

PEDF 对肺腺癌 A549 细胞迁移、侵袭能力和转移相关蛋白表达水平的影响

程宇,束军,徐胜,李晓峰

摘要 目的 观察色素上皮衍生因子(PEDF)对肺腺癌 A549 细胞迁移、侵袭能力以及对转移相关蛋白如纤维连接蛋白(FN)和基质金属蛋白酶 9(MMP-9)表达水平的影响。方法 设不加 PEDF 的肺腺癌 A549 细胞为阴性对照组, PEDF 干预组细胞分别加入 180、360 和 720 nmol/L PEDF; Transwell 检测 PEDF 对 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响; 半定量 RT-PCR 法检测 PEDF 对 FN、MMP-9 mRNA 表达水平的影响; ELISA 法检测 PEDF 对 A549 细胞培养上清液中和细胞内的 FN、MMP-9 蛋白表达水平的影响。结果 PEDF 干预组的 A549 细胞迁移细胞数和侵袭细胞数均显著低于阴性对照组($P < 0.05$),随着 PEDF 浓度的增加,迁移和侵袭细胞数逐渐减少($P < 0.05$)。各浓度 PEDF 干预组 A549 细胞的 FN、MMP-9 表达水平较阴性对照组显著降低($P < 0.05$),随着 PEDF 浓度的增加, FN、MMP-9 表达水平逐渐降低($P < 0.05$)。结论 PEDF 在体外能显著抑制肺腺癌 A549 细胞的迁移和侵袭能力,能显著抑制转移相关蛋白(FN、MMP-9)的表达水平。

关键词 色素上皮衍生因子;肺腺癌;转移;迁移;侵袭

中图分类号 R 734.2;R 73-37

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0345-06

2015-12-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:1308085MH141);
安徽医科大学科研基金资助项目(编号:2010xkj115)

作者单位:安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230022

作者简介:程宇,女,硕士研究生;

束军,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: J. Shu

@ 126.com

肺癌在恶性肿瘤发病率及死亡率中居于首位。全世界每年新发肺癌病例数为 180 多万, 占所有恶性肿瘤的 13%; 因肺癌导致的死亡患者近 160 万, 占所有恶性肿瘤死亡的 19.4%^[1]。转移是肺癌患者预后不良的重要因素, 对其转移能力的研究对于肺癌患者的治疗和预后有着非常重要的意义。肿瘤的转移是有多步骤的复杂过程, 其中肿瘤细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)之间的相互作用在介导和调节肿瘤的转移中起重要作用^[2]。纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是细胞外基质的重要组成部分, 参与细胞黏附、迁移、侵袭和肿瘤转移。同时, 基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)介导的 ECM 的降解对肿瘤的生长和转移有重要意义^[3]。色素上皮衍生因子(pigment epithelial-derived factor, PEDF)在体内生理和病理过程中有多种活性, 包括神经营养、抗血管生成、抗肿瘤生成和抗转移等。然而, 关于 PEDF 对肺腺癌转移能力的影响及其机制目前仍不十分清楚。该研究旨在观察不同浓度 PEDF 对肺腺癌 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响, 以及对转移相关蛋白 FN 和 MMP-9 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 人肺腺癌细胞株 A549 由

Joseph disease(MJD) and Parkinson's Disease(PD). **Methods** Here, using the classical model of GAL/UAS system, and the MHC-GAL4 promotor to make the pathogenic protein fragment (SCA3tr-Q78) expressed in Drosophila muscles, thus SCA3/MJD transgenic Drosophila models were constructed. Using the same approach, we constructed the classical PD transgenic Drosophila models—PINK1^{tr} which was dominantly modified PD related gene PINK1 null mutant. **Results** The two disease models exhibited similar abnormal wing posture, the degraded mitochondria in muscle fibers and the decreased ATP levels. In the disease models, the expression of mitochondrial oxidative respiratory chain complex I subunit ND42 mRNA decreased and the expression of NDUFS3 protein reduced which also morked the function of complex I. **Conclusion** The two neurodegenerative diseases SCA3/MJD and PD show the similar abnormal phenotypes and the mitochondrial dysfunction. The similar pathogenesis may raise the theoretical basis for "the same cure for different diseases".

