مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۷۰/هفته دوم اسفند ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۰

# لپتین به واسطه‌ی افزایش سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی موجب افزایش رشد تومور ملانوما می‌گردد

دکتر شقایق حق جوی جوانمرد[۱]، مهدی خورشیدی بهزادی[۲]، فاطمه سادات امجدی[۳]، دکتر مجید خزاعی[۴]، دکتر حمید زرکش اصفهانی[۵]

## چکیده

**مقدمه:** مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که چاقی باعث افزایش خطر ابتلا به برخی از سرطان‌ها از جمله ملانوما می‌شود. لپتین پلی‌پپتیدی است که اغلب توسط سلول‌های چربی ترشح می‌شود. همچنین مشخص شده است که در چاقی بیان لپتین افزایش می‌یابد. سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی (Endothelial progenitor cell یا EPC) در رگ‌زایی در بافت‌ها نقش دارند. به تازگی در چندین تحقیق پیشنهاد شده است که رشد تومور وابسته به سلول‌های EPC است. هدف ما در مطالعه‌ی انجام شده، بررسی اثر لپتین روی رشد تومور ملانوما و شمارش تعداد EPCهای در گردش خون محیطی بود.

**روش‌ها:** به منظور ایجاد تومور ملانوما تعداد $۲ \times ۱۰^{۶}$ سلول ملانومای B16F10 به ۳۲ موش C57BL6 به صورت زیرجلدی تزریق شد. سپس ۳۲ موش به صورت تصادفی به چهارگروه ۸ تایی تقسیم شدند. دو گروه روزانه دو بار به صورت تزریق داخل صفاقی PBS (Phosphate-buffered saline) یا لپتین نوترکیب موشی را دریافت کردند (۱ میکروگرم به ازای ۱ گرم وزن موش). دو گروه دیگر به صورت تزریق داخل صفاقی به ترتیب 9F8 آنتی‌بادی ضد گیرنده‌ی لپتین و ایمونوگلوبین IgG موشی با غلظت ۵۰ میکروگرم به ازای هر ۱ گرم وزن موش به صورت ۳ روز متوالی دریافت کردند. در پایان هفته‌ی دوم، نمونه‌های خون موش‌ها جهت شمارش EPCها با روش فلوسایتومتری جمع‌آوری شد. همچنین تومور موش‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تعداد سلول‌های EPC و وزن تومور در گروه‌های لپتین، PBS، 9F8 و IgG به ترتیب عبارت از (۲۷/۲۶ ± ۱۳۲/۶۶، ۱۸ ± ۲۳/۳۳، ۱۷۱ ± ۱۳۳/۳۳ و ۳۶/۵ ± ۲۲۲/۶۶) در ۱ سی‌سی خون و (۰/۳ ± ۱/۷، ۰/۲ ± ۱/۶۱، ۰/۳ ± ۱/۷ و ۰/۶ ± ۳/۲) گرم بود. وزن تومور، اندازه‌ی آن و تعداد سلول‌های EPC به طور معنی‌داری در گروه لپتین بیشتر از گروه 9F8 و همچنین بیشتر از هر دو گروه شاهد بود.

**نتیجه‌گیری:** لپتین باعث رشد تومور ملانوما می‌گردد. همچنین لپتین باعث افزیش تعداد سلول‌های EPC می‌شود و ممکن است سبب افزایش رگ‌زایی نیز شود.

**واژگان کلیدی:** سرطان ملانوما، لپتین، EPC

## مقدمه

ایجاد و شکل‌گیری رگ‌های خونی جدید در رشد و متاستاز تومورها نقش مهمی دارند (۱). تشکیل عروق خونی در تومورها با دو مکانیسم آنژیوژنز و واسکولوژنز صورت می‌گیرد. آنژیوژنز تشکیل عروق از طریق جوانه زدن از عروق موجود است و واسکولوژنز تشکیل عروق جدید از طریق سلول‌های بنیادی است که به طور عمده از مغز استخوان منشعب می‌شوند و سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی (EPC یا Endothelial progenitor cell) از این جمله هستند

