



· 论 著 ·

# Leptin基因沉默对胆囊癌GBC-SD和OCUG细胞系侵袭和迁移能力的影响

石万红<sup>1</sup>, 邹雷<sup>1</sup>, 康强<sup>2</sup>, 王峻峰<sup>3</sup>, 白建华<sup>1</sup>, 晋云<sup>3</sup>, 张杰<sup>1</sup>, 张小文<sup>2</sup>

1. 昆明医科大学第一附属医院器官移植科, 云南昆明 650032;
2. 昆明医科大学第二附属医院肝胆外科, 云南昆明 650101;
3. 云南省第一人民医院肝胆外科, 云南昆明 650021

**[摘要]** 背景与目的: 研究表明, 与肥胖症密切相关的源自脂肪细胞的细胞因子瘦素 (leptin) 在癌变和肿瘤发生中起着重要作用。通过体外实验观察leptin对人胆囊癌细胞系GBC-SD和OCUG侵袭和迁移能力的影响, 探讨其可能的作用机制。方法: 将胆囊癌GBC-SD和OCUG细胞分为对照组和实验组。实验组利用小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术靶向沉默胆囊癌GBC-SD和OCUG细胞的leptin表达, 应用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 检测转染效率, 通过细胞划痕实验和transwell小室法检测胆囊癌GBC-SD和OCUG细胞的迁移和侵袭能力, 采用免疫荧光和免疫细胞化学实验检测siRNA干扰后胆囊癌GBC-SD和OCUG细胞的leptin蛋白水平, 利用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测干扰后GBC-SD和OCUG细胞的leptin和p-AKT蛋白表达。结果: 细胞划痕实验结果显示, 利用siRNA靶向沉默leptin后GBC-SD和OCUG细胞的迁移能力下降 ( $t=26.614, P<0.01; t=19.338, P<0.01$ )。Transwell迁移实验结果显示, 利用siRNA靶向沉默leptin后GBC-SD和OCUG细胞的迁移能力也下降 ( $t=7.185, P=0.002; t=8.889, P=0.003$ )。Transwell侵袭实验结果显示, 干扰后GBC-SD和OCUG细胞的侵袭能力下降 ( $t=10.183, P=0.001; t=9.697, P=0.001$ )。免疫荧光和免疫细胞化学实验结果显示, 干扰后GBC-SD和OCUG细胞的leptin蛋白表达下降, Western blot检测结果表明, 靶向沉默GBC-SD细胞后leptin和p-AKT蛋白表达下调 ( $t=26.463, P<0.01; t=13.904, P<0.01$ ), 靶向沉默OCUG细胞后leptin和p-AKT蛋白表达也下调 ( $t=21.335, P<0.01; t=17.914, P<0.01$ )。结论: 下调GBC-SD和OCUG细胞的leptin表达可抑制细胞侵袭和转移能力, 并可能通过AKT信号通路调控胆囊癌细胞的侵袭和迁移。Leptin有望成为胆囊癌治疗的一个重要靶点。

**[关键词]** 胆囊癌; 瘦素; 侵袭; 迁移

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.11.002

中图分类号: R735.8 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)11-1050-08

## The influence of silencing leptin gene on the invasion and migration abilities of gallbladder cancer GBC-SD and OCUG cells

SHI Wanhong<sup>1</sup>, ZOU Lei<sup>1</sup>, KANG Qiang<sup>2</sup>, WANG Junfeng<sup>3</sup>, BAI Jianhua<sup>1</sup>, JIN Yun<sup>3</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>, ZHANG Xiaowen<sup>2</sup> (1. Department of Organ Transplantation, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021, Yunnan Province, China)

Correspondence to: ZHANG Xiaowen E-mail: zhangxiaowenlu@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Emerging evidence suggests that fat cell-derived cytokine leptin, which is closely related to obesity, plays an important role in carcinogenesis and tumorigenesis. In this study, the effect of leptin on the invasion and migration abilities of GBC-SD and OCUG cells were observed *in vitro*, and its possible related mechanisms were explored. **Methods:** GBC-SD and OCUG cells were divided into control group and experimental group. In the experimental group, we used

**基金项目:** 云南省科技厅基础研究面上项目 (202001AT070018); 国家自然科学基金 (81760430); 云南省医学学科后备人才项目 (H-2017037); 云南省卫生和计划生育委员会医学学科带头人培养计划 (D-201658); 云南省科技惠民专项 (2016RA011); 云南省科技计划项目-科技入滇专项 (2018IB007)。

