

## 巨噬细胞移动抑制因子抗体对大鼠大肠异常隐窝病灶及大肠癌的影响\*

沈媛媛<sup>1</sup>,刘成霞<sup>1</sup>,王爱丽<sup>1</sup>,程凯<sup>2</sup>,张冉冉<sup>1</sup>

(滨州医学院附属医院:1.消化内科;2.甲状腺乳腺外科,山东滨州 256600)

**[摘要]** **目的** 探讨巨噬细胞移动抑制因子(MIF)抗体对二甲基胍诱导的大鼠大肠异常隐窝病灶(ACF)、癌瘤数目及大肠癌变过程中 MIF 表达的影响。**方法** 二甲基胍诱导建立大鼠大肠癌变模型,观察 MIF 抗体对 ACF 及癌瘤数量的抑制作用,并采用 ELISA 及免疫组化方法检测 MIF 抗体对早期癌变肠黏膜及癌瘤形成后 MIF 表达的影响。**结果** MIF 抗体干预后可明显抑制 ACF 及癌瘤的数量( $P<0.01$ )。大鼠大肠癌模型中 MIF 的表达明显高于癌前病变 ACF 模型中 MIF 的表达( $P<0.01$ ),应用 MIF 抗体可明显抑制大鼠 ACF 及大肠癌模型中 MIF 表达。**结论** MIF 抗体可明显抑制大鼠大肠黏膜癌变,可能与抑制 ACF 数量及 MIF 表达有关,MIF 抗体有望成为大肠癌预防和治疗的新靶点。

**[关键词]** 巨噬细胞移动抑制因子抗体;异常隐窝病灶;结直肠肿瘤**[中图分类号]** R574.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)05-0598-03

## Effect of MIF antibody on aberrant crypt foci and colorectal carcinoma in rat\*

SHEN Yuanyuan<sup>1</sup>, LIU Chengxia<sup>1</sup>, WANG Aili<sup>1</sup>, CHENG Kai<sup>2</sup>, ZHANG Ranran<sup>1</sup>

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Thyroid and Breast Surgery, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256600, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of macrophage migration inhibitory factor(MIF) antibody on the rat colonic aberrant crypt foci(ACF) induced by 1,2-dimethylhydrazine(DMH), carcinoma number and expression of MIF in rat colonic carcinogenesis. **Methods** Rat colonic carcinogenesis model was induced by DMH. In this model, the inhibitory effect of MIF antibody on the number of ACF and carcinoma was observed. ELISA and immunohistochemical staining were adopted to investigate the effect of MIF antibody in early cancerative intestinal mucosa and MIF expression after cancer formation. **Results** The number of ACF and carcinoma was significantly inhibited by MIF antibody intervention( $P<0.01$ ). The expression of MIF in the colonic carcinoma model was significantly higher than that in the pre-carcinoma ACF model( $P<0.01$ ). Applying MIF antibody could significantly inhibit the expression of MIF in both rat colonic ACF and colonic carcinoma model. **Conclusion** MIF antibody can significantly inhibit the rat colonic mucosal carcinogenesis, which may be related with inhibiting number of ACF and expression of MIF. MIF antibody may be expected to become a new target spot of precaution and treatment of colonic carcinoma.

**[Key words]** macrophage migration inhibitory factor antibody; aberrant crypt foci; colorectal neoplasms

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康,早期发现大肠癌前病变是提高大肠癌治愈率的关键。异常隐窝病灶(aberrant crypt foci, ACF)是目前显微镜下可见的最小、最早的癌前病变<sup>[1]</sup>, ACF 数量与结直肠肿瘤发生有明显相关性<sup>[2]</sup>。因此,如何早期发现及治疗 ACF 成为研究的热点。研究表明,巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)作为一种传统的炎性因子,可直接影响细胞的分裂和诱导癌基因的恶性转化,是一个独特的促肿瘤发生细胞因子<sup>[3-4]</sup>。因此,本实验采用二甲基胍诱导大鼠 ACF 及大肠癌模型,在组织学水平探讨 MIF 的表达及 MIF 抗体对 ACF 及癌瘤数量的影响,分析 MIF 抗体在大肠癌变中的抑制作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验动物:实验用 Wistar 大鼠 100 只,雌雄各半,5 周龄左右,平均体质量 70 g 左右,购自山东鲁抗公司,生产许可证号 SCXK 鲁 20130001。严格按照滨州医学院动物实验伦理委员会的条例执行。主要药物及试剂:二甲基胍、MIF 抗体均由济南芯博生物科技有限公司生产,生产批号 D161802、

