

重组人内皮抑素对食管癌细胞生长抑制作用的体外研究

张志明 孙苏平[△]

(南京医科大学附属常州第二人民医院放疗科 江苏 常州 213003)

摘要 目的 探讨重组人内皮抑素(rhES)对食管鳞癌系 KYSE-150 及 TE1 细胞生长的影响。方法 应用四甲基偶氮唑盐(MTT)法,以大鼠成纤维细胞 L929 为对照细胞,检测 rhES 不同浓度(0、12.5、25、50、100、200、400、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和作用时间(24h、48h)对食管鳞癌系 KYSE-150、TE1 和 L929 细胞的生长抑制作用。结果 大鼠 L929 细胞经 rhES 处理后,吸光度 A 值轻微降低,差异不具有统计学意义($P>0.05$),食管鳞癌系 KYSE-150、TE1 经 rhES 处理后,吸光度 A 值明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论: rhES 明显抑制食管鳞癌系 KYSE-150 及 TE1 细胞增殖,且呈时间-剂量依赖性。

关键词 重组人内皮抑素 食管癌细胞 生长抑制

中图分类号 R735.1 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)02-235-04

Growth Inhibition of Esophageal Cancer Cell in vitro by rhES

ZHANG Zhi-ming, SUN Su-ping[△]

(Department of Radiology, Changzhou Second Hospital & Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the growth inhibition of Recombinant Human Endostatin (rhES) on human esophageal squamous carcinoma cell line KYSE-150 and TE1. **Methods:** The effect of rhES on the proliferation of human esophageal squamous carcinoma cell line KYSE-150, TE1 cell and of normal cell line (L929) was studied by 3-(4,5)-dimethylthiazolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay, treating with various concentrations (0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and at different time points (24h, 48h). **Results:** After treating with various concentrations of rhES and at different time points, the absorbance of human esophageal squamous carcinoma cell line KYSE-150, TE1 was significantly decreased ($P<0.05$) while L929 was not ($P>0.05$). **Conclusions:** rhES can inhibit the growth of human esophageal squamous carcinoma cell line KYSE-150, TE1 with time-dose dependent style.

Key words: rhES; Esophageal squamous carcinoma; Growth inhibition

Chinese Library Classification(CLC): R735.1 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)02-235-04

前言

食管癌是我国常见恶性肿瘤,目前非手术治疗方法仍是该病特别是中晚期患者的主要治疗手段,其疗效涉及诸多因素。管癌常规放射治疗的长期生存率为 4.3%~16.4%。同期放疗结合治疗食管癌也显示出其优势。治疗方案的个体化可进一步增加疗效,降低并发症,提高生活质量。生物学方法可能为非手术治疗食管癌个体化治疗方案的选择提供思路^[1]。抗血管生成治疗可能成为另一个潜在的食管癌治疗思路,资料表明:30%~60%食管癌高度表达 VEGF,且与总体生存预后不良有关^[2]。本文以食管鳞癌系 KYSE-150 及 TE1 细胞为研究对象,探讨血管生成抑制靶向药物重组人内皮抑素对其体外生长的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人食管鳞癌系 TE1 细胞由南京医科大学附属常州第二人民医院中心实验室保存,食管鳞癌系 KYSE-150 细胞购自上海复祥

生物科技有限公司,重组人内皮抑素(rhES)由烟台麦得津生物工程股份有限公司提供,RPMI1640 和 DMEM 购自 Gibco 公司,小牛血清购自 Gibco 公司,胰蛋白酶购自华美生物公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自上海生工,二甲基亚砜(DMSO)购自上海国药。

1.2 细胞培养

培养基为 RPMI1640 和 DMEM 液,含有 10%胎牛血清,青霉素(100U/ml),链霉素(100U/ml),谷氨酰胺(0.3 mg/ml)。食管癌细胞 KYSE-150 接种于培养瓶中,置于 37℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,2-3 天传代一次。rhES 为无色澄清液体,15mg/3ml/支,实验前用 RPMI1640 或 DMEM 液稀释至各实验浓度,MTT 用 0.01mol/L 的 PBS 溶解至 5 mg/ml,4℃保存备用;胎牛血清于水浴锅中 50℃灭活 30 min。

