

不同浓度葡萄糖对肺腺癌细胞 PEDF 表达的影响

金程¹, 束军¹, 姜志霞¹, 沈继龙²

摘要 目的 观察不同浓度葡萄糖对肺腺癌细胞株 A549 中色素上皮衍生因子(PEDF)表达的影响。方法 在基础培养液中,根据加入的葡萄糖浓度分为:对照组(5.6 mmol/L 葡萄糖)、甘露醇组(5.6 mmol/L 葡萄糖 + 25 mmol/L 甘露醇)、高糖 A 组(10 mmol/L 葡萄糖)、高糖 B 组(20 mmol/L 葡萄糖)、高糖 C 组(30 mmol/L 葡萄糖),进行 A549 细胞培养,分别于 24、48、96 h 后取样:采用半定量 RT-PCR 法检测不同时间点、含不同浓度葡萄糖组细胞 PEDF mRNA 水平,用 ELISA 法检测细胞培养上清液中和胞内 PEDF 蛋白,比较不同组间 PEDF 表达水平差异。结果 与对照组相比,随着葡萄糖浓度的增加,各组 A549 细胞 PEDF 的表达水平有明显下降趋势($P < 0.05$),呈剂量依赖性改变;随着葡萄糖作用时间的延长,除 RT-PCR 检测中的高糖 C 组,及 ELISA 检测中的高糖 B 组外,各组 A549 细胞 PEDF 的表达水平有明显下降趋势($P < 0.05$),呈时间依赖性改变。结论 高浓度葡萄糖、较长时间作用可能降低肺腺癌细胞 PEDF 的表达水平。

关键词 肺腺癌;色素上皮衍生因子;葡萄糖;浓度;影响

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1084-04

色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是目前已知最强的内源性血管形成抑

制剂。研究^[1]表明, PEDF 在各种类型的肺癌细胞株中均有表达;有报道^[2]称, PEDF 在糖尿病性肾病中分泌降低,并且高血糖是其分泌下降的直接原因;另有报道^[3]称,糖尿病患者中肺癌的发病率远高于普通人群。由此推测较高血糖浓度可能对肺癌细胞的发生、发展产生影响,但相关研究尚未见报道。该实验拟通过体外条件下改变细胞培养液中葡萄糖的浓度,观察不同浓度的葡萄糖对肺腺癌细胞 PEDF 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 A549 细胞株由安徽医科大学附属省立医院检验科实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂及仪器 检测 PEDF mRNA 的 RT-PCR 引物购于生工生物(上海)有限公司;TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 第一链 cDNA 合成试剂盒购于德国 Thermo Scientific 公司;ELISA 试剂盒购于上海原叶公司;无糖型 1640 培养液、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;葡萄糖购于美国 Sigma 公司;DNA Marker (DL2000) 购于日本 TaKaRa 公司。电热恒温水浴锅购于上海天平仪器厂;超速离心机购于德国 Beckman 公司;超净工作台购于苏州安泰空气技术有限公司;165-4000IEF 电泳仪购于美国 Bio-Rad 公司;D-801 凝胶成像分析系统购于江苏捷达科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏 A549 细胞,用含 100 ml/L 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、5.6 mmol/L 葡萄糖的 1640 培养液培养于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 将无糖型 1640 培养液作为细胞

2014-04-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:1308085MH141);安徽高等学校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2011A173);安徽医科大学科研基金资助项目(编号: 2010xkj115);安徽医科大学第四附属医院引进人才科研启动基金资助项目

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:金程,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

membrane potential across the membrane analysis showed that SHI-1 cells significantly showed an alteration of fluorescence after treating with HHT for 20 hours, as compared with control group. **Conclusion** HHT is able to inhibit proliferation and induce apoptosis of SHI-1 cells, the mechanism may be associated with the mediation by mitochondrial apoptosis pathway.

