DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.016

胆囊收缩素、胃泌素对胆管癌细胞细胞内钙的调节

马宽生* 何振平 王曙光 李 昆 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心)重庆, 400038

提 要 目的: 探索胆囊收缩素(Cholecystokinin, CCK)、胃泌素(Gastrin)对胆管癌细胞细胞内钙的调控作用。方法: 应用细胞内钙测定技术,检测了 CCK、Gastrin及其受体拮抗剂对胆管癌细胞株 QBC939细胞(简称 QB细胞)细胞内钙的影响。结果: CCK-8 Sulfated(CCK-8S)、Gastrin-17(G-17)明显促进了 QB细胞内钙的释放; CCK-A受体拮抗剂 L364, 718(L18)明显抑制了 CCK-8S对细胞内钙的激活, CCK-B/Gastrin受体拮抗剂 L365, 260(L60)抑制了 G-17激发的细胞内钙释放。结论: 细胞内钙参与了 CCK Gastrin对胆管癌细胞增殖影响的细胞内过程。

关键词 胆囊收缩素;胃泌素;细胞内钙;胆管癌
中图法分类号 R735.8

胆囊收缩素(CCK)、胃泌素(Gastrin)是同一族的消化道激素,近年研究发现它们通过存在于某些消化道癌细胞膜上的 CCK-A或 和 CCK-B/Gastrin受体,促进部分消化道癌的增殖[1],其细胞内的机制主要是通过磷酸肌醇酯-细胞内钙系统介导[2]。上述结果主要来自对胰腺癌、胃癌和结肠癌的研究,但 CCK Gastrin对胆管癌细胞细胞内钙调节作用待研究。

为探索 CCK Gastrin对胆管癌细胞细胞内钙的影响,作者研究了 CCK Gastrin及其受体拮抗剂对胆管癌细胞株 QB细胞内钙的调控,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CCK-8S, Gastrin-17(G-17), Na_2SeO_3,转铁蛋白, DMEM培养基,均购自 Sigma; Fura-2/AM,中科院上海生理所;牛血清白蛋白, Triton X-100和 EGTA,购自华美公司; L18及 L60由 Evans BE教授(Merck & Co, USA)惠赠;无血清培养基按文献[3]配方配制[1000 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,牛血清白蛋白 5 g,胰高血糖素 10 mg, $NaSeO_3$ 10^{-2} mol]。

1.2 细胞培养

人胆管癌细胞株 QB由我科建株[4]。患者为男性,51岁,材料取自低分化肝门部胆管腺癌肝内转移灶。本实验所用者为第 25~30代细胞。QB细胞在含 10%小牛血清的 DMEM培养基中,于 37℃、5% CO_2培养箱内培养,细胞贴壁生长良好,每 3 d传代一次。

1.3 细胞内钙测定

传代 72 h对数生长期 QB细胞, 0.25%胰蛋白酶消化, 10%小牛血清的培养液制成细胞悬液,接种于 12孔板(10^6细胞/1.8 ml/孔),培养 24 h,当细胞贴壁生长后换为等量无血清培养液,再培养 24 h,细胞近 70%汇合时,消化, 800× g离心 3 min,去上清,加等量新鲜无血清培养液悬浮培养 2 h,每孔加 1 mmol的 Fura-2/AM,培养 5 min, 2000× g离心 15 s,去上清,加 1.8 ml电解质液[5](140 mmol NaCl, 5 mmol KCl, 0.9 mmol $MgCl_2$, 25 mmol glucose, 16 mmol Hepes, 6 mmol Tris and a mixture of amino acids, pH 7.2),倒入测试管内,各管分别加入 0.2 ml(1× 10^{-9} mol·L^{-1}) CCK-8S、G-17、L18、L60及 0.1 mol PBS(对照组),按时间[0 s(未加试剂)、30、60、90、120、150 s]顺序测定 Fo值,每管测试 Fo完毕后加入 20 μl(1× 10^{-3} mol·L^{-1}) EGTA测 Fmin,然后再加入 Triton X-100 20 μl测 Fmax值,测定仪为日立 MPF-4型荧光光谱仪,激发光波长为 344 nm,发射光波长为 500 nm,按公式计算细胞内钙($[Ca^{2+}]i$)含量:

$[Ca^{2+}]i = Kd \times (Fo - Fmin)/(Fmax - Fo)$; $Kd = 224$ nm

1.4 统计分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用未配对资料的 t 检验比较组间差异。

2 结果

CCK-8S、G-17明显促进了胆管癌细胞 QB细胞内钙的释放,而单用 L18、L60对细胞内钙的释放无明显影响; L18明显抑制了 CCK-8S对细胞内钙的激活, L60抑制了 G-17激发的细胞内钙释放,见附表。

* 马宽生,男,34岁,主治医师,讲师,博士

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

附表　CCK、Gastrin及其受体拮抗剂对胆管癌细胞 QB[Ca^{2+}]i的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$, nmol/L)