Key words SCA3/ MJD; PD; mitochondria; Drosophila

安徽医科大学基础医学院病原微生物实验室惠赠。人重组 PEDF 蛋白(美国 Peprotech 公司);Matrigel 胶(美国 B&D 公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);逆转录试剂盒(德国 Thermo Scientific 公司);ELISA 试剂盒(上海源叶公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司);RT-PCR 引物(上海 Invitrogen 公司);RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 HyClone 公司);DEPC(美国 Sigma 公司);DL2000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司);CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);PCR 仪(德国 Biometra 公司);酶标仪(美国 Biotek 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);JD-801 凝胶成像分析系统(江苏捷达科技发展有限公司);超低温冰箱(日本 Sanyo 公司)。

1.2 细胞培养 在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基常规培养人肺腺癌 A549 细胞。细胞在培养瓶中贴壁生长,每 2~3 d 传代 1 次。

1.3 PEDF 干预组与阴性对照组肺腺癌 A549 细胞的迁移和侵袭能力

1.3.1 A549 细胞体外迁移实验 取生长状态良好的对数期细胞, PEDF 干预组分别加入 720、360 和 180 nmol/L PEDF, 阴性对照组不加 PEDF, 分别作用于 A549 细胞 24 h。常规消化, 1 000 r/min 离心 5 min 后, 用无血清 RPMI-1640 培养基调整各组 A549 细胞密度为 2×10^5 /ml, 取 100 μ l 细胞悬液轻轻加入 Transwell 小室上室, 下室中加入 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基 600 μ l, 每组 3 个复孔。置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。弃上室内培养基, PBS 洗两遍, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 风干后用 0.1% 结晶紫染色液染色约 30 min, 医用棉棒轻轻擦去小室膜上表面尚未穿过的细胞。在光学显微镜($\times 200$)下观察拍照, 400 倍高倍镜下细胞计数, 随机选取 6 个高倍镜视野/孔计数穿过底膜的细胞数, 即迁移细胞数, 取平均值作为结果。实验重复 3 次。

1.3.2 A549 细胞体外侵袭实验 Matrigel 胶 4 °C 融化后, 用 4 °C 预冷的无血清 1640 培养基按 1:8 比例稀释 Matrigel。在 Transwell 上室底部加入 50 μ l 稀释后的 Matrigel, 铺满小室底, 置 37 °C 培养箱干燥 30 min, 待 Matrigel 胶凝固后, 小心弃去上层析出的液态培养基, 每个小室再加入 50 μ l 无血清 1640 培养基, 置于 37 °C 30 min 水化基底膜。后续

步骤同 Transwell 迁移实验。

1.4 半定量 RT-PCR 法检测肺癌 A549 细胞株中 FN、MMP-9 mRNA

1.4.1 RNA 提取 取生长状态良好的对数期细胞, PEDF 干预组分别加入 720、360 和 180 nmol/L PEDF, 阴性对照组不加 PEDF, 分别作用于 A549 细胞 24 h 后重悬细胞, 加入 TRIzol(1 ml), 吹打后分别吸入 EP 管(无 RNA 酶)中, 加入 0.2 ml 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 冰上静置 3 min, 低温 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液至另一 EP 管中, 加入 0.5 ml 异丙醇温和混匀, 冰上静置 10 min, 低温 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加 1 ml 75% 乙醇(DEPC 处理水配制), 低温 4 °C 7 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 室温放置 10 min 干燥 RNA 沉淀, 加 20 μ l DEPC 水于 55 °C 促溶 RNA, -80 °C 保存。

将样品稀释后, 利用紫外分光光度计测量各组在 260、280 nm 波长的吸光度(absorbance, A), 计算 A_{260}/A_{280} , 要求比值在 1.8~2.0, 表明纯度较高。