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] کارشناس، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** دکتر شقایق حق جوی جوانمرد
Email: shaghayeghhaghjoo@yahoo.com



www.mui.ac.ir

(۲). تحقیقات اخیر پیشنهاد کردند که رشد برخی از انواع تومورها تنها وابسته به آنژیوژنز نیست و ارتباط منطقی بین سلول‌های اندوتلیال بالغ و تولید رگ‌های خونی جدید وجود دارد. اما اغلب با واسکولوژنز مرتبط هستند که می‌تواند نشان دهنده‌ی این موضوع باشد که تولید رگ‌های جدید خونی وابسته به EPCها هستند (۳).

مهاجرت EPCها از مغز استخوان یک مرحله‌ی مهم در واسکولوژنز است. میزان EPCهای خون محیطی در مراحلی از بدخیمی‌های مشخصی افزایش داشته است. علاوه بر این، اثر ممانعتی EPC در شرایط نئوپلاستیک به طور مؤثر باعث کاهش رشد و تمایز تومور می‌گردد (۵). در این رابطه EPCها بالقوه در پاتوفیزیولوژی ملانوما نقش دارند و می‌توانند به عنوان یک عامل پیش‌آگهی برای رشد تومور باشند.

لپتین یک پپتید با عملکردهای متنوع است که به صورت عمده از سلول‌های چربی ترشح می‌شود و توسط ژن چاقی Obese (ob) کد می‌شود (۶). همچنین چندین اثر دیگر مثل تنظیم مصرف غذا و انرژی و عملکردهای ایمنی نیز از خصوصیات لپتین عنوان شده است. لپتین دارای نقش آنژیوژنیک در شرایط داخل و خارج بدن است و باعث افزایش محصولات سلول‌های اندوتلیال همانند NO (Nitric oxide) (۸-۷) و افزایش بیان VEGF (Vascular endothelial growth factor) و (Vascular endothelial growth factor receptor) VEGFR/2 و فاکتور شماره‌ی ۲ بازی فیبروبلاستیک (FGF2 یا Fibroblast growth factors) می‌گردد (۹).

سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های اندوتلیال (۱۱-۱۰)، سلول‌های خونی با مارکر +CD34 (۱۰) و سلول‌های EPC خون محیطی گیرنده‌ی لپتین را بیان می‌کنند (۱۲).

لپتین باعث افزایش چسبندگی و مهاجرت EPCها در آسیب‌های عروقی می‌شود (۱۲). اثر لپتین روی سلول‌های اندوتلیوم از طریق NO اعمال می‌گردد. همچنین لپتین از این طریق می‌تواند به صورت مستقیم با فعال کردن تولید NO در مسیر AKt در سلول‌های اندوتلیال باعث تغییرات NO شود (۱۴-۱۳). سلول‌های ملانومای موش گیرنده‌های لپتین را بیان می‌کنند. اما مطالعات کمی در مورد ارتباط لپتین و ملانوما وجود دارند. تأثیر لپتین بر رشد تومور سینه در تحقیقات اخیر نشان داده شده است. به علاوه در افزایش بیان VEGF/VEGFR2 و اینترلوکین ۱ نقش مؤثری دارد (۴).

نتایج یک مطالعه‌ی اپیدمیولوژیک نشان داد که مقادیر بالای لپتین سرم با افزایش خطر ملانوما در ارتباط مستقیم است (۱۵). همچنین لپتین به طور مستقیم باعث تشدید رشد تومور ملانوما در موش می‌شود (۱۶). به تازگی در تحقیق دیگری مشخص شده است که لپتین از طریق فعال کردن مسیر MAPK (Mitogen-activated protein kinase) باعث تکثیر سلول‌های ملانوما شد (۱۷).

هدف اصلی ما در این مطالعه، پیدا کردن پاسخ این سؤال بود که آیا لپتین باعث افزایش تعداد EPC در خون محیطی در موش‌های مبتلا به ملانوما می‌شود یا خیر.

