瘦素对人甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖、迁移及侵袭的影响

王 帅 葛俊杰 耿 晓 崔 文 周成军

摘 要 目的 探讨不同浓度的瘦素对人甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响。**方法** 分别用 0ng/ml(空白对照组)、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、125ng/ml,5 组不同浓度的瘦素处理人甲状腺乳头状癌 K1 细胞,MTT 实验检测不同浓度瘦素处理后细胞的增殖能力、划痕实验检测细胞迁移能力、Transwell 实验检测细胞侵袭能力。**结果** MTT 实验检测结果显示,瘦素对 K1 细胞的增殖没有影响($P>0.05$);不同浓度的瘦素处理 K1 细胞后 24h 后划痕实验迁移率分别为:40.201%、47.383%、59.950%、68.732%、79.306%;48h 后划痕实验迁移率分别为:49.398%、74.192%、86.733%、87.795%、90.005%。随瘦素浓度增加与处理时间延长,划痕内面面积缩小,迁移率增加($P<0.05$)。Transwell 实验结果显示,穿出聚碳酸酯膜的细胞数依次增多($P<0.05$)。**结论** 随处理时间的延长和瘦素浓度的增加,人甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖能力不受影响,K1 细胞迁移和侵袭能力均呈上升趋势。

关键词 瘦素 人甲状腺乳头状癌 细胞增殖 细胞迁移 细胞侵袭

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.02.017

Regulation of Leptin on the Proliferation, Migration and Invasion of Human Papillary Thyroid Cancer K1 Cells. *Wang Shuai, Ge Junjie, Geng Xiao, et al. The Second Hospital of Shandong University, Shandong 250000, China*

Abstract Objective To study the effect of different concentration of leptin on the proliferation, migration and invasion on human papillary thyroid cancer K1 cells. **Methods** Different concentrations of leptin (0ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 125ng/ml) were used to treat papillary thyroid cancer K1 cells, and the MTT assay, scratch assay and transwell were used to assess the viability and invasive ability of K1 cells respectively. **Results** The MTT assay results that leptin had no effect on the proliferation K1 cells ($P>0.05$). K1 cells were treated different concentration of leptin. After 24 hours the scratch test migration rates were: 40.201%, 47.383%, 59.950%, 68.732%, 79.306%. 48 hours of scratch test migration rates were: 49.398%, 74.192%, 86.733%, 87.795%, 90.005%. The results that the increase of leptin concentration and the extension of treatment time area were reduced and mobility enhanced. Transwell show that the number of cells traversing in polycarbonate membrance increasing trend sequentially ($P<0.05$). **Conclusion** Leptin had no effect on the proliferation of K1 cells. But it could promote migration and invasion on K1 cells.

Key words Leptin; Papillary thyroid cancer; Proliferation; Migration; Invasion

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤,发生率近 10 年显著增高。甲状腺乳头状癌在甲状腺癌中最为常见,占 80% ~85%[1]。流行病学调查显示,肥胖是恶性肿瘤发生的危险因素。有学者对肥胖与甲状腺癌的关系进行了研究,结果显示在肥胖人群中甲状腺癌发生率更高[2]。并有研究报道血清瘦素水平与体重呈正相关[3]。瘦素是研究最多的脂肪因子之一,是由肥胖基因(ob)编码的蛋白类激素。可以通过调节体内脂肪储存来调节体重,并且对于食物摄取与能量平衡、新陈代谢、神经内分泌也有调节作用[4]。本研究对瘦素与人甲状腺乳头状癌 K1 细胞的关系进行实验,研究瘦素对 K1 细胞功能的调控。

材料与方法

1. 材料 :人甲状腺乳头状癌细胞系(K1)购于欧洲细胞库(英国 ECACC 公司)。DMEM 培养基购自中国 Fisher 公司,胎牛血清(FCS)购自杭州四季青公司,MTT 购自美国 Sigma 公司,Transwell 小室购自美国 Costar 公司。

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2009CM070);山东省高等学校计划项目(JI3LKI4)

作者单位:250062 济南,山东大学第二医院病理科(王帅、周成军);250000 济南,山东大学齐鲁儿童医院胸外肿瘤外科(葛俊杰);250000 济南,山东省职业卫生与职业病防治研究院(耿晓);272000 济宁医学院(崔文)

