

- 4 Wang Z, Wang F, Wang WQ, Gao Q, Wei WL, Yang Y, Wang GY. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. *World J Gastroenterol* 2004;10:550-554
- 5 宋今丹, 高丰, 蒋英丽, 赵欣, 陈誉华, 王芸庆. 细胞凋亡与大肠肿瘤. *世界华人消化杂志* 2002;10:429-431
- 6 申洪. 免疫组织化学染色定量方法的研究(III). *中国组织化学与细胞化学杂志* 1995;4:89-92
- 7 Qiao D, Gaitonde SV, Qi W, Martinez JD. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 2001;22:957-964
- 8 Calabro V, Mansueto G, Santoro R, Gentilella A, Pollice A, Ghioni P, Guerrini L, La Mantia G. Inhibition of p63 transcriptional activity by p14ARF: functional and physical link between human ARF tumor suppressor and a member of the p53 family. *Mol Cell Biol* 2004;24:8529-8540
- 9 Ito T, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Komeda T, Nakao K. Alteration of the p14 (ARF) gene and p53 status in human hepatocellular carcinomas. *J Gastroenterol* 2004;39:355-361
- 10 Xiao EH, Li JQ, Huang JF. Effects of P53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2004;10:190-194
- 11 Martinez JC, Palomino JC, Cabello A, Sepulveda JM, de la Camara AG, Ricoy JR. HDM2 overexpression and focal loss of p14/ARF expression may deregulate the P53 tumour suppressor pathway in meningeal haemangiopericytomas. *Histopathology* 2005;46:184-194
- 12 Wang YC, Lin RK, Tan YH, Chen JT, Chen CY, Wang YC. Wild-type P53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:154-164
- 13 Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/P16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530
- 14 Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of P16 (INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000;60:129-133
- 15 Sarbia M, Gedert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2004;111:224-228
- 16 Radfar A, Unnikrishnan I, Lee HW, DePinho RA, Rosenberg N. p19 (Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13194-13199

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 胆囊收缩素受体在胰腺癌细胞中的表达及胆囊收缩素对胰腺癌细胞周期的影响

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 曹亮, 魏群

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 魏群, 南通大学附属医院消化内科  
江苏省南通市 226001  
曹亮, 南通市第一人民医院 江苏省南通市 226001  
通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化内科.  
zhouquoxiong@pub.nt.isinfo.net  
电话: 0513-5777166 传真: 0513-5519820  
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

### 摘要

**目的:** 观察胆囊收缩素受体(CCKR)在人胰腺癌细胞株 SW1990 中的表达及胆囊收缩素(CCK)-8 肽对胰腺癌细胞周期的影响。

**方法:** 应用 RT-PCR 方法检测人胰腺癌细胞株 SW1990 中胆囊收缩素受体(CCKR)mRNA 的表达, 细胞化学法检测 SW1990 细胞中胆囊收缩素受体(CCKR)蛋白水平的表达, 流式细胞仪检测不同浓度的 CCK-8 肽对 SW199 细胞周期的影响。

**结果:** 在人胰腺癌细胞株 SW1990 中不表达 CCK-A 亚型受

体, 但表达 CCK-B 亚型受体; CCKR 在癌细胞株 SW1990 中的表达主要位于细胞膜上, 细胞浆内也可见。在  $10^{-8}$  g/L- $10^{-5}$  g/L 浓度范围内, CCK-8 肽促进 SW1990 细胞的增殖, 呈剂量依赖性, 细胞周期分析发现 S 期细胞增加,  $G_2/M$  期细胞减少。

**结论:** CCKB 受体在人胰腺癌细胞株 SW1990 中表达, CCK-8 肽能促进 SW1990 细胞的增殖, 抑制细胞的凋亡, CCK 通过 CCKR 在胰腺癌细胞的增殖中发挥重要作用。

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 曹亮, 魏群. 胆囊收缩素受体在胰腺癌细胞中的表达及胆囊收缩素对胰腺癌细胞周期的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1599-1602