## روش‌ها

***کشت سلول:***

سلول‌های ملانومای B16F10 با توانایی رشد در موش‌های نژاد C57BL/6 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (مؤسسه پاستور) خریداری شدند. سلول‌ها



www.mui.ac.ir

در محیط کشت DMEM با غلظت ۴ میلی‌مول L گلوتامین و ۴/۵ گرم در لیتر گلوکز و ۱۰ درصد FBS و ترکیب آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسن و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پنی سیلین با شرایط رطوبتی و $Co_2$ ۵ درصد در دردمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند (۱۸).

پس از ایجاد تراکم سلولی ۸۰ درصد در یک لایه ی کشت سلولی، سلول ها توسط محلول PBS (Phosphate-buffered saline) (شامل ۲۵ درصد تریپسین و ۰/۰۳ درصد EDTA) جدا شدند و به وسیله‌ی سانتریفیوژ با دور ۱۰۰ گرم به صورت توده‌ی متراکم در آمدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و سلول های توده شده دوباره در محلول PBS معلق شدند و سلول‌ها شمارش گردیدند.

***کارآزمایی حیوانی:***

جهت ایجاد تومور ملانوما در مدل حیوانی از موش های نر ۸-۶ هفته‌ای با نژاد C57BL/6 که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند استفاده شد. ابتدا به موش‌ها برای سازگاری با محیط زیست جدید یک هفته فرصت داده شد. تزریق زیر جلدی $۲ \times ۱۰^۶$ سلول ملانومای B16F10 به ۳۲ موش با نژاد C57BL6 انجام شد. اولین توده‌های تومور قابل تشخیص در روزهای ۶ و ۷ به وجود آمد. در روز ۸ موش های دارای تومور به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند.

دو گروه از موش ها شامل ۱۶ عدد روزانه ۲ مرتبه تزریق داخل صفاقی PBS و لپتین نوترکیب موشی را دریافت کردند (۱ میکروگرم به ازای هر ۱ گرم وزن موش). دو گروه دیگر به صورت داخل صفاقی به ترتیب آنتی‌بادی مونوکلونال 9F8 و IgG موشی با دوز ۵۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن موش، در ۳ روز متوالی دریافت کردند. لازم به ذکر است که 9F8 یک آنتی بادی مونوکلونال بر علیه گیرنده‌ی لپتین است. آنتی‌بادی 9F8 بخشی از هدیه‌ی پروفسور Richard Ross از دانشگاه Sheffield کشور انگلیس بود.

در روز ۱۴ همه‌ی موش‌ها با استفاده از فنوباربیتورات به آسانی جان خود را از دست دادند. تومورها با دقت جدا شدند و وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین حجم تومورها با استفاده از فرمول:

$$V = (4/3 \times \pi \times (a)\ 2 \times (b)$$

اندازه‌گیری شدند که در آن a نصف قطر کوچک و b نصف محور بزرگ تومور است. وزن موش ها نیز پس از درآوردن و برش تومور دوباره اندازه‌گیری و ثبت شد.

***فلوسایتومتری EPCها:***

بعد از خون‌گیری شمارش تعداد EPCها با روش فلوسایتومتری انجام شد. EPC ها با مارکر های اندوتلیالی موشی PE-VEGFR/2 (شرکت R&D)، FITC-CD34+ (شرکت Ebioscience) و PECY5-CD45+ (Santa Cruz Biotechnology) شمارش شدند.

