



河北大学
HEBEI UNIVERSITY

密 级：

分 类 号：

学校代码：10075

学 号：20191724

硕士学位论文

人脂肪间充质干细胞来源的外泌体 对非小细胞肺癌细胞转移的影响

学 位 申 请 人：刘冬雪

指 导 教 师：钟理 教授

学 位 类 别：理学 硕士

学 科 专 业：细胞生物学

院 系 名 称：生命科学学院

答 辩 日 期：二〇二二年五月

Classified Index:

CODE: 10075

U. D.C.:

No. 20191724

Thesis for the Degree of Master

The role of exosomes derived from
human adipose mesenchymal stem
cells on metastasis of non-small cell
lung cancer cells

Candidate: Dongxue Liu

Supervisor: Prof. Li Zhong

Category of Academic Degree : Master of Science

Specialty: Cell Biology

College: College of Life Sciences

Date of Oral Defense: May, 2022

河北大学

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得河北大学或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

作者签名：刘冬雪 日期：2022年5月27日

学位论文使用授权声明

本人完全了解河北大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

本学位论文属于

1、限制公开 ☐，在_____年_____月_____日限制期满后适用本授权声明。

2、不限制公开 ☒。

(请在以上相应方格内打“√”)

作者签名：刘冬雪 日期：2022年5月27日

导师签名：钟理 日期：2022年5月27日

保护知识产权声明

本人为申请河北大学学位所提交的题目为(人脂肪间充质干细胞来源的外泌体
对非小细胞肺癌细胞转移的影响)
的学位论文,是我个人在导师(钟理)指导并与导师合作下取得的研究成果,
研究工作及取得的研究成果是在河北大学所提供的研究经费及导师的研究经费
资助下完成的。本人完全了解并严格遵守中华人民共和国为保护知识产权所制定
的各项法律、行政法规以及河北大学的相关规定。

本人声明如下:本论文的成果归河北大学所有,未经征得指导教师和河北大
学的书面同意和授权,本人保证不以任何形式公开和传播科研成果和科研工作内
容。如果违反本声明,本人愿意承担相应法律责任。

声明人: 刘冬雪 日期: 2022年 5月 27日

摘要

背景：间充质干细胞（Mesenchymal stem cells, MSCs）是一种成体多功能干细胞。由于 MSCs 的分化可塑性、强大的体外扩展能力和免疫特权已被广泛应用于细胞再生和组织修复领域，被认为是各种器官或组织再生的细胞治疗策略。间充质干细胞来源的外泌体（Exosomes derived from mesenchymal stem cells, MSCs-Exos）作为一种微粒子免疫载体分布于全身多种组织，具有和 MSCs 相同的生物活性，已被应用于多种临床研究中。MSCs 在癌症中的研究显示，MSCs 可迁移至肿瘤微环境中，通过旁分泌作用发挥致瘤或抗肿瘤的活性，与肿瘤的发展和转移密切相关。肺癌是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤，其中非小细胞肺癌（Non-small cell lung cancer, NSCLC）占比 80% 以上。因此本研究旨在探究肺癌微环境中 MSCs-Exos 对 NSCLC 细胞转移的影响及作用机制，为研究人员可以更深刻地理解 MSCs 和肿瘤及微环境之间的相互联系提供理论依据，具有重要的指导意义。

方法：本研究采用人脂肪间充质干细胞（Human adipose-derived stem cells, hADSCs）和 A549、H1299 两种 NSCLC 细胞为研究对象，以浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的人脂肪间充质干细胞来源的外泌体（Exosomes derived from human adipose-derived stem cells, hADSCs-Exos）处理 NSCLC 细胞来模拟体内肺癌微环境。研究内容包括以下四个方面：（1）探究 hADSCs 以及 hADSCs-Exos 对 NSCLC 细胞上皮间质转化（Epithelial-mesenchymal transition, EMT）的影响，采用 qRT-PCR、Western Blot 实验检测 NSCLC 细胞内 EMT 相关因子的表达。（2）探究肺癌微环境是否可以提供激活 CXCL12/CXCR4 信号轴的条件，采用 qRT-PCR 实验检测 CXCR4 和 CXCL12 的基因表达水平。（3）探究 hADSCs-Exos 是否通过 CXCL12/CXCR4 信号轴影响 NSCLC 细胞的活力、迁移和侵袭能力，采用 MTT 实验、细胞划痕实验和 Transwell 实验检测 NSCLC 细胞的活力、迁移和侵袭能力。（4）探究 hADSCs-Exos 在 NSCLC 中发挥作用的潜在机制，运用 Western Blot 实验检测 AMPK/mTOR 信号通路蛋白的表达情况。

结果：（1）hADSCs 和 hADSCs-Exos 都可以促进 NSCLC 细胞发生 EMT。（2）在肺癌微环境中 CXCR4 和 CXCL12 的基因表达水平显著增加。（3）hADSCs-Exos 可以增强 NSCLC 细胞活力、迁移和侵袭能力；加入 CXCR4 的抑

制剂 AMD3100 后, 以上细胞功能的变化被抵消。(4) hADSCs-Exos 处理 A549 细胞后, p-AMPK α 表达量减少, p-mTOR 表达量增加, 促进 mTOR 信号通路的激活, 加入 CXCR4 抑制剂 AMD3100 后, p-AMPK α 的表达有增加的趋势, p-mTOR 表达量显著降低。

结论: 本实验发现 hADSCs 和 hADSCs-Exos 都可以促进 NSCLC 细胞发生 EMT, 且 hADSCs-Exos 可以通过 CXCL12/CXCR4 信号轴调节 AMPK/mTOR 信号通路参与 NSCLC 细胞的进展。本研究有力地证明了 hADSCs 和 hADSCs-Exos 对 NSCLC 细胞转移的促进作用, 为深入探究 MSCs 与 NSCLC 及其微环境之间的相互联系提供了理论依据和指导作用。在将 MSCs 应用于临床之前, 检查 MSCs 是否具有潜在的致癌性至关重要。

关键词 人脂肪间充质干细胞 外泌体 非小细胞肺癌 上皮间质转化 CXCR4

Abstract

Background: Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult pluripotent stem cells. MSCs have been widely used in cell regeneration and tissue repair due to their differentiation plasticity, strong in vitro expansion ability and immune privilege, and are considered as a cell therapy strategy for various organs or tissues regeneration. Exosomes derived from mesenchymal stem cells (MSCs-Exos), as a microparticle immune vector, are distributed in various tissues throughout the body and have the same biological activity as MSCs, which has been applied in a variety of clinical studies. Studies on MSCs in cancer have shown that MSCs can migrate to the microenvironment of lung cancer, and play tumorigenic or antitumor activities in the microenvironment of lung cancer through paracrine action, which is closely related to the development and metastasis of tumors. Lung cancer is a malignant tumor with the highest morbidity and mortality in the world, and non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for more than 80%. Therefore, this study aims to study the effect of MSCs-Exos in tumor microenvironment on NSCLC cell metastasis and its mechanism, so as to provide theoretical basis for researchers to have a deeper understanding of the interaction between MSCs and tumor and tumor microenvironment.

Methods: In this study, human adipose-derived stem cells (hADSCs) and NSCLC cells were used as research objects. NSCLC cells were treated with Exosomes derived from human adipose-derived stem cells (hADSCs-Exos) at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ to simulate the in vivo lung cancer microenvironment. The research content includes the following four aspects: (1) To explore the effects of hADSCs and hADSCs-Exos on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of NSCLC cells. qRT-PCR and Western Blot were used to detect the expression of EMT-related factors in NSCLC cells. (2) To explore whether the lung cancer microenvironment can provide the conditions for activating the CXCL12/CXCR4 signal axis, qRT-PCR was used to detect the gene expression levels of

CXCR4 and *CXCL12*. (3) To investigate whether hADSCs-Exos affected the viability, migration and invasion ability of NSCLC cells through *CXCL12/CXCR4* signal axis, MTT assay, cell scratch assay and Transwell assay were used to detect the viability, migration and invasion of NSCLC cells. (4) Explore the potential mechanism of hADSCs-Exos in NSCLC, and use Western Blot assay to detect the expression of AMPK/mTOR signaling pathway proteins.

Results: (1) Both hADSCs and hADSCs-Exos promoted EMT in NSCLC cells. (2) The gene expression levels of *CXCR4* and *CXCL12* were significantly increased in lung cancer microenvironment. (3) hADSCs-Exos can enhance the viability, migration and invasion of NSCLC cells; After the addition of AMD3100, an inhibitor of *CXCR4*, these changes in cell function were cancelled out. (4) After hADSCs-Exos treated A549 cells, the expression of p-AMPK α decreased, and that of p-mTOR increased, promoting the activation of mTOR signaling pathway. After *CXCR4* inhibitor AMD3100 was added, the expression of p-AMPK α tended to increase, and the expression of p-mTOR decreased significantly.

Conclusion: In this study, we found that both hADSCs and hADSCs-Exos can promote EMT in NSCLC cells, and hADSCs-Exos can regulate AMPK/mTOR signaling pathway through *CXCL12/CXCR4* chemotactic pathway to participate in progression of NSCLC cells. This study strongly proved the promoting effect of hADSCs and hADSCs-Exos on NSCLC cell metastasis, and provided theoretical basis and guidance for further exploration of the interaction between MSCs and NSCLC and its microenvironment. Before applying MSCs to the clinic, it is important to check whether MSCs have potential carcinogenicity, and it also has important guiding significance in the application of MSCs in the field of medical beauty.

Keywords Human adipose mesenchymal stem cells Exosomes Non-small cell lung cancer Epithelial mesenchymal transformation *CXCR4*

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 间充质干细胞.....	1
1.1.1 间充质干细胞的概述.....	1
1.1.2 间充质干细胞的应用.....	1
1.1.3 间充质干细胞与癌症疾病.....	2
1.1.4 人脂肪间充质干细胞的作用优势.....	3
1.2 外泌体概述.....	4
1.2.1 外泌体的特性.....	4
1.2.2 间充质干细胞来源的外泌体的作用.....	5
1.3 肺癌微环境.....	6
1.3.1 肺癌微环境与转移.....	6
1.3.2 肺癌微环境与上皮间质转化.....	7
1.3.3 间充质干细胞对肺癌微环境的调控作用.....	7
1.4 研究目的及意义.....	8
第二章 实验材料、仪器与方法.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.1.1 细胞及培养基.....	10
2.1.2 实验试剂.....	10
2.2 实验仪器.....	13
2.3 实验方法与步骤.....	14
2.3.1 细胞培养.....	14
2.3.2 hADSCs 表面标志物鉴定	14
2.3.3 hADSCs 诱导分化能力检测	14
2.3.4 RNA 提取实验	15
2.3.5 cDNA 合成实验	15
2.3.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验.....	16

2.3.7	蛋白提取实验.....	17
2.3.8	BCA 蛋白定量实验	17
2.3.9	蛋白免疫印迹 (Western Blot) 实验.....	18
2.3.10	hADSCs-Exos 的分离提取	19
2.3.11	hADSCs-Exos 的鉴定	19
2.3.12	hADSCs-Exos 荧光标记实验	20
2.3.13	AchE 活性检测 hADSCs-Exos 水平	20
2.3.14	MTT 实验检测细胞活力	21
2.3.15	细胞划痕实验检测 NSCLC 细胞迁移能力.....	21
2.3.16	Transwell 实验检测 NSCLC 细胞侵袭能力	22
2.3.17	统计方法.....	22
第三章	实验结果与讨论.....	23
3.1	人脂肪间充质干细胞的鉴定.....	23
3.1.1	hADSCs 表面标志物的鉴定	23
3.1.2	hADSCs 多向分化潜能的鉴定	23
3.2	共培养时 hADSCs 对 NSCLC 细胞的影响	24
3.2.1	共培养时 hADSCs 对 NSCLC 细胞发生 EMT 的影响	24
3.2.2	共培养时 hADSCs 对 NSCLC 细胞迁移能力的影响	26
3.2.3	共培养时 hADSCs 对 NSCLC 细胞侵袭能力的影响	26
3.3	hADSCs-Exos 的分离提取及鉴定	27
3.4	hADSCs-Exos 对 A549 细胞发生 EMT 的影响.....	28
3.5	hADSCs-Exos 被 NSCLC 细胞摄取	29
3.6	肺癌微环境对 hADSCs 分泌外泌体能力的影响	29
3.7	hADSCs-Exos 通过 CXCL12/CXCR4 信号轴影响 NSCLC 细胞转移 ..	30
3.7.1	hADSCs-Exos 对 CXCL12/CXCR4 信号轴的影响	30
3.7.2	hADSCs-Exos 通过 CXCL12/CXCR4 信号轴增强 NSCLC 细胞细 胞活力.....	31
3.7.3	hADSCs-Exos 通过 CXCL12/CXCR4 信号轴增强 NSCLC 细胞迁	

移能力.....	32
3.7.4 hADSCs-Exos 通过 CXCL12/CXCR4 信号轴增强 NSCLC 细胞侵	
袭能力.....	33
3.8 A549 细胞中 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白检测	34
3.9 讨论.....	35
第四章 结论.....	41
参考文献.....	42
致 谢.....	51
攻读学位期间的研究成果.....	52

第一章 绪论

1.1 间充质干细胞

1.1.1 间充质干细胞的概述

间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种十分重要且具有异质性的干细胞群体^[1]。MSCs 存在于几乎所有的组织和细胞基质周围, 根据来源不同可以分为: 脐带间充质干细胞^[2]和脂肪间充质干细胞^[3, 4]等。MSCs 符合以下标准即可被定义为 MSCs: 首先, MSCs 具备对塑料的粘附能力; 其次, MSCs 高表达标志物 CD73、CD105 和 CD90; 最后, MSCs 具有在体外分化为脂肪、成骨和成软骨细胞的潜能^[5]。

MSCs 是目前骨关节、肌肉、血管和炎症相关再生医学的最佳候选治疗细胞。MSCs 因强大的体外扩展能力和免疫特权成为细胞治疗和组织工程中最常用的干细胞。MSCs 也可以在肿瘤细胞和肿瘤相关细胞类型之间进行交流。随着对 MSCs 特性的深入了解, MSCs 相关的临床实验也逐渐开展。

1.1.2 间充质干细胞的应用

随着 MSCs 在各种组织的发现, 根据 MSCs 具有多能性的特点, 在最近的几十年中, 细胞疗法引起了越来越多的关注, MSCs 已被广泛研究, 特别是在再生医学和自身免疫病领域^[6]。由于 MSCs 的分化可塑性, 其已广泛应用于细胞再生和组织康复领域, 在骨和心血管修复和造血等领域中十分重要。MSCs 可以被招募到炎症部位或损伤组织, 在再生医学的应用中, MSCs 能分化成特定的细胞类型促进受损组织细胞再生^[7]。MSCs 被越来越多的研究人员认为是各种器官或组织再生的细胞治疗策略。除了这些再生的特性, MSCs 被招募到特定部位后, 改变其功能, 适应机体的代谢进行分化, 并与靶细胞协同作用。长期以来, 干细胞一直被视为治疗不同健康相关问题的可能载体。目前, 因 MSCs 功能强大被广泛应用。

MSCs 已被证明具有协调肿瘤细胞命运的能力, 引起了肿瘤领域的广泛关注。MSCs 因具有向肿瘤部位迁移的特性, 其被认为是未来基于细胞的靶向

癌症基因治疗最有希望的载体。MSCs 可以改变肿瘤微环境中免疫细胞的表型进而影响肿瘤的生长和转移。尽管 MSCs 的应用广泛，但因 MSCs 对肿瘤生长的不确定性，对于有癌症患病风险的高危人群，应用 MSCs 治疗仍需严格谨慎，因为 MSCs 不一定会起到治疗癌症的作用，可能会促进肿瘤的生长。

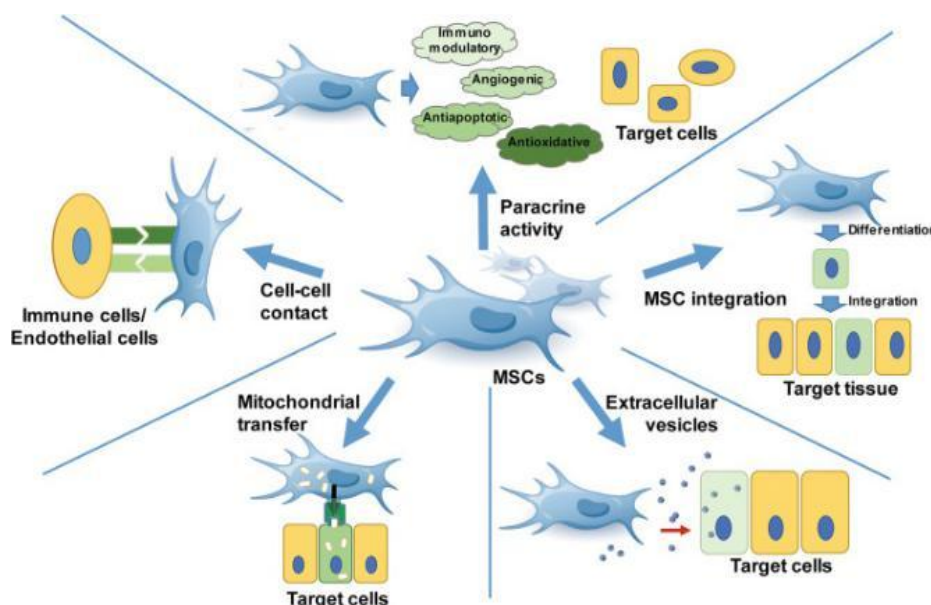


图 1-1 MSCs 的作用形式^[8]

