

# 艾塞那肽抑制子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株裸鼠移植瘤的血管生成

张宇<sup>1</sup>, 成娟<sup>1</sup>, 徐芬<sup>2</sup>

(中山大学附属第三医院 1. 妇科, 2. 内分泌科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨艾塞那肽在子宫内膜癌细胞株 Ishikawa 裸鼠皮下移植瘤内血管生成中的作用。【方法】构建子宫内膜癌细胞株 Ishikawa 裸鼠皮下移植瘤动物模型; 实验分为艾塞那肽组和对照组; 采用免疫组化的方法检测瘤内微血管密度(MVD, CD31 阳性)和巨噬细胞浸润密度(MID, F4/80 阳性); 采用 Western blot 检测瘤内的血管生成因子(VEGF)的含量。【结果】①艾塞那肽组瘤内 MVD-CD31 阳性为  $(13.2 \pm 1.4)/400$  高倍镜, 比对照组的  $(25.9 \pm 5.8)/400$  高倍镜少 ( $P < 0.01$ )。②艾塞那肽组的瘤内 VEGF 含量低于对照组 ( $P < 0.05$ )。③艾塞那肽组瘤内 MID-F4/80 阳性为  $(31.4 \pm 3.4)\%$ , 比对照组的  $(72.1 \pm 4.2)\%$  低 ( $P < 0.01$ )。【结论】艾塞那肽可减少子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株裸鼠移植瘤局部的肿瘤相关巨噬细胞的浸润, 减少 VEGF 生成, 抑制移植瘤内的血管生成。

**关键词:** 艾塞那肽; 子宫内膜癌; Ishikawa; 血管生成

中图分类号: R774.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)03-0327-05

## Exenatide Weakens Tumor Angiogenesis within Endometrial Cancer Ishikawa Xenografts in Nude Mice

ZHANG Yu<sup>1</sup>, CHENG Juan<sup>1</sup>, XU Fen<sup>2</sup>

(1. Departments of Gynecology, 2. Endocrinology and Metabolism, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: XU Fen, E-mail: xufen0815@hotmail.com

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the role of exenatide on angiogenesis in endometrial cancer Ishikawa xenografts in nude mice. 【Method】 We used the subcutaneous human endometrial cancer cell Ishikawa xenografts in nude mice model, and divided them into control group and exenatide-treated group. The harvested tumors were preserved for immunohistochemistry staining and western blot analysis. 【Results】 The micro-vessel density (CD31 positive) in exenatide-treated group was  $(13.2 \pm 1.4)/400$  power field, less than that in control group [ $(25.9 \pm 5.8)/400$  power field] ( $P < 0.01$ ). The expression level of VEGF was significantly lower in exenatide-treated group than that in control group ( $P < 0.05$ ). The mean density of tumor associated macrophages (F4/80 positive) is  $(31.4 \pm 3.4)\%$  in exenatide-treated group and  $(72.1 \pm 4.2)\%$  in control group with significant difference ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】 Exenatide weakens tumor angiogenesis within endometrial cancer Ishikawa xenografts in nude mice.

**Key words:** exenatide; endometrial cancer; Ishikawa; angiogenesis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(3): 327-331]

子宫内膜癌是女性生殖道常见的三大肿瘤之一,在发达国家女性恶性肿瘤中排名第四位<sup>[1]</sup>。大量的研究表明肥胖、糖尿病和胰岛素抵抗是子宫内膜癌发病的高危因素<sup>[2-3]</sup>,糖尿病患者发生子

宫内膜癌的几率是非糖尿病患者的2倍<sup>[4]</sup>,而且糖尿病也会增加子宫内膜癌患者的病死率<sup>[5-6]</sup>。而且,抗糖尿病药物对恶性肿瘤的作用倍受关注,目前越来越多的证据提示不同的糖尿病药物与恶

收稿日期: 2017-01-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81300705)

作者简介: 张宇, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: zy2270716468@163.com; 徐芬, 通信作者, E-mail: xufen0815@hotmail.com

