

网络出版时间:2016/1/28 14:23:10 网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160128.1423.024.html>

高浓度葡萄糖对肺腺癌 A549 细胞生长及 VEGF、MMP-2 表达的影响

李晓峰¹, 束军¹, 程宇¹, 徐胜¹, 沈继龙²

摘要 目的 观察高浓度葡萄糖对肺腺癌 A549 细胞生长及血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达的影响。方法 根据处理条件不同,将 A549 细胞分为:对照组(无干预)、甘露醇组(25 mmol/L 甘露醇)、葡萄糖组(10, 20, 30, 40 mmol/L 葡萄糖)、顺铂组(5, 10, 20, 40 μmol/L 顺铂)和联合组(30 mmol/L 葡萄糖联合 5, 10, 20, 40 μmol/L 顺铂),分别处理 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞的增殖率,比较不同组别间细胞增殖率的差异;对照组、葡萄糖组、甘露醇组处理 24 h 和 48 h 后,采用半定量 RT-PCR 法检测细胞中 VEGF、MMP-2 的 mRNA 水平,采用 ELISA 法检测细胞培养上清液中 VEGF、MMP-2 的蛋白浓度,比较不同组别间 VEGF、MMP-2 的表达水平差异。结果 除 10 mmol/L 葡萄糖组外,葡萄糖组的细胞增殖率均高于对照组($P < 0.05$);相同顺铂浓度下,联合组的细胞增殖率高于顺铂组($P < 0.05$);与对照组比较,葡萄糖组 VEGF、MMP-2 表达明显增强($P < 0.05$),且对葡萄糖浓度有一定依赖性,葡萄糖浓度为 30 mmol/L 时 VEGF mRNA、MMP-2 的 mRNA 和蛋白水平达最高值,40 mmol/L 时 VEGF 蛋白浓度最高;相同干预条件,48 h 细胞的 VEGF、MMP-2 表达水平高于 24 h ($P < 0.05$)。结论 高浓度葡萄糖能促进肺腺癌 A549 细胞的增殖,增强对顺铂的耐受力及 VEGF、MMP-2 的表达。

关键词 葡萄糖;肺腺癌;生长;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶-2

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)03-0363-06

肺癌是对人类健康和生命危害最大的恶性肿瘤之一,在全球和我国肺癌的发病率与死亡率都居所有恶性肿瘤之首。研究^[1]提示糖尿病能增加肺癌的发生率,尤其在女性糖尿病患者中更为明显。与

2016-01-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:1308085MH141);

安徽医科大学科研基金资助项目(编号:2010xkj115)

作者单位:¹安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230022

²安徽病原生物学省级实验室和人兽共患病安徽省重点实验室、安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室,合肥 230032

作者简介:李晓峰,男,硕士研究生;

束军,男,医学博士,硕士生导师,责任作者, E-mail: J.Shu@126.com

空腹血糖正常的肺癌患者比较,空腹血糖浓度大于 126 mg/dl 的肺癌患者具有更高的死亡率^[2]。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)作为血管增生的抑制因子,不仅能抑制肿瘤新生血管的形成,还能降低肿瘤细胞的增殖和转移能力^[3]。课题组前期研究^[4]表明,高浓度的葡萄糖能够降低肺癌细胞中 PEDF 的表达。高浓度葡萄糖是否对肺癌细胞的增殖、耐药及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达有影响,尚未见报道。该实验拟在体外条件下通过不同浓度葡萄糖对肺腺癌 A549 细胞进行干预,观察细胞的增殖情况和 VEGF、MMP-2 的表达水平,并且联用顺铂对细胞进行处理,比较细胞增殖率的变化。

1 材料与方法

1.1 材料 A549 细胞株由安徽医科大学基础医学院病理生理教研室惠赠;胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司;低糖 DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司;胰蛋白酶购自上海碧云天生物技术有限公司;DMSO、MTT、葡萄糖、甘露醇购自美国 Sigma 公司;顺铂购自齐鲁制药有限公司;ELISA 试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;RNA isolater、RT-PCR 第一链 cDNA 合成试剂盒和 2 × Taq Master Mix 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR 所用引物由上海生工生物工程有限公司合成;细胞培养箱购自美国 Thermo 公司;超净工作台购自苏州安泰空气技术有限公司;酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司;超速低温离心机购自美国 Scilogex 公司;16S-4000IEF 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;DNA Marker(DL 2000)购自日本 TaKaRa 公司;D-801 凝胶成像分析系统购自江苏捷达科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基(含 5.6 mmol/L 葡萄糖)于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 A549 细胞。