通信作者: 张小文 E-mail: zhangxiaowenlu@163.com

small interfering RNA (siRNA) to target and silence the expression of leptin in GBC-SD and OCUG cells. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) was used to detect the transfection efficiency. Wound healing assay and transwell assay were used to detect the migration and invasion abilities of GBC-SD and OCUG cells. The immunofluorescence and immunocytochemistry experiments were used to detect the expression of leptin protein in GBC-SD and OCUG cells after siRNA interference. The protein expressions of leptin and p-AKT in GBC-SD and OCUG cells after interference were detected by Western blot. **Results:** The results of wound healing assay showed that the migration abilities of GBC-SD and OCUG cells decreased after silencing leptin with siRNA interference ( $t=26.614, P<0.01$ ;  $t=19.338, P<0.01$ ). The results of transwell migration assay also showed that the migration abilities of GBC-SD and OCUG cells decreased after silencing leptin with siRNA interference ( $t=7.185, P=0.002$ ;  $t=8.889, P=0.003$ ). Transwell invasion assay results showed that the invasion abilities of GBC-SD and OCUG cells decreased after interference ( $t=10.183, P=0.001$ ;  $t=9.697, P=0.001$ ). Immunofluorescence and immunocytochemistry experiments showed decreased leptin protein expression in GBC-SD and OCUG cells after interference. Western blot showed that leptin and p-AKT protein expressions were down-regulated after targeted silencing in GBC-SD cells ( $t=26.463, P<0.01$ ;  $t=13.904, P<0.01$ ). Western blot showed that leptin and p-AKT protein expressions were also down-regulated after targeted silencing in OCUG cells ( $t=21.335, P<0.01$ ;  $t=17.914, P<0.01$ ). **Conclusion:** Down-regulation of leptin expression in GBC-SD and OCUG cells can inhibit cell invasion and metastasis, and may regulate gallbladder cancer invasion and migration through AKT signaling pathway. Leptin are expected to become an important target for gallbladder cancer treatment.

[Key words] Gallbladder cancer; Leptin; Invasion; Migration

胆囊癌是最常见的胆道恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 在某些国家(如印度、智利、日本和中国)发病率较高<sup>[2]</sup>。胆囊癌患者的中位生存期为1年, 晚期胆囊癌患者的中位生存期甚至不足6个月, 整体5年生存率约为10%<sup>[2-3]</sup>。70%~90%的胆囊癌患者有胆囊结石病史, 胆囊结石被认为是胆囊癌最强烈相关的危险因素<sup>[4]</sup>。由于缺乏明显的症状或体征, 大多数患者被诊断时已为晚期<sup>[5]</sup>。瘦素(leptin)是由脂肪细胞分泌的重要脂肪因子, 在能量稳态调节中起关键作用, 同时, leptin在各种癌症类型中具有促有丝分裂和抗细胞凋亡的作用<sup>[6]</sup>。Leptin主要通过与其受体(leptin receptor, OB-R)结合来发挥其生物学效应。OB-R是I类细胞因子受体家族的成员, 类似于高尔基体蛋白130。OB-R由OB-Ra、OB-Rb、OB-Rc、OB-Rd、OB-Re和OB-Rf 6个同种型组成, 其中OB-Rb被称为长型, 包含leptin介导的下丘脑JAK-STAT信号通路激活所必需的胞内基序, 使OB-Rb成为与leptin特异性结合发挥作用的主要形式<sup>[7-8]</sup>。因此, 了解胆囊癌发生、发展的分子机制对于早期诊断和制订更好的晚期治疗策略很有必要。本实验以胆囊癌GBC-SD、OCUG细胞系为研究对象, 采用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)技术, 观察GBC-SD、OCUG细胞的侵袭和迁移情况并探讨可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞系

Zou等<sup>[9]</sup>研究发现, leptin及其功能性受体OB-Rb在人胆囊癌组织和细胞系中显著共表达, 其水平远高于正常人胆囊组织。因此, 本研究旨在通过体外细胞实验进一步探索leptin与胆囊癌之间的关系。选取具有高侵袭性的人胆囊癌细胞系GBC-SD和OCUG细胞用于实验<sup>[10-11]</sup>, 胆囊癌细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

### 1.2 主要试剂与仪器

Leptin、AKT抗体购自英国Abcam公司,  $\beta$ -actin抗体购自上海碧云天生物技术有限公司, leptin-siRNA序列和实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)基因检测试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 羊抗兔-辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)二抗和羊抗鼠-HRP二抗购自上海碧云天生物技术有限公司, 羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)荧光二抗购自北京索莱宝科技有限公司, RPMI-1640培养基购自美国GE Healthcare Life Sciences公司, DMSO购自美国Sigma Aldrich公司, transwell

小室购自美国Corning公司, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶配置试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, Lipofectamine™3000转染试剂购自美国Thermo Fisher Science公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 构建转染序列

细胞转染采用siRNA技术, 构建2条siRNA

序列, 序列设计见表1。本实验分为对照组 (GBC-SD-Mock、OCUG-Mock)、实验组1 (GBC-SD-siRNA-1、OCUG-siRNA-1) 和实验组2 (GBC-SD-siRNA-2、OCUG-siRNA-2), 采用蛋白质印迹法 (Western blot) 对实验组1和实验组2进行siRNA序列转染效率的筛选。采用Lipofectamine™3000转染试剂进行转染。其中对照组不添加siRNA序列, 其余实验步骤与实验组方法一致。

