

• 论 著 •

色素上皮细胞衍生因子对甲状腺乳头状癌细胞作用的研究*

连云宗¹, 潘群雄², 庄建良², 陈一峰³

(福建医科大学附属泉州第一医院: 1. 检验科; 2. 肿瘤科; 3. 病理科 362000)

摘要:目的 探讨重组色素上皮细胞衍生因子(rPEDF)对甲状腺乳头状癌细胞(TPC-1)增殖、侵袭和表达有关的血管活性因子的影响。方法 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测癌细胞增殖率,观察不同浓度 rPEDF 对 TPC-1 细胞增殖活性的影响;细胞侵袭实验检测 rPEDF 抑制甲状腺乳头状癌细胞侵袭性;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血管内皮细胞生长因子(VEGF)与血小板反应素-1(TSP-1)的变化。结果 甲状腺乳头状癌细胞穿透数为(91.4±20.3)%明显多于 rPEDF 处理过的细胞(43.6±13.8)%的 2.1 倍,加入促血管生成因子(VEGF)后,细胞穿透数减少至 72.4%[(72.4±16.5)%, $P<0.05$],表明 rPEDF 能有效抑制甲状腺乳头状癌细胞的体外侵袭性,至少部分是在 VEGF 调节的作用下。TPC-1 PEDF 组(将 rPEDF 加入甲状腺乳头状癌细胞 TPC-1 中)中 VEGF 表达量为(0.38±0.04)IU/mL,与未加 rPEDF 蛋白的甲状腺乳头状癌细胞作对照[TPC-1 con 组,(2.11±0.02)IU/mL]比较,平均减少 5.6 倍($P<0.01$),同时 TSP-1 的表达量 TPC-1 PEDF 组为(1 298±116)IU/mL,与 TPC-1 con 组的(251±21)IU/mL 比较,平均表达上调 5.2 倍($P<0.01$)。结论 rPEDF 能抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖、侵袭并改变其表达。

关键词:细胞增殖; 肿瘤浸润; 色素上皮细胞衍生因子; 甲状腺乳头状癌细胞; 表达

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)06-0644-02

The research of the effect of pigment epithelial-derived factor on papillary thyroid carcinoma cells*

Lian Yunzong, Pan Qunxiong, Zhuang Jianliang, Chen Yifeng

(Fujian Medical University Affiliated Quanzhou First Hospital: 1. Department of Clinical Laboratory;

2. Department of Oncology; 3. Department of Pathology, Quanzhou 362000, China)

Abstract: Objective To explore the impact of recombinant pigment epithelium-derived factor (rPEDF) on the growth and invasion and expression of the papillary thyroid carcinoma cells. **Methods** The effects of various concentrations of pigment epithelium-derived factor on proliferation and invasion of the papillary thyroid carcinoma cells were observed by MTT assay; the cell migratory assay was used for evaluating its inhibitory migration rate, the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) and thrombospondin-1 (TSP-1) were evaluated by enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA). **Results** rPEDF (25~200ng/L) inhibited the proliferation of the papillary thyroid carcinoma cells with dose and time dependent manners, the migratory cells of papillary thyroid carcinoma (91.4±20.3)% were 2.1 times higher than those of added rPEDF (43.6±13.8)%, and the migratory rate was 72.4%[(72.4±16.5)%, $P<0.05$] even in the presence of VEGF. rPEDF could decrease the migratory capacity of the papillary thyroid carcinoma cells at least in the presence of VEGF partly. The VEGF expression (0.38±0.04)IU/mL of TPC-1 PEDF (added the PEDF to the TPC-1 cells) decreased 5.4 times compared with the TPC-1 con[not added the PEDF to the TPC-1 cells,(2.11±0.02)IU/mL, $P<0.01$] as well as increased the TSP-1[(1 298±116)IU/mL, 5.2 times, $P<0.01$] compared with the TPC-1 con (251±21)IU/mL. **Conclusion** rPEDF is a potent factor for the inhibition proliferation and migration in papillary thyroid carcinomas in part by regulation of angiogenetic factors even can change TPC-1 cells expression.