通讯作者:周成军,电子信箱:nice118@126.com

2. 方法:(1)细胞培养使用含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,将培养瓶放于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。在倒置显微镜下观察细胞融合至 80% 时,1:2传代。(2)MTT 实验:取对数生长期的 K1 细胞,按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中。接种第 2 天换 DMEM 无血清培养液,每孔加入 100μl。第 3 天同一时间,配置好不同浓度的瘦素,实验设置 0ng/ml(空白对照组)、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、125ng/ml 5 个组,每组设置 3 个复孔。分别在加药后的 24h 和 48h 加入 25μl MTT 溶液,2h 后加入 100μl Lysis buffer 溶液,过夜(超过 12h)后测吸光度值(波长为 570nm),以上实验重复 3 次,取平均值。(3)划痕实验:将 K1 细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中。第 2 天长满后用 200μl 的枪头比对直尺垂直划痕。每孔划痕 3 道垂直线。划痕后使用 PBS 冲洗细胞 2 次。用配制好的不同浓度瘦素给予刺激(0ng/ml、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、125ng/ml)。分别在 0、24 和 48h 置于荧光倒置显微镜下拍照。计算得出细胞迁移率[细胞迁移率(%)=(修复前划痕内面面积-修复后划痕内面面积)/修复前划痕内面面积×100%]。以上实验重复 3 次,取平均值。(4)Transwell 实验:用 30μl 1:6 稀释的 Matrigel 胶铺于 Transwell 小室上层,2h 后加 100μl DMEM 培养基水化,上室加入用不同浓度瘦素预先处理过的细胞 2×10^5 个,下室加入 500μl 含 10% FBS 的培养基,每组设 3 个复孔。放置培养箱中培养 72h。72h 后取出小室,PBS 清洗 3 遍,棉签轻轻擦去上室内细胞,无水甲醇固定 30min,0.5% 的结晶紫染色 30min,PBS 清洗 3 次,自然风干,每个浓度组在正置显微镜下取 5 个视野拍照。以上实验重复 3 次,取平均值。

3. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,所有资料用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,运用单因素方差分析(*ANOVA*),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. MTT 实验检测 K1 细胞增殖:5 组不同浓度瘦素处理 K1 细胞后,用 MTT 法连续观察 K1 细胞在 24h 和 48h 增殖情况,检测波长 570nm 处的吸光度(*A*)值,运用 *ANOVA* 法计算出数据(表 1)。结果显示相同时间下不同波度组的瘦素对 K1 细胞的增殖并无影响,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1　不同浓度瘦素影响 K1 细胞增殖

组别	24h	48h
0ng/ml	0.247 ± 0.002	0.251 ± 0.011
10ng/ml	0.252 ± 0.002	0.261 ± 0.056
50ng/ml	0.244 ± 0.001	0.263 ± 0.018
100ng/ml	0.243 ± 0.002	0.270 ± 0.028
125ng/ml	0.244 ± 0.001	0.274 ± 0.013
P	0.360	0.528

2. 划痕实验检测 K1 细胞迁移:0ng/ml、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml 和 125ng/ml 不同浓度瘦素组 24h K1 细胞迁移率分别为 40.201%、47.383%、59.950%、68.732%、79.306%;48h 细胞迁移率分别为 49.398%、74.192%、86.733%、87.795%、90.005%。随着瘦素浓度逐渐升高,划痕内面面积缩小,迁移率升高;随着瘦素处理时间延长,划痕内面面积缩小,迁移率升高。K1 细胞表现出与瘦素的时间依赖性与浓度依赖性的特点。24h 与 48h 迁移率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2　各浓度瘦素处理 K1 细胞后迁移率分析(%)

组别	24h 迁移率	48h 迁移率
0ng/ml	40.201	49.398
10ng/ml	47.383	74.192
50ng/ml	59.950	86.733
100ng/ml	68.732	87.795
125ng/ml	79.306	90.005
P	0.000	0.000

3. Transwell 实验检测 K1 细胞侵袭:显微镜下计数 0ng/ml、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml 和 125ng/ml 5 个浓度组的 K1 细胞穿出聚碳酸酯膜个数分别为 63 ± 3、97 ± 7、126 ± 6、140 ± 1、180 ± 2 个(图 2)。穿出聚碳酸酯膜的细胞个数与瘦素浓度呈正比。随着瘦素浓度增加,K1 细胞侵袭能力增强,说明瘦素对 K1 细胞侵袭能力有促进作用,差异有统计学意义($P=0.000$)。

