

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.15.001

阻断胃泌素受体对胃癌细胞增殖和凋亡及其信号通路的影响*

袁 航,汪 闯,王琴容,赵 艳,李雅洁,龙妮娅,周建奖[△]

(贵州医科大学分子生物重点实验室/地方病与少数民族疾病教育部重点实验室,贵阳 550004)

[摘要] **目的** 探讨阻断胃泌素受体对胃癌细胞增殖、凋亡及其相关通路中关键蛋白表达的影响。**方法** 试验组使用终浓度为 5 mmol/L 的丙谷胺(胃泌素受体阻断剂)处理胃癌细胞 SGC-7901 和 AGS 6 d,以不加丙谷胺培养的胃癌细胞 SGC-7901 和 AGS 为对照组。四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)法检测各组细胞的生长并绘制细胞生长曲线;流式细胞术检测各组细胞的细胞周期,Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组细胞的凋亡;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测典型 Wnt/ β -catenin 通路、核因子 κ B、磷脂酰肌醇 3 激酶-丝氨酸-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白中关键蛋白 β -连环蛋白(β -catenin)、核转录因子 RelA、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白、糖原合酶激酶 3 β mRNAs 的表达;免疫蛋白印迹检测 β -catenin 蛋白质的表达。**结果** 用丙谷胺处理后,试验组细胞的生长速度低于对照组细胞,细胞周期中 S 期细胞百分数也低于对照组细胞,而 G_0/G_1 期细胞百分数高于对照组细胞($P < 0.05$);试验组的细胞凋亡数高于对照组($P < 0.05$);RT-qPCR 结果显示:丙谷胺处理后,胃癌细胞中 β -catenin 的 mRNA 表达量降低($P < 0.05$)。Western blot 结果显示丙谷胺处理后, β -catenin 蛋白质的表达量降低($P < 0.05$)。**结论** 阻断胃泌素受体能下调胃癌细胞中 β -catenin 的表达,抑制细胞增殖,同时促进细胞凋亡。

[关键词] 胃肿瘤;胃泌素类;细胞凋亡;细胞增殖;丙谷胺; β -catenin**[中图分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)15-2017-04

Influence of blocking gastrin receptor on the proliferation and apoptosis and expression of key proteins in related pathway of gastric cancer cell*

Yuan Hang, Wang Chuang, Wang Qinrong, Zhao Yan, Li Yajie, Long Niya, Zhou Jianjiang[△]

(Key Laboratory of Molecular Biology of Guizhou Medical University/Key Laboratory of Endemic and Minority Diseases, Ministry of Education Guiyang, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of blocking gastrin receptor on the proliferation, apoptosis and expression of key proteins in the related pathway in gastric cancer cell lines. **Methods** In the experimental group, the gastric cancer cell lines SGC-7901 and AGS cells were treated with 5 mmol/L proglumide, a kind of a gastrin receptor antagonist. And the normal cultured gastric cancer cells SGC-7901 and AGS were used in control group. The growth of each group was detected by MTT assay; the cell growth curve was drawn by flow cytometry; the cell cycle of each group was detected by flow cytometry. Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect the cell growth of apoptosis. The relative mRNA expression of β -catenin, nuclear factor-P65, mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 beta in Wnt, NF- κ B and PI3K-AKT-MTOR pathways were detected by RT-qPCR. The expression of β -catenin protein was detected by Western blotting. **Results** After treatment with proglumide, the growth of the cells in the experimental group was lower than that in the control group; and the proportion of S phase cells in the cell cycle was also lower than that in the control group, but the proportion of cells in G_0/G_1 phase was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The percentage of apoptotic cells was also increased after treatment with proglumide ($P < 0.05$). Furthermore, proglumide treatment significantly reduced the expression of β -catenin at both mRNA and protein levels ($P < 0.05$). **Conclusion** Blocking gastrin receptor can down-regulate the expression of β -catenin, inhibit the cell proliferation and promote the cell apoptosis in gastric cancer cells.

