

瘦素在骨肉瘤细胞增殖迁移中的作用

陈胜¹, 王鹏²

1. 江苏盛泽医院骨科, 江苏 苏州 215228; 2. 江苏盛泽医院普外科, 江苏 苏州 215228

摘要: **目的** 探讨瘦素在骨肉瘤细胞增殖、侵袭、迁移中的影响。**方法** 体外培养骨肉瘤 MG63 细胞,分为 MG63 组、MG63 + 瘦素组(浓度分别为 0、100、200、400、800 ng/ml)。CCK8 试剂盒检测各组 MG63 细胞增殖;转板迁移测定法(Transwell® Migration Assay)检测细胞迁移能力;基质胶侵袭实验(Transwell® Invasion Assays)检测肿瘤细胞侵袭能力。比较不同浓度瘦素作用 MG63 细胞 24 h 对细胞增殖的影响,比较 MG63 组与 MG63 + 瘦素组细胞增殖、细胞侵袭及迁移能力。**结果** 瘦素 200 ng/ml 以下浓度作用下, MG63 细胞生长率上升;瘦素 200 ng/ml 以上浓度作用下, MG63 细胞生长率下降,故细胞增殖、细胞侵袭及迁移能力检测及比较均取瘦素浓度 200 ng/ml, MG63 + 瘦素组细胞增殖能力(光密度, OD 值)明显高于 MG63 组(0.59 ± 0.10 vs 0.34 ± 0.07 , $P < 0.01$)。MG63 + 瘦素组侵袭试验穿膜细胞数明显多于 MG63 组(56.39 ± 6.51 vs 34.23 ± 3.56 , $P < 0.01$)。MG63 + 瘦素组迁移试验穿膜细胞数明显多于 MG63 组(61.06 ± 4.89 vs 39.12 ± 3.25 , $P < 0.01$)。**结论** 瘦素可促进人骨肉瘤细胞 MG63 细胞的增殖、侵袭和迁移。

关键词: 骨肉瘤细胞; 瘦素; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号: R-33 R 738.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2018)01-0056-04

Effect of leptin in the proliferation and migration of osteosarcoma cells

CHEN Sheng*, WANG Peng

* Department of Orthopedics, Jiangsu Shengze Hospital, Suzhou, Jiangsu 215228, China

Corresponding author: WANG Peng, E-mail: wp@njmu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the effect of leptin on proliferation, invasion and migration of osteosarcoma cells. **Methods** The osteosarcoma MG63 cells were cultured in vitro and were divided MG63 group and MG63 + leptin group (concentrations of leptin were 0, 100, 200, 400, 800 ng/ml, respectively). Cell Counting Kit-8 was used to detect the proliferation of osteosarcoma MG63 cells. Transwell migration assay(Transwell® Migration Assay) was used to detect the migration ability. Glue coated transwell matrix invasion assay(Transwell® Invasion Assays) was used to detect the invasion ability. The effects of leptin of different concentration for 24 h on cell proliferation were compared. The abilities of proliferation, invasion and migration were compared between MG63 group and MG63 + leptin group. **Results** MG63 cell growth rate under the action of 200 ng/ml leptin increased, and it decreased under the action of 200 ng/ml leptin, thus the concentration of 200 ng/ml leptin was taken for the detection and comparison of proliferation, invasion and migration of cells. The cell proliferation ability (optical density, OD) in MG63 + leptin group was significantly higher than that in MG63 group(0.59 ± 0.10 vs 0.34 ± 0.07 , $P < 0.01$). Transwell invasion assay showed that the number of cell penetrating membrane in MG63 + leptin group was significantly more than that in MG63 group(56.39 ± 6.51 vs 34.23 ± 3.56 , $P < 0.01$). Transwell migration assay showed that the number of cell penetrating membrane in MG63 + leptin group was significantly more than that in MG63 group(61.06 ± 4.89 vs 39.12 ± 3.25 , $P < 0.01$). **Conclusion** Leptin could promote the proliferation, invasion and migration of human osteosarcoma MG63 cells.

