

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.19.011

L-4F 对小鼠胰腺癌的抑制作用

黄文敬¹, 刘海辰², 周建宇³

1. 天津市红桥区邵公庄街社区卫生服务中心检验科, 天津 300121; 2. 天津市公安医院检验科, 天津 300120;
3. 协和干细胞基因工程有限公司, 天津 300384

摘要:目的 探讨载脂蛋白 A-I 模拟肽 L-4F 对小鼠胰腺癌的抑制作用。方法 用胰腺癌细胞系 H7 构建小鼠胰腺癌模型, 将胰腺癌原位荷瘤小鼠随机分为 L-4F 组与 Sc-4F 组, 每组 8 只, L-4F 组接受 L-4F(10 mg/kg)腹腔注射治疗, Sc-4F 组接受无功能对照 Sc-4F(10 mg/kg)腹腔注射治疗。观察两组小鼠的肿瘤体积, 比较两组小鼠的肿瘤重量及肿瘤组织中血管生成及炎症反应情况。结果 与 Sc-4F 组小鼠的肿瘤重量比较, L-4F 组小鼠的肿瘤重量明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Sc-4F 组小鼠肿瘤组织中有大量血管生成、炎症细胞大量浸润, 与其相比, L-4F 组小鼠肿瘤组织中的血管数量及炎症细胞数量大量减少。结论 L-4F 对小鼠胰腺癌的生长具有一定的抑制作用。

关键词:载脂蛋白 A-I 模拟肽; L-4F; 胰腺癌; 炎症; 血管生成

中图分类号:R735.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)19-2827-04

Inhibitory effect of L-4F on pancreatic cancer in mice

HUANG Wenjing¹, LIU Haichen², ZHOU Jianyu³

1. Department of Clinical Laboratory, Shaogongzhuang Street Community Health Service Center, Hongqiao District, Tianjin 300121, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Gong'an Hospital, Tianjin 300120; 3. Xiehe Stem Cell Genetic Engineering Co., Ltd., Tianjin 300384, China

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effect of apolipoprotein A-I mimic peptide L-4F on pancreatic cancer in mice. **Methods** Pancreatic cancer cell line H7 was used to construct mice pancreatic cancer model. The pancreatic cancer in situ tumor bearing mice were randomly divided into L-4F group and Sc-4F group, with 8 mice in each group. L-4F group received intraperitoneal injection of L-4F (10 mg/kg), and Sc-4F group received intraperitoneal injection of nonfunctional control Sc-4F (10 mg/kg). The tumor volume of the two groups of mice was observed, and the tumor mass, angiogenesis and inflammatory response of the two groups of mice were compared. **Results** Compared with the tumor mass of mice in the Sc-4F group, the tumor mass of mice in the L-4F group decreased significantly, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There were a large number of angiogenesis and inflammatory cells infiltration in the tumor tissue of the Sc-4F group mice. Compared with Sc-4F group, the number of blood vessels and the number of inflammatory cells in the tumor tissue of the L-4F group were greatly reduced. **Conclusion** L-4F has a certain inhibitory effect on the growth of pancreatic cancer in mice.

Key words: apolipoprotein A-I mimic peptide; L-4F; pancreatic cancer; inflammation; angiogenesis

胰腺癌是具有极强侵袭性的恶性肿瘤, 近年来, 我国胰腺癌的发病率呈上升趋势, 其发病率和病死率分别位于恶性肿瘤的第 9 位和第 6 位。手术切除是目前唯一能根治胰腺癌的方法, 但有手术机会的患者仅占 10%~20%, 即使是可进行手术的患者术后 5 年生存率也不足 20%^[1]。胰腺导管腺癌家族史和慢性胰腺炎是胰腺癌的两大危险因素^[2]。炎症也可通过促进上皮细胞向间充质细胞转化和促进肿瘤细胞进入血液循环而加速胰腺癌的发展, 因此, 抗炎药物治

