所示,红色代表该种代谢物的峰强度较高,而蓝色代表峰强度较低。



A、B:负离子模式;C、D:正离子模式

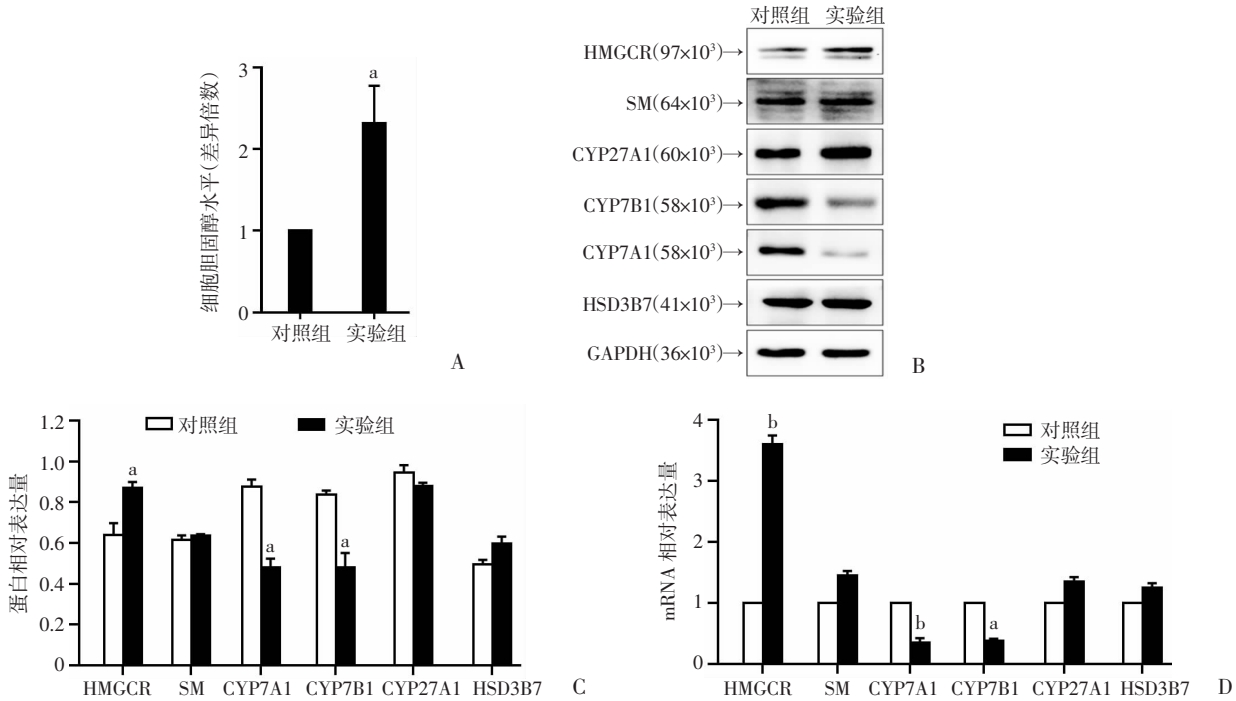
图 6 对照组与实验组差异代谢物热图和火山图

表 3 对照组与实验组显著降低的差异代谢物 (取前 10 位)

代谢物描述信息	化学式	差异倍数	*P* 值	变量投影重要度
PE(22:0/P-18:1(11Z))	C45H88NO7P	0.640 527	0.0435 24	1.009 068
Hexyl glucoside	C12H24O6	0.591 069	0.008 839	1.109 565
LysoPC(20:1(11Z))	C28H56NO7P	0.563 085	0.034 663	1.087 799
PC[18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]	C46H74NO8P	0.547 659	0.037 534	1.276 867
3-(Heptadecanoyloxy)-2-[(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-octadecatrienoyloxy]propyl icosanoate	C58H106O6	0.539 864	0.038 727	1.131 203
3alpha,7alpha,12-alpha-Trihydroxy-27-carboxymethyl-5beta-cholestan-26-oic acid	C29H48O7	0.529 339	0.010 7	1.153 346
6,7-Dihydro-4-(hydroxymethyl)-2-(p-hydroxyphenethyl)-7-methyl-5H-2-pyrindinium	C18H22NO2+	0.526 534	0.010 503	1.188 779
PC[18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)]	C44H72NO8P	0.520 700	0.017 801	1.480 704
Tauroursodeoxycholic acid	C26H45NO6S	0.515 196	0.017 182	1.423 277
Cyanidin 3-O-(6″-malonyl-arabinoside)	C23H21O13+	0.506 323	0.037 627	1.623 897

