DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.006
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
112 2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0112-03

胃泌素对人结肠癌裸鼠移植瘤的促增殖作用

何双梧,赵言明,沈康强 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

提 要 目的:为探讨胃泌素对人结肠癌裸鼠移植瘤的作用及机制。方法:建立人结肠癌SW480细胞株裸鼠移植瘤模型,观察在5肽胃泌素(PG)作用下移植瘤的体积和重量的变化;采用放射免疫法测瘤细胞内cAMP含量;用流式细胞术测DNA、蛋白质和细胞周期。实验动物随机分为2组:PG组(皮下注射PG每只4 μg,2/日)及对照组(皮下注射生理盐水,每只0.4 ml,2/日),每组5只裸鼠,连续用药35 d。结果:移植瘤的体积、重量,瘤细胞内cAMP、DNA、蛋白质含量PG组均显著高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$),PG组G_0/G_1期细胞数显著低于对照组($P<0.01$),而S期、G_2M期细胞数和增殖指数均显著高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:胃泌素在体内具有促进人结肠癌SW480细胞株分裂和增殖的作用,这种作用是通过增加cAMP、DNA和蛋白质的含量,从而促进癌细胞从G_0/G_1期进入到S期和G_2M期。本实验为结肠癌病人施行内分泌治疗提供了实验依据。

关键词 结肠癌;胃泌素;裸鼠;移植瘤
中图法分类号 R347.921;R735.35 文献标识码 A

Promoting effects of gastrin on transplanted human colonic carcinoma in nude mice

HE Shuang-wu, ZHAO Yan-ming, SHEN Kang-qiang (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract Objective: To study the effects of gastrin on the transplanted human colonic carcinoma in the body of nude mice. Methods: After the transplantation of human colonic carcinoma cell line SW480 into the body of nude mice, the mice of the PG group (5 mice) received hypodermical injection of pentagastrin (4 μg, bid) and those of the control group received saline injection. The changes of the size and weight of the transplanted carcinoma were measured. The cAMP content of the carcinoma cells was determined with radioimmunoassay. DNA, protein content and cell cycle were observed with flow cytometry. Results: The size and weight of the transplanted carcinoma and the content of cAMP, DNA and protein of the carcinoma cells were significantly higher in the PG group than those in the control ($P<0.05$, $P<0.01$). The number of cells in the G_0/G_1 phase was significantly lower in PG group than in the control ($P<0.01$) and the cell number and proliferation index in the S and G_2M phases were markedly higher in the PG group than in the control ($P<0.05$, $P<0.01$). Conclusion: Gastrin exerts a promoting effect on the cell division and proliferation of human colonic carcinoma cell line SW480 in mice. The mechanism might be that gastrin promotes the synthesis of cAMP, DNA and protein in the carcinoma cells and then accelerates the cell growth from G_0/G_1 to S and G_2M phase. Our findings provides theoretical basis for the hormone therapy for colorectal carcinoma.

Key words colonic carcinoma; gastrin; nude mice; transplantation

通过建立人结肠癌SW480细胞株裸鼠移植瘤模型,观察在5肽胃泌素(Pentagastrin, PG)作用下,移植瘤的体积、重量,瘤细胞内环磷酸腺苷(cAMP)、DNA和蛋白质含量及细胞周期动力学,以探讨胃泌素对人结肠癌移植瘤的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌SW480细胞株(美国纪念斯隆-凯特林癌症中心

作者简介:何双梧(1936.11),女,湖南省郴州市人,主任医师,教授,主要从事胃肠肿瘤与胃肠激素及性激素的关系方面的研究,发表论文56篇。电话:(023)68757268

收稿日期:1999-02-20,修回日期:1999-08-11

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

建株, 重庆医科大学病理生理学教研室提供)、BALB/C 裸小鼠(第三军医大学实验动物中心), 5 肽胃泌素(上海丽珠生化试剂公司)、cAMP 放免分析试剂盒(上海第二医科大学核医学教研室)。

1.2　移植瘤模型的建立

将人结肠癌 SW480 细胞株按常规方法复苏, 初代移植瘤采用生长旺盛的细胞消化后, 离心去消化液, 调整细胞浓度为 5×10^6/ml, 台盼蓝染色活细胞计数>99%。取裸鼠 12 只, 鼠龄 4~6 周, 体重 18~22 g, 雌雄兼用, 分 6 次传代, 每次 2 只, 在其颈部背侧皮下接种瘤细胞液 0.2 ml, 饲养于净化室内。初代肿瘤潜伏期 6~10 d, 待肿瘤直径长至 1.5~2.2 cm, 断颈椎处死, 无菌剥离瘤体, 留取组织学及电镜标本后, 剪碎, 加 RPMI 1640 培养液, 研磨成细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^6/ml, 取 0.2 ml 按上述方法接种传代。

1.3　实验分组

经传代后, 生长稳定的人结肠癌移植瘤按前述方法接种于 10 只裸鼠, 随机分为 2 组(对照组: 皮下注射生理盐水, 每只 0.4 ml, 2/d; PG 组: 皮下注射 PG, 每只 4 μg, 2/d), 每组 5 只, 接种次日开始给药, 连续用药 35 d, 末次用药后 24 h 处死裸鼠。