[Key words] stomach neoplasms; gastrins; apoptosis; cell proliferation; proglumide; β -catenin

胃泌素是一种由胃窦部的 G 细胞合成分泌的肽类激素,胃泌素受体主要是胆囊收缩素-B(cholecystokinin-B receptor, CCK-B)受体,通常表达在胃肠道细胞的细胞膜上^[1]。已有证据表明,幽门螺旋杆菌(HP)感染会引起高胃泌素血症^[2-3],本课题组前期研究也表明 HP 感染会上调胃泌素基因 mRNA 的表达水平^[4],而 HP 感染作为胃癌高发的生物因素,已经得到公认,因此胃泌素可能与胃癌的发生、发展密切相关。本课题组前期的体外研究也发现,胃泌素及其受体在胃癌细胞株

AGS、SGC-7901 均有表达,用商品化胃泌素处理细胞后,两种细胞的增殖、迁移、侵袭能力增强^[5-6]。丙谷胺具有跟胃泌素相似的结构,能够与胃泌素竞争结合胃泌素受体,是胃泌素受体的阻断剂^[7]。为了探究阻断胃泌素受体对胃癌细胞的作用及其可能的信号通路,本研究用丙谷胺处理胃癌细胞株 SGC-7901 和 AGS,检测细胞的增殖、凋亡及相关信号通路中几个关键基因的表达,包括 Wnt、核因子 κ B(NF- κ B)、磷脂酰肌醇 3 激酶-丝氨酸-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K-AKT-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260303,31560326);贵州省科技合作计划项目(黔科合 LH 字[2015]7360)。 作者简介:袁航(1989—),住院医师,硕士,主要从事胃癌方面研究。 [△] 通信作者, E-mail: jianjiangzhou@sina. cn。

MTOR)信号通路中关键蛋白 β -连环蛋白(β -catenin)、核转录因子(Rel A P65)、MTOR、糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β),寻找胃泌素的作用途径及胃癌可能的治疗靶点。

1 材料与与方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC-7901 和 AGS 购于中国科学院上海细胞库,由本实验室保存。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco,美国),丙谷胺(国家食品药品检定研究所),青霉素(Hyclone,美国),细胞总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(Tiangen,中国),四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)试剂盒、Western blot 相关试剂、蛋白提取试剂盒(碧云天,中国),琼脂糖(Sigma,美国),八连管(ABI,美国),SYBER Green(ABI,美国),细胞周期检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(BD,美国),二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(Thermo,美国), β -catenin 一抗、羊抗兔二抗(Proteintech,美国)。

1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞株 SGC-7901 和 AGS 的培养 用含 5% 胎牛血清、1% 双抗的 RPMI 1640 培养基,于 5% CO₂、37 °C 条件下培养,待细胞贴壁生长达 80% 以上融合度时进行传代,备用。

1.2.2 MTT 试验 取对数生长期的两种细胞以 2×10^3 /孔接种于 96 孔板,试验组加入含 5 mmol/L 丙谷胺的 RPMI 1640 完全培养基 200 μ L,对照组用 RPMI 1640 完全培养基,每组设 5 个复孔,37 °C,5% CO₂ 培养 24 h 后弃去培养液,每孔加 20 μ L MTT 液。孵育 4 h 后,去上清液,加入 DMSO 每孔 150 μ L,振荡器振荡 10 min,于酶标仪 490 nm 波长处测各孔吸光度(A)值,连续检测 7 d 后绘制细胞的生长曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 试验组与对照组细胞于 5% CO₂、37 °C 恒温培养,3 d 后换液,继续培养 3 d,弃培养基后 PBS 洗 3 次,加入胰酶消化收集细胞,流式细胞仪检测细胞周期与凋亡,按试剂说明书操作。试验重复 3 次。

1.2.4 RT-qPCR 检测各信号通路中关键基因 mRNA 的表达

取各组细胞,按试剂盒步骤提取总 RNA,去除 gDNA。反应体系如下:5 \times gDNA Buffer 2.0 μ L,总 RNA 2 μ g,RNase-Free ddH₂O 补足 10.0 μ L,37 °C 孵育 30 min。随后用 Oligo dt 逆转录成 cDNA。体系为 MIX 10.0 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,cDNA 模板 2.0 μ L,去离子水补足至 20.0 μ L。反应条件为 94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。收集各基因的荧光信号,以 β -actin 为内参基因,SDS 1.4 软件计算试验组细胞中各靶基因的相对表达量。用融解曲线监测各样本 PCR 反应的特异性,相对标准曲线计算 PCR 反应的扩增效率,试验重复 3 次,每次 3 个复孔。计算公式: $\Delta\Delta Ct = \text{待测基因 Ct 值} - \beta\text{-actin Ct 值}$, $\Delta\Delta Ct = \text{试验组 } \Delta Ct - \text{对照组 } \Delta Ct$,相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。qPCR 引物序列见表 1。

