胰高糖素样肽-1受体激动剂对人甲状腺髓样癌细胞生长和能量代谢的影响

王 红，张斯亮，关海霞

中国医科大学附属第一医院内分泌科、内分泌研究所，
辽宁省内分泌疾病重点实验室，辽宁 沈阳 110001

［摘要］ **背景与目的：**胰高糖素样肽-1(glucagon like peptide-1，GLP-1)受体激动剂是一种新型降糖药。在研发过程中，发现其可增加啮齿类动物患甲状腺C细胞肿瘤的风险。因此，该药物对人类甲状腺的影响引人关注。本研究旨在探讨GLP-1受体激动剂对人甲状腺髓样癌(medullary thyroid cancer，MTC)细胞增殖、降钙素的分泌和能量代谢的影响。**方法：**体外培养人MTC细胞系(TT)。分别以0、1、10和100 nmol/L艾塞那肽和利拉鲁肽处理细胞24、48和72 h后，采用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8，CCK-8)检测GLP-1受体激动剂艾塞那肽和利拉鲁肽处理后细胞增殖情况；采用降钙素试剂盒测定细胞培养上清液中降钙素水平的变化；采用Seahorse能量代谢分析仪检测细胞糖酵解及线粒体呼吸的变化。**结果：**实验组细胞增殖率与对照组相比，差异无统计学意义(P>0.05)，降钙素的量与对照组相比，差异无统计学意义(P>0.05)，不同浓度艾塞那肽和利拉鲁肽处理细胞24 h后，与对照组相比，实验组艾塞那肽和利拉鲁肽对MTC细胞能量代谢并无明显影响(P>0.05)，随着艾塞那肽和利拉鲁肽处理时间延长，TT细胞糖酵解和线粒体呼吸并无明显改变(P>0.05)。**结论：**GLP-1受体激动剂对人MTC发生、发展无明显促进作用，未来仍需大规模临床数据进一步证实GLP-1受体激动剂的安全性。

［关键词］ 甲状腺髓样癌；艾塞那肽；利拉鲁肽；能量代谢

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.06.002

中图分类号：R736.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-3639(2016)06-0487-05

Effect of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on growth and energy metabolism in human medullary thyroid cancer cells

WANG Hong, ZHANG Siliang, GUAN Haixia (Department of Endocrinology and Metabolism, the Endocrine Institute, the First Hospital of China Medical University, the Liaoning Provincial Key Laboratory of Endocrine Diseases, Shenyang 110001, Liaoning Province, China)

Correspondence to: GUAN Haixia E-mail: hxguan@vip.126.com

［**Abstract**］ **Background and purpose:** This study aimed to investigate the effect of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on proliferation, secretion of calcitonin and energy metabolism of medullary thyroid cancer (MTC) cell. **Methods:** The MTC cell line (TT) was cultured *in vitro*. After treatment with exenatide and liraglutide (0, 1, 10 and 100 nmol/L) for 24, 48 and 72 h, the proliferation of TT was analyzed by CCK-8 kit, the calcitonin was measured by calcitonin assay kits, and the energy metabolism of TT was measured by Seahorse XF instrument. **Results:** When compared with control group, neither exenatide nor liraglutide had effects on proliferation of TT (P>0.05); the calcitonin levels did not change significantly after treatment with GLP-1 receptor agonists (P>0.05). Exenatide and liraglutide did not alter glycolysis and mitochondrial respiration in TT cells in a dose- and time-dependent manner. **Conclusion:** GLP-1 receptor agonists have no effect on the development of TT. Further collection of the safety data of exenatide and liraglutide on thyroid is still needed.

［**Key words**］ Medullary thyroid cancer; Exenatide; Liraglutide; Energy metabolism

基金项目：辽宁省科学技术计划项目(2013225021)。
通信作者：关海霞 E-mail: hxguan@vip.126.com

甲状腺髓样癌(medullary thyroid cancer，MTC)占所有甲状腺癌的5%~10%。与其他类型的甲状腺癌相比，MTC在临床症状、诊断及治疗方面的特征均不相同。MTC起源于甲状腺滤泡旁C细胞，过度分泌降钙素，且恶性程度高、预后差，严重威胁患者的生存质量和寿命[1]。新一类降糖药物胰高糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1，GLP-1)受体激动剂利拉鲁肽在研发过程中，曾发现其可激活啮齿类动物甲状腺滤泡旁C细胞的GLP-1受体，引起C细胞异常增生，有潜在的致MTC的风险[2-3]。但目前为止，GLP-1受体激动剂是否会促进人MTC生长和增殖尚未明确。本研究观察GLP-1受体激动剂对MTC细胞增殖和降钙素的分泌的作用，并从能量代谢角度探讨GLP-1受体激动剂对MTC细胞的影响。

