

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.06.006

甘氨酸延伸型胃泌素对人胃癌细胞株 SGC-7901 的体外作用

叶敏*, 李济宇

Effect of Glycin-extended Gastrin on Human Gastric Cancer Cell Line SGC-7901 in Vitro

YE Min*, LI Ji-yu

Department of General Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 20092, China (* Present; Department of General Surgery, Nanhui Branch of Huashan Hospital, Shanghai Fudan University, 201300)

Abstract: Objective To explore the effect of Glycin-extended gastrin on proliferation and anti-apoptotic effect of gastric cancer cell line SGC-7901, as well as the role of G-Gly in the development of gastric cancer. **Methods** Cell proliferation was detected by MTT colorimetric assay at various concentrations of G-Gly, and cell apoptotic rate was examined with flow cytometry analysis. **Results** G-Gly can promote cell proliferation of SGC-7901 in a dose-dependant manner within a certain extent. The concentration of maximum effect is 0.1 nmol/L. Its effects can not be inhibited by antibody of CCKBR. MMC can promote SGC-7901 cell line apoptosis significantly, but G-Gly could inhibit its apoptosis induced by MMC. **Conclusion** G-Gly promoted cell proliferation and inhibited cell apoptosis induced by MMC. These results suggest that G-Gly may promoted the development of gastric cancer.

Key words: Glycin-extended gastrin; Gastric carcinoma; Apoptosis

摘要:目的 体外研究甘氨酸延伸型胃泌素(Glycin-extended gastrin, G-Gly)对人胃癌细胞株 SGC-7901 增殖以及对丝裂霉素(MMC)促凋亡作用的影响,探讨 G-Gly 在胃癌发生发展中的作用。**方法** 应用 MTT 法检测不同浓度 G-Gly 对 SGC-7901 增殖的影响,应用流式细胞术检测细胞的凋亡率。**结果** G-Gly 能促进 SGC-7901 的增殖,其增殖率在一定范围内与剂量有关,在浓度 0.1 nmol/L 时具有最大增殖效果。其效应不能被缩胆囊肽 B 受体(Cholecystokinin B receptor, CCKBR)的抗体所抑制。G-Gly 能抑制 MMC 诱导的凋亡($P < 0.01$)。**结论** G-Gly 能促进 SGC-7901 的增殖和抑制 MMC 诱导的凋亡,提示 G-Gly 能促进胃癌肿瘤的生长。

关键词: 甘氨酸延伸型胃泌素;胃癌;凋亡

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)06-0630-03

0 引言

胃泌素是由胃泌素前体大分子经过一系列酶裂解而形成的终末产物,它具有促进胃酸分泌和细胞增殖、分化的作用^[1]。而胃泌素前体一度被认为是没有生物学活性的,直到 1994 年,Seva 等^[2]才第一次证实甘氨酸延伸型胃泌素(Glycin-extended gastrin, G-Gly)(胃泌素主要前体之一)也具有促进细胞增殖的作用。此后的研究表明^[3-5],胃泌素前体具有不同于胃泌素的作用,且作用的受体也不同(尽管受体至今

未明)。目前国内对胃泌素前体研究甚少,本试验旨在体外研究 G-Gly 对人胃癌细胞株 SGC-7901 增殖以及对丝裂霉素(MMC)促凋亡作用的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901 购自上海中科院细胞库;人 Gastrin(1-17)-Gly 购自法国 NeoMPS 公司(Strasbourg, France);缩胆囊肽 B 受体(Cholecystokinin B receptor, CCKBR)的兔多克隆抗体(Rabbit polyclonal to CCKBR)购自美国 abcam 公司;丝裂霉素 C(MMC)为日本京都协和发酵工业株式会社制造(10 mg/支);二甲基亚砜(DMSO)为 Sigma 分装产品;噻唑蓝(MTT)为 Amresco 产品;RPMI 1640 培养液(Gibco BRL);胎牛血清(Gibco BRL);

收稿日期:2009-01-01;修回日期:2009-08-27

作者单位:200092 上海交通大学附属新华医院普外科(* 现工作单位:201300 上海复旦大学附属华山医院南汇分院普外科)