1.2.2 MTT 法检测葡萄糖及顺铂对 A549 细胞增殖的影响 实验分为对照组、甘露醇组、葡萄糖组、顺铂组和联合组。取对数生长期细胞,0.25% 胰酶消化后 900 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加培养液混匀。以 6 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 使每孔体积为 200 μl , 边缘孔加 200 μl 的 PBS 溶液, 并留 4 孔(只加培养基)作为空白组, 以排除系统误差, 培养箱中培养。细胞贴壁后, 分别加入不同含量的葡萄糖, 使葡萄糖组中葡萄糖终浓度分别为 10、20、30、40 mmol/L; 分别加入不同含量的顺铂, 使顺铂组中顺铂终浓度分别为 5、10、20、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$; 加入适量的葡萄糖和顺铂, 使联合组中葡萄糖终浓度均为 30 mmol/L, 顺铂终浓度分别为 5、10、20、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$; 另设对照组(无干预)和甘露醇组(甘露醇浓度为 25 mmol/L)。加药完毕后, 于培养箱中培养 48 h。然后, 每孔加入 20 μl MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃去孔内液体, 每孔加入 150 μl DMSO, 培养箱中孵育 15 min。最后, 用酶标仪于 570 nm 波长处检测各孔的吸光度(absorbance, A)值。以对照组细胞增殖率为 100%, 则干预组细胞增殖率(%) = (干预组 A 值 - 空白组 A 值)/(对照组 A 值 - 空白组 A 值)。每次实验设置 6 个复孔, 重复 3 次。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR 法检测细胞中 VEGF 和 MMP-2 的 mRNA 水平 取对数期细胞, 以 3×10^5 个/孔的密度种于 6 孔板中, 细胞贴壁后, 分别加入不同含量的葡萄糖, 使各孔的葡萄糖终浓度分别为 10、20、30、40 mmol/L, 另设对照组(无干预)和甘露醇组(甘露醇浓度为 25 mmol/L), 加药完毕后, 于培养箱中培养 24 h 和 48 h。用 PBS 洗细胞 2 遍, 每孔加入 1 ml RNA isolater, 按照说明书提取总 RNA, 溶解于 DEPC 处理水后, -80 °C 长期保存。按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA, -20 °C 保存。VEGF 上游引物序列: 5'-GAAGTGGT-GAACATTGATGGATGTC-3', 下游引物序列: 5'-CGATCGTTCTGTATCACTCTTCC-3', 541、408 bp^[5]; MMP-2 上游引物序列: 5'-CCTGTTCTGCT-GAAGGACA-3', 下游引物序列: 5'-GTACTTGC-CATCCTTCTCAA-3', 616 bp^[6]; β -actin 上游引物序列: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3', 下游引物序列: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3', 285 bp。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 72 °C 彻底延伸 7 min, 28 个循环。用含 1% 琼脂糖的凝胶对 PCR 产物进行电泳分离, 并用凝胶成像分析系统进行处理, 以 β -ac-