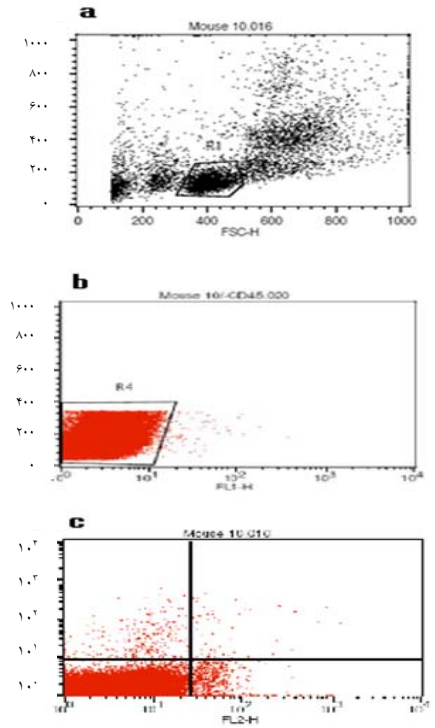
به طور خلاصه خون موش‌ها در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری گردید و برای ۱۰ دقیقه با FCR-blocking (Miltenyibiotec، Germany) انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ی خون کامل با ۴ میکرولیتر از KDR، ۵ میکرولیتر از CD34 و ۵ میکرولیتر از CD45 انکوبه شد. نمونه های کنترل منفی با ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل برای هر نمونه انکوبه شدند. گلبول‌های قرمز قبل از فلوسایتومتری لیز شدند.

بعد از لیز کردن RBCها، سوسپانسیون سلول با فلوسایتومتری FACS Caliber مورد سنجش قرار گرفت. پس از عملیات انتخاب (Gating) جمعیت لنفوسیت ها و



www.mui.ac.ir

تعداد EPCهایی که مارکرهای CD45 dim، +CD34 و +KDR داشتند به صورتی که در شکل ۱ نشان داده شده است، مشخص شدند.




**شکل ۱. شمارش سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال با فلوسایتومتری**
**A**: مشخص سازی و جدا کردن لنفوسیت‌ها بر اساس **forward & side scatter**
**B**: تعیین سلول‌های **-CD45** که در جمعیت لنفوسیت‌ها قرار گرفته‌اند.
**C**: مشخص سازی **EPC**ها با مارکرهای **dim**، **+CD34** و **+KDR** در جمعیت **-CD45**

***اندازه‌گیری لپتین:***

موش‌ها پس از ۱۴ ساعت ناشتا (بدون غذا) پس از خون‌گیری از طریق قلب کشته شدند. سپس پلاسمای خون کامل با استفاده از سانتریفیوژ جدا گردید و غلظت لپتین با استفاده از روش ELISA (کیت شرکت R&D) با دستگاه Biotek ساخت آمریکا ارزیابی شد.

اطلاعات به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. مقایسه‌ی بین گروه‌ها به وسیله‌ی آزمون ANOVA و پس‌آزمون Bonferroni مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بیان تفاوت وزن های اندازه‌گیری شده قبل و بعد، از آزمون Student-t استفاده شد. مقادیر $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. همه‌ی اطلاعات آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicag, IL) مورد سنجش قرار گرفت.

## یافته‌ها

مقادیر لپتین پلاسما به طور معنی‌داری در گروه لپتین بالاتر از موش‌های گروه‌های دیگر بود، در حالی که تفاوت معنی‌داری بین دیگر گروه‌ها نبود (جدول ۱). وزن موش ها در هر گروه در جدول ۱ نشان داده شده است. کاهش وزن موش های گروه لپتین چشمگیر و محسوس بود. همچنین در طول مطالعه موش‌های گروه 9F8 با افزایش وزن معنی‌داری مواجه بودند.

تعداد سلول های EPC در یک سی سی خون در گروه‌های لپتین، PBS، 9F8 و IgG به ترتیب عبارت

**جدول ۱. مقادیر غلظت پلاسمایی لپتین، وزن تومور، اندازه‌ی تومور و تعداد سلول‌های EPC درگروه‌های مورد آزمون**

| گروه‌ها / متغیرها | غلظت پلاسمایی لپتین (نانوگرم در میلی‌لیتر) | وزن تومور (گرم) | اندازه‌ی تومور (سانتی‌متر مکعب) | EPC (CD34+ ,KDR+) (تعداد در ۱ سی‌سی خون محیطی) |
|---|---|---|---|---|
| IgG | ۲/۴ | ۱/۷ | ۲/۲ | ۱۴۰ |
| 9F8 | ۲/۵ | ۱/۶ | ۲/۳ | ۱۳۵ |
| Leptin | ۴/۷ | ۲/۸ | ۶/۱ | ۲۳۵ |
| PBS | ۲/۴ | ۱/۷ | ۳/۲ | ۱۴۲ |

از ۲۷/۲۶ ± ۱۳۲/۶۶، ۱۸ ± ۲۳/۳۳، ۱۷۱ ± ۱۳۳/۳۳، ۳۶/۵ ± ۲۲۲/۶۶ بود که تفاوت معنی‌داری بین گروه 9F8 و سایر گروه‌ها مشاهده شد (P < ۰/۰۵).