作者简介:叶敏(1974-),男,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤的基础和临床研究

Annexin V FITC 试剂盒为晶美生物工程有限公司产品(现为上海麦约尔(旺科)生物技术有限公司);自动酶标仪(Biotek BioRad Automated EIA Analyzer, USA);流式细胞仪(Beckman coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用 RPMI 1640 培养液(含 10% 胎牛血清、100 u/L 青霉素、100 u/L 链霉素),在 37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养,细胞贴壁生长。0.25%胰酶(Trypsin)消化,2~3 天传代 1 次,取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.2 MTT 法检测 SGC-7901 细胞的增殖 将 SGC-7901 细胞用胰蛋白酶消化后,血细胞计数盘计数,用含 10%胎牛血清的 1640 培养液制备为 5 × 10⁴/ml 细胞悬液,取 100 μl 接种于 96 孔板内,共设空白对照组、不加药组和 4 个不同浓度加药组共 6 个组,每组 3 个复孔,每孔加满至 200 μl,生长 24 h 后换无血清 RPMI 1640,并分别在四个不同浓度加药组中加入终浓度为 0.01、0.1、1、10 nmol/L 的 G-Gly,继续培养 24 h 后每孔加入新鲜配置的 MTT 储存液(5 mg/ml)20 μl,继续孵育 4 h 后,弃去上清液,每孔再加入 150 μl DMSO 溶解细胞内结晶,室温下置于微孔板震荡仪轻轻振荡 10 min,使结晶充分溶解,酶标仪(Biotek)490 nm 波长处测定每孔吸光值 OD。

1.2.3 CCKBR 抗体(CCKBRab)对 G-Gly 增殖作用的影响 同上法将 SGC-7901 细胞用含 10%胎牛血清的 1640 培养液制备为 2 × 10⁴/ml 细胞悬液,取 100 μl 接种于 96 孔板内,共设空白对照组、不加药组和 CCKBR 抗体(1 : 300)组、G-Gly(0.1 nmol/L)组、CCKBR 抗体(1 : 300)和 G-Gly(0.1 nmol/L)加药 5 个组,每组 3 个复孔,每孔加满至 200 μl,每组 3 个复孔,生长 24 h 后换无血清 RPMI1640,并分别加 CCKBR 抗体 1:300、G-Gly(终浓度 0.1 nmol/L)继续培养 24 h 后用 MTT 法测 OD 值。

1.2.4 AnnexinV/碘化丙啶(PI)双染法检测凋亡 操作根据试剂盒说明书进行。将 SGC-7901 细胞传至 6 cm 培养皿中(设空白组、加 MMC 阳性对照组、不同浓度的 G17-Gly 三个加药组,各三个复孔),待指数生长期的 SGC-7901 细胞生长至达 50% 时改用无血清 RPMI1640,同时在后四组中分别加入终浓度为 5 μmmol/L 的 MMC 和 0.01、0.1、1.0 nmol/L 的 G17-Gly,继续孵育 48 h。将收获的各组细胞制成单细胞悬液,用 PBS 洗涤两次后,用结合缓冲液 250 μl 重悬,取其中 100 μl 分别加入 5 μl Annexin V-FITC 和 PI 10 μl,避光染色 15 min

后,上机测细胞凋亡。

1.3 统计学方法

运用 SPSS 11.0 统计软件进行分析处理。实验结果计量资料多组间均数比较采用单因素方差分析,预先用 Homogeneity of Variances 进行方差齐性检验,如方差齐采用 LSD 检验,如方差不齐采用 Tamhane's T2 检验。检验水准 α 为 0.05。

2 结果

2.1 G-Gly 能促进 SGC-7901 细胞的增殖

G-Gly 能促进 SGC-7901 的增殖,其增殖率与剂量有关,见图 1。在 G-Gly(0.01~1.0) nmol/L 的浓度范围均能明显促进细胞增殖,其在浓度 0.1 nmol/L 时具有最大增殖效果。其增殖的效果不能被酰胺化胃泌素经典的受体 CCKBR 的抗体(CCKBR antibody, CCKBR-ab)所抑制,见图 2。