tin 为内参, 半定量计算 VEGF 和 MMP-2 的 mRNA 水平。

1.2.4 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中 VEGF 和 MMP-2 的蛋白浓度 取对数期细胞, 以 3×10^5 个/孔的密度种于 6 孔板中, 细胞贴壁后, 分别加入不同含量的葡萄糖, 使各孔的葡萄糖终浓度分别为 10、20、30、40 mmol/L, 另设对照组(无干预)和甘露醇组(甘露醇浓度为 25 mmol/L), 加药完毕后, 于培养箱中培养 24 h 和 48 h。收集细胞上清液 3 000 r/min 离心 15 min, 小心吸取上清液, 分装后冻存于 -80 °C。按照试剂盒说明书操作, 检测上清液中 VEGF 和 MMP-2 的蛋白浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(SNK 检验进行两两比较), 两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 高浓度葡萄糖能提高 A549 细胞增殖力及对顺铂的耐受力 对照组的细胞增殖率为 100%, 葡萄糖组的细胞增殖率分别为 $(105.68 \pm 7.45)\%$ 、 $(115.28 \pm 5.79)\%$ 、 $(134.57 \pm 7.17)\%$ 、 $(129.71 \pm 11.37)\%$, 甘露醇组的细胞增殖率为 $(101.95 \pm 4.30)\%$, 6 组间细胞增殖率不完全相等 ($F = 60.170, P < 0.05$), 与对照组比较, 20、30、40 mmol/L 葡萄糖组的细胞增殖率明显升高 ($P < 0.05$), 30、40 mmol/L 葡萄糖组较 20 mmol/L 组明显升高 ($P < 0.05$), 30、40 mmol/L 葡萄糖组间差别无统计学意义, 见图 1。顺铂组的细胞增殖率均低于对照组, 且随着顺铂浓度的增大, 细胞增殖率逐渐降低, 各组间

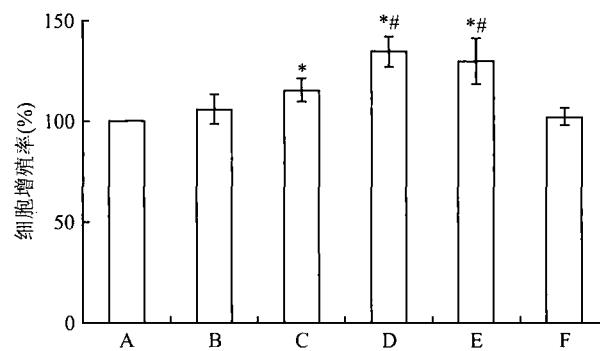


图 1 不同条件干预 A549 细胞 48 h 后的增殖率

A:对照组;B:10 mmol/L 葡萄糖组;C:20 mmol/L 葡萄糖组;D:30 mmol/L 葡萄糖组;E:40 mmol/L 葡萄糖组;F:甘露醇组;与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 20 mmol/L 葡萄糖组比较: # $P < 0.05$

差别均有统计学意义 ($F = 326.78, P < 0.05$) , 相同浓度顺铂干预下, 联合组的细胞增殖率均高于顺铂组 ($P < 0.05$) , 见图 2。

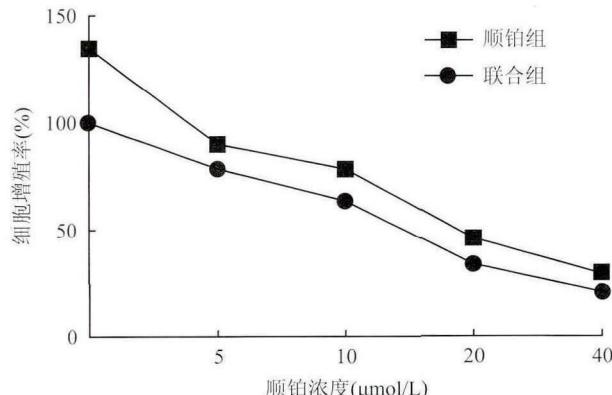


图 2 干预 48 h 后顺铂组及联合组 A549 细胞增殖率变化

2.2 高浓度葡萄糖能提高 A549 细胞中 VEGF、MMP-2 的 mRNA 水平 与对照组比较, 高浓度葡萄糖干预细胞 24 h 和 48 h 后, 细胞中 VEGF、MMP-2 的 mRNA 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。相同时间点, 随着葡萄糖浓度的升高, VEGF、MMP-2 的 mRNA 水平呈逐渐升高的趋势 ($VEGF: F_{24\text{h}} = 71.401, F_{48\text{h}} = 58.091, P < 0.05$; $MMP-2: F_{24\text{h}} = 31.647, F_{48\text{h}} = 46.225, P < 0.05$), 在 30 mmol/L 葡萄糖干预时达到最高值, 而后有所下降; 与对照组比较, 甘露醇组 MMP-2 的表达未见明显变化, 甘露醇组 VEGF 的表达明显增强 ($P < 0.05$); 相同干预条件下, 与 24 h 比较, 48 h 两 mRNA 的水平明显升高 ($P < 0.05$), 见图 3、4。

