

### 【基础研究】

## 脂联素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖及侵袭和转移能力的影响

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2018)07-0563-05

通信作者:杨 君(1976-),女,河南卫辉人,硕士,主任医师,研究方向:妇科肿瘤;E-mail:67189771@qq.com。

perimental group was lower than that in the blank control group and the negative control group ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference in the expression of adiponectin and ERK protein in the Ishikawa cells between the blank control group and negative control group ( $P > 0.05$ ). The Ishikawa cell cloning ability in the experimental group was more than that in the blank control group and the negative control group ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference in the Ishikawa cell cloning ability between the blank control group and negative control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Adiponectin may play an anti-tumor role by inducing endometrial carcinoma cell apoptosis and inhibiting the invasion and migration of endometrial cancer cells by effecting ERK signaling pathway.

**Key words:** endometrial carcinoma; adiponectin; cell proliferation; cell apoptosis; invasion; metastasis

子宫内膜癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 严重威胁女性健康和生活质量<sup>[1]</sup>。近年来, 子宫内膜癌发病率呈上升趋势, 发病年龄也向年轻化发展<sup>[2]</sup>。子宫内膜癌传统的治疗方法主要有手术治疗、化学治疗和放射治疗, 这些治疗方法均存在诸多缺陷<sup>[3]</sup>。因此, 探索子宫内膜癌新的治疗方法至关重要。随着生命科学技术的发展, 从基因、蛋白乃至分子水平上对子宫内膜癌进行联合治疗具有较大的潜力。目前, 针对细胞凋亡蛋白进行肿瘤靶向治疗是一个新的研究方向<sup>[4]</sup>。脂联素是重要的肿瘤特异性蛋白之一, 属于细胞凋亡相关蛋白, 在抗肿瘤中发挥作用。脂联素表达水平高的肿瘤细胞的抗凋亡能力较低<sup>[5]</sup>。由此推测, 脂联素可能在细胞凋亡过程中发挥调控作用。但是, 脂联素是否参与子宫内膜癌细胞的侵袭和转移目前尚不清楚。本研究旨在探讨脂联素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞侵袭和转移的影响及其机制, 以期为子宫内膜癌的临床研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、试剂与仪器** 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞购自上海拜力生物科技有限公司, 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、转染试剂脂质体购自北京鼎国生物工程有限公司, 磷脂酰丝氨酸外翻检测试剂盒、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的膜联蛋白 V (Annexin V-FITC)、碘化丙啶 (propidium iodide, PI)、caspase-3 活性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 抗脂联素抗体和二抗购自美国 Sigma 公司, RPMI-1640 培养基和胎牛血清购自上海丰寿生物科技有限公司, 脂联素反义 RNA 及其对照 microRNA 由苏州吉玛基因股份有限公司构建和提供。细胞培养箱购自美国 Thermofisher 公司, BD Accuri C6 流式细胞仪购自美国 BD 公司; ChemiDoc™ Touch Imaging System 购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组** 将子宫内膜癌 Ishikawa

细胞复苏后应用含体积分数 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37 ℃、饱和湿度、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的孵箱中培养, 呈贴壁生长, 1~2 d 换液 1 次, 2.5 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶常规消化, 1:3 传代。将培养的子宫内膜癌 Ishikawa 细胞随机分为空白对照组、阴性对照组和实验组。

**1.2.2 细胞转染** 取 3 组对数生长期细胞, 在转染前 1 d 使用 0.1 nmol · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶和二胺四乙酸混合物于 37 ℃ 下消化 10 min, 加入新鲜培养基, 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 细胞沉淀重悬于新鲜的含体积分数 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。第 2 天, 细胞密度达到约 95%, 采用脂质体转染法将脂联素反义 RNA (50 nmol · L<sup>-1</sup>) 及其对照 microRNA (50 nmol · L<sup>-1</sup>) 分别转入实验组及阴性对照组子宫内膜癌 Ishikawa 细胞, 转染 24 h 后换新鲜培养基, 转染 36 h 后收集细胞进行后续实验。空白对照组细胞不进行转染。

