

蛙皮素对胃癌细胞 BGC-823 的生长调控作用

徐秀英¹, 崔巍¹, 姜若兰¹, 卢香兰², 宗志宏³

(1. 中国医科大学附属第一医院消化科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 附属第一医院血液室; 3. 基础医学院生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] 目的: 观察蛙皮素(BBS)对人低分化胃癌细胞株 BGC-823 的生长调控作用, 测定细胞内环磷酸腺苷(cAMP)含量、蛋白激酶 C(PKC)活性及 PKC 亚型的表达, 探讨受体后信息传导途径。方法: BGC-823 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 于 37℃、5%CO₂ 条件下培养, 分别加入不同浓度的 BBS, 应用 MTT 法观察细胞的增殖程度; 应用放射免疫分析方法测定细胞内 cAMP 含量; 应用 [γ -³²P]ATP 掺入外源性底物的方法测定 PKC 活性; 应用 Western blot 方法分析 PKC 亚型 α 、 β ₁、 β ₂ 及 ϵ 的表达。结果: BBS 能促进 BGC-823 细胞的生长, 且与剂量呈正相关 ($r = 0.747, P < 0.05$); BBS 能促进细胞内 cAMP 的产生及 PKC 活性的增加, PKC α 表达明显增加, 而 β ₁、 β ₂ 及 ϵ 则无明显表达。结论: BBS 对胃癌细胞 BGC-823 的生长、细胞内 cAMP 产生及 PKC 活性增加有重要作用。

[关键词] 蛙皮素; 环磷酸腺苷; 蛋白激酶 C; 蛋白激酶 C 亚型

[中图分类号] R730.231.4

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-4646(2007)02-0203-03

Effect of Bombesin on growth of human gastric cancer cell line BGC-823

XU Xiu-ying¹, CUI Wei¹, JIANG Ruo-lan¹, LU Xiang-lan², ZONG Zhi-hong³

(1. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Hematological Laboratory, The First Affiliated Hospital; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Bombesin on the growth of a poorly differentiated human gastric cancer cell line BGC-823 and to explore the post-receptor signal transduction pathway by determining the content of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP), the activity of protein kinase C (PKC), and the expression of PKC isoforms α , β ₁, β ₂, and ϵ . **Methods:** BGC-823 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FCS in atmosphere of 5% carbon dioxide at 37°C, and then were treated with different concentrations of Bombesin or its antagonist. The viability and proliferation were determined with MTT assay. The content of intracellular cAMP was detected by radioimmunoassay. The activity of PKC was measured by incorporating [γ -³²P]-ATP into exogenous substrate, and the expressions of PKC isoforms was analyzed with Western blotting. **Results:** Bombesin promoted the growth of BGC-823 cells in a dose-dependent manner, which can be inhibited significantly by the antagonist of Bombesin. Bombesin increased the content of intracellular cAMP and the activity of PKC. The expression of PKC- α significantly increased, but no expression of PKC- β ₁, β ₂, and ϵ was found. **Conclusion:** Bombesin may play an important role in the proliferation, production of intracellular cAMP, and activity of PKC in poorly differentiated gastric carcinoma cell line BGC-823.

[Key words] Bombesin; cyclic adenosine monophosphate; protein kinase C; PKC isoforms

蛙皮素(bombesin, BBS)是由 14 个氨基酸组成的多肽, 胃泌素释放肽(gastrin releasing peptide, GRP)是蛙皮素在哺乳动物的对应物。BBS/GRP 具有生长因子样效应, 人胃癌细胞中已发现 BBS 受体, BBS/GRP 能促进癌细胞生长, 而其拮抗剂则能抑制胃癌细胞生长^[1]; 但这种调节作用的机制尚不清楚。近年来, PKC 在肿瘤发生发展中的作用引起人们广泛兴趣, 但 BBS 对人胃癌细胞 PKC 活性及 PKC 亚型表达影响的研究报告极少。本文旨在观察 BBS 及其受体拮抗剂 [Leu^{13} - ψ (CH₂NH)-Leu¹⁴]-Bombesin 对人胃癌细胞 BGC-823 生长的影响, 并通

