

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.03.002

IGFBP3 通过癌旁脂肪细胞促进肾癌细胞生长与转移的作用研究 *

沈梦君¹ 董 凯² 韩 厦¹ 赵宇阳¹ 徐东亮^{1,3Δ}

(1 上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 200080; 2 海军军医大学 上海 200433;

3 海军军医大学附属长征医院泌尿外科 上海 200003)

摘要 目的:探讨肾透明细胞癌的分泌蛋白 IGFBP3 对癌旁脂肪细胞分化的作用及通过脂肪细胞促进肾透明癌细胞生长与转移的作用。**方法:**通过肾细胞癌的基因数据库发现过表达的基因 IGFBP3,免疫组化和 RT-PCR 确认 IGFBP3 在标本中的表达。RT-PCR 和 Western Blot 检测 IGFBP3 对脂肪细胞分化成熟特征标志物表达的影响。以过表达 IGFBP3 的 786-O 细胞为模型,Western Blot 检测 IGFBP3 的促脂肪细胞分化作用与 TGFβ-smad1/5/8 及 TGFβ-p38MAPK 信号通路的关系。将过表达 IGFBP3 的 786-O 细胞与脂肪细胞共培养得到条件培养基,通过油红染色检测条件培养的肾癌细胞中脂滴含量,迁移实验和 CCK8 实验分别检测脂肪细胞对肾癌细胞侵袭性及增殖的影响。**结果:**相较于正常组,肾癌标本中 IGFBP3 的表达增加($P=0.017$)。IGFBP3 使脂肪细胞分化成熟相关标志物 PPARγ、PGC1α、c/EBPα、Prdm16、UCP1 表达增加。以 IGFBP3 处理脂肪细胞时,可以增加 TGFβ 下游蛋白表达水平,30 min 后 p-smad1/5/8 表达增加($P=0.024$),60 min 后 p-p38MAPK 表达明显增加($P=0.013$)。条件培养后的 786-O 细胞内的脂滴形成增加($P=0.028$),脂肪细胞促进 786-O 细胞的增殖和迁移能力。**结论:**IGFBP3 是肾透明细胞癌中过度表达的蛋白,能够促进前脂肪细胞分化,其机制主要通过激活 TGFβ 通路中的 smad1/5/8、p38MAPK。成熟的脂肪细胞能够促进肾癌细胞脂质滴形成,并且促进肿瘤的增殖、提高肿瘤的侵袭性。

关键词:IGFBP3; 脂代谢; 脂肪细胞; 肾细胞癌**中图分类号:**R-33; R737.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)03-407-07

IGFBP3 Enhances Proliferation and Migration Capability of Renal Carcinoma Cell via Adjacent Adipocytes*

SHEN Meng-jun¹, DONG Kai², HAN Sha¹, ZHAO Yu-yang¹, XU Dong-liang^{1,3Δ}

(1 Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;

2 Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China; 3 Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military

Medical University, Shanghai, 200003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanisms of IGFBP3 in the action on adjacent adipocytes and the effect of adjacent adipocytes on the proliferation and migration capability of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). **Methods:** IGFBP3 was found to be overexpressed in the database of ccRCC, which was verified in the specimen of ccRCC. RT-PCR and Western Blot were used to detect the biomarkers of adipocytes. Renal carcinoma cell line 786-O cell overexpressing IGFBP3 was used as cellular model and western blot was used to detect the effect of IGFBP3 on TGFβ-smad1/5/8 and TGFβ-p38MAPK pathway. Conditioned medium was prepared via cocultivation of 786-O overexpressing IGFBP3 and preadipocytes. Oil red staining was used to detect the contents of lipid droplets in renal carcinoma cell. Transwell and CCK8 was used to detect the effect of adipocytes on migration capability and proliferation of renal carcinoma cell. **Results:** The expression of IGFBP3 markedly increased in the specimen of renal cell carcinoma ($P=0.017$). IGFBP3 promoted the differentiation of preadipocyte after activating smad1/5/8 ($P=0.024$) and p38MAPK ($P=0.013$). The contents of lipid droplets increased in 786-O cell cultivated in the conditioned medium ($P=0.028$) and migration capability and proliferation of 786-O were promoted. **Conclusions:** IGFBP3, overexpressed in renal cell carcinoma, promoted the expression of preadipocyte by activating smad1/5/8 and p38MAPK. Mature adipocytes could increase the contents of lipid droplets and promoted migration capability and proliferation of renal cell carcinoma.

Key words: IGFBP3; Lipid metabolism; Adipocyte; Renal cell carcinoma**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R737.11 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2021)03-407-07

* 基金项目: 申康医院研究发展中心基金项目(SHDC12014215)

作者简介: 沈梦君(1994-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 肾癌, E-mail: mjsh1123@163.com

Δ 通讯作者: 徐东亮(1976-), 男, 博士生导师, 教授, 主要研究方向: 肾癌, E-mail: urologistdx@126.com, 电话: 13918829767

(收稿日期: 2020-05-31 接受日期: 2020-06-26)

前言

肾细胞癌位于男性肿瘤的第6位,其死亡率为5.6/10万^[1]。肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是肾细胞癌的最常见病理类型^[2],患者希佩尔-林道基因(Von-Hippel-Lindau, VHL)大多表达异常,导致低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)的堆积,从而引起cyclinD1、EGFR、TGF α 等^[3-5]上调。针对pVHL-HIF-VEGF通路的药物已成为一线治疗方案^[6-8],但目前可供选择的药物较少,且存在脱靶和耐药的问题^[9,10]。脂肪细胞与肿瘤细胞之间有着许多重要联系,包括供能、抗凋亡、通过旁分泌途径促进成瘤或血管生成等^[11,12]。目前已证实肥胖是肾细胞癌的危险因素^[13,14],但仍缺乏肾周脂肪的相关研究。

通过Oncomine数据库的分析发现IGFBP3在ccRCC中高表达。临床研究发现患者存在不同基因型的IGFBP3,AA型的患者具有更高的肾细胞癌患病风险,同时发现AA型基因与病理分期有关^[15,16]。鉴于IGFBP3能够促进棕色脂肪细胞的生长和分化^[17],本次研究发现肾透明细胞癌过度表达IGFBP3,并通过IGFBP3促进癌旁脂肪细胞分化,进而由成熟的脂肪细胞促进肾癌细胞的生长与转移,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 人肾癌细胞系786-O由上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科研究所提供。C57BL/6小鼠(6-7w)购于上海杰思捷实验动物有限公司。

