

doi:10.3969/j.issn.1007-855x.2013.04.015

内皮素拮抗剂抑制人源性喉癌 Hep-2 细胞 VEGF-C 体外表达的定量分析

林雁¹, 尹芳¹, 袁莹¹, 邹剑², 刘锋², 周鹏², 刘世喜², 张京晶³

(1. 昆明医科大学第二附属医院, 云南昆明 650101; 2. 四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川成都 610041; 3. 昆明医科大学公共卫生学院, 云南昆明 650500)

摘要: 通过影响人源性喉癌 Hep-2 细胞中血管内皮生长因子 C(VEGF-C) 表达, 探讨内皮素拮抗剂(BQ-123)与喉癌淋巴转移的机制, 为临床及基础研究提供相应的实验依据。体外培养人源性喉癌 Hep-2 细胞, 运用酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞培养液中 VEGF-C 的含量; 利用 MTT 比色法, 测定不同浓度的内皮素拮抗剂对人源性喉癌 Hep-2 细胞增殖的影响。实验中发现当浓度分别为 20.0 ~ 150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BQ-123 作用 48 h, 对人源性喉癌 Hep-2 细胞增殖有显著抑制作用($P < 0.05$); 浓度分别为 50.0 ~ 150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BQ-123 对人源性喉癌 Hep-2 细胞 VEGF-C 蛋白分泌量有明显抑制活性作用($P < 0.05$)。BQ-123 可以有效抑制人源性喉癌 Hep-2 细胞中 VEGF-C 体内的表达。

关键词: 内皮素拮抗剂; 人源性喉癌 Hep-2 细胞; VEGF-C; 酶联免疫吸附测定法; MTT 比色法
中图分类号: R739.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-855X(2013)04-0071-04

Quantitative Analysis of Endothelin Receptor Blockade on in Vitro VEGF-C Expression in Human Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells

LIN Yan¹, YIN Fang¹, YUAN Ying¹, ZOU Jian², LIU Feng²,
ZHOU Peng², LIU Shi-xi², ZHANG Jing-jing³

(1. The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China;

2. Department of Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

3. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract: Through the study of endothelin receptor blockade about the vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in the human laryngeal carcinoma Hep-2 cells, the mechanism between BQ-123 and the lymphatic metastasis is discussed. In vitro Hep-2 cells are cultivated. The content of VEGF-C in the culture fluid is determined by ELISA. MTT is then adopted to examine the influence of endothelin receptor blockade with different doses on the proliferation of human laryngeal carcinoma Hep-2 cells. It is found that it has significantly higher inhibition on Hep-2 cells when it is 20.0 ~ 150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with BQ-123 after 48h ($P < 0.05$); and that the activation of VEGF-C secretion in Hep-2 cells is reduced remarkably with 50.0 ~ 150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BQ-123. It is pointed out that BQ-123 can significantly inhibit the expression of VEGF-C in Hep-2 cells, which may become a potential treatment for human laryngeal carcinoma.

Key words: endothelin receptor blockade; human laryngeal carcinoma Hep-2 cell; VEGF-C; ELISA; MTT

收稿日期: 2013-06-05. **基金项目:** 云南省教育厅科学研究基金项目(2011C077); 昆明医学院第二附属医院联邦中青年医药师培养基金(2011-LB-01).

作者简介: 林雁(1976-), 男, 博士, 讲师. 主要研究方向: 耳鼻咽喉头颈外科学基础与临床. **E-mail:** jarodlin@sohu.com