Key words: cell proliferation; neoplasm invasiveness; pigment epithelium-derived factor; papillary thyroid carcinoma; expression

色素上皮细胞衍生因子(pigment epithelial derived factor, PEDF)是一种具有多种生物学活性的蛋白质,由胎儿视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞分泌至视网膜光感受器基质中,玻璃体和房水中浓度也较高。多年的研究表明, PEDF 既是一种神经营养因子又是一种内源性的高效的的新生血管抑制剂,直接作用于形成新生血管的内皮细胞,通过抑制内皮细胞有丝分裂、诱导内皮细胞凋亡来抑制新生血管形成^[1-2]。本研究选取甲状腺乳头状癌细胞(TPC-1)系为研究目标,在体外观察重组色素上皮细胞衍生因子(rPEDF)对与甲状腺乳头状癌细胞增殖、侵袭有关的血管活性因子的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 TPC-1 由中国医学科学院细胞所提供; rPEDF(1 mg/mL)购自上海希美生物科技有限公司;四甲基偶

氮唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT], RPMI 1640 培养基、青霉素、链霉素(美国 GIBCO);血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板反应素-1(thrombospondin-1, TSP-1)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司生产);细胞侵袭试验试剂盒(美国 Chemicon)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 TPC-1 细胞于含 10% 灭活血清的 RPMI 1640 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养至对数生长期,第 N+2~N+4 代细胞用于试验中。

1.2.2 TPC-1 细胞增殖抑制率的测定 将 TPC-1 细胞制成 5×10⁴/孔细胞悬液,置入 96 孔培养板内,在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养 24 h,细胞置于无血清培养基中,

* 基金项目:泉州市人民政府自然科学基金项目(2004Z25)。

加入终浓度为 25、50、100、200 ng/mL 的 rPEDF, 以碱性磷酸酶(PBS)作为空白对照, 每种剂量 6 个平行孔。药物分别作用不同时段(12、24、48、72、120 h)后, 弃上清液, 每孔加入 MTT (1 mg/mL) 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 4 h, 再离心弃上清液后每孔加二甲亚砜 100 μ L, 微量振荡器振荡 10 min 后于酶标仪上测定 A_{490} , 细胞增殖抑制率(%) = (1 - 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值) \times 100%。

1.2.3 TPC-1 细胞体外侵袭试验 将 300 μ L 预热的无血清 RPMI 1640 基础培养液加入内槽中, 水化 ECMatrixTM 膜 1 h; 加 300 μ L 准备好的 TPC-1 con(未加 rPEDF 蛋白的 TPC-1 作对照组)、TPC-1 PEDF(加入终浓度为 200 ng/mL rPEDF) 组细胞放在内槽中; 在 CO₂ 培养箱内孵育 24 h; 用棉签除去未能穿过内槽底部膜的细胞和 ECMatrixTM, 于另外空的孔中加入 500 μ L 染色液; 将内槽放入加有染色液的孔中, 染色 20 min; 加入 200 μ L 的冰醋酸溶解染色的细胞, 并转移到 96 孔酶标板, 在 560 nm 读取 A 值。

1.2.4 VEGF 与 TSP-1 的 ELISA 测定 将 rPEDF 加入 TPC-1 中, 同时以未加 rPEDF 蛋白的 TPC-1 作对照组。48 h 后取培养液 150 μ L 加入预先以 VEGF 和 TSP-1 单抗包被的检测孔内, 37 $^{\circ}$ C 2 h 后加生物素标记的二抗, TMB 显色后测 490 nm 处吸光度(A_{490})值。

