DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.015
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
598 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)07-0598-03

生长抑素类似物对胆管癌SK-ChA-1细胞株及其相关基因表达的影响

陈 华[1],何振平[1],马宽生[1],杨 忠[2] (第三军医大学:[1]西南医院全军肝胆外科研究所,[2]基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨生长抑素类似物SMS201-995抑制人胆管癌增殖时对SK-ChA-1细胞细胞周期及cyclinD_1和p16蛋白的影响。方法 采用血清饥饿法将SK-ChA-1细胞同步化,同步化释放后SMS201-995处理48 h收取不同时相细胞,以流式细胞仪(flow cytometer)分析细胞周期相分布;并同时用免疫组化和原位杂交检测cyclinD_1和p16基因表达水平。结果 SMS处理SK-ChA-1细胞后6、12 h可抑制SK-ChA-1细胞经血刺激由G_0/G_1进入S期。CyclinD_1蛋白表达在SMS处理SK-ChA-1细胞后6 h明显减弱。p16蛋白在细胞周期各时相呈稳定性低表达。SK-ChA-1细胞cyclinD_1和p16 mRNA各时相表达无明显变化。结论 SMS诱导的cyclinD_1蛋白量降低可能与SMS干扰细胞G_1-S期转换,阻遏SK-ChA-1细胞增殖有关。

关键词:生长抑素;人胆管癌SK-ChA-1细胞;细胞周期;基因表达
中图法分类号:R730.23;R735.8;R977.1 文献标识码:A

Effects of somatostatin analogues on the cell cycle and the related gene expression in human cholangiocarcinoma cell line SK-ChA-1

CHEN Hua[1], HE Zhen-ping[1], MA Kuan-sheng[1], YANG Zhong[2] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital; [2]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 430038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of somatostatin analogue (SMS201-995, SMS) on the cell cycle of human cholangiocarcinoma SK-ChA-1 cells and cell cycle-regulated gene cyclinD1 and p16. Methods SK-ChA-1 cells were synchronized by serum starvation. Cells at different phases were harvested at 48 h after SMS treatment of the synchronized SK-ChA-1 cells. The distribution of cell cycles was analyzed by flow cytometry. The expression levels of cyclinD1 and p16 gene were detected by SABC immunohistochemistry and *in situ* hybidization. Results SMS could significantly inhibit the poorly serum-synchronized SK-ChA-1 cells to reenter the cell cycle from G_0/G_1-phase at 6 h and 12 h ($P<0.05$) by serum stimulation. SMS inhibited CyclinD1 protein expression significantly in the liberation of synchronized SK-ChA-1 cells at 6 h, but p16 protein expression remained unchanged. No changes of CyclinD1 and p16 mRNA were found at different time points. Conclusion These findings suggest that the amounts of G0/G1 and S-phase are dependent on the level of cyclinD1, and the down-regulation of cyclinD1 in SK-ChA-1 cells may be due to the anti-proliferation of SMS.

Key words: somatostatin; human cholangiocarcinoma; SK-ChA-1 cells; cell cycle; gene expression

近年来的研究使人们认识到在恶性肿瘤多阶段发生逐渐积累突变的过程中,肿瘤细胞的发生和发展与细胞周期的紊乱及调控因子的丧失有关。研究表明生长抑素(somatostatin, SS)对胆管肿瘤细胞的增殖有抑制作用[1],但其对细胞周期作用尚不清楚。本研究采用流式细胞、免疫组化和原位杂交等方法,观察生长抑素类似物(SMS201-995)对1株生长抑素受体阳性的胆管癌细胞株(SK-ChA-1)增殖的细胞周期及cyclinD_1和p16的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料及细胞培养

人胆管癌SK-ChA-1细胞株由Knuth教授(德国)惠赠。SMS由Suter教授(瑞士)惠赠。CyclinD_1和p16鼠抗人单抗及异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠IgG抗体(FITC-IgG),cyclinD_1和p16寡核苷酸探针、SABC免疫组化试剂盒、DAB试剂盒、BCIP/NBT试剂盒和敏感加强型原位杂交试剂盒,均购自武汉博士德生物技术公司。蛋白酶K和RNase A均购自成都华美公司。细胞接种于25