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1599.asp>

### 0 引言

胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)是人体正常胰腺

生长过程中的重要调节递质,在人体内存在多种分子形式:胆囊收缩素受体(cholecystokinin receptor, CCKR)是位于细胞膜上的G蛋白偶联受体,参与细胞内多种信号传导,CCK与受体结合后影响细胞的增殖.根据CCKR对CCK和胃泌素的亲和力高低,可将其分为CCK-A受体和CCK-B受体(胃泌素受体)两种亚型.CCK及其受体在胰腺癌发生、发展中的重要作用已受到广泛重视.本研究旨在观察CCKR在人胰腺癌细胞株SW1990中的表达情况及CCK-8肽对胰腺癌细胞周期的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株SW1990由上海交通大学附属医院第一人民医院消化内科王兴鹏教授惠赠.细胞培养基(低糖型DMEM)由美国Gibco公司生产.小牛血清及胎牛血清购自中国科学院上海实生细胞生物技术有限公司.免疫组化试剂CCKR抗体和过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物(Peroxidase-Antiperoxidase, PAP)试剂均购自上海森雄公司.流式细胞仪(FACScalibur型)由美国BD公司生产,分析软件为Apple公司随机软件.倒置显微镜由上海精密仪器厂生产.细胞摄像机由德国Leica公司生产.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞传代后加入100 mL/L的胎牛血清10 mL,约12 h后细胞融合达50%左右弃去上清液,改用无血清培养基孵育24 h,使细胞同步化.

1.2.2 免疫细胞化学法 固定后的细胞爬片先用PBS洗涤,再用10 g/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醇阻断内源性过氧化物酶10-20 min, PBS洗涤后再用正常羊血清(二抗的正常血清)1:20室温封闭20 min.使用1:50的CCK-A受体或CCK-B受体的单克隆抗体(羊抗人)于37℃下孵育1 h,洗涤后加入1:100用生物素标记的二抗(马抗羊),于37℃下孵育30 min后用PBS洗涤,再加入适当稀释的兔PAP复合物,在37℃下孵育1 h后予以PBS洗涤,最后用0.4 mg/L DAB+0.3 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色5-15 min,苏木素衬染.阳性染色为细胞膜及细胞浆出现棕黄色颗粒,部分呈深棕黄色颗粒.

1.2.3 本实验采用一步法RT-PCR进行mRNA检测 (1)细胞模板RNA的提取:采用TRIZOL法提取细胞中的总RNA, (2)引物设计合成:根据GeneBank中目的基因序列,通过Primer 3软件进行设计引物.CCK-A受体引物序列:上游引物为5' -tgc ttt gaa ggt gat tgc tg-3',下游引物为5' -gta aca ccc atc gct gtc ct-3',扩增产物大小为340 bp. CCK-B受体引物序列:上游引物为5' -gga gct ggc cat tag aat ca-3',下游引物为5' -acc ccc atg agg tag gaa ac-3',扩增产物大小为252 bp.上游引物为5' -tca ttg aca aac tgc gct tc-3',下游引物为5' -cac aca gct tca cct gag ga-3';扩增产物大小为342 bp.内参基因β-

actin引物序列:上游引物5' -aag tac tcc gtg tgg atc gg-3',下游引物为5' -atg cat tca cct ccc ctg tg-3',扩增产物大小为486 bp.以上引物均由上海生物工程公司合成. (3)反应扩增条件:在0.5 mL EP管中分别加入下列试剂:10× Buffer 5 μL, 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL、dNTPs mix(10 mmol/L 每管)1 μL,模板RNA 1 μL, CCK受体的上游引物、下游引物各1 μL(引物共三对,其中CCK-A受体引物为一对,CCK-B受体引物为两对),内参β-actin上游引物、下游引物各1 μL,RT逆转录酶 1 μL, DNA聚合酶 1 μL,加DEPC水至50 μL,最后在各管内各滴入一滴石蜡油.55℃温育45 min. PCR循环条件:预变性温度:92℃, 30 s;变性温度:92℃, 30 s;退火温度55℃, 30 s;延伸温度72℃, 1 min;循环40次,终止反应后延伸温度为72℃,延时2 min,反应结束后吸取10 μL最终反应的产物,17 g/L琼脂糖凝胶在120 V条件下电泳25 min后,于紫外线下观察电泳结果,用图像分析仪摄像、记录分析.