1.4.2 使用逆转录试剂盒进行逆转录合成 cDNA

各组分别取总 RNA 2 μ g, 按照逆转录试剂盒说明书进行操作, 最后合成 cDNA 产物总体积为 20 μ l, 放入 -20 °C 保存。

1.4.3 PCR 扩增 以合成的 cDNA 为模板进行扩增。FN 的上游引物为: 5'-TCCAGGAGGAAATTC-CAATG-3', 下游引物为: 5'-CTCTTCATGACCGTTGT-GGA-3', 产物长度 382 bp; MMP-9 的上游引物为: 5'-GGCGCTCATGTACCCTATGT-3', 下游引物为: 5'-TCAAAGACCGAGTCCAGCTT-3', 产物长度 468 bp; GAPDH 的上游引物为: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3', 下游引物为: 5'-GTCCACCACCCT-GTTGCTGTAG-3'。PCR 仪扩增, 程序为 95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 50 s) 35 个循环, 72 °C 10 min, 4 °C 10 min。

1.4.4 琼脂糖凝胶电泳 用 0.8% 琼脂糖凝胶分离 PCR 产物, 每 100 ml 琼脂糖凝胶溶液加 5 μ l 核酸染料。凝胶成像系统观察结果并进行拍照, 分析比较各组 FN、MMP-9 mRNA 的相对表达量。

1.5 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液和细胞内 FN、MMP-9 蛋白含量 取生长状态良好的对数期细胞, PEDF 干预组分别加入 720、360 和 180 nmol/L PEDF, 阴性对照组不加 PEDF, 分别作用于 A549 细

胞 24 h 后收集细胞培养上清液,4 ℃ 3 000 r/min 离心 20 min,小心吸取上清液,分装后于 -80 ℃ 冻存备用;然后将 A549 细胞消化离心(1 000 r/min、5 min),重悬后用细胞计数板计数,取含 106 个细胞的细胞悬液离心,1 ml PBS 重悬后,每管细胞加 100 μl 细胞裂解液,用吸管吹打数下,使细胞和裂解液充分接触,室温裂解 1 h,再用反复冻融方法裂解细胞,随后 4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min,小心吸取上清液,分装后于 -80 ℃ 冻存备用。依据 ELISA 试剂盒说明书操作,对细胞培养上清和细胞内 FN、MMP-9 蛋白含量进行测定。

1.6 统计学处理 实验结果采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数间的比较采用单因素方差分析,并进行 Levene's 方差齐性检验,两两比较采用 SNK-q 检验。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 PEDF 抑制 A549 细胞的迁移 720、360 和 180 nmol/L PEDF 干预组和阴性对照组的迁移细胞个数分别为 (16.44 ± 3.47)、(30.78 ± 2.17)、(42.11 ± 2.36)、(63.67 ± 1.45) 个。与阴性对照组相比,各浓度 PEDF 干预组迁移细胞数均明显减少,且随着 PEDF 浓度的增加,迁移细胞数逐渐减少,各干预组间差异有统计学意义 ($F = 138.831, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 PEDF 抑制 A549 细胞的侵袭 720、360 和 180 nmol/L PED 干预组和阴性对照组的侵袭细胞个数分别为 (11.44 ± 1.58)、(21.67 ± 1.20)、(35.11 ± 2.71)、(44.89 ± 1.07) 个。与阴性对照组相比,各浓度 PEDF 干预组侵袭细胞数均明显减少,且随着 PEDF 浓度的增加,侵袭细胞数逐渐减少,各干预组间差异有统计学意义 ($F = 208.998, P < 0.05$)。见图 2。