1.1.3 间充质干细胞与癌症的关系

MSCs 被认为是具有双刃效应的细胞，具有致癌或抗肿瘤活性。MSCs 可以迁移至肿瘤部位，为肿瘤提供信号因子和微环境支持进而抑制肿瘤的生长^[8]；同时，MSCs 也是肿瘤微环境中基质细胞的祖细胞，能促使肿瘤相关基质转移的形成，与肿瘤发生发展密切相关^[9]。一方面，许多研究表明，MSCs 在多种肿瘤微环境中具有促进肿瘤生长的功能，包括表达生长因子、增强肿瘤形成和创造肿瘤干细胞生态位等。MSCs 可以释放多种生长因子和细胞因子促进肿瘤的血管生成，加速肿瘤发展和转移^[10]。MSCs 可以参与侵袭和转移的许多关键步骤，包括刺激 EMT 和诱导干细胞样特性，使癌症干细胞在循环中增加生存能力^[11]。此外，Karnoub 等人研究发现 MSCs 最初定位于乳腺癌，随后会被整合到肿瘤相关的间质中，乳腺癌细胞刺激 MSCs 分泌趋化因子以旁分泌的方式作用于癌细胞，以增强他们的运动性^[12]。另一方面，在其他研究中观察到了许多相互矛盾的结果。相关研究表明 MSCs 对人肝癌细胞 HepG2 的生长具有抑制和

促进凋亡的作用，且呈剂量依赖性^[13, 14]。MSCs 可以作为一些抗肿瘤药物或制剂的递送载体^[15]应用于动物体内并表现出抑制肿瘤生长的效应^[16]。

此后，关于 MSCs 影响肿瘤进展的研究还没有一致的结论。肿瘤微环境中的 MSCs 等间质细胞作为癌旁组织中的一部分在肿瘤生长转移的过程中目前仍然存在争议^[17]。因此，因 MSCs 具有向肿瘤组织归巢的特性将其作为递药的载体并不是一个好的治疗手段，在将 MSCs 应用于临床之前，检查 MSCs 是否具有潜在的致癌性至关重要。

1.1.4 人脂肪间充质干细胞的作用优势

尽管已经在各种组织中发现 MSCs，但由于不同组织来源的 MSCs 分离难度不同，目前，在现有的不同干细胞群体中，人脂肪间充质干细胞（Human adipose-derived stem cells, hADSCs）在过去 10 年里一直备受关注^[18]。hADSCs 是在毛囊基底皮下组织、真皮片、毛囊间真皮和皮下组织中发现的 MSCs，这些细胞被认为在调节皮肤再生和老化相关的形态缺陷中发挥重要作用。与其他干细胞群体和来源相比，hADSCs 具有多个优点：首先，hADSCs 更易获得（通过微创和无痛操作从脂肪轻松获得），同时在处理脂肪组织时可以提供更高的产量，而且 hADSCs 符合医学伦理规范；其次，hADSCs 的增殖能力更强^[19]；最后，相较于其他 MSCs 来说 hADSCs 的分化能力更强^[20]。

研究发现，hADSCs 具有广泛的临床应用潜力。hADSCs 作为一种多能干细胞，可以通过胶原酶消化和差速离心从脂肪组织中分离出来。越来越多的研究表明，hADSCs 能够分化成不同的细胞谱系在血管生成、免疫调节、皮肤伤口愈合和组织再生中发挥作用^[21]，同时也可以对受损的神经进行修复^[22]和愈合作用^[23]。除此之外，对于一些神经相关的疾病^[24]，注射 hADSCs 也有不同程度的修复作用^[25]。Wang 等人的研究显示，hADSCs 会促进骨损伤模型康复^[26]。Spasovski 等人的临床研究发现，将 hADSCs 注射入受损的关节中，可以调节局部免疫细胞的炎症表型，使其成为愈合的抗炎细胞进而起到缓解疼痛的作用^[27]。hADSCs 在心脏疾病模型中十分重要。Omar 等人的研究显示，当静脉注射 hADSCs 后，在急性心肌梗死模型中可以增强心脏功能和血管形成^[28]。Bobi 等人的研究结果显示，在冠状动脉注射 hADSCs 后，可以增加对心脏的保护作用和修复机制，但对

左心室的功能没有影响^[29]。Joo 等人的研究显示, 注射 hADSCs 对左心室的功能修复有促进作用^[30]。Liang 等人的研究显示, hADSCs 可以分化为肝细胞进而可以分泌抗凋亡和抗炎因子, 改善脓毒症的全身炎症, 促进肝损伤的愈合, 提高存活率^[31]。Jiao 等人的研究显示, hADSCs 可以增强抗炎因子 IL-10 和血管生成因子 VEGF 等的分泌, 减轻炎症促进肝脏再生^[32]。在肝脏出现炎症时, hADSCs 会起到消炎作用^[33, 34]。在机体出现炎症时, hADSCs 也会降低机体炎症恶化的发生概率^[35]。hADSCs 还可以在免疫系统中增强血管生成因子等可以起到修复作用的一些细胞因子的产生^[36]。

近年来, 干细胞因其多能性、自我更新和促进再生细胞因子分泌的能力而蓬勃发展。多能干细胞克服了与胚胎干细胞有关的道德顾虑被广泛地研究。大部分 hADSCs 来源于脂肪组织, 其数量是同等骨骼数量的近 500 倍。hADSCs 被越来越多研究人员发现它的应用优势, 在上述的神经相关疾病、心脏疾病、炎症和免疫调节等领域中, hADSCs 已被报道出具有强大的临床应用潜力。而且 hADSCs 的旁分泌作用在肾脏损伤^[37]、糖尿病^[38]、皮肤伤口的愈合^[39]等生理病理过程中已经成为一个热门的话题。但 hADSCs 对癌症的调控作用仍不一致, 对于存在癌症患病风险的人群, 应用 hADSCs 治疗以上疾病的同时仍需检查其是否具有潜在的致癌性。此过程中的相关机制尚需进一步的探索和研究。

1.2 外泌体概述

1.2.1 外泌体的特性

近年来, 外泌体 (Exosomes) 作为细胞间通信的关键角色被探索。外泌体是纳米大小的囊泡, 内含介导细胞交流的生物信号分子可以维持细胞的稳态^[40]。它由被脂质双层膜包围的蛋白质和 RNA 组成, RNA 形式包括转运 RNA、核糖体 RNA、核仁 RNA 和长链非编码 RNA 等, DNA 片段也可能存在于外泌体中。

外泌体的生物发生过程包括以下几个步骤: 首先质膜向内出芽形成早期内体, 早期内体形成晚期内体, 然后当晚期内体与质膜融合时, 外泌体被释放; 如果这些晚期内体与溶酶体融合, 则晚期内体被降解。晚期内体与质膜融合后释放腔内囊泡到胞外, 被称为外泌体^[41]。通常情况下, 运输机制控制外泌体的生物

发生和形成以及囊泡的脱落。外泌体的摄取不是随机的，而是依赖于外泌体表面蛋白质和受体细胞之间的相互作用。分泌出的外泌体随后可通过一个相当不确定的机制被导向其他细胞，可能是通过膜融合、内吞作用或受体配体相互作用被目标细胞吸收，之后可转移到溶酶体中降解或在受体细胞内释放其中的物质^[42-44]。随着研究的进展，外泌体的功能要复杂得多。由于外泌体中含有不同的遗传物质和蛋白质，它参与了许多生物过程。许多研究发现外泌体在再生医学的未来应用中的关键作用。外泌体在免疫和炎症反应的调节和神经再生等方面的应用具有重要的意义。

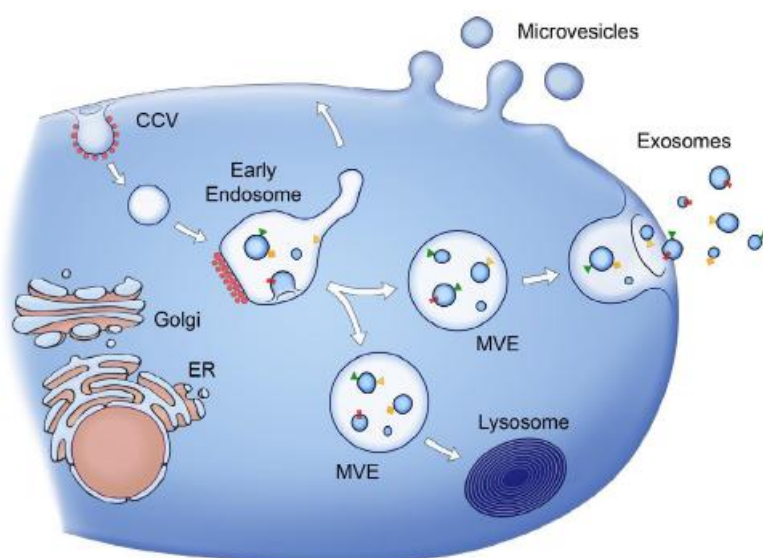


图 1-2 外泌体的形成过程^[41]

1.2.2 间充质干细胞来源的外泌体的作用

外泌体被越来越多地研究人员认为是干细胞相关应用的中介物质。像细胞一样，外泌体膜富含信号分子和表面抗原，其内容物多种多样，但不包含任何细胞器，如细胞核和线粒体。活细胞移植存在固有风险，因此，外泌体基于更安全、更低成本和更有效的应用方式逐渐成为现代医学中多功能的前沿领域。外泌体的生产也是具有扩展性的，更易于优化且来源广泛，多种重要领域已经显示出其广泛的临床应用，包括组织再生、免疫反应和肿瘤等。相关研究也将为外泌体的工业化生产铺平道路。

许多研究发现，外泌体在呼吸系统疾病^[45]、炎症^[46]、心血管病^[47]和肿瘤^[48]等人类重大疾病的发生发展过程中都发挥了其细胞间转移生物活性物质的能力

^[49]。MSCs 的应用效果在很大程度上是由其来源的外泌体 (MSCs-Exos) 支撑的。作为 MSCs 分泌的纳米大小的细胞外小泡, MSCs-Exos 与 MSCs 具有类似的生物活性和功能。MSCs-Exos 可以被微环境中其他细胞摄取并将其内容物输送到受体细胞中, 可以调节受体细胞的功能, MSCs-Exos 可以以支持或抑制的方式影响肿瘤的进展^[50]。

1.3 肺癌微环境

1.3.1 肺癌微环境与转移的关系

肺癌常常在晚期才被诊断出来, 但已经出现局部侵犯和远端转移。这些步骤需要血管生成, 降解基质屏障和诱导细胞运动这些基本阶段, 这些阶段通常都预示着癌症的预后不良^[51]。非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 占肺癌病例的 80% 以上, 70% 的患者的死亡是癌细胞转移造成的。癌细胞转移是指具有转移潜能和强侵袭性的肿瘤细胞离开原始肿瘤位置并在新环境中定居和生长, 最终形成转移性病变, 在这一过程中, 肿瘤细胞可以降解细胞外基质, 随着体内的生物循环侵入血液和各种组织中, 是一个连续的生物过程^[52]。恶性肿瘤的转移涉及局部浸润、渗入血管、血流中存活、外渗移出血管和远处克隆性生长等多个步骤, 受肿瘤自身及其所处微环境的双重调控^[53]。

肺癌微环境与肺癌细胞之间的相互作用可以促进或抑制肺癌发展。肺癌微环境中抗炎因子的分泌可以抑制肺癌转移, 但肺癌微环境的失调或慢性炎症是增加肺癌发病风险的特征^[54]。肺癌细胞和肺癌微环境之间的相互作用对癌细胞的转移至关重要, 并且影响肺癌细胞转移的器官选择性。多种成分互相作用构成复杂且多样的肺癌微环境, 在癌症进程中, 它们互相协调时时刻刻影响癌细胞的转移和肿瘤的生长^[55]。在肺癌微环境中的 MSCs、肺癌细胞、可溶性因子和炎性细胞等互相协调作用, 组成复杂的网状结构, 肺癌微环境可以影响肺癌细胞的生物学功能, 肺癌细胞也可以改变肺癌微环境的性质。发现 NSCLC 细胞和肺癌微环境中的 MSCs 之间合作的机制, 提高对潜在的分子和细胞机制的理解仍是一个紧迫和必要的问题, 有助于人们深刻地理解肺癌微环境与转移之间的联系。

1.3.2 肺癌微环境与上皮间质转化的关系

受肺癌微环境影响的肺癌细胞可以发生凋亡等变化从而抑制肿瘤的生长和转移;同时受肺癌微环境影响的肺癌细胞也会随着体内的循环移动到血液和各种组织和器官中,随着肺癌细胞的增殖和生长最终形成新的肺癌转移瘤^[56]。其中,肺癌微环境促进肺癌细胞转移的过程中可以发生上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)这一过程。EMT 是肺癌微环境中的 MSCs 影响 NSCLC 生长最直观的变化^[57]。MSCs 促进肺癌细胞从原发灶向继发灶的转移,导致 EMT 现象发生;MSCs 抑制肺癌细胞生长和转移,则会抑制 EMT 现象的发生。

目前,EMT 过程是研究癌细胞迁移、侵袭和转移性传播的焦点。在促癌发生的阶段,肿瘤细胞要脱离原发肿瘤并侵入周围组织,必须打破细胞间的接触,重塑细胞与基质的黏附位点。这些过程在发育过程中也可以被观察到,如原肠胚细胞或神经嵴细胞迁移和分化,上皮细胞去分化,移动到一个遥远的位置,然后再分化形成一个新的结构。在 EMT 过程中,非运动性、极化的上皮细胞,通过细胞间连接包埋在一个细胞集体中,通过消除它们的连接,转化为单个的、非极化的、具有运动性和侵袭性的间质细胞。肺癌细胞改变它们的粘附体系,通过发育过程获得迁移和侵袭性,包括细胞骨架的重组和侵袭生长所需的膜突的形成,这是一个逐渐发生的过程。在分子水平上,许多转录因子包括 *snail*, *slug* 和 *zeb* 直接靶向 *E-Cadherin* 和其他上皮基因进行转录抑制。*twist* 是间质细胞转录程序的强启动子,促进间质细胞标志物的表达。*Vimentin* 和 *N-Cadherin* 这些下游间质细胞蛋白重塑细胞骨架和细胞膜以促进细胞迁移^[58-61]。在抑癌发生的阶段,以上细胞运动和分子水平的改变会呈现一个相反的结果。肺癌微环境中各个信号通路之间会相互整合,共同协调 EMT 的发生发展。

1.3.3 间充质干细胞对肺癌微环境的调控作用

MSCs 在许多肿瘤的发生发展中均具有重要作用,是当前肿瘤相关研究的热点, MSCs 通过由细胞表面受体,分泌的细胞因子和代谢物等介导的信号网络,在多种癌症微环境中对肿瘤的转移和生长起到不同的效应。MSCs 以多种方式在不同的环境中或不同的培养条件下都显示出明显的效应,但在肺癌领域的相关报

道不是很多而且仍然存在争议, MSCs 如何促进肺癌进程或如何抑制肺癌发展其中的作用机制仍不清楚。因此, 在恶性肿瘤存在的情况下, 利用 MSCs 作为新的临床应用策略和方案尚需进一步的深入探索。

MSCs 对肺癌的作用仍然存在争议。李梅等研究发现人骨髓来源的 MSCs 可以向 NSCLC 细胞趋化, 并促进 NSCLC 细胞的生长^[62]; Jeon 等人在小鼠肺癌模型中发现, 脂肪组织来源的 MSCs 可介导血管生成, 进而促进肺癌细胞的生长^[63]; Zhang 等报道称, 人骨髓来源的 MSCs 可以减少 NSCLC 细胞的凋亡, 促进肺癌肿瘤的形成和生长^[64]; Keramidas 等的研究显示, 注射人骨髓来源 MSCs 可以抑制小鼠实体瘤的生长, 并改善肿瘤血管系统, 证明 MSCs 有治疗预先形成的肿瘤的潜力^[65]。Liu 等人的研究表明, 注射大鼠骨髓来源 MSCs 在大鼠模型中可以阻止肺癌的发展^[66]。此外, 还有研究报道, 在体内和体外, 人 MSCs 对肺癌细胞生长的作用是相互矛盾的^[67]。MSCs 在肺癌微环境中对 NSCLC 细胞的转移进程和 EMT 现象发生之间的分子机制还未得到研究人员的深刻理解。以 EMT 和 NSCLC 转移过程为切入点, 研究 MSCs 及 MSCs-Exos 对 NSCLC 转移的作用将为人们深刻理解 MSCs 在肺癌微环境中的机制提供帮助, 也可以对解答 MSCs 潜在致病的问题具有指导意义。

1.4 研究目的及意义

在过去几十年中, 出现了大量的研究, 在临床前研究中可以基于 MSCs 的疗法来治疗许多不同的疾病。MSCs 可作为骨关节、肌肉、血管和炎症相关再生医学的最佳候选治疗细胞。但 MSCs 在癌症中的治疗潜力仍然存在争议。虽然一些研究表明, MSCs 可能抑制癌症的发病机制, 但新的数据报告了 MSCs 对肿瘤生长和转移的促进作用。MSCs-Exos 与 MSCs 具有相似的生物活性。由于这一现实, 在将 MSCs-Exos 应用于癌症疾病之前, 需要持续努力了解 MSCs-Exos 对肿瘤发展的作用及机制。

