

胃泌素受体拮抗剂抑制胰腺癌细胞生长的初步研究

叶 静

摘 要 **目的** 探讨应用胃泌素受体拮抗剂治疗胰腺癌的可行性。**方法** 在体外条件下观察胃泌素及其受体拮抗剂丙谷胺对胰腺癌细胞株的细胞活力及细胞增殖的影响。**结果** 在体外条件下,胃泌素能促进胰腺癌细胞株的增殖,而丙谷胺能完全阻断胃泌素的作用。**结论** 胃泌素受体拮抗剂能够抑制胃泌素受体阳性的胰腺癌细胞生长,有望为胰腺癌的治疗提供一种新手段。

关键词 胃泌素 受体拮抗剂 胰腺癌 丙谷胺

Proliferation Inhibition Effect of Gastrin Receptor Antagonist on Pancreatic Adenocarcinoma Cells. Ye Jing. Department of General Surgery, The First Hangzhou People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To explore the feasibility of gastrin receptor antagonist application in the management of pancreatic adenocarcinoma. **Methods** The viability and proliferation of pancreatic adenocarcinoma cell line treated with gastrin and its receptor antagonist proglumide were observed *in vitro*. **Results** The proliferation of pancreatic adenocarcinoma cell line cells were promoted by the gastrin, while were totally blocked by proglumide. **Conclusion** Gastrin receptor antagonist could inhibit the growth of gastrin - receptor positive pancreatic adenocarcinoma cells, indicating a new possible therapeutic method.

Key words Gastrin; Receptor antagonist; Pancreatic adenocarcinoma; Proglumide

近年来的基础研究发现,胃泌素作为消化道肿瘤的一种自分泌生长因子,可以促进胃癌、结肠癌等肿瘤细胞的无限制增生^[1,2]。对于胰腺癌细胞能否表达胃泌素及其抗体,国内外鲜有报道。因此研究胃泌素及其抗体在胰腺癌细胞中的表达,对揭示胰腺癌细胞无限制增生的机制具有重要的意义,并为探讨胰腺癌的内分泌治疗提供一定的理论依据。

本实验利用人胰腺癌细胞株 AsPC - 1 来检测胃泌素及其受体在基因水平的表达,并观察其在胃泌素和胃泌素受体拮抗剂丙谷胺作用下的增生变化。

材料与方 法

1. 材料:ASPC - 1 胰腺癌细胞株购自上海细胞所;17 肽胃泌素购自 Sigma 公司;丙谷胺购自 Sigma 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sangon 公司;二甲亚砜(DMSO)购自 Sangon 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程技术有限公司;1640 培养基购自 GIBCO 公司;RT - PCR 仪(Eppendorf 公司,德国);Kadok 凝胶图像分析系统(Life Technologies 公司,美国);酶联免疫测定仪(DYNEX 公司,日本);EPICS XL 流式细胞仪(Beckman Coulter 公司,美国)。

2. 细胞培养、mRNA 测定和药物配制:AsPC - 1 用培养液稀释后,送入 37℃、5% CO₂、100% 湿度的细胞培养箱培养,细胞贴壁生长稳定后,每 72h 传代 1 次。Trizol 法提取的 AsPC -

1 的 mRNA,反转录后行 PCR,琼脂糖凝胶电泳后成像。用反转录聚合酶链反应(RT - PCR)法检测 AsPC - 1 中胃泌素及其受体在 mRNA 水平的表达。含胎牛血清的 1640 培养液中分别加入灭菌的胃泌素、丙谷胺、胃泌素加丙谷胺,分成 4 组:空白对照组,胃泌素组($G - 17 \ 1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$),丙谷胺组($PGL \ 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$),胃泌素加丙谷胺组($G - 17 \ 1 \times 10^{-7} \text{ mol/L} + PGL \ 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)。