表 4 对照组与实验组显著增加的差异代谢物（取前 10 位）

代谢物描述信息	化学式	差异倍数	*P* 值	变量投影重要度
3-{[(2-Aminoethoxy)(hydroxy)phosphoryl]oxy}[13]-2-[(9Z)-9-hexadecenoyloxy]propyl (9Z)-9-hexadecenoate	C37H70NO8P	4.892 864	0.005 344	4.009 868
4,6-CHOLESTADIEN-3-ONE	C27H42O	4.817 471	0.009 248	4.735 151
CL(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/20:1(11Z)/18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)	C85H148O17P2	4.744 676	0.000 532	3.048 239
Milnacipran	C15H22N2O	4.744 210	0.015 315	2.355 011
N-icosanoylsphingosine 1-phosphate	C38H76NO6P	4.540 036	0.019 142	2.689 555
PC[22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	C52H84NO8P	4.336 506	0.000 888	3.035 345
PE[14:0/18:3(6Z,9Z,12Z)]	C37H68NO8P	4.207 076	0.000 173	2.643 826
(19R)-25-Amino-22-hydroxy-22-oxido-16-oxo-17,21,23-trioxa-22lambda~5~-phosphapentacosan-19-yl (9Z,12Z,15Z)-9,12,15-octadecatrienoate	C39H72NO8P	4.042 607	4.59E-06	2.693 372
(2R)-3-{[(2-Aminoethoxy)(hydroxy)phosphoryl]oxy}-2-(octanoyloxy)propyl octanoate	C21H42NO8P	3.866 781	0.013 779	3.589 356
Tragopogonsaponin C	C51H72O17	3.669 962	0.020 226	2.343 900



A:各组细胞总胆固醇水平;B、C:Western blot 检测各组细胞胆固醇合成、分解代谢关键酶蛋白的表达及半定量分析;D:qRT-PCR 检测各组细胞胆固醇关键酶 mRNA 的表达水平 a:*P*<0.05,b:*P*<0.01,与对照组比较

图 7 mBMSCs-Exo 通过调控 HMGCR、CYP7A1、CYP7B1 表达影响 Renca 细胞胆固醇代谢

2.6 mBMSCs-Exos 通过调控 HMGCR、CYP7A1、CYP7B1 表达影响 Renca 细胞胆固醇代谢

脂质组学分析结果显示,牛磺熊去氧胆酸降低,该底物是胆固醇分解代谢的底物,胆固醇合成水平将升高。mBMSC-Exos 处理 Renca 细胞后的总胆固醇水平变化结果显示,与对照组比较,mBMSC-Exos 组的 Renca 细胞总胆固醇升高(*P*<0.05,图 7A)。为进一步探究 mBMSCs-Exos 调控细胞胆固醇代谢的分子机制,采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测胆固醇代谢关键酶的表达。结果显示,与对照组比较,mBMSCs-Exos 处理后 Renca 细胞胆固醇合成代谢途径关键酶 HMGCR 的 mRNA 和蛋白水平均显著上调,而胆固醇分解代谢途径关键酶 CYP7A1、CYP7B1 的 mRNA 和蛋白水平均显著下调(*P*<0.05,图 7B~D)。提示 mBMSCs-Exos 可通过调控胆固醇代谢关键酶 HMGCR、CYP7A1、CYP7B1 影响 Renca 细胞胆固醇代谢。

3 讨论

外泌体是由细胞分泌的一种囊泡,具有脂质双分子层结构,可由肿瘤细胞[17]、脂肪细胞[18]、间充质干细胞[19]等细胞分泌。在肿瘤微环境中,外泌体作为MSCs旁分泌机制中的活性物质,具有多种生物学活性,包括免疫调节、组织损伤修复以及调控肿瘤细胞的生物学行为等作用[8]。有研究表明,BMSCs-Exos可通过下调肿瘤细胞衣被蛋白复合体亚基β2(coatomer protein complex subunit beta 2, COPB2)的表达,使直肠癌的癌细胞侵袭、迁移和增殖的能力受到抑制[20]。但是,人脐带间充质干细胞来源的外泌体可通过Wnt信号通路抑制人肝癌细胞的增殖和迁移[21]。由此可见,骨髓间充质干细胞外泌体可在肿瘤中发挥重要的作用,探究骨髓间充质外泌体对肾癌细胞的影响很有必要。本研究通过CCK-8和Transwell实验发现mBMSCs-Exos促进Renca细胞的增殖、侵袭和迁移。