1.1.2 组织标本 选取2017年12月至2018年5月的手术标本28例,经术后病理证实,14例为肾透明细胞癌患者,14例为肾囊肿患者,分别取肿瘤组织和正常肾组织,脂肪组织选取周围脂肪组织和远端(腹膜)脂肪组织。

1.1.3 实验试剂及仪器 合成h-IGFBP3单体、T3、Insulin、DEX、IBMX、吡啶美辛购自美国Sigma-Aldrich公司,过表达IGFBP3慢病毒载体购自上海纽恩生物科技有限公司,IGFBP3

抗体、pSmad1/5/8抗体、Smad1/5/8抗体、p-P38 MAPK抗体、P38 MAPK抗体、 β -actin抗体、UCP1抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,LDN-193189、SB431542购自美国Selleck Chemicals,油红染色试剂盒购自上海懋康生物科技有限公司,引物、甲醇、氯仿、无水乙醇、异丙醇购自上海Sango Biotech,30%丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED、Tween 20、CCK8试剂盒购自上海碧云天公司,RT-PCR试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司,免疫组化试剂盒购自陕西普罗安蒂生物科技发展有限公司。PCR仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司,Transwell小室购自美国康宁公司,酶标仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 使用免疫组化Elivision二步法检测IGFBP3的表达。将切片脱蜡、水化,用PBS冲洗。对组织抗原进行修复。加50 μ L的3%双氧水,室温下孵育10 min。PBS冲洗后加入50 μ L封闭液,室温孵育30 min。除去封闭液,加50 μ L IGFBP3抗体,室温下孵育60 min。PBS冲洗,加50 μ L聚合物增强剂,室温下孵育约20 min, PBS冲洗3次,每次约5 min,加50 μ L酶标抗体,室温下孵育20 min。PBS冲洗,加入50 μ L新鲜配制的DAB溶液,显微镜观察10 min,当出现棕色染色而背景无着色时终止反应。用水冲洗,苏木素复染。

1.2.2 油红染色 取目的细胞进行涂片,自然干燥后,将准备好的细胞涂片置于配制好的油红染液工作液中,染色约10 min,用37 $^{\circ}$ C预热的双蒸水洗涤约15 s;可以不用等待涂片上的水完全干,用试剂盒中的水溶性封固液进行封片;镜检观察:组织中的脂肪可被染成红色,细胞核可被染成蓝色。

1.2.3 总RNA提取、逆转录-聚合酶链反应 对于组织,切取约25 g,加入TRIZOL试剂1 mL,然后使用组织强力均质机使其均质化;对于细胞,6孔板中加入TRIZOL试剂1 mL,并通过移液枪抽吸拍打几次促进细胞的裂解。提取样品中的RNA,溶解RNA并检测其浓度。根据RT-PCR试剂盒配制反应体系,逆转录得到目的cDNA,于-20 $^{\circ}$ C保存。根据相关基因的cDNA序列设计引物:

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences in this study

Genes Names	Forward primers	Reverse primers
IGFBP3	CCAGGAAACATCAGTGAGTCC	GGATGGAACCTTGAATCGGTCA
PPAR γ	CTCCAAGAATACCAAAGTGCGA	GCCTGATGCTTTATCCCCACA
PGC1 α	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT	CCACTTCAATCCACCCAGAAAG
c/EBP α	CAAGAACAGCAACGAGTACCG	GTCAGTGGTCAACTCCAGCAC
Prdm16	CCAAGGCAAGGGCGAAGAA	AGTCTGGTGGGATTGGAATGT
UCP1	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT
36b4	AGATTCGGGATATGCTGTTGGC	TCGGGTCCTAGACCACTGTTC

完成定量PCR后,得到各基因的CT值,其中以稳定表达的基因36b4为内参基因,计算各基因表达情况。

1.2.4 分离小鼠原代棕色脂肪及其培养 选取6-7周的C57BL/6小鼠。无菌条件下取下小鼠肩胛部棕色脂肪,放入培

养皿中,清洗3次。充分剪碎组织,放入消化液中消化。将消化液过滤后,以1800 rpm离心5 min,弃去上清,加入DMEM培养基(20% FBS)制成细胞悬液。取少量细胞悬液,计数,调节细胞密度。10⁴密度接种于培养皿中,以DMEM培养基(20%

FBS)培养至汇合成层(记为第0天)。

第0天起加入含不同剂量 IGFBP3 的诱导剂,(1)实验组为 DMEM 培养基 + 20 % FBS + 1 nM T3 + 20 nM + 5 M DEX + 0.5 mM IBMX + 250、500、1000 ng/ml rhIGFBP3,(2)阴性对照组为 DMEM 培养基 + 20 % FBS + 1 nM T3 + 20 nM insulin + 5 M DEX + 0.5 mM IBMX,(3)阳性对照组为 DMEM 培养基 + 20 % FBS + 1 nM T3 + 20 nM insulin + 5 M DEX + 0.5 mM IBMX + 0.125 M 吡啶美辛。2 天后换液,将培养基改为 DMEM 培养基 + 20 % FBS + 1 nM T3 + 20 nM insulin。之后,每隔 2 天为细胞换一次液,直至第 10 天。分别于 0 d、2 d、4 d、8 d、10 d 显微镜下观察胞质内脂滴的大小和数量,使用酶标仪行定量分析。

1.2.5 慢病毒感染肾癌细胞 提前 1 天将培养状态良好的 786-O 接种于 24 孔板,细胞密度为 $10^5/\text{mL}$,保证第 2 天肾癌细胞的细胞汇合率能达 50 % 左右。移去肾癌细胞的培养基,加入 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene 0.5 mL,可促进慢病毒的感染。从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出慢病毒,先置于冰上慢慢融化,弃去细胞原有培养基并加入 250 μL 混有病毒原液的培养基。后持续感染 4 h,4 h 后再加入 250 μL 该培养液。选用 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素进行筛选。每 3 天更换 1 次含有嘌呤霉素的完全培养基,直到没有感染的对照组细胞被完全杀死。传代筛选后的细胞,过程中继续使用嘌呤霉素,在连续传代 3 次后可进行冻存。