疗在抑制胰腺癌扩散方面具有一定作用。已有研究证实, 载脂蛋白 A-I 模拟肽 L-4F 是一种有效的抗氧化、抗炎剂^[3]。基于此, 本研究对 L-4F 在小鼠胰腺癌模型中的作用进行了探讨, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 雌性, 体质量 16~20 g, 共 16 只(购自北京军事医学科学院), 编号采用耳朵打孔的方式。饲养条件: 无菌, 25℃恒温, 光照/黑暗 12 h 循环, 食物与水按时投喂。饲养地

作者简介: 黄文敬, 女, 主管技师, 主要从事免疫检验研究。

本文引用格式: 黄文敬, 刘海辰, 周建宇. L-4F 对小鼠胰腺癌的抑制作用[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(19): 2827-2829.

点:天津医科大学动物实验中心,严格按照天津医科大学动物伦理委员会制定的实验室动物管理与使用条例进行管理、使用。小鼠胰腺癌细胞系 H7。

1.2 仪器与试剂 主要试剂:L-4F(序列 Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂)及其无功能对照 Sc-4F(序列 Ac-D-W-F-A-K-D-Y-F-K-K-A-F-V-E-E-F-A-K-NH₂)由 Lysine Bio-System 公司合成;胎牛血清、DMEM 培养液、L-谷氨酰胺、双抗青霉素-链霉素、胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司;磷酸盐缓冲液(PBS)购自上海索来宝生物科技有限公司。主要仪器:倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司;FACS-Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司;超净工作台购自苏州苏净安泰空气技术有限公司;细胞培养板、细胞培养皿,一次性 5 mL、10 mL 吸管及一次性 15 mL、50 mL 离心管购自美国 Corning 公司;CO₂ 培养箱购自日本三洋公司;Eppendorf 5804 高速离心机、迷你离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 试剂配制 将 L-4F 及其无功能对照 Sc-4F 溶解于 50 mmol/L 碳酸氢铵(pH 值为 7.0)及 0.1 mg/mL Tween-20 中备用。

1.3.2 细胞培养 具有高迁移能力的胰腺癌 H7 细胞参考文献[4-5]的体外筛选实验方法获得。将胰腺癌 H7 细胞培养于添加了 10%胎牛血清、100 mg/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养液中,然后放入 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱内培养。

1.3.3 胰腺癌原位荷瘤小鼠模型的构建 细胞准备:接种胰腺癌 H7 细胞在 10 cm 细胞培养皿内,采用 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清,1%的双抗青霉素-链霉素)在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养,达到对数生长期后开始收获细胞。胰酶收获细胞:在每个 10 cm 细胞培养皿中加入 1 mL 0.25%的胰酶,消化 1 min,加入含 10%胎牛血清的 2 mL DMEM 培养液,终止胰酶消化,转入 15 mL 离心管,加入 5 mL PBS,冲洗培养皿,转入 15 mL 离心管,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 重悬 H7 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复冲洗 2 次。细胞计数:收集的 H7 细胞用 PBS 重悬,计数,并调整细胞终水平至 2×10⁷/mL。麻醉小鼠:每只小鼠腹腔注射麻醉剂苯戊巴比妥(剂量为 150~200 μL),注射前用 75%乙醇对小鼠注射部位进行消毒。胰腺癌 H7 细胞注射:麻醉后用棉签蘸取聚维酮碘消毒液对小鼠腹部消毒;在小鼠左上腹部用眼科手术剪做一长约 1 cm 的纵切口,用无菌棉签轻轻翻找,使脾脏可见,然后在脾脏附近寻找胰腺;确定胰腺后,用眼科弯镊子轻轻夹住胰腺尾部尖端和脾脏,并轻轻横向拉出使胰腺充分暴露(注意切勿弄破脾脏);选用 27-gauge 规格的注射器针头,用规格 1 mL 的注射器轻轻从胰腺尾部尖端开始,沿横轴插到胰腺头部区域后固定(注意切勿穿透胰