3. 四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色分析法测定细胞增殖能力:取 100 μl 含细胞的培养液(细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$),接种于 96 孔平底型培养板,细胞贴壁后吸去培养液;按上述分组分别加入培养液、胃泌素、丙谷胺、胃泌素加丙谷胺各 0.5 μl ,各组均设 4 个复孔。培养 48h 后每孔加 MTT 20 μl ,继续培养 4h,弃上清液,每孔加 DMSO 100 μl ,室温放置 10min,用酶联免疫检测仪在 570nm 波长处测定其吸光度(OD)值。按下述公式计算细胞生长抑制率(inhibition rate, IR)和细胞增生率(proliferation rate, PR):抑制率(IR) = (对照 OD - 实验 OD) $\div$ (对照 OD - 空白 OD) $\times 100\%$;增生率(PR) = (1 - IR) $\times 100\%$ 。

4. 胰腺癌细胞 DNA 周期分布的测定:细胞培养及分组、加药同上,细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,培养 48h 后收集细胞, PBS 洗涤 2 次,加 2ml 培养液制成细胞悬液,离心弃上清液,再以 PBS 洗涤 2 次,碘化丙啶染色,在流式细胞仪上测定 DNA 细胞周期分布。

5. 统计学处理:实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.0 软件作方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结 果

1. 人胰腺癌细胞株 AsPC - 1 PCR 产物凝胶电泳分析结果: AsPC - 1 有 CCK_B/GR、G - 17 强表达(图 1)。

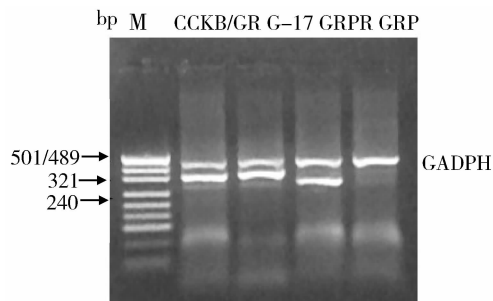


图 1 AsPC - 1 凝胶电泳分析结果

2. AsPC - 1 MTT 分析结果: 见表 1。

表 1 AsPC - 1 MTT 分析结果

分组	OD 值	IR(%)	PR(%)
G - 17	0.747 ± 0.049 *	-47.69	147.69
PGL	0.589 ± 0.031	-9.90	109.9
G - 17 加 PGL	0.535 ± 0.032	3.30	96.7
对照	0.548 ± 0.056	-	-

与对照组比较, * $P < 0.01$

3. 流式细胞仪分析 AsPC - 1 细胞 DNA 周期结果: 利用流式细胞仪对胃泌素和丙谷胺作用后的 AsPC - 1 进行了 DNA 周期分布的改变做了分析。结果显示, 胃泌素组的 $G_0 \sim G_1$ 期细胞明显减少至 67%, 对照组和丙谷胺组分别为 85% 和 85%, 而胃泌素和丙谷胺组的 $G_0 \sim G_1$ 期细胞也升至 85%。

讨 论

从病理学角度来说, 致癌因素即使是停止了作用, 癌组织仍然会无限制地增生, 因此其中一定有促进癌细胞持续生长的因子存在。近年来, 关于某些激素尤其是消化道激素扮演的促癌细胞生长因子的角色不断见诸报道, 其中胃泌素及其特异性受体更是研究的热点, 关于其促进胃癌、结肠癌生长的机制探讨已经比较深入, 但是对胰腺癌的影响在国内还未见报道。本实验就胃泌素及其受体对胰腺癌增生的影响作了一些初步的研究。

国内已经有学者用胃泌素作用于存在胃泌素受体的胃癌和结肠癌细胞株, 结果证实胃泌素能有效促进癌细胞的增生^[3,4]。黄广建等^[5]利用胃泌素促进

胃癌细胞增生, MTT 结果显示, 浓度在 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 的胃泌素能明显促进癌细胞的增生, 而且在 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ mol/L 时这种增生作用到达平台期。这说明胃泌素对胃泌素受体阳性的消化道肿瘤细胞的促生长过程符合受体的饱和学说, 在胃泌素到达一定的浓度以后, 由于受体数量的限制, 其促癌增生作用也趋于平稳, 可见胃泌素受体的含量及其亲和力的大小决定了癌细胞对胃泌素的反应性。