1.2.6 Transwell 实验 选取病毒转染的 786-O 细胞,Western Blot 定量检测转染细胞培养基中的 IGFBP3 蛋白水平。将肾癌细胞和脂肪细胞进行共培养,上层细胞为原代棕色脂肪细胞,下层细胞为对照组细胞(空载)、单独的肾癌细胞、过表达 IGFBP3 的肾癌细胞、过表达 IGFBP3 的肾癌细胞 + IGFBP3 的中和抗体。检测实验组和对照组中 PPAR γ 、PGC1 α 、c/EBP α 、Prdm16、UCP1 的 mRNA 水平。Western Blot 定量分析 UCP1 的蛋白水平。分别于 0 d、2 d、4 d、8 d、10 d 显微镜下监测胞质内脂滴情况。

通过共培养可以得到条件培养基,根据条件培养液的不同

共分 4 个实验组,A 组为过表达 IGFBP3 的 786-O 细胞 + 脂肪细胞,B 组为 786-O 细胞 + 脂肪细胞,C 组为过表达 IGFBP3 的 786-O 细胞,D 组为 786-O 细胞。肾癌细胞经过条件培养基培养后行迁移实验:用胰酶消化 786-O 细胞,充分消化后离心,可见细胞分层,去除上清液。四组细胞需要用不同的条件培养液稀释,细胞密度约为 5×10^4 个/mL。接着取 100 μL 细胞悬液置于小室内培养。下室放置完全培养基,注意小室与下层培养板之间不能留气泡。将细胞置于培养箱内培养 48 h。取出小室,去除小室内的培养液后,用 PBS 清洗 2 遍,甲醛固定 20 min,等待其风干。结晶紫染色 20 min,再去除上层未发生迁移的细胞,最后用无菌的 PBS 冲洗 3 遍。

1.2.7 CCK8 实验 将处于对数生长期的 786-O 细胞加入 24 孔板中。与迁移实验相同,细胞共分成 4 个实验组,每组细胞有 3 个复孔。将其置入 37 $^{\circ}\text{C}$,5 % CO_2 的培养箱培养,细胞处理后应每天在同一时间点进行观察。检测时,将 CCK-8 和 PBS 的混合溶液加入到各孔中。孵育 2 h 后,用酶标仪(波长 450 nm)测定每孔的吸光度值,最后绘制细胞生长曲线。

1.3 统计方法

采用 GraphPad Prism 7.0 对实验数据进行统计分析,采用平均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。若两组间差异性比较,采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 认为两者差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IGFBP3 在肿瘤标本中表达增加

免疫组化的结果显示肿瘤组的肾癌细胞相较于正常细胞 IGFBP3 表达增加($P = 0.017$,图 1A)。RT-PCR 检测结果显示肿瘤组织中 IGFBP3 的基因表达增加(图 1B)。对于棕色脂肪细胞标志物 UCP1 的检测,无论与非肿瘤组比较还是与远端脂肪组织比较,肿瘤周围脂肪组织都有 UCP1 的表达增加($P < 0.001$,图 1C、D),表明癌旁脂肪组织中表达 UCP1 的成熟棕色脂肪细胞增加。

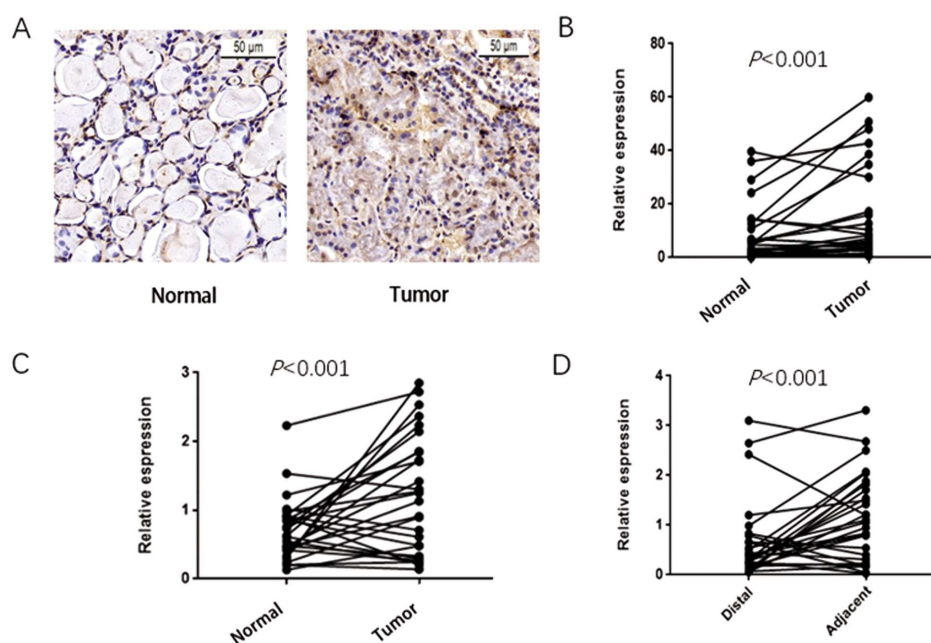


图 1 IGFBP3 和 UCP1 在标本中的表达

Fig.1 Expression of IGFBP3 and UCP1 in the specimen

2.2 IGFBP3 体外促进棕色前脂肪细胞分化

我们主要选取小鼠的原代脂肪细胞,实验组中加入不同剂量的(250、500、1000 ng/mL),而阴性对照组中加入已明确有促脂肪细胞分化的吡啶美辛。在分化第 10 天对棕色脂肪相关基因检测(见图 2A),发现相较于阴性对照组,加入 IGFBP3 或吡啶美辛后 PPAR γ 、PGC1 α 、c/EBP α 的 mRNA 水平明显较高,包括棕色脂肪细胞的特征性标志物 Prdm16、UCP1,两者也有明显差异。除此之外,根据图 2B,IGFBP3 的效应存在明显的剂量

