

# 细胞外信号调节激酶 1/2 在瘦素促进子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖中的作用

龚成, 刘义, 肖维, 尹婕, 王冬花, 盛慧

## The Role of ERK1/2 in Leptin Promoting the Proliferation of Human Endometrial Cancer Cell Line Ishikawa

GONG Cheng, LIU Yi, XIAO Wei, YIN Jie, WANG Dong-Hua, SHENG Hui

华中科技大学同济医学院  
附属协和医院妇产科,  
湖北 武汉 430022

Department of Gynecology and  
Obstetrics,  
Union Hospital,  
Tongji Medical College,  
Huazhong University of Science  
and Technology,  
Wuhan, Hubei, 430022,  
P. R. China

通讯作者: 刘义  
Correspondence to: LIU Yi  
Tel: 86-27-85351614  
E-mail: liqun94@163.com

收稿日期: 2007-04-17  
修回日期: 2007-05-29

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Epidemiologic studies showed that leptin is closely related to the tumorigenesis of endometrial cancer, but the mechanism is unclear. As a mitogenic agent, leptin can promote the proliferation of many kinds of cells. This study was to explore the role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in leptin promoting the proliferation of human endometrial cancer cell line Ishikawa. METHODS: The expression of leptin receptor OB-Rb in Ishikawa cells was detected by fluoroimmunoassay. Ishikawa cells were treated by leptin at various concentrations (0, 10, 50, 100, and 150 ng/ml) for different time (6, 12, and 24 h). Cell proliferation was examined by MTT assay. Meanwhile, the effect of PD98059, selective inhibitor of ERK1/2, on the proliferation of Ishikawa cells induced by leptin was also studied. Ishikawa cells were treated with 100 ng/ml leptin for different time (20, 40, and 60 min), then the levels of phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) and ERK1/2 were examined by Western blot. RESULTS: Fluoroimmunoassay showed the presence of OB-Rb in Ishikawa cells. Leptin stimulated the proliferation of Ishikawa cells. This effect was maximal at 100 ng/ml after 24-hour treatment, and there was no significant difference between 100 ng/ml group and 150 ng/ml group ( $P=0.129$ ). Blocking ERK1/2 phosphorylation by PD98059 significantly reduced the proliferation of Ishikawa cells stimulated by leptin. When treated with 100 ng/ml Leptin and 100  $\mu\text{mol/L}$  PD98059 for 24 h, cell proliferation rate was  $(6.88 \pm 0.86)\%$ . ERK1/2 phosphorylation was enhanced significantly in Ishikawa cells after treatment of 100 ng/ml leptin. CONCLUSION: Leptin may promote the proliferation of endometrial cancer Ishikawa cells by activating ERK1/2 signaling pathway.

KEYWORDS: Endometrial neoplasm; Leptin; Signal-regulated kinase; Ishikawa cell; Proliferation

【摘要】背景与目的: 流行病学研究提示瘦素与子宫内膜癌的发生有关, 但其作用机制尚不清楚。瘦素作为促有丝分裂原, 能够显著促进多种细胞的生长增殖。本研究的目的在于探讨细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 在瘦素促进子宫内膜癌细胞增殖中的作用。方法: 免疫荧光染色检测 Ishikawa 细胞中瘦素受体的表达; 于 Ishikawa 细胞中分别加入不同浓度的瘦素 (0、10、50、100、150 ng/ml), 作用不同时间 (6、12、24 h), MTT 法检测各组细胞的增殖情况; 同时应用 ERK1/2 激酶特异性抑制剂 PD98059 阻断 ERK1/2 磷酸化, 观察其对瘦素促进 Ishikawa 细胞增殖的影响; 应用免疫印迹技术检测 100 ng/ml 瘦素作用于 Ishikawa 细胞不同时间后 (20、40、60 min) ERK1/2 的活化水平 (以 p-ERK1/2 与 ERK1/2 的比值表示)。结果: 免疫荧光检测结果证实 Ishikawa 细胞存在瘦素受体的表达; 瘦素能明显促进 Ishikawa 细胞的增殖, 在 0~100 ng/ml 范围内瘦素浓度越高, 细胞增殖越显著, 100 ng/ml 瘦素作用 24 h 其增殖效应最大 (A