**1.2.3 MTT 法检测子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖能力** 细胞转染 36 h 后, 收集 3 组对数生长期细胞, 调整细胞悬液浓度, 每孔加入 100 μL (96 孔平底板), 铺板使待测细胞密度为每孔 1 000 个, 置于含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的 37 ℃ 培养箱中孵育 48 h, 倒置显微镜下观察细胞的生长情况; 每孔加入 5 g · L<sup>-1</sup> MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h; 终止培养, 小心吸去孔内培养液; 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测仪波长 490 nm 处测各孔的吸光度值, 实验重复 5 次。

**1.2.4 磷脂酰丝氨酸外翻流式细胞术检测子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡情况** 细胞转染 36 h 后, 取 3 组 Ishikawa 细胞各 2 × 10<sup>5</sup> 个, 向 250 μL 细胞悬液中分别加入 50 μL 的 Annexin V FITC 试剂和 1 μL 反应缓冲液, 常温下避光孵育 20 min。采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况, 以磷脂酰丝氨酸在细胞膜表面的表达量作为凋亡指标。流式细胞术检测中发射光波长和吸收光波长分别为 484、625 nm, 实验重复 5 次。

**1.2.5 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中 caspase-3 活性检测** 细胞转染 36 h 后,取 3 组 Ishikawa 细胞各  $2 \times 10^5$  个,向细胞中加入裂解液,使细胞中蛋白质释放出来,再向细胞裂解物中加入 caspase-3 生色底物,常温下避光孵育 20 min。酶标仪分析各组细胞在波长 492 nm 处的吸光度值,实验重复 5 次。

**1.2.6 Western blot 法检测子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中脂联素及细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)表达水平** 细胞转染 36 h 后,取 3 组 Ishikawa 细胞各  $2 \times 10^5$  个,向细胞悬液中加入裂解液,充分裂解细胞,再向细胞裂解物中加入电泳上样缓冲液,制备 western blot 样品。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳对细胞中的蛋白水平进行分析。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳条件如下:先在 60 V 下电泳 30 min,再在 60 V 下电泳 100 min;将蛋白转移至硝酸纤维素膜,转移条件为 90 mA、180 min;将硝酸纤维素膜浸泡于含  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  脱脂奶粉和吐温-20 的磷酸盐缓冲液中,室温下轻轻摇动封闭 2 h;使用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次。在硝酸纤维素膜上分别加入抗脂联素(1:2 000)的单克隆抗体或抗 actin 的内参单克隆抗体(1:4 000),室温条件下反应 3 h,使用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次。再向硝酸纤维素膜上加入山羊抗小鼠二抗(1:1 000),室温条件下反应 3 h;使用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次。最后,对硝酸纤维素膜上的蛋白质进行显影和定影,采用 Image J 6.0 软件处理和分析各组子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中 ERK 蛋白和脂联素的表达水平,实验重复 5 次。

**1.2.7 克隆形成实验** 细胞转染 36 h 后,取 3 组 Ishikawa 细胞,用含体积分数 20% 胎牛血清的培养液调整细胞密度至  $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ ,按照 0、10、50、100、200 倍的梯度进行稀释,将稀释后的细胞接种至软琼脂中,置于含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的  $37^\circ\text{C}$  培养箱中培养 2 周。待有克隆形成时,弃去培养液,加入纯甲醇室温下固定 15 min。加入 Giemsa 染色 30 min,进行克隆计数,实验重复 5 次。