过测定细胞内环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)含量、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 活性及 PKC 亚型 α 、 β ₁、 β ₂ 和 ϵ 的表达, 进一步观察蛙皮素的受体后信息传递。

1 材料与方法

1.1 材料

BBS 及其受体拮抗剂 [Leu^{13} - ψ (CH₂NH)-Leu¹⁴], Triton X-100, 异丁基甲基黄嘌呤(IBMx)及 EGTA 均购自 Sigma 公司, ¹²⁵I-cAMP 放免试剂盒为美国 DiaSorin Inc 产品, 塞唑蓝(MTT)为瑞士 FLUKA 公司产品; 抗 PKC α 、 β ₁、 β ₂ 及 ϵ 抗体均为 Santa Cruz 公司产品。 [γ -³²P]ATP 为北京福瑞公司产品。RP-MI1640 粉为美国 GIBCO 产品。胰蛋白酶(trypsin)为

[作者简介] 徐秀英(1960-), 女, 副教授, 博士。

E-mail: xxying0828@sina.com

Sigma 公司产品。CO₂ 培养箱为美国 Fisher, Scientific 公司 1168751H 型; 日本 Nikon TMS 倒置相差显微镜; 美国 Beckman J6-HC 型低温离心机; 美国 Beckman 公司 LE-80 型低温超速离心机; 美国 Beckman DU-640 型紫外可见光分光光度计; 美国超声粉碎仪; 美国 Beckman LS-6500 型液体闪烁计数仪; 北京核仪器厂 FT-613 型 ¹²⁵I- γ 自动计数仪; 英国 UVP 公司 DGS8000 凝胶成像及分析系统; BIO-RAD450 型酶标仪; 美国硝酸纤维素膜。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃癌细胞株 BGC-823 细胞由中国医科大学肿瘤研究所陆平惠赠。细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 于 37℃、5%CO₂ 条件下培养, 细胞贴壁生长良好, 每 3 d 传代 1 次, 采用 MTT 法检测细胞的生长。

1.2.2 环磷酸腺苷(cAMP)的检测: 采用放射免疫分析法测定细胞内 cAMP 含量。

1.2.3 PKC 活性的测定: PKC 活性的测定参考 Takai 法, 蛋白定量采用 Lowry 法, 牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.4 PKC 亚型的测定: 采用 Western blot 分析 PKC 亚型 α 、 β_1 、 β_2 及 ϵ 的表达。用凝胶成像及分析系统对实验结果进行照相及分析。

1.3 统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用 *t* 检验, 采用直线相关回归分析判断线性关系。

2 结果

2.1 BBS 及其受体拮抗剂对 BGC-823 胃癌细胞生长的影响(图 1)

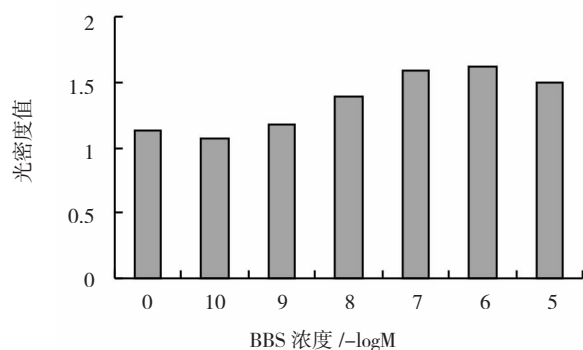


图 1 不同浓度 BBS 对人胃癌细胞生长的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of BBS on the growth of BGC-823 cells

不同浓度的 BBS($10^{-8} \sim 10^{-5}$ mmol)能显著促进人胃癌细胞的生长, 这一促生长作用与 BBS 浓度呈正相关($r = 0.878, P < 0.05$)。BBS 受体拮抗剂能抑制蛙皮素对胃癌细胞的促生长作用, 其抑制作用随着拮抗剂浓度的加大而更为明显, 提示蛙皮素的促生长作用是通过特异性受体所介导。