依赖性,随着剂量的增加,IGFBP3 的促分化作用也随之提高,但当剂量达到 500 ng/mL 后,这种效应也减少。分别于 0 d、2 d、4 d、8 d、10 d 这几个不同时间段,观察脂肪内的脂滴含量,通过油红染色我们发现在加入 IGFBP3 或吡啶美辛后,分化成熟的脂肪细胞脂滴含量增加,这种变化在脂肪细胞分化的第 8 天最为明显。在第 10 天,通过 Western Blot 分析发现 IGFBP3 使棕色脂肪的标志物 UCP1 表达增加(见图 2C),表明 IGFBP3 能够使脂肪细胞的成熟分化相关标志物表达增加。

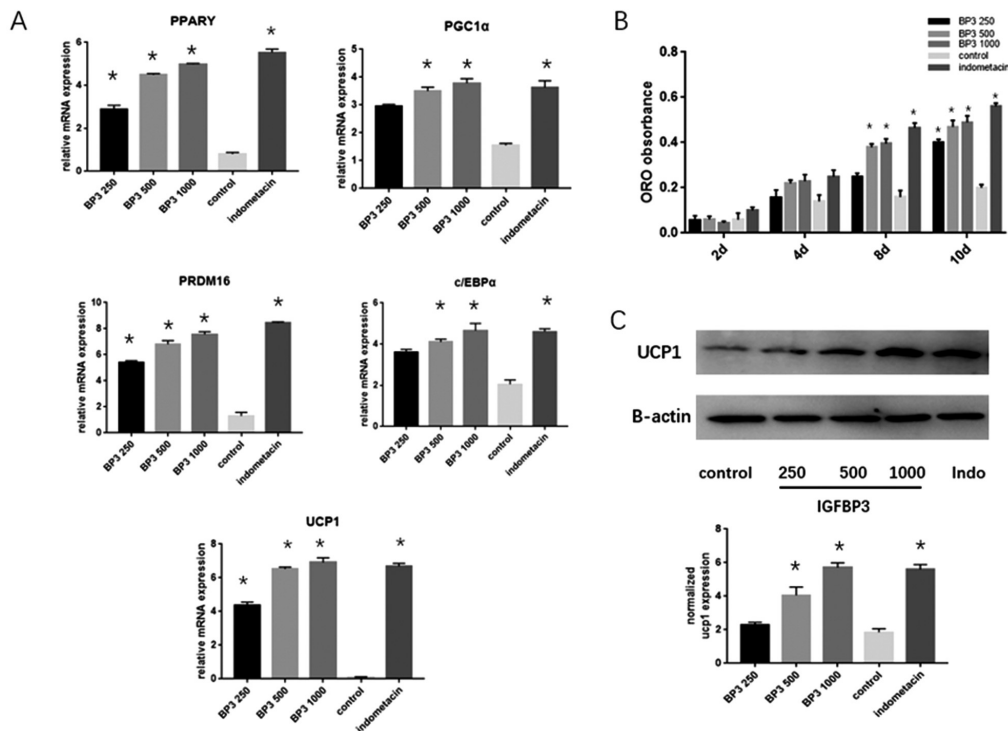


图 2 IGFBP3 在体外能够促进棕色脂肪细胞的分化

Fig.2 IGFBP3 promoted differentiation of brown adipocytes in vitro

Notes: Data were expressed as mean $\pm$ SD, * P <0.05, compared with the control group; BP3 represents IGFBP3; indo represents indometacin.

2.3 IGFBP3 可由肾癌细胞分泌促进脂肪细胞分化

通过 transwell 实验将肾癌细胞与脂肪细胞共培养,模拟 IGFBP3 有肾癌细胞分泌作用于脂肪细胞的过程。图 3A 中可以看到构建的基因重组细胞系过度表达 IGFBP3。在图 3B 中,与过表达 IGFBP3 共培养的脂肪细胞 PPAR γ 、PGC1 α 、c/EBP α 的 mRNA 水平明显较高,同时棕色脂肪细胞的特征性标志物 Prdm16、UCP1 也明显升高,而对对照组细胞并没有类似的效应。再加入 IGFBP3 的中和抗体后,可以明显看到相关基因的表达明显调低。分别于 0 d、2 d、4 d、8 d、10 d 这几个不同时间段(见图 3C),观察脂肪内的脂滴含量,在 8 d 时过表达 IGFBP3 组的脂肪细胞内的脂滴含量明显升高,而加入中和抗体后细胞内脂滴含量降低。在图 3D 中,作为棕色脂肪的标志物 UCP1 也在过表达 IGFBP3 的肾癌细胞的作用下表达增加,而且与其他组相比有明显差异。因此,过表达 IGFBP3 的肾癌细胞能够使脂肪细胞分化成熟特征性标志物升高,并提高脂肪细胞内脂滴含量。

2.4 IGFBP3 激活 TGF β 通路

图 4A 中,加入 IGFBP3 后 30 min 时 p-smad1/5/8 的表达

开始明显增加;同样地,图 4C 中,加入 IGFBP3 后 60 min 时 p-p38MAPK 的表达开始明显增加($P=0.013$)。可见 IGFBP3 能够激活 TGF β 的下游通路,从而促进脂肪细胞的分化。在加入相应的 TGF β 抑制剂,结果显示着这种效应可以被阻断,说明 IGFBP3 通过 TGF β 通路作用于下游的 smad1/5/8、p38MAPK。定量分析(图 4B、D)发现在开始反应后 30 min 起,p-smad1/5/8 ($P=0.024$)和 p-p38MAPK($P=0.033$)的表达量相较于 0 min 时存在明显统计学差异。

2.5 脂肪细胞促进肾癌细胞的增殖和侵袭

图 5 显示过表达 IGFBP3 的 786-O 细胞与脂肪细胞共培养后,其条件培养基处理后的肾癌细胞脂滴明显多于其他 3 组。空载的 786-O 并没有相同的作用($P=0.028$),说明 IGFBP3 对脂肪细胞的作用在其中起到关键性作用,但相较于其它两组仍有上升趋势,说明脂肪细胞对肾癌细胞形成脂滴有一定的作用。786-O 细胞本身具有一定侵袭性,但是图 6A、B 显示在脂肪细胞的作用下,迁移的肾癌细胞的数量高于其他两组,尤其是在过表达 IGFBP3 的肾癌细胞作用后。细胞计数后发现该组的肾癌细胞的迁移数量与对照组相比有显著性差异。图 4C 中过