表1 实验组1和2的引物序列

Tab. 1 The sequences of experimental group 1 and 2

Group	Forward primer	Reverse primer
Sequence 1	5'-GGAGAGUACAGUGAGCCAATT-3'	5'-UUGGCUCACUGUACUCUCCTT-3'
Sequence 2	5'-UCCUGACCUUAUCCAAGAATT-3'	5'-AUCUUGGAUAAGGUCAGGATT-3'

转染前1 d将细胞接种到6孔板中, 用无抗生素而有血清的RPMI-1640培养液进行培养, 以转染当天细胞融合度达40%~50%为宜。每1吸光度 (*D*) 值的siRNA用125 μL焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水稀释siRNA, 7.5 μL Lipofectamine™3000和5 μL siRNA序列加入到250 μL无血清培养基中混匀, 室温静置20 min, 形成siRNA转染试剂复合体。最后将siRNA转染试剂复合体加入换上新鲜有血清培养基的6孔板中, 置培养箱中培养4~6 h后换液, 4~5 d后提取RNA了解转染情况。

#### 1.3.2 RTFQ-PCR检测转染效率

先提取总RNA, 每培养皿加入1 mL TRIzol裂解液, 室温静置5 min, 加入0.2 mL氯仿, 剧烈振荡15 s后静置3 min, 4 °C以12 000 × g离心15 min, 取上层水相加0.5 mL异丙醇室温放置10 min, -20 °C过夜, 以12 000 × g离心10 min, 弃上清液, 加1 mL 75%乙醇溶液洗涤, 以7 500 × g离心5 min, 弃上清液, 室温自然干燥后用DEPC水溶解。然后反转录合成cDNA, 按RNA反转录体系在42 °C温育60 min, 80 °C变性10 min后终止。最后用RTFQ-PCR体系进行40个循环后终止, 数据应用2<sup>-ΔCt</sup>分析 (ΔCt=待测基因-内参基因)。

#### 1.3.3 Transwell侵袭和迁移实验

首先用基质胶包被transwell小室, 按1:10

比例稀释后平铺于小室底部 (迁移实验无需铺设基质胶), 培养4 h。然后用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 冲洗细胞, 0.25%胰酶消化细胞, 用有血清培养基中和胰酶, 以300 × g离心5 min后用无血清培养基重悬细胞并计数。在小室中加入4 × 10<sup>4</sup>个细胞, 在24孔板中加入500 μL有血清培养基。最后培养48 h取出小室, 棉签除去小室上层, 用结晶紫染色后在显微镜下观察采集图像, 计数后进行数据分析。

#### 1.3.4 划痕实验

实验前1 d用24孔板进行铺板, 以第2天达80%~90%的细胞融合度为宜, 用100 μL移液器吸嘴垂直划十字交叉, PBS冲洗细胞后加入有血清培养基。最后培养0、24 h后进行图像采集, 对比各组细胞迁移距离, 分析数据。

#### 1.3.5 免疫细胞化学实验<sup>[12]</sup>

先在24孔板中铺设细胞爬片, 培养24 h后进行细胞转染 (以转染时细胞融合度达到30%~50%为宜, 转染方法同上)。转染后培养4~5 d用4%组织固定液固定。然后将浓度为5%的triton X-114加入到细胞爬片中, 10%BSA封闭液封闭。温育一抗方法: 细胞爬片加入1:144的兔抗人多克隆抗体, 湿盒4 °C冰箱过夜。温育二抗方法: 加入DAKO二抗 (鼠兔通用型), 室温放置20 min。加入1:100的二氨基联苯胺 (diaminobenzidine,

DAB) 浓缩液和DAB稀释液显色, 混匀, 避光, 在显微镜下观察。然后用苏木精染色, 视情况用3%盐酸乙醇分化, 最后中性树胶封片, 在显微镜下摄片。

### 1.3.6 免疫荧光实验<sup>[13]</sup>

温育一抗方法与免疫细胞化学实验相同。温育二抗方法: 加入1:20山羊抗兔的荧光二抗, 避光, 室温静置1 h, 然后用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色10 min, 使用抗荧光衰减封片液封片, 最后在荧光显微镜下摄片。

