DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.008
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0017-03

论著

17肽胃泌素及其受体拮抗剂L-365260对人胃癌细胞株SGC-7901生长的影响

唐卓斌,刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038)

提 要:目的 旨在探讨17肽胃泌素(G-17)及L-365260对人胃癌细胞生长的影响及其作用机制。方法 采用G-17及L-365260作用于人胃癌细胞株SGC-7901,通过MTT活细胞染色法检测细胞增殖抑制率,流式细胞仪检测Bcl-2和Bax蛋白表达。结果 G-17在1×10^{-9}~1×10^{-5} mol/L浓度范围内对SGC-7901细胞有明显促进作用。L-365260在1×10^{-8}~1×10^{-5} mol/L浓度范围内对SGC-7901细胞有明显抑制作用。L-365260可明显抑制G-17对SGC-7901细胞的促生长作用。G-17可使SGC-7901细胞中的Bcl-2蛋白表达显著增加,对Bax蛋白无影响。L-365260不仅可使SGC-7901细胞中的Bcl-2蛋白表达显著减少,而且还可使Bax蛋白表达显著增加。结论 G-17对人胃癌细胞生长具有促进作用,而L-365260则对其具有抑制作用。上调Bcl-2蛋白表达,以抑制SGC-7901细胞凋亡可能是G-17促进胃癌细胞生长的机制之一。L-365260可能通过下调Bcl-2、上调Bax蛋白表达,诱导SGC-7901细胞凋亡,以抑制癌细胞生长。

关键词:胃泌素;胃肿瘤;细胞凋亡;L-365260
中图法分类号:R347.92;R735.2 文献标识码:A

Effects of gastrin G-17 and its antagonist L-365260 on the growth of human gastric cancer cell line SGC-7901

TANG Zhuo-bin, LIU Wei-wen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038 China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of gastrin G-17 and its antagonist L-365260 on the growth of human gastric cancer cell line SGC-7901. Methods The cells were incubated in the medium with G-17, L-365260 and the combination of these two agents, respectively. The expressions of Bcl-2, Bax protein and cell growth inhibitory rate of the cells from every group were assessed with flow cytometry and MTT assay respectively. Results G-17 improved the growth of the SGC-7901 cells at the concentration of 1×10^{-9} to 1×10^{-5} mol/L. Within the concentration of 1×10^{-8} to 1×10^{-5} mol/L, L-365260 not only inhibited the growth of the cells, but also suppressed the promoting effect of G-17 on them. G-17 increased the expression of Bcl-2 protein, but had no effect on that of Bax protein in the cells. L-365260 not only decreased the expression of Bcl-2 protein, but also increased that of Bax protein in SGC-7901 cells. Conclusion G-17 has a promoting effect on gastric cancer cells, but L-365260 effects the cells in an inhibitory way. The mechanism of G-17 promoting the growth of gastric cancer cells is that it can up-regulate the expression of Bcl-2 protein and then the cell apoptosis is inhibited. L-365260 may induce apoptosis of SGC-7901 cells through down-regulating the expression of Bcl-2 and up-regulating the expression of Bax protein, and thus inhibit the growth of gastric cancer cells.

Key words: gastrin; gastric neoplasm; cell apoptosis; L-365260

胃泌素是一种多肽激素,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营养胃肠粘膜的作用。近年发现,胃泌素对多种胃肠道肿瘤有促生长作用。这种作用可被其受体拮抗剂所阻断,但不同拮抗剂对不同肿瘤细胞的生长抑制作用并不完全相同。因此,为了进一步了解胃泌素及L-365260对胃癌细胞生长的影响,探讨L-365260治疗胃癌的可能性,我们选用了人中分化胃癌细胞株SGC-7901,采用了噻唑氮蓝(MTT)比色分析法,研究了6种浓度的G-17及L-365260对SGC-7901生长的影响及其作用机制,以期为临床应用提供依据。

作者简介:唐卓斌(1966—),男,河北省邯郸市人,博士,主治医师,主要从事胃癌的发病机制及其防治方面的研究,发表论文10余篇,现在北京大学临床肿瘤学院北京市肿瘤防治研究所工作。电话:(010)66171122-2021

收稿日期:2000-05-08;修回日期:2000-09-09

1 材料和方法

1.1 主要试剂

17肽胃泌素(G-17)和MTT(四甲基偶氮唑蓝)均购自Sigma公司,L-365260由Manning教授惠增。RPMI 1640(GIBCO),人胃癌细胞株SGC-7901由本科培养。DMSO,上海硫酸厂产品,胰蛋白酶(Trypsin,华美公司)。胎牛血清(华西生物制品厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞株SGC-7901用含5%FCS的RPMI 1640培养基在37 ℃,5% CO_2条件下常规培养。

