

The Expression and Clinical Significance of VEGF and bFGF in Endometrial Carcinoma

Na Zhang, Yang Fan*, Man Li, Liyun Ma, Hongxia Na, Xueqi Liu, Liqin Wang, Xiangming Gao

Department of Obstetrics and Gynecology, The People's Hospital of Ningxia, Yinchuan Ningxia
Email: yangf0803@126.com

Received: Nov. 10th, 2016; accepted: Nov. 24th, 2016; published: Nov. 29th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The aim of this article is to explore the expression and clinical significance of VEGF and bFGF in endometrial carcinoma. PCR technique was used to detect the variation of expression of VEGF and bFGF in estradiol, insulin and both adding group between Ishikawa cells. Estradiol, insulin, estradiol insulin have different degrees of promoting the expression of VEGF and bFGF at the same concentration of E2, Insulin, E2 + Insulin on Ishikawa cells; the expression of VEGF and bFGF in E2 + Insulin cell group in the same time point shows no significant increase than E2, Insulin cell group. The difference was not statistically significant ($p > 0.05$). VEGF and bFGF are important angiogenesis factors in endometrial carcinoma. Estrogen and insulin induced Ishikawa cells produce VEGF and bFGF and promote the occurrence and development of endometrial carcinoma.

Keywords

Endometrial Cancer, Estradiol, Insulin, Ishikawa Cells, Vascular Endothelial Growth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor

雌激素、胰岛素诱导子宫内膜癌细胞中VEGF和bFGF的表达及临床意义

张娜, 樊杨*, 李熳, 马丽芸, 纳红霞, 柳学琴, 王丽琴, 高向明

宁夏人民医院, 宁夏 银川

*通讯作者。

文章引用: 张娜, 樊杨, 李熳, 马丽芸, 纳红霞, 柳学琴, 王丽琴, 高向明. 雌激素、胰岛素诱导子宫内膜癌细胞中 VEGF 和 bFGF 的表达及临床意义[J]. 世界肿瘤研究, 2016, 6(3): 21-26. <http://dx.doi.org/10.12677/wjcr.2016.63004>

Email: yangf0803@126.com

收稿日期: 2016年11月10日; 录用日期: 2016年11月24日; 发布日期: 2016年11月29日

摘要

初步探讨雌二醇、胰岛素诱导子宫内膜癌细胞系Ishikawa细胞中血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的产生及临床意义。采用荧光定量PCR技术分别检测雌二醇、胰岛素、雌二醇 + 胰岛素作用后Ishikawa细胞中VEGF、bFGF基因表达的情况。结果显示相同浓度雌二醇(1×10^{-8} mol/L), 胰岛素(1×10^{-8} mol/L), 雌二醇 + 胰岛素(1×10^{-8} mol/L雌二醇 + 1×10^{-8} mol/L胰岛素)对Ishikawa细胞中VEGF、bFGF均有不同程度促进表达作用; VEGF、bFGF基因在雌二醇+胰岛素组中表达与雌二醇、胰岛素组比较无明显增高, 差异没有统计学意义($p > 0.05$)。因此, 雌激素、胰岛素诱导子宫内膜癌细胞系Ishikawa细胞产生VEGF、bFGF, 促进了子宫内膜癌发生、发展。

关键词

子宫内膜癌, 雌二醇, 胰岛素, Ishikawa细胞系, 血管内皮生长因子, 碱性成纤维细胞生长因子

1. 引言

子宫内膜癌(endometrialcarcinoma EC)是发生于子宫内膜的一组上皮性恶性肿瘤, 其发病机制至今不清。目前普遍认为子宫内膜癌的发生与子宫内膜长期受雌激素作用而缺乏孕激素拮抗有关[1]。肥胖、高血压、糖尿病、多囊卵巢综合征作为子宫内膜癌发生的相关危险因素越来越受到重视, 这些因素共同病理生理特征是胰岛素抵抗和继发的高胰岛素血症[2]。有研究发现血管内皮生长因子(VEGF), 能够明显促进新生血管形成, 在子宫内膜癌发生发展中发挥重要作用[3]。bFGF与调控体内血管新生过程, 其主要生物学效应是促进细胞增殖, 增加血管的血液供应, 从而提供大量营养物质促使肿瘤细胞快速增长[4]。bFGF与子宫内膜癌的发生有密切的关系[5]。我们旨在通过对子宫内膜癌细胞ER表达阳性Ishikawa细胞株中VEGF和bFGF的表达与雌激素、胰岛素的关系进行初步探讨, 分析子宫内膜癌发生发展可能的分子机制。