### 1.3.7 Western blot检测转染前后leptin和p-AKT蛋白表达情况

先用胰酶消化收集细胞后, 按每1 mL RIPA裂解液加入20  $\mu$ L EDTA、20  $\mu$ L磷酸酶抑制剂和20  $\mu$ L蛋白酶抑制剂, 然后以10 000  $\times$  g离心3 min取上清液, 得到细胞裂解产物, 微量分光光度计检测蛋白浓度。每40  $\mu$ L细胞裂解产物加10  $\mu$ L的5 $\times$ 样本缓冲液100  $^{\circ}$ C加热10 min。电泳方法: 首先配置5%的浓缩胶和15%的分离胶, 蛋白上样总量为50  $\mu$ g, 浓缩胶采用80 V恒压, 分离胶采用120 V恒压进行电泳。然后将聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜用甲醇浸泡后采用湿转法在350 mA恒定电流下进行转膜, 时间为90 min。最后将PVDF膜置于5%脱脂牛奶中, 在摇床上封闭2 h。温育一抗方法: 将目的条带置于1:720的兔抗人多克隆抗体, 内参条带置于1:1 000的鼠抗人单克隆抗体。温育二抗方

法: 分别加入1:1 000的HRP标记山羊抗兔IgG二抗和HRP标记山羊抗鼠IgG二抗, 温育1 h。最后用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)液按1:1混合后温育1 min, 在成像仪中进行曝光显影摄片。

### 1.4 统计学处理

应用SPSS 20.0和OriginPro 9.0软件对实验数据进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用LSD法,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 si-RNA沉默leptin基因后用RTFQ-PCR检测leptin的mRNA表达效率

分别用siRNA-mock、leptin siRNA-1和leptin siRNA-2转染GBC-SD和OCUG细胞, 培养4~5 d后, 用RTFQ-PCR检测leptin的mRNA表达。设空白对照组(siRNA-mock组)的相对表达量为1, GBC-SD细胞株实验组1(leptin siRNA-1组)和实验组2(leptin siRNA-2组)相对于空白对照组的RTFQ-PCR结果分别为 $0.256 \pm 0.024$ 和 $0.298 \pm 0.033$ ; OCUG细胞株实验组1(leptin siRNA-1组)和实验组2(leptin siRNA-2组)相对于空白对照组的RTFQ-PCR结果分别为 $0.369 \pm 0.051$ 和 $0.391 \pm 0.037$ , 差异有统计学意义( $F=462.025$ ,  $P < 0.01$ , 图1)。因此, 后续实验选用siRNA-1转染处理过的细胞。

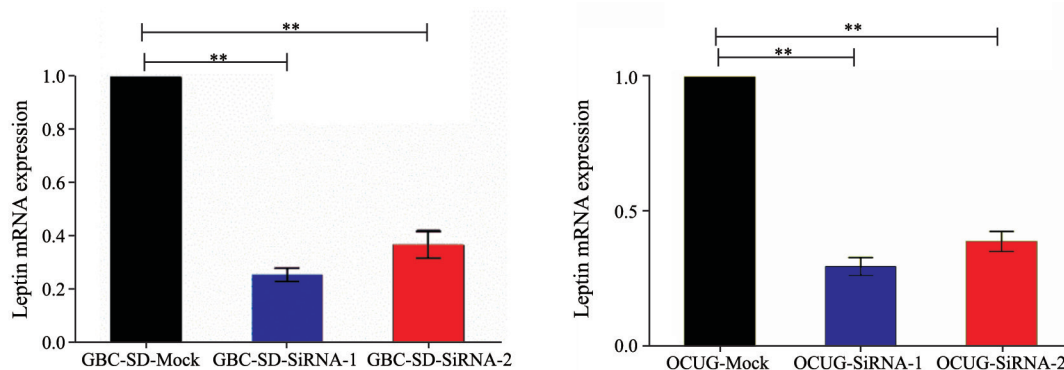


图1 RTFQ-PCR检测GBC-SD和OCUG细胞中leptin的mRNA表达

Fig. 1 RTFQ-PCR detection of leptin mRNA expression in GBC-SD and OCUG cells

\*\* :  $P < 0.01$

## 2.2 沉默*leptin*基因后用免疫荧光和免疫细胞化学实验检测*leptin*蛋白的水平

*Leptin*蛋白主要存在于细胞质中, 免疫荧光和免疫细胞化学实验结果显示, *leptin* siRNA沉默*leptin*基因后, GBC-SD和OCUG细胞的细胞质中*leptin*蛋白水平显著下调(图2)。

## 2.3 沉默*leptin*基因对GBC-SD和OCUG细胞侵袭及迁移能力的影响

沉默GBC-SD细胞的*leptin*基因后对照组和实验组的transwell迁移实验结果分别为(146.67 ± 11.06)和(97.00 ± 4.58)个细胞, 差异有统计学意义( $t=7.185$ ,  $P=0.002$ )。Transwell侵袭实验结果分别为(66.33 ± 5.69)和(23.67 ± 4.51)个细胞, 差异有统计学意义( $t=10.183$ ,  $P=0.001$ , 图3A、3B)。细胞划痕实验中的细胞损伤愈合率分别为0.161 ± 0.005和0.081 ± 0.003, 差异有统计学意义( $t=26.614$ ,  $P<0.01$ , 图3C、3D)。