作者简介:陈 华(1962—),男,四川省达州市人,博士,主治医师,主要从事胆管癌方面的研究。电话:(023)68752731

收稿日期:2003-04-18;修回日期:2003-09-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ml 培养瓶中, 用含 10% 小牛血清 DMEM /F12(V ∶V, 1 ∶1)培养基于 37 ℃, 5% CO_2, 湿度为 95%的 CO_2 培养箱培养。

1.2　观测项目及方法

1.2.1　SK-ChA-1 细胞的同步化及同步化释放后 SMS 作用的流式细胞仪(FCM)检测　　取对数生长期细胞, 有血清培养液于 12 孔板(1×10^6 /孔)培养 24 h 后, 弃培养液。分别无血清培养和有血清培养 24 h 后做 FCM 检测。药物处理: 细胞同步化后, 换有血清培养液, 加入 SMS201-995(100 ng/ml), 以 PBS 代替 SMS 作为对照组, 继续培养 0、6、12、24 h 后, 终止培养, 消化收集细胞, 制成单细胞悬液, 加 70%冷乙醇固定 24 h, PI 染色, FCM 测定细胞周期分布。

1.2.2　$CyclinD_1$ 和 p16 蛋白表达的免疫组化检测　　取对数生长期细胞, 调整细胞浓度 2×10^4 /ml, 接种于放有多聚赖氨酸预处理无菌盖玻片的 24 孔培养板, 每孔 1 ml。药物处理同上, 于不同时相取出细胞爬片用 4%多聚甲醛固定, −20 ℃保存, 按说明进行免疫组化(SABC 法)染色。每张片选 5 个视野, 采用重庆大学设计生产的 Tiger 图像分析系统进行图像定量测定细胞光密度值。

1.2.3　$CyclinD_1$ 和 p16mRNA 检测　　细胞处理同上。原位杂交主要步骤: 盖玻片经高温, RNA 酶灭活和多聚赖氨酸预处理, 细胞爬片经 4%多聚甲醛室温固定 30 min。蛋白酶 K 消化。切片加原位杂交液, 湿盒中 37 ℃杂交过夜。加小鼠抗地高辛 20 ~37 ℃ 30 min。滴加生物素化羊抗小鼠 IgG: 20~37 ℃ 20 min。加 BCIP/NBT20~37 ℃显色 20~30 min。封片, 镜检。每张片选 5 个视野, 采用 Tiger 图像分析系统分析。

1.3　统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 做 t 检验。

2　结果

2.1　SMS 对胆管癌细胞周期动力学的影响

细胞周期分析表明, SK-ChA-1 细胞经有血清培养 24 h 后细胞周期分布为: G_1 期细胞占 41%, S 期细胞占 42%, G_2/M 期细胞占 17%。无血清培养 24 h 后细胞周期分布为: G_0/G_1 期细胞占 66%, S 期细胞占 20%, G_2/M 期细胞占 14%, 提示无血清培养 24 h 后可使 66%细胞被同步化于 G_0/G_1 期。SMS201-995 作用后细胞周期变化结果见表 1。与对照组相比, SMS201-995 作用 6 h 及 12 h 后, 可明显阻止 G_0/G_1 细胞的下降, 同时减少 S 期细胞的增加, 而对 G_2/M 期细胞无明显影响。SMS201-995 作用 24 h 后的细胞周期分析结果与对照组间差异无显著意义。

表 1　SMS 对 SK-ChA-1 细胞周期分布影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of SMS on the cell cycle of SK-ChA-1 cells($\bar{x}\pm s$)

Time (h)	SMS group			Control group		
	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M
0	66.90±2.16	19.22±0.23	13.76±3.39	67.81±2.10	19.56±0.96	13.63±2.58
6	58.22±1.03 *	26.15±1.15 *	15.63±1.40	52.56±1.00	34.51±1.81	12.93±0.81
12	36.25±2.85 *	45.80±0.50 *	18.29±2.49	30.88±1.99	52.47±0.91	16.66±1.25
24	39.07±1.97	39.05±2.22	21.88±1.10	43.96±2.12	36.36±1.12	19.68±2.18
48	41.78±1.30	37.56±1.29	20.66±1.43	42.28±1.53	38.25±1.29	19.55±1.34