1.3 统计学处理 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验, 统计分析在 SPSS10.0 统计软件上完成, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 rPEDF 抑制 TPC-1 增殖 各组 TPC-1 加入 rPEDF 培养 72 h 后, 用 MTT 法检测肿瘤细胞生长抑制率, 发现随 rPEDF 浓度的增加, 其对 TPC-1 细胞增殖活性的抑制作用逐渐增强, 使用 25 ng/mL 浓度时, 低剂量的 rPEDF 对 TPC-1 细胞生长的抑制率较低, 对甲状腺乳头状癌细胞生长的抑制率为 (4.15 \pm 0.73)%, 随着 rPEDF 浓度的增加, 其对甲状腺乳头状癌细胞的抑制率也逐渐升高, 当 rPEDF 浓度达 200 ng/mL 时, 对 TPC-1 的抑制率为 (49.76 \pm 1.39)%, 与 TPC-1 con 组比较, TPC-1 的增殖明显减慢, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 并随作用时间的延长, 对 TPC-1 细胞增殖活性的抑制作用也进一步增强, 使用相同浓度 200 ng/mL 时, 短时间的(孵育 12 h) rPEDF 对 TPC-1 细胞生长的抑制率较低, 对 TPC-1 生长的抑制率为 (27.45 \pm 2.14)%, 随着作用时间延长(孵育 24、48、72 h), 对 TPC-1 的抑制率逐渐升高[分别为 (35.6 \pm 1.10)%, (42.4 \pm 1.67)%, (49.76 \pm 1.39)%], 分别与孵育 12 h 比较(*t* 值分别为 1.14、1.94、2.56), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

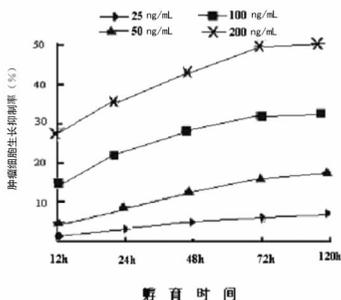


图 1 不同浓度 rPEDF 作用于 TPC-1 的时间效应曲线

2.2 rPEDF 抑制 TPC-1 侵袭 TPC-1 con 组细胞穿透数 (91.4 \pm 20.3)% 明显多于 rPEDF 处理过的 TPC-1 PEDF 组 [(43.6 \pm 13.8)%, $P < 0.05$], 加入 VEGF 后, 细胞穿

透数减少至 72.4% [(72.4 \pm 16.5)%, $P < 0.05$], 表明 rPEDF 能有效抑制 TPC-1 细胞的体外侵袭, 至少部分是在 VEGF 的作用下。

2.3 rPEDF 对 TPC-1 中血管活性因子的影响 加入 rPEDF 后, 与 TPC-1 con 组比较, TPC-1 PEDF 组中 VEGF 平均减少 5.6 倍 ($P < 0.01$); 同时 TSP-1 的表达平均增高 5.2 倍 ($P < 0.01$)。见图 1 和表 1。

表 1 rPEDF 对 TPC-1 表达 VEGF、TSP-1 变化的影响

组别	复孔数	VEGF(IU/mL)	TSP-1(IU/mL)
TPC-1 PEDF 组	3	0.38 \pm 0.04	1 298 \pm 116
TPC-1 con 组	3	2.11 \pm 0.02	251 \pm 21
<i>t</i> 值	—	3.04	33.42
<i>P</i> 值	—	<0.05	<0.01

