DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.040
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0093-03

论著

CCK对胆管癌细胞增殖及 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 基因表达的影响

马宽生,罗昆仑,何振平,王曙光,董家鸿 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所,西南肝胆外科医院,重庆,400038)

提 要:目的 探讨胆囊收缩素(Cholecystokinin,CCK)促进胆管癌细胞增殖的可能机制。方法 采用细胞增殖计数法及流式细胞仪分析CCK对胆管癌细胞生长、增殖及细胞周期的影响,RT-PCR、Western印迹法检测CCK对 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 基因表达的影响。结果 CCK具有显著促进无血清培养的胆管癌细胞的生长和增殖,加速细胞周期的进程,$P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ mRNA和蛋白水平表达明显降低。结论 CCK促进胆管癌细胞增殖可能与下调细胞周期相关蛋白 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 的表达有关。

关键词:CCK;$P21^{WAF1}$;$P27^{KIP1}$;细胞周期
中图法分类号:R394.3;R730.231.4;R735.8 文献标识码:A

Effect of CCK on proliferation of cholangiocarcinoma cells and expression of $P21^{WAF1}$ and $P27^{KIP1}$ genes

MA Kuan-sheng, LUO Kun-lun, HE Zhen-ping, WANG Shu-guang, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of cholecystokinin (CCK) on the growth of cholangiocarcinoma cell line QBC939, and explore the relationship between $P21^{WAF1}$ and $P27^{KIP1}$ gene expressions and QBC939 cell proliferation. **Methods** Cell counting and flow cytometry (FLC) were used to investigate cell growth, proliferation and cell cycle of the QBC939 cells after co-cultured with CCK. The expressions of $P21^{WAF1}$ and $P27^{KIP1}$ were determined with immunohistochemical staining. **Results** The proliferation of QBC939 cells with CCK treatment showed an increase in the percentage of cells at S phase and a concomitant reduction of cells at G_1 phase, which could be inhibited by L60. The expression levels of $P21^{WAF1}$ and $P27^{KIP1}$ genes were markedly down-regulated in response to CCK treatment. **Conclusion** The promotion of CCK to QBC939 cell proliferation may be related to the down-regulation of $P21^{WAF1}$ and $P27^{KIP1}$ genes.

Key words: cholecystokinin; $P21^{WAF1}$; $P27^{KIP1}$; cell cycle

胆囊收缩素(Cholecystokinin,CCK)是由十二指肠和空肠Ⅰ型细胞分泌的一种多肽激素,对胃肠道粘膜细胞及某些恶性肿瘤细胞有显著促生长作用。近年在消化道肿瘤发生发展中的作用日益受到重视[1,2]。本实验拟通过观察CCK对胆管癌细胞生长特性的影响,探讨 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 在胆管癌细胞增殖过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及来源

CCK8肽,L365,260(L60)均购自Sigma公司,并用0.01 mol/L PBS配制成适当浓度,-20 ℃保存备用。DMEM购自Gibco公司,$P27^{KIP1}$ 鼠抗人单克隆抗体购自Sigma公司,$P21^{WAF1}$ 鼠抗人单克隆抗体购自Santa Cruz公司,S-P试剂盒购自Zymed公司。Tripure Isolation Reagent购自Roche,Access RT-PCR system购自Promega,DNA分子量标准品:PCR Marker、λDNA/*Hind* Ⅲ、λDNA/*Hind* Ⅲ+*EcoR* Ⅰ购自Promega公司。琼脂糖、多聚甲醛、DEPC、Triton X-100、硝酸纤维膜等购自Sigma。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770727)
作者简介:马宽生(1963-),男,博士,副主任医师,副教授,主要从事胆管癌的临床与实验研究,射频消融治疗肝肿瘤的临床和实验方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68754168
收稿日期:2001-07-26;修回日期:2001-11-29

1.2 细胞培养

人胆管癌细胞系QBC939为CCKB/Gastrin受体阳性细胞株由本科王曙光教授建立。QBC939细胞在含10%灭活的小牛血清(含适量的HEPES以及100 μg/ml链霉素、100 U/ml青霉素)的DEME培养基中,培养条件为37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养,细胞贴壁生长良好。细胞每3~4 d用0.25%胰酶/0.02% EDTA消化,以1∶3~1∶5传代1次。实验采用对数期生长细胞,消化传代,在含10%小牛血清的DMEM培养基中培养贴壁(约12 h),再换成无血清培养基(无血清培养基按Miyagiwa的方法配制,即1 000 ml DMEM培养基液,胰岛素200 U,转铁蛋白5 mg,EGF 1 μg,氢化可的松0.2 mol/L,牛血清白蛋白5 g,胰高血糖素10 mg,Na_2SeO_3 10^{-2} mol/L),体外无血清培养的CCK B/Gastrin受体阳性的胆管细胞QBC393细胞系分别加入 10^{-9} mol/L的CCK8以及CCKB/Gastrin受体拮抗剂L365,260(L60)。

