

奥曲肽体外对黑色素瘤细胞株 A375 分泌 VEGF 的影响

刘桂琴, 应方微

基金项目: 中国深圳市科技计划资助项目 (No. 200702088)
作者单位: (518040) 中国广东省深圳市, 暨南大学第二临床医学院深圳市眼科医院
作者简介: 刘桂琴, 主任医师, 眼科学博士, 中国康复医学会重建外科专业委员会颅颌面外科学组委员, 深圳市劳动能力鉴定专家库成员, 曾获得广东省中医药局科研课题立项资助 1 项, 深圳市科技局科技计划项目资助 2 项, 研究方向: 眼眶病、眼肿瘤、眼整形。
通讯作者: 应方微, 女, 主治医师, 眼科学硕士, 研究方向: 眼科病理及基础研究. yingfangwei@ yahoo. com. cn
收稿日期: 2009-10-16 **修回日期:** 2010-01-11

Research of the effect of octreotide on cultured A375 melanoma cell lines

Gui-Qin Liu, Fang-Wei Ying

Foundation item: Shenzhen Science and Technology Plan Project, China (No. 200702088)

Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Correspondence to: Fang-Wei Ying. Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. yingfangwei@ yahoo. com. cn

Received: 2009-10-16 Accepted: 2010-01-11

Abstract

• **AIM:** To understand effects of octreotide on vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in cultured A375 melanoma cells.

• **METHODS:** A375 cells *in vitro* amplified were co-cultured with octreotide of concentration 5, 1 and 0.2 mg/L for 24, 48 and 72 hours. Whether octreotide affected the proliferation of A375 melanoma cells was tested by MTT methods. The octreotide effects on VEGF secretion in A375 cells were tested according to the ELISA method, and octreotide effects on cultured A375 melanoma cell line proliferation and VEGF secretion were statistically analyzed.

• **RESULTS:** Twenty-four hours after coculture, octreotide improved the A375 cell proliferation ($F = 14.180, P = 0.00$). The concentration and time of octreotide coculture with A375 cells *in vitro* affected the VEGF secretion significantly (content factor: $F = 24.441, P = 0.00$; time factor: $F = 127.233, P = 0.00$). Octreotide of the three concentrations improved VEGF secretion in A375 cells in 24 hours. The higher concentration, the less in crease of VEGF level (One-way analysis of variance: $F = 19.489, P = 0.00$), and octreotide decreased VEGF secretion in A375 cells in 72-hour, the inhibiting power accorded with the concentration (One-way analysis of variance: $F = 16.116, P = 0.002$).

• **CONCLUSION:** Octreotide inhibition on VEGF secretion in A375 melanoma cells is a long-term trend and in a dose-dependent manner.

• **KEYWORDS:** octreotide; melanoma; vascular endothelial growth factor; inhibition

Liu GQ, Ying FW. Research of the effect of octreotide on cultured A375 melanoma cell lines. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(2):231-232

摘要

目的: 了解奥曲肽对体外培养黑色素瘤细胞株 A375 的影响。

方法: 体外培养扩增 A375 细胞, 分别与浓度为 5, 1, 0.2, 0 mg/L 的奥曲肽共培养 24, 48, 72h, 利用 MTT 法测定各组奥曲肽对 A375 细胞增殖作用的影响, 通过 ELISA 法测定奥曲肽对 A375 细胞分泌 VEGF 作用的影响。

结果: 共培养 24h 后, 奥曲肽对 A375 细胞增殖有显著促进作用 ($F = 14.180, P = 0.00$), 48h 及 72h 增殖作用不明显; 奥曲肽浓度及作用时间对体外培养的 A375 细胞分泌的 VEGF 含量有显著性影响 (浓度因素: $F = 24.441, P = 0.00$; 时间因素: $F = 127.233, P = 0.00$), 各浓度的奥曲肽与 A375 细胞共培养后 24h 均呈现明显的增加细胞分泌 VEGF 的作用, 浓度越高增加的越少 (单向方差分析 $F = 19.489, P = 0.00$); 随着作用时间的延长, 细胞分泌 VEGF 减少, 72h 各浓度的奥曲肽均明显抑制 A375 细胞分泌 VEGF, 浓度越高抑制作用越明显 (单向方差分析 $F = 16.116, P = 0.002$)。