1.3 rhES 对大鼠 L929 细胞的作用

对数生长期细胞接种 24h 后,细胞换液为含相应 rhES 实验浓度的培养液,对照组为 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rhES 的 RPMI1640 溶液,继续培养 24h。0.25%胰酶消化对数生长期细胞,细胞计数后,用 RPMI1640 或 DMEM 培养基完全培养基稀释为 5×10^4 个/ml 细胞悬液,分别接种于 96 孔培养板,细胞悬液 100 μl /孔,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24h,分别给予 rhES 为 0、12.5、25、50、100、200、400、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 各 100 μl ,培养 24h 后加入 MTT 20 μl ,继续培养 4h 后吸出培养液,加入 100 μl DMSO 振荡 10

作者简介 张志明,硕士研究生,南京医科大学肿瘤放射治疗专业
[△]通讯作者 孙苏平,放射医学博士,南京医科大学副教授,硕士生导师,E-mail: ssp56@126.com
(收稿日期 2011-06-03 接受日期 2011-06-30)

min,充分溶解,酶联免疫检测仪 (BIORAD 680) 于波长 570/630 nm 处测吸光度 A 值。每个剂量点设 3 个平行样取平均值,实验重复 3 次。

1.4 rhES 对食道癌 KYSE-150 及 TE1 细胞增殖抑制作用

对数生长期细胞接种 24h 后,细胞换液为含相应 rhES 实验浓度的培养液,对照组为 0μg/ml rhES 的 RPMI1640 溶液,继续培养 24h。0.25%胰酶消化对数生长期细胞,细胞计数后,用 RPMI1640 或 DMEM 培养基完全培养基稀释为 5×10^4 个/ml、 4×10^4 个/ml 细胞悬液,分别接种于 96 孔培养板,细胞悬液 100μl/孔,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24h,分别给予 rhES 为 0、12.5、25、50、100、200、400、600μg/ml 各 100μl,培养 24h、48h 后加入 MTT 20μl,继续培养 4h 后吸出培养液,加入 100μl DMSO 振荡 10 min,充分溶解,酶联免疫检测仪于波长 570/630 nm 处测吸光度 A 值。每个剂量点设 3 个平行样取平均值,实验重复 3 次。食管癌 TE1 细胞处理同 KYSE-150 细胞。

1.5 统计分析

实验结果采用 SPSS 统计软件检验分析,数据均以均数±标准差表示,组间比较采用两两比较用 t 检验;以 ANOVA 分析各组间差异,多个实验组与对照组的比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 rhES 对大鼠成纤维细胞 L929 的作用

大鼠 L929 细胞经 RhES 处理后继续培养 24h,酶联免疫检测仪于波长 570/630 nm 处测吸光度 A 值,检测细胞增殖能力。

表 1 不同浓度 rhES 处理大鼠 L929 细胞培养 24h 后的吸光度值和细胞存活率

Table 1 Absorbance and survival rate of rat L929 cell after treated by different concentrations of rhES for 24 hours

rhES(μg/ml)	Absorbance	Cell survival rate(%)
0	0.984 ± 0.055	100.0 ± 5.6
12.5	0.938 ± 0.023	95.3 ± 2.3
25	0.912 ± 0.046	92.7 ± 4.7
50	0.910 ± 0.021	92.5 ± 2.2
100	0.899 ± 0.088	91.3 ± 9.0
200	0.882 ± 0.040	89.7 ± 4.1
400	0.868 ± 0.075	88.2 ± 7.6
600	0.838 ± 0.037	85.1 ± 3.8

如表 1 所示,用 MTT 实验观察大鼠 L929 细胞的增殖抑制,给予 rhES 处理后,于波长 570/630 nm 处测吸光度 A 值轻微降低,差异不具统计学意义 (P>0.05),提示 rhES 对大鼠 L929 细胞的增殖抑制没有显著作用。