1.4　检测方法

1.4.1　移植瘤体积　　接种后每 6 d 同一时间测量一次移植瘤的长径(a)、短径(b), 按公式体积 $V=1/2a^2b$ 计算体积, 连续观察 6 周。

1.4.2　移植瘤瘤重　　将剥出的肿瘤去除血污、脂肪等非瘤组织, 测量瘤重。

1.4.3　病理组织学及超微结构　　取第 6 代移植瘤组织, 福尔马林固定, 常规石蜡包埋、切片, HE 染色, 光镜下观察。将第 6 代移植瘤低温下切取 1 mm×1 mm×1 mm 大小组织 2 块, 6%戊二醛和 1%锇酸固定, 丙酮脱水, EPON-812 包埋, 超薄切片, 钾-铅染色, 在 300 型透射电子显微镜下观察。

1.4.4　移植瘤细胞内 cAMP 含量测定　　称取 50 mg 湿重瘤组织, 剪碎, 加入 1 mol/L 的过氯酸 1 ml, 匀浆后离心, 加 20% KOH 中和后再离心, 取上清液 50 μl, 按试剂盒说明测 cAMP, 结果以 pmol/mg 表示。

1.4.5　流式细胞术　　切取移植瘤组织约 15 mg, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^6/ml, 4℃、70%乙醇固定。用碘化丙啶(PI)染色 DNA 呈红色荧光, 异硫氰酸(RITC)染色蛋白质呈绿色荧光, 置室温 30 min 后上机分析。采用 Barlogie 细胞周期分析法, 将处于不同时期的细胞分成 3 部分, 即 G_0/G_1 期、S 期和 G_2M 期。细胞增殖指数(PI)按公式 $PI=(S+G_2M)/(G_0/G_1+S+G_2M)\times100\%$。

1.4.6　统计学处理　　数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　人结肠癌裸鼠移植瘤模型及生物学特性

移植瘤接种成功率为 100%, 无一只死亡, 移植瘤生长速度至第 6 代基本稳定, 潜伏期 6~8 d, 第 5 周末肿瘤长达可达 1.6~2.0 cm, 早期为椭圆形, 表面光滑, 后期为不规则形, 表面呈结节状。移植瘤组织学 HE 染色及超微结构具有人结肠癌的病理组织学特征。

2.2　PG 对人结肠癌裸鼠移植瘤的作用

实验结束时荷瘤鼠全部成活。移植瘤的体积、瘤重 PG 组显著高于对照组 ($P<0.01$, $P<0.05$), 见表 1。移植瘤细胞内 cAMP、DNA、蛋白质含量 PG 组显著高于对照组($P<0.01$), 见表 2。移植瘤 PG 组 G_0/G_1 期细胞数低于对照组($P<0.01$), 而 S 期、G_2M 期细胞数、增殖指数(PI)均显著高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 3。

表 1　PG 对人结肠癌裸鼠移植瘤体积、重量的影响($n=5$)

Tab 1　Effect of PG on the volume and weight of transplanted carcinoma ($n=5$)

Group	Volume(mm^3)	Weight(g)
Control	1765.54±35.68	3.04±0.13
PG	1926.10±97.92**	3.37±0.21*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

表 2　PG 对人结肠癌裸鼠移植瘤细胞内 cAMP、DNA、蛋白质含量的影响($n=5$)

Tab 2　Effect of PG on the cAMP, DNA, protein content of transplanted carcinoma cell($n=5$)

Group	cAMP(pmol/mg)	DNA(U)	Protein(U)
Control	2.74±0.14	946.56±16.31	363.86±11.64
PG	3.18±0.23**	1003.78±16.86**	675.28±17.8**

**: $P<0.01$ *vs* control group

表 3　PG 对人结肠瘤裸鼠移植瘤细胞周期和增殖指数的影响($n=5$)

Tab 3　Effect of PG on the cell cycle, proliferation index of transplanted carcinoma cell($n=5$)

Group	G_0/G_1	S	G_2M	PI(%)
Control	64.92±1.72	18.24±1.20	16.84±2.35	35.08±1.72
PG	59.22±1.18**	20.16±1.06*	20.62±2.05*	40.78±1.81**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

3　讨论

胃泌素的生理功能是刺激胃酸分泌和对胃肠粘膜的营养作用。近年来研究发现胃肠肿瘤有胃泌素基因的表达[1], 瘤细胞膜上存在胃泌素受体, 胃泌素可刺激胃肠肿瘤的生长, 特别是胃泌素与结肠癌的关系是人们研究的热门课题。