در پایان کارآزمایی بین موش‌های گروه لپتین و 9F8 تفاوت وزن آشکار و معنی‌داری وجود داشت (P < ۰/۰۵). همچنین بین دیگر گروه ها نیز با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نبود (جدول ۱).

## بحث

ترشحات مختلف بافت چربی شامل چندین آدیپوکاین است که تحریک کننده‌ی التهاب، تمایز سلولی و آنژیوژنز است. لپتین یکی از مهم‌ترین این ترشحات است که موجب افزایش تشدید و تمایز سلول های تومورهای مختلف می شود. همچنین باعث تحریک مهاجرت سلول های EPC در شرایط داخل و خارج بدن می گردد. لپتین به عنوان یک عامل مهم در رگ‌زایی پیشنهاد شده است (۱۶، ۱۳-۱۰).

لپتین همچنین می تواند عامل تحریک کننده‌ی رشد تومور باشد، در حالی که دلیل مستقیم و مشخص تأثیر لپتین روی سرعت رشد تومور هنوز به طور قطعی نشان داده نشده است. با این حال بیشتر اطلاعات و تحقیقات بر روی نقش لپتین در تحریک تمایز سلول و آنژیوژنز از مطالعات در شرایط خارج بدن به دست آمده است.

وزن تومور در گروه لپتین در مطالعه‌ی حاضر از سایر گروه‌ها بالاتر بود. لپتین در سرطان‌های مختلف انسانی مورد توجه است. البته لپتین می تواند یک پیش اگهی هر چند ناچیز و ضعیفی برای این موضوع باشد.

در یک مطالعه‌ی انجام شده، بیان لپتین و گیرنده‌ی آن در سرطان‌های اولیه‌ی سینه با متاستاز، افزایش معنی‌داری در رابطه با بافت‌های غیر سرطانی در زنان داشت (۱۹). در یک مطالعه‌ی بالینی دیگر بیان لپتین با تومور درجه‌ی دوم سرطان کولورکتال ارتباط داشت (۲۰). در کارسینومای سلول‌های کلیوی بیان لپتین و گیرنده‌ی آن در ارتباط با افزایش میزان بقا و تهاجم عروقی و متاستاز گره‌های لنفاوی بود (۲۱). همچنین لپتین در سرطان‌های اندومتریال و میزنای دارای نقش است (۳۱). در حالی که در مطالعات قبلی اطلاعات کمی در مورد ارتباط ملانوما و لپتین وجود داشت، تاکنون در یک مطالعه‌ی اپیدمیولوژیک ارتباط بین احتمال ابتلای به ملانوما با سطح سرمی لپتین فرد به صورت مثبتی مشخص شده است (۱۵).

از مطالعات منتشر شده ی محدودی که بر مدل های حیوانی انجام گرفته است، نتایج متفاوتی از تأثیر لپتین بر رشد تومور به دست آمده است. برخی مطالعات این موضوع را تأیید کردند که نبود سیگنالینگ لپتین در موش، رشد تومور را در سرطان ملانوما محدود کرده است (۲۴-۲۳، ۱۶، ۹).

Brandon و همکاران در یک مطالعه نشان دادند که کاهش لپتین باعث کاهش رشد تومور می شود، ولی موجب از بین بردن کامل تومور ملانوما نمی‌شود (۱۶). همچنین در یک مدل موشی سرطان پستان با استفاده از آنتاگونیست گیرنده‌ی لپتین مشخص شد که سیگنالینگ لپتین باعث افزایش رشد برخی از تومورهای ملانوما شده است (۲۳). به علاوه باعث افزایش بیان آنتی‌ژن‌های هسته‌ای سلول سیکلین D1، VEGF و VEGF/R2 نیز شده است (۲۶-۲۵).

