

全反式维甲酸对睾丸卵黄囊瘤细胞 VEGF 表达的抑制作用

张浩川 包小周 陈聪德 李仲荣 陈肖鸣

摘要 **目的** 研究全反式维甲酸 (ATRA) 对睾丸卵黄囊瘤细胞血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的抑制作用。**方法** 在体外细胞培养的基础上, 采用 MTT 比色法测定不同浓度 ATRA 对睾丸卵黄囊瘤细胞增殖影响, 半定量 RT-PCR 方法检测 VEGF mRNA 的表达水平, Western Blot 法检测 VEGF 蛋白表达水平。**结果** ATRA 能抑制肿瘤细胞增殖, RT-PCR 结果显示实验组卵黄囊瘤细胞的 VEGF mRNA 表达水平下调, Western Blot 显示实验组卵黄囊瘤细胞的 VEGF 蛋白表达水平降低, 且两者下调作用均呈较明显的时间-剂量依赖性。**结论** 全反式维甲酸可以抑制睾丸卵黄囊瘤细胞的增殖, 抑制肿瘤增殖机制可能与下调 VEGF 的表达有关。

关键词 全反式维甲酸 睾丸卵黄囊瘤细胞 体外培养 VEGF

Effects of All-trans Retinoic Acid on the Expression of VEGF in Testicular Yolk Sac Tumor Cell Line *in vitro*. Zhang Haochuan, Bao Xiaozhou, Chen Congde, et al. Department of Pediatric Surgery, The Yuying Children Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract **Objective** To investigate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the expression of VEGF in testicular yolk sac tumor cell line *in vitro*. **Methods** By technique of cell culture *in vitro*, testicular yolk sac tumor cell line was exposed to ATRA of different concentration. MTT was used to examine the effects of ATRA on proliferation of testicular yolk sac tumor cell line. The VEGF mRNA expression levels were determined by semi-quantitative RT-PCR. The protein expressions of VEGF were analyzed by Western blot. **Results** After yolk sac tumor cells were treated with all-trans retinoic acid, the proliferation index decreased markedly. The mRNA and protein expressions of VEGF decreased dramatically in a time-dose dependent manner. **Conclusion** ATRA could inhibit proliferation of yolk sac tumor cell line, and down regulation of VEGF could be the inhibitory mechanism of ATRA on yolk sac tumor cell line *in vitro*.

Key words ATRA; Testicular yolk sac tumor cell line; Culture *in vitro*; VEGF

卵黄囊瘤 (yolk sac tumor, YST) 是小儿睾丸肿瘤中常见的恶性肿瘤之一, 恶性程度较高。虽然随着现代医学的发展, 对卵黄囊瘤的治疗效果有了很大的提高, 但多种疗法仍难以彻底治愈肿瘤。近年研究表明, 诱导分化已成为一种重要的有效的肿瘤治疗方法, 其中全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 是目前诱导分化剂中最重要并已用于临床治疗的药物^[1]。VEGF 是最重要的血管生成因子, 能直接或间接参与血管生成, 以促进肿瘤血管新生的方式促进肿瘤的生长, 在恶性肿瘤的发生、发展及预后中具有极其重要的地位^[2]。本研究通过体外实验观察全

反式维甲酸对睾丸卵黄囊瘤细胞中 VEGF 在 mRNA 和蛋白水平表达的影响, 为 ATRA 在卵黄囊瘤抗血管生成的治疗提供实验资料。

材料与方法

1. 细胞培养: 肿瘤标本取自温州医学院附属育英儿童医院小儿外科收治的 1 例小儿睾丸卵黄囊瘤患者的手术标本, 术中及术后病理诊断均为睾丸卵黄囊瘤。用消化法进行原代传代培养, 培养的细胞经形态学、细胞生长动力学、AFP、染色体分析等方面并结合其组织病理诊断作了鉴定, 被确认为小儿卵黄囊瘤细胞系。培养基为 DMEM, 含 10% 胎牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 0.1mg/ml, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔日换液, 取对数生长期细胞进行试验。

