DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.013

三磷酸肌醇、钙离子在胃泌素促人结肠癌 SW480细胞株增殖中的作用

谢 斌* 何双梧 (第三军医大学附属大坪医院普通外科) 重庆, 400042

提 要 目的: 探讨胃泌素对人结肠癌细胞株 SW480内三磷酸肌醇 (IP_3)、钙离子 (Ca^{2+})的影响及其在细胞增殖中的作用,为结肠癌抗信息传导治疗提供实验依据。方法:① ^3H-肌醇标记细胞进行 IP_3分析。② 应用 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fura-2检测细胞内 Ca^{2+} 的浓度。③ MTT比色分析法检测活细胞数(吸光度 A 值)。结果: 5肽胃泌素 (Pentagastrin, PG)可使 SW480细胞内 IP_3、Ca^{2+} 水平升高,同时活细胞数 A 值增加; 5肽胃泌素与其受体拮抗剂丙谷胺 (Proglumide, PGL)合用时,癌细胞内 IP_3、Ca^{2+} 水平和活细胞数 A 值均无明显变化。结论: 提示胃泌素可能通过肌醇脂质信号传导途径促进人结肠癌细胞株 SW480的增殖。

关键词 胃泌素;三磷酸肌醇;钙离子;结肠肿瘤;细胞系
中图法分类号 R735.35

胃泌素依赖肌醇磷脂跨膜转导其生物信号,肌醇脂质信号系统在生物信号的跨膜传递方面起着重要作用,并与细胞增殖及肿瘤形成密切相关[1]。关于胃泌素促进结肠癌细胞生长的细胞内肌醇脂质信号转导机制尚不清楚,本研究从细胞信号转导方面探讨胃泌素对结肠癌细胞的促生长作用,为结肠癌抗信息传导治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

5肽胃泌素 (PG,上海丽珠生化试剂公司); [^3H]-myo-肌醇 (中国科学院上海原子能研究所) Fura-2/AM(SIGMA); MTT (FLUKA,瑞士);丙谷胺 (PGL,上海制药十一厂); RPMI 1640培养基 (GIBCO);液体闪烁液 (第三军医大学附属大坪医院药剂科);人结肠癌细胞株 SW480(美国幻念斯隆-凯特林癌症中心)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结肠癌细胞株 SW480培养于含 10%小牛血清的 RPMI 1640培养液中, 37℃、5% CO_2条件下生长,细胞培养至对数生长期时接种在培养瓶中继续培养,于倒置显微镜下观察,选择合适时相实验。

1.2.2 实验分组 实验分为对照组、PG组、PG+ PGL组。

1.2.3 细胞内 IP_3测定 按文献 [2],略加改进。在细胞悬液 (× 10^6 cell/ml)中加入 [^3H]肌醇 (5μCi/ml)箱孵育 18 h, 20 mmol/L LiCl作用 2 h,然后加入不同处理因素作用 1 min,氯仿/甲醇 (v/v, 1∶2)终止反应抽提肌醇磷酸。Dowex× 8AG型微型阴离子交换层析柱分离 IP_3,采用液闪计数仪测其 Bq计数。

1.2.4 细胞内 Ca^{2+} 测定 按文献 [3],略加改进。在细胞悬液 (× 10^6 cell/ml)中加入 5μmol/L fura-2/AM,混匀。孵育 60 min, 150 g离心 5 min,弃培养液,平衡盐溶液重悬。置石英杯, 37℃测其 340/380 nm的荧光强度值;加入不同处理因素后测其荧光强度值 F,再依次加入 0.1% TritonX-100, 3 mmol/L EGTA,分别测得最大荧光强度值 F_{max}、最小荧光强度值 F_{min},依据公式计算 $[Ca^{2+}]_i = Kd \times (F - F_{min})/(F_{max} - F)$ (nmol/L), Kd = 220 nmol/L。