胆固醇是脂质筏和细胞膜的重要组成成分,充当装配中心的信号分子。快速增殖的癌细胞对胆固醇有大量的需求,用于合成细胞膜,提示胆固醇是肿瘤细胞恶性增殖的必要条件[22]。同时,胆固醇可通过影响细胞内BAX蛋白的活化,抑制肿瘤细胞的凋亡以促进肿瘤进展[23-26]。胆固醇异常积累是肾癌细胞的典型表型之一[27]。研究表明,在肾癌细胞中TRET1可通过抑制胆固醇分解代谢关键酶CYP7A1、CYP7B1等表达,下调细胞胆固醇水平,抑制肾癌细胞增殖和克隆形成[28]。本研究也发现mBMSCs-Exos可通过调控胆固醇代谢关键酶HMGCR、CYP7A1、CYP7B1表达上调肾癌细胞胆固醇水平,促进细胞增殖。

外泌体可通过调控胆固醇代谢而影响肿瘤的发生、发展。癌细胞源性外泌体可通过携带非编码RNA NONHSAT105177进入胰腺癌细胞,下调胆固醇合成途径关键酶HMGCR、CYP51A1等表达,抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和上皮间充质转化[16]。此外,前列腺癌细胞源性的外泌体可介导肿瘤细胞与骨髓细胞之间的细胞通讯,并以胆固醇依赖的方式促进前列腺癌的肠道转移[29],提示外泌体可通过调控胆固醇代谢影响肿瘤细胞的增殖、迁移等。本研究通过脂质组学分析和实验发现mBMSCs-Exos处理后肾癌细胞胆固醇水平上调,胆固醇合成关键酶HMGCR显著上调,胆固醇分解代谢关键酶CYP7A1、CYP7B1显著下调。以上结果与先前的研究相符,证实了mBMSCs-Exos可调控肾癌细胞胆固醇代谢,并影响肾癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

在肿瘤微环境中,外泌体作为生物载体,可以通过细胞间隙进入靶细胞,通过翻译、抑制等方式调控肿瘤细胞的生物学行为,影响肿瘤的进展[30]。本研究显示骨髓间充质干细胞源性外泌体可通过调控胆固醇合成、分解代谢关键酶表达上调肾癌细胞胆固醇水平,促进肾癌细胞增殖和转移,为肾癌相关标志物的筛选和靶向药物研发提供了潜在的理论依据。

参考文献:

[1] CHEN S J, LIN J H, YAO X D, *et al*. Nrdp1-mediated degradation of BRUCE decreases cell viability and induces apoptosis in human 786-O renal cell carcinoma cells[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2): 597-602. DOI: 10.3892/etm.2016.3356.

[2] MEEKS J J, ROBERTSON A G. Immune signatures dominate molecular subtyping to predict response to neoadjuvant immunotherapy[J]. Eur Urol, 2020, 77(6): 711-712. DOI: 10.1016/j.eururo.2020.03.021.

[3] MOTZER R J, AGARWAL N, BEARD C, *et al*. NCCN clinical practice guidelines in oncology: kidney cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2009, 7(6): 618-630. DOI: 10.6004/jnccn.2009.0043.

[4] CHOW W H, DONG L M, DEVESA S S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer[J]. Nat Rev Urol, 2010, 7(5): 245-257. DOI: 10.1038/nrurol.2010.46.

[5] XU W H, XU Y, TIAN X, *et al*. Large-scale transcriptome profiles reveal robust 20-signatures metabolic prediction models and novel role of G6PC in clear cell renal cell carcinoma[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(16): 9012-9027. DOI: 10.1111/jcmm.15536.

[6] MOTZER R J, ESCUDIER B, GEORGE S, *et al*. Nivolumab versus everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma: Updated results with long-term follow-up of the randomized, open-label, phase 3 CheckMate 025 trial[J]. Cancer, 2020, 126(18): 4156-4167. DOI: 10.1002/cncr.33033.

[7] ABDALLAH B M, KASSEM M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications[J]. Gene Ther, 2008, 15(2): 109-116. DOI: 10.1038/sj.gt.3303067.

[8] GNECCHI M, DANIELI P, MALPASSO G, *et al*. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1416: 123-146. DOI: 10.1007/978-1-4939-3584-0_7.

[9] LEE J K, PARK S R, JUNG B K, *et al*. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells[J]. PLoS ONE, 2013, 8(12): e84256. DOI: 10.1371/journal.pone.0084256.

[10] HUANG Y, LIU W, HE B, *et al*. Exosomes derived from

bone marrow mesenchymal stem cells promote osteosarcoma development by activating oncogenic autophagy[J]. J Bone Oncol, 2020, 21: 100280. DOI: 10.1016/j.jbo.2020.100280.

[11] QI J, ZHOU Y L, JIAO Z Y, *et al*. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth through hedgehog signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2242-2254. DOI: 10.1159/000479998.