Key words: Osteosarcoma cells; Leptin; Proliferation; Invasion; Migration

骨肉瘤是一种临床常见的恶性骨肿瘤,具有高度恶性、高转移率、预后差等特点^[1-3]。新辅助化疗在一定程度上可抑制肿瘤细胞的增殖和迁移。近 20 年

来国内外在骨肉瘤的治疗策略上一直处于平台期,综合治疗的效果停滞不前,主要是对骨肉瘤细胞增殖和迁移的分子机制,尤其是其化学生物信号的传导途径

尚缺乏深入研究^[4-5]。瘦素主要是一种由肥胖基因编码以及脂肪组织分泌和产生的脂源性激素。近年来研究报道显示,瘦素能够刺激多种肿瘤细胞的增殖,并增加肿瘤细胞的侵袭能力,促进肿瘤内新生血管形成,故瘦素被认为是一种新的促肿瘤生长因子^[6-7]。本文旨在探讨瘦素在骨肉瘤细胞增殖迁移中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人骨肉瘤 MG63 细胞(由四川大学华西药学院国家重点实验室所赠)。

1.2 主要试剂 高糖 DMEM(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),CCK8 试剂盒(日本同仁公司)。

1.3 主要仪器 培养皿(美国 Gibco 公司),24、96 孔细胞培养板(美国 Coster 公司),倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 MG63 细胞培养 MG63 细胞于含 10% 胎牛血清(FBS)及标准浓度青链霉素的 DMEM/F-12 培养基中,放置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养、传代。细胞培养于直径 10 cm 的 Gibco 培养皿中,加入 10 ml 10% FBS 及标准浓度青链霉素的 DMEM/F-12 培养基中,培养至细胞融合率 70% 后,更换无血清培养基,放置 24 h 后给药,瘦素组浓度分别为 0、100、200、400、800 ng/ml。每组均设 4 个复孔。

1.4.2 CCK8 试剂盒检测各组细胞增殖能力 取 96 孔细胞培养板,每孔加入 100 μl 约 2 000 个细胞,培养 8 h。按照实验分组每孔加入 10 μl CCK-8 溶液。继续培养箱内孵育 2 h 后,在 450 nm 测定光密度(OD)值。每组重复 4 次。

1.4.3 转板迁移测定法(Transwell® Migration Assay)检测细胞迁移 Transwell 细胞迁移实验分别取对数生长期的 MG63 细胞。常规消化、计数。24 孔板每孔加 600 μl DMEM 完全培养基,并放入侵袭小杯,每小杯分别接种 1×10^5 个细胞,小杯内补无血清培养基至 400 μl,37 ℃、5% CO₂ 孵箱中常规培养 12 h。取出小杯,常规染色镜检,随机选取 6 个视野计数取均值并照相。实验重复 3 次。见图 1。

1.4.4 基质胶侵袭实验(Transwell® Invasion Assay)检测细胞侵袭 于 Transwell 小室上室中加入 200 μl 无血清 DMEM 培养液,上下室之间用孔径 12 μm 的聚碳酸酯膜分开,膜上铺 Matrigel 胶,120 μg/室(用 50 μl 无血清 DMEM 稀释),37 ℃ 放置 30 min,使其形成凝胶状,上室内滴入单细胞悬液

($5 \times 10^5/\mu\text{l}$) 200 μl/室,下室中滴入 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养基,37 ℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 48 ~ 72 h。取出小室,吸弃上室内的细胞悬液,以棉签小心除去滤膜上室面的细胞和 Matrigel 胶,侵袭并黏附到滤膜下室面的细胞以中性甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次,常规 HE 染色。显微镜($\times 400$)下随机计数 5 个视野内的穿膜细胞数,计算平均值。每组至少设 3 个平行样本。见图 2。