1.2.5 MTT比色分析法[4] 测定活细胞数 (Viable cell count, VCC)。细胞培养第 24小时,吸去上清液,每孔加入无血清培养液 100μl,继续培养 24 h 吸去上清液,每孔加入 0.5%小牛血清培养液 100μl,第 1孔为空白对照,第 2孔为细胞对照,分别加入 0.5%小牛血清培养液 100μl,第 3孔以后每孔加入不同浓度处理因素 100μl,加样结束后,置 37℃、5% CO_2培养箱继续培养 72 h,结束培养前 6 h,向各孔加入 MTT应用液 10μl, 37℃孵育 6 h,从每孔中吸去 100μl上清液,每孔加入 20% SDS 100μl,于培养箱中过夜,用酶标仪测定 570 nm波长处吸光度 (A)。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 Excel 6.0版专用统计分析程序对各组数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 5肽胃泌素、丙谷胺对人结肠癌细胞株 SW480细胞内 IP_3的影响

当 5肽胃泌素浓度为 6.25μg/ml时, IP_3即出现增高,当 5肽胃泌素浓度为 25μg/ml时, IP_3增高明显,与对照组比差异非常显著 ($P < 0.01$)。当 5肽胃泌素浓度为 50μg/ml时, IP_3不再增高,见表 1。

2.2 5肽胃泌素、丙谷胺对人结肠癌细胞株 SW480细胞内 $[Ca^{2+}]_i$的影响

当 5肽胃泌素浓度为 6.25μg/ml时,细胞内 Ca^{2+} 浓度即出现增高,当 5肽胃泌素浓度为 25μg/ml时,细胞内 Ca^{2+} 浓度增高明显,与对照组比差异非常显著 ($P < 0.01$),当 5肽胃泌素浓度为 50μg/ml以上时,细胞内 Ca^{2+} 浓度不再增高,但与对照组

* 谢 斌,男, 30岁,住院医师,硕士

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

比差异仍非常显著($P < 0.01$);当 5肽胃泌素(25μg/ml)与丙谷胺(32μg/ml)合用时,细胞内 Ca^{2+} 浓度为 31.79 nmol/L,与对照组比差异不显著($P > 0.05$),见表 1.

2.3　5肽胃泌素、丙谷胺对人结肠癌细胞株 SW480活细胞数(A)的影响

当 5肽胃泌素浓度为 6.25μg/ml时,A 值即出现增高,当 5肽胃泌素浓度为 25μg/ml时,A 值增加显著,与对照组比差异非常显著($P < 0.01$),当 5肽胃泌素浓度为 50μg/ml以上时,A 值不再继续增加;当 5肽胃泌素(25μg/ml)与丙谷胺(32μg/ml)合用时,A 值明显低于 5肽胃泌素(25μg/ml)组($P < 0.05$),与对照组比差异不显著($P > 0.05$),见表 1.

表 1　胃泌素对人结肠癌细胞株 SW480细胞内 IP_3(cpm△/10^6 cells)、$[Ca^{2+}]i$(nmol/L)、活细胞数(A)的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　The effects of gastrin on IP_3(cpm△/10^6 cells), $[Ca^{2+}]i$(nmol/L), VCC(A) in SW480 ($\bar{x} \pm s$)

Group	IP_3 (n = 6)	$[Ca^{2+}]i$(nmol/L) (n = 4)	VCC(A) (n = 8)
Control	8.83± 1.33	26.36± 2.91	1.554± 0.009
PG+ PGL PG(μg/ml)	9.00± 1.58	31.79± 4.41	1.546± 0.011
6.25	10.17± 1.33	30.6± 2.16	1.555± 0.005
12.5	11.17± 0.75**	50.69± 2.30**	1.563± 0.010
25.0	16.17± 0.75**	101.44± 2.49**	1.580± 0.011**
50.0	14.17± 1.60**	70.63± 4.17**	1.579± 0.008**
100	13.00± 2.53**	62.59± 2.59**	1.578± 0.010**

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

△: 1 cpm= 30.72 Bq

2.4　胃泌素作用于人结肠癌细胞株 SW480后 IP_3, $[Ca^{2+}]i$, VCC(A)的比较

随着 PG浓度的升高,IP_3、Ca^{2+}、VCC(A)也分别升高,三者在 PG浓度为 25μg/ml时均达到一个峰值.随着 PG浓度的进一步升高,呈递减趋势.当 PG(25μg/ml)与 PGL(32μg/ml)合用时,IP_3、Ca^{2+}、VCC(A)与对照组比差异均不显著($P > 0.05$),见图 1.