1.2.4 细胞周期 同步化的细胞最终接种浓度为1×10<sup>8</sup>个细胞/L,取细胞悬液1 mL接种在两块12孔的培养板上,接种后每孔中加入无血清的培养基1 mL及相关浓度的CCK-8肽0.25 mL(经此处理后CCK-8肽浓度被稀释为所需的浓度).细胞药物干预试验共设立六组,其中一组为空白对照组,另五组分别加入不同浓度的CCK-8肽(1×10<sup>-3</sup> g/L、1×10<sup>-4</sup> g/L、1×10<sup>-5</sup> g/L、1×10<sup>-6</sup> g/L、1×10<sup>-7</sup> g/L的CCK-8肽浓度),每组均重复三次.细胞增殖6 h和12 h后,收集各组细胞,制成细胞悬液,用0.01 mol/L PBS水洗涤两次,经700 mL/L的酒精于4℃下固定24 h后,以无药物组作空白对照组,用流式细胞仪检测不同浓度CCK-8肽对细胞周期的影响.

统计学处理 数据以mean±SD表示,由WSTATA统计软件进行方差分析.

## 2 结果

2.1 免疫细胞化学染色结果 CCK-A受体未见阳性染色,CCK-B受体的阳性染色表现为细胞膜及细胞浆出现棕黄色颗粒,部分呈深棕黄色颗粒(图1).

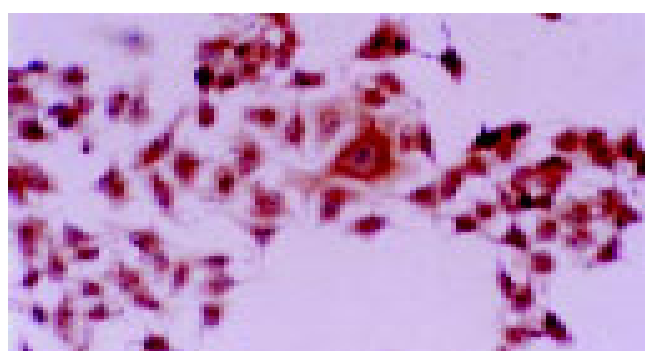


图1 胰腺癌细胞SW1990 CCKB受体免疫细胞化学染色(×250).

2.2 RT-PCR 检测结果 人胰腺癌细胞株SW1990总RNA经RT-PCR成功扩增出CCK-B受体的基因片段和内参 $\beta$ -actin基因片段,相应的片段大小为CCK-B受体为252 bp, $\beta$ -actin为486 bp,所检出基因片段与原设计完全一致,但未能扩增出CCK-A受体的基因片段(图2)。