20415-1-AP。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 所有大鼠在温度 24 ℃、湿度 50%左右的条件下饲养,喂以常规饲料,适应 1 周后,将其分为 5 组,每组 20 只。空白组(A组):每周腹腔内注射生理盐水 1 mL/100 g。参照贾旭东等<sup>[5]</sup>方法建立动物模型,ACF 对照组(B组):腹腔注射二甲基胍 25 mg/kg 及生理盐水 1 mL/100 g,每周 1 次,连续 12 周;MIF 抗体治疗 ACF 组(C组):腹腔注射二甲基胍 25 mg/kg+生理盐水 1 mL/100 g+MIF 抗体 400 μg/只,连续 12 周;大肠癌对照组(D组):腹腔注射二甲基胍 25 mg/kg 及生理盐水 1 mL/100 g,每周 1 次,连续 20 周后;MIF 抗体治疗大肠癌组(E组):腹腔注射二甲基胍 25 mg/kg+生理盐水 1 mL/100 g + MIF 抗体 400 μg/只,连续 20 周。以上大鼠每周称体质量 1 次,并根据体质量改变生理盐水、二甲基胍剂量。

**1.2.2 大鼠 ACF 检查** 实验第 13 周,选取 A 组大鼠 10 只及 B、C 组全部( $n=20$ )大鼠用于 ACF 检查。10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血后断头处死大鼠,快速分离大肠并切下,参照 BIRD<sup>[6]</sup>的方法固定标本和染色,用生理盐水冲洗肠内容物,将

整根大肠铺平夹于两层滤纸之间,固定于 100 mL/L 中性缓冲甲醛溶液中,至少 24 h。固定好的标本用 2 g/L 亚甲蓝染色 3~5 min,立即在  $\times 40$  光学显微镜下观察并计数 ACF 数目。比较 A、B、C 3 组 ACF 数目变化。

**1.2.3 大鼠大肠癌检查** 实验第 21 周,将 A 组剩余 10 只大鼠及 D、E 组全部( $n=20$ )大鼠用 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血后断头处死,快速分离大肠并切下,纵向剖开,用生理盐水冲洗肠内容物,展开铺于玻璃板上,计算每只大鼠大肠肿瘤数目,最后用中性缓冲甲醛溶液固定。固定后,梯度乙醇脱水,石蜡包埋并 5 mm 切片,每组选取 2 张进行常规 HE 染色。

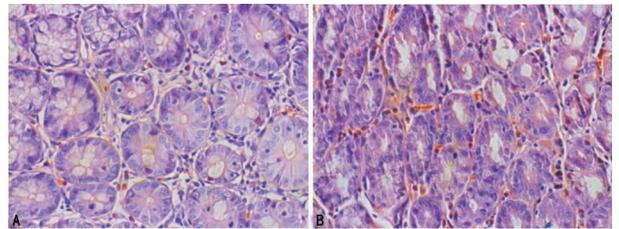
**1.2.4 ELISA 及免疫组化检测** 将各组血标本离心并取血液上清液,冻存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。在进行 ELISA 前将各组血液上清液复温,并按照 ELISA 试剂盒说明书检测 MIF。将各组石蜡标本 5 mm 切片后,随机选取 2 张进行 MIF 免疫组化染色,严格按照说明书进行。以已知阳性结果作为阳性对照,PBS 液作为阴性对照。

**1.3 统计学分析** 数据采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验;计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,分类变量间相关性检验采用 Pearson 等级相关分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MIF 抗体对大鼠 ACF 的形成及大肠癌形成的影响** 实验第 13 周,处死 A 组 10 只大鼠的大肠中无 ACF 形成,B、C 组大鼠的大肠中均有 ACF 形成(图 1A);B、C 组大鼠的大肠 ACF 总数量分别为( $115.20\pm 14.12$ )、( $52.40\pm 7.35$ )个,C 组的抑制率为 54.50%,C 组每只大鼠的大肠 ACF 总数量明显低

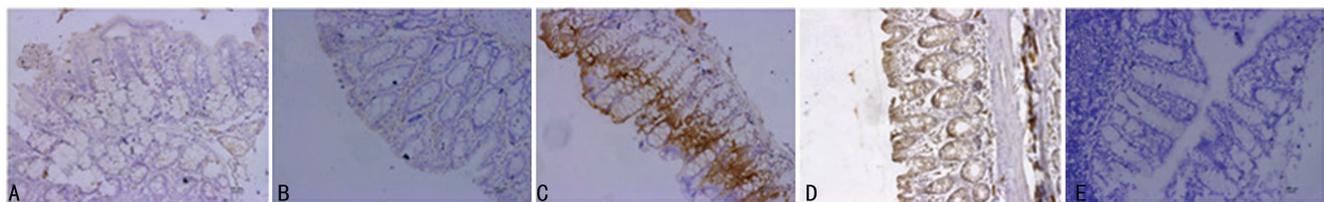
于 B 组,两组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。实验第 21 周,处死 A 组 10 只大鼠的大肠中无大肠癌发生,D、E 组大鼠的大肠中均有大肠癌形成(图 1B);D 组大鼠大肠癌总数目为 27 个,E 组为 14 个;E 组的抑制率为 48.10%,与 D 组比较,E 组的大鼠大肠癌发生率明显受抑制( $P<0.01$ )。