[12] MATASSA D, AGLIARULO I, AVOLIO R, *et al*. TRAP1 regulation of cancer metabolism: dual role as oncogene or tumor suppressor[J]. Genes, 2018, 9(4): 195. DOI: 10.3390/genes9040195.

[13] HASHMI S, WANG Y, SUMAN D S, *et al*. Human cancer: Is it linked to dysfunctional lipid metabolism? [J]. Biochim et Biophys Acta, 2015, 1850(2): 352-364. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.11.004.

[14] DRABKIN H A, GEMMILL R M. Cholesterol and the development of clear-cell renal carcinoma[J]. Curr Opin Pharmacol, 2012, 12(6): 742-750. DOI: 10.1016/j.coph.2012.08.002.

[15] LIU Z, LIU X W, LIU S, *et al*. Cholesterol promotes the migration and invasion of renal carcinoma cells by regulating the KLF5/miR-27a/FBXW7 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 502(1): 69-75. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.122.

[16] WANG X J, LI H Z, LU X X, *et al*. Melittin-induced long non-coding RNA NONHSAT105177 inhibits proliferation and migration of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 940. DOI: 10.1038/s41419-018-0965-3.

[17] MCATEE C O, BOOTH C, ELOWSKY C, *et al*. Prostate tumor cell exosomes containing hyaluronidase Hyal1 stimulate prostate stromal cell motility by engagement of FAK-mediated integrin signaling[J]. Matrix Biol, 2019, 78/79: 165-179. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.05.002.

[18] CREWE C, JOFFIN N, RUTKOWSKI J M, *et al*. An endothelial-to-adipocyte extracellular vesicle axis governed by metabolic state[J]. Cell, 2018, 175(3): 695-708. e13. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.005.

[19] MATHIVANAN S, JI H, SIMPSON R J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication[J]. J Proteomics, 2010, 73(10): 1907-1920. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.

[20] CHEN H L, LI J J, JIANG F, *et al*. MicroRNA-4461 derived from bone marrow mesenchymal stem cell exosomes inhibits tumorigenesis by downregulating $COPB_2$ expression in colorectal cancer[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(2): 338-346. DOI: 10.1080/09168451.2019.1677452.

[21] YUAN Y, ZHOU C, CHEN X, *et al*. Suppression of tumor cell proliferation and migration by human umbilical cord mesenchymal stem cells: a possible role for apoptosis and Wnt signaling[J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 8536-8544. DOI: 10.3892/ol.2018.8368.

[22] HUANG B, SONG B, XU C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Nat Metab, 2020, 2(2): 132-141. DOI: 10.1038/s42255-020-0174-0.

[23] CHRISTENSON E, MERLIN S, SAITO M, *et al*. Cholesterol effects on BAX pore activation[J]. J Molecular Biol, 2008, 381(5): 1168-1183. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.06.037.

[24] LI Y C, PARK M J, YE S K, *et al*. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents[J]. Am J Pathol, 2006, 168(4): 1107-1118. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050959.

[25] MARTÍNEZ-ABUNDIS E, GARCÍA N, CORREA F, *et al*. Changes in specific lipids regulate BAX-induced mitochondrial permeability transition[J]. FEBS J, 2007, 274(24): 6500-6510. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06166.x.

[26] SWINNEN J V, BRUSSELMANS K, VERHOEVEN G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(4): 358-365. DOI: 10.1097/01.mco.0000232894.28674.30.

[27] GEBHARD R L, CLAYMAN R V, PRIGGE W F, *et al*. Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma[J]. J Lipid Res, 1987, 28(10): 1177-1184.

[28] FREDERICKS W J, YIN H K, LAL P, *et al*. Ectopic expression of the TERE1 (UBIAD1) protein inhibits growth of renal clear cell carcinoma cells: altered metabolic phenotype associated with reactive oxygen species, nitric oxide and SXR target genes involved in cholesterol and lipid metabolism[J]. Int J Oncol, 2013, 43(2): 638-652. DOI: 10.3892/ijo.2013.1985.

[29] HENRICH S E, MCMAHON K M, PLEBANEK M P, *et al*. Prostate cancer extracellular vesicles mediate intercellular communication with bone marrow cells and promote metastasis in a cholesterol-dependent manner[J]. J Extracell Vesicles, 2020, 10(2): e12042. DOI: 10.1002/jev2.12042.

[30] MORI M A, LUDWIG R G, GARCIA-MARTIN R, *et al*. Extracellular miRNAs: from biomarkers to mediators of physiology and disease[J]. Cell Metab, 2019, 30(4): 656-673. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.07.011.

(收稿:2021-04-28;修回:2021-05-14)

(编辑 汪勤俭)