1.2.2 细胞增殖试验 用MTT法测定。选择对数生长期胃癌细胞,经0.25%胰酶消化后用2.5% FCS的RPMI 1640液调整细胞浓度为2×10^7/L,接种于96孔细胞培养板中,每孔200 μl,置37 ℃,5% CO_2条件下培养24 h后换为无血清的RPMI 1640液培养,再孵育24 h,使细胞同步化后分组进行以下试验:(1)空白组:不含细胞;(2)对照组:培养液不加药物;(3)胃泌素(G-17)组:17肽胃泌素终浓度分为1×10^{-10}~1×10^{-5} mol/L设

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

6 个浓度段；(4)L-365260 组：设终浓度为 $1\times10^{-10}\sim1\times10^{-5}$ mol/L 6 个浓度段；(5)G-17(1×10^{-7})＋L-365260 组：L-365260 设终浓度为 $1\times10^{-10}\sim1\times10^{-5}$ mol/L 6个浓度段。每个浓度3个复孔。培养24小时后加入MTT液(5 mg/ml)20 μl，37 ℃，继续孵育4 h，弃上清液，每孔加入DMSO 150 μl，振荡10 min，于30 min内在酶联免疫检测仪上选择490 nm波长测定各孔光吸收值(D_λ)。按下述公式计算细胞生长抑制率(Inhibition rate，IR)和细胞增殖率(Proliferation rate，PR)：

$$\text{抑制率(IR)}=\frac{\text{对照 } D_\lambda-\text{实验 } D_\lambda}{\text{对照组 } D_\lambda-\text{空白 } D_\lambda}\times100\%$$

$$\text{增殖率(PR)}=(1-\text{抑制率})\times100\%$$

1.2.3 流式细胞仪检测Bax和Bcl-2蛋白表达 选择对数生长期胃癌细胞，用2.5%FCS的RPMI 1640液调整细胞浓度为4.5×10^8个/L接种于6孔培养板中，每孔1.5 ml，实验分3组：(1)对照组；(2)G-17组；(3)L-365260，每组设3个复孔。待胃癌细胞生长于对数生长期，每孔分别加入终浓度均为1×10^{-7} mol/L的G-17、L-365260，分别继续无血清培养12 h，结束培养时，经0.25%胰蛋白酶消化后，离心，PBS漂洗细胞2次，加入1∶100稀释的一抗100 μl，在37 ℃恒温水浴中温育30 min，PBS洗2次，然后加入1∶20稀释的FITC标记的二抗100 μl，37 ℃水浴30 min，PBS洗2次，离心，去上清液，除去未结合的多余荧光抗体。加入1.0 ml PBS，经400目滤网过滤，上机检测(流式细胞FACS420为美国BD公司产品)。测量数据及图形输入计算机，应用相应程序软件进行资料处理，测定前以鸡血红细胞标准样品调整仪器的*CV*值在5%以内。设未处理的胃癌细胞为空白对照。

1.3 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，用t检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 胃泌素(G-17)对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响

$1\times10^{-9}\sim1\times10^{-5}$ mol/L的胃泌素(G-17)作用于SGC-7901细胞24 h后，可显著刺激胃癌细胞的增殖，1×10^{-10} mol/L的胃泌素对胃癌细胞增殖无明显作用($P>0.05$)，见表1。

表1 G-17对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响

Tab 1 Effects of G-17 on the proliferation of SGC-7901 cells

G-17(C_B/mol·L^{-1})	D_{490}	IR	PR
Control	0.463±0.111	—	—
1×10^{-5}	0.633±0.111	−36.72	136.72**
1×10^{-6}	0.603±0.009	−30.24	130.24**
1×10^{-7}	0.587±0.013	−26.78	126.78**
1×10^{-8}	0.550±0.011	−18.79	118.79**
1×10^{-9}	0.503±0.004	−8.64	108.64*
1×10^{-10}	0.490±0.007	−5.83	105.83

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.2 L-365260对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响

L-365260在$1\times10^{-8}\sim1\times10^{-5}$ mol/L浓度范围内，可显著抑制胃癌细胞SGC-7901的增殖。而L-365260在$1\times10^{-10}\sim1\times10^{-9}$ mol/L浓度范围内，对SGC-7901细胞的增殖抑制作用差异无显著性($P>0.05$)，见表2。