表达 IGFBP3 的共培养组的存活细胞数明显高于其他三组,可见脂肪细胞对肾癌细胞增殖的促进作用。

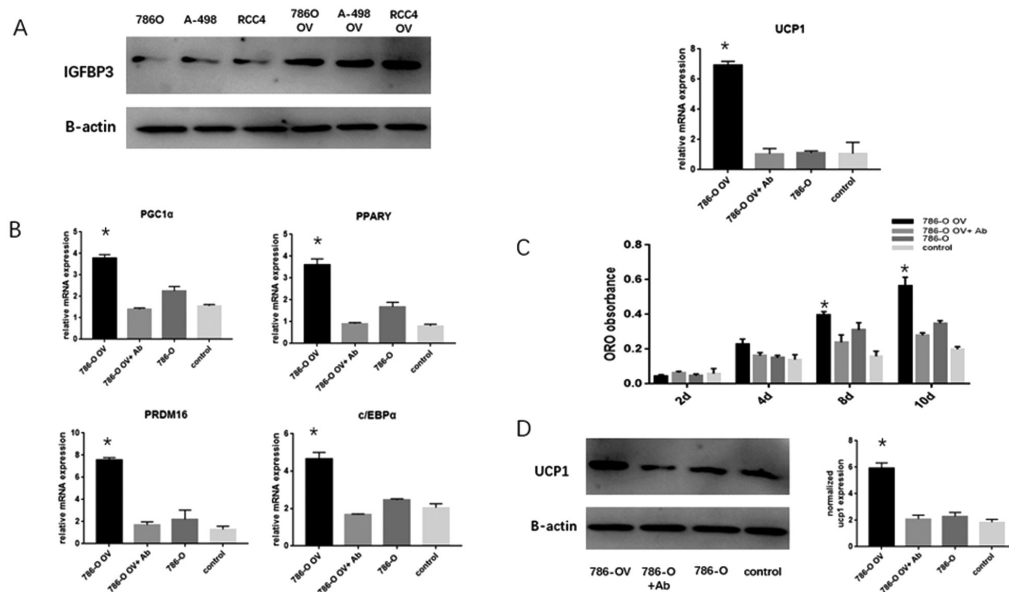


图3 由肾癌细胞分泌的 IGFBP3 能够促进脂肪细胞分化

Fig.3 IGFBP3 secreted by renal carcinoma cell promotes differentiation of adipocytes

Notes: Data were expressed as mean $\pm$ SD, * P <0.05, compared with the control group; OV represented overexpression; Ab represented antibody of IGFBP3.

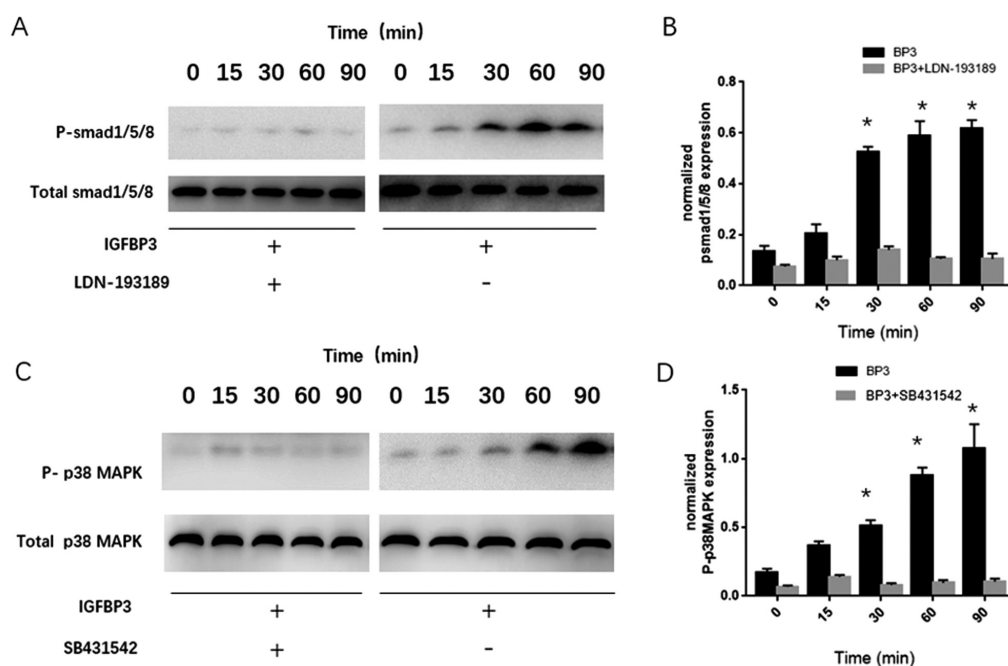


图4 IGFBP3 激活 TGFβ 通路

Fig.4 IGFBP3 activated TGFβ pathway

Notes: Data were expressed as mean $\pm$ SD, * P <0.05, compared with 0 min; LDN-193189 was the inhibitor of smad1/5/8; SB431542 was the inhibitor of p38MAPK.

3 讨论

对于某些肿瘤来说,脂肪细胞是肿瘤发生发展的重要微环境,目前发现的主要有乳腺癌和腹腔转移瘤,如卵巢癌、结肠癌等^[18,19]。除了本身可以分泌信号分子,脂肪细胞还促进肿瘤的迁移、粘附等,与肿瘤细胞进行能量物质的交换。脂肪细胞为肿瘤

细胞提供脂肪酸,而肿瘤细胞通过脂肪酸氧化获取能量。本研究中,我们对 IGFBP3 对前脂肪细胞分化的作用进行检测,发现 IGFBP3 的促分化作用,推测 IGFBP3 通过增加成熟的脂肪细胞促进肿瘤的进展。