1.1 材料和方法

1.1 材料

人MTC细胞系TT购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。细胞培养基F12、胎牛血清(fetal bovine serum，FBS)、谷氨酰胺、丙酮酸钠、青霉素和链霉素均购自美国Hyclone公司。艾塞那肽购自美国礼来公司，利拉鲁肽购自丹麦诺和诺德公司。细胞计数试剂盒(cell counting kit-8，CCK-8)购自日本同仁公司。降钙素测定试剂盒购自深圳市新产业生物医学工程股份有限公司。XF糖酵解压力测试试剂盒、XF细胞线粒体压力测试试剂盒和XF基础培养液均购自美国Seahorse Bioscience公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

TT细胞培养于F12培养基，其中青霉素终浓度为100 U/mL，链霉素终质量浓度为100 mg/L，在37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养。细胞呈单层贴壁生长，0.25%胰蛋白酶消化传代，实验时取对数生长期细胞。

1.2.2 CCK-8法检测细胞生长和增殖

将处于对数生长期的细胞胰酶消化，在培养基中调整细胞密度为1×10^4/mL，接种于96孔板，每孔200 μL。贴壁24 h后用含不同浓度(0、1、10和100 nmol/L)的艾塞那肽和利拉鲁肽的培养基培养细胞24、48和72 h，实验结束时每孔加10 μL CCK-8，待结晶溶解后用酶标仪测定450 nm波长处各个孔的吸光度(*D*)值。最后计算不同浓度和作用时间下细胞的增殖率。细胞增殖率=(实验组*D*值 – 空白组*D*值)/(对照组*D*值 – 空白组*D*值)。每组设3个复孔，实验重复3次。

1.2.3 降钙素实验测定细胞降钙素

取生长状态良好的细胞胰酶消化，将细胞以1×10^4/mL接种于24孔板，待细胞贴壁后，分别用含不同浓度(0、1、10和100 nmol/L)的艾塞那肽和利拉鲁肽的培养基培养细胞24、48和72 h，实验结束后，收取细胞培养基，应用降钙素试剂盒测定降钙素水平。

1.2.4 Seahorse能量代谢分析仪检测细胞能量代谢的改变

将生长状态良好的细胞消化、计数，用含不同浓度(0、1、10和100 nmol/L)的艾塞那肽和利拉鲁肽的培养基制成密度为1.5×10^5个/mL的细胞悬液，每孔80 μL接种于Seahorse专用96孔板(12 000个细胞/孔)。处理24 h组，室温静置1 h，放入培养箱中继续培养23 h；处理时间为48 h组，细胞先种入6孔板，培养24 h后胰酶消化，再种入Seahorse专用96孔板中继续培养。同时水化探针板过夜。糖酵解压力测试试验：分别向探针板A、B和C孔加入葡萄糖、寡霉素和2-脱氧葡萄糖(2-deoxy-*D*-glucose，2-DG)；线粒体压力测试试验：分别向探针板A、B和C孔加入寡霉素、羰基-氰-对-三氟甲氧基苯腙(carbonyl cyanide *p*-trifluormethoxyphenylhydrazone，FCCP)、抗霉素和鱼藤酮。校正探针板后，加入细胞培养板检测。

1.3 统计学处理

应用SPSS 17.0软件分析，计量数据以$\bar{x}\pm s$表示。采用单因素方差分析比较各组间差异。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 GLP-1受体激动剂对TT细胞增殖的影响

CCK-8法检测不同浓度(0、1、10和100 nmol/L)的艾塞那肽和利拉鲁肽处理TT细胞后的增殖情况，结果显示，与对照组相比较，不同浓度的艾塞那肽和利拉鲁肽处理TT 24、48和72 h后，实验组活细胞相对数与对照组相比差异无统计学意义，且随着处理时间延长，仍未见实验组活细胞相对数出现明显变化(P>0.05，图1)。

2.2 GLP-1受体激动剂对TT细胞分泌降钙素的影响

测定不同浓度(0、1、10和100 nmol/L)的艾塞那肽和利拉鲁肽处理TT细胞后培养基中降钙素水平的变化，结果显示，与对照组相比，随着艾塞那肽和利拉鲁肽处理浓度增加，实验组细胞降钙素分泌水平与对照组相比，差异无统计学意义(P>0.05)，且随着处理时间延长，实验组细胞降钙素浓度与对照组相比，差异无统计学意义(P>0.05，图2)。