2.3 RT-PCR 结果 720、360 和 180 nmol/L PEDF 干预组和阴性对照组 A549 细胞中 FN mRNA 的相对表达量分别是 (0.245 ± 0.016)、(0.378 ± 0.021)、(0.488 ± 0.040) 和 (0.616 ± 0.026) (图 3),MMP-9 mRNA 的相对表达量分别是 (0.378 ± 0.020)、(0.521 ± 0.047)、(0.711 ± 0.016) 和 (0.859 ± 0.021) (图 4)。与阴性对照组相比,各浓度 PEDF 干预组 A549 细胞的 FN、MMP-9 mRNA 表

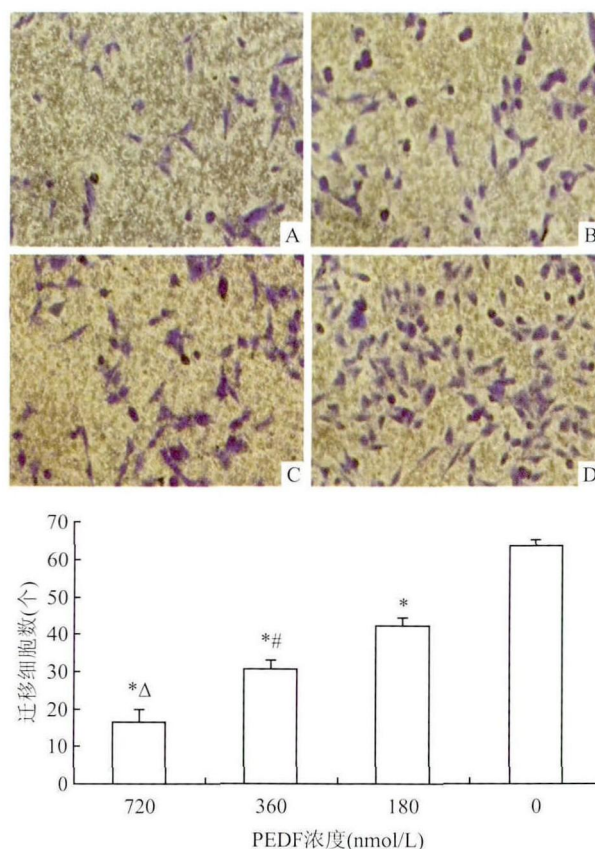


图 1 不同浓度 PEDF 处理的 A549 细胞迁移能力的比较 ×200
A:720 nmol/L PEDF; B:360 nmol/L PEDF; C:180 nmol/L PEDF; D:阴性对照组; 与阴性对照组(0 nmol/L)比较: * $P < 0.05$; 与 180 nmol/L PEDF 干预组比较: # $P < 0.05$; 与 360 nmol/L PEDF 干预组比较: Δ $P < 0.05$

达水平均明显降低。随着 PEDF 干预剂量增加, FN mRNA 表达水平逐渐降低,各干预组间组间差异均有统计学意义 ($F = 100.161, P < 0.05$); MMP-9 mRNA 表达水平也逐渐降低 ($F = 156.162, P < 0.05$)。见图 5、6。

2.4 ELISA 结果 比较不同浓度 PEDF 处理的 A549 细胞培养上清液中和细胞内 FN、MMP-9 蛋白浓度, PEDF 干预组比阴性对照组 A549 细胞上清液中和细胞内的 FN、MMP-9 表达水平均明显降低。随着 PEDF 干预剂量增加,细胞上清液中 FN 的表达水平逐渐降低,不同剂量 PEDF 干预组间比较差异均有统计学意义 ($F = 446.055, P < 0.05$),细胞内 FN 的表达水平依次递减 ($F = 70.117, P < 0.05$),细胞上清液中 MMP-9 的表达水平 ($F = 1 009.000, P < 0.05$) 和细胞内 MMP-9 的表达水平 ($F = 1 719.000, P < 0.05$) 也均逐渐降低。见表 1、2。