沉默OCUG细胞的*leptin*基因后对照组和实验组的transwell迁移实验结果分别为(137.28 ± 10.19)和(87.50 ± 3.99)个细胞, 差异有统计学意义( $t=8.889$ ,  $P=0.003$ )。

Transwell侵袭实验结果分别为(78.41 ± 4.47)和(33.79 ± 5.22)个细胞, 差异有统计学意义( $t=9.697$ ,  $P=0.001$ , 图3A、3B)。细胞划痕实验中的细胞损伤愈合率分别为0.185 ± 0.004和0.098 ± 0.004, 差异有统计学意义( $t=19.338$ ,  $P<0.01$ , 图3C、3D)。

## 2.4 沉默*leptin*基因后GBC-SD和OCUG细胞中*leptin*和p-AKT的表达

沉默GBC-SD、OCUG细胞的*leptin*基因前后*leptin*和p-AKT蛋白的凝胶电泳图像见图4A。进行灰度分析量化结果为: *leptin* siRNA处理GBC-SD细胞前后*leptin*蛋白相对表达水平为0.714 ± 0.019和0.329 ± 0.017, 差异有统计学意义( $t=26.463$ ,  $P<0.01$ ); p-AKT蛋白相对表达水平为0.773 ± 0.060和0.213 ± 0.035, 差异有统计学意义( $t=13.904$ ,  $P<0.01$ )。Leptin siRNA处理OCUG细胞前后*leptin*蛋白相对表达水平为0.754 ± 0.024和0.119 ± 0.027, 差异有统计学意义( $t=21.335$ ,  $P<0.01$ ); p-AKT蛋白相对表达水平为0.889 ± 0.025和0.513 ± 0.027, 差异有统计学意义( $t=17.914$ ,  $P<0.01$ , 图4B)。

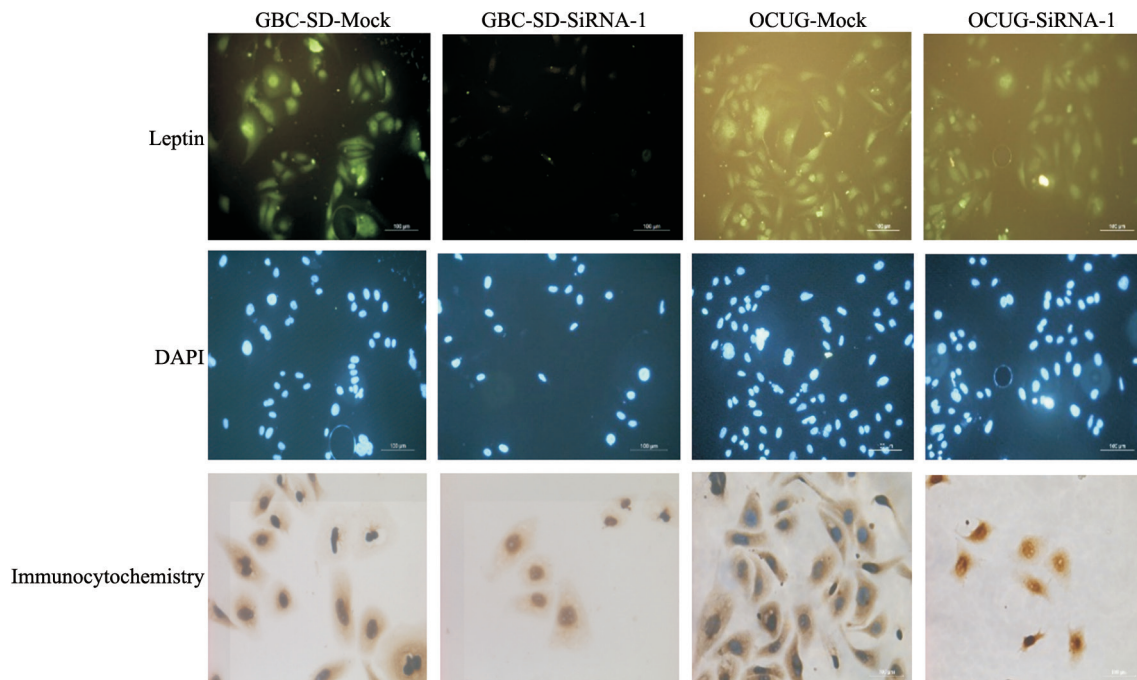


图2 免疫荧光和免疫细胞化学实验检测各组*leptin*蛋白的表达

Fig. 2 Immunofluorescence and immunocytochemistry experiments to detect the protein expression of leptin in each group