在本研究中, 以肺癌为研究对象, 因肺癌是世界上致死率最高的癌症之一, 最能代表大部分癌症类型。hADSCs 主要来源于脂肪组织, 相对其他类型的 MSCs 离肺癌组织的物理距离较近, 且易于在肺癌微环境中增殖和扩散。因此, 本实验通过共培养 hADSCs 和 NSCLC 细胞来模拟体内肺癌微环境, 探究 hADSCs 对

NSCLC 细胞转移的影响;用 hADSCs-Exos 处理 NSCLC 细胞,确认 hADSCs-Exos 与 hADSCs 在肿瘤微环境中对 NSCLC 细胞影响结果的相同。接着检测了 hADSCs-Exos 是否通过相关信号通路影响 NSCLC 细胞的转移能力。目的是通过探究外泌体影响肺癌转移与发展过程中的机制,进而了解 hADSCs-Exos 对 NSCLC 的具体作用,为研究人员可以更深刻地理解 MSCs 和肿瘤及其微环境之间的相互联系提供理论依据,具有重要指导意义。

第二章 实验材料、仪器与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞及培养基

人脂肪间充质干细胞（hADSCs）购于湖南丰晖生物科技有限公司，由湘雅医院实验室分离得到；非小细胞肺癌细胞系 A549 和 H1299 细胞购于中国武汉大学典型培养物保藏中心；以上细胞均在 37℃、5% CO₂ 条件下的培养箱中无菌培养。A549 细胞和 hADSCs 应用的培养基为 90% DMEM 高糖培养基+10% GEMINI 胎牛血清；H1299 细胞应用的培养基为 90% RPMI 1640 培养基+10% GEMINI 胎牛血清。

2.1.2 实验试剂

实验所需主要实验试剂见表 2-1 和表 2-2。

表 2-1 实验试剂

试剂	公司
DMEM 高糖培养基	Gibco
RPMI 1640 培养基	Gibco
PBS 缓冲液	生工生物工程
胰酶	维森特
胎牛血清	GEMINI
青霉素-链霉素	博奥龙
Trizol	TaKaRa
无水乙醇	Sigma
2×SYBR Green	天根生化科技
Tween20	北京索莱宝生物
MTT 活性检测试剂盒	北京索莱宝生物
DEPC	北京索莱宝生物
Tris	Biotopped
SDS	Biotopped
NaCl	Biotopped
甘氨酸	Biotopped
基质胶	COENING
引物	北京擎科生物
cDNA 合成试剂盒	天根生化科技
人 MSCs 成骨诱导试剂盒	上海弗元生物
人 MSCs 成脂诱导试剂盒	上海弗元生物

表 2-1 实验试剂 (续)

试剂	公司
6×Super GelRed Prestain loading Buffer	US EVERBRIGHT
结晶紫溶液	北京雷根生物
4%中性多聚甲醛	Biotopped
琼脂糖	Vivantis
外泌体专用裂解液	宇玫博生物
外泌体荧光标记染料	宇玫博生物
乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性检测试剂盒	北京索莱宝生物
CXCL12	碧云天生物
AMD3100	碧云天生物
ECL 超敏发光液	北京索莱宝生物
DMSO	北京索莱宝生物
异丙醇	北辰方正试剂厂
氯仿	北辰方正试剂厂
CD19-Perp-Cy5.5	BD
CD90-PerCP-Cy5.5	BD
HLA-APC	BD
CD45-FITC	BD
CD105-PE	BD
CD14-APC	BD
CD34-FITC	BD
CD73-PE	BD
mTOR 抗体	Cell Signaling Technology
p-mTOR 抗体	Cell Signaling Technology
AMPKα 抗体	Cell Signaling Technology
p-AMPKα 抗体	Cell Signaling Technology
CXCR4 抗体	abcam
GAPDH 抗体	Abcam
CXCR4 抗体	Abcam
E-Cadherin 抗体	HUABIO
N-Cadherin 抗体	景杰生物
Vimentin 抗体	景杰生物
HRP-羊抗兔二抗	Cell Signaling Technology

表 2-2 实验试剂配方

试剂	配制方法
0.1% DEPC 水	于 200 mL ddH ₂ O 中加入 0.2 mL DEPC, 在摇床上震荡 12 h 以上, 高压灭菌并分装后 4℃ 保存
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	于 800 mL ddH ₂ O 中加入 181.7 g Tris, 调 pH 到 8.8, 定容至 1 L 室温保存
1.0 M Tris-HCl (pH 8.0)	于 800 mL ddH ₂ O 中加入 121.1 g Tris, 调 pH 到 8.0, 定容至 1 L 室温保存
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	于 800 mL ddH ₂ O 中加入 121.1 g Tris, 调 pH 到 6.8, 定容至 1 L 室温保存
10%过硫酸铵	于 10 mL ddH ₂ O 中加入 1 g 过硫酸铵, 4℃ 保存
5×电泳缓冲液	于 1 L ddH ₂ O 中加入 72 g Glycine, 15 g Tris 和 5 g SDS, 用玻璃棒搅拌溶解, 室温保存
10×转膜缓冲液	于 1 L ddH ₂ O 中加入 144 g Glycine, 30.3 g Tris, 用玻璃棒搅拌溶解, 室温保存
1×TBST 洗膜缓冲液	于 800 mL ddH ₂ O 中加入 40 mL 1 M pH 8.0 的 Tris-HCL 和 17.5 g NaCl, 用玻璃棒搅拌溶解后加 1 mL Tween 20, 定容至 2 L, 4℃ 保存
5% BSA	于 10 mL TBST 中溶解 0.5 g BSA, 用玻璃棒搅拌溶解, 4℃ 保存
封闭液	于 40 mL TBST 中溶解 2 g 脱脂奶粉, 用玻璃棒搅拌溶解, 现用现配

2.2 实验仪器

实验所需主要仪器见表 2-3。

表 2-3 实验仪器

仪器	公司
冰箱	Hair
超低温冰箱	Hair
倒置荧光显微镜	奥林巴斯
超净工作台	Eppendorf
酶标仪	Molecular Devices
瞬时离心机	Andy Bio
CO ₂ 恒温培养箱	YAMATO
分析天平	奥豪斯
漩涡震荡仪	杭州米欧仪器有限公司
超声波清洗仪	天津瑞普电子
微波炉	格兰仕
恒温摇床	哈尔滨市东联电子
恒温培养箱	宁波江南仪器厂
流式细胞仪	贝克曼库尔特
台式离心机	贝克曼库尔特
金属浴	BIOER
制冰机	广州冰翔制冷设备有限公司
烘箱	上海飞越实验仪器有限公司
超纯水机	Heal Force
冷冻离心机	Beckman
超速离心机	Beckman
高压蒸汽灭菌锅	TOMY
电泳仪	Bio-Rad
凝胶成像仪	Bio-Rad
荧光定量 PCR 仪	Bio-Rad
PCR 仪	Applied Biosystems
移液枪	Thermo

2.3 实验方法与步骤

2.3.1 细胞培养

细胞复苏：做好防护的同时从液氮中取出细胞冻存管，遵循“快融”的规则迅速解冻细胞，吸取细胞悬液至 15 mL 离心管中 1000 rpm 离心 3 min。弃去上清，吹悬细胞团使之均匀分布，把培养瓶放于 37℃，5% CO₂ 的培养箱中。

细胞传代：取生长良好的细胞进行传代，胰酶消化细胞后加入所用胰酶 3 倍体积的完全培养基终止消化，吸取细胞悬液至 15 mL 离心管中 1000 rpm 离心 3 min。弃去上清，吹悬细胞团使之均匀分布，分装后把培养瓶放于 37℃，5% CO₂ 的培养箱中。

细胞冻存：消化细胞步骤与上述相同。加入细胞冻存液吹悬细胞团，将细胞悬液加入冻存管中，遵循“慢冻”的规则梯度降温冻存细胞。

2.3.2 hADSCs 表面标志物鉴定

(1) 准备第三代的 hADSCs，当细胞融合密度至 85%左右消化 hADSCs，消化 hADSCs 步骤与 2.3.1 中相同。调整细胞悬液密度为 1×10^6 个细胞/mL，向流式管 1 和流式管 2 内分别加入适量细胞悬液。

(2) 向流式管 1 中加入 20 μ L CD19-Perp-Cy5.5、20 μ L CD105-APC、5 μ L CD45-FITC 和 5 μ L CD14-PE，向流式管 2 中加入 20 μ L CD90-Perp-Cy5.5、20 μ L CD73-APC、5 μ L HLA-FITC 和 5 μ L CD34-PE，将 2 个流式管室温避光孵育 30 min。

(3) 向流式管 1 和流式管 2 中加入 400 μ L PBS，流式细胞仪上机检测。分析 hADSCs 的表面标志物表达率。

2.3.3 hADSCs 诱导分化能力检测

按照上海弗元生物公司生产的人间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒和人间充质干细胞成骨诱导分化试剂盒对第三代的 hADSCs 进行分化潜能的鉴定。具体步骤如下：

hADSCs 成脂诱导分化：准备所需诱导的第三代 hADSCs，当细胞融合密度至 85%左右时消化 hADSCs，消化 hADSCs 步骤与 2.3.1 中相同。调整细胞密度

为 3×10^4 个细胞/ cm^2 在 6 孔板中进行培养, 培养条件也与 2.3.1 中相同。当细胞融合密度至 85% 左右时, 按 72 h 和 24 h 的周期分别更换试剂盒中的 B 和 C 液培养 hADSCs。诱导 3 周后, 应用试剂盒中的油红 O 试剂染 hADSCs 并观察。

hADSCs 成骨诱导分化: 准备所需诱导的第三代 hADSCs, 当细胞融合密度至 85% 左右时消化 hADSCs, 消化 hADSCs 步骤与 2.3.1 中相同。调整细胞密度为 3×10^4 个细胞/ cm^2 在 6 孔板中进行培养, 培养条件也与 2.3.1 中相同。当细胞融合密度至 65% 左右时, 按 72 h 的周期更换试剂盒中的成骨诱导液培养 hADSCs。诱导 3 周后, 应用试剂盒中的茜素红试剂染 hADSCs 并观察。

2.3.4 RNA 提取实验

(1) 分别取按照实验要求处理的 hADSCs、A549 和 H1299 细胞, 弃去旧培养基用 PBS 洗 3 次, 加入 1 mL Trizol 并把贴壁的细胞用力吹打掉, 收集到 1.5 mL 的 EP 管内, 静置 5 min 或 -80°C 条件下保存。

(2) 加入 Trizol 1/5 体积的氯仿, 震荡混匀, 室温静置 5 min 后 12000 g , 4°C 离心 15 min。

(3) 离心后吸取 350 μL 管内上层液体到新 EP 管中, 加入 Trizol 1/2 体积的异丙醇, 震荡混匀, 静置 10 min 后 12000 g , 4°C 离心 10 min。

(4) 离心后肉眼可看到管底侧面形成白色沉淀, 弃去上清加入 1 mL 由 DEPC 水配置的 75% 乙醇, 上下摇晃后 7500 g , 4°C 离心 5 min。

(5) 弃去上清, 室温干燥沉淀 2-3 min。加入 30 μL RNase-free 水溶解沉淀即为 RNA 溶液。保存在 -80°C 条件下。

2.3.5 cDNA 合成实验

(1) 按照 cDNA 合成实验试剂盒进行操作, 首先将试剂盒内的所有试剂都放在冰上解冻, 解冻后震荡混匀并短暂离心备用。

(2) 按表 2-4 加样 42°C 孵育 3 min。

(3) 按表 2-5 加样。

(4) 把加好的表 2-5 中的反转录反应体系 Mix 分装到按表 2-4 制备的去除 gDNA 体系中, 震荡混匀。

(5) 按照以下反应将混匀的体系进行上机反应: 在 42°C 条件下反应 15 min 后,

在 95℃条件下反应 3 min，然后在 4℃条件下反应至结束。

表 2-4 去除 gDNA 体系

成分	体积
5×gDNA Buffer	1 μL
RNA Template	0.5-1 μL
RNase-Free ddH ₂ O	Up to 5 μL

表 2-5 反转录反应体系

成分	体积
10×Fast RT Buffer	1 μL
RT Enzyme Mix	0.5 μL
FQ-RT Primer Mix	1 μL
RNase-Free ddH ₂ O	Up to 5 μL

2.3.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

(1) 按表 2-6 中的 qRT-PCR 引物序列在北京擎科生物公司合成引物。

表 2-6 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'—3')
<i>snail1</i> -F	CGAGTGGTTCTTCTGCGCTA
<i>snail1</i> -R	CTGCTGGAAGGTAAACTCTGGA
<i>zeb1</i> -F	GATGACCTGCCAACAGACCA
<i>zeb1</i> -R	CTGTGTCATCCTCCCAGCAG
<i>zeb2</i> -F	CCTCTGTAGATGGTCCAGTGA
<i>zeb2</i> -R	GTCAGTGCCTGAAGGTACT
<i>twist1</i> -F	TCAAGAGGTCGTGCCAATCA
<i>twist1</i> -R	TTGCAGGCCAGTTTGATCCC
<i>twist2</i> -F	CGGGAGTGAGCACATTAGCA
<i>twist2</i> -R	TGAGTGGATTTCGCCTTTCCC
<i>CXCR4</i> -F	TCATCCTCATCCTGGCTTTC
<i>CXCR4</i> -R	CAAATCACACCCTTGCTTG
<i>CXCL12</i> -F	TGTGCCCTTCAGATTGTAGCC
<i>CXCL12</i> -R	CTAGGCTTTGCCCAGGTTGA
<i>GAPDH</i> -F	CATCATCCCTGCCTCCACT
<i>GAPDH</i> -R	GCCTGCTTCACCACCTTCTT

(2) 按表 2-7 向 96 孔板中加样，加样过程中注意避光。

(3) 将混匀的体系进行上机反应，按表 2-8 设置反应条件，反应结束后计算基因的相对表达量。

表 2-7 qRT-PCR 反应体系

成分	体积
2×Fast Super EvaGreen Master Mix	5 μL
上游引物 (10 μM)	0.25 μL
下游引物 (10 μM)	0.25 μL
cDNA 模板	0.5 μL
RNase-Free ddH ₂ O	4 μL

表 2-8 qRT-PCR 反应条件

阶段	循环	温度	时间
预变性	1×	95℃	10 min
		95℃	10 sec
PCR 反应	40×	55℃	20 sec
		72℃	30 sec
Melting Curve			

2.3.7 蛋白提取实验

(1) 实验开始前将离心机温度调到 4℃ 进行预冷, 取出按照实验要求处理的 A549 和 H1299 细胞, 弃去上清加入细胞蛋白裂解液并在冰上裂解 20 min。

(2) 将贴壁的细胞用力刮下来, 收集到 1.5 mL 离心管中。用超声破碎仪破碎细胞 30-50 次, 以上步骤都在冰上操作。

(3) 4℃, 15000 g 离心 5 min。取上清即为 A549 和 H1299 细胞的总蛋白成分, 保存在 -20℃ 条件下。

2.3.8 BCA 蛋白定量实验

(1) 将索莱宝生物公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒中的 Cu 试剂和 BCA 试剂按 1:50 的体积比例添加, 混匀制备成 BCA 工作液。

(2) 向 90 μL 的 PBS 中加入 10 μL 浓度为 5 mg/mL 的 BSA 标准品, 混匀制备成标准品稀释液。向 96 孔板中加 0、2、4、6、8、12、16、20 μL 的标准品稀释液后, 每孔再加 20、18、16、14、12、8、4、0 μL 的 PBS 至每孔液体体积为 20 μL。向 90 μL 的 PBS 中加入 10 μL 蛋白样品, 混匀制备成样品稀释液并向 96 孔板中每孔加入 20 μL。

(3) 向所有孔内各加 180 μL BCA 工作液, 在 37℃ 条件下反应 30 min 后检测各孔在 562 nm 处的 OD 值。

2.3.9 蛋白免疫印迹（Western Blot）实验

（1）制胶：洗干净制胶的器材后，装板加水试漏；配置分离胶，分离胶配方见表 2-9，配胶板试漏 5 min 后观察胶板不漏液可向胶板中加入分离胶，加至距离胶板顶端 1/3 处停止加分离胶并液封；配置浓缩胶，浓缩胶配方见表 2-9。分离胶凝固后在分离胶上层缓慢地加入浓缩胶，插入凝胶梳，在室温条件下静置 30 min 后立即使用或用湿巾包好保存于 4℃ 条件下。

（2）蛋白变性：向 40 μL 5×Loading Buffer 中加入适量蛋白样品后在 100℃ 的金属浴中煮沸 10 min。

（3）电泳：将凝胶垂直安装在电泳设备上，加入 1×电泳缓冲液，拔掉凝胶梳。电泳设备安装好后向每个胶孔加入 20 μL 蛋白样品，最后向预留的第一个胶孔中加入 3-5 μL 蛋白 Marker，恒压 100 V 跑电泳 1.5 h。

（4）转膜：观察蛋白 Marker 条带判断目的蛋白到达可分辨区域时关闭电源，取出胶板，将上层浓缩胶和无用的部分凝胶切掉。用甲醇将 PVDF 膜激活 5 min。依次放海绵、滤纸、蛋白凝胶、PVDF 膜、滤纸和海绵，排掉气泡锁紧转膜夹，区分好正负极后将转膜夹插入预冷的转膜槽内，加入 1×转膜缓冲液没过待转凝胶，恒压 100 V 开始转膜 65 min。