讨　　论

甲状腺癌是目前增长最快的恶性肿瘤,排名第 6 位[5,6]。甲状腺癌有 4 种分型,即甲状腺乳头状癌(PTC)、滤泡型甲状腺癌(FTC)、低分化癌(PDTC)和未分化癌(ATC)。2014 年美国诊断病例为 62980 例,其中 90% 为甲状腺乳头状癌(PTC)[7]。未分化的甲状腺癌由于远处转移和缺乏有效治疗,10 年生存率 <10%[8]。随着多种诊断技术和诊断方法的增加,甲状腺癌的检出率也逐渐增高,甲状腺癌早期多无明显

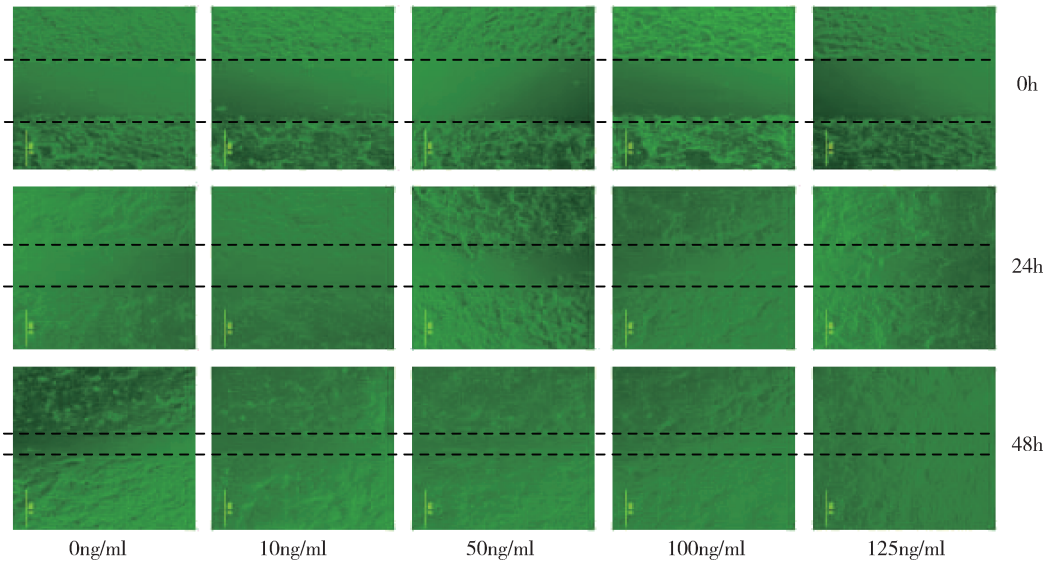


图 1　各浓度瘦素处理 K1 细胞后划痕实验图片（×100，荧光倒置显微镜）

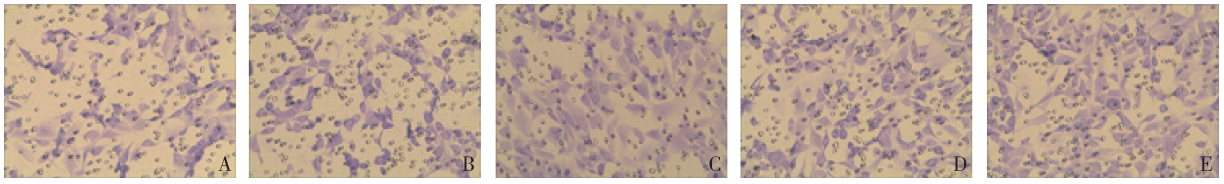


图 2　不同浓度瘦素处理 K1 细胞侵袭性比较（结晶紫染色，×100）

A. 0ng/ml；B. 10ng/ml；C. 50ng/ml；D. 100ng/ml；E. 125ng/ml

症状，多在健康体检中发现有占位性病变。另外 CT、MRI 扫描、生化标志物等多种诊断技术的使用增多也使甲状腺癌的检出率增高[9]。

根据流行病学调查显示，肥胖已经成为全球性疾病，并且与许多疾病息息相关，也是致癌的危险因素之一。脂肪组织不仅可以储存能量，还能分泌细胞因子和激素，如脂联素（adiponectin）、瘦素（leptin）、内脏脂肪素（visfatin）、肿瘤坏死因子 α（TNF－α）等。虽然与肥胖发生的相关分子机制尚未完全明确，但是基因起到决定性因素，最主要的基因是肥胖（Ob）基因和 Ob 受体（Ob－R）基因。瘦素与其受体结合后激活 PI_3K、ERK1/2、STAT3 条通路，从而促进肿瘤细胞的增殖，并且当瘦素受体相对缺乏时，可影响 ERK1/2 和（JAK2）/ STAT3 信号转导[10,11]。

