DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.016

胃泌素对胆管癌细胞增殖的调节

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,630038

提 要 目的:探索胃泌素(Gastrin)对胆管癌细胞增殖的调节作用。方法:应用细胞培养技术及^{3}H-Tdr掺入法,研究了胃泌素-17(G-17)、亮氨酸胃泌素-17(LeuG-17)、五肽胃泌素(G-5)及胆囊收缩素(CCK-B/Gastrin)受体拮抗剂 L-365,260(L-60)对培养的人胆管癌细胞 QBC939(QB)、OCUCh-LM1(OC)、HuCC-T1(Hu)、OZ增殖的影响。结果:G-17 LeuG-17 G-5通过 CCK-B/Gastrin受体显著的促进了 QB OC的增殖,而对 Hu和 OZ的增殖无明显影响。结论:部分胆管癌细胞有 CCK-B/Gastrin受体表达,胃泌素可促进胆管癌细胞的增殖,为发展胆管癌的生物学治疗方式提供了新的资料。

关键词 胃泌素;胆管癌;细胞增殖
中图法分类号 R735.8

胆管癌是消化系统较常见的肿瘤,近年随着影像诊断技术水平的提高和人口寿命的延长,其发病率呈上升趋势。但其手术切除率低,而且对放疗、化疗不敏感,预后较差[1]。近期研究表明,多种胃肠道激素包括胃泌素与消化道肿瘤的发生和发展有密切联系[2]。但有关胃泌素(Gastrin)与胆管癌细胞增殖关系的研究国内外尚未见报道,为探索 Gastrin对胆管癌细胞增殖的调节作用,我们应用细胞培养技术及^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核苷(^{3}H-TdR)掺入法,研究了胃泌素-17(G-17 亮氨酸胃泌素-17(LeuG-17)、五肽胃泌素(G-5)及胆囊收缩素-B/胃泌素(CCK-B/Gastrin)受体拮抗剂 L-365,260(L-60)对培养的人胆管癌细胞 QBC939(QB)、OCUCh-LM1(OC)、HuCC-(Hu)、OZ生长的影响。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 试剂

G-17,G-5,Sigma,RPMI1640 DMEM培养基,Gibceo小牛血清,杭州四季清,^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核苷(^{3}H-TdR),北京原子能研究所,LeuG-17由 L. Moroder(Max-Planck-Institut for Biochemie, Germany)教授惠赠;CCK-B/Gastrin受体拮抗剂 L365,260(L60)由 Evans BE(Merck& Co,USA.)教授惠赠。无血清培养基按文献[3]配制。

1.2 细胞培养

人胆管癌细胞系 QBC939(QB)由我科建株[4]。患者为男性,51岁。材料取于肝门部胆管低分化腺癌肝内转移灶,本实验所用为25~30代细胞。OCUCh-LM1(OC)[5]由 Chung YS(Osaka City University Medical School, Japan)教授惠赠,患者为男性,61岁。材料取于肝外胆管高分化腺癌肝内转移灶。本实验所用为第20~25代细胞。HuCC-T1(Hu)[3]由 Okada K(Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan)教授惠赠,患者64岁,女性,原发灶为胆总管下端癌,培养材料取于其腹腔转移淋巴结,本实验所用为20~25代细胞。人胆管癌细胞系 OZ[6]由 Matsuura T(The Jikei University School of Medicine, Japan)教授惠赠,患者7岁,女性,原发灶是肝门部胆管高分化乳头状腺癌,培养材料取其腹水。本实验所用为40~45代细胞。QB OC OZ细胞在含10%小牛血清的 DMEM培养基中,Hu细胞在含10%小牛血清的 RPMI 1640培养基中,于37℃、5% CO_2条件下培养,细胞贴壁生长良好,QB OC细胞每3 d传代一次,Hu OZ细胞每7 d 10 d传代一次。

1.3 细胞增殖研究

传代72 h在对数生长期细胞,0.25%胰蛋白酶消化后用含10%小牛血清的培养液配成细胞悬液,接种于24孔板(5×10^4细胞/0.9ml/孔),24 h细胞贴壁生长后换为无血清培养液,各孔加入不同浓度的胃泌素及受体拮抗剂,对照组加入等量的培养液,培育72 h,收获前2 h加入^{3}H-TdR(2uci/孔),然后收集细胞过滤、干燥、计数。