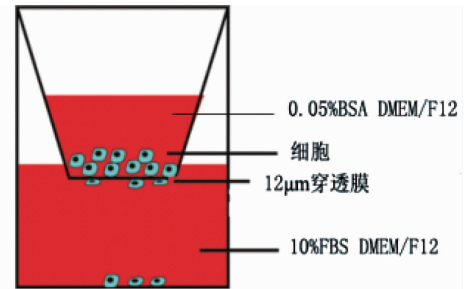


图 1 Transwell 小室 MG63 细胞的迁移力检测

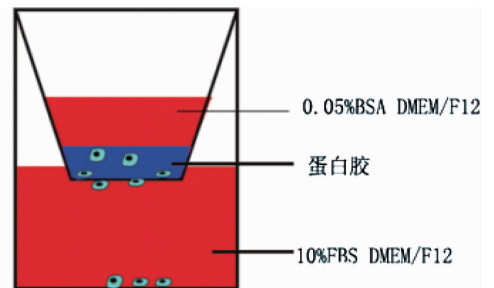


图 2 Transwell 小室 MG63 细胞的侵袭力检测

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件处理数据。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析及多重比较的 Dunnett-*t* 检验,两组间比较行成组 *t* 检验;计数资料采用百分率表示,行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度瘦素作用下 MG63 细胞 24 h 对细胞生长率的影响 瘦素 200 ng/ml 以下浓度作用下, MG63 细胞生长率上升,瘦素 200 ng/ml 以上浓度作用下,细胞生长率下降;故而,取瘦素 200 ng/ml 作为最佳浓度进行比较。见表 1。以下细胞增殖、细胞侵袭及迁移能力检测,瘦素也是取浓度 200 ng/ml。

2.2 两组细胞增殖比较 MG63 + 瘦素(200 ng/ml) 组细胞增殖 OD 值明显高于 MG63 组($P < 0.01$)。即活细胞增多,表明瘦素可促进人骨肉瘤 MG63 细胞增殖。见表 2。

2.3 两组侵袭试验结果比较 MG63 + 瘦素(200 ng/ml) 组侵袭试验穿膜细胞数明显多于 MG63 组($P < 0.01$)。见表 2。

2.4 两组迁移试验结果比较 MG63 + 瘦素 (200 ng/ml) 组迁移试验穿膜细胞数明显多于 MG63 组 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 不同浓度瘦素作用 MG63 细胞 24 h 对细胞生长率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	复孔(n)	细胞生长率(%)
瘦素(0 ng/ml)	4	100.00 ± 0.00*
瘦素(100 ng/ml)	4	189.48 ± 15.46*
瘦素(200 ng/ml)	4	273.10 ± 28.41
瘦素(400 ng/ml)	4	204.32 ± 21.04*
瘦素(800 ng/ml)	4	162.31 ± 15.47*

注:与瘦素(200 ng/ml)比较,* $P < 0.05$ 。

表 2 两组 MG63 细胞增殖、侵袭试验、迁移试验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	复孔(n)	细胞增殖 (OD 值)	侵袭试验 (穿膜细胞数)	迁移试验 (穿膜细胞数)
MG63 组	4	0.34 ± 0.07	34.23 ± 3.56	39.12 ± 3.25
MG63 + 瘦素组	4	0.59 ± 0.10	56.39 ± 6.51	61.06 ± 4.89
<i>t</i> 值		4.0962	5.9732	7.4734
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

骨肉瘤是恶性程度极高的一种骨源性肿瘤,常发生于骨干骺端,具有起病隐匿恶性度高及进展快等特点,骨肉瘤细胞过度增殖和侵袭转移是造成死亡的一个主要原因^[8-9]。肿瘤微环境主要是由多种不同的细胞外基质细胞和基质组成,是肿瘤细胞赖以生存的复杂环境,肿瘤细胞与肿瘤微环境成分间存在相互刺激作用,促进肿瘤发展、转移^[10-11]。临床报道显示,恶性肿瘤生长中局部组织会形成一种慢性缺氧微环境,对肿瘤细胞具有侵袭转移、血管生成及促进生长等作用,进一步促进恶性肿瘤细胞的增殖及侵袭^[12]。

瘦素是脂肪细胞分泌的一种激素,主要由 167 个氨基酸与四螺旋捆绑而成的细胞因子,该脂肪因子主要在脂肪组织产生,但在各种组织包括淋巴组织、骨髓、乳腺上皮细胞、卵巢及胎盘均有所表达^[13-15]。瘦素结合受体主要位于整个中枢神经系统和一些周围组织,目前临床上已确定至少 6 种变化或其亚型,这些亚型具有同型区域,由于 mRNA 剪接的变化在不同细胞内域根据其长度和序列出现变化^[16-18]。瘦素的浓度主要反映体内脂肪储存能量的量。研究报道显示,瘦素具有广泛的生物学效应,具有促进肿瘤细胞生长、侵袭转移及血管生成等作用^[19]。有研究显示,瘦素与多种恶性肿瘤的发生、发展相关,如肺癌、大肠癌及乳腺癌等组织中均检测到瘦素高表达^[20-21]。但目前关于瘦素与骨肉瘤研究甚少。本研究显示,瘦素 200 ng/ml 以下浓度作用下,MG63 细胞