（5）封闭、抗体孵育：在室温下用封闭液浸泡 PVDF 膜 1 h。用 TBST 洗 3 次 PVDF 膜，添加一抗工作液在 4℃ 摇床过夜孵育。用 TBST 洗 3 次 PVDF 膜，添加二抗工作液室温孵育 1 h。

（6）显影：用 TBST 洗 3 次 PVDF 膜，添加 2-3 mL 现配的 ECL 显影液避光孵育 2-3 min，在凝胶成像仪中显影。

表 2-9 蛋白凝胶配方表

组分	浓缩胶（5 mL）	12%分离胶（10 mL）
水	3.4	3.3
30% Acrylamide	0.83	4.0
1.5 M Tris-HCl（pH 6.8）	0.63	-
1.5 M Tris-HCl（pH 8.8）	-	2.5
10% SDS	0.05	0.1
10%过硫酸铵	0.05	0.1
TEMED	0.005	0.004

2.3.10 hADSCs-Exos 的分离提取

本实验采用分离 hADSCs-Exos 的方法是通过超高速离心机差速离心的方法进行分离提取，具体步骤为：

(1) 制备无外泌体胎牛血清：将 GEMINI 胎牛血清加入无菌的贝克曼超速离心管中，100000 g，4℃ 离心 12 h 后收集上清。

(2) 取出细胞融合密度至 80%左右的 hADSCs（仅使用第 3-7 代）细胞培养瓶，弃去旧培养基，PBS 洗涤细胞 2 次，用胰酶消化下来铺于细胞培养瓶中，待细胞融合密度达到 80%左右时，换为含无外泌体胎牛血清的完全培养基。

(3) 培养 48 h 后收集 hADSCs 培养液上清，在 300 g 的转速下 4℃ 离心 10 min，收集上清在 2000 g 的转速下 4℃ 离心 20 min，收集上清在 10000 g 的转速下 4℃ 离心 1 h，收集上清置于新的贝克曼超速离心管中，在 120000g 的转速下 4℃ 离心 2 h，弃掉上清液，沉淀部分为粗外泌体。

(4) 将得到的粗外泌体重悬于无菌的 PBS 中，加入新的超速离心管中，在 120000 g 的转速下 4℃ 离心 2 h，弃掉上清液洗去杂蛋白，获得的沉淀即为纯净的外泌体。hADSCs-Exos 收集在 200 μ L PBS 中，分离后立即使用或保存在 -80℃ 条件下。

2.3.11 hADSCs-Exos 的鉴定

(1) hADSCs-Exos 标志蛋白鉴定：采用宇玫博生物公司的外泌体专用裂解液产品对获取的 hADSCs-Exos 进行裂解，将 hADSCs-Exos 与裂解液按体积比 1:1 添加到 1.5 mL 离心管中混匀，在 4℃ 条件下裂解 10 min 后在 12000 g 离心 5 min，收集上清即为裂解好的 hADSCs-Exos；将上述获得的裂解后的 hADSCs-Exos 按照 2.3.8 中步骤进行 BCA 蛋白浓度测定，Western Blot 实验检测 hADSCs-Exos 的生物标志物：ALIX、CD63、TSG101。

(2) hADSCs-Exos 的透射电镜鉴定实验：将获取的 hADSCs-Exos 用少量 PBS 重悬，用 PBS 稀释 hADSCs-Exos 悬液 10 倍，吸取 10-20 μ L hADSCs-Exos 稀释液滴到无菌透明手套上，然后将直径 2 mm 的铜网轻轻放到液滴上，室温静置 5 min 后取下铜网，然后将铜网轻轻放到滴在无菌透明手套的醋酸双氧铀液滴上，室温静置 5 min 后取下铜网使铜网干燥，用 PBS 洗铜网 2-3 次洗掉多余的染料，干燥铜网后用 JEM-100SX 透射电子显微镜观察 hADSCs-Exos 的形态并拍照，透

射电子显微镜的电压设为 80-120 kV。

2.3.12 hADSCs-Exos 荧光标记实验

DiR 是一种亲脂性的近红外荧光花青染料。其两个 18-碳链可以与细胞膜或亲脂性生物分子结合,从而进行特定、稳定的染色,DiR 染色后的 hADSCs-Exos 所发射的红外光可以高效地穿过 NSCLC 细胞,进而可以观察到 hADSCs-Exos 被 NSCLC 细胞摄取。hADSCs-Exos 荧光标记实验的操作步骤为:

(1) hADSCs-Exos 蛋白浓度测定:取适量 hADSCs-Exos 裂解液进行 BCA 蛋白浓度测定以确定 hADSCs-Exos 蛋白浓度,BCA 蛋白浓度测定步骤与 2.3.8 中相同。

(2) DiR 染料工作液制备:避光条件下用 PBS 稀释 DiR 储存液,配置浓度为 1 μM 的 DiR 染料工作液。

(3) hADSCs-Exos 染色:在避光的条件下,向 hADSCs-Exos 中加入 DiR 染料工作液,震荡混匀后在 37℃ 的金属浴上反应 30 min,向孵育后的 hADSCs-Exos-染料复合物中加入 10 mL PBS 混匀后加入贝克曼超速离心管中,在 4℃ 条件下 120000 g 离心 2 h,弃掉含多余染料的上清液,沉淀部分为染色后的 hADSCs-Exos。取 200 μL PBS 重悬沉淀物。

(4) hADSCs-Exos 摄取:在避光的条件下,将染色后的 hADSCs-Exos 与 NSCLC 细胞在 37℃,5% CO_2 条件下共培养 6 h,浓度为 1 g hADSCs-Exos / 10^4 个细胞,共培养结束后用 PBS 清洗 3 次,用 4% 的中性多聚甲醛室温固定摄取 hADSCs-Exos 的 NSCLC 细胞 20 min, PBS 清洗后用 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI 稀释液于在室温条件下和细胞反应 15 min, PBS 清洗 3 次后在细胞爬片上加一滴封片剂,用激光共聚焦显微镜观察 NSCLC 细胞摄取 hADSCs-Exos 的结果。

2.3.13 AchE 活性检测 hADSCs-Exos 水平

乙酰胆碱酯酶 (AchE) 定位于外泌体膜, AchE 活性可以作为外泌体释放的标记物。测定 hADSCs 培养上清中的 AchE 活性可以间接地反映细胞分泌 hADSCs-Exos 的水平,按试剂盒中说明书操作的步骤为:

(1) 将酶标仪波长调为 412 nm。

(2) 收集 hADSCs 的培养上清,进行样本测定,按表 2-12 加样本和试剂盒中的

试剂。检测各孔在 412 nm 处的 OD 值。

(3)按 AchE 酶活计算公式计算 AchE 活性: $\text{AchE 酶活(U/mL)} = 2255 \times \Delta A$, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

表 2-10 AchE 活性检测样品测定表

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)
样本	15	15
试剂二	50	-
37℃金属浴准确反应 5min。		
试剂四	50	50
试剂二	-	50
12000 rpm 常温离心 5 min, 向 96 孔板中加入 10 μL 离心后的上清液		
试剂一	170	170
试剂三	20	20

2.3.14 MTT 实验检测细胞活力

MTT 实验可以检测细胞存活和生长能力。采用索莱宝生物公司的 MTT 检测试剂盒检测 NSCLC 细胞的活力。MTT 实验检测 NSCLC 细胞活力的操作步骤为:

(1)将 DMSO、hADSCs-Exos、hADSCs-Exos+AMD3100 和 AMD3100 4 组 NSCLC 细胞消化, 消化步骤与 2.3.1 中相同。调整细胞密度为 3000 个细胞/孔, 向 96 孔板中的每孔加 100 μL 细胞悬液, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

(2)待细胞贴壁后, 弃去上清, 加入 90 μL 新鲜的完全培养基和 10 μL MTT 溶液继续养 4-5 h。

(3)培养结束后弃去 96 孔板内培养液上清, 向每孔加入 110 μL Formazan 溶解液, 振荡混匀 10 min 切勿产生气泡, 检测各孔在 490 nm 处的 OD 值。

2.3.15 细胞划痕实验检测 NSCLC 细胞迁移能力

(1)用无菌的记号笔在六孔板背面画线标记, 便于后续实验。

(2)按照实验要求处理 NSCLC 细胞后消化细胞, 消化步骤与 2.3.1 中相同。调整细胞密度为 10⁵ 个细胞/mL, 向 6 孔板中每孔加入 2 mL 细胞悬液置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

(3)24 h 后弃去旧培养基, PBS 清洗 2 次, 用 10 μL 的移液枪尖垂直 6 孔板底部沿着六孔板背面标记均匀地划线。加 PBS 清洗 2 次后, 每孔加 2 mL 基础培养基。

(4) 在显微镜下观察 NSCLC 细胞划痕区域, 拍照作为 0 h 实验结果。

(5) 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后再次拍照作为 24 h 实验结果。

2.3.16 Transwell 实验检测 NSCLC 细胞侵袭能力

(1) 取出 Transwell 小室轻轻地悬挂在 24 孔板上, 在每个 Transwell 上室中加 50 μL 基质胶和基础培养基的混合液, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 5 h。

(2) 按照实验要求处理 NSCLC 细胞后消化 NSCLC 细胞和 hADSCs, 消化步骤与 2.3.1 中相同。调整所有细胞的密度为 10⁵ 个细胞/mL, 向 Transwell 上室加入 150 μL NSCLC 细胞悬液; Transwell 下室中加入 500 μL hADSCs 细胞悬液和 100 ng CXCR12, 每组做 3 个复孔。置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

(3) 24 h 后弃去旧培养基, PBS 清洗 2 次, 向 Transwell 下室加入 500 μL 4% 中性多聚甲醛固定小室 10 min, 晾干小室。

(4) 向 Transwell 下室中加入 500 μL 0.1% 结晶紫染液染小室 10 min, 用 PBS 多次洗涤小室。在显微镜下观察 NSCLC 细胞的侵袭能力。

2.3.17 统计方法

所有实验至少重复 3 次。用 GraphPad Prism 7.0 软件对实验数据进行分析并绘图, 实验所得数据均以平均数±标准差 (Mean±SEM) 的形式表示。设定 $p < 0.05$ 具有统计学差异, $p < 0.01$ 具有显著统计学差异, $p < 0.001$ 具有极显著统计学差异。

第三章 实验结果与讨论

3.1 人脂肪间充质干细胞的鉴定

3.1.1 hADSCs 表面标志物的鉴定

用流式细胞仪检测了第三代 hADSCs 的细胞表面标志物,结果如图 3-1 所示:与对照组相比, hADSCs 的 CD73、CD105 和 CD90 高表达, hADSCs 的 CD45、CD14、CD19、CD34 和 HLA 低表达。符合 MSCs 的表面标志物特征。

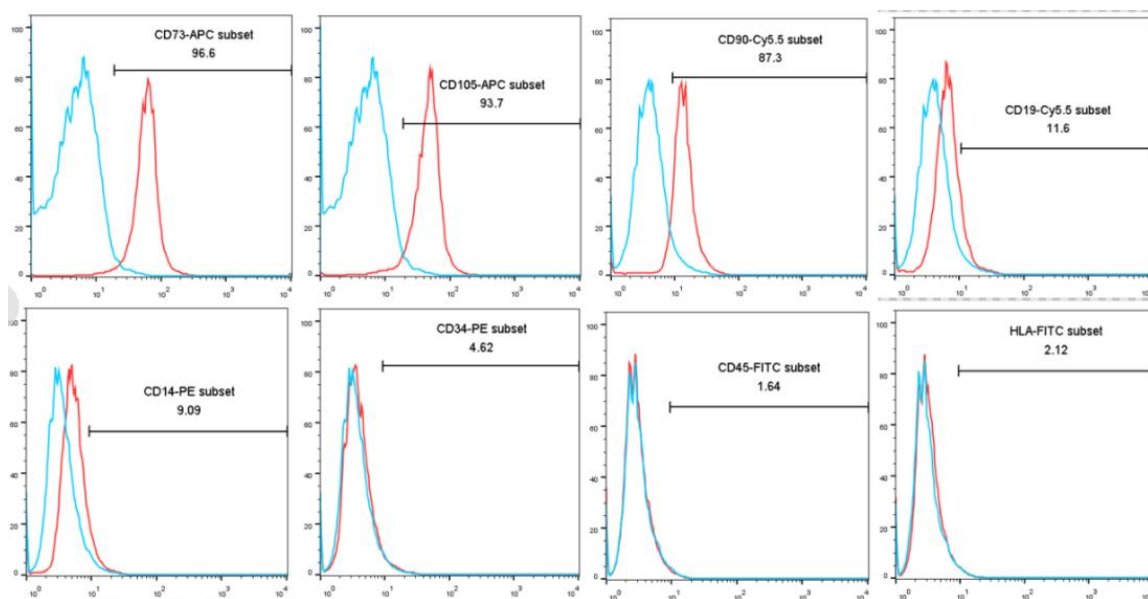


图 3-1 流式细胞仪鉴定 hADSCs 表面标志物
图中红色曲线为 hADSCs 实验组, 蓝色曲线为对照组

3.1.2 hADSCs 多向分化潜能的鉴定

hADSCs 复苏后培养至细胞贴壁,用显微镜观察细胞形态如图 3-2 (a) 所示: hADSCs 在培养皿内均匀分布,细胞之间粘连紧密呈螺旋状生长,细胞形态呈梭形且细胞核呈卵圆形。培养至细胞融合密度达到 80%左右,换成脂成骨诱导分化培养基对 hADSCs 诱导分化。

hADSCs 经成脂诱导分化 3 周后,结果如图 3-2 (b) 所示:与未诱导的细胞相比, hADSCs 胞中脂滴形成的现象增加,且细胞形态向脂肪细胞的形态转变。经油红 O 染色后在显微镜下可明显地看到 hADSCs 内被染成橘红色的脂滴。表

示 hADSCs 具有分化为脂肪细胞的能力。

hADSCs 经成骨诱导分化 3 周后, 结果如图 3-2 (c) 所示: 与未诱导的细胞相比, 在显微镜下虽未看到细胞中的矿化钙结节大面积着色, 但可观察到 hADSCs 的细胞形态出现了成骨细胞的典型形态, 表示 hADSCs 具有分化为成骨细胞的潜力。

综上所述, 以上对生长特性、表面标志和分化能力的鉴定结果表明, 本课题使用的 hADSCs 符合国际细胞治疗协会制定的关于 MSCs 应用在基础和临床前研究满足的基本条件, 且在 3-7 代细胞状态稳定, 证明我们的 hADSCs 可以确保本研究的后续进行。

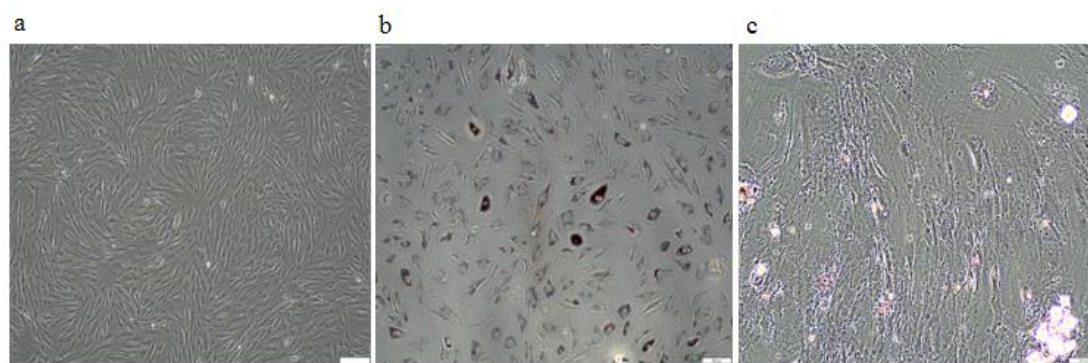


图 3-2 hADSCs 成脂成骨诱导分化结果

(a) 未诱导未分化的第三代 hADSCs; (b) hADSCs 成脂诱导分化结果; (c) hADSCs 成骨诱导分化结果。图为 3 次实验结果的代表性图片

3.2 共培养时 hADSCs 对 NSCLC 细胞的影响

采用细胞小室共培养 hADSCs 和 NSCLC 细胞, 将 hADSCs 和 NSCLC 细胞分别种于上下室, 小室内和培养板中的细胞培养液以具有通透性的聚碳酸酯膜相隔, 用细胞小室共培养两种细胞可以模拟体内肺癌微环境, 小室内外的成分互相“交流”可以影响细胞的生长和运动等。本研究采用 hADSCs 和 A549、H1299 细胞为研究对象。

3.2.1 共培养时 hADSCs 对 NSCLC 细胞发生 EMT 的影响

用显微镜观察与 hADSCs 共培养后 A549 和 H1299 细胞形态的变化, 并拍照记录。结果如图 3-3 (a) 所示: 与 hADSCs 共培养 48h 后, NSCLC 细胞形态由椭圆形变为长梭型, 细胞间黏连性降低呈分散状态, 发生 EMT 的细胞形态学变化。