脂肪细胞分化是一个复杂的过程,PPAR γ 是最重要的调节因子,能与 C/EBP 发挥协调作用使脂肪细胞保持其正

常的基因表达^[20,21]。基于 IGFBP3 下游通路的探索, Nguyen 等^[17]认为 IGFBP3 可能与脂肪细胞的分化有关。在对白色脂肪细胞系 3T3-L1 的研究中, IGFBP3 与 PPAR γ 反应元件结合, 从而阻断下游通路, 最终抑制 3T3-L1 的分化^[22]。Hasanthi C^[23]等发现 IGFBP3 能够调节 3T3-L1 对 TGF β 的敏感性, 进而增强 Smad 通路对脂肪细胞分化的抑制作用。而在原代棕色脂肪细胞中的研究发现 IGFBP3 能够促进棕色脂肪细胞的生长和分化^[17]。本次研究结果显示外源的 IGFBP3 在浓度达到 500 ng/mL 时, 相较于对照组有明显的促分化, 胞内脂滴含量增加, 这种作用在前脂肪细胞分化的第 8 天最为显著。所以 IGFBP3 与脂肪细胞分化的关系还需要进一步的阐述。我们认为存在这种差异可能与是否采用原代脂肪细胞以及脂肪细胞这类有关。目前看来 IGFBP3 对原代棕色脂肪有着特异性的作用。另外, BMP7 与 TGF β 同属同一超家族, 因此在通路下游可能存在交叉, 而研究表明 BMP7 与棕色脂肪细胞的分化密切相关^[24]。

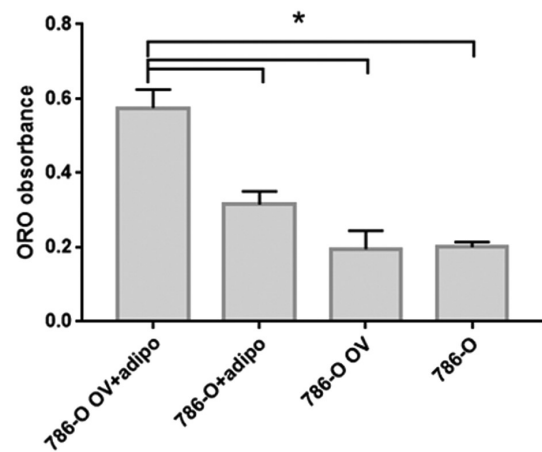


图5 脂肪细胞促进肾癌细胞脂质贮存

Fig.5 Adipocytes increased the contents of lipid droplets in cancer cell
Notes: Data were expressed as mean $\pm$ SD, * $P < 0.05$; adipo presented adipocytes; ov presented overexpression.

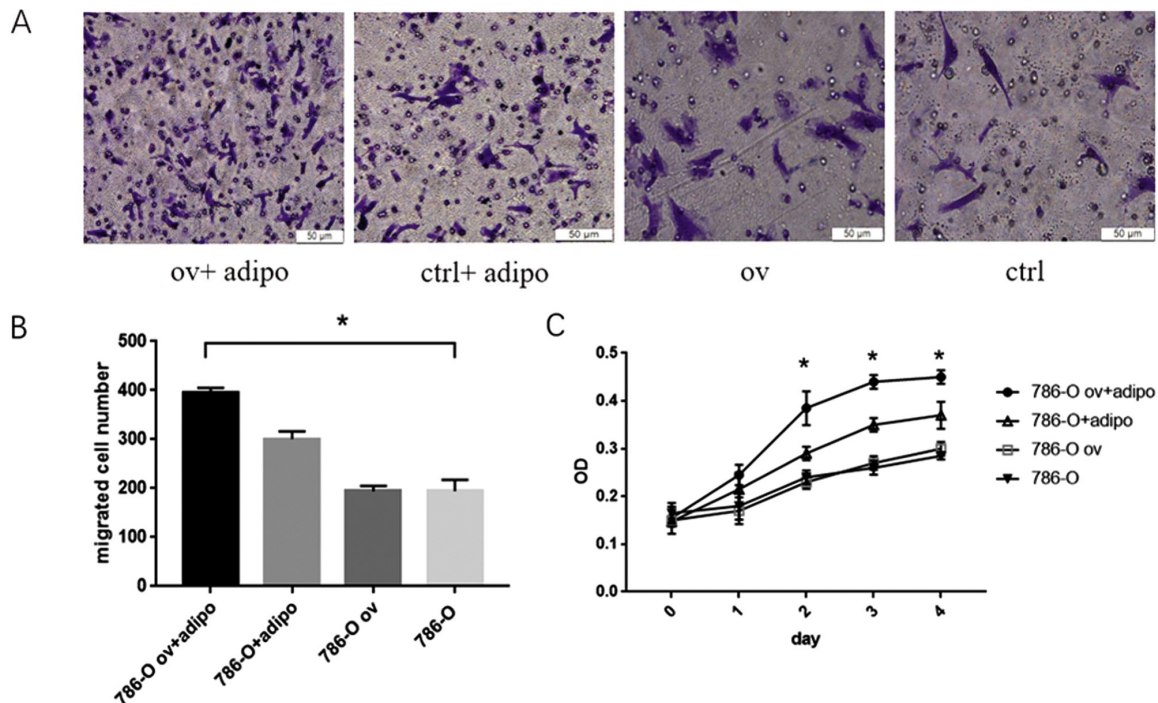


图6 脂肪细胞能够促进肾癌细胞的增殖和侵袭

Fig.6 Adipocytes promoted proliferation and migration capacity of renal carcinoma cell

Notes: Data were expressed as mean $\pm$ SD, * $P < 0.05$; adipo presented adipocytes; ov presented overexpression.