2. 材料与方法

2.1. 材料来源

子宫内膜癌细胞系Ishikawa, 来自于子宫内膜高分化腺癌, 其雌激素受体(ER)表达阳性, 购自于南京凯基生物技术公司。 β 雌二醇及胰岛素(牛来源)购自北京博奥拓达科技有限公司; 胎牛血清、McCoy's5A培养液、RPMI 1640培养液、胰蛋白酶消化液均购自于美国gibco公司; 酶标仪E1808(BiTek)、流式细胞仪accuri C6(BD)、二氧化碳培养箱HF90(Heal force)、荧光定量PCR仪(Roche 480); 荧光定量引物由Primer 3在线设计: VEGFA-F AAGAGCGACCCTCACATCAA, VEGFA-R AAAGAAACACTCATCCGTAACAC, 全长147 bp; bFGF-F GCTGTACTGCAAAAACGGGG, bFGF-R TAGCTTGATGTGAGGGTTCGC 全长94 bp, 引物由上海生工合成。

2.2. 方法

2.2.1. Ishikawa 增殖实验

1) 96孔板铺板: 将稳定传代的Ishikawa细胞消化离心, 计数, 每孔加入细胞100 ul/孔(约 1×10^4)。

其中 96 孔边缘孔空出来, 设置空白对照组 1 个(不加细胞不给药), 阴性对照组 1 个(有细胞不给药), 实验组各三个孔。放置二氧化碳培养箱培养 24 小时。

2) 细胞培养: 吸去上清, 3 个实验孔加入 200 ul 含有 β 雌二醇的培养液, 3 个实验孔加入 200 ul 含有胰岛素的培养液, 3 个实验孔加入 200 ul 含有 β 雌二醇和胰岛素的培养液, 阴性对照孔不加。其中配制的雌二醇浓度最终为 10^{-8} mmol/l, 胰岛素最终浓度 10^{-8} mmol/l。

3) 四甲基偶氮唑蓝(MTT): 在 24 h、48 h、72 h、96 h 分别终止反应, 吸去上清, 每孔加入 $1 \times \text{MTT}20$ ul, 80 ul 的无血清培养液。37°C 培养 4 小时。4 小时后吸出上清每孔加入 150 ul DMSO 摇动混匀 10 min, 酶标仪上 490 nm 波长下测定各吸光度值。

4) 荧光定量 PCR 技术分别检测雌二醇、胰岛素、雌二醇 + 胰岛素作用后 Ishikawa 细胞中 VEGF、bFGF 基因的表达: TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 利用 RT 试剂盒逆转录合成 cDNA。VEGF 基因引物序列, 上游: 5'-AAGAGCGACCCTCACATCAA-3', 下游: 5'-AAAGAAACTCATCCGTAACAC-3', 扩增产物片段 147bp; bFGF 基因引物序列, 上游: 5'-GCTGTACTGCAAAAACGGGG-3', 下游: 5'-TAGCTTGATGTGAGGGTCGC-3', 扩增产物片段长度 94 bp, PCR 反应体系共 20 ul, 包括 DNA 荧光燃料 SYBR Green 10 ul, PCR Forward Primer (10 μM) 0.8 μl , PCR Reverse Primer (10 μM) 0.8 μl , DNA 模板(<100 ng) 2 μl , 加水至 20 μl 。PCR 反应条件: 预变性 95°C 30 sec 1 cycle PCR 95°C 5 sec, 60°C 30 sec 45 cycles 融解 95°C 5 sec, 60°C 1 sec, 95°C 1 cycle 降温 50°C 30 sec 1 cycle。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 mRNA 的表达水平。

2.2.2. 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm S$)表示, 多样本间的两两比较, 采用单因素方差分析。