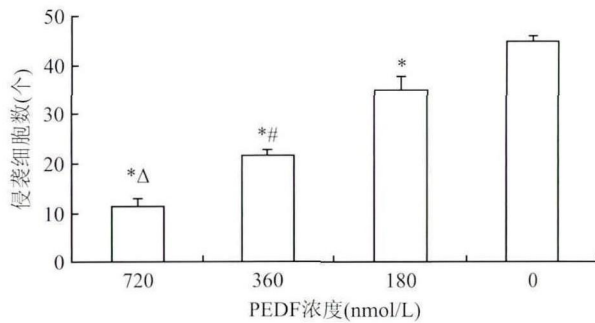
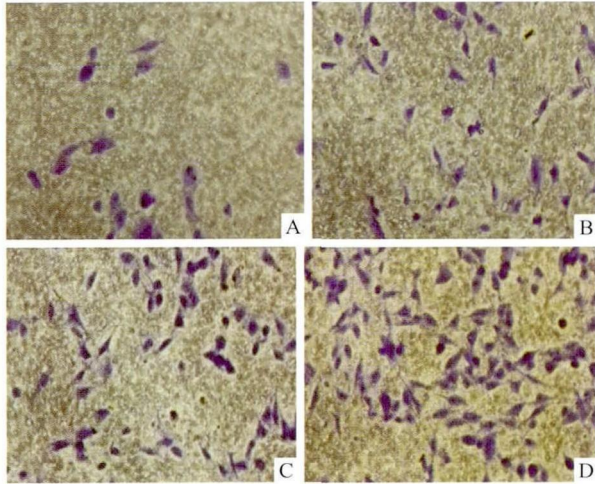


图2 不同浓度 PEDF 处理的 A549 细胞侵袭能力的比较 ×200
A: 720 nmol/L PEDF; B: 360 nmol/L PEDF; C: 180 nmol/L PEDF; D: 阴性对照; 与阴性对照组 (0 nmol/L) 比较: * P < 0.05; 与 180 nmol/L PEDF 干预组比较: # P < 0.05; 与 360 nmol/L PEDF 干预组比较: Δ P < 0.05

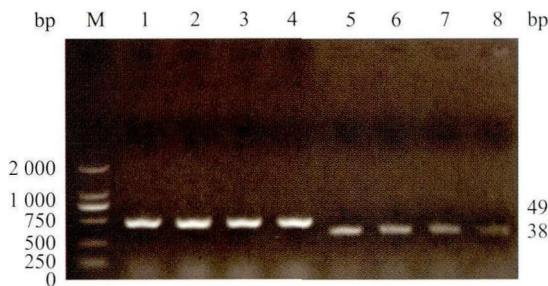


图3 不同浓度 PEDF 处理的 A549 细胞 FN mRNA 表达
M: Marker; 1~4: GAPDH; 5: 阴性对照组; 6: 180 nmol/L PEDF; 7: 360 nmol/L PEDF; 8: 720 nmol/L PEDF

表1 不同浓度 PEDF 处理的 A549 细胞
培养上清液中和细胞内 FN 蛋白浓度 (x ± s, n = 3)

组别	细胞上清液中 FN (ng/ml)	细胞内 FN (ng/ml)
PEDF 干预		
720 nmol/L	86.660 ± 2.250 *Δ	108.700 ± 3.349 *Δ
360 nmol/L	104.789 ± 1.314 *#	124.389 ± 2.760 *#
180 nmol/L	126.778 ± 0.386 *	133.822 ± 4.047 *
阴性对照	146.944 ± 3.396	143.933 ± 1.633

与阴性对照组 (0 nmol/L) 比较: * P < 0.05; 与 180 nmol/L PEDF 干预组比较: # P < 0.05; 与 360 nmol/L PEDF 干预组比较: Δ P < 0.05

表2 不同浓度 PEDF 处理的 A549 细胞
培养上清液中和细胞内 MMP-9 蛋白浓度 (x ± s, n = 3)