1.2.5 Western blot 检测 β -catenin 蛋白质的表达 取试验组及对照组细胞,提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒定量后,取 20 μ g 总蛋白上样,10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳 3.0 h 后转膜封闭,兔抗 β -catenin 多克隆抗体(1:1 500)4 °C 孵育过夜,加入山羊抗兔二抗(1:5 000 稀释)及 HRP- β -actin(1:10 000)孵育 1 h 后暗室胶片曝光。用 Image J 软件处理条带并读取灰度值,试验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件对试验数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,细胞周期分布用单因素方差

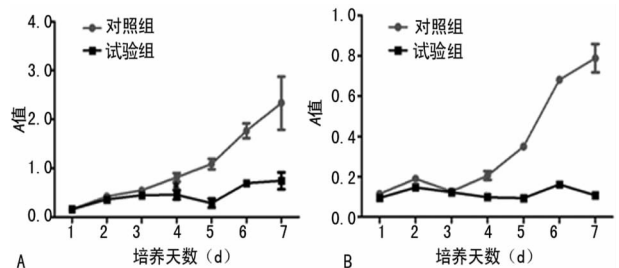
分析后进行两两比较,其他试验结果用独立样本 *t* 检验,行双侧检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阻断胃泌素受体对细胞生长的影响 丙谷胺处理细胞后,试验组 SGC-7901、AGS 细胞在培养第 4 天时 A 值低于对照组细胞($P < 0.05$),培养第 7 天时两组差异最大,见图 1。

表 1 qPCR 引物序列

| 基因引物 | 引物(5'-3') | 产物(bp) |
|------------------|---------------------------|--------|
| P65 | 上游:GGAGCACAGATACCACCAAGA | 223 |
| | 下游:CGCTTCTTCACACTGGATT | |
| GSK-3 β | 上游:GGCTACCATCTTATTCCTCTCT | 105 |
| | 下游:GTCTGTCCACGGTCTCCAGTAT | |
| MTOR | 上游:CTTGTTTGTGGCTCTGAATGAC | 178 |
| | 下游:GGCACTCTGCTCTTTGATTCTT | |
| β -catenin | 上游:CTGAGGACAAGCCACAAGATTA | 183 |
| | 下游:ATCCACCAGAGTGAAAAGAAGC | |
| β -actin | 上游:CCACTCTCCACCTTTG | 564 |
| | 下游:TTCTCTTGTGCTCTTGC | |