性肿瘤存在不同的风险关系。胰高血糖素样肽-1受体激动剂类药物如艾塞那肽近几年用于临床,是否会对肿瘤产生某些作用,临床医师非常关注。我们的研究显示艾塞那肽可以抑制子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株的裸鼠皮下移植瘤体积的增长<sup>[7]</sup>;本文通讯作者及其他研究者的研究提示艾塞那肽可减少机体炎症反应<sup>[8-10]</sup>,减少巨噬细胞的浸润<sup>[11]</sup>。而新生血管生成有赖于巨噬细胞<sup>[12-13]</sup>,目前关于艾塞那肽对子宫内膜癌的血管生成作用尚未见有报道。因此,本研究建立子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株的裸鼠皮下移植瘤的动物模型,分为艾塞那肽组和对照组;采用免疫组化的方法检测瘤内微血管密度(MVD, CD31 阳性)和巨噬细胞浸润密度(MID, F4/80 阳性);采用 Western blot 检测瘤内的血管生成因子(VEGF)的含量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物与细胞

4周龄的无特殊病原体(special pathogen free, SPF)BALB/c 雌性裸鼠,平均体质量 16~18 g(北京维通利华实验动物技术有限公司),许可证:SCXY(京)2006-2009。饲养于中山大学附属第三医院疫苗研究所动物实验室 SPF 级屏障系统内,设施使用合格证号:SYXK(粤)2007-0083。人子宫内膜癌细胞株 Ishikawa 由中山大学附属第三医院妇科实验室保存。

### 1.2 主要试剂

胎牛血清购自 Hyclone 公司,DMEM 和胰酶购自 Gibco 公司,艾塞那肽购自 Lily 公司,抗鼠 CD31 抗体和 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology,抗鼠 F4/80 购自 Santa Cruz,抗 VEGF 抗体(即抗兔 VEGF-A 抗体)购自 Merck Millipore。

### 1.3 主要方法

1.3.1 细胞培养 Ishikawa 细胞于含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM 培养液中培养。细胞于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 的条件下进行培养。

1.3.2 人子宫内膜癌裸鼠模型的建立及实验分组 取 4 周龄裸鼠 10 只,适应性喂养 1 周。取对数生长期的 Ishikawa 细胞,以 0.25% 胰酶消化后制成单细胞悬液,每只裸鼠接种 0.2 mL ( $3 \times 10^7$ /mL) 细胞悬液,接种于裸鼠右侧臀部皮下。1 周后,随

机分为艾塞那肽组(5 只)和对照组(5 只),开始进行药物治疗。艾塞那肽组的裸鼠按每天每公斤体质量 24 nmol/L 艾塞那肽,腹腔内注射;对照组的裸鼠予腹腔注射等量的生理盐水,6 d/周,共 4 周。

1.3.3 移植瘤组织处理与观察 干预结束处死裸鼠,取出瘤组织,分取部分组织冻存于 -80 $^{\circ}$ C,部分瘤体中性甲醛固定,石蜡包埋,常规切片作免疫组化,中性树胶封片,光镜下观察。

1.3.4 免疫组化 组织石蜡切片脱蜡水化,加入过氧化物酶阻断溶液室温下孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶的活性,根据抗体使用说明用稀释的鼠抗 CD31(1:300)及鼠抗 F4/80(1:100)室温孵育切片,再用生物素标记的第二抗体孵育,然后 DAB 染色并冲洗,苏木素复染,冲洗,脱水,在光学显微镜下观察。MVD 计数法参照 Weidner<sup>[14]</sup>方法进行量化分析,即每张标本首先在低倍镜下寻找血管高密度集中的区域作为“热点”,然后在高倍镜下选取 5 个视野计数微血管密度,取其平均值作为该标本的 MVD。任何一个与周围其它组织有明显界限、胞浆呈棕染的单个内皮细胞或内皮细胞簇,无论有无管腔、无论管腔内有无红细胞均定义为一个微血管,凡管腔直径大于 8 个红细胞或管壁有明显肌层以及纤维硬化、炎症及坏死的微血管均不计入总数。F4/80 的免疫组化阳性结果为细胞膜及包浆上的棕黄染色。细胞计数采用 40 倍物镜下观察,每样品计 10 个视野,统计 40 倍物镜下的阳性细胞数。