3. 结果

3.1. VEGF、bFGF 在雌二醇, 胰岛素, 雌二醇 + 胰岛素中的表达情况

荧光定量 PCR 技术检测显示: 雌二醇组细胞中 VEGF 基因表达自 24 h 至 72 h 远高于对照组, 24 小时表达差异极显著($p < 0.0001$), 48 h 和 72 h 表达差异极显著($p < 0.01$), 96 h 与对照组相比较, 该基因表达呈下降趋势; 胰岛素组细胞中 VEGF 基因表达呈持续升高趋势, 与对照组比较, 24 h、48 h 升高趋势并不明显, 但从 72 h 开始, 与对照组比较, 72 h、96 h 表达升高趋势显著($p < 0.05$), 见表 1; 雌二醇组细胞中 bFGF 基因在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 表达均呈递增趋势, 24 h、48 h 表达略低于对照组, 72 h、96 h 高于对照组, 其中 72 h 该基因表达与对照组比较差异显著($p < 0.05$), 96 h 该基因表达与对照组比较差异极显著($p < 0.01$); 胰岛素组细胞中 24 h bFGF 表达相对于对照组, 呈短暂抑制后升高, 48 h 与对照组比较差异显著($p < 0.05$), 然后 72 h、96 h 呈下降趋势, 但均高于各时间点对照组的表达水平; 雌二醇 + 胰岛素组细胞中 bFGF 在 48 h、72 h、96 h 表达水平均高于对照组, 且 72 h 表达水平最高, 差异有统计学意义($p < 0.05$)。本研究显示结果显示: 雌二醇, 胰岛素, 雌二醇+胰岛素均不同程度的诱导 Ishikawa 细胞中 bFGF mRNA 的表达, 且在 72 小时表达最显著, 见表 2。

3.2. VEGF、bFGF 基因在雌二醇 + 胰岛素组中表达与雌二醇、胰岛素组的比较

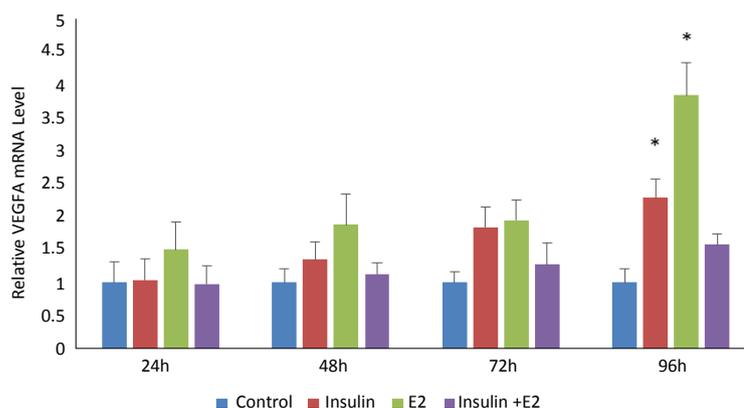
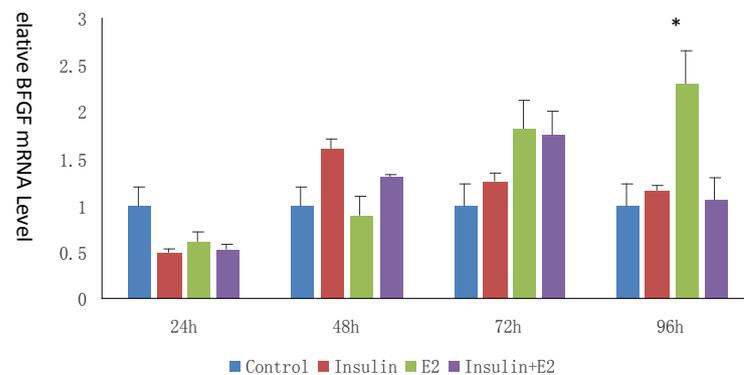
该研究结果显示: 雌二醇 + 胰岛素组细胞中 VEGF 的表达与相同时间点雌二醇、胰岛素组中 VEGF 的表达比较无明显增高, 差异没有统计学意义($p > 0.05$); 雌二醇+胰岛素组细胞中 bFGF 的表达与相同时间点雌二醇、胰岛素组中 bFGF 的表达比较无明显增高, 差异没有统计学意义($p > 0.05$), 见图 1, 图 2。