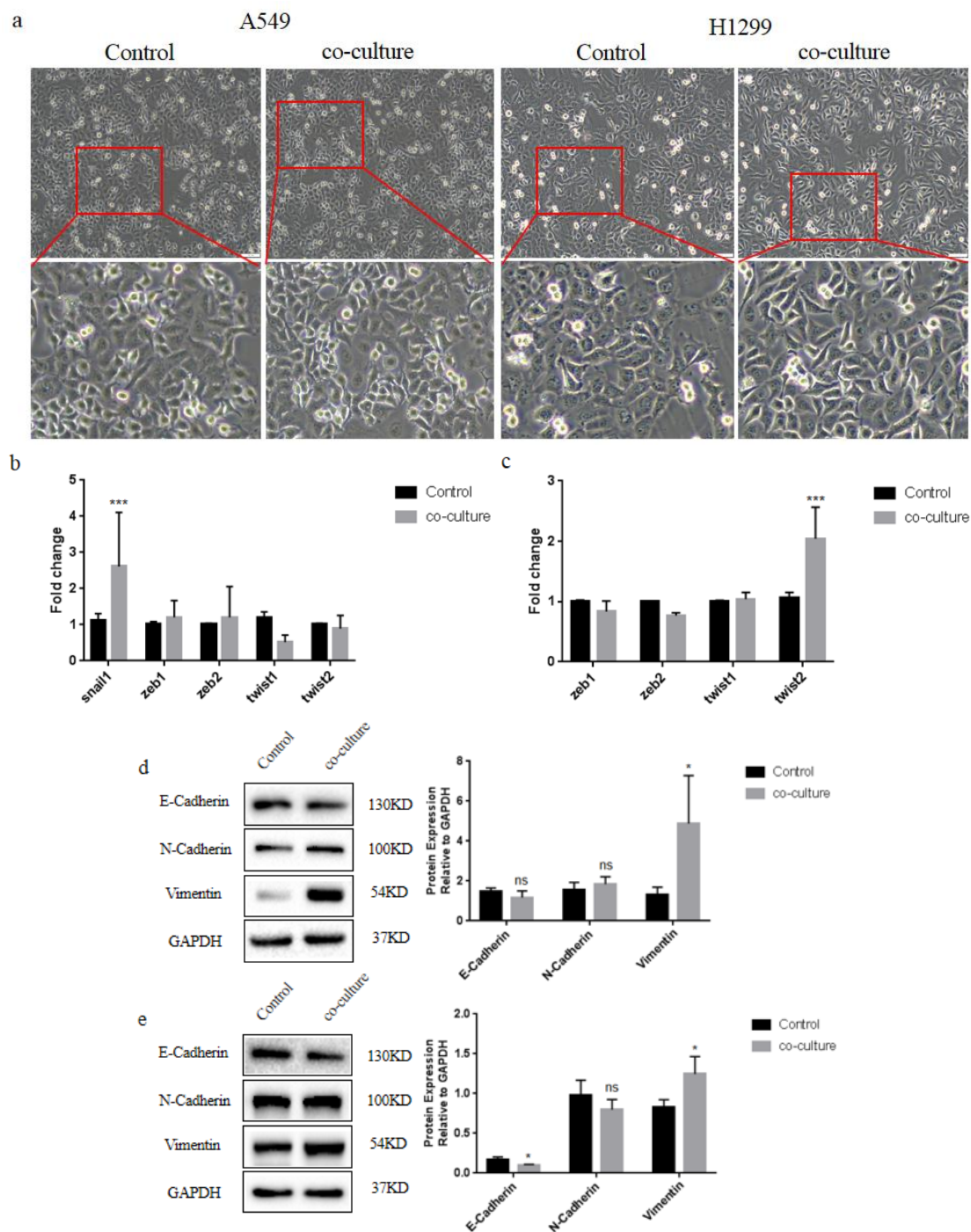


图 3-3 共培养时 hADSCs 诱导 A549 和 H1299 细胞发生 EMT
(a) A549 和 H1299 发生 EMT 变化的细胞形态学变化; (b) EMT 相关转录因子在 A549 细胞中的基因表达水平; (c) EMT 相关转录因子在 H1299 细胞中的基因表达水平; (d) EMT 标志蛋白在 A549 细胞中表达水平; (e) EMT 标志蛋白在 H1299 细胞中表达水平

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

为了进一步验证 hADSCs 对 NSCLC 细胞发生 EMT 的影响, 与 hADSCs 共培养 48h 后, 收集 A549 和 H1299 细胞的 RNA 和蛋白质, 采用 qRT-PCR 及 Western Blot 实验检测 NSCLC 细胞中发生 EMT 的变化。结果如图 3-3 (b、c、d、e) 所

示:EMT 相关转录因子 *snail1* 在 A549 细胞中的基因表达量显著增加($p \leq 0.001$); EMT 相关转录因子 *twist2* 在 H1299 细胞中的基因表达量显著增加 ($p \leq 0.001$); 上皮细胞标志蛋白 E-Cadherin 在 A549 和 H1299 细胞中的表达量都明显降低, 间质细胞标志蛋白 Vimentin 在 A549 和 H1299 细胞中的表达量都显著增加 ($p \leq 0.05$); 具有统计学意义。

综上所述, 在共培养时 hADSCs 可以诱导 A549 和 H1299 细胞发生 EMT。

3.2.2 共培养时 hADSCs 对 NSCLC 细胞迁移能力的影响

细胞迁移是建立和维持多细胞生物正常组织的基础, 参与哺乳动物组织和细胞的正常生长。一般来说, EMT 的发生通常伴随着细胞迁移能力的增强, 因此我们采用细胞划痕实验检测了共培养时 hADSCs 对 A549 和 H1299 细胞迁移能力的影响。实验分为对照组和共培养组, 运用 Image J 软件对 NSCLC 细胞的 0 h 和 24 h 划痕图片进行分析和计算。实验结果如图 3-4 所示, 相较于 Control 组, co-culture 处理组的 NSCLC 细胞迁移率显著增加 ($p < 0.01$), 具有统计学差异。

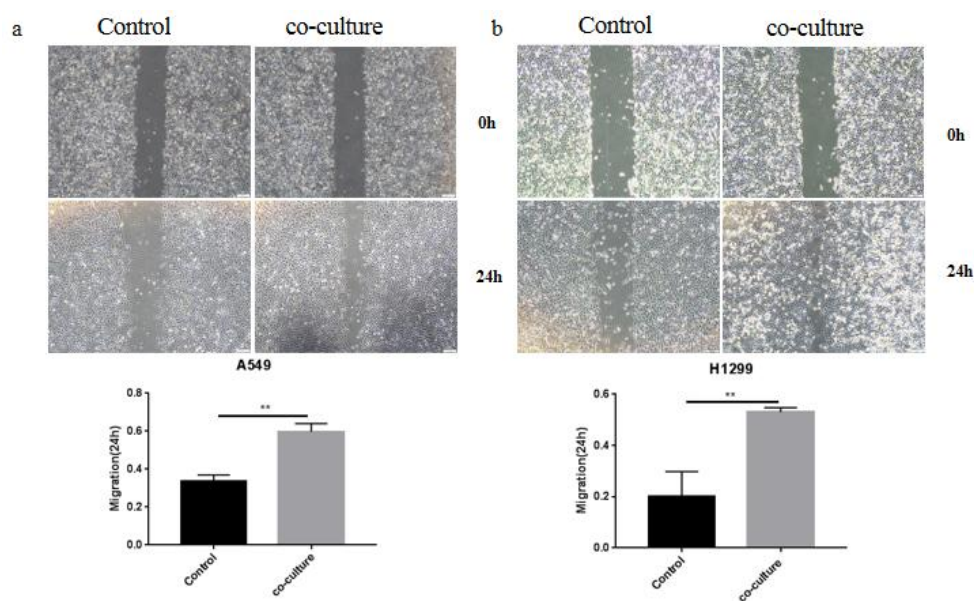


图 3-4 细胞划痕实验检测共培养时(a) A549 和(b) H1299 细胞的迁移能力
** $P < 0.01$

3.2.3 共培养时 hADSCs 对 NSCLC 细胞侵袭能力的影响

本实验中选用孔径直径为 $8.0 \mu\text{m}$ 的 Transwell 小室, 为了模仿 NSCLC 细胞在体内的侵袭能力, 在 Transwell 上室加入基质胶稀释液。再将 NSCLC 细胞接种于上室, 将 hADSCs 接种于下室进行共培养, 培养 24h 后将穿过小室的 NSCLC 细胞染色并拍照。穿过小室的细胞个数可以间接地体现共培养时 NSCLC 细胞的

侵袭能力。结果如图 3-5 所示，与 Control 组相比，co-culture 组的 NSCLC 细胞的侵袭能力显著增加 ($p < 0.01$)，具有统计学意义。

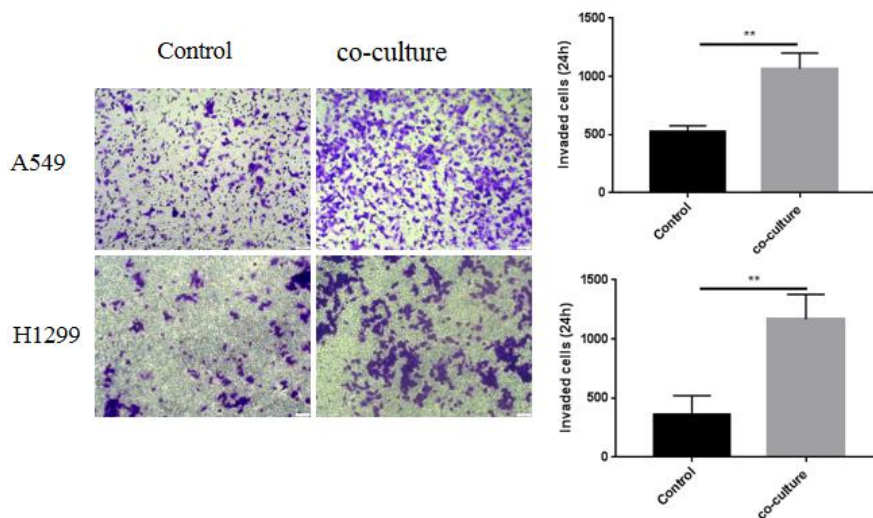


图 3-5 Transwell 实验检测共培养时 NSCLC 细胞的侵袭能力 ** $p < 0.01$

3.3 hADSCs-Exos 的分离提取及鉴定

很多研究表明，MSCs 来源的外泌体与 MSCs 具有类似的生物活性。由前面的实验结果可以得知：hADSCs 对 NSCLC 细胞的生长和转移起促进作用，为了探究 hADSCs-Exos 对 NSCLC 细胞的影响是否与 hADSCs 相同，我们通过超高速离心机差速离心的方法进行分离提取 hADSCs-Exos，将 hADSCs-Exos 收集在 200 μ l PBS 中，分离后立即使用或保存在 -80°C 条件下。经 BCA 蛋白浓度检测结果显示，hADSCs 细胞培养上清液获得 hADSCs-Exos 的浓度约为 1.50 mg/mL。对所提取的 hADSCs-Exos 分别从形态学和蛋白标志物两个方面进行鉴定。鉴定结果如图 3-6 所示：

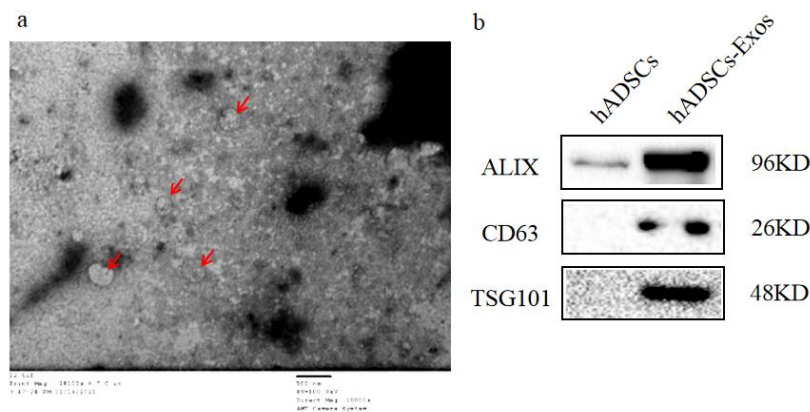


图 3-6 hADSCs-Exos 的鉴定

(a)透射电子显微镜观察 hADSCs-Exos 形态；(b) Western Blot 实验鉴定 hADSCs-Exos 标志蛋

白 ALIX、CD63 和 TSG101

透射电镜下观察结果显示：图中红色箭头标记即为 hADSCs-Exos，hADSCs-Exos 的形态是类圆形，成典型的“杯口”状结构；圆形囊泡大小主要在 30-150 nm 之间，大部分为外泌体，证明提取外泌体的方法正确。

同时，通过 Western Blot 法检测结果显示：hADSCs-Exos 标志蛋白 ALIX、CD63 和 TSG101 呈阳性；而 hADSCs 中未检测到 ALIX、CD63 和 TSG101 高度表达，表明 hADSCs-Exos 较为纯净。

3.4 hADSCs-Exos 对 NSCLC 细胞发生 EMT 的影响

为了探究 hADSCs-Exos 对 NSCLC 细胞发生 EMT 的影响，通过超速离心法从 hADSCs 培养上清液中提取出 hADSCs-Exos，鉴定成功后，依据相关参考文献^[39]，以 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 hADSCs-Exos 处理 NSCLC 细胞，采用 qRT-PCR 和 Western Blot 实验检测细胞中发生 EMT 的变化。结果如图 3-7 所示，与 Control 组相比，hADSCs-Exos 处理 A549 细胞后，上皮细胞标志蛋白 E-Cadherin 在 A549 细胞中的表达量明显降低，间质细胞标志蛋白 Vimentin 在 A549 细胞中的表达量显著增加 ($p < 0.01$)，EMT 相关转录因子 *twist1* 和 *twist2* 的基因表达量显著升高 ($p < 0.01$)，具有统计学意义。以上结果表明，hADSCs-Exos 可诱导 A549 细胞发生 EMT。验证了 hADSCs-Exos 和 hADSCs 对 NSCLC 细胞具有相同作用的假说。但此部分实验在 H1299 这种 NSCLC 细胞中未发现明显的趋势变化。

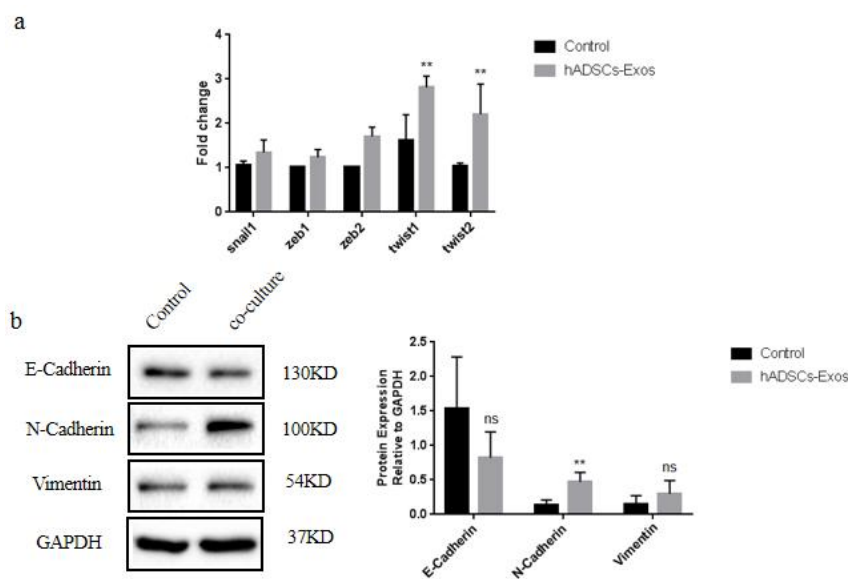


图 3-7 hADSCs-Exos 诱导 A549 细胞发生 EMT

(a) EMT 相关转录因子在 A549 细胞中的基因表达水平；(b) EMT 标志蛋白在 A549 细胞中表达水平 ** $p < 0.01$

3.5 hADSCs-Exos 被 NSCLC 细胞摄取

外泌体通过转移自身及内含物介导细胞间的通讯，因此，我们假设 hADSCs-Exos 可转运自身进入 NSCLC 细胞内或与之融合。将提取的 hADSCs-Exos 进行 DiR 荧光标记，然后将标记后 hADSCs-Exos 加入 NSCLC 细胞培养液中，与之共培养 6 h 左右避光封片，观察并拍照。观察结果如图 3-8 所示：蓝色为 DAPI 核染色，TD 为透射光成像通道，在 A549 和 H1299 细胞中都可以看到 DiR 标记的红色荧光，提示 A549 和 H1299 细胞都可以摄取 hADSCs-Exos，且 A549 细胞中 hADSCs-Exos 被标记的效率比 H1299 细胞中高。