Key words homoharringtonine; SHI-1 cell; acute monocytic leukemia; cell proliferation; cell apoptosis

培养基基础液,按照实验设计、分别加入不同浓度的葡萄糖后分为以下5组:① 对照组:加入 5.6 mmol/L 葡萄糖;② 甘露醇组:加入 5.6 mmol/L 葡萄糖 + 25 mmol/L 甘露醇(甘露醇作为渗透压对照);③ 高糖 A 组:加入 10 mmol/L 葡萄糖;④ 高糖 B 组:加入 20 mmol/L 葡萄糖;⑤ 高糖 C 组:加入 30 mmol/L 葡萄糖。分别培养 24、48、96 h 后取样,行后续实验检测。

1.2.3 细胞总 RNA 提取及 RT-PCR 法检测细胞 PEDF mRNA 取细胞,PBS 洗 2 遍,消化后 800 r/min 离心 5 min,去上清液,加 1 ml TRIzol,按照 TRIzol 法提取总 RNA。逆转录合成 cDNA,步骤依据试剂盒说明书进行操作,最后产物总体积为 20 μ l。GAPDH 上游引物序列: 5'-GATTGTTGCCAT-CAACGACC-3',下游引物序列: 5'-GTGCAGGATG-CATTGCTGAC-3',370 bp;PEDF 上游引物序列: 5'-CTCCTGTCTCCTCTCAGTGTGG-3',下游引物序列: 5'-CGGTCCTCTCTTCATCCAAGTA-3',481 bp。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,63.1 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 10 min,35 个循环。循环结束后,1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外透射灯下观察实验结果,运用凝胶图像扫描分析系统,以目的基因片段与 GAPDH 片段的条带灰度值比值作 PEDF mRNA 的相对含量分析。

1.2.4 ELISA 法检测细胞内及上清液中 PEDF 蛋白含量 取生长状态良好的 A549 细胞,接种于 6 孔板中培养,按说明书操作,ELISA 法测定细胞内和上清液中 PEDF 蛋白的含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,数据两两比较采用 SNK 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 对照组与甘露醇组中 A549 细胞 PEDF mRNA 的相对含量均较高,两组间差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组或甘露醇组相比,高糖 A、B、C 组任一组中 A549 细胞 PEDF mRNA 的相对含量均较低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。相同时间点,高糖 A、B、C 组组间相比,A549 细胞 PEDF mRNA 的相对含量递减($P < 0.05$),提示随着葡萄糖浓度的增加,A549 细胞 PEDF 表达呈剂量依赖性下降。不同时间点,高糖 A、B、C 组组内相比提示:在高糖 A 组和高糖 B 组中,随着作用时间的延

长,A549 细胞 PEDF mRNA 的相对含量呈时间依赖性下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);在高糖 C 组中,随着作用时间的延长,A549 细胞 PEDF 表达亦呈时间依赖性下降,但 48 h 和 96 h 间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1~4。