腺,否则胰液外漏可能导致小鼠死亡),然后每只小鼠注射 2×10⁷/mL 的 H7 细胞 50 μL(注意细胞注射成功可见一明显小水泡鼓起,若胰腺被冲破,则注射时可见细胞悬浮液外漏;进针后或出针前稍改变针头方向,缓慢注入细胞悬液,缓慢出针,用无菌棉签轻按针孔片刻可有效避免漏液)。轻轻将脾脏和胰腺送回腹腔,小鼠的皮肤和腹膜用规格为 3-0 的外科手术线缝合。手术结束后,小鼠放在白炽灯照射加热的温暖环境中,直到自然苏醒。L-4F 及 Sc-4F 处理:术后第 3 天,将胰腺癌原位荷瘤小鼠随机分为 L-4F 组与 Sc-4F 组,每组 8 只,分别接受 L-4F(10 mg/kg)及其无功能对照 Sc-4F(10 mg/kg)腹腔注射治疗,每天 1 次,共治疗 7 d。处死小鼠:治疗 7 d 后,麻醉小鼠,脱颈处死,分离收获小鼠的胰腺肿瘤,观察肿瘤体积大小并称重肿瘤重量。

1.3.4 HE 染色 收集 L-4F 组与 Sc-4F 组胰腺癌原位荷瘤小鼠的肿瘤组织,石蜡包埋,制作石蜡切片,进行 HE 染色,观察组织中血管生成、炎性反应情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料两组间比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 L-4F 处理抑制胰腺癌原位荷瘤小鼠的肿瘤体积增长 与 Sc-4F 组小鼠的肿瘤体积比较,L-4F 组小鼠肿瘤体积较小。L-4F 组与 Sc-4F 组的胰腺癌分期也明显不同,Sc-4F 组大多数小鼠显示出胰腺癌终末期常见的临床表现,如腹水、远处转移和肠系膜淋巴结肿大,而 L-4F 组小鼠上述临床表现较少。见图 1。

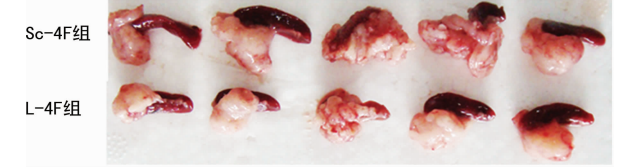
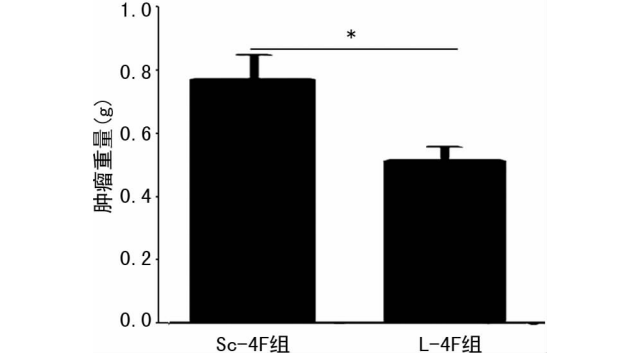