2.2 BBS 受体后信息传递

2.2.1 BBS 及其拮抗剂对人胃癌细胞 cAMP 生成的影响: 不同浓度的 BBS $10^{-5} \sim 10^{-8}$ mol/L 能显著促进细胞内 cAMP 的生成, cAMP 生成量与 BBS 浓度的对数呈正相关($r = 0.68, P < 0.01$)。不同浓度的 BBS 受体拮抗剂可以拮抗 BBS 的促 cAMP 生成作用, 随着拮抗剂浓度增加, 其拮抗作用也更明显, 呈剂量依赖关系。

2.2.2 BBS 及其受体拮抗剂对 BGC-823 细胞 PKC 活性的影响: 不同浓度的 BBS 能增加 BGC-823 细胞的 PKC 活性, 呈剂量依赖关系。 10^{-6} mol/L BBS 可使 BGC-823 细胞 PKC 活性增加, 1 min 时即出现 PKC 活性增加, 5 min 时作用最明显, 尤以膜活性增加明显。BBS 受体拮抗剂可抑制 BBS 对 BGC-823 细胞 PKC 活性的激活作用, $10^{-5} \sim 10^{-7}$ mol/L 拮抗剂能明显降低胞浆及胞膜 PKC 活性。

2.2.3 PKC 亚型 α 、 β_1 、 β_2 及 ϵ 的表达: 不同浓度($10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L)的 BBS 可使 PKC α 表达明显增强, β_1 、 β_2 在各种 BBS 浓度时均无表达, PKC ϵ 亦无表达。PKC α 的表达随 BBS 浓度的增加而增强(BBS $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L)。

3 讨论

BBS/GRP 是具有广泛生物学作用的重要胃肠肽, 是胃肠肽类激素中最早被发现具有生长因子样效应的肽, MENSTEIN 等的研究结果显示, GRP 和 GRP 受体 mRNA 在人的食道、胃和胰腺均有广泛表达^[2]; 1994 年, RICHARD J.B 首先报道, BBS 能促进人胃癌细胞株 SIIA 细胞的生长^[3]。在体内, BBS/GRP 拮抗剂能抑制裸鼠的人胃癌细胞移植瘤的生长^[4], 我们的实验结果表明, BBS 能显著促进人胃癌细胞株 BGC-823 细胞的生长, 而且呈剂量依赖关系, 这种促生长作用可被特异的 BBS 受体拮抗剂所抑制, 证明这一促生长作用是通过特异性受体所介导。

细胞增生可通过多个信号传导通路刺激, 它们以协同或结合方式传递环境信号, 各信号途径相互影响、相互制约、相互联系, 共同协调地发挥调控作用。其中 cAMP-PKA 及 DG-PKC 系统在细胞生长调

控中起着十分重要的作用。蛋白激酶 C 是磷脂酰肌醇通路中的重要激酶,近年来,PKC 在肿瘤发生发展中的作用日益受到重视,已发现多种肿瘤组织中 PKC 含量高于正常,人胃癌组织中 PKC 活性显著高于周围正常组织。UCHIDA N 等测定了胃癌组织和邻近正常胃黏膜组织的 PKC 活性,结果表明,当肿瘤小无淋巴结转移,浸润浅,分化较好时,PKC 活性降低,提示在胃癌早期,PKC 活性呈降下调节^[4]。在肠化生、不典型增生及胃癌的发生过程中,存在 PKC 表达水平的增高^[5];PKC 抑制剂可诱导凋亡和细胞周期静止,抑制 AGS 胃癌细胞的生长^[6],提示 PKC 作为信号传导者,在胃癌生长中可能起重要作用。PKC 目前已发现多个亚类同工酶,这些亚型分布具有一定的组织或细胞特异性,在同一细胞的不同生长状态,亚型的表达也各不相同,某一信号传导途径可能仅涉及一个 PKC 亚型。ABRAHAM C 等认为,在人结肠癌 CaCO₂ 细胞,PKC α 而非其他亚型调节细胞的生长分化^[7],而 PATRIZA K.R 认为 PKC β 1 在结肠肿瘤调控中起重要作用^[8]。PKC β 抑制剂 317615.2HCl 能抑制 Hep 肝细胞癌和胃癌移植瘤血管的形成,并能加强 5-氟尿嘧啶和吉西他滨的作用^[9]。