A:SGC-7901;B:AGS。

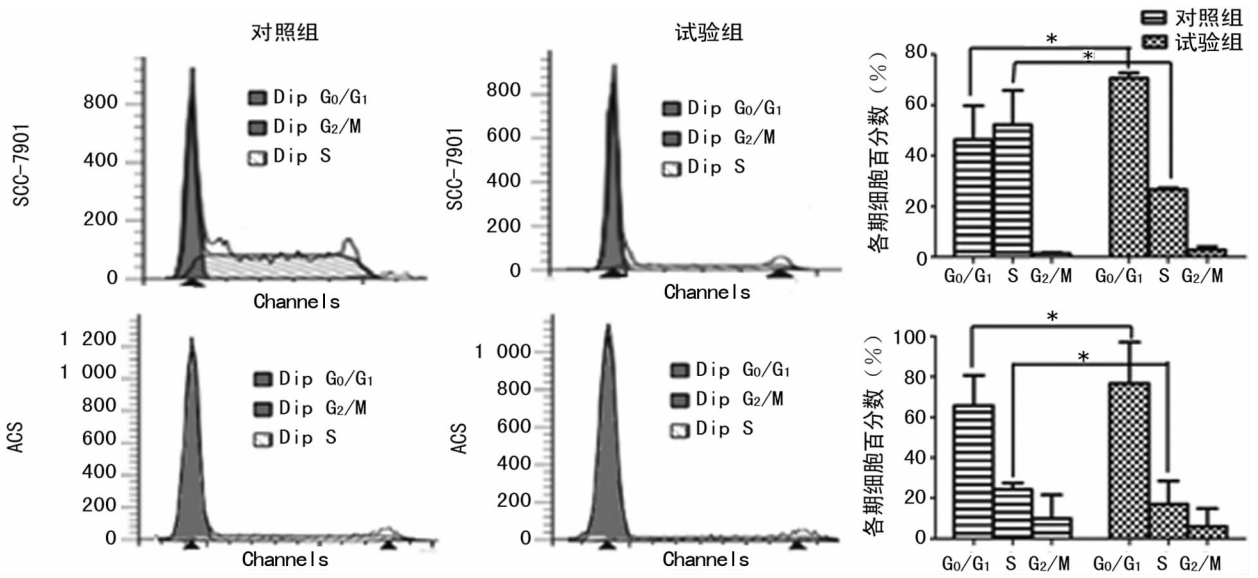
图 1 SGC-7901(A)和 AGS(B)的细胞生长曲线

2.2 阻断胃泌素受体对细胞周期的影响 丙谷胺处理 6 d 后,试验组细胞的 S 期细胞百分数明显低于对照组细胞,G₀/G₁期的细胞百分数明显高于对照组细胞,比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 阻断胃泌素受体对细胞凋亡的影响 丙谷胺处理细胞 6 d 后,流式细胞仪检测各组细胞凋亡,结果显示试验组的凋亡细胞数均高于对照组细胞,比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

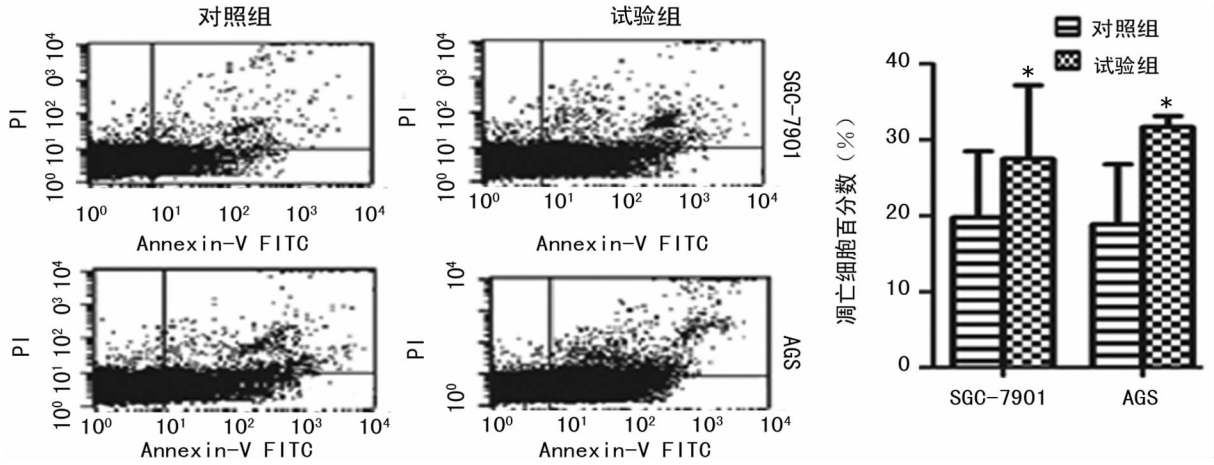
2.4 阻断胃泌素受体对信号蛋白 β -catenin、P65、MTOR、GSK-3 β mRNA 表达的影响 试验组与对照组细胞的总 RNA, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.8~2.0,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, RNA 28 s 与 18 s 的比例为 1.5~2.0,提示 RNA 质量较好。RT-qPCR 检测结果显示各基因的溶解曲线均为单峰,各基因的扩增特异性较好。丙谷胺处理后,试验组的 β -catenin mRNA 的表达量比对照组显著降低,比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而其他基因的表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 4。

2.5 阻断胃泌素受体对 β -catenin 蛋白表达的影响 丙谷胺处理细胞 6 d 后,试验组两种胃癌细胞中的 β -catenin 蛋白质表达较对照组明显下调,比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。