瘦素是由 Ob 基因编码的由 167 个氨基酸组成的蛋白质入血后去除 N 末端的 21 个氨基酸信号序列后，形成含有 146 个氨基酸的蛋白类激素[12]。大多数瘦素主要分布在白色脂肪，血循环中瘦素浓度测定直接与人体白色脂肪的总量呈正比。健康人群中瘦素的含量是 5 ~ 10ng/ml，肥胖人群中瘦素含量是 40 ~ 100ng/ml[13]。

Rehem 等[14]研究了高分化甲状腺癌与血清瘦素的关系，采集 30 例高分化甲状腺癌患者与 30 例甲状腺良性结节患者术前和术后 1 个月的血样，分析血清瘦素的变化，得出血清瘦素水平比对照组高且术后下降，这一现象说明瘦素在诊断甲状腺癌中起到重要作用。Hedayati 等[15]选取 83 例甲状腺乳头状癌 PTC 患者（35 例男性、48 例女性）和 90 名健康者（40 名男性、50 名女性），年龄、性别、BMI 均互相匹配。采集血样测定血清瘦素后比较含量，并测量身高、体重、计算 BMI。实验分析患病组比正常组血清瘦素水平高，说明瘦素与 PTC 有相关性；女性比男性瘦素水平高，说明体内的脂肪含量与瘦素水平呈正比（女性体内脂肪含量高于男性）。Fan 等[16]探讨了瘦素及其受体在甲状腺癌预后中的潜在意义，选取 173 例甲状腺癌患者，得出瘦素及其受体的表达与 PTC 有相关性，并且会引起患者预后不良。

本实验选取了脂肪因子中的瘦素进行细胞实验，MTT 实验结果显示瘦素并不影响细胞的增殖（$P > 0.05$）。体内的肿瘤细胞能够大量增殖可能与癌细胞

远处转移这一特性有关,从而促进了癌细胞的大量增殖[17]。在本实验中癌细胞增殖不受影响,或许是因为细胞模型的局限性所致。另外的一个原因或许是因为瘦素抵抗现象,即瘦素受体具有饱和性,从而导致浓度过高的瘦素因为瘦素受体的这一特性不能完全发挥作用。也或许是瘦素仅仅是在患癌的起始阶段起了一定的作用,体内过高浓度的瘦素只起到致癌的作用,而并不能促进癌细胞生长。中国台北地区 Mackay Memorial 医院的 Cheng 等[17]研究了瘦素对 K1 细胞的迁移能力,研究发现高浓度瘦素能够提高其迁移性[17]。本实验用不同浓度的瘦素处理 K1 细胞后划痕实验也得出瘦素能够促进 K1 细胞的迁移。肿瘤细胞穿过基膜是肿瘤细胞是否转移的关键一步,建立体外侵袭实验的细胞模型模拟肿瘤细胞在体内侵袭的生理过程,本实验结果显示瘦素促进甲状腺癌细胞的侵袭,并且随瘦素浓度的增加侵袭性增强。本实验初步探讨了瘦素对于甲状腺癌侵袭的影响,机制还尚不完全清楚,在下一步实验中还需进一步研究哪个信号通路在这一过程中起作用。

综上所述,对甲状腺癌的诊断除其他的特定肿瘤标志物外,瘦素还可作为一个相关肽辅助诊断。在临床甲状腺癌治疗中,瘦素或许可以作为一个基因治疗的靶点或是一种新药起到临床治疗作用。

参考文献

1 Podnos YD, Smith DD, Wagman LD, *et al*. Survival in patients with papillary thyroid cancer is not affected by the use of radioactive isotope [J]. J Surg Oncol, 2007, 96(1): 3 - 7

2 Han JM, Kim TY, Jeon MJ, *et al*. Obesity is a risk factor for thyroid cancer in a large, ultrasonographically screened population [J]. Eur J Endocrinol, 2013, 168(6):879 - 886