2. 实验分组: 本实验共分 5 组: 采用无水乙醇配制成的 10⁻³mol/L 储备液, 再用培养液稀释成需要浓度。实验组为 4 组: ATRA 终浓度分别为 1 × 10⁻⁸ mol/L、1 × 10⁻⁷ mol/L、1 × 10⁻⁶ mol/L、5 × 10⁻⁶ mol/L ATRA, 对照组加等浓度无水乙醇 (<0.1%)。

3. 细胞形态学的观察: 取对数生长期的卵黄囊瘤细胞, 调

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y204463); 浙江省卫生厅卫生科技重点项目 (2004ZD009)

作者单位: 325027 温州医学院附属育英儿童医院小儿外科

通讯作者: 陈肖鸣, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 电子信箱: cxm@

wzmc.net

整细胞浓度为 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 数目接种于培养瓶中,分别在加入不同终浓度 ATRA 前后用倒置相差显微镜观察细胞形态学改变,每组均观察 7 天。

4. MTT 法检测增殖抑制作用:收集对数生长期细胞,调整细胞悬液浓度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$,接种于 96 孔板,加入终浓度分别为 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的 ATRA,设加等浓度无水乙醇的对照孔和只加培养液的调零孔,培养 24h、48h、72h,每 24h 取出一个培养板离心,弃上清,每孔加入 5mg/ml 的 MTT 溶液 $20 \mu\text{l}$,继续孵育 4h 终止培养,离心,弃上清,每孔加二甲亚砜 $100 \mu\text{l}$,37 度孵育 5min,用酶联免疫检测仪(波长 570nm)比色,测定各孔的吸光度(A)值。计算抑制率。公式:抑制率(%) = $(1 - \text{实验孔平均 OD 值} / \text{对照孔平均 OD 值}) \times 100\%$ 。

5. RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达:收集各 ATRA 组及对照组细胞,按 Invitrogen 公司提供的 Trizol 总 RNA 分离试剂盒说明提取 RNA。根据反转录试剂盒操作步骤合成 cDNA。然后参照 TaKaRa one step RNA PCR Kit 说明进行 RT-PCR 反应,每管分别加入 VEGF 上下游引物 $1 \mu\text{l}$,每管同时加入内参照 β -actin 上下游引物各 $0.5 \mu\text{l}$ 。按照以下条件进行 RT-PCR 反应:50℃ 50min RT 反应,94℃ 2min 灭活 RTase,94℃ 30s、60℃ 30s、72℃ 1.5min 延伸,循环 40 次。反应结束后,取 PCR 反应液 $8 \mu\text{l}$ + loading buffer $2 \mu\text{l}$ /孔,加入含 goldlin 染色剂的 20g/L 琼脂糖凝胶,6V/cm 电压电泳 30~40min,凝胶图像分析仪分析条带的光密度值,各目标条带 VEGF 的光密度值除以内参照 β -actin 的光密度值,得相对光密度值。取 $10 \mu\text{l}$ 左右 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察扩增产物,凝胶成像分析系统扫描扩增带,以 β -actin 为内参照,与目的基因 PCR 产物条带灰度容积之比作为反映目的基因 mRNA 水平的相对指标。引物序列: β -actin 上游引物:5'-GGC ATG GGT CAG AAG GAT TCC-3',下游引物:5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC CG-3',712bp; VEGF 上游引物:5'-TCG GGC CTC CGA AAC CAT GA-3',下游引物:5'-GCT GGT GAG AGA TCT GGT TC-3',461bp。