结论: 奥曲肽对黑色素瘤细胞 A375 分泌 VEGF 长期的趋势上是抑制作用, 与时间和剂量呈依赖关系。

关键词: 生长抑素; 黑色素瘤; 血管内皮生长因子; 抑制作用

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.02.009

刘桂琴, 应方微. 奥曲肽体外对黑色素瘤细胞株 A375 分泌 VEGF 的影响. 国际眼科杂志 2010;10(2):231-232

0 引言

黑色素瘤组织中有大量的肿瘤血管, 对肿瘤的生长有重要的作用, 生长抑素对神经内分泌肿瘤等肿瘤血管具有一定的生成抑制作用, 研究初步阐述生长抑素奥曲肽对体外培养的黑色素瘤细胞株 A375 分泌血管内皮生长因子 (VEGF) 作用的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 A375 细胞株 (中科院上海生物研究所提供利用含 150 mL/L 胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养并扩增), DMEM 培养基 (GIBCO), 胎牛血清 (杭州四季青), 奥曲肽 (山东中天), 酶标仪 (THAM)。

1.2 方法

1.2.1 奥曲肽对 A375 细胞增殖作用的测定 取处于对数

表1 奥曲肽对 A375 细胞增殖作用 ($\bar{x} \pm s$)

		5mg/L	1mg/L	0.2mg/L	0mg/L
细胞增殖	24h	1.66 ± 0.26	1.17 ± 0.09	1.21 ± 0.16	1.02 ± 0.09
	48h	1.19 ± 0.26	1.04 ± 0.21	1.12 ± 0.31	1.20 ± 0.39
	72h	1.22 ± 0.23	1.33 ± 0.10	1.31 ± 0.14	1.26 ± 0.12
上清 VEGF 浓度	24h	84.6 ± 2.0	95.1 ± 8.5	99.0 ± 5.1	64.0 ± 2.6
	48h	68.3 ± 1.5	91.0 ± 8.0	78.0 ± 5.2	68.0 ± 3.0
	72h	53.3 ± 0.5	56.0 ± 1.7	57.3 ± 2.0	66.0 ± 1.7

生长期的 A375 细胞,800r/min 离心 5min,弃上清,加入 DMEM 完全培养液,调整细胞密度至 $10^9/L$,各取 200 μL 细胞悬液加入到 96 孔培养板,按照分组在各孔中加入奥曲肽,浓度分别为 0(对照组),5,1,0.2mg/L,每组 5 个复孔。将培养板置于 37 $^{\circ}C$,50mL/L CO₂ 培养箱培养 24,48,72h 后每孔加入 5g/L MTT 液 20 μL ,继续培养 4h 后,吸除培养液,加入二甲基亚砜 200 μL ,充分混匀,在酶标仪上测定每孔的吸光度 A 值,波长为 492nm。

1.2.2 奥曲肽对 A375 细胞分泌 VEGF 作用的测定 制备检测样品: $10^9/L$ A375 细胞悬液各取 200 μL 加入 96 孔培养板,分别加入奥曲肽浓度分别为 0(对照组),5,1,0.2mg/L,每组 5 个复孔,置于 37 $^{\circ}C$,50mL/L CO₂ 培养箱培养 24h 后,吸出培养液上清。在酶标板上分别设定空白孔,含 1000~15.6ng/L VEGF 的倍比稀释共 7 个标准样品孔,及培养 24h 后的对照组样品孔,3 组不同奥曲浓度的样品孔,各加入相应的样品溶液 100 μL ,37 $^{\circ}C$ 反应 120min 后,弃去液体并在每孔加入检测溶液 A 100 μL ,37 $^{\circ}C$ 反应 60min,之后洗板 3 次,每次 2min,甩干后每孔加入 100 μL 检测溶液 B,37 $^{\circ}C$ 反应 60min,再次洗板 5 次,每次 2min,甩干后依序每孔加入底物溶液 90 μL ,37 $^{\circ}C$ 避光反应 20min 后加入终止溶液 50 μL 终止反应,用酶标仪在 450nm 测量 A 值。按照倍比稀释的 7 个标准品的 VEGF 浓度为横坐标,A 值为纵坐标绘出标准曲线,并用直线回归方程式,根据前样品的 A 值计算出样品的 VEGF 浓度。

统计学分析:利用 SPSS 13.0 系统处理数据。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 奥曲肽对 A375 的作用 体外共培养 24h 后,奥曲肽对 A375 细胞增殖有显著促进作用 ($F = 14.180, P = 0.00$),其中 5mg/L 奥曲肽最为明显,与其他浓度相比均有显著性差异 ($P < 0.05$);而培养 48h 及 72h 则不明显。