2.3 高浓度葡萄糖能提高 A549 细胞上清液中 VEGF、MMP-2 的蛋白浓度 与对照组比较, 高浓度葡萄糖处理细胞 24 h 和 48 h 后, 细胞上清液中 VEGF、MMP-2 的蛋白浓度明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。相同时间点, 随着葡萄糖浓度的升高, 细胞上清液中 VEGF 的蛋白浓度逐渐升高 ($F_{24\text{h}} = 201.370, F_{48\text{h}} = 162.531, P < 0.05$), 在 40 mmol/L 葡萄糖干预时达最高水平; 甘露醇组 VEGF 浓度高于对照组 ($P < 0.05$); 相同浓度葡萄糖干预细胞, 48 h 上清液中 VEGF 浓度明显高于 24 h ($P < 0.05$), 见表 1。相同时间点, 随着葡萄糖浓度的升高, MMP-2 的蛋白浓度逐渐升高 ($F_{24\text{h}} = 35.226, F_{48\text{h}} = 41.301, P < 0.05$), 在 30 mmol/L 葡萄糖干预时达到最高值, 40 mmol/L 葡萄糖时有所下降; 与对照组比较, 甘露醇组 MMP-2 浓度无明显变化; 相同浓度葡萄糖干预细胞, 48 h 上清液中 MMP-2 浓度明

显高于 24 h ($P < 0.05$), 见表 2。

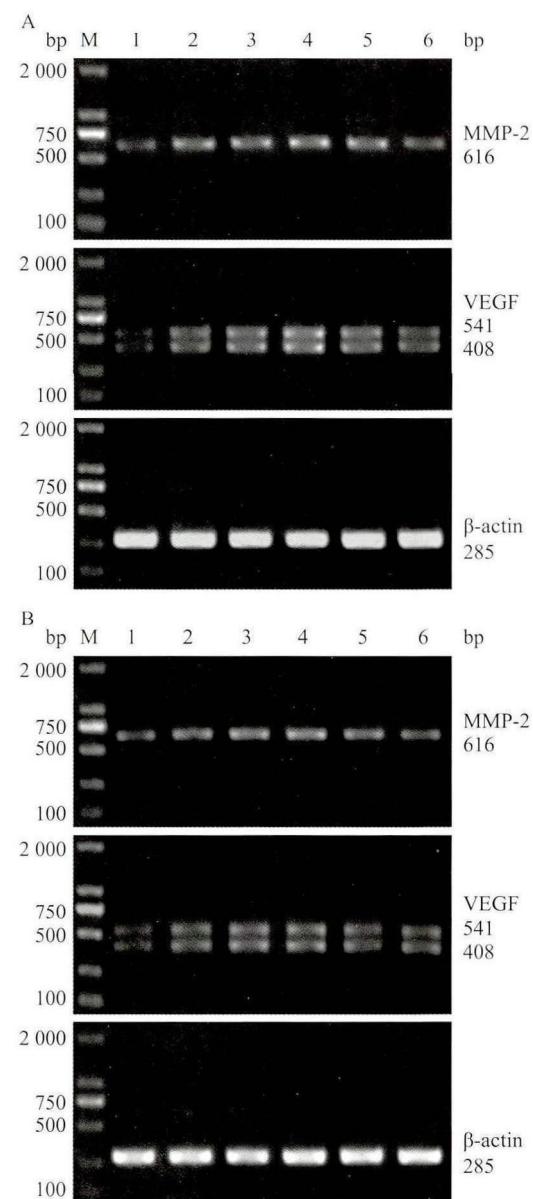


图 3 RT-PCR 检测不同组别 VEGF、MMP-2 mRNA 的表达

A: 24 h; B: 48 h; M: Mark; 1: 对照组; 2: 10 mmol/L 葡萄糖组; 3: 20 mmol/L 葡萄糖组; 4: 30 mmol/L 葡萄糖组; 5: 40 mmol/L 葡萄糖组; 6: 甘露醇组