通信作者: 张京晶(1978-), 女, 博士, 讲师. 主要研究方向: 儿少卫生及基因. **E-mail:** tree1219@163.com

0 引言

喉癌是头颈部常见恶性肿瘤之一,占7.9%~35.0%。淋巴转移是喉癌转移方式之一,其转移的分子生物学机制尚不明确,并与患者的预后及生存率相关,关于喉癌相关的淋巴管发生、发展及转移机制研究具有非常重要的临床诊断及治疗价值^[1,2],内皮素及其受体(ET/ETR)成为研究靶点之一,有文献显示,ET-1在ETR的介导下与肿瘤细胞增殖、侵袭性有显著相关性,并与多个肿瘤的生长有关^[3,4]。近年来的研究发现,血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C),也称为特异性的淋巴管生成因子,可激活淋巴管的内皮细胞特异性受体 VEGFR-3,从而促进淋巴管内皮细胞增殖分化并诱导淋巴管生成^[5],与肿瘤中的淋巴管形成及转移有关^[6]。有国外学者报道 ET-1 对 VEGF-C 的表达有一定的上调作用,与肿瘤的淋巴管生成有关系^[7,8]。本文采用内皮素受体拮抗剂(endothelin receptor blockade)作用于人源性喉癌 Hep-2 细胞,探讨喉癌细胞中内皮素及其受体与 VEGF-C 的表达及其在淋巴转移中的作用,进一步探讨喉癌淋巴转移的发生机制及之间的相互关系,为喉癌研究及治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

内皮素受体拮抗剂 BQ-123(TD 纯度 >98%,美国 Sigma 公司),以无菌 DMSO 溶解并配制成 20mg/mL 的贮存液,用时用 DMEM 培养液稀释至所需浓度。人源性喉癌 Hep-2 细胞由昆明医科大学实验中心保存;100 万 U 注射用硫酸链霉素(大连美罗大药厂),二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司),DMEM 培养液(高糖,Gibco),甲基噻唑蓝四氮唑盐(MTT,美国 sigma 公司),新生小牛血清(杭州四季青生物有限公司);人 VEGF-C 酶联免疫(ELISA)检测试剂盒(美国 Sigma 公司);80 万 U 注射用青霉素钠(哈药集团制药总厂)。

1.2 细胞培养

人源性喉癌 Hep-2 细胞,以 DMEM 和 10% FBS 为其培养基,置于 CO₂ 培养箱中,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.2.1 MTT 法检测人源性喉癌 Hep-2 细胞的增殖

选用处于对数生长期的 Hep-2 细胞悬液接种于 96 孔培养板,将 Hep-2 细胞数调整为约 5×10^7 个,置于吸出各孔内培养液,加入含不同浓度内皮素拮抗剂,并设置空白对照组。每组均设 5 个复孔,分别培养 48 h。培养结束前 4 h,各培养孔加入 MTT 溶液(10 mg/mL)20 μ L。培养结束后,弃上清液每孔加入 100 μ L DMSO,震荡并避光 10 min 后,测定各孔 OD 值($\lambda = 570$ nm),以不加药的阴性对照组 A570 的 OD 值均数作为对照数,计算细胞抑制率,计算公式为:抑制率(%) = (1 - 实验组 OD 值/阴性对照组 OD 值) \times 100%。

1.2.2 人源性喉癌 Hep-2 细胞 VEGF-C 蛋白表达检测

接种于培养瓶中的人源性喉癌 Hep-2 细胞制成细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板(每孔细胞数约为 1×10^5 个)中培养 24 h 后,分为对照组、BQ-123 5 个浓度(1、10、20、50、100 μ g/mL)组、5-Fu 5 个浓度(1、10、20、50、100 μ g/mL)组,每组设 3 个复孔,各组分别培养 48 h 后,留取上清液,离心 10 min 后,用 VEGF-C ELISA 试剂盒测定培养上清液中 VEGF-C 蛋白的浓度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件对所有实验数据进行统计学处理,数据用 $\bar{X} \pm s$ 表示。各组的组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 ELISA 检测 BQ-123 抑制人源性喉癌 Hep-2 细胞的生长抑制效应

由表 1 可见当 BQ-123 的浓度处于 20~150 μ g/mL 时对人源性喉癌 Hep-2 细胞的生长抑制,抑制率分别是 25.47%、30.71%、41.59% 及 63.21%,与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$),表明 BQ-123

可明显抑制体外喉癌细胞的生长,而浓度在 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BQ-123 对人源性喉癌 Hep-2 细胞的生长无抑制,抑制率分别只有 10.12%, 21.63% 与对照组相比无统计学差异 ($P > 0.05$).