*: $P<0.05$, *vs* control

2.2　Cyclin D_1 和 p16 在 SK-ChA-1 细胞同步化释放后的表达

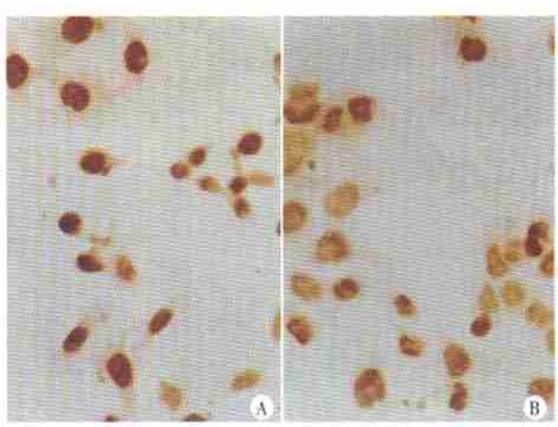
$CyclinD_1$ 蛋白表达呈明显时相改变, 细胞同步释放 6 h 后, $cyclinD_1$ 明显增高达峰值。细胞周期分析显示此时 SK-ChA-1 细胞处于的 G_1 期向 S 期转换过程中, 而至 12 h 时 S 期细胞明显上升, $cyclinD_1$ 则开始下降。p16 蛋白表达量低且在不同时相点无明显改变。

2.3　SMS201-995 作用 SK-ChA-1 细胞同步化释放后 $cyclinD_1$ 和 p16 蛋白表达的变化

$CyclinD_1$ 阳性反应物呈棕褐色, 主要定位于胞核; p16 阳性反应物呈棕黄色, 主要定位于胞核, p16 蛋白在 SK-ChA-1 细胞呈弱表达。图像分析如表 2 所示: SK-ChA-1 细胞同步化释放 6h 后, 与对照组(图 1A)比较 SMS201-995 明显抑制 $cyclinD_1$ 表达(图 1B); 而 p16 蛋白表达与对照组无差异。

2.4　SMS 作用 SK-ChA-1 细胞同步化释放后 $cyclinD_1$ 和 p16 mRNA 表达的变化

$CyclinD_1$ mRNA 和 p16 mRNA 均呈紫蓝色主要存在于细胞浆内(图 2A、2B)。图像分析显示: SMS 作用后, 各时相点 $cyclinD_1$ 和 p16 mRNA 反应信号与对照组无差异。

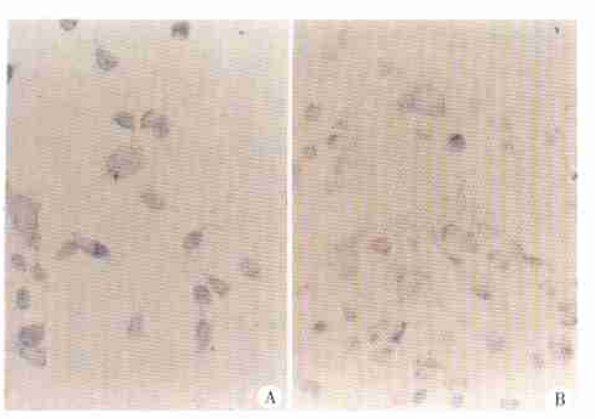


A: Normol control; B: SMS treated

图 1　免疫组化分析 SMS201-995 作用 SK-ChA-1 细胞 6 h $CyclinD_1$ 蛋白表达结果　(SABC×400)

Fig 1　Immunohistochemical staining analysis of expression of $CyclinD_1$ protein in SK-ChA-1 cells stimulated by SMS201-995 for 6 h　(SABC×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: CyclinD$_1$ mRNA; B: p16 mRNA

图 2 CyclinD$_1$ 和 p16 mRNA 在人胆管癌 SK-ChA-1 细胞中的表达原位杂交结果

Fig 2 Expressions of CyclinD$_1$ and p16 mRNA *in situ* hybridization in human cholangiocar cinoma SK-ChA-1 cells

表 2 SMS 对 SK-ChA-1 细胞表达 cyclinD$_1$ 和 p16 蛋白的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of SMS on the expressions of cyclinD1 and p16 protein in SK-ChA-1 cells ($\bar{x}\pm s$)

Time (h)	SMS group		Control group	
	CyclinD$_1$	p16	CyclinD$_1$	p16
0	0.13±0.03	0.080±0.050	0.16±0.02	0.070±0.010
6	0.36±0.03*	0.760±0.050	0.52±0.05	0.075±0.010
12	0.42±0.02	0.085±0.060	0.42±0.03	0.080±0.010
24	0.37±0.02	0.080±0.010	0.38±0.02	0.075±0.050
48	0.39±0.03	0.078±0.009	0.40±0.04	0.090±0.010