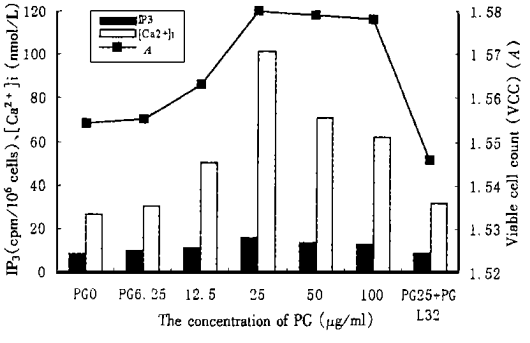


图 1　胃泌素作用于人结肠癌细胞株 SW480后 IP_3, $[Ca^{2+}]i$, VCC(A)的比较

Fig 1　Comparision of IP_3, $[Ca^{2+}]i$, VCC(A) after PG acting on SW480

3　讨论

目前已公认磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸(Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, PIP_2)是生成第二信使 IP_3及 DG的直接前体.IP_3结合到内质网的专一性受体上,从而打开离子通道,释放出 Ca^{2+} 进而通过 Ca^{2+} 信号系统完成各种细胞效应.胞浆中游离 Ca^{2+} 的升高是重要的促有丝分裂信号,而许多肿瘤的发生、发展与 Ca^{2+} 有关,应用 Ca^{2+} 拮抗剂后能够抑制肿瘤的发生和转移[5].胃泌素是由胃幽门窦 G细胞分泌的一种多肽类激素,目前已明确它对有些结肠癌细胞株也有营养作用[6].本实验采用 [^{3}H]-myo-肌醇标记人结肠癌细胞株 SW480细胞悬液,观察不同浓度 5肽胃泌素对癌细胞内 IP_3(Bq/10^6cells)的影响,同时还检测 5肽胃泌素对癌细胞内 Ca^{2+} 的影响.将不同浓度 5肽胃泌素作用于癌细胞,引起 IP_3、Ca^{2+} 浓度的变化,二者的改变均与 5肽胃泌素的浓度呈一定的剂量依赖关系,而且胞内 Ca^{2+} 浓度的升高基本上是与 IP_3的升高成正相关,与 Ishizuka等[3]的结果一致.我们还应用了胃泌素受体拮抗剂丙谷胺观察其对癌细胞中 IP_3、Ca^{2+} 浓度的影响,结果 IP_3、Ca^{2+} 浓度的变化与对照组相比无显著性差异,表明 5肽胃泌素通过受体介导途径来影响 IP_3、Ca^{2+} 浓度的变化.采用 MTT比色分析法研究了 5肽胃泌素对人结肠癌细胞株 SW480活细胞数的影响,结果表明 5肽胃泌素能促进该细胞株的生长,这与 Kiss的实验结果[7]一致.而当 5肽胃泌素(25μg/ml)+ 丙谷胺(32μg/ml)合用时,这种效应则受到抑制.

在肿瘤细胞中或者组织中肌醇磷脂代谢增强[8].Yassin等[9]报道 17肽胃泌素(10 nmol/L)可以引起鼠结肠上皮细胞内 IP_3浓度迅速而短暂的升高,Ishizuka等[3]研究发现,胃泌素促进人胃癌 AGS细胞生长是通过胃泌素与其受体结合后使钙离子从细胞器(内质网)中释放,引起胞浆内钙离子浓度升高而实现的.Ishizuka等[10]研究又发现,在人结肠癌 HT-29细胞中,17肽胃泌素(10 nmol/L)能够引起胞内钙离子浓度升高并与 IP_3升高的幅度成正相关.由此可见,胃泌素对肌醇脂质信号传递系统有明显的影响.