值=0.73±0.02), 100 ng/ml 组与 150 ng/ml 组差异无统计学意义( $P=0.129$ ); PD98059 能明显抑制瘦素对 Ishikawa 细胞的增殖作用, 100 ng/ml 瘦素和 100  $\mu\text{mol/L}$  PD98059 作用 24 h 后, 细胞增殖率为(6.88±0.86)%; Ishikawa 细胞经 100 ng/ml 瘦素处理后, ERK1/2 活化程度明显增高。结论: 瘦素可能通过激活 ERK1/2 信号转导途径促进子宫内膜癌细胞的增殖。

关键词: 子宫肿瘤; 瘦素; 信号调节激酶; Ishikawa 细胞; 增殖

中图分类号: R737.33 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2007)11-1211-04

子宫内膜癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一, 其发病机制一直倍受关注。流行病学研究显示, 瘦素与子宫内膜癌的发生密切相关<sup>[1]</sup>, 但其作用机制迄今尚未明了。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的一个亚族, 参与细胞增殖、分化等信号的转导, 该信号转导通路的过度活化与肿瘤的发生密切相关。ERK1 和 ERK2 是 ERK 的两个重要成员, 本研究探讨 ERK1/2 信号转导通路在瘦素促进子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 增殖中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 购自美国 ATCC 公司。人瘦素购自 Peprotech 公司; 培养基 DMEM (高糖) 购自 Gibco-BRL 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 胰蛋白酶购自 Difco 公司; 鼠抗人 ERK1/2 单克隆抗体、鼠抗人 ERK1/2 磷酸化(Thr202/Tyr204)单克隆抗体、鼠抗人 OB-Rb 多克隆抗体均购自 Upstate 公司; FITC 标记羊抗鼠抗体(二抗)和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(二抗)购自博士德公司; ERK1/2 激酶特异性抑制剂 PD98059 购自 Promega 公司; RIPA 细胞裂解液购自碧云天科技公司; MTT 购自 Biomol 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 ECL 发光试剂购自 Pierce Chemical 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Ishikawa 细胞置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 并消化、传代。

1.2.2 免疫荧光染色检测 OB-Rb 表达 将对数生长期细胞接种于含盖玻片的 6 孔板内, 培养 12 h。待细胞充分贴壁后, 取出盖玻片用冷甲醇固定 20 min, 自然干燥 10 min, 然后用 0.01 mol/L PBST

(20 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 漂洗 5 min×3 次。1:10 稀释的兔血清 37℃ 封闭 30 min, 滴加鼠抗人 OB-Rb 一抗(1:100), 4℃ 过夜。PBST 漂洗 5 min×3 次, 滴加 FITC 标记的羊抗鼠二抗(1:100), 避光 37℃ 孵育 1 h, PBST 洗 5 min×3 次, 加入甘油缓冲液封片保存, 在荧光显微镜下观察。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 瘦素对 Ishikawa 细胞增殖的影响 取对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 按  $5\times 10^3$  个细胞/孔(每孔 200  $\mu\text{l}$ ) 接种于 96 孔板, 贴壁生长后, 换无血清 DMEM 饥饿培养 24 h, 使细胞同步化。分别加入含瘦素浓度为 0、10、50、100 和 150 ng/ml 的 DMEM 培养基(含 5%胎牛血清), 每个浓度设 10 个平行孔, 其中无瘦素(0 ng/ml) 组为对照组。继续培养 6、12、24 h 后, 每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu\text{l}$ , 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 150  $\mu\text{l}$  DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测定 570 nm 波长处每孔的吸光度值(A 值), 以不加细胞的空白孔调零。

1.2.4 ERK1/2 激酶抑制剂 PD98059 对瘦素促细胞增殖效应的影响 细胞处理同上, 经血清饥饿培养 24 h 后, 换含 5%胎牛血清的 DMEM 培养基, 分别用以下方法处理: 100 ng/ml 瘦素; 100 ng/ml 瘦素+20  $\mu\text{mol/L}$  PD98059; 100 ng/ml 瘦素+50  $\mu\text{mol/L}$  PD98059; 100 ng/ml 瘦素+100  $\mu\text{mol/L}$  PD98059。用含 5%胎牛血清的 DMEM 培养基作为对照组, 每组均设 6 个平行孔。分别在培养 6、12、24 h 后用 MTT 法检测细胞增殖情况, 相同实验重复 3 次。计算细胞增殖率, 细胞增殖率=(实验组平均 A 值-对照组平均 A 值)/对照组平均 A 值×100%。