6. Western Blot 法检测 VEGF 蛋白表达水平:收集各 ATRA 组及对照组细胞,冷 PBS 洗涤细胞 3 次,12000r/min 离心收集在离心管中,用单去污法裂解细胞,样品进行 SDS PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜,加入含 50g/L 去脂奶粉封闭液,室温摇床温育 2h,使用单去污法提取细胞内总蛋白,Bradford 法测定蛋白的含量,取适量样品,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳;转膜封闭后分别加入 VEGF (Santa Cruz 公司, SC-7269)、 β -actin 抗体 (Santa Cruz 公司, SC-81178),4℃ 下孵育过夜;再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二级抗体,室温孵育膜 1h,KTCTM 化学发光法分别检测 PVDF 膜上和 β -actin 蛋白的表达量,Image 图像分析系统测定各条带灰度值,以同一管中和 β -actin 条带积分吸光度值之比作数据分析,以反映蛋白的表达程度。

7. 统计学处理方法:数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析, $P < 0.05$ 有统计学差异, $P < 0.01$ 有显著统计学差异。计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

结 果

1. 细胞形态学的观察:对照组细胞贴壁生长,短梭形或多角形,细胞聚集时可呈束状排列,有一定的极向,见较多的核分裂象,细胞异型性明显(图 1)。实验组用 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ATRA 处理 3 天后,可见细胞体积变小,核质比减小,染色质浓缩,分裂细胞减少(图 2)。



图 1 卵黄囊瘤细胞对照组培养 72h
倒置相差显微镜($\times 200$)



图 2 10^{-6} mol/L ATRA 处理 72h 卵黄囊瘤细胞($\times 200$)

2. MTT 法检测结果:各组细胞吸光度见表 1: $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ATRA 组处理卵黄囊瘤细胞后,第 24h 和 48h 无明显变化,第 72h 后开始出现生长抑制,细胞存活率为 92.4%,与对照组相比差异显著($P < 0.05$); $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ATRA 组作用于细胞 24、48、72h 后细胞存活率分别为 57.9%、53.3%、19.4%,与对照组相比差异显著($P < 0.01$),提示 ATRA 可抑制卵黄囊瘤细胞生长,且其抑制作用呈较明显的时间-剂量依赖性。

表 1 MTT 法测不同浓度 ATRA 作用不同时间对卵黄囊瘤细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24h	48h	72h
	OD	OD	OD
对照组	0.298 ± 0.036	0.513 ± 0.052	0.896 ± 0.040
10 ⁻⁸ mol/L ATRA 组	0.293 ± 0.034	0.486 ± 0.045 *△	0.8301 ± 0.031 *
10 ⁻⁷ mol/L ATRA 组	0.266 ± 0.049	0.356 ± 0.030 ***△	0.391 ± 0.054 ***△△
10 ⁻⁶ mol/L ATRA 组	0.175 ± 0.053 **	0.242 ± 0.034 ***△△	0.177 ± 0.036 ***△△
5 × 10 ⁻⁶ MATRA 组	0.160 ± 0.031 **	0.253 ± 0.031 ***△△	0.174 ± 0.040 ***△△

与对照组比较, $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$; 同组前后两时间段比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3. RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达结果: 不同浓度作用 48h 后细胞 VEGF mRN 表达量随着 ATRA 浓度的递增依次下降(图 3); 1×10^{-6} mol/L ATRA 组在分别作用 24h、48h、72h 后 VEGF mRNA 表达逐渐降低(图 4), 两组间比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果提示 ATRA 能下调卵黄囊瘤 VEGF mRNA 的表达, 这种抑制效应在一定范围内呈剂量时间依赖关系。

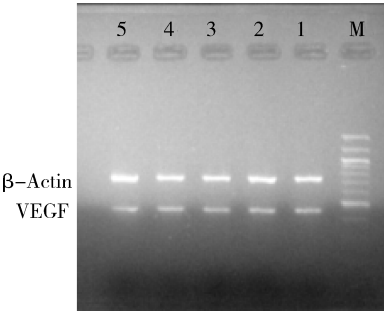


图 3 不同浓度 ATRA 作用 48h 后细胞 VEGF mRNA 表达的影响

1 为对照组, 2、3、4、5 分别为 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-6} mol/L、 5×10^{-6} mol/L ATRA 组