Fusco و همکاران نشان دادند که غیر فعال کردن گیرنده‌ی لپتین، از تمایز و تفاوت سلول‌های سرطان سینه جلوگیری می کند (۲۷). در تحقیق دیگری خلاف



www.mui.ac.ir

ایـن موضـوع در مـوش‌هـای چـاق Zucker بـا گیرنده‌های ناقص لپتین، تومورهای پستان توسعه‌ی بیشتری نسبت به موش های صحرایی Zucker لاغر پـس از مواجهـه بـا مـواد سـرطان‌زایـی مثـل dimethylbenzanthyl 7,12 از خـود نشـان دادنـد (۲۸). گیرنده‌های لپتین در سلول‌های ملانومای موش همانند EPC به خوبی بیان شدند (۲۹).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دادند که لپتـین موجـب افـزایش تعـداد EPCهـا در خـون محیطـی مـی‌شـود. مطالعات اخیر بیانگر این موضوع هستند کـه EPCهـای مشتق شده از مغز استخوان در رگ‌زایی تومور مشارکت دارند (۳۰). هر چند که توضیح بیشتر ارتباط EPCهـا و تومور هنوز مورد بحث است (۳۲-۳۱).

در حد دانش کنونی ما این اولین بار است کـه نشـان داده شد در مدل تومور ملانوما، لپتین باعث افزایش EPC مـی‌گـردد و مطالعـات دیگـر تـأثیر لپتـین بـر افـزایش چسبندگی و لانه گزینی EPCهـا در invitro را گـزارش کرده‌اند که می‌تواند باعث افزایش ظرفیت برای رگ‌زایی در شرایط بدن موجود زنـده شـود (۲۹). لپتـین موجـب افزایش NO می شود که NO نیز به عنوان عامل افـزایش دهنـده‌ی مهـاجرت EPC مشـخص شـده اسـت. NO همچنین می تواند در مسیر فسفریلاسیون با فعـال کـردن فسـفاتیدل اینوزیتـول (PI) و ۳-کینـاز مسـتقل از Akt، باعث تحریک و شروع مهاجرت EPCها از مغز استخوان گردد (۳۳). همچنین مکانیسم افزایش تعداد سـلول‌هـای EPC در خون محیطی می‌تواند به علت افزایش مهاجرت از مغز استخوان باشد. به علاوه مشخص شده اسـت کـه لپتین می‌تواند باعث افزایش واسطه‌های مؤثر در رگ‌زایی مثل VEGF و پیام رسان‌های داخل سلولی مسـیر تکثیـر سـلولی فسفریلاسـیون شـامل MAPK P38 و ERK1/2MAPK شود (۳۴).

## نتیجه‌گیری

نتایج ما نشان داد که لپتین باعث افـزایش رشـد تومـور ملانوما گردید. ممکن است یک مکانیسم مؤثر از طریـق افزایش تعداد EPCها در خون محیطی انجام گیـرد، کـه خود باعث افزایش رگ‌زایی در تومور می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت تحقیقات و فنـاوری دانشـگاه علـوم پزشکی اصفهان کـه هزینـه‌ی ایـن طـرح پژوهشـی بـه شماره‌ی ۲۸۸۲۳۵ را تقبل نمودند.