2.2 rhES 对食道癌细胞 KYSE-150 增殖抑制作用

食道癌细胞 KYSE-150 经 rhES 处理后继续培养 24h、48h,酶联免疫检测仪于波长 570/630 nm 处测吸光度 A 值,检测细胞增殖能力。

表 2 不同浓度 rhES 处理 KYSE-150 细胞培养 24h 后的吸光度值和细胞存活率

Table 2 Absorbance and survival rate of KYSE-150 cell after treated by different concentrations of rhES for 24 hours

rhES (μg/ml)	Absorbance	Cell survival rate (%)
0	1.071 ± 0.048	100.0 ± 4.5
12.5	1.048 ± 0.024	97.9 ± 2.2
25	1.023 ± 0.034	95.5 ± 3.1
50	0.970 ± 0.099	90.6 ± 9.3
100	0.968 ± 0.018	90.4 ± 1.6
200	0.933 ± 0.029 [△]	87.1 ± 2.7*
400	0.780 ± 0.040 [△]	72.9 ± 3.8*
600	0.768 ± 0.028 [△]	71.7 ± 2.6*

注 与对照组相比,△P<0.05,*P<0.05
Note:compared with the control group,△P<0.05,*P<0.05.

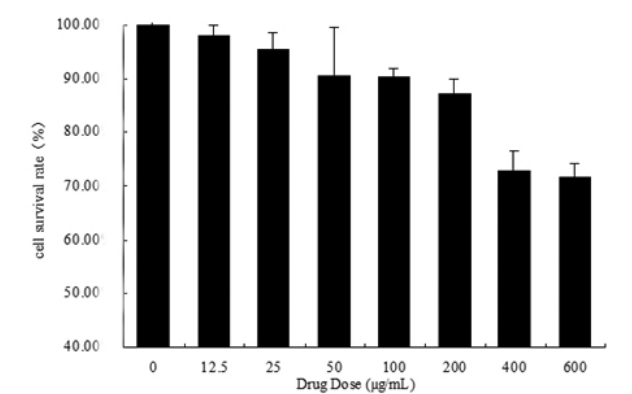


图 1 不同浓度 RhES 处理 KYSE-150 细胞培养 24h 后的细胞存活率
Fig.1 Survival rate of KYSE-150 cell after treated by different concentrations of rhES for 24 hours

表 3 不同浓度 rhES 处理 KYSE-150 细胞培养 48h 后的吸光度值和存活率

Table 3 Absorbance and survival rate of KYSE-150 cell after treated by different concentrations of rhES for 48 hours

RhES(μg/ml)	Absorbance	Cell survival rate (%)
0	0.472 ± 0.043	100.0 ± 9.1
12.5	0.458 ± 0.064	97.1 ± 13.7
25	0.422 ± 0.014	89.4 ± 3.0
50	0.397 ± 0.030	84.1 ± 6.4
100	0.395 ± 0.040	83.8 ± 8.5
200	0.359 ± 0.029 [△]	76.2 ± 2.7*
400	0.320 ± 0.026 [△]	67.9 ± 5.4*
600	0.317 ± 0.011 [△]	67.2 ± 2.2*

注 与对照组相比,△P<0.05,*P<0.05
Note: compared with the control group, △P<0.05,*P<0.05

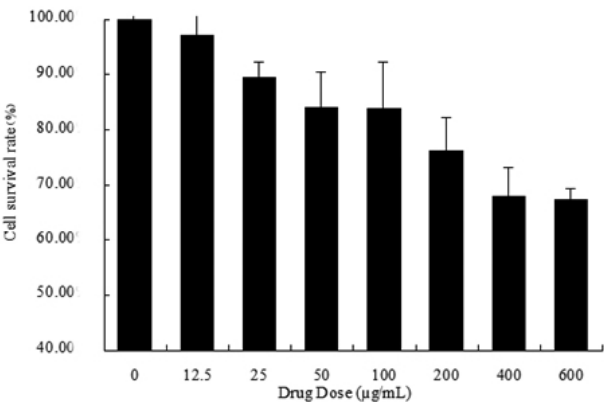


图2 不同浓度 rhES 处理 KYSE-150 细胞培养 48h 后的存活率

Fig.2 Survival rate of KYSE-150 cell after treated by different concentrations of rhES for 48 hours