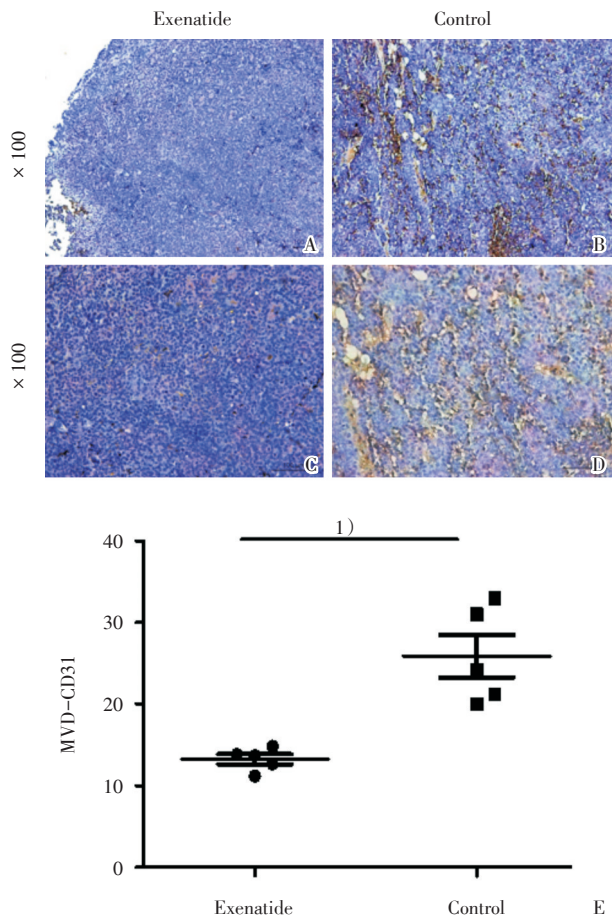
1.3.5 Western blotting 检测 VEGF 蛋白表达 提取一块瘤体组织的蛋白,紫外分光光度计定量,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印至硝酸纤维素膜上,常规进行免疫印迹实验操作,分别 VEGF 兔抗(1:500)和 GAPDH 鼠抗(1:200)及  $\beta$  抗抗体(1:10 000)孵育,增强发光(ECL)显色。对膜上的免疫复合物条带进行分析。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学的处理,各组间各指标的比较先采用正态性检验和方差齐性检验;若为正态分布且方差齐则采用 *t* 检验,不符合正态分布的计量资料则采用 Mann-Whitney *U* 检验。按  $\alpha = 0.05$  的检验水准,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 艾塞那肽减少移植瘤内的 CD31 表达



A-D: The positive staining of CD31 is brown in immunohistochemical sections and expresses in cytoplasm of vascular endothelial cells ( $\times 400$ ). E: Data shown are CD31-MVD of each individual tumor with the mean indicated by a horizontal line  $\pm$  SE. 1)  $P = 0.009 < 0.01$ .

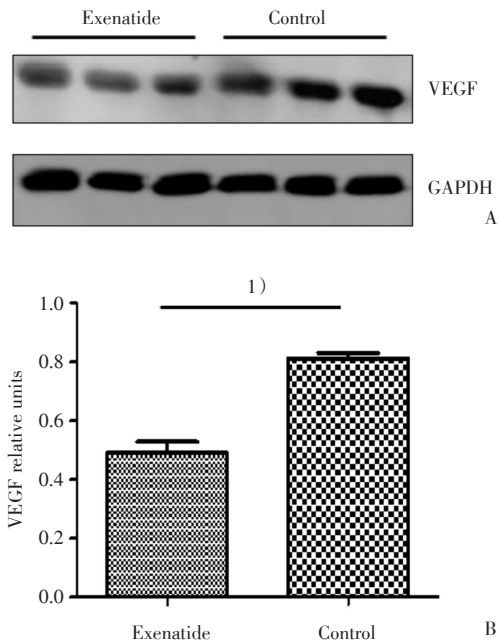
图1 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株裸鼠皮下移植瘤内 CD31 的表达情况