表 1 不同组别上清液中 VEGF 蛋白浓度 (ng/L, $n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
对照	728.107 ± 15.546	732.146 ± 32.014
10 mmol/L 葡萄糖	$812.209 \pm 13.631^{\star}$	$856.204 \pm 10.609^{\star\blacktriangle\blacktriangledown}$
20 mmol/L 葡萄糖	$1037.243 \pm 12.534^{\star\blacktriangle\blacktriangledown}$	$1128.392 \pm 42.907^{\star\blacktriangle\blacktriangledown}$
30 mmol/L 葡萄糖	$1233.437 \pm 24.070^{\star\triangle\blacktriangle}$	$1419.174 \pm 22.674^{\star\blacktriangle\triangle}$
40 mmol/L 葡萄糖	$1377.392 \pm 11.538^{\star}$	$1449.825 \pm 16.070^{\star\blacktriangledown}$
甘露醇	$886.651 \pm 23.021^{\star\triangle\triangledown}$	$913.171 \pm 36.750^{\star\blacktriangledown\blacktriangle\blacktriangledown}$

相同时间, 与对照组比较: $^{\star}P < 0.05$; 与 10 mmol/L 葡萄糖组比较: $\#P < 0.05$; 与 20 mmol/L 葡萄糖组比较: $\triangle P < 0.05$; 与 30 mmol/L 葡萄糖组比较: $\triangledown P < 0.05$; 与 40 mmol/L 葡萄糖组比较: $\blacktriangle P < 0.05$; 与相同组别 24 h 比较: $\blacktriangledown P < 0.05$

表2 不同组别上清液中 MMP-2 蛋白浓度(mg/L , $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h
对照	5.224 ± 0.042	5.435 ± 0.174
10 mmol/L 葡萄糖	6.181 ± 0.143 *△	6.277 ± 0.087 *△▽
20 mmol/L 葡萄糖	6.828 ± 0.147 *#△	7.106 ± 0.116 *#△▽
30 mmol/L 葡萄糖	7.214 ± 0.160 *	7.416 ± 0.094 *▽
40 mmol/L 葡萄糖	6.703 ± 0.157 *△	7.182 ± 0.144 *△▽
甘露醇	5.276 ± 0.240	5.568 ± 0.181

相同时长,与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 10 mmol/L 葡萄糖组比较: △ $P < 0.05$; 与 30 mmol/L 葡萄糖组比较: ▽ $P < 0.05$; 与 40 mmol/L 葡萄糖组比较: ▲ $P < 0.05$; 与相同组别 24 h 比较: ▨ $P < 0.05$