1.3 PCR引物

$P27^{KIP1}$:P_1 5′-GAG GGC AAG TAC GAG TGG CAA-3′;P_2 5′-CTG CGC ATT GCT CCG CTA ACC-3′;产物长度为238 bp,退火温度60 ℃。

$P21^{WAF1}$:P_1 5′-AAG ACC ATG TGC ACC TGT CA-3′;P_2 5′-GGC TTC CTC TTG GAG AAG AT-3′;产物长度为170 bp,退火温度60 ℃。

GAPDH:P_1 5′-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3′;P_2 5′-TCT AGA CGG CAC GTC AGG TCCAC-3′;产物长度为598 bp,

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

退火温度 60 ℃。

以上引物均由上海生工所合成，PAGE 纯化。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 细胞生长增殖能力测定[3] 收集对数生长期 QBC939 细胞，以 10^5 个细胞/孔（培养液为含 10% FCS 的 DMEM）接种于 6 孔板中，37 ℃、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养，待细胞完全贴壁（约 12 h），置换培养液（含 10^{-9} mol/L 浓度的 CCK8、L60 无血清培养液），等量含 0.01 mol/L PBS 无血清培养液作为对照组，分别命名为 CCK8、CCK8+ L60、L60 以及对照组，每组细胞设 3 个平行孔，于药物处理后 1、3、5 d 收集细胞并计数。

1.4.2 细胞周期分析 细胞分组同上。经药物处理 72 h 用胰酶消化收集细胞，离心弃培养液，PBS 洗一遍，留少许 PBS 重悬细胞，迅速入预冷的 70% 乙醇，固定 18 h 以上，800～1 000 r/min 离心弃乙醇后用 PBS 洗 1 次，少许 PBS 重悬细胞后转入 EP 管中，吹匀，加入 RNA 酶（终浓度为 50 μg/ml）37 ℃作用 1～2 h。加入碘丙啶（PI）染色（100 μg/ml）混匀，置冰上 30 min 后，在流式细胞仪（FACS 420）检测细胞各期的分布。

1.4.3 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ mRNA 表达的检测 细胞分组同上。采用 Tripure™ 试剂（Roche）按说明书标准程序进行细胞总 RNA 抽提，取 5 μl 紫外分光光度计测 D_{260}/D_{280} 进行定量和测定纯度，以无菌 DEPC 水调整为 2.0 μg/μl 浓度。RT-PCR 采用一步一管法（Acess RT-PCR System 购自 Promega）说明书标准程序操作测定 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ mRNA 表达量。扩增产物长度：GAPDH 598 bp；$P21^{WAF1}$ 170 bp；$P27^{KIP1}$ 238 bp。取扩增产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳，紫外线下观察拍照。

1.4.4 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 蛋白表达的检测 细胞分组同上。收集待测细胞样本，常规制备裂解液，细胞经充分裂解抽提后，进行蛋白定量，并调至每孔上样量为 10 μg。置于 12% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳数小时，电转移至硝酸纤维膜上，加上特异性抗体（1∶500），4 ℃过夜。经 DAB 显色至清晰带出现，烤干保存。

2 结果

2.1 CCK 对 QBC939 细胞增殖能力影响

在 10^{-9} mol/L 浓度的各药物作用 24 h 后，各组间（1～2）细胞总数无明显变化（$P>0.05$），3～5 d 后，CCK8 能显著促进 QBC939 细胞生长增殖。而其受体拮抗剂组可阻止 CCK8 的效应，结果见表 1。

表 1 CCK8、L60 对 QBC939 细胞生长的影响（1×10^4）

Tab 1 Effect of CCK8 and L60 on the proliferation of QBC939 cells（1×10^4）

Group	Time (day)			
	0	1	3	5
Control	10.0	11.9±1.0	40.9±3.2	75.2±4.6
CCK8		13.0±1.2	52.9±4.3 *	120.7±10.5 **
CCK8+L60		12.3±0.9	38.2±4.1 △	75.6±4.7 △△
L60		11.5±0.7	37.1±2.7 △△	72.4±5.9 △△