1.2.5 Western blot 检测 ERK1/2 的活化 取对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 按  $1\times 10^6$  个细胞/孔接种于 6 孔板, 贴壁生长后, 加入 100 ng/ml 瘦素, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱分别孵育 20、40、60 min, 每组设 6 个平行孔。根据 RIPA 试剂盒说明书提取细胞内总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。取 50  $\mu\text{g}$  蛋白样品进行电泳, 转膜, 封闭, 加入鼠抗人 ERK1/2 磷酸化一抗(1:1000) 4℃ 孵育过夜, 洗涤后加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:500), 37℃ 孵育 2 h, 充分洗涤后加入 ECL 发光试剂, 在 X 线胶片上曝光, 显影。再次洗膜, 封闭, 加入鼠抗人 ERK1/2 一抗(1:1000) 行第二次免疫印迹, 方法同前, 洗片并将图像扫描后应用 BandScan5.0 (Glyko 公司) 检测各条带 A 值, 以 p-ERK1/2 和 ERK1/2 的比值表示 ERK1/2 的活化程度。

1.3 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS12.0 软件处理数据, 多组均数比较采用单因素方差分析。P<0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光染色

免疫荧光染色结果显示 Ishikawa 细胞存在瘦素受体, 呈强绿色荧光(图 1)。

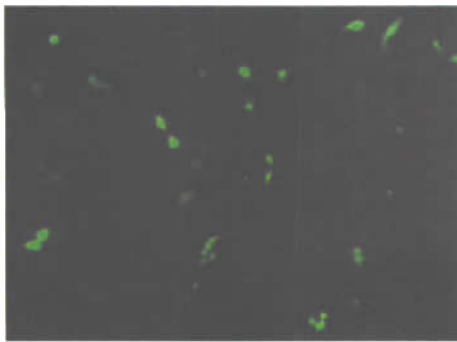


图 1 Ishikawa 细胞中瘦素受体的免疫荧光染色(SP ×200)

Figure 1 Fluoroimmunoassay of leptin receptor OB-Rb in Ishikawa cells (SP ×200)

Green fluorescence is observed in Ishikawa cells at wavelength of 510 nm.

2.2 瘦素对 Ishikawa 细胞增殖的影响

瘦素对 Ishikawa 细胞的增殖有促进作用, 10 ng/ml 瘦素作用 24 h 后显示出促增殖效应, 其余各浓度组在 6、12、24 h 时与对照组比较均明显促进细胞增殖。在 0~100 ng/ml 范围内瘦素浓度越高, 细胞增殖越明显, 瘦素浓度达 100 ng/ml 其增殖效应最大, 150 ng/ml 组与 100 ng/ml 组比较, 差异无统计学意义(P=0.129)(表 1)。

2.3 PD98059 对瘦素刺激 Ishikawa 细胞增殖的影响

加入 PD98059 阻断 ERK1/2 磷酸化, 可明显抑制瘦素对 Ishikawa 细胞的促增殖作用。不同浓度 PD98059 作用 6、12、24 h 后, 均显示随 PD98059 浓度增高, 对瘦素刺激 Ishikawa 细胞增殖的抑制作用逐渐增强, 各组之间比较差异有统计学意义(P<0.01)(表 2)。

2.4 瘦素对 Ishikawa 细胞 ERK1/2 活化的影响

无瘦素刺激时, Ishikawa 细胞便有一定量的 ERK1/2 活性; 经 100 ng/ml 瘦素处理后, 随时间延长 Ishikawa 细胞 ERK1/2 活化水平逐渐增高, 且持续至少达 60 min(图 2)。

表 1 不同浓度的瘦素对 Ishikawa 细胞增殖的刺激作用  
Table 1 Effect of leptin at different concentrations on the proliferation of Ishikawa cells

Leptin (ng/ml)	Cell proliferation rate (%)		
	6 h	12 h	24 h
0	0.35 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.52 ± 0.01
10	0.37 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.65 ± 0.02 <sup>a</sup>
50	0.54 ± 0.03 <sup>a,b</sup>	0.64 ± 0.02 <sup>a,b</sup>	0.68 ± 0.02 <sup>a,b</sup>
100	0.60 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>	0.73 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>
150	0.62 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>	0.72 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>	0.74 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>

All values are presented as mean ± SD of 10 experiments. <sup>a</sup>P<0.01, vs. 0 ng/ml group; <sup>b</sup>P<0.01, vs. 10 ng/ml group; <sup>c</sup>P<0.01, vs. 50 ng/ml group.