**1.2.8 Transwell 实验检测子宫内膜癌 Ishikawa 细胞迁移能力** 细胞转染 36 h 后,取 3 组 Ishikawa 细胞,在 Transwell 板上层铺固体培养基,下层铺含有趋化因子的培养基,上层分别接种 3 组 Ishikawa 细胞,培养 48 h 后计数下层细胞数,实验重复 5 次。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,2 组样本均数比较采用  $q$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 3 组 Ishikawa 细胞增殖能力比较** 空白对照组、阴性对照组和实验组 Ishikawa 细胞增殖能力(灰度值)分别为  $49.2 \pm 11.1$ 、 $52.3 \pm 12.3$ 、 $85.0 \pm 18.1$ ;实验组 Ishikawa 细胞增殖能力大于空白对照组及阴性对照组,差异均有统计学意义( $q = 5.745$ 、 $5.266$ , $P < 0.01$ );空白对照组与阴性对照组 Ishikawa 细胞增殖能力比较差异无统计学意义( $q = 0.479$ , $P > 0.05$ )。

**2.2 3 组 Ishikawa 细胞凋亡情况比较** 空白对照组、阴性对照组、实验组 Ishikawa 细胞膜表面磷脂酰丝氨酸表达分别为  $6.8 \pm 1.3$ 、 $7.4 \pm 1.6$ 、 $4.2 \pm 0.9$ ;实验组 Ishikawa 细胞膜表面磷脂酰丝氨酸表达低于空白对照组及阴性对照组,差异均有统计学意义( $q = 4.477$ 、 $5.510$ , $P < 0.05$ ),空白对照组与阴性对照组 Ishikawa 细胞膜表面磷脂酰丝氨酸表达比较差异无统计学意义( $q = 1.033$ , $P > 0.05$ );见图 1。空白对照组、阴性对照组和实验组 Ishikawa 细胞中 caspase-3 活性分别为  $3.6 \pm 1.1$ 、 $3.8 \pm 1.2$ 、 $1.1 \pm 0.1$ ;实验组 Ishikawa 细胞中 caspase-3 活性低于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义( $q = 6.085$ 、 $6.562$ , $P < 0.01$ );空白对照组与阴性对照组 Ishikawa 细胞中 caspase-3 活性比较差异无统计学意义( $q = 0.477$ , $P > 0.05$ )。

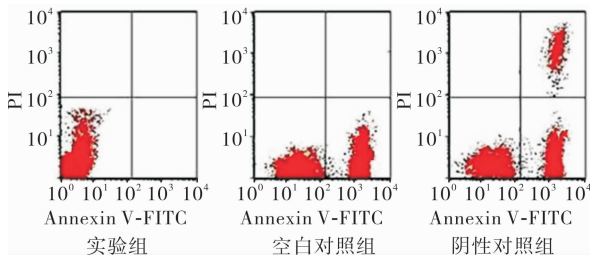


图 1 3 组 Ishikawa 细胞膜表面磷脂酰丝氨酸的表达  
Fig.1 Expression of phosphatidylserine of on the surface of Ishikawa cell membrane in the three groups

**2.3 3 组 Ishikawa 细胞中脂联素及 ERK 蛋白表达比较** 空白对照组、阴性对照组和实验组 Ishikawa 细胞中脂联素蛋白表达分别为  $3.50 \pm 0.01$ 、 $3.41 \pm 0.01$ 、 $1.32 \pm 0.01$ ;实验组 Ishikawa 细胞中脂联素蛋白表达低于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义( $q = 69.803$ 、 $66.630$ , $P < 0.01$ );空白对照组与阴性对照组 Ishikawa 细胞中脂联素蛋白表达比较差异无统计学意义( $q = 3.173$ , $P > 0.05$ );见图 2。空白对照组、阴性对照组和实验组 Ishikawa 细胞中 ERK 蛋白表达分别为  $1.1 \pm 0.1$ 、 $1.2 \pm 0.1$ 、 $1.4 \pm 0.1$ ;实验组 Ishikawa 细胞中 ERK 蛋白表达低

于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义( $q=7.423、4.949,P<0.01$ );空白对照组与阴性对照组 Ishikawa 细胞中 ERK 蛋白表达比较差异无统计学意义( $q=2.474,P>0.05$ );见图 3。