Fig.1 Exenatide reduces CD31 expression in endometrial cancer Ishikawa xenografts

CD31 表达阳性为在血管上皮胞浆内棕色颗粒。对于子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株裸鼠移植瘤的石蜡切片进行 CD31 免疫组化并进行计算 CD31 阳性的平均血管密度 (MVD-CD31 阳性), 结果艾塞那肽组为  $(13.2 \pm 1.4)$ , 对照组为  $(25.9 \pm 5.8)$ , 两者的差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 1A, B), 提示艾塞那肽可减少子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株裸鼠移植瘤的血管生成。

### 2.2 艾塞那肽减少移植瘤的 VEGF 表达

血管的生成需要 VEGF, 我们进行 western blot 检测移植瘤内的 VEGF 表达, 结果艾塞那肽组中的 VEGF 表达量明显比对照组的低 ( $P < 0.05$ , 图 2A, B), 表明艾塞那肽可减少子宫内膜癌 Ishikawa



A: The tumor tissues whose phenotype were in the middle ( $n = 3$  in each group) were selected to detect protein VEGF and GAPDH (as a loading control) by Western Blot analysis. B: The expression level of VEGF protein was significantly lower in the exenatide group than that in control group from three independent experiments of Western Blot analysis. 1)  $P = 0.019 < 0.05$ .

图2 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株裸鼠皮下移植瘤内 VEGF 的表达情况

Fig.2 Exenatide decreases VEGF expression in endometrial cancer Ishikawa xenografts