关于 BBS 促胃癌细胞生长的细胞内机制,国内外研究较少,而且结果不一致。RICHARD JB 认为 BBS 促 SIIA 胃癌细胞生长是通过酪氨酸激酶途径而不是磷脂酶 C 途径^[3]。我们采用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 掺入外源性底物的方法测定 PKC 的总活性,结果发现 BBS 能增加胃癌细胞胞浆及胞膜的 PKC 活性,采用 Western blot 方法,进一步分析 PKC 亚型的表达,发现 BBS 作用后,PKC α 表达明显增加,提示 PKC α 在 BGC-823 胃癌细胞的生长调控中起重要作用,我们对 46 例人胃癌细胞的免疫组化研究表明,胃癌组织 PKC α 及 ε 表达均明显增加,而对 BGC-823 细胞的 Western blot 分析,则未见 PKC ε 表达,这可能因不同生长状态的细胞 PKC 亚型的表达亦不同。

cAMP 是腺苷环化酶信号系统中重要的信号分子,关于 cAMP 在细胞生长调控中的作用,有不同报道。本实验观察到,不同浓度的 BBS ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L)能促进 cAMP 合成,呈剂量依赖关系,提示 cAMP 是 BBS 促 BGC-823 细胞生长的重要细胞内信号。

综上所述,BBS 能促进 BGC-823 胃癌细胞的生长,这种促生长作用是通过细胞膜上的蛙皮素受体介导,其受体后信息传递途径,可能涉及 DG-PKC 和 cAMP-PKA 系统,一方面激活 PKC α 促进细胞增殖,另一方面可能通过激活腺苷环化酶,使 cAMP 增加,进一步激活 PKA,而促进细胞增殖。而 PKC 的激活会进一步增加 cAMP 在细胞内的集聚,两套信息传导系统在 BBS 促 BGC-823 胃癌细胞增殖的作用中,起协同作用。PKC α 和 cAMP 可能是 BBS 促进 BGC-823 细胞生长的细胞内早期信号,关于 BBS 促胃癌细胞生长的晚期信号是什么,以及 cAMP、PKC 与核内信息的代谢通路及相互关系,尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] QIN Y, HALMOS G, CAI RZ, et al. Bombesin antagonists inhibit in vitro and in vivo growth of human gastric cancer and binding of bombesin to its receptors [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1994, 120(9): 519-528.
- [2] MONSTEIN HJ, GRAHN N, TRUEDSSON M, et al. Progastrin-releasing peptide and gastrin-releasing peptide receptor mRNA expression in non-tumor tissue of the human gastrointestinal tract [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(16): 2574-2578.
- [3] BOLD RJ, LOWRY PS, ISHIZUKA J, et al. Bombesin stimulates in vitro growth of a human gastric cancer cell line [J]. *J Cell Physiol*, 1994, 161(5): 519-525.
- [4] UCHIDA N, OKAMURA S, KUWANO H. Protein kinase C activity in human gastric carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(4): 793-796.
- [5] 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 等. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2001, 9(3): 302-307.
- [6] ZHU GH, WONG BC, EGGO MC, et al. Pharmacological inhibition of protein kinase C activity could induce apoptosis in gastric cancer cells by differential regulation of apoptosis-related genes [J]. *Dig Dis Sci*, 1999, 44(10): 2020-2026.
- [7] ABRAHAM C, SEWELL B S, SKAROSL SF, et al. Protein kinase C & modulates growth and differentiation in Caco-2 cells [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 503-509.
- [8] RAINER PK, SEDIVY R, MARIAN B. Protein kinase C tissue localization in human colonic tumors suggests a role for adenoma growth control [J]. *Gastroenterology*, 1996, 110(10): 1753-1759.
- [9] TEICHER BA, MENON K, ALVAREZ E, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase C beta inhibitor in human hepatocellular and gastric cancer xenografts [J]. *In Vivo*, 2001, 15(3): 185-193.

[收稿日期] 2006-06-26