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* CCK8

2.2 细胞周期分析

CCK8 组与其它各组相比，G_1 期细胞比例明显减少，S 期比例明显增多，而其它各组间无显著性差异（$P>0.05$），见表 2。

表 2 CCK8、L60 作用 72 h 对 QBC939 细胞周期的影响（%）

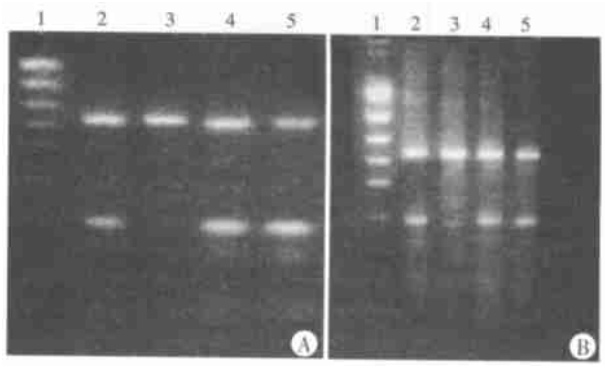
Tab 2 Effect of CCK8 and L60 on the cell cycle of QBC939 cells（72 h，%）

	Control	CCK8	CCK8+L60	L60
G_1	66.3±3.1	40.3±4.1 **	65.3±2.6 △△	67.8±3.2 △△
S	27.6±2.5	49.0±3.8 **	27.9±2.0 △△	26.4±1.5 △△
G_2/M	6.5±1.2	11.2±2.3 *	6.3±1.1 △	5.5±1.2 △

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* CCK8 group

2.3 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ mRNA 和蛋白表达改变

RT-PCR 检测显示，与对照组相比，CCK8 组 QBC939 细胞中 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ mRNA 表达明显降低，而其受体拮抗剂 L60 可拮抗其效应，结果见图 1。

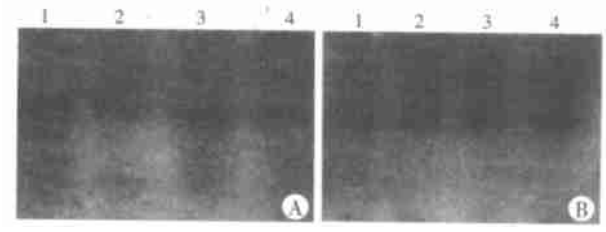


1：PCR marker；2：Control；3：CCK8；4：CCK8+L60；5：L60

图 1 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ mRNA 的表达

Fig 1 Expressions of $P21^{WAF1}$ RNA（A）$P27^{KIP1}$ mRNA（B）in QB939 cells with RT-PCR

Western blot 结果显示，CCK8 作用 72 h 后，QBC939 细胞中 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 蛋白表达几乎测不到，与对照组相比明显减少。而 L60 可拮抗此效应，结果见图 2。



1：Control；2：CCK8；3：CCK8+L60；4：L60

图 2 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 蛋白表达

Fig 2 Expressions of $P21^{WAF1}$ protein（A）and $P27^{KIP1}$ protein in QBC939 cells with Western blot

3 讨论

3.1 CCK 对 QBC939 细胞生长增殖的影响

研究发现，一些肿瘤细胞株如某些结肠癌、胰腺癌细胞株存在自分泌 CCK、Gastrin 现象[4～7]。癌细胞分泌 CCK、Gastrin 并作于自身或邻近细胞的 CCKA 或 CCKB/Gastrin 受体，调控细胞生长增殖活动。而有些肿瘤细胞株则无 CCK、Gastrin 自分泌现象，但存在 CCK/Gastrin 受体，肿瘤宿主体内分泌的 CCK 或 Gastrin

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

可通过与这些癌细胞表达的 CCK/Gastrin 受体结合产生效应[8~10]。目前对 CCK、Gastrin 与胆管癌细胞生长增殖的关系研究甚少, 且结果差异较大。Hugh[11] 将胆管癌细胞株 Slu-132 移植于裸鼠体内, 再给予 CCK, 发现 CCK 显著抑制肿瘤生长。而 Hudd 却认为, CCK 对 Slu132 的生长无明显影响。Ikematsu[12] 发现, CCK 显著地促进 BOP 诱导的胆管上皮细胞癌变的发生, 而 CCK 受体拮抗剂能抑制 CCK 的促癌作用。本实验显示, CCK8 能显著促进 QBC939 细胞的生长增殖能力, 并加快 G_1 向 S 期转换, 使 G_1 期细胞比例明显减少, S 期比例明显增大, 促进细胞周期的演变。而其受体拮抗剂 L60 能阻止其效应。

3.2　CCK 对胆管癌细胞内 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 基因表达的影响

近年来细胞周期调控的研究已取得令人注目的成绩, 确定了调控细胞周期的核心机制, 即 CDK 的活性表达与调控, 揭示了细胞周期调控模式, 即不同时相间的转换取决于能否顺利通过若干关卡(Check point), 其中以 $G_1 \rightarrow S$ 期和 $G_2 \rightarrow M$ 转变的关卡调节最为重要[13]。这依赖于一系列正/负调节因子(如 C-myc、P53、Rb, Cyclins、CDKs、CDKIs 等)的相互作用, 使细胞顺利渡过 $G_1 \rightarrow S$ 和 $G_2 \rightarrow M$ 两个关卡的转换[14]。本实验证实, CCK8 促进胆管癌细胞增殖与影响细胞周期进程有关。因此, 我们推测 CCK 促进 QBC939 细胞增殖可能涉及细胞周期相关调节因子的表达改变。