IGFBP3 是一种高亲和力的蛋白, 越来越多的研究着眼于 IGFBP3 的 IGF 非依赖性作用, 特别是在肿瘤中所发挥的作用。肝癌中, IGFBP3 启动子是甲基化的, 如诱导 IGFBP3 的表达会引起细胞的生长抑制, 同样的现象也发现在乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌和前列腺癌^[25]。除此之外, IGFBP3 还与某些癌基因相关, 研究发现 IGFBP3 能够激活 SPHK, 因此有人猜想 IGFBP3 可能与酪氨酸激酶通路相关, 事实证明在乳腺癌细胞中 IGFBP3 和 EGFR 确实都是高表达的^[26]。IGFBP3 对肾细胞癌的影响, 目前认为 IGFBP3 可能促进其的生长, 而且这种作用与 TGF- β 信号通路有关^[27,28]。而我们认为高表达 IGFBP3 的肾癌细胞不仅仅能通过自分泌影响肿瘤生长, 同时可能通过分泌

IGFBP3 影响周围的肿瘤微环境。通过分析标本中 IGFBP3 的表达, 我们明确了肾癌细胞中会出现 IGFBP3 生成增加的现象。在体外, 将脂肪细胞与肾癌细胞共培养后, 脂肪细胞受肾癌细胞影响, 棕色脂肪相关标志物 Prdm16、UCP1 明显升高, 这种效应在加入 IGFBP3 中和抗体后收到抑制。由此可知, IGFBP3 以旁分泌的方式影响脂肪细胞的分化。而在标本中我们同样发现, 与非肿瘤组、远端脂肪组比较时, 肿瘤组织周围的脂肪组织 UCP1 明显表达增加, 且具有显著性差异($P < 0.001$)。

与脂肪分化相关的通路有 Wnt 通路、Hedgehog 通路、IGF/insulin 通路和 TGF- β 通路^[20,21,29,30]。有研究发现在肥胖的人和小鼠模型中, TGF β 的表达增加, 同时发现 TGF β -SMAD3 通

路对于多功能干细胞分化为脂肪细胞有促进作用。另外,由于 SMAD3 的表达增加使得白色脂肪细胞的棕色脂肪标志物表达增加,说明该通路可能还与白色脂肪转化为棕色脂肪有关^[31]。通过检测 TGF β 下游通路,我们发现 IGFBP3 能够激活 smad1/5/8、p38MAPK,从而促进脂肪细胞分化。

ccRCC 本身与脂肪细胞有着重要的联系。肥胖是其明确危险因素,甚至有研究发现即使是儿童时期或是青年时期的超重、肥胖也会成为之后肾细胞癌的重要风险因素^[32]。在肾细胞癌几种病理类型中,肥胖是能够增加 ccRCC 发生风险的一种因素^[33]。本次研究表明,成熟的脂肪细胞能够促进肾癌细胞的增殖,并可增强其侵袭力,但其具体机制尚未阐明。值得注意的是,过表达 IGFBP3 的 786-O 细胞与脂肪细胞共培养后的培养液能够使 786-O 细胞脂质贮存增加,可能与脂肪细胞的参与有关。脂滴是一种独特的多功能细胞器。在 ccRCC 中,除了与能量代谢相关外,脂滴对细胞应激有着重要的保护作用,包括维持内质网稳态、清除氧自由基和肿瘤耐药^[34]。因此脂肪细胞促进肿瘤进展可能与引起肾癌细胞脂代谢紊乱有关,有待进一步研究。

综上所述,本次研究表明 IGFBP3 是肾透明细胞癌中过度表达的蛋白,脂肪细胞作为 IGFBP3 的靶器官,IGFBP3 能够促进其分化,其机制主要通过激活 TGF β 通路中的 smad1/5/8、p38MAPK。成熟的脂肪细胞能够促进肾癌细胞质脂滴形成,并且促进肿瘤的增殖、提高肿瘤的侵袭性。通过 IGFBP3 将肾细胞癌与肾周脂肪联系在了一起,为未来肾细胞癌的诊疗提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30
- [2] Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17009
- [3] Tarade D, Ohh M. The HIF and other quandaries in VHL disease[J]. Oncogene, 2017, 37(2): 139-147
- [4] Yu Y, Yu Q, Zhang X. Allosteric inhibition of HIF-2 α as a novel therapy for clear cell renal cell carcinoma [J]. Drug Discov Today, 2019, 24(12): 2332-2340
- [5] Martinez-Saez O, Gajate Borau P, Alonso-Gordoa T, et al. Targeting HIF-2 α in clear cell renal cell carcinoma: A promising therapeutic strategy[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2017, 111: 117-123
- [6] Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(1): 55-64
- [7] Atkins MB, Tannir NM. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma [J]. Cancer Treat Rev, 2018, 70: 127-137
- [8] Barata PC, Rini BI. Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(6): 507-524
- [9] Giuliano S, Cormerais Y, Dufies M, et al. Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux [J]. Autophagy, 2015, 11 (10): 1891-1904
- [10] Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(10): 569-579
- [11] Quail DF, Dannenberg AJ. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(3): 139-154
- [12] Choi J, Cha YJ, Koo JS. Adipocyte biology in breast cancer: From silent bystander to active facilitator [J]. Prog Lipid Res, 2018, 69: 11-20
- [13] Johansson M, Carreras-Torres R, Scelo G, et al. The influence of obesity-related factors in the etiology of renal cell carcinoma-A mendelian randomization study[J]. PLoS Med, 2019, 16(1): e1002724
- [14] Rajandram R, Perumal K, Yap NY. Prognostic biomarkers in renal cell carcinoma: is there a relationship with obesity?[J]. Transl Androl Urol, 2019, 8(Suppl 2): S138-S146
- [15] Huang CY, Huang YL, Pu YS, et al. The joint effects of arsenic and risk diplotypes of insulin-like growth factor binding protein-3 in renal cell carcinoma[J]. Chemosphere, 2016, 154: 90-98
- [16] Safarinejad MR. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene variants are associated with renal cell carcinoma [J]. BJU Int, 2011, 108(5): 762-770
- [17] Nguyen KH, Mishra S, Nyomba BL. In vitro differentiation of mouse brown preadipocytes is enhanced by IGFBP-3 expression and reduced by IGFBP-3 silencing [J]. Obesity (Silver Spring), 2015, 23 (10): 2083-2092
- [18] Ladanyi A, Mukherjee A, Kenny HA, et al. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis[J]. Oncogene, 2018, 37(17): 2285-2301
- [19] Nimri L, Peri I, Yehuda-Shnaidman E, et al. Adipocytes Isolated from Visceral and Subcutaneous Depots of Donors Differing in BMI Crosstalk with Colon Cancer Cells and Modulate their Invasive Phenotype[J]. Transl Oncol, 2019, 12(11): 1404-1415
- [20] Li Y, Jin D, Xie W, et al. PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2018, 13(3): 185-192
- [21] Benchamana A, Mori H, MacDougald OA, et al. Regulation of adipocyte differentiation and metabolism by lansoprazole[J]. Life Sci, 2019, 239: 116897
- [22] Chan SS, Schedlich LJ, Twigg SM, et al. Inhibition of adipocyte differentiation by insulin-like growth factor-binding protein-3 [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 296(4): E654-663
- [23] de Silva HC, Firth SM, Twigg SM, et al. Interaction between IGF binding protein-3 and TGF β in the regulation of adipocyte differentiation[J]. Endocrinology, 2012, 153(10): 4799-4807
- [24] Tseng YH, Kokkottou E, Schulz TJ, et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure[J]. Nature, 2008, 454(7207): 1000-1004
- [25] Baxter RC. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(5): 329-341
- [26] Marzec KA, Baxter RC, Martin JL. Targeting Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Signaling in Triple-Negative Breast Cancer [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 638526
- [27] Rosendahl AH, Holly JM, Celander M, et al. Systemic IGF-I administration stimulates the in vivo growth of early, but not advanced, renal cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2008, 123(6): 1286-1291