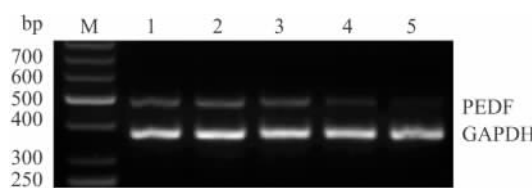


图1 不同浓度葡萄糖作用 24 h 后 A549 细胞中 PEDF mRNA 的相对含量

M:Marker;1:对照组;2:甘露醇组;3:高糖 A 组;4:高糖 B 组;5:高糖 C 组

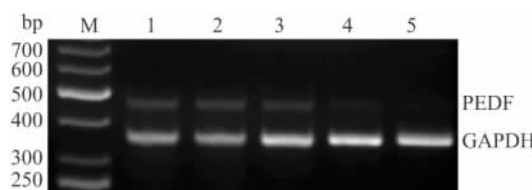


图2 不同浓度葡萄糖作用 48 h 后 A549 细胞中 PEDF mRNA 的相对含量

M:Marker;1:对照组;2:甘露醇组;3:高糖 A 组;4:高糖 B 组;5:高糖 C 组

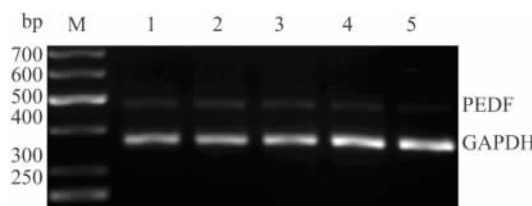


图3 不同浓度葡萄糖作用 96 h 后 A549 细胞中 PEDF mRNA 的相对含量

M:Marker;1:对照组;2:甘露醇组;3:高糖 A 组;4:高糖 B 组;5:高糖 C 组

2.2 ELISA 检测 不同组 A549 细胞培养上清液中和细胞内 PEDF 蛋白浓度见表 1。无论细胞培养上清液、还是细胞内 PEDF 蛋白,在对照组与甘露醇组中均有较高表达,两组间差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组或甘露醇组相比,高糖 A、B、C 组任一组中 A549 细胞 PEDF 蛋白浓度均较低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。相同时间点,高糖 A、B、C 组组间相比,A549 细胞 PEDF 蛋白浓度递减($P < 0.05$),亦提示随着葡萄糖浓度的增加,A549 细胞 PEDF 表达呈剂量依赖性下降(上清液蛋白 $F_{24h} =$

表1 不同组 A549 细胞培养上清液中和细胞内 PEDF 蛋白浓度 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	上清液 PEDF (ng/L)			细胞内 PEDF (ng/L)		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
对照	1 406.359 ± 11.486	1 395.978 ± 44.881	1 319.521 ± 23.037	1 314.883 ± 9.733	1 294.356 ± 32.984	1 318.492 ± 42.916
甘露醇	1 393.401 ± 11.689	1 423.238 ± 16.810	1 320.239 ± 16.877	1 313.522 ± 23.595	1 302.282 ± 38.685	1 311.695 ± 6.132
高糖 A	1 281.643 ± 22.497 ^{ab}	1 210.511 ± 27.114 ^{abc}	1 126.382 ± 51.940 ^{abef}	1 241.512 ± 25.417 ^{ab}	1 082.120 ± 12.429 ^{abc}	1 016.843 ± 42.626 ^{abef}
高糖 B	1 107.296 ± 24.847 ^{abc}	1 067.593 ± 37.995 ^{abc}	965.511 ± 39.965 ^{abcef}	979.361 ± 38.710 ^{abc}	899.994 ± 24.036 ^{abc}	835.552 ± 9.598 ^{abcef}
高糖 C	954.045 ± 19.504 ^{abcd}	869.992 ± 26.950 ^{abcde}	811.849 ± 10.753 ^{abcdef}	810.866 ± 27.525 ^{abcd}	737.692 ± 7.440 ^{abcde}	669.641 ± 27.611 ^{abcdef}

相同时间点:与对照组比较:^a $P < 0.05$;与甘露醇组比较:^b $P < 0.05$;与高糖 A 组比较:^c $P < 0.05$;与高糖 B 组比较:^d $P < 0.05$;不同时间组内比较:与作用 24 h 比较:^e $P < 0.05$;与作用 48 h 比较:^f $P < 0.05$

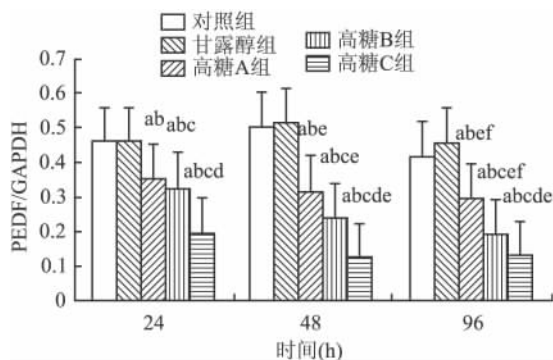


图4 各组 PEDF mRNA 相对含量平均值比较

相同时间点:与对照组比较:^a $P < 0.05$;与甘露醇组比较:^b $P < 0.05$;与高糖 A 组比较:^c $P < 0.05$;与高糖 B 组比较:^d $P < 0.05$;不同时间点组内比较:与作用 24 h 比较:^e $P < 0.05$;与作用 48 h 比较:^f $P < 0.05$