—: 表示无数据。

3 讨 论

肿瘤的生长和转移依靠肿瘤内新生血管的形成, 而血管的生成受到 VEGF 和抗血管生成因子的双重调节。已经证实, VEGF 直接作用于内皮细胞有丝分裂原, 具有促进新生血管形成、增加血管通透性等功能, 是目前已知的最关键的血管生成促进因子之一[3]。Takano 等[4]利用 ELISA 法对正常组织、肿瘤组织及囊液中 VEGF 的水平进行定量检测, 在肿瘤的囊液中 VEGF 的表达是健康人血清中的 200~300 倍, 并且 VEGF 蛋白分布于肿瘤细胞的胞质和血管生成的部位, 尤其突出存在于周围微血管“热点”及肿瘤坏死灶周围区域。而当肿瘤生长时, 此因子急剧下降。TSP-1 的产生依赖于野生型抑癌基因 p53, 当发生癌变时, p53 突变, 野生型减少, TSP-1 也减少。TSP-1 作用于膜受体 CD36, 并活化 Fyn、Src 酪氨酸激酶, 导致内皮细胞凋亡。一旦 TSP-1 与 CD36 结合后, 内皮细胞对所有的其他促生长因子都不起作用, 包括 VEGF, 从而抑制血管的生长、黏附及移动[5-6]。目前研究者认为, PEDF 抑制肿瘤生长主要依赖于其抗血管新生的活性[7]; Crawford 等[8]研究发现, PEDF 是新生血管形成的有效抑制剂和神经分化的诱导剂, 它主要是由神经节细胞和 Schwann 细胞产生。本组结果表明, rPEDF 在下调 VEGF 表达的同时明显增加 TSP-1 的表达 ($P < 0.01$), 显示出抑制 TPC-1 血管新生的特性。当 rPEDF 浓度达 25 ng/mL 时, 就开始抑制 TPC-1 的增殖; 当其作用浓度增加时, 抑制率也增加, 两者之间存在明显的量效关系。当其浓度达到 200 ng/mL, 对 TPC-1 的抑制率为 49.76%, 表明 rPEDF 对抑制 TPC-1 具有明显的生长作用, 提示 rPEDF 可能是在下调促血管生成因子的同时, 协同抗血管生成因子 TSP-1 的作用从而达到抑制 TPC-1 增殖的目的。并随作用时间的延长, rPEDF 对 TPC-1 细胞增殖活性的抑制作用也逐步增强, 但至 72 h 后逐渐趋向平稳, 可能是其作用的时效性所致。与其他肿瘤不同, TPC-1 的恶性表现主要为局部侵袭和浸润, 因此极易复发, 这也是临床治疗上一个最为棘手的问题。而肿瘤细胞的侵袭性和迁移性是决定肿瘤细胞浸润和转移的关键因素之一。侵袭试验结果都表明, 将 rPEDF 加入 TPC-1 后, TPC-1 细胞穿透数目有明显下降, 即使在加入促进甲状腺乳头状癌血管生成最有效因子的条件下, 肿瘤细胞穿透数仍明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 rPEDF 能有效抑制 TPC-1 的体外侵袭, 甚至在 VEGF 存在的条件下。本研究观察到 rPEDF 能有效地抑制 TPC-1 增殖和侵袭的现象, 试验的下一步将通过 Microarray 对 rPEDF 抑制作用(下转第 647 页)

种类型间的差异有统计学意义 ($F=70.938, P=0.000$); 两两比较的差异也都有统计学意义, I-J 值分别为 0.580、1.142、1.803、2.394、2.944、0.562、1.224、1.814、2.365、0.661、1.252、1.802、0.590、1.141 和 0.551。除第 1 类和第 2 类 ($P=0.001$)、第 2 类和第 3 类 ($P=0.001$)、第 4 类和第 5 类 ($P=0.001$)、第 5 类和第 6 类 ($P=0.009$) 外, 其他各类型间 P 值都为 0.000。

2.3 血浆 Big ET-1 含量诊断心血管疾病的敏感度和特异度分析 226 例心血管疾病患者和 57 例健康对照组的血浆 Big ET-1 含量的 ROC 分析, 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.931, $Q1=0.871, Q2=0.893, SE=0.014, Z=30.407, P=0.000$ 。如用血浆 Big ET-1 ≥ 3.25 pmol/L 作为心血管疾病的实验诊断标准, 226 例心血管疾病有 209 例符合诊断, 敏感度为 92.5%; 而 57 例健康对照组有 2 例结果符合心血管疾病的诊断, 特异度为 96.5%; Youden 指数为 0.89, 阳性似然比为 26.429, 阴性似然比为 0.078, 对心血管疾病的诊断符合率为 93.3%。

3 讨论

本研究结果显示, 不同级别的心血管疾病患者的血浆 Big ET-1 水平都有明显差异, I ~ IV 级的心血管疾病患者的血浆 Big ET-1 水平呈线性上升趋势。本组研究发现心衰患者的血浆 Big ET-1 水平为 (5.07 ± 1.59) pmol/L, 与国外报道相近^[9]。通过不同心血管疾病患者的血浆 Big ET-1 水平分析, 而得出从高到低的类别依次为肺动脉高压、扩张型心肌病、AMI、原发性高血压、心肌病、心绞痛。所以建议在不同类型的心血管疾病进行 I ~ IV 级的较大样本调查, 以便作出准确诊断和疗效监测。本组研究还发现慢性肾衰患者的血浆 Big ET-1 水平较高, 与国外报道相符^[10]。