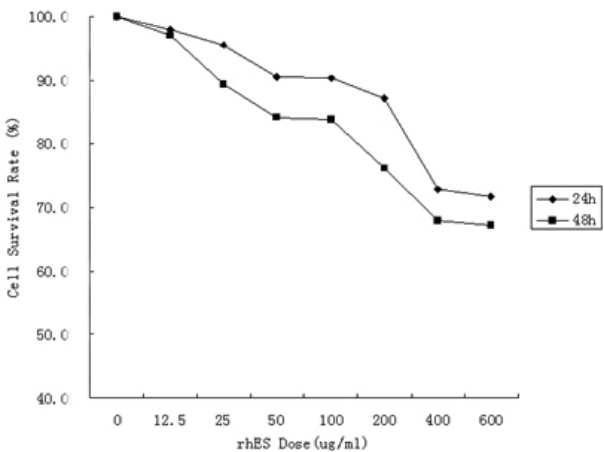


图3 不同时间 RhES 处理 KYSE-150 细胞的存活率

Fig.3 Survival rate of KYSE-150 cell treated by rhES for different time

如表 2、3 及图 1、2 所示,KYSE-150 细胞细胞存活率随 rhES 浓度升高而逐渐降低,rhES 细胞增殖抑制作用随浓度升高而增加。与对照组相比,1、12.5、50、100、μg/ml rhES 对 KYSE-150 细胞增殖抑制作用无统计学差异 ($P>0.05$) ;200、400 和 600μg/ml rhES 细胞存活率随浓度升高而降低,与对照组相比,具有统计学差异 ($P<0.05$) 如图 3 所示,rhES 细胞增殖抑制作用随时间而增加;表明 rhES 细胞增殖抑制作用总体呈剂量 - 时间依赖性。

2.3 RhES 对食管癌系 TE1 细胞增殖抑制作用

食管癌系 TE1 细胞经 RhES 处理后继续培养 24h、48h,酶联免疫检测仪于波长 570/630 nm 处测吸光度 A 值,检测细胞增殖能力。

如表 4、5 所示,TE1 细胞存活率随 rhES 浓度升高而逐渐降低,rhES 细胞增殖抑制作用随浓度升高而增加。与对照组相比,0、12.5、50、100、μg/ml rhES 对 TE1 细胞增殖抑制作用无统计学差异 ($P>0.05$) ;200、400 和 600μg/ml rhES 细胞存活率随浓度升高而降低,与对照组相比,具有统计学差异 ($P<0.05$) ;如图 4、5、6 所示,rhES 对 TE1 细胞增殖抑制作用随时间而增加;表明 rhES 对 TE1 细胞增殖抑制作用总体呈剂量 - 时间依赖性。

表 4 不同浓度 rhES 处理 TE1 细胞培养 24h 后的吸光度值和细胞存活率

Table 4 Absorbance and survival rate of TE1 cell after treated by different concentrations of rhES for 24 hours

rhES(μg/ml)	Absorbance	Cell survival rate (%)
0	1.010 ± 0.094	100.0 ± 9.4
12.5	0.946 ± 0.028	94.4 ± 2.8
25	0.918 ± 0.016	91.6 ± 1.6
50	0.898 ± 0.024	89.7 ± 2.4
100	0.897 ± 0.078	89.6 ± 7.7
200	0.848 ± 0.032 [△]	84.6 ± 3.2*
400	0.842 ± 0.034 [△]	84.0 ± 3.4*
600	0.840 ± 0.032 [△]	83.8 ± 3.3*