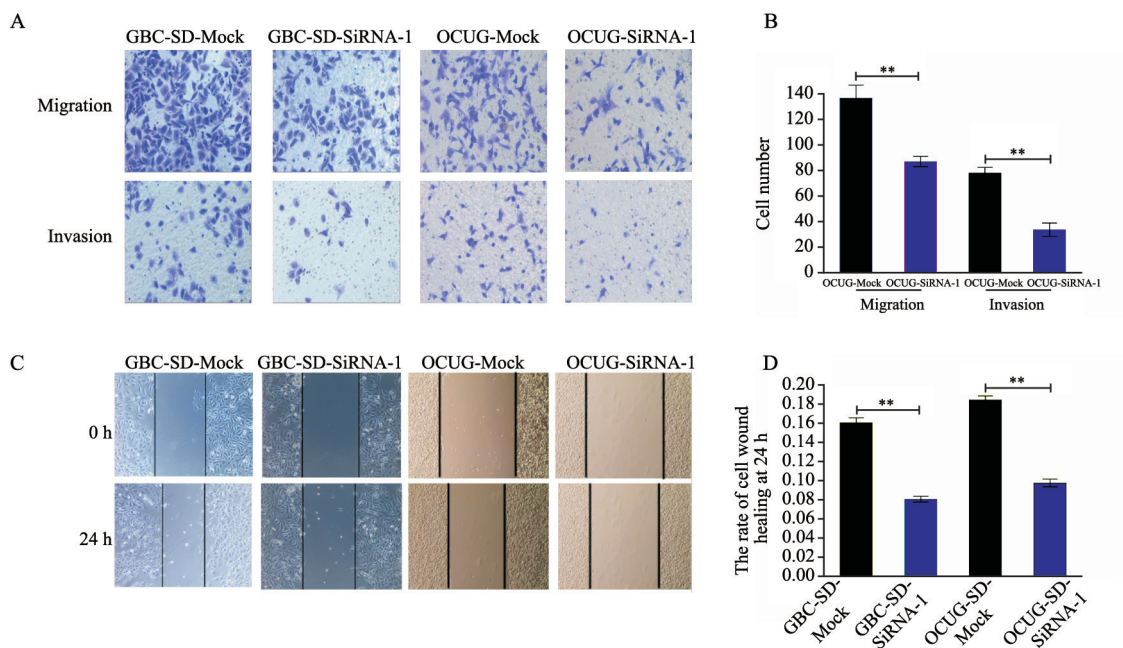


图3 沉默leptin基因对胆囊癌细胞GBC-SD、OCUG侵袭及迁移能力的影响

Fig. 3 The effect of silencing leptin gene on the invasion and migration abilities of GBC-SD and OCUG cells

A: The images of the number of invasion and migration cells in the two groups ( $\times 200$ ); B: The histogram of the number of invasion and migration cells in the two groups; C: The images of cell wound healing in the two groups at 0 and 24 h; D: The rate of cell wound healing at 24 h. \*\*:  $P < 0.01$

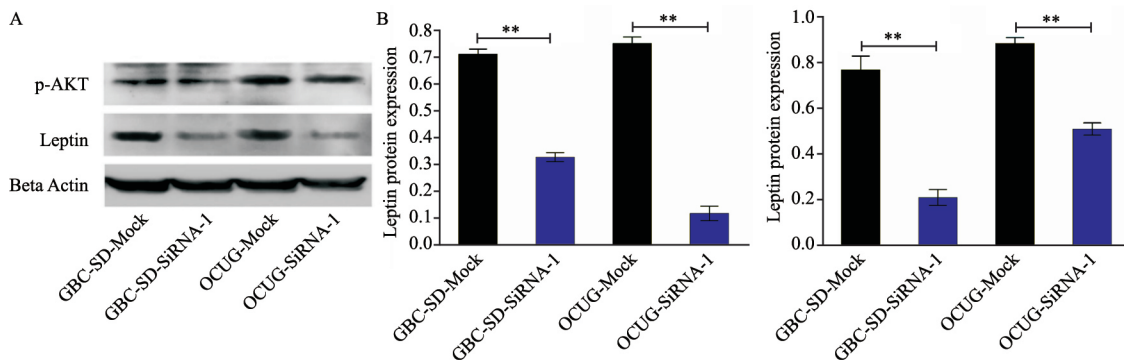


图4 Western blot检测沉默leptin基因对胆囊癌细胞GBC-SD、OCUG的leptin和p-AKT蛋白水平的影响

Fig. 4 Western blot was used to detect the effect of silencing leptin gene on the protein levels of leptin and p-AKT in GBC-SD and OCUG cells

A: The gel electrophoresis images of the protein levels of leptin and p-AKT in two groups; B: The histogram of the relative protein expressions of leptin and p-AKT in the two groups. \*\*:  $P < 0.01$

### 3 讨 论

胆囊癌是一种常见的胆道恶性肿瘤，预后不良，随着全球平均寿命的增加，预计胆囊癌的发病率也会增加<sup>[14]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>表明，肥胖与不同类型的癌症有关，包括血液系统恶性肿瘤、胃癌、结直肠癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝细胞