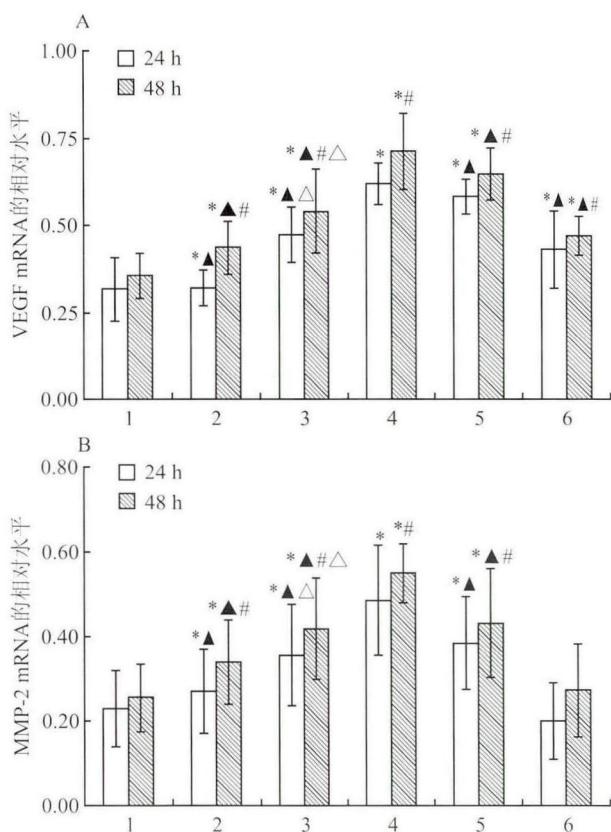


图4 不同组别 VEGF、MMP-2 mRNA 的相对水平

A: VEGF; B: MMP-2; 1: 对照组; 2: 10 mmol/L 葡萄糖组; 3: 20 mmol/L 葡萄糖组; 4: 30 mmol/L 葡萄糖组; 5: 40 mmol/L 葡萄糖组; 6: 甘露醇组; 相同时长,与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 10 mmol/L 葡萄糖组比较: △ $P < 0.05$; 与 30 mmol/L 葡萄糖组比较: ▽ $P < 0.05$; 与 40 mmol/L 葡萄糖组比较: ▲ $P < 0.05$; 与相同组别 24 h 比较: ▨ $P < 0.05$

3 讨论

葡萄糖作为人体最基本的供能物质,在生命活动中发挥着重要的作用,然而,近来研究⁷⁻¹⁰显示高浓度的葡萄糖对肿瘤的发生和进展有一定的促进作用。Zhao et al.¹⁷对胃癌患者进行研究,发现合并糖尿病者,更容易出现耐药,且预后较差,进一步,对胃癌细胞进行不同浓度的葡萄糖处理,发现高浓度

的葡萄糖能促进细胞增殖,并能减弱 5-氟尿嘧啶的抑制作用。对子宫内膜癌细胞分别进行含 1、5、25 mmol/L 葡萄糖的培养基培养发现,与 5 mmol/L 葡萄糖比较,1 mmol/L 葡萄糖能使细胞阻滞于 G1 期,降低细胞的增殖能力,而 25 mmol/L 葡萄糖可激活 AMPK/mTOR/S6 和 MAPK 信号通路,提高细胞的增殖和侵袭能力^[8]。此外,高浓度的葡萄糖还能激活 Wnt/β-catenin 信号通路,从而促进肿瘤的发生^[9]。Inal et al.^[10]对 442 例进展期肺癌患者进行回顾性研究发现,在接受以铂类为基础的化疗药物的肺癌患者中,与未患糖尿病者比较,合并有糖尿病的患者具有较短的无进展生存期和总生存期。

MMP-2 作为基质金属蛋白酶家族的重要成员,参与细胞外基质的分解,并能增强肺癌细胞的转移能力^[11],VEGF 是最关键的促血管生长因子之一,不仅调控正常组织的血管生成,还能促进肺癌组织新生血管的形成^[12],因此 VEGF 和 MMP-2 的表达与肺癌的发生和进展有密切的关联。药物治疗,尤其是以铂类为基础的化疗药物,是中晚期肺癌患者的主要选择,但是,癌细胞的耐药现象却严重影响化疗效果,使肺癌的治疗变得困难。

本研究采用较为常见的肺腺癌 A549 细胞为实验对象,分别进行不同浓度的葡萄糖和 25 mmol/L 甘露醇进行干预,结果提示,高浓度的葡萄糖能促进 A549 细胞的增殖,提高 VEGF、MMP-2 的表达水平。随着葡萄糖浓度的提高,葡萄糖对 VEGF、MMP-2 表达的影响更加明显,超过一定浓度后作用反而减弱。研究^[13]显示,高浓度葡萄糖作用 A549 细胞后,能促进活性氧的生成,激活 TGF-β1/PI3K/Akt 信号通路,从而提高血红素氧化酶-1 的水平,最终增强转移相关蛋白 MMP-9 的表达及细胞的侵袭能力。由于 MMP-2 和 MMP-9 同属基质金属蛋白酶家族,具有相似的结构和功能,都参与肿瘤的转移,本研究结果与研究^[13]一致,均证明高浓度葡萄糖与肺腺癌的转移有关。VEGF 作为重要的促血管生成因子,与 PEDF 作用相反,本研究结果提示高浓度葡萄糖能提高 A549 细胞中 VEGF 水平,前期研究^[4]显示高浓度葡萄糖能降低 A549 细胞中 PEDF 水平,两次研究中高浓度葡萄糖对 A549 细胞的作用一致。Seebacher et al.^[14]发现高浓度葡萄糖能通过 P-糖蛋白提高 A549 细胞对抗肿瘤药阿霉素的抵抗力,本研究亦显示 30 mmol/L 的葡萄糖能提高肺癌细胞对化疗药物顺铂的耐受力,推测高浓度葡萄糖可能与 A549 多重耐药有关。实验中,25 mmol/L 的甘露醇