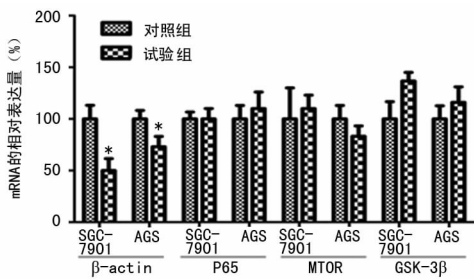
*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 流式细胞仪检测细胞周期结果



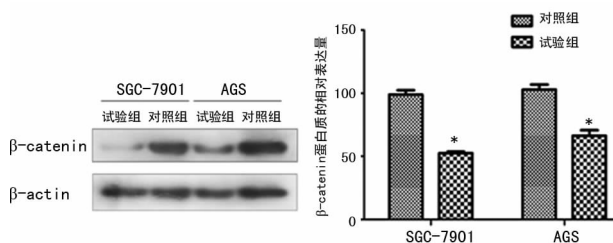
*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 3 流式细胞仪检测细胞凋亡结果



*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 4 信号通路中相关基因 mRNA 的表达



*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 5 丙谷胺处理对 β -catenin 蛋白表达的影响

3 讨论

胃泌素促进胃癌细胞生长的作用在诸多研究中已经证实, Cao 等^[8]在结肠癌细胞的研究中也发现胃泌素有类似的作用, 并且阐明是通过激活 β -catenin/Tcf-4 通路发挥作用。然而阻断胃泌素受体对胃癌细胞作用的潜在机制的报道较少。为了进一步探究丙谷胺对胃癌细胞株 SGC-7901、AGS 的作用, 本研究根据前期结果用丙谷胺处理胃癌细胞, 检测细胞的生长, 细胞周期, 细胞凋亡。与杨莹莹等^[9]的结果相似, 试验组细胞的增殖受到抑制。细胞周期检测结果提示阻断胃泌素受体可能阻止细胞从 G_1 期进入 S 期, 从而抑制细胞增殖。流式细胞仪检测的结果还显示, 试验组的凋亡细胞数增加, 提示阻断胃泌素受体不仅能抑制胃癌细胞的增殖, 还能促进胃癌细胞的凋亡, 这些结果与国内外的相关研究结果一致^[10-11]。

为了探讨丙谷胺的作用机制, 本研究用定量 PCR 技术筛查了与细胞增殖、凋亡相关信号通路中几个关键蛋白的 mRNA 表达, 包括 Wnt、NF- κ B、PI3K-AKT-MTOR 信号通路中关键蛋白 β -catenin、P65、MTOR 及 GSK-3 β , 结果仅有 β -catenin mRNA 的表达水平在处理的 2 株细胞中一致性的明显降低, 随后用 Western blot 证实 β -catenin 蛋白表达量在丙谷胺处理

后也一致性的明显降低。 β -catenin 的功能主要体现在 2 个方面:(1)与 E-cadherin 组成复合物参与细胞间的黏附^[12];(2)作为经典 Wnt 信号通路中的关键蛋白参与通路的激活^[13]。在肿瘤细胞中,当 Wnt 蛋白与受体结合后,会抑制此 β -catenin 降解复合物的形成,使 β -catenin 在胞内聚集进而转移至核内与转录因子 Tcf/Lef-1 结合,引起 c-Myc、Cyclin-D1、survivin 等转录,引起肿瘤的发生^[14-16]。同时也会调节众多上皮间质转移(EMT)相关蛋白如 MMP7、Snail、Twist 等表达,诱导 EMT 的发生^[17]。研究发现, β -catenin 在胃癌组织高表达,同时与胃癌恶性程度正相关,并且随着浸润深度的增加而增加,推测可能是 E-cadherin 与 β -catenin 的复合物中 E-cadherin 的丢失使得癌细胞黏附减弱,易于脱落,促进了肿瘤的浸润和转移^[18]。同时, β -catenin 从膜 E-cadherin 的结合部位分离,会更多地在胞内聚集,从而激活 Wnt 信号通路,使肿瘤进展。因此,有诸多学者认为 β -catenin 的异常表达可能作为胃癌进展的一个生物学指标^[19]。