Table 1. The comparison of VEGFmRNA expression level in every group Ishikawa cells ($\bar{x} \pm S$)**表 1.** 各组 Ishikawa 细胞中 VEGFmRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm S$)

组别	样本数	24	48	72	96
E2 组	3	8.51 ± 0.44**	2.50 ± 0.05**	2.38 ± 0.48**	0.68 ± 0.21
Insulin 组	3	1.66 ± 0.38*	2.64 ± 0.26**	0.90 ± 0.33	0.55 ± 0.29
E2 + Insulin 组	3	3.23 ± 0.50**	1.21 ± 0.28*	1.11 ± 0.32*	1.11 ± 0.06
Control 组	3	1.00 ± 0.48	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.14

注: *与对照组比较 $p < 0.05$ 。**Table 2.** The comparison of bFGFmRNA expression level in every group Ishikawa cells ($\bar{x} \pm S$)**表 2.** 各组 Ishikawa 细胞中 bFGFmRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm S$)

组别	样本数	24	48	72	96
E2 组	3	0.61 ± 0.10	0.90 ± 0.19	1.82 ± 0.30**	2.30 ± 0.36**
Insulin 组	3	0.49 ± 0.04	1.60 ± 0.10**	1.27 ± 0.07**	1.16 ± 0.04*
E2 + Insulin 组	3	0.52 ± 0.05	1.30 ± 0.03*	1.75 ± 0.25**	1.06 ± 0.23*
Control 组	3	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.23

注: *与对照组比较 $p < 0.05$ 。**Figure 1.** The VEGF gene expression in different dealing groups (mean ± SD, n = 3)**图 1.** 不同处理组 VEGF 基因表达情况(mean ± SD, n = 3)**Figure 2.** The bFGF gene expression in different dealing groups (mean ± SD, n = 3)**图 2.** 不同处理组 bFGF 基因表达情况(mean ± SD, n = 3)

4. 讨论

子宫内膜癌是一个多基因参与的渐进性发展疾病，主要是由于抑癌基因与癌基因之间失去平衡，抑癌基因缺失、突变失活导致细胞增殖失去控制并且多个癌基因的编码蛋白过度表达而出现异常激活，从而导致细胞出现恶性转变，具体机制尚不清楚[4] [6]。血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是子宫内膜癌重要的细胞因子，参与调控体内血管新生过程，其主要生物学效应是促进细胞增殖、刺激血管内皮细胞迁移和促进血管生成，增加血管的血液供应，从而提供大量营养物质促使肿瘤细胞快速增长[5]。

目前，肥胖、糖尿病、高血压是公认的子宫内膜癌的三大高危因素，肥胖是首要危险因素。流行病学研究表明子宫内膜癌的发生与肥胖有关，子宫内膜癌患者中 40%~50%为过度肥胖。体重指数(BMI)是衡量肥胖的指标，成人超重和肥胖的体重指数 WHO 标准为：BMI 正常值为 18.5~24.9, 25~27.9 为超重, >30 为肥胖。肥胖，糖尿病，高血压的共同的病理生理基础为胰岛素抵抗及高胰岛素血症。国际多项研究证实子宫内膜癌的发病风险直接与 C 肽和胰岛素水平呈正相关。胰岛素和胰岛素抵抗在肿瘤的形成和恶性转化阶段起重要作用。胰岛素可促进性激素的合成，同时可降低性激素结合球蛋白的水平，从而使雌激素和其他促肿瘤因子的水平增高，促进肿瘤生长。同时，胰岛素可激活胰岛素受体的酪氨酸激酶生长受体通路，进一步引起下游的信号通路的激活，促进肿瘤细胞的增殖。