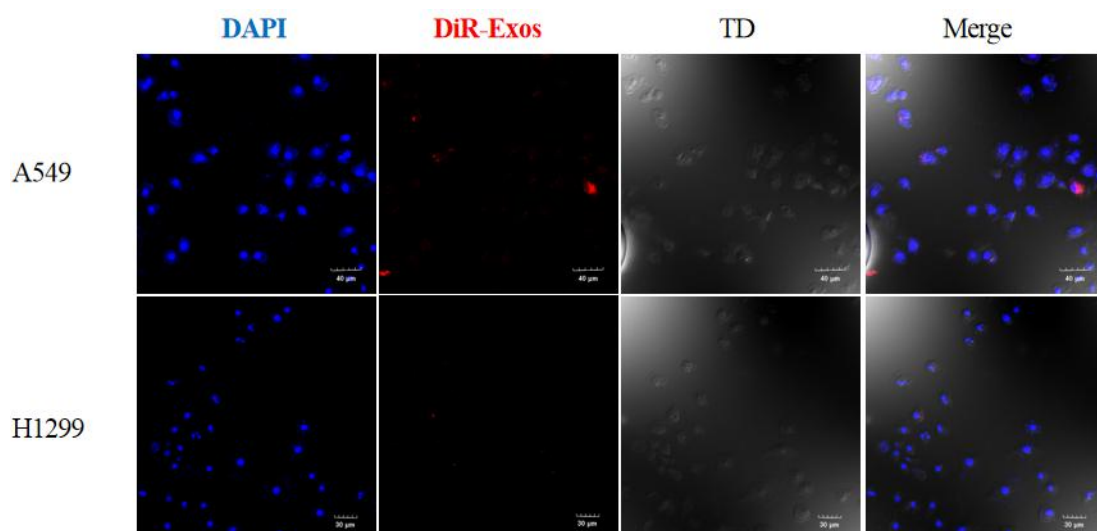


图 3-8 激光共聚焦显微镜下观察 NSCLC 细胞摄取 DiR-hADSCs-Exos

3.6 肺癌微环境对 hADSCs 分泌外泌体能力的影响

由上述实验得知：hADSCs-Exos 在肺癌微环境中可以进入 NSCLC 细胞促进其生长。我们猜想：肺癌微环境会刺激 hADSCs 分泌 hADSCs-Exos 作用于靶细胞。采用乙酰胆碱酯酶（AChE）活性检测试剂盒检测 hADSCs-Exos 的分泌水平验证肿瘤微环境对 hADSCs 分泌 hADSCs-Exos 能力的影响。按照制造商的说明，在酶标仪上读取 412 nm 处的 OD 值，按公式： $\text{AChE 酶活 (Units/mL)} = 2255 \times (\text{测定管 OD 值} - \text{对照管 OD 值})$ 计算酶活。结果如图 3-9 所示，将 A549 和 H1299 细胞分别与 hADSCs 共培养 48 h 后，与 Control 组相比，co-culture 组 hADSCs-Exos 的 AChE 活性显著增加 ($p < 0.05$)，具有统计学意义。提示在共培养条件下，NSCLC 细胞可以促进 hADSCs 分泌外泌体，肺癌微环境使 hADSCs 分泌

hADSCs-Exos 的能力增强。

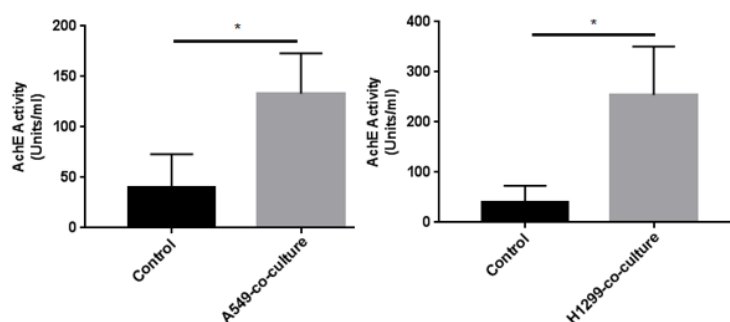


图 3-9 AchE 活性检测肺癌微环境中 hADSCs-Exos 分泌水平

* $p < 0.05$

3.7 hADSCs-Exos 通过 CXCL12/CXCR4 信号轴影响 NSCLC 细胞转移

3.7.1 hADSCs-Exos 对 CXCL12/CXCR4 信号轴的影响

CXCR4 广泛表达于各种细胞中, 包括免疫细胞、间充质干细胞和肿瘤细胞等。CXCL12 是一种可以由 MSCs 分泌的小的促炎性趋化因子。有研究表明 CXCL12/CXCR4 信号轴可能参与了肺癌侵袭转移的过程, 但是其具体机制还不清楚。

本研究假设 hADSCs-Exos 可能通过 CXCL12/CXCR4 信号轴来实现 NSCLC 细胞转移能力的改变。为验证这一假说, 在此, 我们假设 hADSCs-Exos 可以上调 NSCLC 细胞中 CXCR4 的表达激活 CXCL12/CXCR4 信号轴进而促进肿瘤的发生发展。为了探究 hADSCs-Exos 在 NSCLC 细胞中发挥作用的可能机制, qRT-PCR 实验检测了 hADSCs-Exos 处理 48 h 后 A549 和 H1299 细胞中 CXCR4 的基因表达水平。实验结果如图 3-10 所示, 与 Control 组相比, 用浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 hADSCs-Exos 处理 A549 和 H1299 细胞 48h 后, CXCR4 的基因表达量显著升高 ($p < 0.01$; $p < 0.001$)。将 hADSCs 与 A549 和 H1299 细胞分别共培养 48h 后, hADSCs 中 CXCL12 的基因表达量也显著上升 (图 3-11), 具有统计学意义 ($p < 0.01$; $p < 0.05$)。综上所述, hADSCs-Exos 可以上调 NSCLC 细胞中 CXCR4 的表达, NSCLC 细胞可以增强 hADSCs 中趋化因子 CXCL12 的表达, 这种环境为 CXCL12/CXCR4 信号轴的激活提供基本条件。

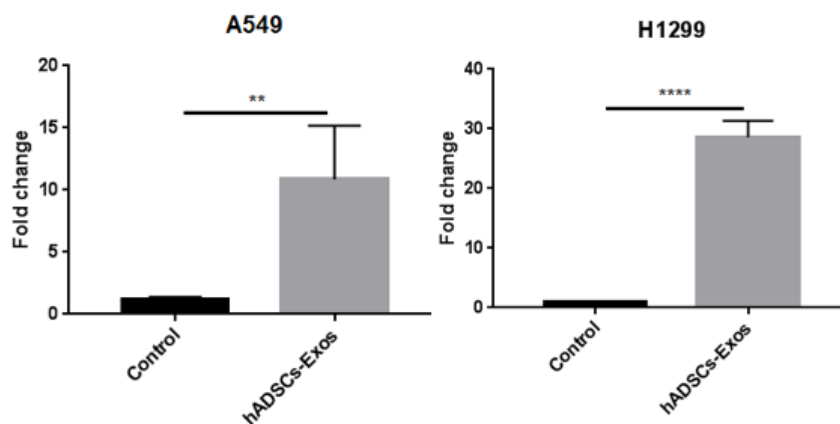


图 3-10 CXCR4 在 NSCLC 细胞中的基因表达水平

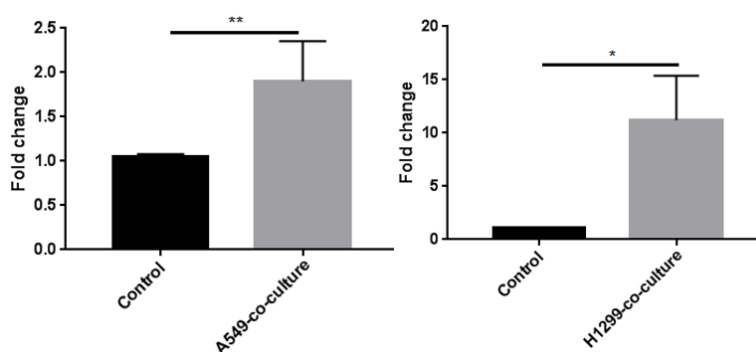
** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 

图 3-11 CXCL12 在 hADSCs 中的基因表达水平

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.7.2 hADSCs-Exos 通过 CXCL12/CXCR4 信号轴增强 NSCLC 细胞细胞活力

为了研究 hADSCs-Exos 是否通过 CXCL12/CXCR4 信号轴影响 NSCLC 细胞的细胞活力，我们将 NSCLC 细胞分为 DMSO 组、hADSCs-Exos 组、hADSCs-Exos+AMD3100 组和 AMD3100 组，MTT 实验检测细胞的活力。结果如图 3-12 所示，与 DMSO 组相比，hADSCs-Exos 可以明显地增强 NSCLC 细胞的细胞活力 ($p < 0.001$; $p < 0.05$)，然而加入 CXCR4 的抑制剂 AMD3100 后，这种活力增加的效应被明显地抵消 ($p < 0.05$; $p < 0.01$)，具有统计学意义。上述结果表明，hADSCs-Exos 可以增强 NSCLC 细胞的细胞活力，而用 AMD3100 阻断 CXCL12/CXCR4 信号轴后，发现由 hADSCs-Exos 诱导的 NSCLC 细胞的活力增加的效应被明显抑制。综上所述，我们认为 hADSCs-Exos 可以通过调节

CXCL12/CXCR4 信号轴在一定程度上影响 NSCLC 细胞的活力。

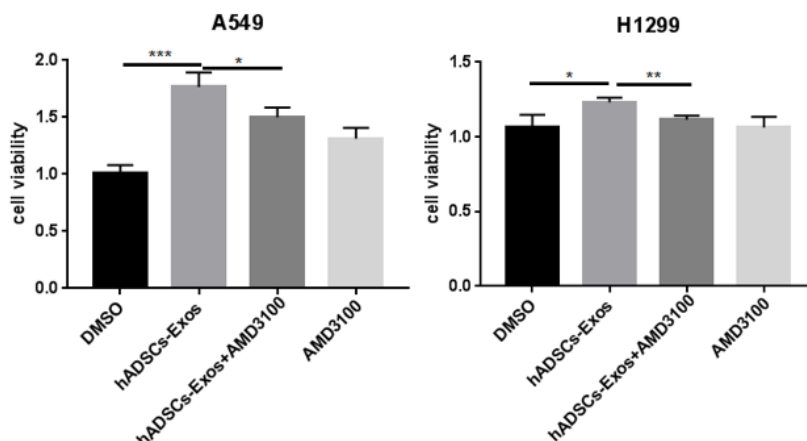


图 3-12 MTT 实验检测 NSCLC 细胞的活力

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.7.3 hADSCs-Exos 通过 CXCL12/CXCR4 信号轴增强 NSCLC 细胞迁移能力

为了研究 hADSCs-Exos 是否通过 CXCL12/CXCR4 信号轴影响 NSCLC 细胞的迁移能力，我们将 NSCLC 细胞分为 DMSO 组、hADSCs-Exos 组、hADSCs-Exos+AMD3100 组和 AMD3100 组，细胞划痕实验检测 NSCLC 细胞的迁移能力。结果如图 3-13 所示，与 DMSO 组相比，hADSCs-Exos 可以明显地增强肺癌细胞的迁移能力($p < 0.01$; $p < 0.05$)，然而加入 CXCR4 的抑制剂 AMD3100 后这种促迁移的效应被明显地抵消 ($p < 0.001$; $p < 0.05$)，具有统计学意义。上述结果表明，hADSCs-Exos 可以增加 NSCLC 细胞的迁移能力，而用 AMD3100 阻断 CXCL12/CXCR4 信号轴后，发现由 hADSCs-Exos 诱导的 NSCLC 细胞迁移能力增加的效应被明显抑制。综上所述，我们认为 hADSCs-Exos 可以通过调节 CXCL12/CXCR4 信号轴在一定程度上影响 NSCLC 细胞的迁移能力。

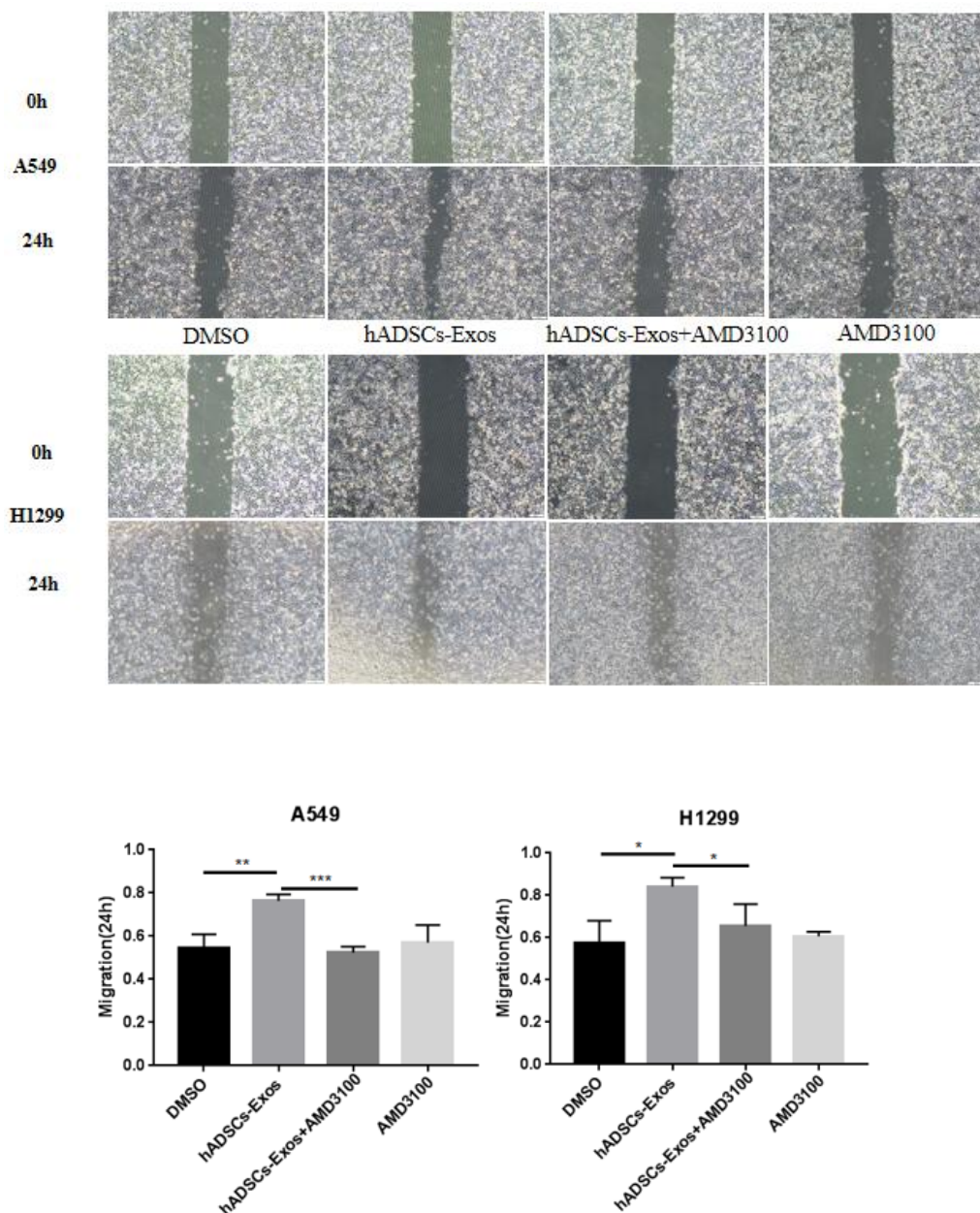


图 3-13 细胞划痕实验检测 NSCLC 细胞的迁移能力

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.7.4 hADSCs-Exos 通过 CXCL12/CXCR4 信号轴增强 NSCLC 细胞侵袭能力

为了研究 hADSCs-Exos 是否通过 CXCL12/CXCR4 信号轴影响 NSCLC 细胞的侵袭能力，我们将 NSCLC 细胞分为 DMSO 组、hADSCs-Exos 组、hADSCs-Exos+AMD3100 组和 AMD3100 组，Transwell 实验检测 NSCLC 细胞的侵袭能力。结果如图 3-14 所示，与 DMSO 组相比，hADSCs-Exos 可以诱导更多

的 NSCLC 细胞侵袭到下室 ($p < 0.05$; $p < 0.01$)，然而加入 CXCR4 的抑制剂 AMD3100 后这种促侵袭的效应被明显地抵消 ($p < 0.01$; $p < 0.05$)，具有统计学意义。上述结果表明，hADSCs-Exos 可以增加 NSCLC 细胞的侵袭能力，而用 AMD3100 阻断 CXCL12/CXCR4 信号轴后，由 hADSCs-Exos 诱导的 NSCLC 细胞侵袭能力增加的效应被明显抑制。综上所述，我们认为 hADSCs-Exos 可以通过调节 CXCL12/CXCR4 信号轴在一定程度上影响 NSCLC 细胞的侵袭能力。

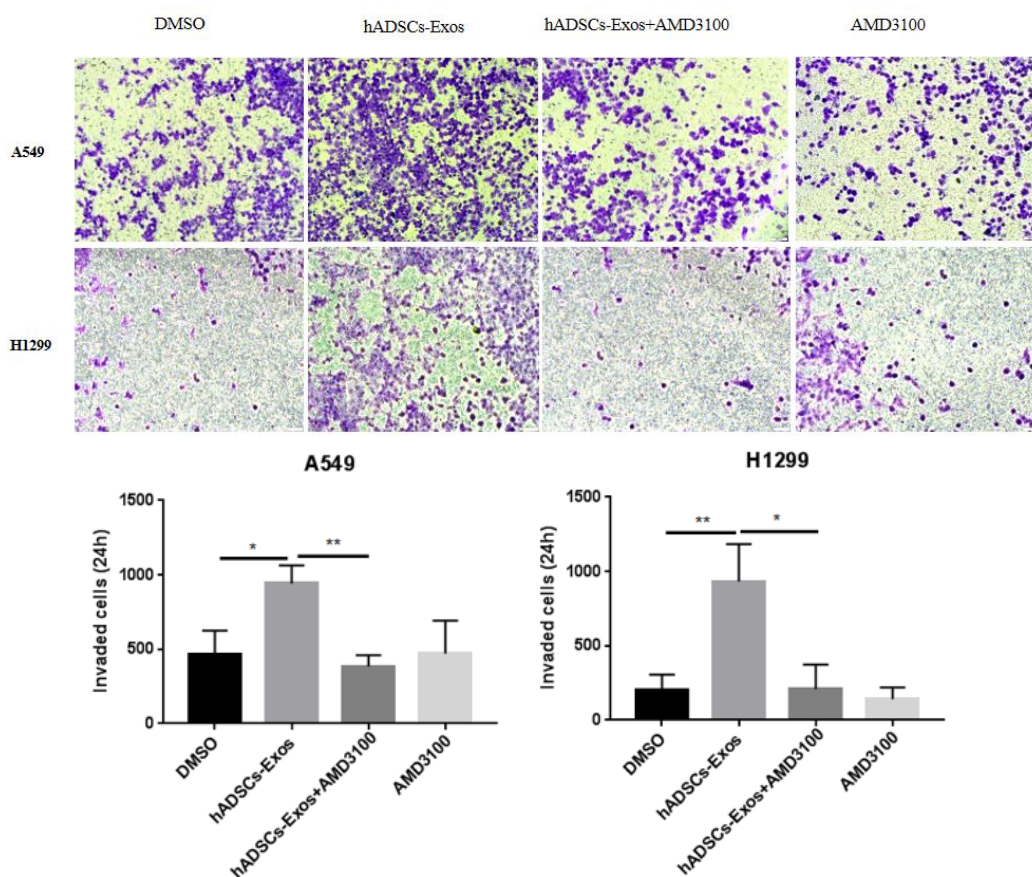


图 3-14 Transwell 实验检测 NSCLC 细胞的迁移能力

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.8 A549 细胞中 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白检测