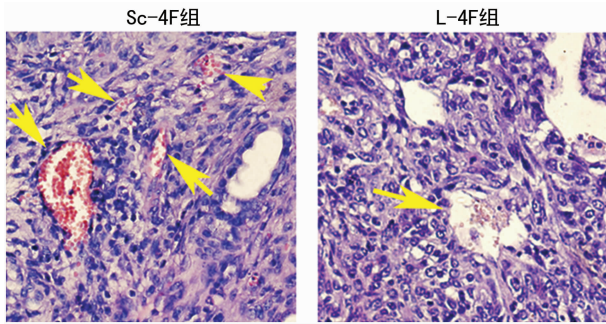
图 1 Sc-4F 组和 L-4F 组典型胰腺癌原位荷瘤小鼠的肿瘤

2.2 L-4F 处理抑制胰腺癌原位荷瘤小鼠的肿瘤重量增长 Sc-4F 组小鼠的肿瘤重量高于 L-4F 组小鼠,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见图 2。



注:Sc-4F 组与 L-4F 组比较,* *P*<0.05。
图 2 两组胰腺癌原位荷瘤小鼠的肿瘤重量比较

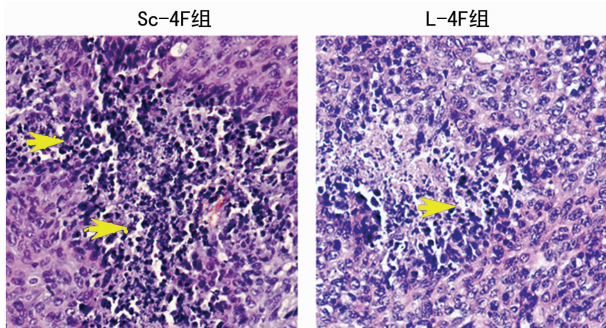
2.3 L-4F 处理抑制胰腺癌原位荷瘤小鼠肿瘤组织中的血管生成 Sc-4F 组小鼠肿瘤组织中有大量血管生成,与其相比,L-4F 组小鼠肿瘤组织中的血管数量明显减少。见图 3。



注:箭头所示为血管。

图 3 两组胰腺癌原位荷瘤小鼠肿瘤组织 HE 染色($\times 200$)

2.4 L-4F 处理抑制胰腺癌原位荷瘤小鼠肿瘤组织中的炎症反应 Sc-4F 组小鼠的肿瘤组织中炎症细胞大量浸润,与其相比,L-4F 组小鼠的肿瘤组织中炎症细胞数量大量减少。见图 4。



注:箭头所示为炎症细胞浸润部位。

图 4 两组胰腺癌原位荷瘤小鼠肿瘤组织 HE 染色($\times 200$)

3 讨 论

胰腺癌是全球公认的最致命的恶性肿瘤之一,其 5 年总生存率 $<5\%$,而接受手术治疗后复发也很常见,根治术后行辅助化疗的患者中位生存期只有 20~23 个月,这给胰腺癌的治疗提出了更高的要求,需要临床进一步改进胰腺癌管理策略和改善治疗方案^[2]。因此,研究者一直在不断地开发新型、低毒、有效的抗胰腺癌药物。

载脂蛋白 A-I(apoA-I)作为一个很有前景的治疗靶点,已被用于很多疾病的临床研究。除抗动脉粥样硬化的作用以外,apoA-I 还具有抗炎、抗氧化应激和抗细胞凋亡等作用。L-4F 是 apoA-I 模拟肽的一种,由 18 个氨基酸残基组成,因其具有较好的理化特性和较高的生物学活性而被广泛应用于多种疾病动物模型的研究中,如冠心病、糖尿病和关节炎等的相关研究。有研究证实,apoA-I 及其模拟肽能够通过减少炎症细胞因子的释放,从而减轻炎症反应^[4]。本研究探讨了 L-4F 在胰腺癌中的抗肿瘤作用,结果表明,与 Sc-4F 组比较,L-4F 组胰腺癌原位荷瘤小鼠的肿瘤体

积和重量均明显减小/降低,且 Sc-4F 组大多数小鼠出现胰腺癌终末期常见的临床表现,如远处转移、腹水和肠系膜淋巴结肿大等,而 L-4F 组出现上述临床表现的小鼠很少。通过对胰腺癌原位荷瘤小鼠的肿瘤组织进行石蜡切片 HE 染色,本研究发现,L-4F 处理抑制了肿瘤组织中的血管生成与炎症细胞浸润。上述结果初步证明,L-4F 具有抗胰腺癌作用,在接下来的研究中,本课题组将从 L-4F 对胰腺癌肿瘤微环境的影响方面出发,探讨可能的机制。