本实验建立的人结肠癌 SW480 裸鼠移植瘤模型, 保持了结肠癌生物学特性, 且皮下成瘤, 便于观察胃泌

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

素对人结肠癌裸鼠移植瘤生长的影响。结果裸鼠移植瘤皮下注射 5肽胃泌素每只 8 μg/d,连续 35 d 后,移植瘤的体积、重量和癌细胞内 cAMP 含量均明显高于对照组, 表明 5肽胃泌素促进了结肠癌移植瘤的增殖。Ishizuka 等[2]报告胃泌素与其受体结合后可增加癌细胞内 cAMP 水平,通过 cAMP 或蛋白激酶 C 等信息传入癌细胞内,以调控细胞的生长和分化。Mauss 等[3]发现对结肠癌细胞的促生长作用是有选择性的, 17肽胃泌素可刺激 HT29、LoVo、CoLo32 等细胞株的生长,却抑制 T84、HCT116 细胞株的生长。这种差异决定于 cAMP 依赖性蛋白激酶的性质和量, Ⅰ型 cAMP 蛋白激酶表达增强,可促进癌细胞分化和生长,而Ⅰ型 cAMP 蛋白激酶减少或Ⅱ型 cAMP 蛋白激酶增加, 则抑制瘤细胞的分化和生长[4]。Baldwin 等[5]报告胃泌素可促进体内 50%的结肠癌移植瘤生长。

我们还应用流式细胞术测定移植瘤细胞内 DNA、蛋白质含量和细胞周期,结果 5肽胃泌素组 DNA 和蛋白质含量均明显高于对照组, G_0/G_1 期细胞数明显低于对照组,而 S 期、G_2M 期细胞数和增殖指数均显著高于对照组,与我们体外实验结果相一致[6],表明胃泌素促进人结肠癌 SW480 细胞株分裂增殖是通过增加 cAMP、DNA 和蛋白质的含量,从而促进癌细胞从 G_0/G_1 期进入到 S 期和 G_2M 期。

结肠癌是常见的恶性肿瘤,病人就诊时多为中、晚期,为进一步提高疗效,选择对胃泌素敏感的结肠癌病人,采用胃泌素受体拮抗剂如丙谷胺、生长抑素等进行辅助治疗,可望提高病人的生存率。

参考文献

[1] 王和明. 胃泌素在恶性肿瘤中的作用[J]. 国外医学:外科学分册, 1997, 24(3): 132—134.

[2] Ishizuka J, Townsend J R, Richard J. Effects of gastrin on 3′,5-cyclie adenosine monophosphate, inyracellular calcium and phosphatidylinositol hydrolysis in human colon cancer cells[J]. Cancer Res, 1994, 54(8):2 129—2 131.

[3] Mauss S, Niederau C, Hengels K. Effects of gastrin, proglumide, loxiglumide and L-365, 260 on growth of human colon carcinoma cells[J]. Anticancer Res, 1994, 14(1A):215—217.

[4] Chochung Y S, Clair T, Tortora G. Suppession of malignancy targeting the intracellular signal transducing proteins of cAMP: The use of site-selective cAMP analogs antisense straegy and gene transfer[J]. Life Sci, 1991, 48(12):1 123—1 125.

[5] Baldwin G S, Whitehead R H. Gut hormone growth and malignancy[J]. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1994, 8(1):185—187.

[6] Shen K Q, He S W, He Y J. Effect of proglumide, a gastrin receptor antagonist, on human large intestine carcinoma SW480 cell line[J]. Chinese Medical Journal, 1998, 111(12):1 075—1 077.

(编辑 冷怀明)

(上接 111页)

3 治疗结果

63例患者术后 5 d折线,眉部均仅见一隐约的线形瘢痕,术后随访 1~3月,或者重新纹眉,或描眉,切口处瘢痕不显,受术者非常满意。

4 典型病例

患者:刘传香,女, 48岁,纹眉后蓝眉,切眉后的切口处瘢痕细小不显,效果极佳。

5 讨论

纹眉可起到美容作用,并可达永久的效果,摆脱天天描眉的烦恼,避免公共场合脱妆、污妆及上妆的尴尬。由于术者的审美意识的不同,操作技术经验及熟练程度不同,纹刺药液选择配制不同, 具效果不尽相同, 常见纹眉并发症主要有眉形宽大不美,颜色变蓝[1],本组 3例均为蓝眉或眉形不美,或因上述原因洗眉造成眉部瘢痕增生者。纹眉并发症治疗通常采用激光洗眉, 而激光洗眉又有疤痕形成, 多次洗眉的并发症且价格较贵。眉部软组织结构分皮肤、浅筋膜层、肌层、腱膜层、眉脂肪垫、帽状腱膜下隙、骨膜[2]。我们采用切口法治疗纹眉并发症,切口仅达皮下组织层,不伤及肌肉,出血少,创伤小,愈合快。由于切除了部分皮肤,直接拉紧缝合,还可以起到除皱作用[3],对中老年患者一举两得,切眉后患者可以描眉或重新纹眉,瘢痕又不显,患者易于接受且纠正了并发症,达到了满意的效果。

关键词 切眉法;纹眉

中图法分类号 R622 文献标识码 B

参考文献

[1] 丁芷林 编著. 美容整形手术并发症[M]. 北京:北京出版社, 1994. 217—240.

[2] 李福耀 主编. 医学美容解剖学[M]. 北京:北京人民卫生出版社, 1999. 185-186.

[3] 查元坤,戴永贵 主编. 现代美容外科学[M]. 北京:人民军医出版社, 1995. 155—161.

(编辑 潘式文)

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