*: $P<0.05$, *vs* control

3 讨论

越来越多的证据表明,细胞分裂的精确性及定时性是正常细胞生长和分化所必须。肿瘤的发生和发展是由于细胞周期 start 位点的失控,导致大量G_0 期细胞无限制通过 G_1/S 和 G_2/M 转换,导致细胞的异常增殖[2]。实验研究证实,生长抑素对许多恶性肿瘤的生长有明显的抑制作用[3]。进一步研究还表明,通过转生长抑素受体基因可使肿瘤细胞生长受到生长抑素的抑制[4]。然而,对生长抑素作用于肿瘤细胞增殖的细胞周期分析的研究报道甚少,而 SMS 对胆管癌增殖的细胞周期分析少见报道[5]。本研究显示,SK-ChA-1 细胞处于血清饥饿状态 24 h 后,大多数细胞同步化于 G_0/G_1 期。在 SK-ChA-1 细胞同步化释放后 6 h 和 12 h 两个时相点,SMS 处理与对照组相比,可明显使细胞减缓 G_0/G_1 期下降,抑制 S 期的增加,对 G_2/M 期无明显阻滞作用。在其后 24 h 和 48 h 两个时相点,SMS 处理组细胞周期各时相期分布与对照组无差异,表明 SMS 使SK-ChA-1 细胞短时阻滞于 G_0/G_1 期。

CyclinD$_1$ 是重要的 G_1 期应答基因。p16 与 cyclinD$_1$ 竞争结合 CDK4 和 CDK6,抑制 CDK4 和 CDK5 的活化,使细胞停滞于 G_1 期从而阻止细胞从 G_1 转化为S 期,抑制细胞增长而达到抗癌目的[6]。我们的研究发现,无血清培养 24 h 后,细胞同步化于 G_0/G_1 期,此时 cyclinD$_1$ 蛋白表达明显低于对照组。同步化释放 6 h 后,cyclinD$_1$ 明显升高,此时处于 G_1 向 S 期转化前期,随着 S 期上升,其表达迅速下降,显示 cyclinD$_1$ 表达呈周期依赖性。而 p16 表达在细胞周期各时相无明显差别。SMS 作用后 6 h cyclinD$_1$ 表达受到抑制,12 h 后 cyclinD$_1$ 表达才增强并与对照组无差别。这种变化在时间上与 FCM 检测的 G_0/G_1 期细胞指数下降减缓相对应,提示 SMS 对 cyclinD$_1$ 蛋白表达的抑制作用可能参与 SMS 阻滞细胞由 G_1 向 S 期的转化。在我们的实验中未发现SMS 对p16 的表达有明显作用。原位杂交分析提示,SMS 作用后 SK-ChA-1 细胞 cyclinD$_1$ 和 p16mRNA 表达水平在各时相点与对照组相比无明显差异。

综上所述本研究证明:SMS 对 SK-ChA-1 细胞同步化释放后 G_0/G_1 期有短暂的阻滞作用。SMS 对 cyclinD$_1$ 蛋白表达的抑制作用,可能是 SMS 阻滞细胞于 G_0/G_1 期的原因之一。

参考文献:

[1] 陈 华, 何振平, 马宽生, 等. 奥典肽对人胆管癌SK-ChA-1 细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(5): 403-404.

[2] Schafer K A. The cell cycle: a review[J]. Vet Pathol, 1998, 35(6): 461-478.

[3] Robbins R J. Somatostatin and cancer[J]. Metablism, 1996, 45(8 Suppl 1): 98-100.

[4] Fisher W E, Wu Y Q, Amaya F, *et al*. Somatostatin receptor subtype 2 gene therapy inhibits pancreatic cancer *in vitro*[J]. J Surg Res, 2002, 105(1): 58-64.

[5] Stetak A, Lankenau A, Vantus T, *et al*. The antitumor somatostatin analogue TT-232 induces cell cycle arrest through PKCdelta and c-Src[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285(2): 483-488.

[6] Lukas S K, Parry D, Aagaard L, *et al*. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16[J]. Nature, 1995, 375(6531): 503-506.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net