生长率呈上升趋势,瘦素 200 ng/ml 以上浓度作用下,细胞生长率呈下降趋势,故而以 200 ng/ml 瘦素作为最佳浓度进行骨肉瘤细胞增殖、侵袭、迁移能力检测;结果表明,MG63 + 瘦素 (200 ng/ml) 组细胞增殖 OD 值明显高于 MG63 组,侵袭试验穿膜细胞数明显多于 MG63 组,迁移试验穿膜细胞数明显多于 MG63 组,说明瘦素可促进人骨肉瘤细胞 MG63 细胞的增殖、侵袭和转移。

综上所述,在人骨肉瘤细胞 MG63 细胞增殖、侵袭和迁移中,瘦素可起促进作用,具有重要的研究意义,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 彭健,李梅,侯春燕,等. 微小 RNA-496 靶向 β -链蛋白抑制骨肉瘤细胞侵袭转移[J]. 中华实验外科杂志,2016,33(7):1739-1743.
- [2] 王玲,曹娜娜,陈伟,等. 共刺激分子 B7-H3 在骨肉瘤细胞侵袭转移中的作用及机制[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(7):643-647.
- [3] 高浩然,钱澍,薛为高,等. EFEMP1 促进骨肉瘤侵袭及转移能力的研究[J]. 中华全科医学,2016,14(6):897-899,903.
- [4] 邵建立,李志忠,王亮,等. miR-181b 通过靶向调控 N-myc 下游调节基因 2 影响骨肉瘤细胞的迁移和侵袭[J]. 南方医科大学学报,2016,36(3):321-326.
- [5] 苏小桃,何俊,欧军,等. 二甲双胍抑制骨肉瘤 MG63 细胞的迁移和侵袭能力[J]. 重庆医学,2016,45(5):602-605,609.
- [6] Giordano C,Chemi F,Panza S,et al. Leptin as a mediator of tumor-stromal interactions promotes breast cancer stem cell activity[J]. Oncotarget,2016,7(2):1262-1275.
- [7] Wei R,Hu Y,Dong F,et al. Hepatoma cell-derived leptin downregulates the immunosuppressive function of regulatory T-cells to enhance the anti-tumor activity of CD8⁺ T-cells[J]. Immunol Cell Biol,2016,94(4):388-399.
- [8] 冯和林,王进,许建发,等. 低氧状态瘦素对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖与抗凋亡影响[J]. 中华肿瘤防治杂志,2016,23(9):568-572.
- [9] 平勇,邸平山,李卫兵,等. Gab2 在人骨肉瘤细胞 U2-OS 中的表达及意义[J]. 中国病理生理杂志,2015,31(3):568-571.
- [10] 章日春,张弘韬,鄂震,等. 敲低趋化因子受体 7 (CCR7) 抑制 MG63 骨肉瘤细胞的增殖和侵袭并诱导其凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2016,32(12):1585-1589.
- [11] 关红亚,张海风,宋石,等. 大豆苷元激活过氧化物酶体增殖子激活受体 γ 通路抑制人骨肉瘤 MG63 细胞的侵袭和迁移[J]. 中华实验外科杂志,2015,32(7):1563-1565.
- [12] Nepal S, Kim MJ, Hong JT, et al. Autophagy induction by leptin contributes to suppression of apoptosis in cancer cells and xenograft model: involvement of p53/FoxO3A axis[J]. Oncotarget, 2015, 6(9):7166-7181.