能一定程度地提高 A549 细胞中 VEGF 的转录和翻译水平,考虑 VEGF 的表达不仅与葡萄糖的浓度有关,还可能受渗透压变化的影响^[15]。

综上所述,高浓度的葡萄糖能提高肺腺癌 A549 细胞的增殖力、对顺铂的耐受力及 VEGF、MMP-2 的表达。

参考文献

- [1] Lee J Y, Jeon I, Lee J M, et al. Diabetes mellitus as an independent risk factor for lung cancer: a meta-analysis of observational studies[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(10):2411–23.
- [2] Luo J, Chen Y J, Chang L J. Fasting blood glucose level and prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients [J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(2):242–7.
- [3] Becerra S P, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(4):258–71.
- [4] 金程, 束军, 娄志霞, 等. 不同浓度葡萄糖对肺腺癌细胞 PEDF 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(8):1084–7.
- [5] Kumar S, Witzig T E, Timm M, et al. Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells[J]. *Leukemia*, 2003, 17(10):2025–31.
- [6] Monteleone G, Caruso R, Fina D, et al. Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21[J]. *Gut*, 2006, 55(12):1774–80.
- [7] Zhao W, Chen R, Zhao M, et al. High glucose promotes gastric cancer chemoresistance *in vivo* and *in vitro*[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1):843–50.
- [8] Han J, Zhang L, Guo H, et al. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 138(3):668–75.
- [9] Chocarro-Calvo A, Garcia-Martinez J M, Ardila-Gonzalez S, et al. Glucose-induced beta-catenin acetylation enhances Wnt signalling in cancer[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(3):474–86.
- [10] Inal A, Kaplan M A, Kucukoner M, et al. Is diabetes mellitus a negative prognostic factor for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer? [J]. *Rev Port Pneumol*, 2014, 20(2):62–8.
- [11] Kuo H Y, Huang Y S, Tseng C H, et al. PML represses lung cancer metastasis by suppressing the nuclear EGFR-mediated transcriptional activation of MMP2[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(19):3132–42.
- [12] Alevizakos M, Kaltsas S, Syrigos K N. The VEGF pathway in lung cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(6):1169–81.
- [13] Kang X, Kong F, Wu X, et al. High glucose promotes tumor invasion and increases metastasis-associated protein expression in human lung epithelial cells by upregulating heme oxygenase-1 via reactive oxygen species or the TGF-β1/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(3):1008–22.
- [14] Seebacher N A, Richardson D R, Jansson P J. Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(10):2557–72.
- [15] Doronzo G, Viretto M, Russo I, et al. Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor synthesis and secretion in aortic vascular smooth muscle cells from obese and lean Zucker rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8):9478–88.

Effects of high glucose on the growth and VEGF and MMP-2 expression of lung adenocarcinoma A549 cells

Li Xiaofeng, Shu Jun, Cheng Yu, et al

(Dept of Respiratory Medicine, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe effects of high glucose on the growth and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) of lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods** According to the intervening factors, A549 cells were grouped as follows: control group (no intervention), mannitol group (25 mmol/L mannitol), glucose groups (10, 20, 30, 40 mmol/L glucose), cisplatin groups (5, 10, 20, 40 μmol/L cisplatin), and combination groups (30 mmol/L glucose with 5, 10, 20, 40 μmol/L cisplatin). Cell proliferation rates of different groups were evaluated by MTT assay after 48 hours' intervention. For the control group, glucose groups and mannitol group, levels of VEGF and MMP-2 mRNA were examined by semi-quantitative RT-PCR and concentrations of VEGF and MMP-2 protein in supernatant were determined by ELISA at 24 and 48 hours after intervention, and then compared with each other. **Results** Except for the group of 10 mmol/L glucose, glucose groups had higher proliferation rates than the control group ($P < 0.05$). At the same concentration of cisplatin, combination groups had higher proliferation rates than the cisplatin groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of VEGF and MMP-2 in glucose groups was remarkably increased in a glucose concentration