癌、胆囊癌和胰腺癌。Leptin与肥胖关系密切，是由脂肪组织产生并分泌到循环系统中的细胞因子之一，它是一种由leptin基因编码的由167个氨基酸残基组成的多肽<sup>[15]</sup>。Leptin的结构类似于促炎性螺旋细胞因子（包含一个四螺旋核心），并包含一个与OB-R结合必不可少的二硫键<sup>[15]</sup>。Leptin的主要功能是维持能量稳态，通过下丘脑水平的中央反馈机制参与厌食途径，通过这种方式调节食物摄取的中间激素机制来控

制脂肪组织的生长<sup>[16]</sup>。此外, *leptin*对胎儿发育、生殖、泌乳、骨骼发育、造血作用、免疫反应、血管生成及许多不同类型细胞的增殖也有影响<sup>[16]</sup>。*Leptin*信号转导已被证明可调控多种重要分子, 参与增殖、黏附、侵袭、迁移、炎症及血管生成<sup>[16]</sup>。*Leptin*参与调节许多细胞内信号转导途径: Janus激酶 (Janus kinase, JAK)、信号转导及转录激活蛋白 (signal transducer and activator of transcription, STAT)、磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)<sup>[17]</sup>。在致癌过程中, *leptin*通过促进细胞增殖和抑制细胞凋亡的途径来促进癌细胞的生长<sup>[17]</sup>。

胆囊癌细胞具有异于正常细胞的细胞生物学行为, 其中高侵袭和转移能力可加速肿瘤细胞远处转移的风险<sup>[18]</sup>, 而胆囊癌的早期远处转移是患者死亡的重要原因<sup>[19]</sup>。*Leptin*已在多种类型肿瘤细胞中被证实与肿瘤的侵袭和迁移能力相关, 如Zou等<sup>[9]</sup>在胆囊癌细胞研究中发现, *leptin*通过增加SOCS3/JAK2/p-STAT3信号通路的OB-Rb表达来促进胆囊癌细胞的增殖、迁移和侵袭。在一项甲状腺癌的研究<sup>[20]</sup>中, *leptin*通过激活PI3K/AKT信号通路来刺激甲状腺癌细胞增殖并抑制细胞凋亡, 而PI3K抑制剂LY294002对PI3K活性的抑制作用消除了*leptin*介导的PI3K/AKT信号转导。Peng等<sup>[21]</sup>在体外细胞研究中发现, *leptin*可显著提高胆管癌细胞的上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 并具有促血管生成作用, 明显抑制内源性miR-122表达, 上调丙酮酸激酶肌肉同工酶M2, 从而加快胆管癌细胞的侵袭和转移。在一项乳腺癌研究<sup>[22]</sup>中, *leptin*显著增加STAT3、AKT和ERK1/2的磷酸化, 通过PI3K/AKT信号转导途径激活白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 诱导乳腺癌细胞进行EMT。Fava等<sup>[23]</sup>在肥胖的fa/fa Zucker大鼠 (一种遗传上具有*leptin*受体缺陷的动物) 及其同窝的动物实验中, 通过长期喂食强力致癌物硫代乙酰胺, 诱发了胆管癌, 发现*leptin*在体外

可增加胆管癌细胞的增殖和转移潜能, 并且对胆管癌细胞具有抗凋亡作用。此外, *leptin*功能的丧失会限制胆管癌的发展。本研究进一步证实了*leptin*对胆囊癌细胞侵袭和迁移的影响, 在胆囊癌GBC-SD和OCUG细胞中转染*leptin* siRNA, 通过细胞划痕实验、transwell侵袭和迁移实验检测发现, 在*leptin*表达被抑制后, 其侵袭和迁移能力与对照组相比显著降低。进一步通过Western blot、免疫细胞化学实验和免疫荧光实验来检测*leptin*蛋白的水平发现, 在*leptin*基因被沉默后, *leptin*和p-AKT蛋白水平明显下降, 提示*leptin*高表达有促进胆囊癌细胞侵袭和转移的作用, 抑制*leptin*表达后, p-AKT蛋白水平也随之下降, 表明*leptin*可能通过AKT信号转导通路调控胆囊癌细胞的侵袭和转移, 这与国内外学者对*leptin*研究的结果类似。

综上所述, 本研究发现*leptin*影响胆囊癌细胞的侵袭和迁移能力, 并且可能通过AKT信号转导通路促进胆囊癌细胞的侵袭和转移。目前, 靶向治疗恶性肿瘤是目前研究的热点, 本研究提示*leptin*可能是胆囊癌生长和转移的潜在分子靶点, 虽然从体外基础研究到临床应用仍有很长的路要走, 但本研究为AKT抑制剂用于靶向治疗胆囊癌提供了新的研究方向。