320.877, $F_{48h} = 154.686$, $F_{96h} = 142.170$, $P < 0.05$; 细胞内蛋白 $F_{24h} = 216.140$, $F_{48h} = 155.526$, $F_{96h} = 217.535$, $P < 0.05$)。不同时间点,高糖 A、B、C 组组内相比提示:除了高糖 B 组上清液中 PEDF 蛋白浓度 24 h 和 48 h 间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外,无论细胞培养上清液、还是细胞内 PEDF 蛋白,随着作用时间的延长,A549 细胞 PEDF 蛋白浓度均呈时间依赖性下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

PEDF 是目前已知最强的抑制血管形成的内源性生物活性因子,在全身广泛表达,其抑制血管形成的效果是血管他丁的 2 倍、内皮他丁的 7 倍多。PEDF 与乳腺癌、前列腺癌、骨肉瘤、胰腺癌等肿瘤有密切的关联^[4]。敲除 PEDF 基因,可以促进内皮细胞和肺癌细胞 A549 的生长;PEDF 低表达与肺癌较差的预后及淋巴转移相关^[4-5]。研究^[6]提示,PEDF 蛋白可抑制肺癌的生长以及肿瘤血管形成,因而可能成为治疗肺癌的新策略。

PEDF 表达水平与血糖浓度高低也可能存在着

一定的联系:在 49 例健康对照和 132 例 2 型糖尿病患者中,用 ELISA 法检测血清 PEDF 水平,结果显示患者血清 PEDF 水平显著低于健康对照组^[7]。在糖尿病性视网膜病变中,PEDF 明显减低而血管内皮生长因子则明显升高^[8],在糖尿病大鼠肾脏中,PEDF mRNA 和蛋白质含量均下降。体外研究^[9]表明,高血糖是肾脏分泌 PEDF 减少的直接原因之一。研究^[10]报道称,在体外培养人视网膜色素上皮细胞,通过氧气含量和葡萄糖浓度变化检测 PEDF 表达情况,结果显示高浓度葡萄糖直接下调 PEDF 的表达。在 2 型糖尿病患者中,发生各种恶性肿瘤的危险性比正常人群增加^[11];肺癌在 2 型糖尿病患者恶性肿瘤的发病中居前 3 位。在日本,糖尿病合并肺癌发病率为 4.98%^[11],英国糖尿病患者肺癌发病率为 1.63/(1 000 人/年)^[12]。但较高浓度葡萄糖对于肺癌的发生、发展究竟有何影响及其可能机制如何,如高糖是否可能通过抑制肺癌细胞 PEDF 的表达而促进肿瘤发展,有待实验观察、探讨。

鉴于肺腺癌在肺癌中约占 40%,较其他类型肺癌(肺鳞癌 25%,小细胞癌 24%,大细胞癌 9%)更为常见,本实验研究在体外首选肺腺癌细胞株为研究对象。实验分组时参照正常者的血糖浓度,以 5.6 mmol/L 葡萄糖组为对照组,逐渐增加每组的葡萄糖含量。本实验观察结果提示:随着葡萄糖浓度的逐渐上升,肺腺癌细胞 PEDF 的表达水平逐渐下降;且随着较高浓度葡萄糖作用时间的延长,PEDF 表达呈时间依赖性下降。此外,甘露醇对 PEDF 的表达未见明显影响。总之,与对照组相比,除 RT-PCR 检测中的高糖 C 组,及 ELISA 检测中的高糖 B 组外,各组随着葡萄糖浓度的增加和葡萄糖作用时间的延长,A549 细胞 PEDF 的表达水平有明显下降趋势,呈剂量、时间依赖性改变。因此,高浓度葡萄糖、较长时间作用可能降低肺腺癌细胞 PEDF 的表达水平。由于 PEDF 可能抑制肺癌细胞的生长与运