注 与对照组相比, $\Delta P<0.05$, * $P<0.05$

Note :compared with the control group, $\Delta P<0.05$, * $P<0.05$

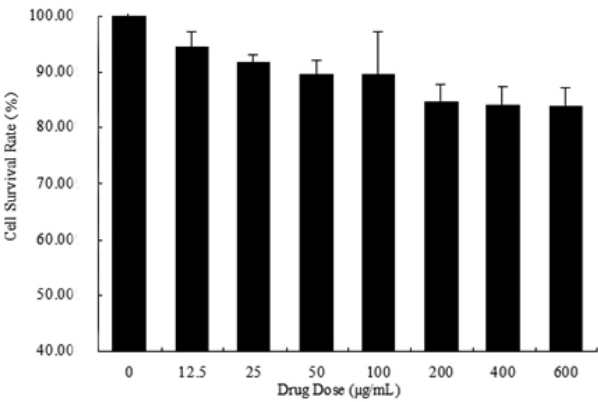


图4 不同浓度 rhES 处理 TE1 细胞培养 24h 后的细胞存活率

Fig. 4 Survival rate of TE1 cell after treated by different concentrations of rhES for 24 hours

表 5 不同浓度 rhES 处理 TE1 细胞培养 48h 后的吸光度值和存活率

Table 5 Absorbance and survival rate of TE1 cell after treated by different concentrations of rhES for 48 hours

rhES(μg/ml)	Absorbance	Cell survival rate (%)
0	0.591 ± 0.065	100.0 ± 11.0
12.5	0.540 ± 0.024	91.3 ± 4.1
25	0.517 ± 0.008	87.5 ± 1.3
50	0.510 ± 0.066	86.2 ± 11.1
100	0.507 ± 0.054	85.8 ± 9.1
200	0.488 ± 0.010 [△]	82.6 ± 1.8*
400	0.423 ± 0.038 [△]	71.6 ± 6.5*
600	0.402 ± 0.020 [△]	68.0 ± 3.5*

注 与对照组相比, $\Delta P<0.05$, * $P<0.05$

Note: compared with the control group, $\Delta P<0.05$, * $P<0.05$

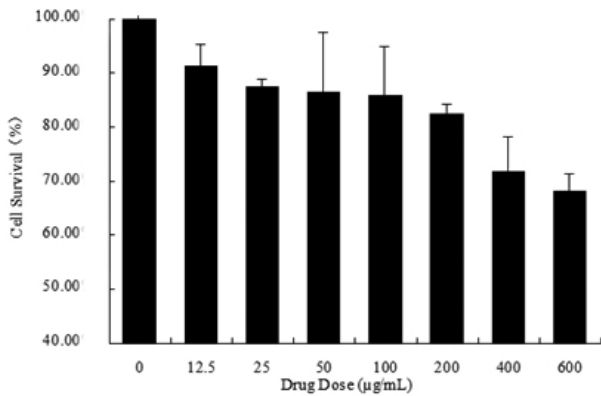


图5 不同浓度 rhES 处理 TE1 细胞培养 48h 后的存活率

Fig. 5 Survival rate of TE1 cell after treated by different concentrations of rhES for 48 hours