A: ACF; B: 大肠癌

图 1 大鼠 ACF 及大肠癌形成 HE 染色( $\times 40$ )

**2.2 MIF 抗体对大鼠大肠癌变过程中 MIF 表达的影响** ELISA 检测各组血清 MIF 表达水平,A、B、C、D、E 组分别为( $1.60\pm 0.30$ )、( $20.10\pm 4.80$ )、( $12.70\pm 3.60$ )、( $78.00\pm 7.50$ )、( $51.20\pm 8.50$ )pg/mL;与 A 组比较,B、C、D、E 组大鼠血清 MIF 表达水平均明显升高( $P<0.01$ );B 组 MIF 水平明显高于 C 组( $P<0.01$ ),D 组 MIF 水平明显高于 E 组( $P<0.01$ ),D 组 MIF 水平明显高于 B 组( $P<0.01$ )。免疫组化法检测各组 MIF 表达,实验第 13 周,MIF 在 B、C 组均有表达(图 2A、B),且 C 组可明显抑制 MIF 表达;实验第 21 周,D 组呈高表达(图 2C),E 组可明显抑制 MIF 表达(图 2D),MIF 在 A 组不表达(图 2E)。



A: B 组; B: C 组; C: D 组; D: E 组; E: A 组

图 2 免疫组化法检测各组大鼠 MIF 表达

## 3 讨论

二甲基胍是一类经典的啮齿类致癌剂,在细胞、组织水平变化及肿瘤发生的分子机制方面与人类大肠癌变过程类似<sup>[7]</sup>;自 1987 年 BIRD<sup>[6]</sup>利用实体镜在大肠癌动物模型中首次发现了 ACF,在随后一系列临床及动物研究中发现,ACF 是大肠癌发病路径中,在显微镜下发现的最早的黏膜损伤,它的出现明显早于不典型增生及腺瘤,并在遗传、表观遗传、免疫组化和组织病理等方面的改变影响着肿瘤的发生,且 ACF 的数量与结直肠癌高危肿瘤[即直径 1 cm 及以上和(或)绒毛状、和(或)重度不典型增生、浸润癌]的发生有明显的相关性,因此它被称为最早的大肠癌前病变<sup>[8-9]</sup>。本实验证实了二甲基胍可诱导产生大鼠最早期癌前病变大肠 ACF,并随用药时间增加建立大鼠大肠癌模型,这说明在大鼠大肠癌变过程中,ACF 是目前最早发生的、显微镜下可见的最小的癌前病变,通过检测 ACF 数量可评价大肠癌变概率。

大肠肿瘤的发生、发展是一个多因素、多途径过程,目前,越来越多的研究集中于肿瘤微环境对肿瘤发生、发展的影响。MIF 是 1966 年由 BLOOM 等<sup>[10]</sup>发现的一种淋巴因子,因其能

减慢或抑制巨噬细胞的随机移动而得名,有激素样抗炎、免疫耐受的作用<sup>[11]</sup>,近年来,发现 MIF 在结肠癌、肝癌、乳腺癌等多种肿瘤中的高表达,并通过信号通路 CD74/CD44 受体结合来活化细胞外信号调节 ERK1/2 MAPK 信号途径<sup>[12]</sup>,并与 CXCR2 和 CXCR4 结合,抑制抑癌基因 p53 功能<sup>[3]</sup>,发挥其在肿瘤增殖、分化等方面的作用。在大肠癌的相关研究中,目前已发现,向 C26 荷瘤小鼠注射抗 MIF 抗体后,可明显抑制肿瘤生长<sup>[13]</sup>;在人正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌组织及相应患者的血清中,MIF 的表达依次增加,且与大肠癌的淋巴转移、肝转移密切相关<sup>[14]</sup>。因此,以 MIF 抗体作为大肠癌预防、治疗、防治转移及预后判断有着潜在的发展前景<sup>[15]</sup>。本实验研究发现,MIF 抗体可以明显抑制 ACF 及大肠癌癌瘤数量,即在组织水平上说明了 MIF 抗体在大鼠从大肠癌早期癌至癌瘤形成的过程中发挥抑制作用。通过免疫组化和 ELISA 发现,大肠癌肠黏膜中 MIF 的表达明显高于早期癌变 ACF 模型肠黏膜的 MIF 表达,在一定意义上说明 MIF 参与了大肠癌变过程,应用 MIF 抗体后可明显抑制 ACF 和大肠癌模型中 MIF 的表达,在蛋白水平上进一步证实了 MIF 抗体在大肠癌变