3 Ahima RS, Flier JS. Leptin[J]. Annu Rev Physiol, 2000, 62(1): 413

4 Rehem RA, Elwafa WA, Elwafa RA, *et al*. Study of serum leptin in well - differentiated thyroid carcinoma: correlation with patient and tumor characteristics [J]. World J Sur, 2014, 38(10):2621 - 2627

5 Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, *et al*. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973 - 2002 [J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(5):525 - 531

6 Nikiforov YE. Is ionizing radiation responsible for the increasing incidence of thyroid cancer? [J]. Cancer, 2010, 116(7): 1646 - 1655

7 Zou Z. Cancer statistics, 2014 [J]. Ca A Cancer J Clin, 2015, 65(1):5

8 Wang Y, Wang W. Increasing incidence of thyroid cancer in shanghai, China, 1983 - 2007 [J]. Asia - Pacific Public Health, 2015, 27(2):NP223

9 Li N, Du XL, Reitzel LR, *et al*. Impact of enhanced detection on the Increase in Thyroid Cancer Incidence in the United States: review of incidence trends by socioeconomic status within the surveillance, epidemiology, and end results registry, 1980 - 2008 [J]. Thyroid, 2013, 23(1): 103

10 Marie CS, Verkerke HP, Paul SN, *et al*. Leptin protects host cells from Entamoeba histolytica cytotoxicity by a STAT3 - dependent mechanism [J]. Infect Immun, 2012, 80(5): 1934 - 1943

11 Lin J, Yan GT, Hao XH, *et al*. Effect of intestinal ischemia - reperfusion injury on protein levels of leptin and orexin - A in peripheral blood and central secretory tissues [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(7): 1000 - 1004

12 Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? [J]. Hormones (Athens), 2010, 9(2): 103 - 108

13 Scherer T, Buettner C. Yin and Yang of hypothalamic insulin and leptin signaling in regulating white adipose tissue metabolism [J]. Rev Endocrine Metab Disord, 2011, 12(3): 235 - 243

14 Rehem RA. Study of serum leptin in well - differentiated thyroid carcinoma: correlation with patient and tumor characteristics [J]. World J Sur, 2014, 38(10): 2621

15 Hedayati M. Leptin: a correlated peptide to papillary thyroid carcinoma? [J]. J Thyroid Res, 2011, 2011:832163

16 Fan YL, Li XQ. Expression of leptin and its receptor in thyroid carcinoma: distin ctive prognostic significance in different subtypes [J]. Clin Endocrinol, 2015, 83(2):261 - 267

17 Cheng SP, Yin PH, Hsu TC, *et al*. Leptin enhances migration of human papillary thyroid cancer cells through the PI_3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways [J]. Oncol Rep, 2011, 26(5): 1265 - 1271

（收稿日期:2017 - 11 - 19）
（修回日期:2018 - 01 - 12）

（上接第 17 页）

18 Xu M, Deng B, Chow YL, *et al*. Effects of curcumin in treatment of experimental pulmonary fibrosis: a comparison with hydrocortisone [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 112(2):292 - 299

19 Guzel A, Kanter M, Guzel A, *et al*. Protective effect of curcumin on acute lung injury induced by intestinal ischaemia/reperfusion [J]. Toxicol Ind Health, 2013, 29(7):633 - 642

20 Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115 - 132

21 Malhotra A, Nair P, Dhawan DK. Modulatory effects of curcumin and resveratrol on lung carcinogenesis in mice[J]. Phytother Res, 2010, 24(9):1271 - 1277

22 Jin H, Qiao F, Wang Y, *et al*. Curcumin inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human non - small cell lung cancer cells through the upregulation of miR - 192 - 5p and suppression of PI3K/Akt signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2015, 34(5):2782 - 2789

23 Chen QY, Zheng Y, Jiao DM, *et al*. Curcumin inhibits lung cancer cell migration and invasion through Rac1 - dependent signaling pathway[J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(2):177 - 185

24 Li S, Liu Z, Zhu F, *et al*. Curcumin lowers erlotinib resistance in non - small cell lung carcinoma cells with mutated EGF receptor[J]. Oncol Res, 2013, 21(3):137 - 144

25 Lee JY, Lee YM, Chang GC, *et al*. Curcumin induces EGFR degradation in lung adenocarcinoma and modulates p38 activation in intestine: the versatile adjuvant for gefitinib therapy [J]. PLoS One, 2011, 6(8):399 - 422

（收稿日期:2018 - 05 - 17）
（修回日期:2018 - 05 - 29）