2.3 GLP-1受体激动剂对TT细胞糖酵解和线粒体呼吸的影响

采用Seahorse能量代谢分析仪检测不同浓度(0、1、10和100 nmol/L)的艾塞那肽和利拉鲁肽处理TT后细胞糖酵解和线粒体呼吸水平的变化。结果显示，与对照组相比，不同浓度的艾塞那肽和利拉鲁肽处理TT细胞24 h后，实验组细胞糖酵解和线粒体呼吸水平未见明显改变；随着处理时间延长，实验组细胞与对照组相比，糖酵解和线粒体呼吸水平仍无明显变化(图3)。

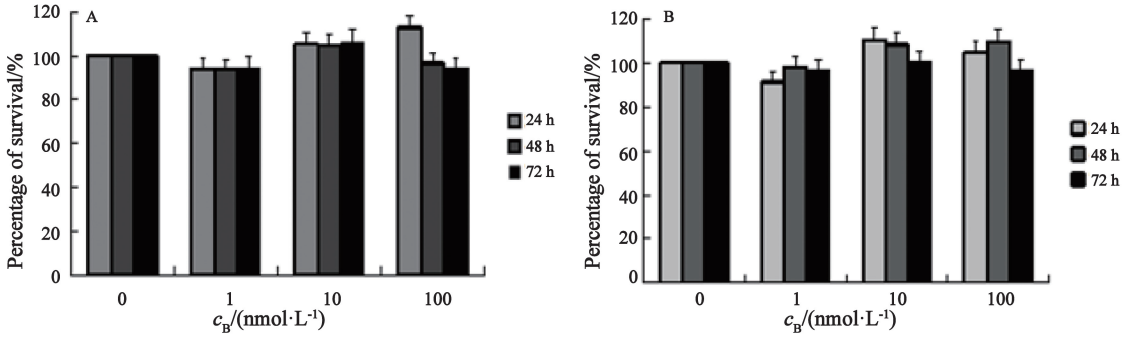

图 1　艾塞那肽和利拉鲁肽对TT细胞生长和增殖的影响

Fig. 1　Effects of exenatide and liraglutide on cell proliferation in TT cells

A: Exenatide; B: Liraglutide

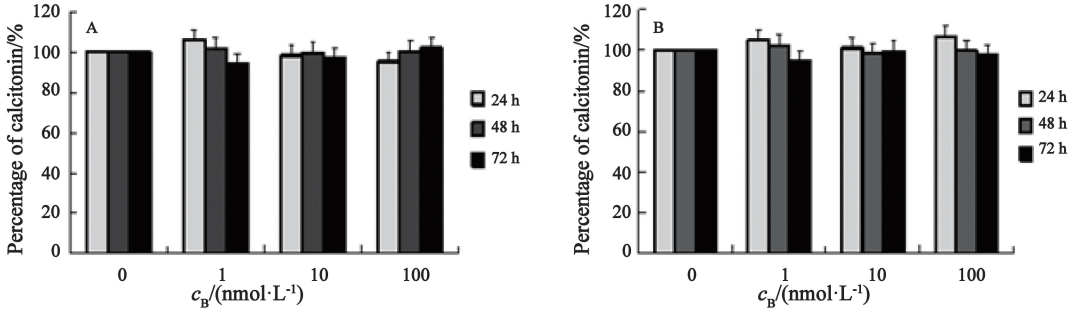

图 2　艾塞那肽和利拉鲁肽对TT细胞降钙素分泌的影响

Fig. 2　Effects of exenatide and liraglutide on the secretion of calcitonin in TT cells