表2 L-365260对SGC-7901细胞增殖的影响

Tab 2 Effects of L-365260 on the proliferation of SGC-7901 cells

L-365260(C_B/mol·L^{-1})	D_{490}	IR
Control	0.463±0.111	—
1×10^{-5}	0.313±0.011	32.40**
1×10^{-6}	0.350±0.007	24.41**
1×10^{-7}	0.403±0.013	12.96**
1×10^{-8}	0.420±0.008	9.29*
1×10^{-9}	0.446±0.06	4.97
1×10^{-10}	0.457±0.004	1.30

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.3 G-17(1×10^{-7} mol/L)＋L-365260对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响

$1\times10^{-8}\sim1\times10^{-5}$ mol/L的L-365260可明显抑制G-17(1×10^{-7} mol/L)对SGC-7901细胞的促生长作用，见表3。

表3 G-17(1×10^{-7})＋L-365260对SGC-7901细胞增殖的影响

Tab 3 Effects of G-17(1×10^{-7})＋L-365260 on the proliferation of SGC-7901 cells

G-17(1×10^{-7})＋L-365260 (C_B/mol·L^{-1})	D_{490}	IR
Control	0.587±0.009	—
1×10^{-5}	0.417±0.016	28.96**
1×10^{-6}	0.457±0.009	22.15**
1×10^{-7}	0.527±0.011	10.22**
1×10^{-8}	0.534±0.009	9.07*
1×10^{-9}	0.557±0.018	5.11
1×10^{-10}	0.570±0.130	2.90

*：$P<0.01$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.4 L-365260和G-17对SGC-7901细胞中Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

经1×10^{-7} mol/L的L-365260处理的胃癌细胞，其Bcl-2蛋白表达显著减少，而Bax蛋白表达则显著增加($P<0.01$)。经1×10^{-7}mol/L的G-17处理的胃癌细胞，Bcl-2蛋白表达显著增加($P<0.01$)，而Bax蛋白则差异无显著性，见表4。

表4 L-365260和G-17对SGC-7901细胞中Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

Tab 4 Effects of L-365260 and G-17 on the expression of Bcl-2 and Bax proteins

Group	Bcl-2 protein		Bax protein	
	Positive cells(%)	Mean fluorescent intensity	Positive cells(%)	Mean fluorescent intensity
Control	64.2 ±1.80	3.59±0.03	66.13±1.96	3.46±0.07
L-365260	54.83±1.51**	3.27±0.02	74.17±0.91*	4.46±0.14*
G-17	84.50±1.73**	5.53±0.08**	64.43±2.24	4.08±0.19

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

3 讨论

胃泌素是一种多肽激素，主要由胃肠道G细胞分泌，与胃泌素受体特异性结合，主要具有刺激胃酸分泌和对胃肠粘膜的营养作用。已有研究表明，胃泌素可

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

促进肿瘤细胞生长[1,2]。而胃泌素受体拮抗剂丙谷胺和 L-365260 可抑制胃癌细胞的生长[3,4]，本研究结果表明，17 肽胃泌素(G-17)可显著促进胃癌细胞生长，而胃泌素受体拮抗剂 L-365260 则可显著抑制胃癌细胞的生长，并可抑制 G-17 对胃癌细胞的促生长作用。

近年来，通过对生物细胞凋亡通路的深入研究，已经证明，细胞凋亡过程的紊乱与肿瘤的形成密切相关[5]。Bcl-2 和 Bax 是调控细胞凋亡的一对基因，Bax 是编码 Bcl-2 相关蛋白 X 的基因，Bax 蛋白与 Bcl-2 蛋白大约有 21%的同源性，具有对抗 Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的作用。目前关于 G-17 促癌机制和 L-365260 抑癌机制的研究较少。我们从 G-17 和 L-365260 对细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的调控角度控讨了其作用机制。结果发现，G-17 可显著上调 Bcl-2 蛋白表达，而对 Bax 蛋白则无调变作用。L-365260 不仅可显著下调 Bcl-2 蛋白表达，而且还可显著上调 Bax 蛋白表达。表明 G-17 可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达、以抑制胃癌细胞凋亡。而 L-365260 则可能通过下调 Bcl-2 蛋白表达、上调 Bax 蛋白表达以诱导胃癌细胞凋亡。我们认为 G-17 通过上调 Bcl-2 蛋白表达以抑制凋亡，可能是其促癌机制之一。而 L-365260 通过下调 Bcl-2 蛋白表达和上调 Bax 蛋白表达以诱导胃癌细胞凋亡，可能是其抑癌机制之一。该结果为临床应用胃泌素受体拮抗剂治疗胃癌提供了实验和理论依据。

参考文献：

[1] Iwase K, Evers B M, Hellmich M R, *et al*. Regulation of growth of human gastric cancer by gastrin and glycine-extended progastrin[J]. Gastroenterol, 1997, 113(3): 782－790.