Table　Effect of CCK, Gastrin and their receptor antagonists on [Ca^{2+}]i of cholangiocarcinoma cells QB($\bar{x}\pm s$, $n=3$, nmol/L)

Group	Time (t/s)					
	0	30	60	90	120	150
Control	85± 6.9	89± 10.6	90± 14.7	89± 4.9	84± 11.4	88± 14.7
CCK-8S	80± 8.8	200± 20.9*	130± 16.4	100± 7.9	78± 4.5	78± 11.9
G-17	80± 7.3	210± 21.1*	130± 12.4	100± 9.9	78± 12.1	78± 14.5
L-18	80± 7.5	82± 21.3	79± 2.2	84± 7.1	83± 9.4	78± 6.2
L-60	82± 6.4	80± 9.584	84± 12.9	83± 6.9	83± 7.5	78± 12.3
CCK-8S+ L-18	85± 7.9	88± 5.7#	84± 11.5	82± 3.9	86± 15.8	78± 11.1
G-17+ L60	85± 7.8	89± 3.8#	90± 10.7	89± 12.1	84± 6.1	88± 7.8

*: $P<0.05$ *vs* 0 time; #: $P<0.05$ *vs* the group of CCK-8S or G-17

3　讨论

正常胆管上皮细胞主要表达 CCK-A受体[6],介导 CCK刺激的胆囊收缩,在胆汁形成和浓缩过程中也起重要作用;胆道上皮的 CCK-B/Gastrin受体表达较弱。激素与受体结合后,激活细胞内第二信使,将激素的作用传导到靶细胞内,产生效应。CCK、Gastrin对靶细胞的作用主要通过磷酸肌醇酯系统传导,细胞内钙在此信号传导系统中起重要作用;因其在其它信号传导途径中也有重要影响,从而被称为第三信使[7]。已证明 CCK、Gastrin对胰腺癌和结肠癌促生长作用是通过磷酸肌醇酯-三磷酸肌醇酯(IP3)细胞内钙的介导[2]。我们既往的研究提示胆管癌细胞 QB有 CCK-A和 CCK-B/Gastrin受体存在,CCK、Gastrin可促进其增殖[8];本研究表明细胞内钙信号传导系统参与了 CCK、Gastrin对胆管癌细胞增殖的影响过程,而 CCK、Gastrin受体拮抗剂可以抑制此作用,我们推测 CCK、Gastrin对胆管癌细胞的促增殖作用可能也是通过磷酸肌醇酯-三磷酸肌醇酯(IP3)-细胞内钙途径介导,但尚需进一步研究证明。

本研究探讨了 CCK、Gastrin对胆管癌细胞细胞内钙的调节作用,深化了消化道激素对胆管癌细胞的作用机制,为发展胆管癌的生物学治疗方式提供了新的资料。

参考文献

1 樊代明,陈元方,尤涵.胃肠肽类激素对消化系统肿瘤生物学行为的调控作用.中华消化杂志,1996;16(4):229

2 Crawley J N, Corwin R L. Biological actions of cholecystokinin. Peptides, 1994;115(4):731

3 Miyagiwa M, Ichida T, Tokiwa T A *et al*. A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T1) producing carbohydrate antigen 19/9 in serum-free medium. *In Vitro* Cell Dev, 1989;25(3):503

4 王曙光,韩本立,陈意生.胆管癌浸润、转移及抗浸润实验研究.第三军医大学学报,1994;16(4):307

5 Sethi T, Rozengur E. Galanin stimulates Ca^{2+} mobilization, inositol phosphate accumulation, and clonal growth in small cell lung cancer cells. Cancer Research, 1991;51:1674

6 Calam J. CCK/gastrin antagonists-clinical perspectives. Acta Gastroenterol Belg, 1993;56(3-4):251

7 孙志贤主编.现代生物化学理论与研究技术.北京:军事医学科学出版社,1994 331

8 马宽生,何振平,王曙光等.胃泌素对胆管癌细胞增殖的调节.第三军医大学学报,1997;19(4):336

(收稿:1997-06-18;修回:1997-12-26)

(编辑　仇玉福)

Regulative effects of cholecystokinin and gastrin on intracellular calcium in cholangiocarcinoma cells

Ma Kuansheng, He Zhengping, Wang Shuguang, Li Kun (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the regulative effects of cholecystokinin (CCK) and gastrin on intracellular calcium in cholangiocarcinoma cells. Methods: The regulative effects of CCK-8, gastrin-17 and their receptor antagonists L18 and L60 on intracellular calcium in cholangiocarcinoma cell line QB. Results: CCK and gastrin stimulated the release of intracellular calcium in QB, but L18 and L60 inhibited the action of the two gut hormones. Conclusion: Intracellular calcium takes part in the process of intracellular action produced by CCK or gastrin.

Key words cholecystokinin; gastrin; intracellular calcium; cholangiocarcinoma cell

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