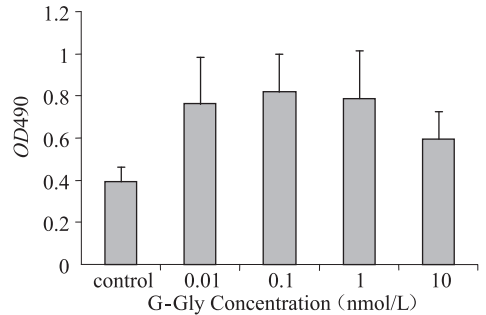


图 1 G-Gly 浓度-吸光值关系直方图
Figure 1 G-Gly concentration-OD histogram

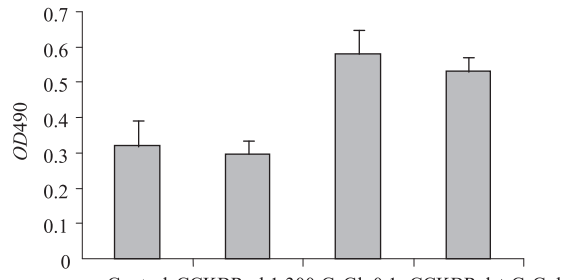


图 2 G-Gly 以及 CCKBR 抗体各加药组 -吸光值关系直方图

Figure 2 G-Gly and CCKBRab adding medicine groups-OD histogram

2.2 G-Gly 能抑制丝裂霉素对 SGC-7901 细胞的促凋亡作用

通过流式细胞仪检测,5 μmmol/L 的 MMC 能明显诱导 SGC-7901 细胞的凋亡(>15%);(0.01~1.0) nmol/L 浓度的 G-Gly 能明显抑制 MMC 诱导的凋亡,各加药组与阳性对照组(MMC 组)比较差异有统计学意义(P<0.01),而不同浓度的 G-Gly 三组之间比较差异无统计学意义(P>0.05),见图 3。

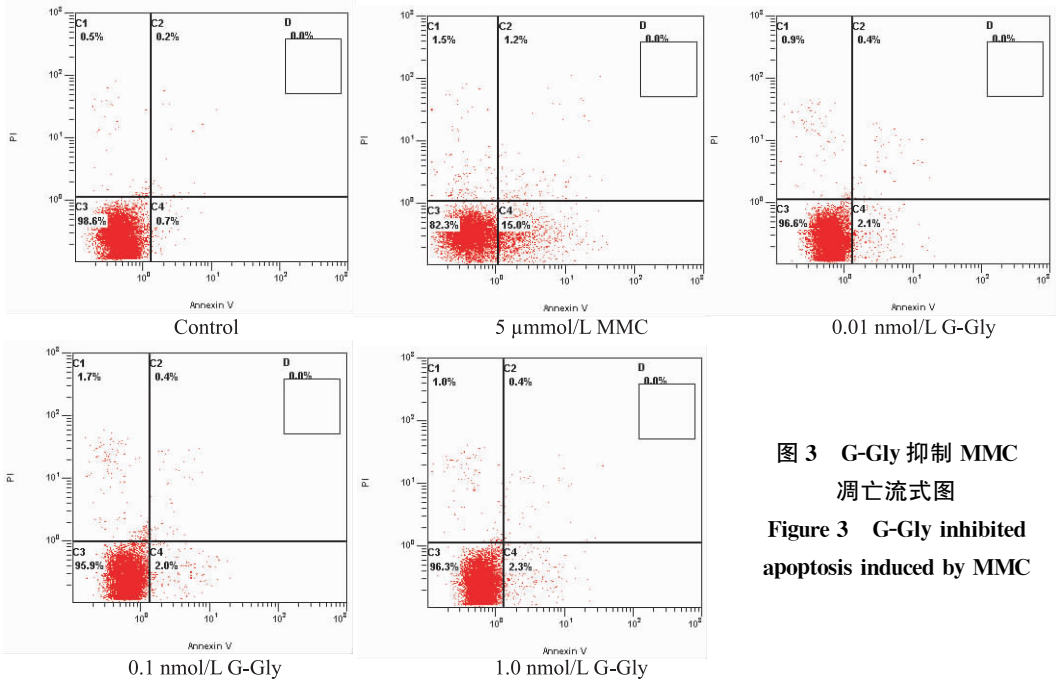


图3 G-Gly抑制MMC
凋亡流式图
Figure 3 G-Gly inhibited
apoptosis induced by MMC

3 讨论

众所周知,肿瘤的发展是多阶段、多基因演变的复杂过程。在肿瘤的发展过程中,往往涉及到多种基因的改变。如果能更好地认识相关基因及其产物在肿瘤演变过程中的作用,在理论上我们就可以找到新型的治疗靶点。