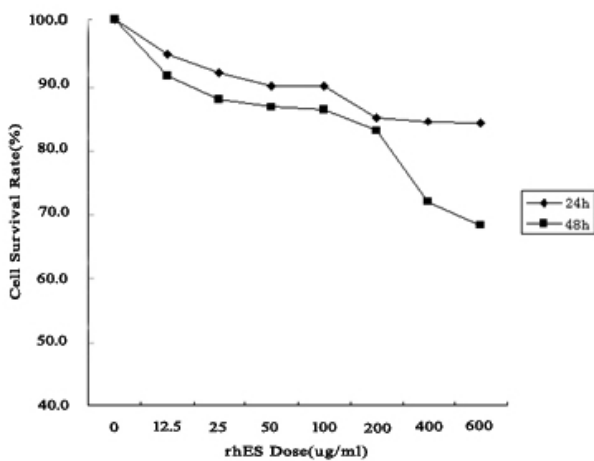


图6 不同时间 rhES 处理 TE1 细胞的存活率

Fig. 6 Survival rate of TE1 cell treated by rhES for different time

3 讨论

血管内皮抑素 (ES) 是细胞外基质胶原 XVIII 羧基末端片段, 最初是从鼠成血管细胞瘤株培养液中分离提纯得到的一种内源性糖蛋白, 能够特异性地作用于新生血管的内皮细胞^[3]。直接抑制内皮细胞的增殖、转移并诱导其凋亡而发挥抗血管生成作用。ES 通过抑制血管内皮细胞达到抗肿瘤作用的机制已被广泛证实^[4-6], 近来 ES 直接抑制某些肿瘤细胞侵袭转移及生长的研究也有了报道^[7,8]。人源性内皮抑素是胶原蛋白 XVIII 分子 C 端非胶原区的一个酶解片段, 由 184 个氨基酸残基构成, 主要由茎环结构和 β -片层组成, 有 4 个半胱氨酸残基, 可以组成 2 对链内二硫键。其相对分子质量约为 18000 道尔顿, O'Reilly^[9]等首先在鼠血管内皮细胞瘤的培养上清液中分离出鼠源性血管内皮抑素。

在我们实验中, 通过 MTT 法检测 rhES 对食管鳞癌系 KYSE-150 及 TE1 细胞增殖的影响情况。我们发现 KYSE-150 及 TE1 细胞经 12.5-100 μ g/ml rhES 处理, 细胞增殖抑制不明显。200、400、600 μ g/ml rhES 处理 48h 增殖抑制率达 20%~

30%。说明 rhES 对细胞的增殖抑制存在时间和浓度依赖性。

给予血管生成抑制剂会增加肿瘤氧合并提高放射效应, 血管生成抑制剂联合单次放射导致在体肿瘤明显的再生长延缓。ES 联合放射既可消除无效的肿瘤血管网、降低间质液压和内皮细胞的辐射致敏。也可通过损伤肿瘤血管, 杀死由血管供养的肿瘤细胞^[10]。它对 Lewis 肺癌移植瘤^[11]、对射线抗拒的 SQ220B 移植瘤、人结肠直肠癌移植同样具有放射增敏作用。I-tasaka 等^[12]指出 ES 阻断射线照射后引起的肿瘤血管再生, 并增加肿瘤组织对放射的敏感性。rhES 和放疗的联合对食管癌细胞表达 VEGF 的影响作用将是我们下一步研究的内容。

参考文献 (References)

- [1] 孙苏平, 杨鸿鹏, 黎功. 中国非手术治疗食管癌研究进展[J]. 癌症进展, 2008,6(1): 30-35
Sun Suping, Yang Hongpeng, Li Gong. Progress in non-surgical treatment of esophageal carcinoma [J]. Oncology progress, 2008,6 (1): 30-35
- [2] Shimada H, Hoshino T, Okazumi S, et al. Expression of angiogenic factors predicts response to chemoradiotherapy and prognosis of oesophageal squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2002,86 (4): 552-557
- [3] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186
- [4] Lijuan Yang, Zhixiong Lin, Jianhua Lin, et al. Antitumor effect of endostatin overexpressed in C6 glioma cells is associated with the down-regulation of VEGF[J]. Int J Oncol, 2011, 38(2): 465-471
- [5] Tolstanova Ganna, Deng Xiaoming, Khomenko Tetyana, et al. Role of anti-angiogenic factor endostatin in the pathogenesis of experimental ulcerative colitis[J]. Life Sciences, 2011,88(1-2): 74-81
- [6] Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, et al. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling[J]. J Cell Biol, 2002,158(3): 529-539
- [7] Dkhisli F, Lu H, Soria C, et al. Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells[J]. Hum Gene Ther, 2003,14(10): 997-1008
- [8] Perletti G, Concarri P, Giardini R, et al. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors [J]. Cancer Res, 2000,60(7): 1793-1796
- [9] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997,88 (2): 277-285
- [10] Citrin D, Ménard C, Camphausen K. Combining radiotherapy and angiogenesis inhibitors: clinical trial design[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006,64(1): 15-25
- [11] Luo X, Andres ML, Timiryasova TM, et al. Radiation-enhanced endostatin gene expression and effects of combination treatment [J]. Technol Cancer Res Treat, 2005,4(2): 193-202
- [12] Itasaka S, Komaki R, Herbst RS, et al. Endostatin improves radioreponse and blocks tumor revascularization after radiation therapy for A431 xenografts in mice[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007,67(3): 870-878