1.4 数据处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Student's t检验,计算统计。

2 结果

2.1 Gastrin对胆管癌细胞增殖的影响,见表1

* 马宽生,男,34岁,讲师,主治医师,博士

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

表 1　Gastrin对人胆管癌细胞株 QB OC增殖的影响 (n= 9,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of gastrin on proliferation of QB and OC cell lines of human cholangiocarcinoma (n= 9,$\bar{x}\pm s$)

Group	^{3}HTdR incorporation (cpm/well)					
	G-17		LeuG-17		G-5	
	QB	OC	QB	OC	QB	OC
Control	3015± 136	3122± 146	7300± 1266	7600± 1345	3015± 1368	3112± 1245
× 10^{-5} C_B/mol·L^{-1}			12868± 889*	2890± 1234*		
× 10^{-6} C_B/mol·L^{-1}	5120± 175*	5266± 174*	8347± 1678	8890± 1345	5120± 3075*	5221± 2744*
× 10^{-7} C_B/mol·L^{-1}	3059± 116	3278± 654	9835± 3662	3789± 3451	3059± 2016	3166± 2141
× 10^{-8} C_B/mol·L^{-1}	3086± 610	3256± 587	12055± 1690*	3002± 2312*	3086± 2610	3365± 2152
× 10^{-9} C_B/mol·L^{-1}	2461± 688	2569± 710	5125± 1989	5467± 2100	2461± 1688	2547± 1774
× 10^{-10} C_B/mol·L^{-1}	3280± 803	3365± 743	10139± 1344*	11231± 1356*	3280± 1803	3256± 2004
× 10^{-11} C_B/mol·L^{-1}	3403± 520	3625± 754	7687± 2938	8890± 3421	3403± 1704	3556± 1652
× 10^{-12} C_B/mol·L^{-1}	4204± 175	4425± 433	10793± 1403*	11561± 1278*	4204± 1339	4436± 1335
× 10^{-13} C_B/mol·L^{-1}	5066± 686*	5256± 425*	13066± 3244*	14321± 4332*	5066± 1668*	5125± 1879*
× 10^{-14} C_B/mol·L^{-1}	2912± 368	2756± 425			2912± 882	3030± 998

*: P < 0.05 *vs* control

从表 1可看出,Gastrin对胆管癌细胞 QB及 OC的促进增殖作用存在双峰。

G-17、LeuG-17及 G-5对胆管癌细胞株 Hu及 OZ的增殖无明显影响(数据未列出)

2.2　CCK-B/Gastrin受体拮抗剂 L-60对胆管癌细胞增殖的影响见表 2

表 2　Gastrin及其受体拮抗剂对胆管癌细胞株 QB OC增殖的影响 (n= 9,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of gastrin and its receptor antagonists on proliferation of QB and OC cell lines of cholangiocarcinoma (n= 9,$\bar{x}\pm s$)

Group	^{3}HTdR incorporation (cpm/well)			
	× 10^{-6} (C_B/mol·L^{-1})		× 10^{-9} (C_B/mol·L^{-1})	
	QB	OC	QB	OC
Control	2232± 1231	2528± 1634	3827± 1239	3008± 112
G-17	16286± 1245*	14172± 998*	16174± 1123*	17788± 996*
LeuG-17	18922± 1256*	18798± 1234*	2036± 1231*	12352± 898*
G-5	12588± 1634*	17574± 698*	14562± 987*	15670± 1212*
G-17+ L-60	5370± 1914	4435± 866	8002± 1167	5670± 1123
LeuG-17+ L-60	3639± 976△△	3671± 997△△	2431± 675△	2428± 998△
G-5+ L-60	3649± 896△△	2972± 129△△	3003± 991△	3112± 1003△

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

结果表明 L-60对 4株胆管癌细胞的增殖均无显著影响(P > 0.05)。

表 2显示 L60能明显地抑制同浓度的 G-17、LeuG-17及 G-5对胆管癌细胞系 QB OC的促增殖作用,提示 Gastrin的促增值作用是通过 CCK-B/Gastrin受体介导的。但对 Hu和 OZ细胞却无此影响(数据未列出)。

3　讨论

Gastrin是一种多肽激素,主要由胃肠道 G细胞分泌,它的主要生理功能是促进胃壁细胞释放胃酸及营养胃肠粘膜和胰腺腺泡细胞[7], G-17是 Gastrin的主要生理活性形式, G-5是人工合成的五肽胃泌素,

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

LeuG-17是将 G-17第 15位的蛋氨酸用亮氨酸置换的人工合成物。在消化道激素分类中,Gastrin与 CCK因在结构上具有共同的 C端五肽酰胺而同属 CCK族,其中 Gastrin受体与 CCK-B受体高度同源,称为 CCK-B/Gastrin受体。L60是高选择性 CCK-B/Gastrin受体的拮抗剂[8]。