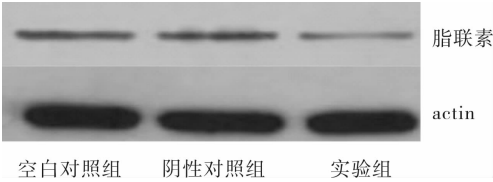


图 2 3 组 Ishikawa 细胞中脂联素蛋白表达  
Fig. 2 Expression of adiponectin protein in Ishikawa cells in the three groups

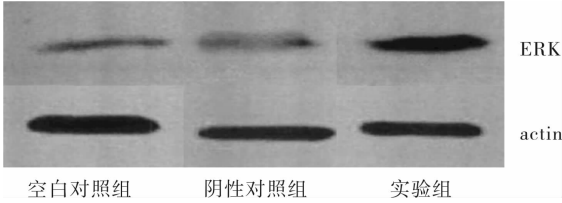


图 3 3 组 Ishikawa 细胞中 ERK 蛋白表达  
Fig. 3 Expression of ERK protein in Ishikawa cells in the three groups

2.4 3 组 Ishikawa 细胞克隆能力比较 结果见图 4。空白对照组、阴性对照组和实验组 Ishikawa 细胞克隆数分别为  $101.3 \pm 23.1$ 、 $109.1 \pm 25.4$ 、 $236.3 \pm 41.2$ ;实验组 Ishikawa 细胞克隆能力大于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义( $q=9.819、9.238,P<0.05$ );空白对照组与阴性对照组 Ishikawa 细胞克隆能力能力比较差异无统计学意义( $q=0.582,P>0.05$ )。

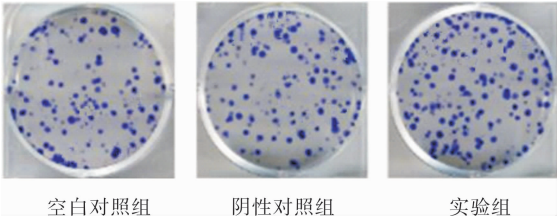


图 4 3 组 Ishikawa 细胞克隆能力( $\times 20$ )  
Fig. 4 Cloning ability of Ishikawa cells in the three groups ( $\times 20$ )

2.5 3 组 Ishikawa 细胞侵袭能力比较 结果见图 5。空白对照组、阴性对照组和实验组 Ishikawa 细胞进入下室的细胞数分别为  $90.1 \pm 13.2$ 、 $89.3 \pm 14.3$ 、 $486.2 \pm 69.1$ 。实验组 Ishikawa 细胞侵袭能力大于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义( $q=21.422、21.476,P<0.01$ );空白对照组与阴性对照组 Ishikawa 细胞侵袭能力比较差异无统计学意义( $q=0.054,P>0.05$ )。

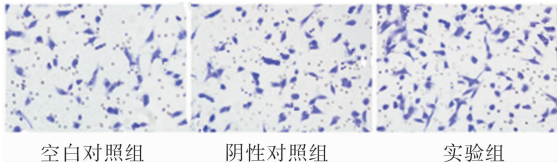


图 5 3 组 Ishikawa 细胞侵袭能力( $\times 20$ )  
Fig. 5 Invasiveness of Ishikawa cells in the three groups ( $\times 20$ )