AMPK 和 mTOR 是哺乳动物组织细胞中重要的能量敏感蛋白，在维持细胞稳态平衡中起着重要的调节作用。许多研究表明，在多种癌症疾病中 AMPK/mTOR 信号通路可以影响癌细胞的增殖、迁移、侵袭、调亡和自噬等。

因此，为了探究 hADSCs-Exos 在 A549 细胞中发挥作用的潜在机制，我们假设 hADSCs-Exos 可以通过 CXCL12/CXCR4 信号轴调节 AMPK/mTOR 信号通

路蛋白的表达进而影响 A549 细胞的生存和增殖。我们将 A549 细胞分为 DMSO 组、hADSCs-Exos 组、hADSCs-Exos+AMD3100 组和 AMD3100 组，采用 Western Blot 实验检测 A549 细胞中 AMPK/mTOR 信号通路蛋白的表达情况。结果如图 3-15 所示，在 A549 细胞中随着 CXCR4 表达水平的改变，AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白的表达情况随之改变。相较于 DMSO 组，hADSCs-Exos 组 p-AMPK α 表达减少，具有统计学差异 ($p < 0.01$)；而加入 CXCR4 抑制剂 AMD3100 后，hADSCs-Exos+AMD3100 组 p-AMPK α 表达有增加的趋势，未磷酸化的 AMPK α 蛋白表达量无明显趋势变化。相较于 DMSO 组，hADSCs-Exos 组 p-mTOR 表达增加，具有统计学差异 ($p < 0.01$)；而加入 CXCR4 抑制剂 AMD3100 后，hADSCs-Exos+AMD3100 组 p-mTOR 表达减少，具有统计学差异 ($p < 0.05$)，未磷酸化的 mTOR 蛋白表达量无明显趋势变化。综上所述，在 A549 细胞中，hADSCs-Exos 可以通过 CXCL12/CXCR4 信号轴调节 AMPK/mTOR 信号通路蛋白的表达情况进而影响 A549 细胞的生存和增殖。但此部分信号通路实验在 H1299 这种 NSCLC 细胞中未发现明显的趋势变化，我们猜想在 H1299 细胞中 hADSCs-Exos 可能通过其他信号通路影响细胞的生存、增殖和转移。

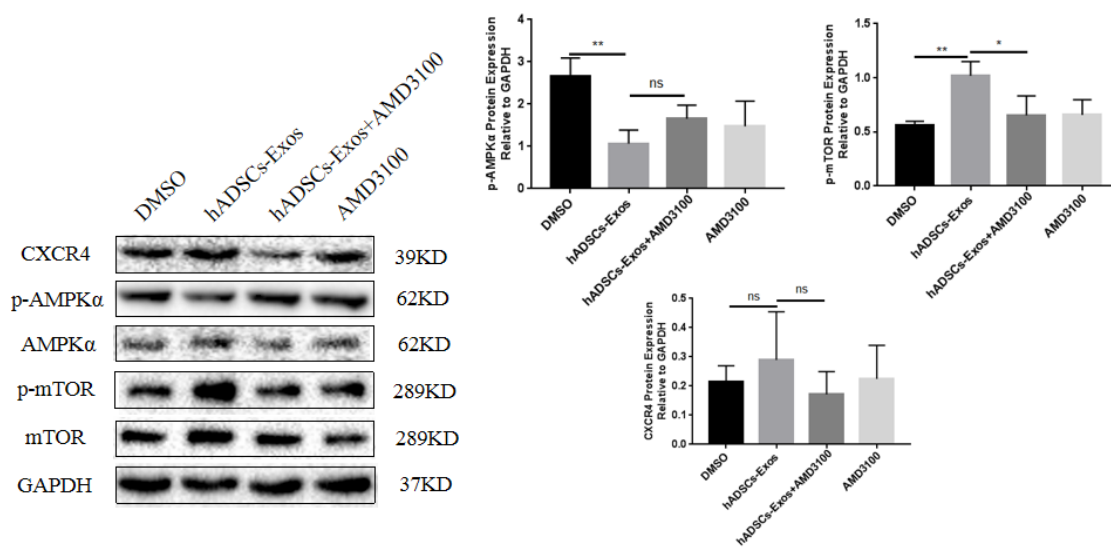


图 3-15 Western Blot 实验检测 AMPK/mTOR 信号通路蛋白表达情况

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.9 讨论

MSCs 是一类是能够自我更新和多向分化的成体多功能干细胞。MSCs 因其诸多优势已成为临床应用中最常用的干细胞类型。MSCs 可以分化为各种细胞类

型并且具备体外扩增的能力,已引起人们对其应用在治疗人类疾病领域中的兴趣。很多研究表明在心血管疾病、组织修复和炎症等领域 MSCs 已经展现出良好的治疗效果。MSCs 也可以分化为多种细胞或分泌细胞囊泡和生长因子在微环境中起作用,与肿瘤的发生发展密切相关。MSCs 也可以分泌促炎因子等生长因子促进癌细胞的生长和迁移进而影响肿瘤的进程。肺癌的发病率和死亡率长时间位居世界第一名,越来越多的研究表明,肺癌微环境和肺癌转移是影响肺癌进程的关键。MSCs 可以广泛分布于机体全身,在肺癌微环境中各种类型 MSCs 协调肺癌细胞的生长, MSCs 通过旁分泌等作用影响肺癌微环境的变化进而协调肺癌细胞向全身组织转移。了解 MSCs 在肺癌转移中的分子机制,有助于探索 MSCs 在肿瘤微环境中的具体作用,确定 MSCs 干预肿瘤生长的靶点,为 MSCs 应用于其他疾病之前提供预测 MSCs 致癌性的功能,对 MSCs 的临床研究具有重要意义。

EMT 和肿瘤干细胞样细胞是促进癌细胞转移的主要因素,是肺癌转移的主要分子机制之一^[68]。EMT 在胚胎形态发生、创伤愈合和肿瘤转移中起重要作用^[69, 70]。在胚胎发育的 EMT 过程中,上皮细胞失去了上皮起源的所有痕迹,获得了完全间质表型,称为完全上皮间质转化,其典型特征是钙粘蛋白开关。在癌症进展的 EMT 过程中,癌细胞失去了分化的上皮特征,其侵袭性增强,产生越来越多的肿瘤细胞和癌症干细胞,并促进对抗癌药物的耐药性。这些表型变化是由细胞外基质成分、外泌体和可溶性因子调控的,这些因子调控几种被称为 EMT 转录因子的转录因子。在这一过程中,癌细胞使血管生成并建造利于转移的炎性环境,存活并最终到达遥远的次级部位,包括骨骼、乳腺、肝脏和大脑^[71]。检查 hADSCs 对 NSCLC 细胞发生 EMT 的作用可以直观的了解肺癌微环境中 hADSCs 对肺癌转移的影响。因此,本课题利用细胞共培养小室将 hADSCs 分别与 A549 和 H1299 细胞共培养模拟体内肺癌微环境,在光学显微镜下观察到 A549 和 H1299 细胞都发生了 EMT 的典型形态学变化,而且在分子水平上也发现 hADSCs 在肺癌微环境中可以促进 NSCLC 细胞发生 EMT 现象;同时在肺癌微环境中 hADSCs 也可以增强 A549 和 H1299 细胞的迁移能力和侵袭能力。本实验初步的结论表明在肺癌微环境中的 hADSCs 促进 NSCLC 细胞转移,在肺癌患者或肺癌患病高风险人群中,使用 hADSCs 进行治疗相关再生疾病具有高风险,是

不可靠的。

许多研究表明, MSCs 能够分泌大量的 MSCs-Exos 在肿瘤微环境中起到一定的作用。对比 MSCs 应用和 MSCs-Exos 应用, 有相似的效果。在开展外泌体相关研究时, 可通过超速离心等方法分离提取各种细胞或体液产生的外泌体。MSCs-Exos 作为具有活性的细胞外囊泡, 能够实现靶细胞与 MSCs 之间相互交流的作用。为了验证实验开始前我们做的假设: hADSCs 与 hADSCs-Exos 对 NSCLC 的作用是相同的, 接着我们采用超速离心法分离提取 hADSCs-Exos, 应用透射电子显微镜和 Western Blot 实验对 hADSCs-Exos 进行形态学鉴定和表面标志物鉴定。用 hADSCs-Exos 处理 A549 和 H1299 细胞 48 h 后, 发现 hADSCs-Exos 在分子水平上可以促进 A549 细胞发生 EMT 现象, 但在 H1299 细胞中未检测到这种结果, 我们猜测 hADSCs-Exos 以其他方式促进 H1299 细胞的生长和转移; hADSCs-Exos 的荧光标记摄取实验表示, 在 H1299 细胞中 hADSCs-Exos 的标记效率较低, 可能导致了 hADSCs-Exos 在分子水平上未对 H1299 细胞的 EMT 现象造成影响的原因。此外, 部分 EMT 相关转录因子在 A549 细胞中的表达模式对共培养和 hADSCs-Exos 两种处理方式显示出的不同反应, 我们分析后理解为: 在不同的培养条件下, A549 细胞中的 EMT 相关信号通路互相影响导致了转录因子的不同表达模式, 但不变的是, 两种处理方式的结果都是促进 EMT 现象的发生。同时, hADSCs-Exos 也可以增强 A549 和 H1299 细胞的迁移能力和侵袭能力。因此, 我们认为 hADSCs 和 hADSCs-Exos 对 NSCLC 细胞的转移起到相同的促进作用, 这是一个促癌发生的过程, 验证了我们的假说。

在肺癌微环境中, 趋化因子在促进和指导细胞迁移方面发挥着重要作用, 但它们也调控着多种不同的体内平衡过程, 如形态形成、新生血管形成、血管生成和适应性免疫应答中的组织形成。近年来, 有多项研究对实体肿瘤中 CXCR4 和 CXCL12 的表达进行了检测。在趋化因子受体中, CXCR4 是一种特异性于 CXCL12 的趋化因子受体之一, CXCR4 是细胞表面 7 层跨膜 G 蛋白偶联的受体之一, 在包括肺癌在内的 20 多种人类肿瘤中过表达^[72-74], CXCL12 表现出广泛的组织表达, 包括大脑、胸腺、心脏、肺、肝脏、肾脏、脾脏和骨髓。CXCR4 可以被认为是一个节点, 它将一系列配体和受体相互作用的输入信号整合并转导到一个具有反应性和发散性的细胞内信号通路网络, 影响多种细胞生物过程, 如

增殖、迁移和应激抵抗等^[75, 76]。CXCL12/CXCR4 信号轴的失调和随之而来的基本细胞过程与疾病相关，CXCL12/CXCR4 信号轴调控多种生物过程，如血管生成和免疫应答等，提示 CXCL12/CXCR4 信号轴可能在癌细胞向特定器官的转移过程中发挥作用^[77-79]。因此，癌细胞中 CXCR4 的高表达可能会增加其转移能力，并预示其较差的生存期，但其具体机制还不清楚。MSCs 分泌的趋化因子可以分泌到肺癌微环境及周围，所以我们就 CXCL12/CXCR4 信号轴在肺癌微环境中的表达及其参与的生物学功能展开研究。

接下来我们为了研究 hADSCs-Exos 在肺癌微环境中是否可以提供趋化 CXCL12/CXCR4 信号轴的条件来实现 NSCLC 细胞转移能力的改变。首先采用 qRT-PCR 实验检测 hADSCs-Exos 处理 NSCLC 细胞后 A549 和 H1299 细胞表达趋化因子受体 CXCR4 能力的变化，结果表明，A549 和 H1299 细胞的 CXCR4 基因表达量明显增加。而且，应用 qRT-PCR 实验也检测到了与 NSCLC 细胞共培养时 hADSCs 中的趋化因子 CXCL12 的基因表达量也明显增加。此外，我们采用 AchE 酶活检测肺癌微环境对 hADSCs 分泌 hADSCs-Exos 的影响，结果显示，在与 NSCLC 细胞共培养时，hADSCs 分泌 hADSCs-Exos 的能力明显增强。hADSCs-Exos 也可以增强 NSCLC 细胞的转移能力，然而加入 CXCR4 的抑制剂 AMD3100 后这种促转移能力的效应被抵消。综上所述，我们得到结论：hADSCs-Exos 可以通过 CXCL12/CXCR4 信号轴来实现 NSCLC 细胞转移能力的改变，且在肺癌微环境中 hADSCs 分泌外泌体的能力增加。验证了我们的假设：hADSCs-Exos 可以通过上调 NSCLC 细胞中 CXCR4 的表达影响 CXCL12/CXCR4 信号轴进而促进 NSCLC 细胞的转移。不足的是，此部分实验中我们在分别处理各组 NSCLC 细胞时，向培养液中加入了 100 ng/ml 的 CXCL12 来提供激活 CXCL12/CXCR4 信号轴的前提条件，但是由于我们还没严格掌握分析外泌体中物质的具体手段，CXCL12 是否存在于 hADSCs-Exos 中暂时还不清楚，此部分研究尚需进一步的探索。

AMPK 和 mTOR 是哺乳动物组织细胞中重要的能量敏感蛋白。AMP 活化蛋白激酶（AMPK）在维持细胞代谢平衡中起着重要的调节作用。就像移动电子设备一样，每个活细胞都包含一个由成对的可转换化学物质组成的“可

充电电池”，即细胞内的关键化学物质 ATP 和 ADP。AMPK 的激活会增加 ATP 生成并降低 ATP 利用的速率，AMPK 作为细胞能量传感器和信号转换器，受广泛的代谢应激调节^[80]。哺乳动物雷帕霉素靶点（mTOR）是 AMPK 的下游靶蛋白之一，mTOR 受多种信号调控，如生长因子、氨基酸和细胞能量，并调节包括翻译、转录和自噬在内的许多必要细胞过程。这两条通路作为调节细胞代谢、能量稳态和细胞生长的信号通路，每条通路的失调都可能导致代谢紊乱，如肥胖、2 型糖尿病和癌症。最近的研究表明 mTOR 和 AMPK 信号通路之间可能存在相互作用。Han 等人发现 AMPK/mTOR 途径在子宫内膜癌中促进细胞增殖起到了关键的作用^[81]。Wen 等人发现二甲双胍和阿司匹林联合应用可以显著抑制 mTOR 和 STAT3 的磷酸化，并通过 caspase-3 和 PARP 切割检测诱导细胞凋亡，从而抑制胰腺癌细胞 PANC-1 和 BxPC-3 细胞的细胞迁移和集落形成^[82]；Xu 等人发现在人甲状腺癌细胞系 TPC1 中 TMP21 蛋白的沉默可以通过调节 AMPK/mTOR 通路相关蛋白的表达诱导自噬来抑制肿瘤生长^[83]。但在肺癌中 AMPK/mTOR 信号通路的研究还相对较少。

为了探究 CXCL12/CXCR4 信号轴在 A549 细胞中发挥作用的潜在机制，我们采用 Western Blot 实验检测 hADSCs-Exos 在 A549 细胞中能否通过 CXCL12/CXCR4 信号轴调节 AMPK/mTOR 信号通路。结果显示，hADSCs-Exos 可以抑制 AMPK 的磷酸化，并激活 mTOR 的磷酸化进而激活 mTOR 信号通路促进细胞转移。然而加入 CXCR4 抑制剂 AMD3100 后，以上效应被逆转，提示 CXCL12/CXCR4 信号轴可能是 AMPK/mTOR 信号通路的上游信号，hADSCs-Exos 可以通过 CXCL12/CXCR4 信号轴参与 AMPK/mTOR 信号通路以促进 NSCLC 细胞转移。不足的是：hADSCs-Exos 可以显著增加 A549 细胞中 CXCR4 基因的表达，但 hADSCs-Exos 没有明显地增强 A549 细胞中 CXCR4 蛋白的表达；而且由于 AMD3100 的抑制效果，CXCR4 的表达也没有明显的降低，此部分研究尚需进一步的深刻探究。

本研究发现 hADSCs-Exos 和 hADSCs 同样具有促进 NSCLC 生长和转移的作用，hADSCs-Exos 可以被 NSCLC 细胞摄取进而通过 CXCL12/CXCR4 信号轴调节 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白的表达，最终影响 NSCLC 细胞的生长和

转移。经过我们的体外验证，CXCL12/CXCR4 信号轴和 AMPK/mTOR 信号通路在 hADSCs-Exos 促进 NSCLC 细胞转移进程中起关键作用。本研究为深入理解 hADSCs-Exos 与 NSCLC 及微环境之间的相互关系提供了新的思路和理论依据，并为研究人员提供指导论据。在将 MSCs 应用于临床之前，检查 MSCs 是否具有潜在的致癌性和致病性至关重要。

第四章 结论

1. hADSCs 和 hADSCs-Exos 都可以促进 NSCLC 细胞发生 EMT, hADSCs-Exos 可以增加 NSCLC 细胞中 CXCR4 的表达, 肺癌微环境可以增加 hADSCs 中 CXCL12 的表达。
2. hADSCs-Exos 可以通过 CXCL12/CXCR4 信号轴增强 NSCLC 细胞的活力、迁移能力和侵袭能力。
3. 在 A549 细胞中, hADSCs-Exos 可以通过 CXCL12/CXCR4 信号轴调节 AMPK/mTOR 信号通路参与细胞的生长与转移。

参考文献

- [1] Crisan M, Corselli M, Chen W C, et al. Perivascular cells for regenerative medicine [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2012, 16(12): 2851-60.
- [2] James A W, Zara J N, Corselli M, et al. An abundant perivascular source of stem cells for bone tissue engineering [J]. Stem cells translational medicine, 2012, 1(9): 673-84.
- [3] Bunnell B A, Flaat M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation [J]. Methods (San Diego, Calif), 2008, 45(2): 115-20.
- [4] Liu J, Yu F, Sun Y, et al. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2015, 33(3): 627-38.
- [5] Liao L L, Ruszymah B H I, Ng M H, et al. Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells [J]. Current research in translational medicine, 2020, 68(1): 5-16.
- [6] Wong S P, Rowley J E, Redpath A N, et al. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair [J]. Pharmacology & therapeutics, 2015, 151: 107-20.
- [7] Casado-D íz A, Quesada-G ómez J M, Dorado G. Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing [J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2020, 8: 146.
- [8] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-7.
- [9] Tsai K S, Yang S H, Lei Y P, et al. Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice [J]. Gastroenterology, 2011, 141(3): 1046-56.
- [10] Cuiffo B G, Campagne A, Bell G W, et al. MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer metastasis [J]. Cell stem cell, 2014, 15(6): 762-74.