过程中的抑制作用。

综上所述,应用 MIF 抗体后能明显抑制 ACF 数量及大肠癌瘤体体积,并抑制 MIF 在血清及组织中的表达,这可能是 MIF 抗体能阻断大肠癌癌变的作用机制,在今后的研究中,需要在分子水平等方面进一步深入研究 MIF 抗体的作用机制,MIF 可能会成为大肠癌早诊早治的新靶点。

#### 参考文献

- [1] WARGOVICH M J, JIMENEZ A, MCKEE K, et al. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression[J]. *Carcinogenesis*, 2000, (21): 1149-1155.
- [2] SEIKE K, KODA K, ODA K, et al. Assessment of rectal aberrant crypt foci by standard chromoscopy and its predictive value for colonic advanced neoplasms[J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(6): 1362-1369.
- [3] JUNG H, SEONG H A, HA H. Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of P53 activity[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20383-20396.
- [4] XU X D, WANG B, YE C S, et al. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2008, 261(2): 147-157.
- [5] 贾旭东, 王伟, 崔文明, 等. 饮茶对大鼠大肠变性隐窝病灶及大肠肿瘤的影响[J]. *卫生研究*, 2000, 29(1): 54-56.
- [6] BIRD RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings[J]. *Cancer Lett*, 1987, 37(2): 147-151.
- [7] INAMINE M, SUZUI M, MORIOKA T, et al. Inhibitory effect of dietary monoglucosylceramide 1-O-beta-glucosyl-N-2'-hydroxyarachidoyl-4,8-sphingadienine on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in F344 rats[J]. *Cancer Sci*, 2005, 96

(12): 876-881.

- [8] CADERNI G, PEWELLI M G, CECCHINI F, et al. Enhanced growth of colorectal aberrant crypt foci in fasted/refed rats involves changes in TGF21 and P21CIP expressions[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(2): 323-327.
- [9] LUO L, SHEN G Q, STIFFLER K A, et al. Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(6): 1153-1159.
- [10] BLOOM B R, BENNETT B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity[J]. *Science*, 1966, 153(3731): 80-82.
- [11] SUN B, NISHIHARA J, SUZUKI M, et al. Induction of macrophage migration inhibitory factor by lysophosphatidic acid: relevance to tumor growth and angiogenesis[J]. *Int Moll Med*, 2003, 12(4): 633-641.
- [12] BARON N, DEUSTER O, NOELKER C, et al. Role of macrophage migration inhibitory factor in primary glioblastoma multiforme cells[J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(5): 711-717.
- [13] SHUN C T, LIN J T, HUANG S P, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(24): 3767-3771.
- [14] 何兴祥, 李晓宇, 郝元涛, 等. 巨噬细胞移动抑制因子与大肠癌肝转移的关系[J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(11): 855-858.
- [15] 杨荣娇, 王丽京, 臧林泉, 等. 靶向巨噬细胞移动抑制因子的 Sirna 对小鼠大肠癌肝转移的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(9): 1495-1497.

(收稿日期: 2017-07-05 修回日期: 2017-09-11)

(上接第 597 页)

- [20] SHEN J, CHEN X I, HENDERSHOT L, et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals[J]. *Dev Cell*, 2002, 3(1): 99-111.
- [21] MESE H, SASAKI A, NAKAYAMA S, et al. Analysis of cellular sensitization with cisplatin-induced apoptosis by glucose-starved stress in cisplatin-sensitive and -resistant A431 cell line[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(2A): 1029-1033.
- [22] 王涛, 王琪, 裴复阳. GRP94 表达在大细胞肺癌 NCI-H460 细胞对顺铂耐药中的作用[J]. *大连医科大学学报*, 2011, 33(6): 517-520.
- [23] NAGELLERKE A, BUSSINK J, VAN DER KOGEL A J, et al. The PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded

protein response affects radioresistance by interfering with the DNA damage response[J]. *Radiother Oncol*, 2013, 108(3): 415-421.

- [24] STROME E D, WU X W, KIMMEL M, et al. Heterozygous screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies dosage-sensitive genes that affect chromosome stability[J]. *Genetics*, 2008, 178(3): 1193-1207.
- [25] DUFHEY E, URRRA H, HETZ C. ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts[J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 15(33): 40-47.
- [26] 黄亨平, 吴明松. 内质网应激--肿瘤治疗的新靶点[J]. *现代医药卫生*, 2014, 30(17): 2600-2603.

(收稿日期: 2017-07-03 修回日期: 2017-09-08)