本实验发现胃泌素能够使人结肠癌细胞株 SW480细胞内 IP_3、Ca^{2+} 的浓度升高,而且这种影响与其促细胞增殖有关,应用丙谷胺后则可抑制这种效应,提示胃泌素促进癌细胞增殖可能是通过受体介导的肌醇脂质信号转导途径而实现的.因此,我们可以针对 IP_3、Ca^{2+},从信号通路着手,设计和筛选出抗信号转导药物,为临床上结肠癌的抗信息传导治疗提供有益的启迪.

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

参考文献

1 Rana R S, Hokin L E. Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. Physiol Rev, 1990, 70(1): 115

2 Ishizuka J, Beauchamp R D, Townsend C M Jr, *et al*. Receptor-mediated antocrine effects of 5-hydroxytryptamine on cultured human pancreatic carcinoid cells. J Cell Physiol, 1992, 150(1): 1

3 Ishizuka J, Martinez J, Townsend C M Jr, *et al*. The effect of gastrin on growth of human stomach cancer cells. Ann Surg, 1992, 215(5): 528

4 武建国.实用临床免疫学检验.南京: 南京科学技术出版社, 1989. 39~41

5 林曙光,郑广华,段小贝,等.细胞信号转导系统基础与临床.天津: 天津科学技术出版社, 1996. 267~268

6 Mc Greger D B, Morriss L L, Manalo P B, *et al*. Pentagastrin stimulation of human coloncarcinoma. Arch Surg, 1989, 124(4): 470

7 Kiss R, Salmon Z, Panwels O, *et al*. In vitro influence of gastrin, oestradiol and gonadotropin-releasing hormone on HCT-15 and Lovo human colorectal neoplastic cell proliferation. Eur J Cancer, 1991, 27(10): 1268

8 Rizzo M T, Weber G. 1-phosphatidylinositol 4-kinase: an enzyme linked with proliferation and malignancy. Cancer Res, 1994, 54(10): 2611

9 Yassin R R, Little K M. Early signaling mechanism in colonic epithelial cell response to gastrin. Biochem J, 1995, 311(Pt3): 945

10 Ishizuka J, Townsend C M Jr, Bold R J, *et al*. Effects of gastrin on 3′, 5′-cyclic adenosine monophosphate, intracellular calcium, and phosphatidylinositol hydrolysis in human colon cancer cells. Cancer Res, 1994, 54(8): 2129

(收稿: 1998-04-15;修回: 1998-10-27)

(编辑 张大春)

Role of inositol 1, 4, 5-trisphosphate calcium in gastrin-induced proliferation of human colon cell line SW480

Xie Bin, He Shuangwu (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the effects of gastrin on inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3), intracellular calcium (Ca^{2+}) in human colon cancer cell line SW480 and its role in the proliferation of this cells line to provide experimental basis for development of antisignaling therapy for patients with colon cancer. Methods: 1) Level of IP3 was analyzed by [^{3}H]-myo-inositol incorporation into inositol phospholipids in the cells. 2) Level of [Ca^{2+}] was measured by fluorescence measurement with fura-2/AM, a fluorescent index of calcium. 3) Viable cell count (VCC) of SW480 cells was calculated by MTT assay. Results: 1) Pentagastrin (PG) promoted the levels of IP3 and [Ca^{2+}] and increased VCC of SW480 cells. 2) When proglumide (PGL), a gastrin- receptor antagonist, used in combination with PG, no significant changes were found in the levels of IP3 and [Ca^{2+}] and increment of VCC of SW480 cells. Conclusion: Gastrin might promote the proliferation of SW480 cells through a receptor-mediated inositol phospholipids signaling pathway.

Key words gastrin; inositol 1,4,5-trisphosphate; calcium; colon neoplasms; cell line

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