- [11] Chang A I, Schwertschko A H, Nolta J A, et al. Involvement of mesenchymal stem cells in cancer progression and metastases [J]. *Current cancer drug targets*, 2015, 15(2): 88-98.
- [12] Karnoub A E, Dash A B, Vo A P, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2007, 449(7162): 557-63.
- [13] Spaeth E L, Dembinski J L, Sasser A K, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression [J]. *PloS one*, 2009, 4(4): e4992.
- [14] Hou L, Wang X, Zhou Y, et al. Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells on liver cancer cells [J]. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2014, 35(2): 1239-50.
- [15] Chen Q, Cheng P, Song N, et al. Antitumor activity of placenta-derived mesenchymal stem cells producing pigment epithelium-derived factor in a mouse melanoma model [J]. *Oncology letters*, 2012, 4(3): 413-8.
- [16] Tang X J, Lu J T, Tu H J, et al. TRAIL-engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells: TRAIL expression and cytotoxic effects on C6 glioma cells [J]. *Anticancer research*, 2014, 34(2): 729-34.
- [17] Shen C J, Chan T F, Chen C C, et al. Human umbilical cord matrix-derived stem cells expressing interferon- β gene inhibit breast cancer cells via apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34172-9.
- [18] Sousa B R, Parreira R C, Fonseca E A, et al. Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications [J]. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2014, 85(1): 43-77.
- [19] Kunze K N, Burnett R A, Wright-Chisem J, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Treatments and Available Formulations [J]. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 2020, 13(3): 264-80.

- [20] Dai R, Wang Z, Samanipour R, et al. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications [J]. Stem cells international, 2016, 2016: 6737345.
- [21] Li X, Zheng W, Bai H, et al. Intravenous administration of adipose tissue-derived stem cells enhances nerve healing and promotes BDNF expression via the TrkB signaling in a rat stroke model [J]. Neuropsychiatric disease and treatment, 2016, 12: 1287-93.
- [22] Kingham P J, Kolar M K, Novikova L N, et al. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair [J]. Stem cells and development, 2014, 23(7): 741-54.
- [23] Muangsant P, Shipley R J, Phillips J B. Vascularization Strategies for Peripheral Nerve Tissue Engineering [J]. Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007), 2018, 301(10): 1657-67.
- [24] Chi K, Fu R H, Huang Y C, et al. Adipose-derived Stem Cells Stimulated with n-Butylidenephthalide Exhibit Therapeutic Effects in a Mouse Model of Parkinson's Disease [J]. Cell transplantation, 2018, 27(3): 456-70.
- [25] Colpo G D, Furr Stimming E, Teixeira A L. Stem cells in animal models of Huntington disease: A systematic review [J]. Molecular and cellular neurosciences, 2019, 95: 43-50.
- [26] Wang Y, Xu J, Chang L, et al. Relative contributions of adipose-resident CD146(+) pericytes and CD34(+) adventitial progenitor cells in bone tissue engineering [J]. NPJ Regenerative medicine, 2019, 4: 1.
- [27] Spasovski D, Spasovski V, Bašćarević Z, et al. Intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis [J]. The journal of gene medicine, 2018, 20(1).
- [28] Omar A M, Meleis A E, Arfa S A, et al. Comparative Study of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow on Acute Myocardial Infarction Model [J]. Oman medical journal, 2019, 34(6): 534-43.
- [29] Bobi J, Solanes N, Fernández-Jiménez R, et al. Intracoronary Administration of Allogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial

- Perfusion But Not Left Ventricle Function, in a Translational Model of Acute Myocardial Infarction [J]. Journal of the American Heart Association, 2017, 6(5).
- [30] Joo H J, Kim J H, Hong S J. Adipose Tissue-Derived Stem Cells for Myocardial Regeneration [J]. Korean circulation journal, 2017, 47(2): 151-9.
- [31] Liang H, Ding X, Yu Y, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate acute liver injury in rat model of CLP induced-sepsis via sTNFR1 [J]. Experimental cell research, 2019, 383(1): 111465.
- [32] Jiao Z, Ma Y, Liu X, et al. Adipose-Derived Stem Cell Transplantation Attenuates Inflammation and Promotes Liver Regeneration after Ischemia-Reperfusion and Hemihepatectomy in Swine [J]. Stem cells international, 2019, 2019: 2489584.
- [33] Yan Y, Fang J, Wen X, et al. Therapeutic applications of adipose-derived mesenchymal stem cells on acute liver injury in canines [J]. Research in veterinary science, 2019, 126: 233-9.
- [34] Hao T, Chen J, Zhi S, et al. Comparison of bone marrow-vs. adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for attenuating liver fibrosis [J]. Experimental and therapeutic medicine, 2017, 14(6): 5956-64.
- [35] Kokai L E, Marra K, Rubin J P. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration [J]. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine, 2014, 163(4): 399-408.
- [36] Combella E J, Jessop Z M, Naderi N, et al. Adipose regeneration and implications for breast reconstruction: update and the future [J]. Gland surgery, 2016, 5(2): 227-41.
- [37] Eirin A, Zhu X Y, Puranik A S, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation [J]. Kidney international, 2017, 92(1): 114-24.
- [38] Qi Y, Ma J, Li S, et al. Applicability of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with type 2 diabetes [J]. Stem cell research & therapy, 2019, 10(1): 274.

- [39] Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mensenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts [J]. Scientific reports, 2016, 6: 32993.
- [40] Gurunathan S, Kang M H, Jeyaraj M, et al. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes [J]. Cells, 2019, 8(4).
- [41] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. The Journal of cell biology, 2013, 200(4): 373-83.
- [42] Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication [J]. Current opinion in cell biology, 2009, 21(4): 575-81.
- [43] Simpson R J, Jensen S S, Lim J W. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives [J]. Proteomics, 2008, 8(19): 4083-99.
- [44] Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine [J]. Biomarkers in medicine, 2013, 7(5): 769-78.
- [45] Guiot J, Struman I, Louis E, et al. Exosomal miRNAs in Lung Diseases: From Biologic Function to Therapeutic Targets [J]. Journal of clinical medicine, 2019, 8(9).
- [46] Console L, Scalise M, Indiveri C. Exosomes in inflammation and role as biomarkers [J]. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2019, 488: 165-71.
- [47] Jaquenod De Giusti C, Santalla M, Das S. Exosomal non-coding RNAs (Exo-ncRNAs) in cardiovascular health [J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2019, 137: 143-51.
- [48] Vu L T, Peng B, Zhang D X, et al. Tumor-secreted extracellular vesicles promote the activation of cancer-associated fibroblasts via the transfer of microRNA-125b [J]. Journal of extracellular vesicles, 2019, 8(1): 1599680.
- [49] Stahl P D, Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis [J]. Physiology (Bethesda, Md), 2019, 34(3): 169-77.
- [50] Quesenberry P J, Goldberg L R, Aliotta J M, et al. Cellular phenotype and extracellular vesicles: basic and clinical considerations [J]. Stem cells and development, 2014, 23(13): 1429-36.

- [51] Cagle P T, Allen T C, Dacic S, et al. Revolution in lung cancer: new challenges for the surgical pathologist [J]. Archives of pathology & laboratory medicine, 2011, 135(1): 110-6.
- [52] Perlikos F, Harrington K J, Syrigos K N. Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: a comprehensive review [J]. Critical reviews in oncology/hematology, 2013, 87(1): 1-11.
- [53] Nguyen D X, Bos P D, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization [J]. Nature reviews Cancer, 2009, 9(4): 274-84.
- [54] Tlsty T D, Coussens L M. Tumor stroma and regulation of cancer development [J]. Annual review of pathology, 2006, 1: 119-50.
- [55] Quail D F, Joyce J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [J]. Nature medicine, 2013, 19(11): 1423-37.
- [56] 常晶晶. 肺癌相关间充质干细胞促进肺癌转移的机制研究 [D]; 天津医科大学, 2018.
- [57] Bartis D, Mise N, Mahida R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? [J]. Thorax, 2014, 69(8): 760-5.
- [58] Zhou J P, Gao Z L, Zhou M L, et al. Snail interacts with Id2 in the regulation of TNF- α -induced cancer cell invasion and migration in OSCC [J]. American journal of cancer research, 2015, 5(5): 1680-91.
- [59] Nieto M A, Huang R Y, Jackson R A, et al. EMT: 2016 [J]. Cell, 2016, 166(1): 21-45.
- [60] Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways [J]. Oncogene, 2005, 24(50): 7443-54.
- [61] Sohni A, Verfaillie C M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking [J]. Stem cells international, 2013, 2013: 130763.
- [62] 李梅, 武毅, 刘仁旺, et al. 间充质干细胞对非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭能力的初步探讨 %J 中国肺癌杂志 [J]. 2015, 18(11): 674-9.

- [63] Jeon E S, Lee I H, Heo S C, et al. Mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis in a murine xenograft model of A549 human adenocarcinoma through an LPA1 receptor-dependent mechanism [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2010, 1801(11): 1205-13.
- [64] Zhang M H, Hu Y D, Xu Y, et al. Human mesenchymal stem cells enhance autophagy of lung carcinoma cells against apoptosis during serum deprivation [J]. *International journal of oncology*, 2013, 42(4): 1390-8.
- [65] K éramidas M, de Fraipont F, Karageorgis A, et al. The dual effect of mesenchymal stem cells on tumour growth and tumour angiogenesis [J]. *Stem cell research & therapy*, 2013, 4(2): 41.
- [66] Liu T, Zhu K, Ke C, et al. Mesenchymal stem cells inhibited development of lung cancer induced by chemical carcinogens in a rat model [J]. *American journal of translational research*, 2017, 9(6): 2891-900.
- [67] Tian L L, Yue W, Zhu F, et al. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo [J]. *Journal of cellular physiology*, 2011, 226(7): 1860-7.
- [68] Liu F, Gu L N, Shan B E, et al. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update [J]. *Oncology letters*, 2016, 12(6): 4869-76.
- [69] Hennessy B T, Gonzalez-Angulo A M, Stemke-Hale K, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics [J]. *Cancer research*, 2009, 69(10): 4116-24.
- [70] Smith B N, Bhowmick N A. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance [J]. *Journal of clinical medicine*, 2016, 5(2).
- [71] Ishikawa M, Inoue T, Shirai T, et al. Simultaneous expression of cancer stem cell-like properties and cancer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast cancer cells [J]. *Cancers*, 2014, 6(3): 1570-8.
- [72] Kucia M, Jankowski K, Reca R, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion [J]. *Journal of molecular histology*, 2004, 35(3): 233-45.

- [73] Kucia M, Wojakowski W, Reca R, et al. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner [J]. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 2006, 54(2): 121-35.
- [74] Neiva K, Sun Y X, Taichman R S. The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis [J]. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 2005, 38(10): 1449-54.
- [75] Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease [J]. *Journal of leukocyte biology*, 2010, 88(3): 463-73.
- [76] Fredriksson R, Lagerström M C, Lundin L G, et al. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints [J]. *Molecular pharmacology*, 2003, 63(6): 1256-72.
- [77] Gupta S K, Pillarisetti K. Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant [J]. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 1999, 163(5): 2368-72.
- [78] Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, et al. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study [J]. *Breast cancer research and treatment*, 2006, 97(3): 275-83.
- [79] Meads M B, Hazlehurst L A, Dalton W S. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance [J]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2008, 14(9): 2519-26.
- [80] Hardie D G, Ross F A, Hawley S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2012, 13(4): 251-62.
- [81] Han J, Zhang L, Guo H, et al. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling [J]. *Gynecologic oncology*, 2015, 138(3): 668-75.

- [82] Yue W, Zheng X, Lin Y, et al. Metformin combined with aspirin significantly inhibit pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo by suppressing anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25): 21208-24.
- [83] Xu X, Gao H, Qin J, et al. TMP21 modulates cell growth in papillary thyroid cancer cells by inducing autophagy through activation of the AMPK/mTOR pathway [J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015, 8(9): 10824-31.

致 谢

行文至此，已是毕业论文完成之际。内心百感交集，三年前第一次来到河北大学时的场景在我脑中慢慢浮现。不知不觉，终要离别，我的三年研究生生涯即将落幕。一路走来，感触颇多。感恩这一路上予我指导，予我帮助与陪伴的人。

师恩难忘，铭记于心。首先我要感谢我的导师钟理教授。此次论文是在钟理教授悉心严谨地指导下完成的。钟理老师对待科研的态度是严谨认真的，这无时无刻不在感染鞭策着我，也促使我将自己的全部精力投入到科学研究工作中去。钟理老师为人大方幽默，学术造诣深，专业水平硬。三年来，钟理老师对我的指导与鼓励使我受益终身，非常幸运成为钟理老师的学生。同时也非常感谢郭蕊教授和梁胜贤老师的帮助与指导。郭蕊老师对待科研严谨认真，指导我们很有耐心。感谢郭蕊老师在我困惑时给我指导，郭蕊老师身上刻苦钻研的精神非常值得我学习。梁胜贤老师很亲切温和，像我们的师姐一样，把自己的经验和收获分享给我们，在我的实验进行和论文撰写过程中给予我很多建议，十分感谢梁胜贤老师的帮助。

非常感谢细胞生物学专业的所有老师们。感谢康现江老师、吴琛老师、刘秀华老师、穆淑梅老师、李振秋老师、常岩林老师、郭帅老师等对我的教育与指导。感谢赵慧师姐、杨辉师姐、孙锦秋师姐、张秀芳师姐、赵倩倩师姐和梁国强师兄传授我实验操作技术，感谢刘亦巍、张越、白雪迎、栗鑫悦、张倡宁、古增、王莹、袁梦、周冰倩、李钰、李沛轩、卜海梅、甄洪成、安伟利、张文静、郑梦娇、许世芳、高斌师弟师妹们朝夕相处共同进步。十分感谢综合科研楼干细胞与生物医学研究实验室的包容与培养。

感谢我的父母家人对我的支持和无私的爱。感谢室友赵梦雪、孙晓蕊、万薇、李春雨和刘金霖的支持与帮助。感谢 19 级细胞生物学专业所有同学的照顾与帮助。同时，我要感谢本篇论文中引用的文献的原作者，让我有了丰富的辅助资料来完成论文的撰写工作。

最后向论文评审和答辩委员会的各位专家们示以诚挚的感谢！

攻读学位期间的研究成果

获奖情况:

2020 年主持项目《新型肺癌早期诊断芯片》获得保定市大学生创新创业大赛二等奖

2020 年参加项目《肺癌早期诊断—自身抗体蛋白芯片应用的先行者》获得第六届“互联网+”大赛河北省铜奖

发表论文情况:

Guoqiang Liang, Jinqiu Sun, Yiwei Liu, et al. Abstract 2312: Identification of tumor associated genes using transcriptome analysis. Cancer Research. 2021

古增, 梁胜贤, 刘冬雪, 等. 间充质干细胞来源的细胞外囊泡在机体修复及疾病治疗中的应用研究. 中国科学: 生命科学. 2021