表 2 PD98059 对瘦素刺激 Ishikawa 细胞增殖的抑制作用  
Table 2 Effect of PD98059 on the proliferation of Ishikawa cells

Group	Cell proliferation rate (%)		
	6 h	12 h	24 h
Leptin (100 ng/ml)	70.08 ± 3.85	70.63 ± 4.12	39.77 ± 2.13
Leptin (100 ng/ml) plus PD98059 (20 μmol/L)	40.17 ± 3.56 <sup>a</sup>	44.66 ± 3.87 <sup>a</sup>	20.84 ± 1.94 <sup>a</sup>
Leptin (100 ng/ml) plus PD98059 (50 μmol/L)	22.16 ± 1.79 <sup>b</sup>	22.09 ± 2.16 <sup>b</sup>	11.85 ± 1.20 <sup>b</sup>
Leptin (100 ng/ml) plus PD98059 (100 μmol/L)	7.20 ± 1.31 <sup>b</sup>	7.28 ± 1.17 <sup>b</sup>	6.88 ± 0.86 <sup>b</sup>

All values are presented as mean ± SD of 3 experiments. <sup>a</sup>P<0.01, <sup>b</sup>P<0.001, vs. leptin group.

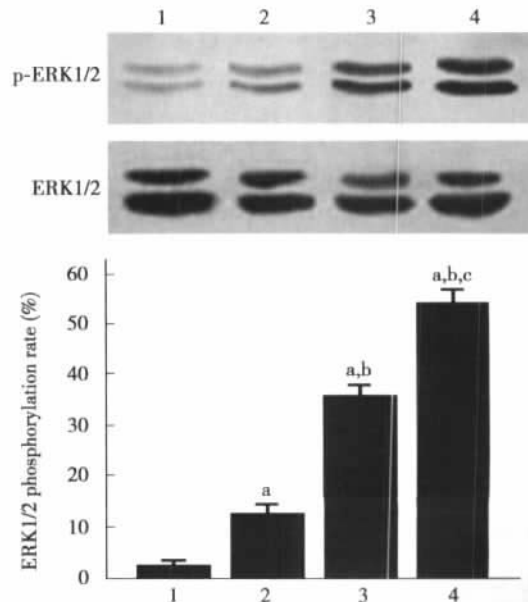


图 2 100 ng/ml 瘦素作用不同时间后 Ishikawa 细胞中 ERK1/2 的活化水平

Figure 2 ERK1/2 activation in Ishikawa cells after treatment of 100 ng/ml leptin

Lane 1; Ishikawa cells before treatment; lanes 2-4; Ishikawa cells treated with 100 ng/ml leptin for 20, 40, and 60 min. <sup>a</sup>P<0.01, vs. control group; <sup>b</sup>P<0.01, vs. 20 min group; <sup>c</sup>P<0.01, vs. 40 min group.

### 3 讨论

#### 3.1 瘦素与子宫内膜癌

瘦素是肥胖基因编码的一种多肽类激素,主要由白色脂肪细胞分泌,参与调节机体的能量代谢、激素分泌、生殖和免疫等功能<sup>[2]</sup>。在肿瘤的增殖、侵袭和转移中,瘦素也起着重要的作用<sup>[3]</sup>。体外研究结果显示,瘦素可作为生长因子刺激体外人类多种肿瘤细胞的生长<sup>[4-6]</sup>。正常子宫内膜组织中存在瘦素受体的表达,并呈周期性变化<sup>[7]</sup>。Yuan 等<sup>[8]</sup>研究发现子宫内膜组织中瘦素受体的异常表达可能参与了子宫内膜癌的发生。另外瘦素能够诱导芳香酶活性,而该酶可以将来源于人类脂肪组织中的雄烯二酮催化成雌酮,从而调节雌激素的生成活性,因此具有影响雌激素依赖性子宫内膜癌的生物行为的能力<sup>[9]</sup>。为了探讨瘦素对子宫内膜癌细胞的直接作用,我们选择瘦素作用于 Ishikawa 细胞<sup>[10]</sup>。本研究通过免疫荧光染色证实在 Ishikawa 细胞中存在瘦素受体的表达;给予不同浓度瘦素干预体外培养的 Ishikawa 细胞,结果表明瘦素能明显促进子宫内膜癌细胞的生长增殖,在 0~100 ng/ml 范围内瘦素浓度越高,细胞增殖越显著。