2.2 奥曲肽对 A375 细胞分泌 VEGF 的作用 标准品的浓度与相应的 OD₄₅₀ 呈线性正相关 ($r = 0.991, P < 0.01$),有统计学意义。经过线性回归,拟合回归方程为:浓度 = $0.08018 + 6.325 \times 10^{-4} OD_{450}$;残差标准差为 0.014 ($t = 5.779, P = 0.01$);回归系数标准差为 0.000 ($t = 18.610, P < 0.01$),均有统计学意义。奥曲肽与 A375 细胞体外共培养 24,48 及 72h 后培养上清样品测量的 450nm 的 A 值的均数通过回归方程计算出对应的各样品的 VEGF 平均含量如表 1。奥曲肽浓度及作用时间对体外培养的 A375 细胞分泌的 VEGF 含量有显著性影响(浓度因素: $F = 24.441, P = 0.00$;时间因素: $F = 127.233, P = 0.00$)。无奥曲肽的对照组 A375 细胞分泌的 VEGF 含量在 24~72h 期间较平稳,无显著性差异;而不同浓度的奥曲肽与 A375 细胞共培养后 24h 均呈现明显的增加细胞分泌 VEGF 的作用,但不同浓度的奥曲肽的影响有差异性(单向方差分

析 $F = 19.489, P = 0.00$);随着作用时间的延长,细胞分泌 VEGF 逐渐减少,并在 72h 显示出各浓度的奥曲肽均明显抑制 A375 细胞分泌 VEGF,不同浓度的奥曲肽的抑制作用有显著差异性(单向方差分析 $F = 16.116, P = 0.002$)。

3 讨论

黑色素瘤是眼科常见的恶性肿瘤,瘤的组织中有大量大小不等的新生血管存在,供养着肿瘤细胞的生长。目前的治疗方法主要为手术摘除眼球,结合放疗,以及其他包括光凝、冷冻、光化学疗法等辅助方法,还有近年来迅速发展起来的肿瘤生物疗法等。肿瘤自身血管系统形成是实体瘤生长和转移过程中至关重要的步骤。肿瘤血管生成是肿瘤细胞、血管内皮细胞与其微环境相互影响的结果,每一步都涉及到血管生成因子与血管生成抑制因子之间的调节失衡^[1]。肿瘤细胞自身分泌促进血管生成的因子可诱导肿瘤血管生成,而一些内源性血管生成抑制因子可通过抑制肿瘤血管生成促使肿瘤处于休眠状态。抗肿瘤血管生成已成为当前肿瘤研究领域中新热点,受到广泛的关注。近年来研究发现生长抑素及其类似物对肿瘤血管生成具有抑制作用^[2],但生长抑素对黑色素瘤的作用研究目前尚未见报道。研究生长抑素奥曲肽与黑色素瘤细胞 A375 共培养对细胞的增殖及 VEGF 的分泌作用的影响,结果发现在培养 24h 后 A375 瘤细胞的明显增殖,药物对细胞分泌 VEGF 有促进作用,之后 VEGF 的分泌则逐渐降低,而促细胞增殖作用消失,在培养 72h 后奥曲肽对 A375 分泌完全呈现抑制作用,药物浓度越高,抑制作用越明显,呈现抑制细胞分泌 VEGF 的时间和剂量依赖作用。在奥曲肽对培养 A375 瘤细胞在 24h 有明显增殖作用,较高浓度的奥曲肽促增殖作用更明显,同时对细胞分泌 VEGF 有促进作用,较高浓度药物促进作用反而较小,可见奥曲肽对 A375 细胞的促增殖作用是短暂的,而较高浓度奥曲肽引起的较多数量的 A375 细胞的 VEGF 分泌并为同等增加,单位细胞分泌 VEGF 的数量反而是较少的。奥曲肽对黑色素瘤细胞 A375 分泌 VEGF 长期的趋势上是抑制作用,与时间和剂量呈依赖关系。黑色素瘤组织中肿瘤血管的生成是受多种因素影响的复杂过程,目前只对生长抑素奥曲肽的体外抑制分泌 VEGF 进行了初步的研究,今后应该逐步研究活体中生长抑素对黑色素瘤血管生成的作用,将其与传统的手术、放疗和化疗联合应用,可能会产生良好的治疗效果,将为黑色素瘤的治疗提供可喜的前景。

参考文献

- 邱达泰,黄芝,欧阳高亮,等. 肿瘤血管生成促进因子和抑制因子. 中国药物与临床 2005;5(7):485-488
- 英卫东,许戈良. 生长抑素抑制肿瘤血管生成的研究进展. 国外医学外科学分册 2003;30(6):334-336