A: Exenatide; B: Liraglutide

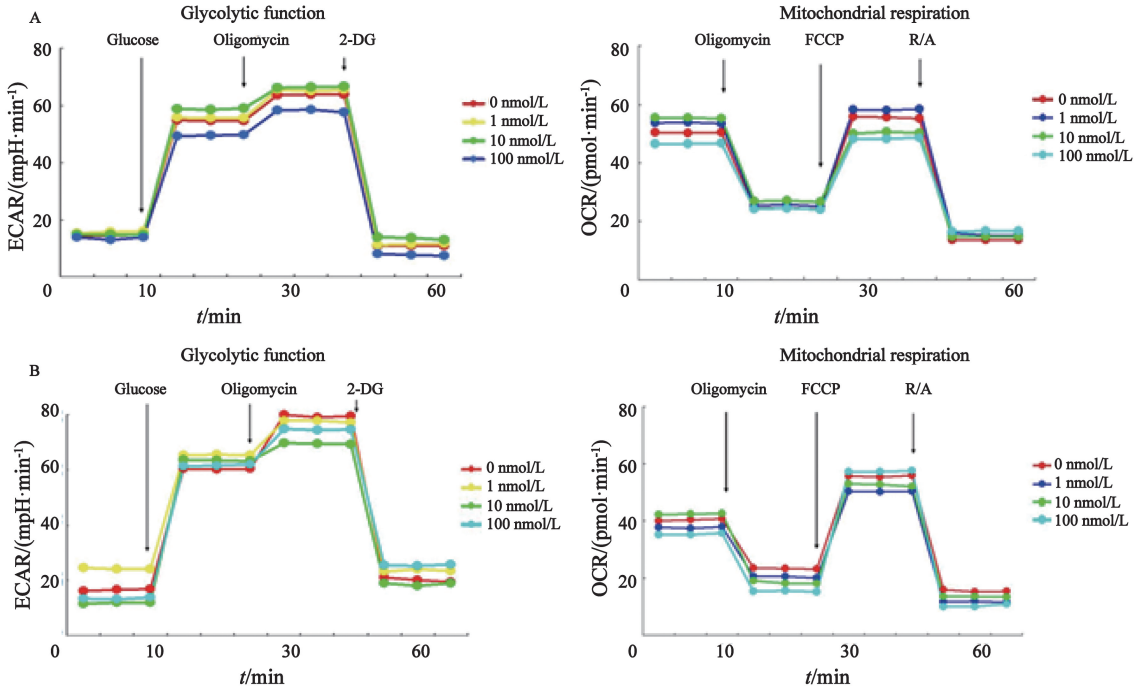

图 3　艾塞那肽和利拉鲁肽对TT细胞能量代谢影响

Fig. 3　Effects of exenatide and liraglutide on energy metabolism of TT cells

A: Exenatide; B: Liraglutide. ECAR: Extracellular acidification rate; OCR: Oxygen consumption rate

3　讨　　论

GLP-1受体激动剂可以在体内模拟GLP-1的作用，与GLP-1受体结合，激活胰岛素信号通路促进胰岛素合成并有助于胰岛细胞的修复和再生，是治疗2型糖尿病的新型降糖药之一。但在该类药物研发的过程中，曾发现在啮齿类动物中，利拉鲁肽有潜在致MTC的风险，艾塞那肽可增加甲状腺C细胞腺瘤的风险[2-3]。因此，GLP-1受体激动剂对人类甲状腺癌是否存在影响受到了极大的关注。我们的前期体外研究显示，人类甲状腺乳头状癌中存在GLP-1受体表达，但艾塞那肽和利拉鲁肽没有促进甲状腺乳头状癌细胞的增殖[4]。在Gier等[5]的研究中发现，与啮齿类动物甲状腺C细胞具有丰富GLP-1受体表达不同，人类MTC细胞系中虽有GLP-1受体的表达，但其表达量低。GLP-1受体激动剂临床上市后，目前尚没有发布艾塞那肽和利拉鲁肽治疗会增加人类患MTC的警示[6]。尽管如此，在完全确认GLP-1受体激动剂的甲状腺安全性之前，还需要更多的体外、体内试验数据。因此，本研究利用人类MTC细胞系，探讨GLP-1受体激动剂对啮齿类动物甲状腺滤泡旁细胞的负面作用是否也存在于人类MTC细胞上。

对于利拉鲁肽和艾塞那肽对MTC细胞的影响，首先从细胞增殖和降钙素分泌角度进行了探讨。细胞增殖是经典的反映肿瘤细胞生长的指标。降钙素由滤泡旁C细胞分泌，是MTC的特异性肿瘤标志物。已有研究明确血清降钙素筛查可作为甲状腺结节患者术前诊断MTC的敏感指标[7-8]。Trimboli等[9]在临床研究中发现，与甲状腺细针穿刺细胞学检查相比，通过测定细针穿刺针洗脱液中的降钙素水平诊断MTC的灵敏度更高。此外，MTC患者联合检测血清降钙素和癌胚抗原可以提高诊断的敏感性，有助于MTC的早期诊断和治疗，并且术后动态观察血清降钙素和癌胚抗原，对于判断手术效果和肿瘤复发有重要意义[10]。美国甲状腺学会的指南也建议MTC术后患者随访期间行