动^[6],高浓度葡萄糖较长时间作用可能有利于肺癌的发生、发展,包括其他类型细胞株及在体实验的实验研究有待于进一步开展。

参考文献

- [1] 王莉苹,束军. 不同类型非小细胞癌细胞株中 PEDF 的表达[J]. 安徽医科大学学报,2013, 48(8):889-92.
- [2] Wang J J, Zhang S X, Lu K, et al. Decreased expression of pigment epithelium-derived factor is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2005, 54(1):243-50.
- [3] 陈思敏,柳广南. 2 型糖尿病合并肺癌的流行病学、危险因素及发病机制的研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(6):967.
- [4] Zhang L, Chen J, Ke Y, et al. Down-regulation of PEDF expression by ribozyme transgene in endothelial and lung cancer cells and its impact on angiogenesis *in vitro* [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(6):1615-9.
- [5] Chen J, Ye L, Zhang L, et al. The molecular impact of pigment epithelium-derived factor, PEDF, on lung cancer cells and the clinical significance [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(1):159-66.
- [6] 陈晋峰,赵威,张建芝,等. 色素上皮衍生因子基因的克隆以及
- 与肺癌细胞生长和肿瘤新生血管形成影响的研究[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(7):485-90.
- [7] 陈海冰,贾伟平,陈俊茜,等. 2 型糖尿病肾病患者血清色素上皮源因子水平的变化及意义[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(18):1230-3.
- [8] Mohan N, Monickaraj F, Balasubramanyam M, et al. Imbalanced levels of angiogenic and angiostatic factors in vitreous, plasma and postmortem retinal tissue of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *J Diabetes Complications*, 2012, 26(5):435-41.
- [9] 姚毅,关明,赵秀琴,等. 缺氧和高浓度葡萄糖对体外培养人视网膜色素上皮衍生因子表达的影响[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(22):1989-92.
- [10] Hemminki K, Li X, Sundquist J, et al. Risk of cancer following hospitalization for type 2 diabetes [J]. *Oncologist*, 2010, 15(6):548-55.
- [11] Kuriki K, Hirose K, Tajima K. Diabetes and cancer risk for all and specific sites among Japanese men and women [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2007, 6(1):83-9.
- [12] Hall G C, Roberts C M, Boulis M, et al. Diabetes and the risk of lung cancer [J]. *Diabetes Care*, 2005, 28(3):590-4.

Effects of glucose of different concentrations on the expression of PEDF in lung adenocarcinoma cells

Jin Cheng, Shu Jun, Lou Zhixia, et al

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

Abstract Objective To observe the effects of glucose of different concentrations on the expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in lung adenocarcinoma cell line A549. **Methods** According to the concentration of glucose in the culture medium, A549 cells were divided into 5 groups: normal group (5.6 mmol/L glucose), mannitol group (5.6 mmol/L glucose + 25 mmol/L mannitol), group A (10 mmol/L glucose), group B (20 mmol/L glucose), group C (30 mmol/L glucose). The levels of PEDF in A549 cells at different time points with different concentrations of glucose was examined by a semi-quantitative RT-PCR and ELISA assay, and then compared with each other. **Results** Compared with the control group, the expression level of PEDF was remarkably decreased in a glucose dose dependent manner; while the A549 cells were exposed to different concentrations of glucose ($P < 0.05$). Except the RT-PCR detection of group C, and the ELISA detection of group B, the expression level of PEDF was remarkably decreased in a action time dependent manner; while the A549 cells were exposed to different durations ($P < 0.05$). **Conclusion** High concentration of glucose with longer durations may reduce the level of PEDF in lung adenocarcinoma cells.

Key words lung adenocarcinoma; pigment epithelium derived factor; glucose; concentrations; effects