已有研究证实,L-4F 具有抗氧化、抗炎作用^[6]。血红素氧合酶 1(HO-1)可能在拮抗高代谢状态导致的炎症反应、内皮损伤及氧化应激中发挥了重要作用^[7]。充分上调 HO-1 表达可以保护组织细胞,对抗氧化应激损伤,其机制可能与经 L-4F 处理后的 HO-1 表达上调,同时激活了单磷酸腺苷活化的蛋白激酶与磷酸化蛋白激酶信号通路有关。L-4F 与辛伐他汀联合应用能够通过上调相关蛋白的表达促进胆固醇流出,有效减少动脉粥样硬化病变的发生^[8]。近期有研究发现,L-4F 有较强的抗肿瘤作用,其可通过降低卵巢癌、结肠癌细胞的活性和增殖能力,抑制肿瘤血管的生成,从而抑制卵巢癌、结肠癌的发展^[9-11]。L-4F 与多种肿瘤的发生发展、药物耐受和预后的相关性已被广泛报道,基础研究亦发现 L-4F 可能通过抗氧化、免疫调节、结合脂多糖及参与代谢与内分泌等机制来发挥抗肿瘤效应^[12]。L-4F 在肿瘤早期诊断、治疗和预后判断上的价值值得进一步验证和探索。

参考文献

- [1] 贾盛楠,章朝雷,曹利平. 腺癌的综合治疗进展研究[J]. 全科医学临床与教育,2021,19(3):256-258.
- [2] 杨吉勇,叶圳,梅丹,等. 胰腺癌生物学诊断治疗进展[J]. 现代中西医结合杂志,2020,29(3):119-122.
- [3] 李鹏,程诚,毕明辉,等. 阿托伐他汀联合 L-4F 对 apoE 缺失小鼠 HDL 功能及水平的影响[J]. 重庆医学,2015,44(17):2338-2340.
- [4] CORBETT T H,ROBERTS B J,LEOPOLD W R,et al. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice[J]. Cancer research,1984,44(2):717-726.
- [5] WANG B,SHI Q,ABRUZZESE J L,et al. A novel,clinically relevant animal model of metastatic pancreatic adenocarcinoma biology and therapy[J]. Int J Gastrointest Cancer,2001,29(1):37-46.
- [6] 熊晨君,张越,李银娇,等. 载脂蛋白 A-I 模拟肽 D-4F 减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤[J]. 上海医学,2018,41(11):676-680.
- [7] 高进辽,陈薇,胡家宾,等. 载脂蛋白 A-I 模拟肽对肥胖大鼠心脏结构和功能的影响及可能机制研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2019,21(8):856-862.
- [8] YING R,YUAN Y,QIN Y F,et al. The combination of L-4F and simvastatin stimulate cholesterol (下转第 2833 页)

碍^[12-13]。卵巢动脉 Vmax、Vmin、RI 和 PI 是常用的血流动力学指标,其中 Vmax、Vmin 用于评价卵巢供血量,RI 用于评价血流阻力情况,PI 用于评价血管畅通情况,Vmax、Vmin 降低,RI、PI 升高时表明卵巢供血功能障碍^[14]。在本研究中,术前、术后 6、12 个月,两组 E₂、LH、FSH 水平及 Vmax、Vmin、RI、PI 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),且同组内不同时间点的上述指标比较,差异也均无统计学意义($P>0.05$),说明单独使用腹腔镜下子宫肌瘤剔除术及腹腔镜下子宫动脉阻断术联合子宫肌瘤剔除术治疗对患者卵巢功能的影响均较小。子宫动脉阻断后,卵巢血液供应的代偿来自卵巢血管网的侧支循环,故治疗后患者卵巢动脉血流参数无明显变化^[15]。此外,子宫动脉阻断后卵巢侧支循环的建立也使该手术对机体下丘脑-垂体-卵巢轴的影响较小,患者性激素水平无明显变化。

综上所述,腹腔镜下子宫动脉阻断术联合子宫肌瘤剔除术对子宫肌瘤患者卵巢功能影响较小,能够有效降低患者子宫肌瘤复发率,且疗效较好,安全性高。

参考文献

[1] 任江虹,王丽.腹腔镜下子宫血管阻断术联合子宫肌瘤剔除术对子宫肌瘤复发率的影响[J].中国实验诊断学,2017,21(5):837-839.