MSCs 联合 PRP 对兔前交叉韧带重建后腱骨愈合的影响

杨军军,徐斌,徐洪港,涂俊,李洋

摘要 目的 探讨骨隧道内局部应用自体间充质干细胞(MSCs)联合富血小板血浆(PR P)对兔前交叉韧带重建后腱-骨愈合的影响。**方法** 24只健康的新西兰大白兔随机平均分配为M组、P组、MP组及C组。分别在肌腱骨道内注入以生物蛋白胶为媒介的MSCs、PRP、MSCs复合PRP,C组仅注入生物蛋白胶。于术后4、8、12周3个时间点取各组兔膝关节标本切片染色,行组织学观察及分析。**结果** 对于腱骨早期愈合有标志性意义的Sharpy样纤维在术后第4周MP组即可观察到,并随着愈合时间的延长,M组、P组及C组也相继出现Sharpy样纤维且Sharpy样纤维的量是持续增加的。各组标本在3个时间点组织形态学Buark评分差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 联合使用MSCs和PRP可促进骨道肌腱早期愈合,比二者单独使用的作用强。

关键词 间充质干细胞;富血小板血浆;前交叉韧带;腱骨愈合

中图分类号 R 686

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)03-0368-05

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)在维持膝关节的稳定中起着重要作用。ACL损伤是一种常见的运动损伤,目前临幊上治疗 ACL 损伤的主要手术方式为关节镜下 ACL 重建术。ACL 重建术的成功与否很大程度上取决于韧带移植物与骨隧道之间的愈合状况^[1],研究证明骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)及富血小板血浆

2015-12-08 收接

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH157)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院运动创伤与关节镜外科,合肥 230022

作者简介:杨军军,男,硕士研究生;

徐斌,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:youchen100@126.com

dependent manner, with peak levels of VEGF mRNA, MMP-2 mRNA and the protein of MMP-2 at 30 mmol/L glucose and peak level of VEGF protein at 40 mmol/L glucose. Under the same intervention, the expression of VEGF and MMP-2 was higher after intervening for 48 hours than 24 hours($P < 0.05$). **Conclusion** High glucose can promote the proliferation of A549 cells, strengthening the resistance to cisplatin and the expression of VEGF and MMP-2.

Key words glucose; lung adenocarcinoma; growth; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase-2

(platelet rich plasma, PRP)对交叉韧带重建后的腱骨愈合有明显的促进作用^[2-3]。但针对MSCs联合PRP对腱-骨愈合的研究报道较少,该实验利用自体MSCs联合PRP凝胶顶端注射的方法注入骨隧道内,观察自体MSCs复合PRP是否有促进腱骨愈合的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年的新西兰大白兔24只,约2.5 kg,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要材料及试剂 兔MSCs成骨诱导分化培养基(广州赛业生物技术有限公司);纤维蛋白酶原、凝血酶、MSCs完全培养基、青链霉素(合肥欣乐生物有限公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);CO₂恒温培养箱(美国SHEL LAB);Masson三色染色剂盒(福州迈新生物技术开发公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs的提取、分离及培养 粒细胞刺激因子刺激各组兔1周后,取兔外周血10 ml,1 200 r/min离心10 min用5 ml含10%胎牛血清及1%双抗的L-DMEM液的完全培养液冲洗离心管后接种至25 cm²培养瓶中,37 °C,5% CO₂恒温箱中培养,48 h后予以第1次换液,后每72 h换液1次,待贴壁细胞铺满培养瓶底部90%以上后进行传代。取生长活跃的第3代细胞进行实验,待细胞传至第3代后,将各组细胞消化后台盼蓝染色并在细胞计数仪上测得各兔细胞活力平均为77.34%。

1.2.2 MSCs的鉴定 每日观察细胞形态,用倒置相差显微镜每日观察体外培养的MSCs增殖和形态