3 讨论

脂联素是由 apM1 基因编码的一种脂源性胶原蛋白,主要存在于血液中,正常情况下血浆脂联素水平为  $1.9 \sim 17.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,人类 apM1 基因是单拷贝基因,位于染色体 3q27,全长约 16 kb,包括 3 个外显子和 2 个内含子,有 6 种存在方式,不同形式的脂联素与其受体结合后发挥不同的生物学效应。脂联素在肿瘤发生发展中的作用尚不十分清楚,有研究表明,脂联素是重要的肿瘤特异性蛋白之一,它是细胞凋亡的促进蛋白,发挥重要的抗肿瘤作用。脂联素高表达的肿瘤细胞的抗凋亡能力差<sup>[5-9]</sup>。PET-RIDOU 等<sup>[10]</sup>研究发现, < 65 岁女性血清脂联素水平每增加 1 个标准差,其患子宫内膜癌的风险就降低 50%。CUST 等<sup>[11]</sup>和 MA 等<sup>[12]</sup>研究发现,血清脂联素水平与子宫内膜癌呈负相关。目前,脂联素在子宫内膜癌中的作用机制仍不明确<sup>[13-15]</sup>。恶性增生和转移侵袭能力是肿瘤细胞的重要特征,它是一个主动过程,主要涉及肿瘤细胞、宿主细胞及细胞外基质之间一系列复杂的相互作用,癌细胞与细胞外间质的黏附、细胞外间质和基底膜的降解及癌细胞的移动常导致肿瘤细胞发生远处转移<sup>[7]</sup>。本研究以子宫内膜癌 Ishikawa 细胞为细胞模型,采用靶向脂联素的反义 RNA 转染技术探讨了脂联素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的调控作用。

本研究结果显示,实验组 Ishikawa 细胞增殖能力大于空白对照组及阴性对照组,空白对照组与阴性对照组 Ishikawa 细胞增殖能力比较差异无统计学意义;同时,克隆形成实验及 Transwell 实验发现,在应用脂联素反义 RNA 敲减子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中脂联素的表达水平后,子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的克隆形成能力及细胞的迁移能力明显增强;说明转染脂联素反义 RNA 的子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的生长和侵袭能力更强,提示脂联素具有抑制肿瘤细胞生长及转移的作用。

细胞凋亡是机体的一种生理过程,机体在产生新生细胞的同时,衰老和突变的细胞通过凋亡机制被清除,使器官和组织得以正常发育和代谢。细胞



凋亡的调控障碍与肿瘤的发生密切相关,肿瘤的发生与控制细胞增殖的癌基因的过度表达有关,也与抑制细胞凋亡的基因高表达及诱导细胞凋亡的抗癌基因变异失活有关。本研究结果显示,转染脂联素反义 RNA 的 Ishikawa 细胞中 caspase-3 活性及细胞膜表面磷脂酰丝氨酸表达降低,说明转染脂联素反义 RNA 的 Ishikawa 细胞凋亡减少,提示脂联素可以促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长。这与以往研究<sup>[16-17]</sup>结果一致。

ERK 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,是传递丝裂原信号的信号转导蛋白,调节着细胞的增殖、分化和存活,ERK 和其信号途径在肿瘤侵袭和转移过程中起中介和放大信号的作用。有研究表明,脂联素受体在人类子宫内膜基质细胞及上皮细胞中均有表达<sup>[18]</sup>,脂联素通过与子宫内膜上皮细胞及间质细胞上的脂联素受体结合,增加腺苷一磷酸依赖的蛋白激酶(5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase,AMPK)α 亚基的磷酸化而激活 AMPK 来调节不同细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)和 E2(Cyclin E2)以及信号蛋白 ERK1/2 和蛋白激酶 B,上调抑癌基因 肝激酶 B1 表达来抗肿瘤增殖,诱导细胞凋亡的发生<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,应用脂联素反义 RNA 敲低子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中脂联素水平后引起了 ERK 蛋白表达升高,提示脂联素可能通过抑制 ERK 蛋白表达而抑制肿瘤细胞的增殖、分化与存活。

综上所述,脂联素可能通过诱导子宫内膜癌细胞凋亡及抑制子宫内膜癌迁移和侵袭双重作用发挥抗肿瘤作用。但是,脂联素在子宫内膜癌中的作用机制仍不明确,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] YU C G,JIANG X Y,LI B,*et al.* Expression of ER,PR,C-erbB-2 and Ki-67 in endometrial carcinoma and their relationships with the clinicopathological features[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2015,16(15):6789-6794.