(下转第 62 页)

参考文献

- [1] 秦启元,黄斌杰,王磊. 重视直肠癌低位前切除综合征的预防与治疗[J]. 中华结直肠疾病电子杂志,2016,5(3):198-203.
- [2] Emmertsen KJ, Laurberg S. Low anterior resection syndrome score: development and validation of a symptom-based scoring system for bowel dysfunction after low anterior resection for rectal cancer[J]. *Ann Surg*,2012,255(5):922-928.
- [3] 李志强,邢建武. 全直肠系膜切除术与双吻合器技术在低位直肠癌保肛术中应用[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2010,24(11):1109-1110.
- [4] 许珊珊,王立平,回广玲,等. 早期排、控便功能训练对低位、超低位直肠癌前切除患者排便功能的影响[J]. 中华结直肠疾病电子杂志,2014,3(5):62-64.
- [5] Schwandner O. Sacral neuromodulation for fecal incontinence and "low anterior resection syndrome" following neoadjuvant therapy for rectal cancer[J]. *Int J Colorectal Dis*,2013,28(5):665-669.
- [6] 顾晋,潘宏达. 直肠前切除综合征的防范与处理[J]. 中华胃肠外科杂志,2016,19(4):366-369.
- [7] 雷亚楠,丁健华,卓光鑽,等. 直肠癌前切除综合征的危险因素分析[J]. 中国普外基础与临床杂志,2016,23(7):809-812.
- [8] 马明星,丛进春,陈春生,等. 低位直肠癌经内外括约肌间切除术后的低前综合征评分[J]. 中国普外基础与临床杂志,2016,23(10):1225-1230.
- [9] 吴浩旋,张弢,赵任. 影响低位直肠癌前切除综合征的因素[J]. 外科理论与实践,2016,21(4):361-364.
- [10] Juul T, Ahlberg M, Biondo S, et al. International validation of the low anterior resection syndrome score[J]. *Ann Surg*,2014,259(4):728-734.
- [11] 杨映弘,颜璟,吴艳军,等. 结肠成形袋改善直肠癌术后排便功能的长期随访结果[J]. 中华普通外科杂志,2011,26(4):340-341.
- [12] 王木勇,张森. 低位直肠癌前切除综合征[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(4):948-952.
- 收稿日期:2017-07-22 修回日期:2017-08-15 编辑:王国品
- (上接第 58 页)
- [13] Noda T, Kikugawa T, Tanji N, et al. Long-term exposure to leptin enhances the growth of prostate cancer cells[J]. *Int J Oncol*,2015,46(4):1535-1542.
- [14] Kato S, Abarzua-Catalan L, Trigo C, et al. Leptin stimulates migration and invasion and maintains cancer stem-like properties in ovarian cancer cells: an explanation for poor outcomes in obese women[J]. *Oncotarget*,2015,6(25):21100-21119.
- [15] Cao H, Huang Y, Wang L, et al. Leptin promotes migration and invasion of breast cancer cells by stimulating IL-8 production in M2 macrophages[J]. *Oncotarget*,2016,7(40):65441-65453.
- [16] Zheng XJ, Yang ZX, Dong YJ, et al. Downregulation of leptin inhibits growth and induces apoptosis of lung cancer cells via the Notch and JAK/STAT3 signaling pathways [J]. *Biol Open*,2016,5(6):794-800.
- [17] Yousef AI, El-Masry OS, Yassin EH. The anti-oncogenic influence of ellagic acid on colon cancer cells in leptin-enriched microenvironment[J]. *Tumour Biol*,2016,37(10):13345-13353.
- [18] Jamalan M, Rezazadeh M, Zeinali M, et al. Effect of ascorbic acid and alpha-tocopherol supplementations on serum leptin, tumor necrosis factor alpha, and serum amyloid A levels in individuals with type 2 diabetes mellitus [J]. *Avicenna J Phytomed*,2015,5(6):531-539.
- [19] 赵勇,王志刚,章必成,等. 瘦素和瘦素受体在结肠癌组织中的表达及瘦素对结肠癌细胞株 HT-29 增殖及凋亡的影响[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(1):48-51.
- [20] 李矿发,庞雪利,黄云秀,等. 瘦素对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制[J]. 吉林大学学报(医学版),2015,41(1):48-53.
- [21] Santander AM, Lopez-Ocejo O, Casas O, et al. Paracrine Interactions between Adipocytes and Tumor Cells Recruit and Modify Macrophages to the Mammary Tumor Microenvironment: The Role of Obesity and Inflammation in Breast Adipose Tissue[J]. *Cancers (Basel)*,2015,7(1):143-178.
- 收稿日期:2017-06-25 修回日期:2017-08-20 编辑:周永彬