[2] 马晔琳,姚惠,杨维佳,等.中医体质类型与子宫肌瘤相关性的 Meta 分析[J].中华全科医学,2019,17(11):142-146.

[3] 于灵,邹青娥.腹腔镜下子宫肌瘤剔除术联合曲普瑞林或米非司酮治疗多发性子宫肌瘤临床疗效及复发率的观察比较[J].中国妇幼保健,2019,34(8):1897-1899.

[4] 郎景和.子宫肌瘤的诊治中国专家共识[J].中华妇产科杂志,2017,52(12):793-800.

[5] XIAO J C,ZHANG R P,TENG Y,et al. Disseminated peritoneal leiomyomatosis following laparoscopic myo-

mectomy:a case report[J].J Int Med Res,2019,47(10):5301-5306.

[6] 孙绍敏.腹腔镜下子宫肌瘤剔除术治疗子宫肌瘤的效果及对患者免疫功能的影响[J].中国妇幼保健,2018,33(1):213-216.

[7] 郎景和.子宫腺肌病的若干问题[J].中国实用妇科与产科杂志,2017,33(2):129-133.

[8] GRZYBOWSKI A,ELIKOWSKI W,GACA-WYSOCKA M. Cardiovascular risk factors in patients with combined central retinal vein occlusion and cilioretinal artery occlusion[J]. Medicine,2018,97(1):e9255.

[9] 吴青,林坦,刘越.腹腔镜子宫腺肌瘤切除联合子宫动脉阻断术对内膜白血病抑制因子的影响[J].中华生殖与避孕杂志,2018,38(4):315-318.

[10] 刘锦钰,杜娟,李晓星,等.腹腔镜下子宫动脉阻断术联合肌瘤切除术治疗子宫肌瘤的临床研究[J].中国妇幼保健,2018,33(8):1704-1707.

[11] 施建红,石磊,马越,等.腹腔镜下肌瘤挖除术时两种子宫动脉阻断术式的比较[J].中国性科学,2018,27(8):68-70.

[12] LAUE L,CHAN W Y,HSUEH A J W,et al. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familialmale precocious puberty[J]. Nature,2018,365(6):652-654.

[13] 凌爱华,赵维英.腹腔镜下子宫血管阻断术联合子宫肌瘤剔除术对患者生活质量和生育功能的影响[J].中国计划生育学杂志,2019,27(12):1620-1623.

[14] 周玉珍,束长珍,黄琴芬.腹腔镜下子宫血管阻断术联合子宫肌瘤剔除术对子宫和卵巢血流的影响研究[J].检验医学与临床,2016,13(16):2249-2251.

[15] 赵佳,莫璟娟,徐建阳.子宫动脉阻断在腹腔镜下子宫肌瘤剔除术中的应用价值[J].中国基层医药,2017,24(9):1385-1389.

(收稿日期:2021-02-16 修回日期:2021-05-09)

(上接第 2829 页)

efflux and related proteins expressions to reduce atherosclerotic lesions in apoE knockout mice[J]. Lipids Health Dis,2013,18:180.

[9] SHARIFOV O F,XU X,GAGGAR A,et al. L-4F inhibits lipopolysaccharide-mediated activation of primary human neutrophils[J]. Inflammation,2019,37(5):1401-1412.

[10] SU F,GRIJALVA V,NAVAB K,GANAPATHY E,et al. HDL mimetics inhibit tumor development in both induced and spontaneous mouse models of colon cancer[J]. Mol Cancer Ther,2019,11(6):1311-1319.

[11] GAO F,CHATTOPADHYAY A,NAVAB M,et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides inhibit expression and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha in human ovarian cancer cell lines and a mouse ovarian cancer model[J]. J Pharmacol Exp Ther,2019,342(2):255-262.

[12] 谢利莹,罗雪珍,陈晓军.载脂蛋白 A-I 的抗肿瘤作用及机制研究进展[J].中国肿瘤临床,2017,44(20):1045-1048.

(收稿日期:2021-01-23 修回日期:2021-05-13)