- Anat Rec (Hoboken), 2019, 302(9): 1552-1560
- [11] Guo Q, Lan P, Yu X, et al. Immunotherapy for hepatoma using a dual-function vector with both immunostimulatory and pim-3-silencing effects[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(6): 1503-1513
- [12] Zheng HC, Tsuneyama K, Takahashi H, et al. Aberrant Pim-3 expression is involved in gastric adenoma-adenocarcinoma sequence and cancer progression [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134 (4): 481-488
- [13] Yu X, Zou Y, Li Q, et al. Decorin-mediated inhibition of cholangiocarcinoma cell growth and migration and promotion of apoptosis are associated with E-cadherin in vitro [J]. Tumour Biol, 2014, 35 (4): 3103-3112
- [14] Popivanova BK, Li YY, Zheng H, et al. Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis[J]. Cancer Sci, 2007, 98(3): 321-328
- [15] Liu B, Wang Z, Li HY, et al. Pim-3 promotes human pancreatic cancer growth by regulating tumor vasculogenesis [J]. Oncol Rep, 2014, 31(6): 2625-2634
- [16] Shen Z, Li Y, Zhao C, et al. miR494BAG1 axis is involved in cinobufacini-induced cell proliferation and apoptosis in gastric cancer[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 7435-7441
- [17] Zhou RP, Chen G, Shen ZL, et al. Cinobufacin Suppresses Cell Proliferation via miR-494 in BGC-823 Gastric Cancer Cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(3): 1241-1245
- [18] Zhang X, Yuan Y, Xi Y, et al. Cinobufacini Injection Improves the Efficacy of Chemotherapy on Advanced Stage Gastric Cancer: A Systemic Review and Meta-Analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 7362340
- [19] Gao H, Gao MQ, Peng JJ, et al. Hispidulin mediates apoptosis in human renal cell carcinoma by inducing ceramide accumulation[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(12): 1618-1631
- [20] Gao H, Xie J, Peng J, et al. Hispidulin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of gallbladder cancer cells by targeting HIF-1 α [J]. Exp Cell Res, 2015, 332(2): 236-246
- [21] Han M, Gao H, Xie J, et al. Hispidulin induces ER stress-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo by activating AMPK signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(5): 666-676
- [22] Xie RF, Li ZC, Chen PP, et al. Bufotionine induced the mitochondria-mediated apoptosis in H22 liver tumor and acute liver injury [J]. Chin Med, 2015, 10: 5
- [23] Wang Z, Li XM, Shang K, et al. T-18, a stemonamide synthetic intermediate inhibits Pim kinase activity and induces cell apoptosis, acting as a potent anticancer drug[J]. Oncol Rep, 2013, 29(3): 1245-1251
- [24] Quan J, Zhou L, Qu J. Knockdown of Pim-3 Suppresses the Tumorigenicity of Glioblastoma by Regulating Cell Cycle and Apoptosis[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2015, 61(1): 42-50
- [25] Li YY, Mukaida N. Pathophysiological roles of Pim-3 kinase in pancreatic cancer development and progression [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(28): 9392-9404
- [26] Chang W, Liu M, Xu J, et al. MiR-377 inhibits the proliferation of pancreatic cancer by targeting Pim-3 [J]. Tumour Biol, 2016, 37(11): 14813-14824
- [27] Ai J, Li W, Zeng R, et al. Blockage of SSRP1/Ets-1/Pim-3 signalling enhances chemosensitivity of nasopharyngeal carcinoma to docetaxel in vitro[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 1022-1031
- [28] Liang C, Yu XJ, Guo XZ, et al. MicroRNA-33a-mediated downregulation of Pim-3 kinase expression renders human pancreatic cancer cells sensitivity to gemcitabine [J]. Oncotarget, 2015, 6 (16): 14440-14455
- [29] Chen XY, Wang Z, Li B, et al. Pim-3 contributes to radioresistance through regulation of the cell cycle and DNA damage repair in pancreatic cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(1): 296-302
- [30] Nakano H, Hasegawa T, Saito N, et al. Design and synthesis of an in vivo-efficacious PIM3 kinase inhibitor as a candidate anti-pancreatic cancer agent[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(24): 5687-93

(上接第 413 页)

- [28] Rosendahl AH, Forsberg G. IGF-I and IGFBP-3 augment transforming growth factor-beta actions in human renal carcinoma cells [J]. Kidney Int, 2006, 70(9): 1584-1590
- [29] Grafe I, Alexander S, Peterson JR, et al. TGF-beta Family Signaling in Mesenchymal Differentiation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(5): a022202
- [30] Wang C, Li X, Dang H, et al. Insulin-like growth factor 2 regulates the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stromal cells via IGF-1R and IR [J]. Cytotherapy, 2019, 21(6): 619-630
- [31] Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011, 12(11): 722-734
- [32] Landberg A, Falt A, Montgomery S, et al. Overweight and obesity during adolescence increases the risk of renal cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2019, 145(5): 1232-1237
- [33] Callahan CL, Hofmann JN, Corley DA, et al. Obesity and renal cell carcinoma risk by histologic subtype: A nested case-control study and meta-analysis [J]. Cancer Epidemiol, 2018, 56: 31-37
- [34] Koizume S, Miyagi Y. Lipid Droplets: A Key Cellular Organelle Associated with Cancer Cell Survival under Normoxia and Hypoxia [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1430