2.2 MTT 检测 BQ-123 抑制人源性喉癌 Hep-2 细胞的 VEGF-C 的表达

根据检测的吸光度 D490 值,由表 2 可见当 BQ-123 的浓度处于 50~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,VEGF-C 的表达有不同程度的下降,蛋白含量平均值分别为 48 pg/mL , 35 pg/mL 及 26 pg/mL ,与对照组相比结果有统计学差异 ($P < 0.05$),表明 BQ-123 可明显抑制体外喉癌细胞的 VEGF-C 的蛋白表达活性,而浓度在 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,蛋白含量平均值分别为 102 pg/mL , 73 pg/mL ,与对照组相比无统计学差异 ($P > 0.05$),BQ-123 对人源性喉癌 Hep-2 细胞的 VEGF-C 的表达无明显抑制.

3 讨论

肿瘤的演进过程是多因素、多基因互作作用及调节的复杂过程,任何单一因素的改变都不能引起肿瘤的发生、发展.肿瘤的生长不仅依靠新生血管,还依赖于淋巴管的生成^[9].在这一过程中,主要调节淋巴管生成的因子有 VEGF-C,其基因定位于 4q34.有研究者发现,将 VEGF-C 基因导入实验小鼠,观察小鼠皮下可出现大量的新生淋巴管,说明 VEGF-C 与淋巴管的形成有关^[10].目前有研究证实,VEGF-C 能与淋巴管内皮细胞的受体 3 (VEGFR-3) 结合,从而诱导淋巴管内皮细胞的增殖,调控新生细胞、淋巴管生成以及细胞间旁分泌或自分泌的相互关系,进而导致淋巴转移的发生^[11,12].有学者也发现 VEGF-C 通过介导淋巴管生成而促进肿瘤转移^[13].本研究同样发现 VEGF-C 表达与肿瘤细胞的增殖、淋巴结转移密切相关,与其他相关文献的观点一致.

同时有文章指出 VEGF-C 是血管内皮生长因子 (VEGF) 家族的新成员之一,又称为淋巴管生成因子,相对分子质量是 46900.在相关的临床病理研究中发现,VEGF-C 在多种恶性肿瘤中的表达有显著性差异,与肿瘤的临床病理分型、侵袭性和转移相关,直接或者间接的诱使肿瘤的转移发生.而对内皮素 (endothelin, ET) 的进一步研究发现,内皮素是由内皮细胞分泌形成的生物多肽,可以上调 VEGF-C 的表达,与肿瘤的淋巴转移有一定关系,其中研究报道最多的是内皮素 1 及其受体 (ET-1/ETR)^[14].有研究显示,ET-1/ETR 参与肿瘤细胞的分化增殖过程,并与肿瘤的发生、发展相关^[15,16].

实验中在使用浓度在 20.0~150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BQ-123 对人源性喉癌 Hep-2 细胞作用 48h 后,肿瘤细胞增殖出现显著抑制 ($P < 0.05$),而在其他浓度时,肿瘤细胞无明显增殖变化;同样当浓度调节至 50.0~150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,BQ-123 对喉癌 Hep-2 细胞中的 VEGF-C 蛋白分泌量有明显抑制作用 ($P < 0.05$),其他浓度则无明显差异性.有研究显示,ET-1 通过与 ETR 结合,促进肿瘤细胞的分裂、增殖,ET-1 的差异性存在,从而影响缺氧诱导因子-1 α 蛋白,导致 VEGF-C 的上调^[17].这与笔者的实验结论一致.

本实验将内皮素拮抗剂 BQ-123 作用于人喉癌 Hep-2 肿瘤细胞,目的为探讨 BQ-123 在肿瘤淋巴

表 1 BQ-123 对喉癌 Hep-2 细胞的生长抑制效应 ($n=5, \bar{x} \pm S$)
Tab.1 The inhibition effect of BQ-123 on laryngeal cancer cells

组别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	吸收率	生长抑制率/%
BQ-123 组	1.0	0.48	10.12
	10.0	0.42	21.63
	20.0	0.34*	25.47
	50.0	0.27*	30.71
	100.0	0.21*	41.59
	150.0	0.16*	63.21
对照组		0.51	-