组别	细胞上清液中 MMP-9 (ng/ml)	细胞内 MMP-9 (ng/ml)
PEDF 干预		
720 nmol/L	316.311 ± 1.831 *Δ	311.567 ± 4.206 *Δ
360 nmol/L	357.989 ± 3.236 *#	362.333 ± 2.883 *#
180 nmol/L	373.300 ± 2.250 *	391.278 ± 1.680 *
阴性对照	416.956 ± 1.289	473.044 ± 1.745

与阴性对照组 (0 nmol/L) 比较: * P < 0.05; 与 180 nmol/L PEDF 干预组比较: # P < 0.05; 与 360 nmol/L PEDF 干预组比较: Δ P < 0.05

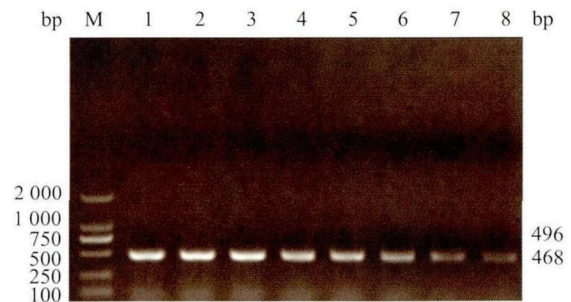


图4 不同浓度 PEDF 处理的 A549 细胞 MMP-9 mRNA 表达
M: Marker; 1~4: GAPDH; 5: 阴性对照组; 6: 180 nmol/L PEDF; 7: 360 nmol/L PEDF; 8: 720 nmol/L PEDF

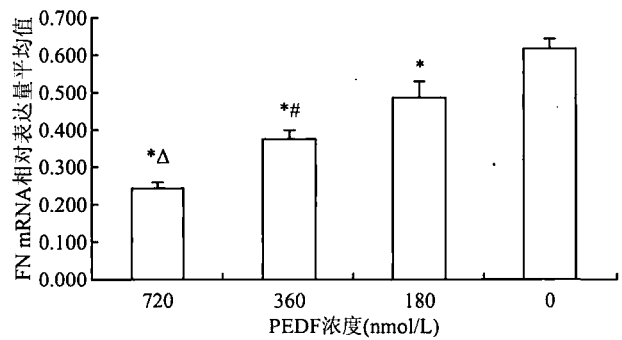


图5 不同浓度 PEDF 处理的 A549 FN mRNA
相对表达量平均值比较

与阴性对照组 (0 nmol/L) 比较: * P < 0.05; 与 180 nmol/L PEDF 干预组比较: # P < 0.05; 与 360 nmol/L PEDF 干预组比较: Δ P < 0.05

3 讨论

PEDF 广泛表达于人体组织,包括脑、眼、脊髓、肝、血浆、骨、心脏和肺。PEDF 是 Tombran-Tink et al^[4]首次在人视网膜色素上皮细胞培养液中发现并提取到的多功能糖蛋白,最初被鉴定为人视网膜色素上皮细胞产生的神经元分化因子。

Chen et al^[5]发现在肺腺癌 A549 细胞和肺鳞癌 SKMES1 细胞中,人重组 PEDF 蛋白显著降低肺癌细胞的运动和对细胞外基质的黏附能力;同时在肺

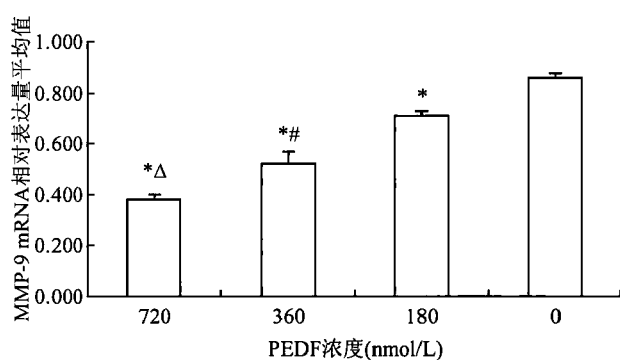


图6 不同浓度 PEDF 处理的 A549 MMP-9 mRNA 相对表达量平均值比较

与阴性对照组(0 nmol/L)比较: * $P < 0.05$; 与 180 nmol/L PEDF 干预组比较: # $P < 0.05$; 与 360 nmol/L PEDF 干预组比较: Δ $P < 0.05$