本实验选用 AsPC - 1 是来自于转移至腹腔积液的胰腺癌细胞^[6]。由于 AsPC - 1 上胃泌素受体的存在, 使其能自主地分泌胃泌素, 即使在难以获得血清胃泌素的腹腔积液中, 依然能够持续增生, 这也可以解释为什么胰腺癌细胞具有强侵袭性的原因^[7]。对于本实验中经过传代的 AsPC - 1, RT - PCR 的结果也证实了其中胃泌素及其受体在 mRNA 水平的表达, 理论上也支持了实验操作的可行性。

本实验使用 10^{-7} mol/L 浓度的胃泌素, 结果确实能有效地促进胰腺癌的增生; 在加了胃泌素受体拮抗剂 PGL 以后, 这种促癌细胞增生作用即消失, 而单用 PGL 对胰腺癌细胞的生长没有明显的影响。由此可见, 只要胰腺癌细胞上具有生物活性的胃泌素受体, 胃泌素就能促进其生长, 如果靶细胞膜上没有胃泌素受体或者受体的功能被药物所抑制, 胃泌素就不能对靶细胞构成影响。这为在药理和免疫学角度开辟新的胰腺癌治疗方法提供了实验证据。流式细胞仪对胃泌素作用于 AsPC - 1 后的 DNA 周期分析结果也证实胃泌素对胰腺癌细胞具有明显的促进增生作用, 处于 $G_0 \sim G_1$ 期的细胞仅占 67%, 而对照组达 85%, 一旦胃泌素组加用丙谷胺, $G_0 \sim G_1$ 期的细胞含量即上升至 85%。

由此可见, 胃泌素及其相应的受体在胰腺癌的增生过程中起着非常重要的推动作用。如果能有效地抑制胃泌素或者胃泌素受体的生物活性, 就可以有效地阻止癌细胞的增生。当然, 对癌细胞起促进增生作用的因素是多元化的, 即使是具有促癌生长的激素也不仅为胃泌素一种, 但根据目前的结果, 如果在药理和免疫治疗方面也能实现突破, 对包括胰腺癌在内的所有受胃泌素调控生长的恶性消化道肿瘤的治疗都具有深远的临床意义。

参考文献

- 1 Chen YP, Yang JS, Liu DT, Yang WP. Long-term effects of proglumide on resection of cardiac adenocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 7, 11(17): 2549 - 2551

(转第 89 页)

消化、心血管、免疫、神经、肾脏及内分泌系统。多器官的功能损害,使机体处于紊乱状态,不利于对抗感染,这无疑大大增加了治疗难度,也使对症支持治疗及脏器功能保护尤显重要,各脏器的生理功能互相影响,因此在治疗上不能顾此失彼,单一脏器的持续恶化势必加重机体的病情进展。

甲型 H1N1 流感病毒嗜肺性强,X 线表现为炎症浸润广泛,一旦发展成为危重症,则病情凶险、迅速进展至呼吸衰竭、严重的低氧血症,从而危及生命。笔者医院收治的 20 例危重症中 16 例应用有创呼吸机、4 例应用无创呼吸机,18 例病人由于就诊及时,均在病情加重的 24h 内给予了机械通气。另外 2 例病人就诊时已发生肺出血,机械通气应用时机晚,预后差。在呼吸支持方面,主张呼吸机的使用应尽早,由于炎症病变广泛、且易迅速进展成为急性呼吸窘迫综合征,初设条件相对较高。PEEP 初设为 6 ~ 8cmH₂O,但多数病人 PEEP 提高到 8 ~ 10cmH₂O 效果较好,ARDS 和肺出血时可设置到 10cmH₂O 以上;潮气量设置遵循小潮气量通气原则,初设为 6 ~ 8ml/kg,逐渐增加到 8 ~ 10ml/kg 通气效果改善好;平均气道压为 18.05 ± 5.01cmH₂O;呼吸频率尽量接近患儿的自主呼吸频率,FiO₂ 开始为 100%,尽可能地保证良好的氧合,根据血气分析和 X 线表现调节呼吸机参数;1 例病人常频呼吸机通气无效的情况下换用高频效果亦不佳。由于呼吸机条件高,易发生气漏综合征,出现皮下气肿、纵隔气肿及气胸,一旦发生气胸则积极行胸腔闭式引流减压排气。1 例 7 岁体重 30kg 的男孩,X 线胸片显示右肺斑片影,左肺完全呈“白肺”表现(图 1B),呼吸机治疗难度大,单纯呼吸机通气难以改善左肺病变,为了使左肺复张增加 PEEP 的同时,右肺过度充气明显,存在气漏的高风险。在治疗第 3 天我们在纤维支气管镜的引导下将 140mg 的肺