$P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 是广泛的 CDK 抑制剂, 属细胞周期负调控蛋白, 通过与 Cyclin 竞争, 或直接与 CDK 或 Cyclin-CDK 复合物结合, 抑制 CDK 催化活性, 阻止细胞周期 G_1 向 S 期转换。当 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 基因表达异常时, 可导致细胞无限增殖和肿瘤形成。本实验发现, CCK 在 10^{-9} mol/L 浓度作用 72 h 后, 在促进 QBC939 细胞增殖的同时, 明显降低细胞内 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ mRNA 和蛋白表达水平, 其受体拮抗剂则可拮抗此效应, 结果表明, CCK 促进胆管癌细胞增殖与 $P21^{WAF1}$、$P27^{KIP1}$ 基因表达改变, 以至细胞周期调控机制异常有关。

参考文献:

[1] 马宽生, 何振平. 胆囊收缩素、胃泌素与胆管癌细胞增殖关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(6): 547

[2] Liddle R A. Regulation of cholecystokinin receptor family molecular cloning, structure and functional expression in rat, guinea pig and human[J]. Ann NY Acacl Sci, 1994, 713(1): 49—66.

[3] 司徒镇强, 吴军正, 主编. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996.

[4] Kleeveland P M, Waldum H L. The gastrin receptor assay[J]. Scand J Gastroenterol, 1991, 180(Suppl 1): 62—69.

[5] Piontek M K, Hengels K J. Differential mode of aetion of high- and low-affinity CCK/Gastrin receptor antagonists in growth inhibition of gastrin responsive human gastric adenocarcinoma cells *in vitro*[J]. Anticancer Res, 1993, 13(3): 715—720.

[6] Wettstein J G, Bueno L, Junien J L. CCK antagonists: pharmacology and therapeutic interest[J]. Pharmacol Ther, 1994, 62(3): 267—282.

[7] Baldwin G S. The role of gastrin and cholecystokinin in normal and neoplastic gastrointestinal growth[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1995, 10(2): 215—232.

[8] Povoski S P, Zhou W. Longenecker D, *et al*. Cholecystokinin receptor characterization and cholecystorinin A receptor messenger RNA expression in transgenic mouse pancreatic carcinomas and dysplatic pancrease[J]. Oncol Res, 1994, 6(9): 411—417.

[9] Bold R J, Warren R E, Ishizuka J, *et al*. Experimental gene therapy of human colon cancer[J]. Surgery, 1994, 116(2): 189—195.

[10] Watson S A, Michaeli D, Grimes S, *et al*. Anti-gastrin antiboclies raised by gastrimuue inhibit growth of the human colorectal tumour Ap5[J]. Int J Cancer, 1995, 61(2): 233—240.

[11] Hugh T R W, Upp J R. Caerulein inhibitds growth of a human cholangiocarcinoma with cholecystokinin receptor[J]. Gastroenterology, 1987, 92(8): 1 801—1 810.

[12] Ikematsu Y, Tomioka T, Tajima Y, *et al*. Enhancement of biliary carcinogenesis in hamsters by cholecystokinin[J]. World J Surg, 1995, 19(6): 847—850.

[13] Jacks T, Weinberg R A. The expanding role of cell cycle regulars[J]. Science, 1998, 280(5366): 1 035—1 036.

[14] Zhan Q, Kontny U, Iglesias M, *et al*. Inhibitory effect of Bcl-2 on P53-mediated transactivation following genotoxic stress[J]. Oncogene, 1999, 18(2): 297—304.

(编辑　王　红)

关于医学符号的使用

统计学符号中有拉丁字母和希腊字母, 不论哪种字母, 也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是拉丁字母 $\bar{x} \pm s$, 卡方的符号是希腊字母 χ^2, 自由度的符号是希腊文"υ", 不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"r", 不能误为希腊文"γ"。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号, 都是拉丁字母正体大写。在书刊上除校对疏漏外很少发生错误。离子态的是在右上角用"—"或"+"加数字表示。例如"Na^+、Ca^{2+}、P^{3-} 等等, 不采用 Ca^{++} 及 P^{---} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角, 例如: ^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 也写在左上角, 例如: ^{99m}Tc、^{133m}In。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称。不能写成[131]碘、[133m]铟、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快, 并已渗透到许多学科, 大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式, 要对符号的来源及其内涵有深刻的了解, 使用时不致发生错误, 例如: RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)三类。r、t、m 是表示类型的符号应小写, RNA 应大写。

(本刊编辑部)

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