肿瘤细胞增殖及血管形成是在多种生长因子调控下完成的，肿瘤的血管生成主要由肿瘤细胞产生的某些血管生长因子诱导，VEGF 和 bFGF 是目前人们关注较多的促血管生长因子。VEGF 又名血管通透因子，是一种内皮细胞有丝分裂原，同时能诱导血管通透性增加，导致血浆蛋白外渗到血管外间隙，形成富于纤维的基质，诱导内皮细胞等的增生，最后形成高度血管化的间质。雌激素可通过非基因转录效应诱导子宫内膜癌细胞产生 VEGF、bFGF，促进子宫内膜癌发生发展，而胰岛素与 VEGF、bFGF 表达关系相关研究较少。本研究结果显示：雌二醇，胰岛素，雌二醇+胰岛素对 Ishikawa 细胞中 VEGF、bFGF 均有不同程度促进表达作用。雌二醇组细胞中 VEGF 在 24 小时表达差异极显著($p < 0.0001$)，48 h 和 72 h 表达差异极显著($p < 0.01$)；胰岛素组细胞中 VEGF 基因表达呈持续升高趋势，与对照组比较 72 h、96 h 表达升高趋势显著($p < 0.05$)；雌二醇组细胞中 bFGF 基因在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 表达均呈递增趋势，其中 72 h 该基因表达与对照组比较差异显著($p < 0.05$)，96 h 该基因表达与对照组比较差异极显著($p < 0.01$)；胰岛素组细胞中 24 h bFGF 表达相对于对照组，呈短暂抑制后升高，48 h 与对照组比较差异显著($p < 0.05$)，然后 72 h、96 h 呈下降趋势，但均高于各时间点对照组的表达水平；雌二醇 + 胰岛素组细胞中 bFGF 在 48 h、72 h、96 h 表达水平均高于对照组，且 72 h 表达水平最高，差异有统计学意义($p < 0.05$)。

雌激素、胰岛素诱发子宫内膜癌细胞产生的 VEGF、bFGF，通过调控体内血管新生，刺激血管内皮细胞迁移和促进血管生成，增加血管的血液供应，从而提供大量营养物质促使肿瘤细胞快速增长，促进子宫内膜癌发生、发展。肥胖、高血压、糖尿病、多囊卵巢综合征，作为子宫内膜癌的高危因素，其共同病理生理特征是胰岛素抵抗和继发的高胰岛素血症，由此可以推测这些高危因素促进子宫内膜癌的发生发展与胰岛素促进 VEGF、bFGF 产生有关，VEGF、bFGF 可能为子宫内膜癌高危因素向内膜癌发展过程中的一个重要的分子机制。

综上所述，本研究探讨了子宫内膜癌发生发展可能的分子机制，雌激素、胰岛素通过诱导子宫内膜癌 ER 表达阳性细胞株 VEGF、bFGF 基因表达，促进了子内膜癌的发生、发展，本研究对临床该病的防治提供了相关的基础支持。

基金项目

本项目获得宁夏自然科学基金(NZ14169)资助。

参考文献 (References)

- [1] 娄雪玲, 周梅玲, 张占薪, 等. 孕激素受体、C-erbB-2 和 Ki-67 在子宫内膜癌中的表达及其与临床病理相关性[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2014(30): 557-560.
- [2] 刘丽, 陈育梅, 何雪芹, 等. 子宫内膜癌患者血清胰岛素与子宫内膜雌激素受体相关性研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2013, 23(1): 43-45.
- [3] 卢燕琼, 蒋斯, 张洁清, 等. 雌二醇诱导子宫内膜癌细胞产生的 VEGF 和 bFGF 对 MAPK 通路的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(12): 925-931.
- [4] 许会彬, 张代民, 曹英林. 碱性成纤维细胞生长因子及受体与肿瘤的关系[J]. 临床军医杂志, 2005, 33(1): 98-100.
- [5] Gravdal, K., Halvorsen, O.J., Haukaas, S.A., *et al.* (2006) Expression of bFGF/FGFR-1 and Vascular Proliferation Related to Clinicopathologic Features and Tumor Progress in Localized Prostate Cancer. *Virchows Archiv*, **448**, 68-74. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0075-3>
- [6] 白晓红, 糜若然. VEGF、bFGF 和 ER 在子宫内膜癌的表达[J]. 中华肿瘤杂志, 2001(23): 211-213.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: wjcr@hanspub.org