表面活性物质(珂立苏)注入左肺,并行左侧卧位,4 ~ 24h 左上肺逐渐含气;治疗第 6 天,再次给予肺表面活性物质 70mg 通过吸痰管从气管插管内注入并左侧卧位,第 7 ~ 8 天左肺逐渐复张,约治疗第 10 天,左肺完全复张。有文献报道,1994 ~ 2004 年多中心研究应用大剂量肺表面活性物质治疗 ARDS 的效果不确定,但笔者医院这例病人的两次给药,从影像学动态变化上均有明显疗效。我院对于甲型 H1N1 流感危重症的治疗体会,认为呼吸机的合理使用在整个治疗过程中非常关键,保证良好的氧合有利于机体机能的恢复。呼吸机使用时机宜早不宜晚,一旦出现呼吸困难,不应再等待观察,而需积极机械通气。对于合并 ARDS 的患儿可以尝试应用肺表面活性物质。

据国外截止到 2010 年 1 月的统计数字显示,甲型 H1N1 流感的病死率为 6.77%,比一般季节性流感要高。甲型 H1N1 流感病毒来势凶猛,一旦发展为危重症,病死率明显增加,因此,对流感病人早期作出正确的判断、及时积极的治疗有利于阻断和延缓病情进展、有利于降低甲型 H1N1 流感危重症的病死率、并有利于改善预后。

参考文献

- 1 任晓旭,宋国维.第 3 代小儿死亡危险评分和小儿危重病例评分的应用[J].实用儿科临床杂志,2006,21(6):382 - 384
- 2 Rogelio Perez - Padilla. Pneumonia and Respiratory Failure from Swine - Origin Influenza A (H1N1) in Mexico[J]. N Engl Med,2009,361:680 - 689
- 3 CDC. Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May - August 2009[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep,2009,58(38):1071 - 1074
- 4 孙瑜,夏照帆.肺表面活性物质治疗急性呼吸窘迫综合征临床诊断研究[J].中国危重症急救医学,2008,20(6):379 - 381

(收稿:2010 - 09 - 09)

(上接第 82 页)

- 2 Schmitz F, Otte JM, Stechele HU, *et al.* CCK - B/gastrin receptors in human colorectal cancer[J]. Eur J Clin Invest,2001,31(9):812 - 820
- 3 王文玲,周建奖,周西春,等.阻断自分泌性胃泌素对胃癌 SGC - 7901 细胞增值和凋亡的影响[J].中华医学杂志,2006,86(28):1989 - 1992
- 4 赵言明,何双梧.胃泌素对人结肠癌裸鼠移植瘤增殖活性的影响.中华消化杂志,2001,21(8):504 - 505
- 5 黄广建,乐竹琴,张延龄.胃泌素受体在胃癌组织中表达的特征及

其预后价值[J].中华普通外科杂志,1999,14(3):193 - 195

- 6 Glazer ES, Massey KL, Curley SA. A protocol to effectively create single cell suspensions of adherent cells for multiparameter high - throughput flow cytometry[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2010,46(2):97 - 101
- 7 Caplin M, Savage K, Khan K, *et al.* Expression and processing of gastrin in patients with pancreatic carcinoma[J]. Br J Surg, 2000,87(8):1035 - 1040

(收稿:2010 - 09 - 01)