胃泌素是一种多肽激素,正常主要由胃肠道G细胞分泌,与胃泌素受体特异性结合,具有刺激胃酸分泌和对胃肠黏膜的营养作用。在肿瘤细胞中,胃泌素基因产物绝大多数以胃泌素前体的形式存在,这与它们缺乏胃泌素成熟所需要的酶有关^[6]。过去认为胃泌素前体没有生物学活性,但是近年来越来越多的证据表明,G-Gly不仅在体外还是在活体内都具有促进细胞增殖和抗凋亡的作用^[4-7]。

我们知道,细胞的过度增殖和凋亡减少是恶性肿瘤发生发展的重要特征。在细胞增殖试验中,我们证实了G-Gly能促进人胃癌细胞株SGC-7901的增殖,其增殖的效应在一定范围内具有剂量依赖效应,最大作用的浓度为0.1 nmol/L,而且这种作用不能被胃泌素经典受体(CCKBR)抗体所阻滞。在抗凋亡研究中,我们选用了临床上治疗胃癌常用的化疗药物——MMC作为诱导凋亡的药物。MMC是一种烷化剂抗癌药,有两个烷化中心可与DNA形成交叉连接,使细胞中DNA解聚,抑制DNA复制,从而促使细胞发生凋亡。我们参考文献^[8]和自己的预试验,选定5 μ mmol/L作为大剂量MMC诱导的浓度。在试验中我们发现(0.01~1.0) nmol/L浓度的G-Gly都具有明显抑制凋亡的作用,提示在胃癌细胞局部存在G-Gly抑制凋亡的微环境,从而

能弱化MMC化疗的疗效。

综上所述,在体外研究中,G-Gly能促进人胃癌细胞株SGC-7901的增殖和抑制MMC引起的凋亡,提示G-Gly具有促进胃癌肿瘤生长的潜在作用,从而为今后的治疗提供新的靶点。但是由于其作用受体、途径至今未明了,因此仍然需要进一步的研究来揭示其作用机制。

参考文献:

- [1] 叶敏,李济宇.甘氨酸延伸型胃泌素在胃肠肿瘤中的研究进展[J].肿瘤防治研究,2009,36(3):253-255.
- [2] Seva C, Dickinson CJ, Yamada T. Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin[J]. Sci, 1994, 265(5170):410-412.
- [3] Ogunwobi OO, Beales IL. Glycine-extended gastrin stimulates proliferation via JAK2- and Akt-dependent NF-kappaB activation in Barrett's oesophageal adenocarcinoma cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2008, 296(1-2):94-102.
- [4] Aly A, Shulkes A, Baldwin GS. Short term infusion of glycine-extended gastrin (17) stimulates both proliferation and formation of aberrant crypt foci in rat colonic mucosa[J]. Int J Cancer, 2001, 94(3):307-313.
- [5] Beales IL, Ogunwobi O. Glycine-extended gastrin inhibits apoptosis in colon cancer cells via separate activation of Akt and JNK pathways[J]. Mol Cell Endocrinol, 2006, 247(1-2):140-149.
- [6] Ferrand A, Wang TC. Gastrin and cancer: a review[J]. Cancer Lett, 2006, 238(1):15-29.
- [7] Ogunwobi OO, Beales IL. Glycine-extended gastrin stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cells via cyclo-oxygenase-independent pathways[J]. Regul Pept, 2006, 134(1):1-8.
- [8] 段红,张俊文,汤为学,等.5-氟脲嘧啶及丝裂霉素C对人胃癌细胞株SGC-7901及BGC-823的相互作用的体外观察[J].中国病理生理杂志,2002,18(3):259-261.

[编辑:周永红;校对:黄园玲]