血清降钙素检测以预测复发，并可依据降钙素水平决定进一步治疗策略[1]。可见，降钙素是评估MTC发生、发展的重要指标。本研究结果显示，艾塞那肽和利拉鲁肽对MTC细胞的生长没有促进作用，并且两种药物对MTC细胞降钙素的分泌没有影响。

本研究进一步应用Seahorse能量代谢分析仪分析了艾塞那肽和利拉鲁肽对MTC细胞能量代谢的影响。之所以选择能量代谢作为研究内容，是因为恶性肿瘤细胞重要的生物学特性之一是细胞代谢的改变，以“瓦博格效应”为突出代表，即肿瘤细胞即使在供氧充足条件下也会以糖酵解为主要供能方式，并出现线粒体呼吸功能降低。鉴于越来越多证据表明这种能量代谢改变是恶性肿瘤发生、发展的基础环节[11-12]，因此以该指标作为评估GLP-1受体激动剂是否可以促进MTC进展的佐证。研究结果并未提示艾塞那肽和利拉鲁肽可以改变MTC细胞能量代谢模式，这进一步支持了两种药物对人类MTC细胞无影响。

综上所述，本研究从细胞增殖、降钙素分泌和能量代谢角度提示GLP-1受体激动剂不会促进MTC发生、发展。但本研究仅在体外实验层面上对利拉鲁肽和艾塞那肽进行了安全性的初步研究。作为2型糖尿病患者新型降糖药物，未来仍需大规模临床数据进一步证实GLP-1受体激动剂在实际应用中的安全性。

［参　考　文　献］

［1］ WELLS S J, ASA S, DRALLE H, et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma ［J］. Thyroid, 2015, 25(6): 567–610.

［2］ LOTTE B K, LARS W M, SOREN A, et al. Glucagon–like peptide–1 receptor agonists activate rodent thyroid C–cells causing calcitonin release and C–cell proliferation ［J］. Endocrinology, 2010, 151(4): 1473–1486.

［3］ HEGEDUS L, MOSES A C, ZDRAVKOVIC M, et al. GLP–1 and calcitonin concentration in humans: lack of evidence of calcitonin release from sequential screening in over 5 000 subjects with type 2 diabetes or nondiabetic obese subjects treated with the human GLP–1 analog, liraglutide ［J］. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(3): 853–860.

［4］ 刘　睿, 王　红, 郭慧玲, 等. 胰高糖素样肽–1受体激动剂对甲状腺乳头状癌细胞生长和增殖的影响 ［J］. 现代肿瘤医学, 2015, 23(8): 1033–1036.

［5］ GIER B, BUTLER P C, LAI C K, et al. Glucagon like peptide–1 receptor expression in the human thyroid gland ［J］. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(1): 121–131.

［6］ ALVES C, BATEL F, MACEDO A F. A meta–analysis of serious adverse events reported with exenatide and liraglutide: acute pancreatitis and cancer ［J］. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 98(2): 271–284.

［7］ KWON H, KIM W G, CHOI Y M, et al. A cut–off value of basal serum calcitonin for detecting macroscopic medullary thyroid carcinoma ［J］. Clin Endocrinol (Oxf), 2015, 82(4): 598–603.

［8］ RASARIO P W, PENNA G C, BRANDAO K, et al. Usefulness of preoperative serum calcitonin in patients with nodular thyroid disease without suspicious history or cytology for medullary thyroid carcinoma ［J］. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2013, 57(4): 312–316.

［9］ TRIMBOLI P, CREMONIN N, CERIANI L, et al. Calcitonin measurement in aspiration needle washout fluids has higher sensitivity than cytology in detecting medullary thyroid cancer: a retrospective multicentre study ［J］. Clin Endocrinol (Oxf), 2014, 80(1): 135–140.

［10］ MEIJER J A, LE C S, VANDEN W B, et al. Calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times as prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: a structured meta–analysis ［J］. Clin Endocrinol (Oxf), 2010, 72(4): 534–542.

［11］ ELF S E, CHEN J. Targeting glucose metabolism in patients with cancer ［J］. Cancer, 2014, 120(6): 774–780.

［12］ ORONSKY B T, ORONSKY N, FANGER G R, et al. Follow the ATP: tumor energy production: a perspective ［J］. Anticancer Agents Med Chem, 2014, 14(9): 1187–1198.

（收稿日期：2015–12–01　修回日期：2016–05–10）