#### [参 考 文 献]

- [1] KRELL R W, WEI A C. Gallbladder cancer: surgical management [J]. *Chin Clin Oncol*, 2019, 8(4): 36.
- [2] KUMAR M, SHUKLA V K, MISRA P K, et al. Dysregulated expression and subcellular localization of base excision repair (BER) pathway enzymes in gallbladder cancer [J]. *Int J Mol Cell Med*, 2018, 7(2): 119-132.
- [3] RAWLA P, SUNKARA T, THANDRA K C, et al. Epidemiology of gallbladder cancer [J]. *Clin Exp Hepatol*, 2019, 5(2): 93-102.
- [4] SCHMIDT M A, MARCANO-BONILLA L, ROBERTS L R. Gallbladder cancer: epidemiology and genetic risk associations [J]. *Chin Clin Oncol*, 2019, 8(4): 31.
- [5] BAIU I, VISSER B. Gallbladder Cancer [J]. *JAMA*, 2018, 320(12): 1294.
- [6] GHASEMI A, SAEIDI J, AZIMI-NEJAD M, et al. Leptin-induced signaling pathways in cancer cell migration and invasion [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019, 42(3): 243-260.
- [7] INAGAKI-OHARA K. Gastric leptin and tumorigenesis: beyond obesity [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2622.

- [ 8 ] GRUZDEVA O, BORODKINA D, UCHASOVA E, et al. Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis [ J ] . *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 191–198.
- [ 9 ] ZOU H, LIU Y X, WEI D, et al. Leptin promotes proliferation and metastasis of human gallbladder cancer through OB–Rb leptin receptor [ J ] . *Int J Oncol*, 2016, 49(1): 197–206.
- [ 10 ] WANG L, ZHANG Y J, LV W, et al. Long non-coding RNA Linc-ITGB1 knockdown inhibits cell migration and invasion in GBC–SD/M and GBC–SD gallbladder cancer cell lines [ J ] . *Chem Biol Drug Des*, 2015, 86(5): 1064–1071.
- [ 11 ] YAMADA N, CHUNG Y, OHTANI H, et al. Establishment and characterization of a new human gallbladder carcinoma cell line (OCUG–1) producing TA–4 [ J ] . *Int J Oncol*, 1997, 10(6): 1251–1255.
- [ 12 ] NAYAK D, KATOCH A, SHARMA D, et al. Indolykoyl methane analogue IKM5 potentially inhibits invasion of breast cancer cells via attenuation of GRP78 [ J ] . *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 177(2): 307–323.
- [ 13 ] MASRAKSA W, TANASAWET S, HUTAMEKALIN P, et al. Luteolin attenuates migration and invasion of lung cancer cells via suppressing focal adhesion kinase and non–receptor tyrosine kinase signaling pathway [ J ] . *Nutr Res Pract*, 2020, 14(2): 127–133.
- [ 14 ] UTSUMI M, AOKI H, NISHIMURA S, et al. Safety of surgical treatment for elderly patients with gallbladder carcinoma [ J ] . *Acta Med Okayama*, 2019, 73(3): 241–246.
- [ 15 ] WRÓBLEWSKI A, STRYCHARZ J, ŚWIDERSKA E, et al. Molecular insight into the interaction between epigenetics and leptin in metabolic disorders [ J ] . *Nutrients*, 2019, 11(8): 1872.
- [ 16 ] SÁNCHEZ–JIMÉNEZ F, PÉREZ–PÉREZ A, DE LA CRUZ–MERINO L, et al. Obesity and breast cancer: role of leptin [ J ] . *Front Oncol*, 2019, 9: 596.
- [ 17 ] MODZELEWSKA P, CHLUDZIŃSKA S, LEWKO J, et al. The influence of leptin on the process of carcinogenesis [ J ] . *Contemp Oncol (Pozn)*, 2019, 23(2): 63–68.
- [ 18 ] SHEN H, HE M, LIN R R, et al. PLEK2 promotes gallbladder cancer invasion and metastasis through EGFR/CCL2 pathway [ J ] . *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 247.
- [ 19 ] INTERNATIONAL B R. Retracted: long noncoding RNA KIAA0125 potentiates cell migration and invasion in gallbladder cancer [ J ] . *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 3471417.
- [ 20 ] UDDIN S, BAVI P, SIRAJ A K, et al. Leptin–R and its association with PI3K/AKT signaling pathway in papillary thyroid carcinoma [ J ] . *Endocr Relat Cancer*, 2010, 17(1): 191–202.
- [ 21 ] PENG C, SUN Z P, LI O, et al. Leptin stimulates the epithelial–mesenchymal transition and pro–angiogenic capability of cholangiocarcinoma cells through the miR–122/PKM2 axis [ J ] . *Int J Oncol*, 2019, 55(1): 298–308.
- [ 22 ] WANG L, TANG C P, CAO H, et al. Activation of IL–8 via PI3K/Akt–dependent pathway is involved in leptin–mediated epithelial–mesenchymal transition in human breast cancer cells [ J ] . *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(8): 1220–1230.
- [ 23 ] FAVA G, ALPINI G, RYCHLICKI C, et al. Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth [ J ] . *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6752–6761.

( 收稿日期: 2021–03–05 修回日期: 2021–09–20 )