与对照组相比, * $P < 0.05$

表 2 不同浓度 BQ-123 作用 48h 后,喉癌 Hep-2 细胞 VEGF-C 蛋白含量测定结果

Tab.2 The expression of VEGF-C in laryngeal cancer cells with different concentrations of BQ-123 after 48 h

组别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	VEGF-C/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照组	-	104 \pm 35
BQ-123	1.0	103 \pm 41
	10.0	72 \pm 29
	20.0	63 \pm 21
	50.0	46 \pm 15*
	100.0	32 \pm 12*
	150.0	23 \pm 9*

与对照组相比, * $P < 0.05$

管生成中的作用机制,观察人喉癌 Hep-2 细胞中 VEGF-C 的表达程度,为进一步研究喉癌淋巴道转移机制和以抗淋巴管生成成为靶点基因治疗提供实验依据,但二者之间具体的相互作用机制还待进一步深入探讨.

4 结论

BQ-123 对喉癌 Hep-2 细胞中的 VEGF-C 蛋白有一定的抑制作用.

参考文献:

- [1] Li H, Yang S, Zhang Y et al. Thoracic recurrent laryngeal lymph node metastases predict cervical node metastases and benefit from three-field dissection in selected patients with thoracic esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2012, 105(6): 548-552.
- [2] Fu ZJ, Ma ZY, Wang QR, et al. Overexpression of CyclinD1 and underexpression of p16 correlate with lymph node metastases in laryngeal squamous cell carcinoma in Chinese patients[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(8): 887-892.
- [3] Timoshenko AV, Rastogi S, Lala PK. Migration-promoting role of VEGF-C and VEGF-C binding receptors in human breast cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(8): 1090-1098.
- [4] Wang CA, Jedlicka P, Patrick AN et al. SIX1 induces lymphangiogenesis and metastasis via upregulation of VEGF-C in mouse models of breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(5): 1895-1906.
- [5] Su JL, Yen CJ, Chen PS, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(4): 541-545.
- [6] Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, et al. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61(1): 103-108.
- [7] Aydin S, Signorelli S, Lechleitner T, et al. Influence of microvascular endothelial cells on transcriptional regulation of proximal tubular epithelial cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(2): C543-554.
- [8] Spinella F, Garrafa E, Di Castro V, et al. Endothelin-1 stimulates lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels to grow and invade[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6): 2669-2676.
- [9] Dobrzycka B, Terlikowski S J, Kowalczyk O, et al. Serum levels of VEGF and VEGF-C in patients with endometrial cancer[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011, 22(1): 45-51.
- [10] Shayan R, Inder R, Karnezis T, et al. Tumor location and nature of lymphatic vessels are key determinants of cancer metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(3): 345-356.
- [11] Woollard DJ, Opeskin K, Coso S, et al. Differential expression of VEGF ligands and receptors in prostate cancer[J]. *Prostate*, 2013, 73(6): 563-572.
- [12] Ramani P, Nash R, Radevsky L, et al. VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 expression in peripheral neuroblastic tumours[J]. *Histopathology*, 2012, 61(6): 1006-1016.
- [13] Ozasa R, Ohno J, Iwahashi T, et al. Tumor-induced lymphangiogenesis in cervical lymph nodes in oral melanoma-bearing mice[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(6): 83.
- [14] Knowles JP, Shi-Wen X, Haque SU, et al. Endothelin-1 stimulates colon cancer adjacent fibroblasts[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(6): 1264-1272.
- [15] 林雁, 张京晶, 刘世喜, 等. 内皮素 A 受体拮抗剂在人喉癌种植瘤的实验研究[J]. *华西医学*, 2009, 24(10): 2674-2676.
- [16] 林雁, 张京晶, 刘世喜, 等. 内皮素-1 与基质金属蛋白酶-9 在喉癌中的表达与临床病理特征的相关性研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2012, 26(6): 245-251.
- [17] Li M, Liu Y, Jin F, et al. Endothelin-1 induces hypoxia inducible factor 1alpha expression in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(21): 3888-3893.