## References

1. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995; 1(1): 27-31.
2. Le B, X, Romon R, Hondermarck H. Role of endothelial progenitor cells in breast cancer angiogenesis: from fundamental research to clinical ramifications. Breast Cancer Res Treat 2010; 120(1): 17-24.
3. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. Am J Pathol 2007; 170(1): 1-15.
4. Guo S, Gonzalez-Perez RR. Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome (NILCO) is critical for leptin-induced proliferation, migration and VEGF/VEGFR-2 expression in breast cancer. PLoS One 2011; 6(6): e21467.
5. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J Clin Invest 2000; 105(1): 17-9.
6. Bluher S, Mantzoros CS. Leptin in humans: lessons from translational research. Am J Clin Nutr 2009; 89(3): 991S-7S.
7. Kimura K, Tsuda K, Baba A, Kawabe T, Boh-oka S, Ibata M, et al. Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. Biochem Biophys Res Commun 2000; 273(2): 745-9.
8. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, et al. Leptin effect on

endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. Diabetes 2002; 51(1): 168-73.
9. Gonzalez RR, Cherfils S, Escobar M, Yoo JH, Carino C, Styer AK, et al. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). J Biol Chem 2006; 281(36): 26320-8.
10. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. Circ Res 1998; 83(10): 1059-66.
11. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. Science 1998; 281(5383): 1683-6.
12. Schroeter MR, Leifheit M, Sudholt P, Heida NM, Dellas C, Rohm I, et al. Leptin enhances the recruitment of endothelial progenitor cells into neointimal lesions after vascular injury by promoting integrin-mediated adhesion. Circ Res 2008; 103(5): 536-44.
13. Goetze S, Bungenstock A, Czupalla C, Eilers F, Stawowy P, Kintscher U, et al. Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands. Hypertension 2002; 40(5): 748-54.
14. Rahmouni K, Haynes WG. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. Curr Diab Rep 2005; 5(4): 260-6.
15. Gogas H, Trakatelli M, Dessypris N, Terzidis A, Katsambas A, Chrousos GP, et al. Melanoma risk in association with serum leptin levels and lifestyle parameters: a case-control study. Ann Oncol 2008; 19(2): 384-9.
16. Brandon EL, Gu JW, Cantwell L, He Z, Wallace G, Hall JE. Obesity promotes melanoma tumor growth: role of leptin. Cancer Biol Ther 2009; 8(19): 1871-9.
17. Ellerhorst JA, Diwan AH, Dang SM, Uffort DG, Johnson MK, Cooke CP, et al. Promotion of melanoma growth by the metabolic hormone leptin. Oncol Rep 2010; 23(4): 901-7.
18. Amjadi F, Javanmard SH, Zarkesh-Esfahani H, Khazaei M, Narimani M. Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production. J Exp Clin Cancer Res 2011; 30: 21.
19. Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. Clin Cancer Res 2004; 10(13): 4325-31.
20. Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Surmacz E, Sulkowski S. Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer. J Clin Pathol 2007; 60(8): 902-6.
21. Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, Asano T, Zheng R, Asano T, et al. Leptin promotes invasiveness of murine renal cancer cells via extracellular signal-regulated kinases and rho dependent pathway. J Urol 2006; 176(4 Pt 1): 1636-41.
22. Koda M, Sulkowska M, Wincewicz A, Kanczuga-Koda L, Musiatowicz B, Szymanska M, et al. Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. Ann N Y Acad Sci 2007; 1095: 90-8.
23. Cleary MP, Phillips FC, Getzin SC, Jacobson TL, Jacobson MK, Christensen TA, et al. Genetically obese MMTV-TGF-alpha/Lep(ob)Lep(ob) female mice do not develop mammary tumors. Breast Cancer Res Treat 2003; 77(3): 205-15.
24. Cleary MP, Grande JP, Maihle NJ. Effect of high fat diet on body weight and mammary tumor latency in MMTV-TGF-alpha mice. Int J Obes Relat Metab Disord 2004; 28(8): 956-62.
25. Carino C, Olawaiye AB, Cherfils S, Serikawa T, Lynch MP, Rueda BR, et al. Leptin regulation of proangiogenic molecules in benign and cancerous endometrial cells. Int J Cancer 2008; 123(12): 2782-90.
26. Rene GR, Watters A, Xu Y, Singh UP, Mann DR, Rueda BR, et al. Leptin-signaling inhibition results in efficient anti-tumor activity in estrogen receptor positive or negative breast cancer. Breast Cancer Res 2009; 11(3): R36.
27. Fusco R, Galgani M, Procaccini C, Franco R, Pirozzi G, Fucci L, et al. Cellular and molecular crosstalk between leptin receptor and estrogen receptor-{alpha} in breast cancer: molecular basis for a novel therapeutic setting. Endocr Relat Cancer 2010; 17(2): 373-82.
28. Hakkak R, Holley AW, Macleod SL, Simpson PM, Fuchs GJ, Jo CH, et al. Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. Breast Cancer Res 2005; 7(5): R627-R633.
29. Heida NM, Leifheit-Nestler M, Schroeter MR, Muller JP, Cheng IF, Henkel S, et al. Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via src kinase and integrin (alpha)vbeta5: implications for angiogenesis in human obesity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010; 30(2): 200-6.
30. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. J Cell Mol Med 2004; 8(3): 294-300.
31. Janic B, Arbab AS. The role and therapeutic potential of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization. ScientificWorldJournal 2010; 10: 1088-99.
32. Patenaude A, Parker J, Karsan A. Involvement of endothelial progenitor cells in tumor