癌组织中, PEDF 的低表达与淋巴结的转移和肺癌病人的不良预后密切相关。郑民等^[6]在对 50 例非小细胞肺癌组织的研究中发现, PEDF 阳性组的微血管密度值和在发生远处转移的患者中所占的比例均低于 PEDF 阴性组, 表明 PEDF 可能通过抑制微血管的形成从而抑制肺癌的转移, PEDF 的检测可能对于判断肺癌是否发生远处转移有一定的意义。研究^[7]显示野生型 PEDF 和三磷酸突变的 PEDF 都能够通过促进内皮细胞的凋亡和肿瘤内血管的破裂来抑制新生血管生成, 阻碍内皮细胞和人脑胶质母细胞瘤细胞本身的迁移。He et al^[8]发现在 Lewis 肺癌鼠模型中, 腺相关病毒介导的 PEDF 基因表达能够在体内抑制其血管生成。马建梅等^[9]发现 PEDF 能有效抑制肺鳞癌细胞 SK-MES-1 的侵袭能力, 对肺鳞癌的转移可能发挥潜在的对抗效应。这些结果表明, PEDF 可能有潜在的抑制肺癌及其恶性肿瘤转移的能力。本研究中肺腺癌 A549 细胞体外迁移实验和侵袭实验结果显示 PEDF 能有效抑制 A549 细胞的迁移和侵袭能力。

关于 FN 和 MMPs 各自不同功能的研究已有不少, 但是关于 PEDF 与 FN、MMPs 之间的相互作用仍然知之甚少。关于 PEDF 与 FN 相互关系的研究^[10]发现, PEDF 在体内和体外均能显著抑制乳腺癌的生长和转移; 并且, PEDF 通过 p-ERK 和 p-AKT 信号通路下调纤维连接蛋白和随后的 MMP2/MMP9 的表达来抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移和侵袭。在前列腺癌、乳腺癌和骨肉瘤等恶性肿瘤细胞中, 已发现 PEDF 特异性下调膜型基质金属蛋白酶 (MT1-MMP) 和基质金属蛋白酶-2 (MMP-2), 这两种

在转移性肿瘤中最常见的基质金属蛋白酶。在对 64 例膀胱肿瘤组织的关于 PEDF 与 MMP-9 相互关系的免疫组化研究^[11]中发现, 相比于正常尿路上皮, PEDF 表达显著下降, 而 VEGF 和 MMP-9 的表达显著升高。在 EL-Kras(G12D) 小鼠模型中, PEDF 缺乏导致的浸润性胰腺导管腺癌与 MMP-2 和 MMP-9 的表达增强有关^[12]。PEDF 抑制子宫内膜癌细胞的增殖和侵袭, 同时, PEDF 下调 VEGF 和 MMP-9 的表达, 上调血小板反应蛋白的表达^[13]。本研究中半定量 RT-PCR 和 ELISA 实验结果显示 PEDF 能显著抑制转移相关蛋白 FN 和 MMP-9 的表达水平。

综上所述, PEDF 在肺腺癌 A549 细胞的转移过程中发挥拮抗效应。PEDF 可作为内源性抗 A549 细胞生物活性因子, 检测其表达水平可能对判断肺腺癌患者的预后有一定指导意义。但是, 本研究只涉及体外细胞层面, PEDF 是否能在体内抑制肺腺癌的转移, 还有待于下一步动物实验以及临床试验的验证。本研究组前期研究^[14-15]表明 PEDF 可以显著地抑制 A549 细胞和 NCI-H460 细胞的增殖、促进细胞形态变化, 并诱导其凋亡。因此, PEDF 可以发挥限制肺癌生长和转移的双重效应, 使其有望成为治疗肺癌的新途径。