[2] KIM T H,YOO J Y,KIM H I,*et al.* Mig-6 suppresses endometrial cancer associated with Pten deficiency and ERK activation[J]. *Cancer Res*,2014,74(24):7371-7382.

[3] BARTOSCH C,MONTEIRO-REIS S,VIEIRA R,*et al.* Endometrial endometrioid carcinoma metastases show decreased ER-α and PR-A expression compared to matched primary tumors[J]. *PLoS One*,2015,10(8):e 0134969.

[4] CHE Q,LIU B Y,WANG F Y,*et al.* Interleukin 6 promotes endometrial cancer growth through an autocrine feedback loop involving ERK-NF-κB signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Com-*

*mun*,2014,446(1):167-172.

[5] PORICHI O,NIKOLAIDOU M E,APOSTOLAKI A,*et al.* Isomorph expression of BAG-1 gene,ER and PR in endometrial cancer[J]. *Anticancer Res*,2010,30(10):4103-4108.

[6] SRIJAIPRACHAROEN S,TANGJITGAMOL S,TANVANICH S,*et al.* Expression of ER,PR,and Her-2/neu in endometrial cancer;a clinicopathological study[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2010,11(1):215-220.

[7] WANG Y,ZHU Y,ZHANG L,*et al.* Insulin promotes proliferation, survival,and invasion in endometrial carcinoma by activating the MEK/ERK pathway[J]. *Cancer Lett*,2012,322(2):223-231.

[8] MIZUMOTO Y,KYO S,MORI N,*et al.* Activation of ERK1/2 occurs in dependently of KRAS or BRAF status in endometrial cancer and is associated with favorable prognosis[J] *Cancer Sci*,2007,98(5):652-658.

[9] SHANG C,LU Y M,MENG L R. KCC1 gene advances cell invasion ability by regulating ERK signaling pathway in endometrial cancer HEC-1B cell line[J]. *Int J Gynecol Cancer*,2011,21(5):795-799.

[10] PETRIDOU E,MANTZOROS C,DESSYPRIS N,*et al.* Plasma Adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer;a case control study in Greece[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2003,88(3):993-997.

[11] CUST A E,KAAKS R,FRIEDENREICH C,*et al.* Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre- and postmenopausal women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2007,92(1):255-263.

[12] MA Y,LIU Z,ZHANG Y,*et al.* Serum leptin,adiponectin and endometrial cancer risk in Chinese women[J]. *Gynecol Oncol*,2013,24(4):336-341.

[13] 王忠民,谈海英,朱文秀.血清脂联素及内脂素水平与子宫内膜癌关系的临床意义探讨[J]. *现代妇产科进展*,2014,23(6):432-435.

[14] 王巍巍,崔玉兰,孙海艳.脂联素及其受体与子宫内膜癌关系的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*,2017,25(9):1503-1505.

[15] 沈丽娜,汪宏波.脂联素与子宫内膜癌发生发展的关系研究[J]. *现代妇产科进展*,2016,25(7):552-553.

[16] ZHANG W,ZHAO L,LIU J,*et al.* Cisplatin induces platelet apoptosis through the ERK signaling pathway[J]. *Thromb Res*,2012,130(1):81-91.

[17] ZHANG W,LIU J,SUN R,*et al.* Calpain activator dibucaine induces platelet apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*,2011,12(4):2125-2137.

[18] TAKEMURA Y,OSUGA Y,YAMAUCHI T,*et al.* Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium[J]. *Endocrinol*,2006,147(7):3203-3210.

[19] MOON H S,CHAMBERLAND J P,ARONIS K,*et al.* Direct role of adiponectin and adiponectin receptors in endometrial cancer;*in vitro* and *ex vivo* studies in human[J]. *Mol Cancer Ther*,2011,10(12):2234-2243.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)