Graham等[2]发现,消化道一些腺癌细胞膜上有某些消化道激素受体的存在,并能够分泌一些消化道激素,通过内分泌及自分泌或 和旁分泌的途径作用于肿瘤细胞膜上的受体及受体后途径来加速或抑制肿瘤的生长,是肿瘤内源性的生长调节因子之一[2]。Richard等[9]已发现胰腺癌、结肠癌细胞有 Gastrin及 CCK受体的存在,Gastrin及 CCK可促进多种胰腺癌和结肠癌细胞生长,而且这种促生长作用可被 Gastrin CCK受体拮抗剂所抑制[9]。由于胆管癌发病率较胃癌、结肠癌及胰腺癌低,目前关于胆管癌细胞是否存在 Gastrin受体, Gastrin受体拮抗剂、激动剂对胆管癌细胞生长调控作用的研究尚未见报道。

本实验证明 Gastrin可显著的促进人胆管癌细胞的增殖,而且这种促进增殖作用是通过 CCK-B/Gastrin受体起作用的,也间接证明部分胆管癌细胞有 CCK-B/Gastrin受体的存在。本实验也显示 CCK-B/Gastrin受体拮抗剂 L60可明显的拮抗 Gastrin对胆管癌细胞的增殖促进作用;但单独应用 L60时对 4株胆管癌细胞无增殖调节作用,提示可能此四种胆管癌细胞系无自分泌和旁分泌 Gastrin的机理,但此结论尚需进一步的实验证实,从分子水平上进一步探讨 Gastrin与胆管癌的关系也将是十分重要的课题。

参考文献

1 Ronalb K T, Bernardo M A, Kimberly D S *et al*. Carcinoma of the ductus choledchus. Am J Surg, 1991, 161(2): 231

2 Graham S B. The role of Gastrin and cholecystokinin in normal and neoplastic gastrointestinal growth. Journal of Gastroenterology and hepatology, 1995, 10(2): 215

3 Miyagiwa M, Ichida T, Tokiwa T *et al*. A new human cholangiocellular carcinoma cell line (Hucc-T1) producing carboydrate antigen 19/9 in serum-free medium. In Vitro Cell Dev. Biol, 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 Yamadsa N, Chung Y S. Arimoto Y *et al*. Establishment of a new human extrahepatic bile duct carcinoma cell line (OCUCH-Lm1) and experimental liver metastatic model. British Journal of Cancer, 1995, 71(3): 543

6 Homma S, Nagamori S, Fujise K *et al*. Human bile duct carcinoma cell line producing abundant mucin in vitro. Gastooenterology Japanica, 1987, 22(4): 474

7 Jacqueline N C, Rebecca L C. Biological actions of choecystokinin. Peptide, 1994, 15(4): 731

8 Michael E, Presti, jerry D G G. Receptor antagonists for gastrointestinal peptides. Am. J. Physiol, 1993, 264(1, Pt1)

9 Richard J B, Jin I, Courtneey M T *et al*. Progress torward hormonal therapy of gastrointestinal cancer. Ann Surg, 1996, 223(1): 4

(收稿: 1996-11-18;修回: 1997-05-28)
(编辑 汪勤俭)

Regulative effects of gastrin on proliferation of cholangiocarcinoma cells

Ma Kuansheng, He Zhenping, Wang Shuguang, Li Kun (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To detect the regulative effects of gastrin on the proliferation of human cholangiocarcinoma cells. Methods: The effects of Gastrin-17 (G-17), Leu-Gastrin-17 (LeuG-17), pentagastrin (G-5) and cholecystokinin (CCK)-B/Gastrin receptor antagonist L365, 260 (L-60) on the proliferation of human cholangiocarcinoma cell lines QBC939 (QB), OCUCh-LM1 (OC), HuCC-T1 (Hu) and OZ were investigated with cell culture and ^{3}HTdR incorporation. Results: G-17, LeuG-17 and G-5 significantly stimulated cell growth of QB and OC through receptor of CCK-B/Gastrin, but the same result was not duplicated for Hu and OZ cell lines. Conclusion: Some human cholangiocarcinoma cell lines can express CCK-B/Gastrin receptor, identifying that gastrin can accelerate the proliferation of human cholangiocarcinoma cells. This provides new theoretical basis for biological treatment of cholangiocarcinoma.

Key words gastrin; cholangiocarinoma; cell proliferation

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