参考文献

- [1] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al. The global burden of cancer 2013[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4): 505-27.
- [2] Fernandez-Garcia B, Eiro N, Marin L, et al. Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteinases in breast cancer metastasis[J]. Histopathology, 2014, 64(4): 512-22.
- [3] Gialeli C, Theocharis A D, Karamanos N K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting[J]. FEBS J, 2011, 278(1): 16-27.
- [4] Tombran-Tink J, Johnson L V. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, 30(8): 1700-7.
- [5] Chen J, Ye L, Zhang L, et al. The molecular impact of pigment epithelium-derived factor, PEDF, on lung cancer cells and the clinical significance[J]. Int J Oncol, 2009, 35(1): 159-66.
- [6] 郑民, 梁岳培, 王洋. 非小细胞肺癌组织中 VEGF、PEDF 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(18): 53-4.
- [7] Konson A, Pradeep S, D'Acunto C W, et al. Pigment epithelium-derived factor and its phosphomimetic mutant induce JNK-dependent apoptosis and p38-mediated migration arrest[J]. J Biol Chem, 2011, 286(5): 3540-51.
- [8] He S S, Shi H S, Yin T, et al. AAV-mediated gene transfer of

- human pigment epithelium-derived factor inhibits Lewis lung carcinoma growth in mice[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4):1142-8.
- [9] 马建梅, 陈承, 李雪萍. PEDF 对肺鳞状细胞癌 SK-MES-1 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, 41(1): 6-9+207.
- [10] Hong H, Zhou T, Fang S, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits breast cancer metastasis by down-regulating fibronectin[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 148(1):61-72.
- [11] Feng C C, Ding Q, Zhang Y F, et al. Pigment epithelium-derived factor expression is down-regulated in bladder tumors and correlates with vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9[J]. *Int Urol Nephrol*, 2011, 43(2):383-90.
- [12] Grippo P J, Fitchev P S, Bentrem D J, et al. Concurrent PEDF deficiency and Kras mutation induce invasive pancreatic cancer and adipose-rich stroma in mice[J]. *Gut*, 2012, 61(10):1454-64.
- [13] Guo T, Gu C, Li B. PEDF inhibits growth and invasiveness of endometrial cancer cells in vitro[J]. *Panminerva Med*, 2012, 54(4):299-304.
- [14] 娄志霞, 束军, 金程, 等. PEDF 对人肺腺癌 A549 细胞增殖与凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(10):1361-4.
- [15] 刘正兵, 束军. 色素上皮衍生因子对非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(6):604-6.

Effects of PEDF on the migration and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells and the expression of metastatic-related proteins

Cheng Yu, Shu Jun, Xu Sheng, et al

(Dept of Respiratory Medicine, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on the migration and invasion of human lung adenocarcinoma A549 cell, as well as the expression of metastatic-related proteins including fibronectin (FN) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). **Methods** A549 cells cultured without PEDF were defined as negative control group, the cells in PEDF intervention group were added 180, 360 and 720 nmol/L PEDF, respectively. The effects of PEDF on the migration and invasion of A549 cell were detected by Transwell assay. The effects of PEDF on the expression of FN and MMP-9 mRNA were detected by semi-quantitative RT-PCR assay, meanwhile the protein of them in supernatant of cell culture and within cells was detected by ELISA. **Results** The numbers of migrating cells and invasive cells in PEDF intervention group were significantly lower than those in the negative control group ($P < 0.05$). With the increase of PEDF concentration, the numbers of migrating and invasive cells decreased by degrees ($P < 0.05$). The expression of FN and MMP-9 in A549 cells was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$) and the expression level was remarkably decreased by degrees with the increase of PEDF concentration ($P < 0.05$). **Conclusion** PEDF can significantly inhibit the migration and invasion of A549 cells *in vitro*, furthermore, PEDF can significantly inhibit the expression of metastasis associated proteins (FN and MMP-9).

Key words pigment epithelium-derived factor; lung adenocarcinoma; metastasis; migration; invasion