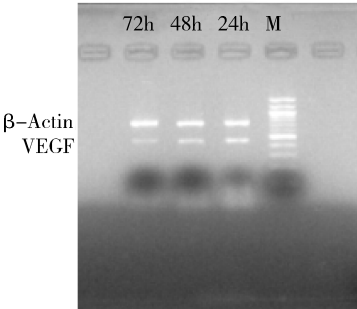


图 4 1×10^{-6} mol/L ATRA 组不同作用时相后细胞 VEGF mRNA 表达的影响

4. Western Blot 检测 VEGF 蛋白表达结果: 不同浓度作用 48h 后细胞 VEGF 蛋白表达量随着 ATRA 浓度的递增依次下降(图 5); 1×10^{-6} mol/L ATRA 组

在分别作用 24h、48h、72h 后 VEGF 蛋白表达逐渐降低(图 6), 两组间比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果提示 ATRA 能下调卵黄囊瘤 VEGF 蛋白的表达, 这种下调作用在一定范围内呈剂量时间依赖关系。

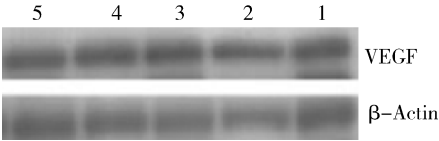


图 5 不同浓度 ATRA 作用 48h 后细胞 VEGF 表达的影响

1 为对照组, 2、3、4、5 分别为 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-6} mol/L、 5×10^{-6} mol/L ATRA 组

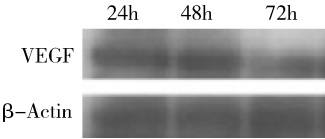


图 6 1×10^{-6} mol/L ATRA 组不同作用时相后细胞 VEGF 表达的影响

讨 论

近年研究表明, 血管新生在恶性肿瘤的生长、转移以及播散中起重要作用。VEGF 是目前所知作用最强的促血管内皮生成的细胞因子, 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原。很多研究证实, 抑制肿瘤细胞合成和释放 VEGF 能显著抑制肿瘤的生长和转移^[3]。因此, 调节 VEGF 水平可以作为肿瘤治疗手段, 近年来已成为肿瘤基因治疗的新靶点。ATRA 因其具有抗肿瘤作用应用于临床抗肿瘤治疗, 作用机制尚不完全清楚, 主要通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞分化和凋亡等途径发挥其抗肿瘤作用。Jain L 等^[4]研究表明, 多数实体肿瘤均过度表达 VEGF。关于 VEGF 与睾丸肿瘤关系的研究报道甚少, Nitzsche B^[5]研究发现, 在原发的睾丸生殖细胞肿瘤中 VEGF 表达比正常组织中显著增加。