www.mui.ac.ir

vascularization. Microvasc Res 2010; 79(3): 217-23.

**33.** de Resende MM, Huw LY, Qian HS, Kauser K. Role of endothelial nitric oxide in bone marrow-derived progenitor cell mobilization. Handb Exp Pharmacol 2007; (180): 37-44.

**34.** Wolk R, Deb A, Caplice NM, Somers VK. Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells. Atherosclerosis 2005; 183(1): 131-9.



www.mui.ac.ir

**Journal of Isfahan Medical School** Original Article

**Vol 29. No 170. 2nd week. March 2012** Received: 9.10.2011 Accepted: 11.12.2011

# Leptin Enhances Melanoma Tumor Growth by Increasing Endothelial Progenitor Cells

Shaghaygh Haghjooy Javanmard PhD[1], Mahdi Khorshidi Behzadi[2], Fatemehsadat Amjadi MSc[3], Majid Khazaei MD, PhD[4], Hamid Zarkesh Esfahani PhD[5]

## Abstract

**Background:** Epidemiological studies propose that obesity increases the risk of several cancers, including melanoma. Leptin is a peptide predominantly produced by adipocytes. Obesity increases the expression of leptin. On the other hand, several recent experiments have suggested that tumor growth to be dependent on endothelial progenitor cells (EPCs) which are effective in generation of new blood vessels. Our objectives in the present study were to examine the effects of leptin on melanoma growth and circulating EPCs number.

**Methods:** Melanoma tumors were induced by subcutaneous injections of $2 \times 10^6$ B16F10 melanoma cells to 32 C57BL6 mice. The mice were randomly divided into 4 groups of 8 on the 8th day. The first two groups received intraperitoneal (IP) injections of either phosphate-buffered saline (PBS) or recombinant murine leptin (1 µg/g initial body weight) twice daily. The other two groups received IP injections of either 9F8 (an anti leptin receptor antibody) or the control mouse IgG at 50 µg/mouse every 3 consecutive days. By the end of the second week, the animals were euthanized and blood samples were saved for computation with flow cytometry. The tumors were also analyzed.

**Findings:** The EPC numbers in leptin, PBS, 9F8, and IgG groups were 222.66 ± 36.5, 133.33 ± 171, 23.33 ± 18, 132.66 ± 27.26 per ml of blood, respectively. Moreover, the corresponding values for tumor weights were 3.2 ± 0.6, 1.7 ± 0.3, 1.61 ± 0.2, 1.7 ± 0.3 g. Tumors weight and size, and circulating EPC numbers were significantly more in the leptin group than 9F8 and both control groups ($P < 0.05$).

**Conclusion:** In conclusion, our observations indicated that leptin caused melanoma growth likely through increased circulating EPC numbers and consequently vasculogenesis.

**Keywords:** Melanoma, Leptin, Endothelial progenitor cell

[1] Assistant Professor, Physiology Research Center and Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3] Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[5] Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
**Corresponding Author:** Shaghaygh Haghjooy Javanmard MD, Email: shaghayeghhaghjoo@yahoo.com