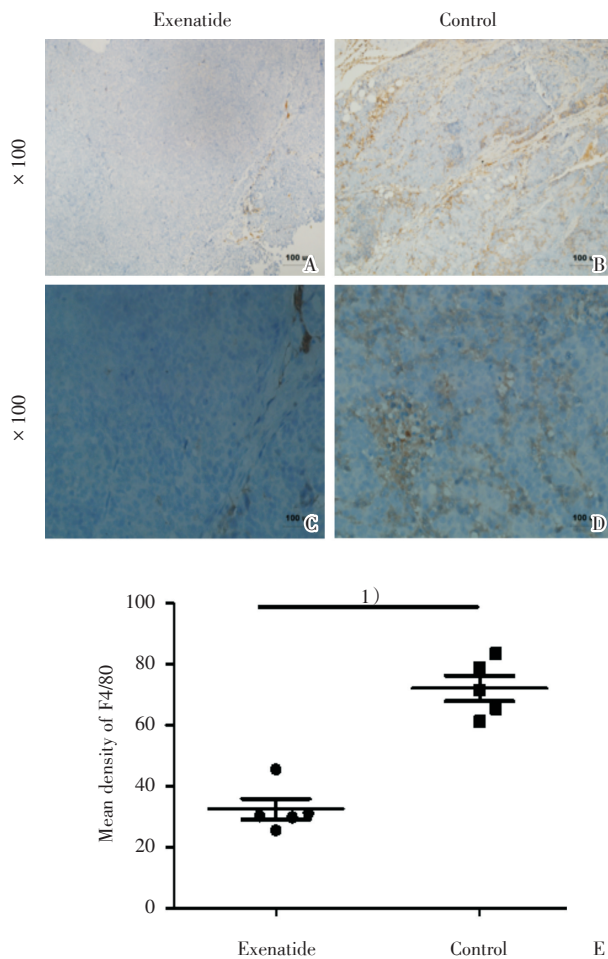
细胞株裸鼠移植瘤的 VEGF 表达, 从而减少血管生成。

### 2.3 艾塞那肽减少移植瘤内的巨噬细胞 (F4/80 阳性) 浸润

肿瘤相关的巨噬细胞可分泌血管生成因子如 VEGF, 而 F4/80 蛋白在越成熟的巨噬细胞中分泌越多<sup>[12]</sup>。本研究的结果显示艾塞那肽组的 F4/80 的表达平均密度为  $(31.4 \pm 3.4)\%$ , 而对照组的为  $(72.1 \pm 4.2)\%$ , 两组的差异存在统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 3), 说明艾塞那肽可减少子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株裸鼠移植瘤内的巨噬细胞浸润。

## 3 讨论

目前, 艾塞那肽已在全球广泛应用于抗糖尿病治疗中, 并显示出许多胰腺以外的获益, 其中艾塞那肽可抑制机体的炎症及巨噬细胞浸润。糖



A-D: F4/80 positive staining indicates macrophages in immunohistochemical sections. E: Data shown (right panel) are Macrophages (F4/80 positive) infiltration density of each individual tumor with the mean indicated by a horizontal line $\pm$ SE. 1)  $P = 0.004 < 0.01$ .

图3 子宫内膜癌Ishikawa细胞裸鼠皮下移植瘤内F4/80的表达情况

Fig.3 Exenatide lessens macrophages (expressing F4/80) in endometrial cancer Ishikawa xenografts

尿病、肥胖及胰岛素抵抗是子宫内膜癌的高危因素,许多子宫内膜癌的患者同时合并糖尿病需要降血糖治疗,那么,艾塞那肽对子宫内膜癌组织的影响也备受关注。本研究结果显示艾塞那肽可以抑制子宫内膜癌细胞株Ishikawa裸鼠移植瘤内的巨噬细胞浸润,减少VEGF的含量,减少血管生成。

肿瘤局部的血管生成决定肿瘤局部的生长及转移。一般而言,肿瘤局部的淋巴细胞包括肿瘤相关的巨噬细胞(TAM)来自血液中的单核细胞,浸润到肿瘤组织。之前这些淋巴细胞更多地被认为是对肿瘤组织的生长起到免疫

监视的作用。但近年来许多研究表明TAM与肿瘤的生物行为包括生长、增殖、基质形成及血管生成更为相关<sup>[15]</sup>。TAM可以分泌血管生成因子例如VEGF<sup>[16]</sup>、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )<sup>[17]</sup>、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和白介素-8<sup>[18]</sup>等来发挥它的作用。VEGF是最熟知的血管生成因子<sup>[19-20]</sup>。

肿瘤的微小血管密度(Micro-Vessel Density, MVD)是一个重要的肿瘤微循环指标。使用免疫组化方法检测血管内皮的标记抗体常见的有VWF抗体、CD抗体和CD抗体,而CD31抗体更好地标记新生血管。本研究中艾塞那肽组的MVD-CD31显著低于对照组,表明艾塞那肽可以减少子宫内膜癌细胞株Ishikawa裸鼠移植瘤的血管生成。

F4/80是小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体1(EMR1),它的68%的氨基酸序列与人成熟的巨噬细胞分泌的EMR1相同。巨噬细胞通过生成分泌细胞因子刺激血管生成<sup>[12]</sup>。近期的研究表明艾塞那肽通过激活SIRT1降低血TNF- $\alpha$ 水平、ATGL和HSL脂解相关蛋白的表达来促进肥胖小鼠脂肪组织脂解作用<sup>[8]</sup>。另外exendin-4(艾塞那肽的主体)通过减少肝内的巨噬细胞募集和活化,而减少肝内组织的炎症反应<sup>[11]</sup>;exendin-4不仅改善肝脏的代谢紊乱并且减轻肝脏的炎症反应<sup>[9]</sup>。另一研究表明exendin-4可以迅速地从细胞水平和因子水平上减轻机体的炎症反应,而且并不依赖于体重减轻,其中减少的炎症因子有TNF $\alpha$ 、interleukin-1 $\beta$ 、JNK-1、TLR-2、TLR-4和SOCS-3<sup>[10]</sup>。我们之前的研究显示脂肪组织的血管生成与巨噬细胞的功能不全是相关的<sup>[13]</sup>。本研究结果同样显示艾塞那肽可以减少子宫内膜癌细胞株Ishikawa裸鼠移植瘤内的成熟型巨噬细胞(F4/80阳性),并可能与瘤体内VEGF的减少相关,减少肿瘤组织内的血管生成。