本研究采用倒置相差显微镜、MTT 法观察体外

培养的卵黄囊瘤细胞在含有不同浓度 ATRA 培养液中的形态学变化及对细胞增殖的抑制作用。结果显示, ATRA 对卵黄囊瘤细胞有明显抑制作用, 不同浓度 ATRA 处理睾丸卵黄囊瘤细胞 24h、48h 和 72h 后, RT-PCR 和 Western Blot 检测对照组产生 VEGF-VEGF mRNA 和 VEGF 蛋白量较高, 说明 ATRA 能抑制睾丸卵黄囊瘤细胞 VEGF mRNA 以及 VEGF 蛋白分泌的表达, 并且这种抑制效应在一定范围内呈剂量时间依赖关系。由此可认为, ATRA 可以降低肿瘤细胞血管内皮生长因子的水平, 而起到血管生长抑制作用。ATRA 抑制睾丸卵黄囊瘤细胞分泌 VEGF 的机制可能与 ATRA 的诱导分化作用有关, ATRA 诱导睾丸卵黄囊瘤细胞分化, 使睾丸卵黄囊瘤细胞向一定程度的良性趋势分化, 从而分泌 VEGF 的能力下降。Saito A^[6] 研究认为 ATRA 可通过血管内皮细胞和肿瘤细胞中维甲酸受体的激活而发挥直接抑制血管内皮细胞的移行与存活。另一种可能机制是 ATRA 直接作用于睾丸卵黄囊瘤细胞, 抑制肿瘤细胞产生 VEGF。Pal 等在鸡胚尿囊膜实验 (CAM) 中证实, ATRA 可选择性抑制 VEGF 诱导的血管新生和血管通透性, 这种抑制作用发生于 1~15min 内, 表明 ATRA 的这种抑制血管新生效能不是完全通过经典的维甲酸受体途径调节转录而发生的, 提示 ATRA 直接抑制 VEGF 的促血管新生可能是维甲酸抗肿瘤的又一种可能机制。Zage PE 等^[7] 研究表明, ATRA 还可抑制肿瘤细胞的 VEGF-R, 从而进一步抑制了 VEGF 特异性结合于内皮细胞表面 VEGFR-1 及 VEGFR-2 的胞外区, 抑制了磷酸化胞内区酪氨酸激酶, 并下调其下游的一系列蛋白, 降低血管通透性, 抑制内皮细

胞分裂、增殖和迁移, 从而抑制肿瘤细胞增殖。ATRA 抑制睾丸卵黄囊瘤细胞 VEGF 受体表达的机制有待进一步研究。

综上所述, 本试验结果提示 ATRA 能抑制卵黄囊瘤细胞 VEGF 在 mRNA 和蛋白的表达, 干扰和阻碍了肿瘤新生血管的生成, 能特异性抑制肿瘤细胞增殖, 为临床利用 VEGF 在肿瘤血管生长中的重要作用来治疗肿瘤提供理论依据。

参考文献

- 1 Neri D Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5 (6): 436-446
- 2 Backer MV, Hamby CV, Backer JM. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling in angiogenic tumor vasculature. *Adv Genet*, 2009, 67: 1-27
- 3 Moser C, Lang SA, Stoeltzing O. The direct effects of anti-vascular endothelial growth factor therapy on tumor cells. *Clin Colorectal Cancer*, 2007, 6(8): 564-571
- 4 Jain L, Vargo CA, Danesi R, *et al.* The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(9): 2496-2508
- 5 Nitzsche B, Gloesenkamp C, Schrader M, *et al.* Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*, 2010, 29; 103(1): 18-28
- 6 Saito A, Sugawara A, Urano A, *et al.* All-trans retinoic acid induces in vitro angiogenesis via retinoic acid receptor; possible involvement of paracrine effects of endogenous vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology*, 2007, 148(3): 1412-1423
- 7 Zage PE, Zeng L, Palla S, *et al.* A novel therapeutic combination for neuroblastoma: the vascular endothelial growth factor receptor/epidermal growth factor receptor/rearranged during transfection inhibitor vandetanib with 13-cis-retinoic acid. *Cancer*, 2010, 15, 116(10): 2465-2475

(收稿: 2010-11-20)

二氧化碳气腹时间对腹腔镜胆囊切除术 患者血液流变学的影响

严美娟 楼小侃 陈悦 于泳健 费鲜明

摘要 目的 观察 CO₂ 气腹时间对腹腔镜胆囊切除术 (laparoscopic cholecystectomy, LC) 患者血液流变学的影响。
方法 胆石症择期行 LC 患者 64 例, 年龄 < 60 岁, 术后根据 CO₂ 气腹持续时间归组: A 组 (21 例): 气腹时间 ≤ 30min; B 组 (23

基金项目: 浙江省卫生厅自然科学基金资助项目 (2009A022)

作者单位: 310014 杭州, 浙江省人民医院麻醉科

通讯作者: 楼小侃, 电子信箱: lxxymj@hotmail.com