[2] Smith J P, Fantaskey A P, Liu G Z, *et al*. Identification of gastrin as a growth peptide in human pancreatic cancer[J]. Am J Physiol, 1995, 268(37): R135－R141.

[3] 王俊平，黄乃霞，黄象谦，等. 胃泌素及其受体拮抗剂对 BGC-823 细胞系生长的调节[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，1996, 5(4): 276－279.

[4] 李哲夫，王德照，乐竹琴，等. 胃泌素受体拮抗剂对胃癌细胞株生长的抑制作用[J]. 中华实验外科杂志，1995, 12(2): 81－82.

[5] Solary E, Dubrez L, Eymin B. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Eur Respir J, 1996, 9(6): 1 293－1 305.

(编辑 薛国文)

文章编号：1000-5404(2001)01-0019-01

经验与短篇

以精神异常为首发症状的破伤风 1 例报告

Report a case of tetanus with mental disorder as initial symptom

范文辉[1]，张 帆[1]，张 博[2] ([1] 第三军医大学附属西南医院神经内科，重庆 400038；[2] 沈阳军区 205 医院内四科，锦州 121001)

患者男，41 岁，乡村医生。因“记忆力下降 10 d，精神行为异常 6 d”入院。入院前 10 天病人不明原因出现记忆力下降，4 d 后出现胡言乱语，冲动伤人毁物。当地医院头颅 CT 检查未见异常，以精神障碍治疗无效，并出现低热，遂来我院就诊，门诊以“脑炎”收住院。既往健康，家族中无精神病患者。

体检：T 37.5 ℃，Bp 15/10 kPa 谵妄状态，表情痛苦，牙关紧闭，颈硬，双侧瞳孔等大等圆，对光反射存在，全身肌张力高，腱反射亢进，病理反射未引出。全身皮肤无皮疹，浅表淋巴结无肿大，双肺呼吸音粗，未闻及干湿罗音，肝脾不大。X 线胸片示双肺纹理增多；头颅 MRI 无异常发现；脑电图正常。血沉 8 mm/h；WBC 16.4×10^9/L，中性 0.84，淋巴 0.16；脑脊液检查正常。肝功能正常，尿便常规正常，血培养无细菌生长。

入院后静滴阿昔诺韦、甲基强的松龙，口服氯丙嗪等镇静解痉药物治疗，发热及精神症状无缓解。3 d 后，病人出现高热，全身性肌肉痉挛，并出现窒息性抽搐发作，紫绀，呼吸道分泌物多，即行气管切开，加强抗感染及输注血浆等支持治疗。2 d 后体温降低，但阵发性肌肉痉挛无好转且易激惹，间歇期全身肌肉仍处于强直状态，发作后原有痉挛加剧，伴发作性牙关紧闭，遂考虑有破伤风可能，应用 TAT8 万单位＋5%GS 500 ml 静脉滴注，每日 1 次，共治疗 3 次后上述症状完全消失。追问病史，1 月前曾被锈钉刺伤右足底，自行处理后包扎，未注射破伤风抗毒素(TAT)，伤口愈合。诊断遂明确。

讨论

破伤风是破伤风杆菌经伤口侵入人体后引起的一种毒血症，细菌所含的痉挛毒素通过神经系统作用于随意肌，引起痉挛及抽搐，以牙关紧闭、局部或全身肌肉强直性和阵发性痉挛为其临床特征[1]。目前认为细菌外毒素经伤口周围的运动终板沿轴突经脊神经进入脊髓、延髓和大脑。毒素进入中枢神经系统以后，脑和脊髓充血、水肿。典型发作的破伤风诊断并不困难。根据受伤史及临床症状，一般可及时作出诊断。但对某些病例外伤史不明确，发病早期仅有前驱症状或症状表现不典型者，诊断较困难易误诊[2]。

本病的基本特征是以牙关紧闭为突出表现的全身性肌肉痉挛，具体有如下特点：① 肌肉痉挛有自头面部至躯干至四肢的发作顺序，但痉挛早期并非全部如此；② 肌肉痉挛呈发作性，且随时间延长，发作次数增加，持续时间延长，严重者可发生喉痉挛，如发作时间过长，可引起突然窒息死亡；③痉挛间歇其全

(下转 23 页)

作者简介：范文辉(1968－)，男，河南省郑州市人，硕士，主治医师，主要从事脑血管性痴呆方面的研究，发表论文 10 篇。电话：(023)68753750

收稿日期：2000-04-15；修回日期：2000-11-21

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