#### 3.2 ERK1/2 在瘦素促进子宫内膜癌细胞增殖中的作用

瘦素促进子宫内膜癌细胞增殖的机制目前尚不十分清楚,已有的研究显示,瘦素可能通过激活多种信号转导途径促进细胞增殖。有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)是酪氨酸激酶信号转导系统的重要成员,研究发现 MAPK 在细胞恶变和肿瘤浸润转移过程中起着重要作用<sup>[11]</sup>。而 ERK1/2 是其中的关键环节,参与调节细胞的增殖、分化以及多种代谢功能。ERK1/2 可被多种生长因子等有丝分裂原激活,促进多种癌基因及细胞周期调节相关基因的转录与表达,进而促进肿瘤细胞增殖,抑制细胞凋亡<sup>[12,13]</sup>。Laud 等<sup>[14]</sup>体外实验研究结果证明,瘦素可以通过激活 MAPK 信号转导途径而作用于乳腺癌细胞。实验结果显示,瘦素能明显促进 Ishikawa 细胞 ERK1/2 的活化,而使用 ERK1/2 激酶抑制剂 PD98059 阻断 ERK1/2 的磷酸化,可显著抑制瘦素对 Ishikawa 细胞的促增殖作用。本研究表明 ERK1/2 在瘦素刺激的 Ishikawa 细胞增殖中起着重要的作用。但 PD98059 为 100 μmol/L 时(完全抑制 ERK1/2 活性剂量)<sup>[15]</sup>,仍未能完全抑制瘦素刺激的细胞增殖,这提示 ERK1/2 途径的激活并非是瘦素促进

Ishikawa 细胞增殖的唯一通路,其他信号转导途径也可能参与这一过程。这些还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Petridou E, Belechri M, Dessypris N, et al. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk [J]. *Ann Nutr Metab*, 2002, 46(3-4): 147-151.
- [2] Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone [J]. *Cell Res*, 2000, 10(2): 81-92.
- [3] Somasundar P, McFadden D W, Hileman S M. Leptin is a growth factor in cancer [J]. *J Surg Res*, 2004, 116(2): 337-349.
- [4] Dieudonne M N, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, et al. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(1): 622-628.
- [5] Pai R, Lin C, Tran T, et al. Leptin activates STAT and ERK2 pathways and induces gastric cancer cell proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4): 984-992.
- [6] Choi J H, Park S H, Leung P C, et al. Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(1): 207-210.
- [7] Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, et al. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(5): 1946-1950.
- [8] Yuan S S, Tsai K B, Chung Y F, et al. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in endometrial cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(3): 769-775.
- [9] 曹文东, 杨涛, 郝斌, 等. 瘦素及瘦素受体在乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(2): 241-243.
- [10] Vollmer G. Endometrial cancer: experimental models useful for studies on molecular aspects of endometrial cancer and carcinogenesis [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10(1): 23-42.
- [11] Force T, Bonventre J V. Growth factors and mitogen-activated protein kinases [J]. *Hypertension*, 1998, 31(1 Pt 2): 152-161.
- [12] Rice P L, Goldberg R J, Ray E C, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and induction of apoptosis by sulindac metabolites [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1541-1547.
- [13] Ajenjo N, Aaronson D S, Ceballos E, et al. Myeloid leukemia cell growth and differentiation are independent of mitogen-activated protein kinase ERK1/2 activation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(10): 7189-7197.
- [14] Laud K, Gourdou I, Pesseme L, et al. Identification of leptin receptors in human breast cancer: functional activity in the T47-D breast cancer cell line [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 188(1-2): 219-226.
- [15] Marra F, Arrighi M C, Fayi M, et al. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat [J]. *Hepatology*, 1999, 30(4): 951-958.

[编辑及校对: 甘可建]