在体外试验中,潘安萍等^[20]用慢病毒载体沉默胃癌细胞中 β -catenin 蛋白的表达,结果发现沉默 β -catenin 后能够减慢细胞增殖,促进细胞凋亡,使众多癌基因的表达下调。结合本研究,推测丙谷胺阻断胃泌素受体后,可能通过下调 β -catenin 的表达,抑制 Wnt 信号通路,进而抑制胃癌细胞的增殖,促进胃癌细胞的凋亡,提示 β -catenin 有可能成为胃癌治疗的靶点之一,但是具体机制有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Schmitz F, Goke MN, Otte JM, et al. Cellular expression of CCK-A and CCK-B/gastrin receptors in human gastric mucosa[J]. Regul Pept, 2001, 102(2/3): 101-110.
- [2] Tucker TL. Inducible regulation of gastrin gene expression during helicobacter pylori infection[D]. Michigan: University of Michigan, 2009.
- [3] Chuang CH, Sheu BS, Yang HB, et al. Hypergastrinemia after Helicobacter pylori infection is associated with bacterial load and related inflammation of the oxyntic corpus mucosa[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(9): 988-993.
- [4] Zhou J, Xie Y, Zhao Y, et al. Human gastrin mRNA expression up-regulated by Helicobacter pylori CagA through MEK/ERK and JAK2-signaling pathways in gastric cancer cells[J]. Gastric Cancer, 2011, 14(4): 322-331.
- [5] 刘骏, 周建奖, 谢渊, 等. 过表达胃泌素促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(4): 354-360.
- [6] 刘骏, 周建奖, 赵艳, 等. 胃泌素促进胃癌细胞的迁移和侵袭[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(4): 730-733.
- [7] Gonzalez-Puga C, Garcia-Navarro A, Escames G, et al. Selective CCK-A but not CCK-B receptor antagonists inhibit HT-29 cell proliferation: synergism with pharmacological levels of melatonin[J]. J Pineal Res, 2005, 39(3): 243-250.
- [8] Cao J, Yu JP, Liu CH, et al. Effects of gastrin 17 on β -catenin/Tcf-4 pathway in Colo320WT colon cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(46): 7482-7487.
- [9] 杨莹莹, 吴会超, 穆媛媛, 等. 胃泌素及其受体拮抗剂对胃癌细胞株 MKN45 增殖及 TFF1、TFF3 表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(6): 545-548.
- [10] Mao JD, Wu P, Huang JX, et al. Role of ERK-MAPK signaling pathway in pentagastrin-regulated growth of large intestinal carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(35): 12542-12550.
- [11] Kovac S, Xiao L, Shulkes A, et al. Gastrin increases its own synthesis in gastrointestinal cancer cells via the CCK2 receptor[J]. FEBS Lett, 2010, 584(21): 4413-4418.
- [12] Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin[J]. Curr Opin Genet Dev, 2006, 16(1): 51-59.
- [13] Tan RJ, Zhou D, Zhou L, et al. Wnt/beta-catenin signaling and kidney fibrosis[J]. Kidney Int Suppl, 2014, 4(1): 84-90.
- [14] Salisbury TB, Binder AK, Grammer JC, et al. GnRH-regulated expression of Jun and JUN target genes in gonadotropes requires a functional interaction between TCF/LEF family members and beta-catenin[J]. Mol Endocrinol, 2009, 23(3): 402-411.
- [15] Manachai N, Saito Y, Nakahata S, et al. Activation of EVI1 transcription by the LEF1/beta-catenin complex with p53-alteration in myeloid blast crisis of chronic myeloid leukemia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(4): 994-1000.
- [16] Cheng XJ, Lin JC, Ding YF, et al. Survivin inhibitor YM155 suppresses gastric cancer xenograft growth in mice without affecting normal tissues[J]. Oncotarget, 2016, 7(6): 7096-7109.
- [17] Lv YF, Dai H, Yan GN, et al. Downregulation of tumor suppressing STF cDNA 3 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by the Wnt/GSK-3beta/beta-catenin/Snail signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2016, 373(2): 164-173.
- [18] 董理. Wnt 信号通路中心调控分子 β -catenin 在胃癌中的表达及其意义[D]. 南昌: 南昌大学医学院, 2014.
- [19] 刘映辉, 所剑, 李寿柏, 等. β -catenin 和核因子- κ B 表达与胃癌的相关性研究[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(20): 1987-1989.
- [20] 潘安萍. 沉默 β -catenin 表达对胃癌细胞生物学行为的影响[D]. 南昌: 南昌大学医学院, 2014.