综上所述,本研究提示艾塞那肽可减少子宫内膜癌Ishikawa细胞株的裸鼠皮下移植瘤内的巨噬细胞浸润,降低肿瘤组织内的VEGF含量,抑制肿瘤局部的血管生成。期待增加样本量来证实本研究的结论,并进一步研究瘤体内血管生成受抑制的具体机制,及与瘤体生长受限的因果关系及机制。

## 参考文献:

- [1] Rebecca LS, Kimberly DM, Ahmedin JD. Cancer Statistics, 2016 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(4):7-30.
- [2] Fader AN, Arriba LN, Frasure HE, et al. Endometrial cancer and obesity: Epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(1): 121-127.
- [3] Gruenigen VE, Gil KM, Frasure HE, et al. The impact of obesity and age on quality of life in gynecologic surgery [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(4): 1369-1375.
- [4] Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, et al. Diabetes and cancer: A consensus report [J]. *Diabetes Care*, 2010, 60(4): 207-221.
- [5] Chia VM, Newcomb PA, Trentham DA, et al. Obesity, diabetes, and other factors in relation to survival after endometrial cancer diagnosis [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2007, 17(2): 441-446.
- [6] Calla EE, Rodriguez C, Walker TK, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of adults [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(17): 1625-1638.
- [7] Yu ZH, Fen X, Hua L, et al. Exenatide inhibits the growth of endometrial cancer Ishikawa xenografts in nude mice [J]. *Oncology Reports*, 2016, 35(9): 1340-1348.
- [8] 林倍思,许海霞,梁华,等. GLP-1受体激动剂对肥胖小鼠脂肪组织的脂解作用及机制探讨 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(11): 2021-2026.  
Lin BS, Xu HX, Liang H, et al. Effect of GLP-1 receptor agonist on lipolysis in adipose tissue of obese mice and its underlying mechanism [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2015, 31(11): 2021-2026.
- [9] Hui Ch, David S, Katherine P, et al. Exendin-4 is effective against metabolic disorders induced by intrauterine and postnatal overnutrition in rodents [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(3): 614-622.
- [10] Chaudhuri A, Ghanim H, Vora M, et al. Exenatide exerts a potent antiinflammatory effect [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(1): 198-207.
- [11] Pang C, Gao Z, Yin J, et al. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(2): E313-322.
- [12] Wang Y, Parlevliet ET, Geerling JJ, et al. Exendin-4 decreases liver inflammation and atherosclerosis development simultaneously by reducing macrophage infiltration [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(3): 723-734.
- [13] Xu F, David B, Gao Z, et al. Angiogenic deficiency and adipose tissue dysfunction are associated with macrophage malfunction in SIRT1-/- Mice [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(4): 1706-1716.
- [14] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2):168-180.
- [15] Fukuda K, Kobayashi A, Watabe K. The role of tumor-associated macrophage in tumor progression [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012, 4(1):787 - 798.
- [16] Zhao J, Chen L, Shu B, et al. Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor influences angiogenesis by regulating the coordinated expression of VEGF and the ang/tie system [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92691.
- [17] Leek RD, Landers R, Fox SB, et al. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(12): 2246-2251.
- [18] Chen JJ, Yao PL, Yuan A, et al. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and IgG immune complexes potentiate the process [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23):7042-7049.
- [19] Solinas G, Germano G, Mantovani A, et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(5): 1065-1073.
- [20] Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(9): 551-564.

(编辑 徐杰)