通过 ROC 分析, AUC 为 0.931, 敏感度为 92.5%, 特异度为 96.5%, 对心血管疾病的诊断符合率为 93.3%。本组还研究了少数乳腺癌患者的血浆 Big ET-1 水平, 结果为 (4.91 ± 1.30) pmol/L, 与国外报道一致^[11]。

综上所述, 本组认为 ELISA 定量检测血浆 Big ET-1 水平

在评价心血管疾病方面, 是 1 项具有高敏感度和高特异度的实验室指标, 是临床准确诊断心血管疾病的重要数据, 在基层医院值得推广应用。

参考文献

- [1] Rivere M, Cortes R, Portoles M, et al. Plasma concentration of big endothelin-1 and its relation with plasma NT-proBNP and ventricular function in heart failure patients[J]. Rev Esp Cardiol, 2005, 58(3):278-284.
- [2] 汪隆海, 张平, 陈启松. 定量检测 N 末端脑钠肽对心衰的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(1):23-25.
- [3] 汪隆海, 夏芳, 陈启松. 大内皮素-1 的定量 ELISA 法测定与临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(2):97-99.
- [4] 赵水平, 胡大一. 心血管病诊疗指南解读[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009:188-511.
- [5] 侯应龙, 卢才义. 心血管疾病现代治疗[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005:205-206.
- [6] 于小林, 刘淑贞, 张翠香. SPSS 医学统计速学速用[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007:82-91.
- [7] 罗应婷, 杨钰娟. SPSS 统计分析从基础到实践[M]. 北京: 电子工业出版社, 2007:171-177.
- [8] 方积乾. 医学统计学与电脑实验[M]. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:447-452.
- [9] Gruson D, Ahn SA, Ketelslegers JM, et al. Circulating levels of stress associated peptide Urocortin in heart failure patients[J]. Peptides, 2010, 31(2):354-356.
- [10] Mikulic I, Petrik J, Galesic K, et al. Endothelin-1, big endothelin-1, and nitric oxide in patients with chronic renal disease and hypertension[J]. J Clin Lab Anal, 2009, 23(6):347-356.
- [11] Yildirim Y, Gunel N, Coskun U, et al. Serum big endothelin-1 levels in female patients with breast cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(8):1119-1123.

(收稿日期:2010-08-14)

(上接第 645 页)

的机制进行研究, 以期进一步明确 rPEDF 抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖和侵袭分子的调控机制, 从而为抗甲状腺乳头状癌侵袭和转移的治疗提供科学的理论依据。

参考文献

- [1] Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, et al. Pigment epithelium-derived factor; neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(25):1526-1530.
- [2] Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, et al. Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition[J]. J Exp Med, 2004, 199(17):1513-1522.
- [3] Mousa AS, Mousa SA. Anti-angiogenesis efficacy of the garlic ingredient alliin and antioxidants: role of nitric oxide and p53[J]. Nutr Cancer, 2005, 53(9):104-110.
- [4] Takano S, Yoshii Y, Kondo S, et al. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain

tumor patients[J]. J Cancer Res, 1996, 56(9):2185-2190.

- [5] Bevtitt DJ, Li Z, Lindrop JL, et al. Analysis of full length ADAMTS6 transcript reveals alternative splicing and a role for the 5' untranslated region in translational control[J]. Gene, 2005, 10(8):99-110.
- [6] 连云宗, 庄建良, 陈一峰. 血小板反应素 mRNA 表达与甲状腺乳头状癌血管生成、转移的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 4(10):289-294.
- [7] Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, et al. Pigment epithelium derived factor (PEDF) regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas[J]. J Nat Med, 2003, 9(11):774-780.
- [8] Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, et al. Pigment epithelium derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity[J]. J Cell Sci, 2001, 114(27):4421-4428.

(收稿日期:2010-08-18)