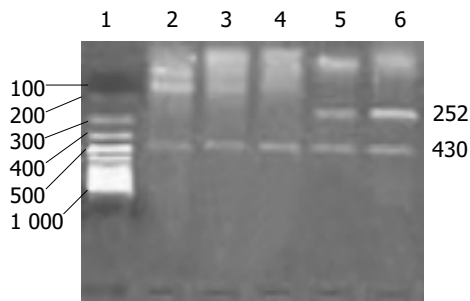


图2 人胰腺癌细胞SW1990中CCKR的表达. 1: marker; 2: 正常胰腺组织对照; 3-4: CCK-A受体; 5-6: CCK-B受体。

2.3 CCK-8 肽干预结果 (1)CCK-8 肽干预后6 h结果:流式细胞仪检测发现,空白对照组细胞各周期比例分别为: $G_0/G_1$ 期85.71%, $G_2/M$ 期14.28%,S期0.01%。药物干预组( $10^{-5}$  g/L) $G_0/G_1$ 期77.97%, $G_2/M$ 期20.49%,S期1.54%。在CCK-8肽使用后6 h,SW1990细胞处于静止期( $G_0/G_1$ 期)细胞比例减少,而处于有丝分裂期( $G_2/M$ 期)及DNA合成活跃期(S期)比例均增加。同时发现随着CCK-8肽浓度的增加,增殖期细胞的比例呈升高趋势。当CCK-8肽浓度为 $10^{-5}$  g/L时,增殖期细胞比例已接近最大,CCK-8肽浓度增为 $10^{-4}$  g/L时,增殖期细胞比例升高较 $10^{-5}$  g/L已不明显。(2)CCK-8肽干预后12 h的结果:流式细胞仪检测发现,空白对照组细胞各周期比例分别为: $G_0/G_1$ 期2.30%, $G_2/M$ 期97.66%,S期0.04%。CCK-8肽干预组( $10^{-5}$  g/L) $G_0/G_1$ 期1.02%, $G_2/M$ 期93.97%,S期5.01%。结果证实细胞接种12 h后绝大多数都进入有丝分裂期( $G_2/M$ 期),两组在该期的比例基本一致。但在CCK-8肽使用后, $10^{-5}$  g/L组提前进入DNA合成活跃期(S期)比例增加(表1)。(3)经统计软件WSTATA进行方差分析: $G_2/M$ 期:各组间F值为31.19, $P < 0.01$ ,在统计学上有显著性意义。对照组与 $10^{-8}$  g/L组差异无显著性( $P = 0.16$ ),而与其他组之间在统计学上有显著性差异( $P < 0.05$ ); $10^{-5}$  g/L组与各组之间有显著性差异;其他各组间均无统计学意义。S期:各组间F值为124.08, $P < 0.01$ ,在统计学上有显著性意义。空白对照组与其他各组间有显著性差异( $P < 0.05$ ); $10^{-8}$  g/L组与其他各组间有显著性差异( $P < 0.05$ ); $10^{-7}$  g/L组与其他组间有显著性

差异; $10^{-6}$  g/L组与其他组间有显著性差异; $10^{-5}$  g/L与 $10^{-4}$  g/L组间无显著性差异。

### 3 讨论

近年来,胆囊收缩素及其受体在胰腺癌发生中的作用日益受到重视。Reubi *et al*<sup>[1]</sup>采用放射自显影技术对人类多种肿瘤进行研究,在胰腺癌、小细胞肺癌等多种肿瘤中均有CCK-B受体的表达。CapLin *et al*<sup>[2]</sup>研究证实正常胰腺标本中无CCK-B/胃泌素受体、前胃泌素、甘氨酸延伸胃泌素或酰胺胃泌素的表达,但在胰腺癌细胞则显示中度到高度表达:CCK-B/胃泌素受体95%,前胃泌素91%,甘氨酸延伸胃泌素55%,酰胺胃泌素23%。本研究采用RT-PCR法,检测了人胰腺癌细胞株SW1990中CCKR mRNA的表达情况,结果证实在人胰腺癌细胞株SW1990中表达CCK-B受体的mRNA,与Ji *et al*<sup>[3]</sup>的结果吻合。采用免疫细胞化学法证实,在人胰腺癌细胞株SW1990中,CCK-B受体也有中度到高度的阳性表达,与De Weerth *et al*<sup>[4]</sup>的结果类似。本研究在mRNA水平及蛋白水平上共同证实在人胰腺癌细胞株SW1990中有CCK-B受体的表达。人胰腺癌细胞株SW1990中CCKR表达表明了CCK-B受体在胰腺癌的发生、发展中起重要作用。

多个研究已证实CCK-B受体为细胞膜受体,属于G蛋白偶联受体超家族,能与鸟苷酸可逆性结合,是一种激素受体和信号传导的功能蛋白。本研究通过免疫细胞化学法证实,在人胰腺癌细胞株中,CCK-B受体不仅存在于细胞膜上而且存在于细胞浆内。细胞膜上CCK-B受体的表达强度高于细胞浆,在细胞浆内CCK-B受体分布比较均匀,细胞浆内CCK-B受体的出现可能与CCK-B受体的内在化有关。Tarasova *et al*<sup>[5]</sup>观察到胃泌素在细胞膜表面与CCK-B受体结合后,可通过包涵素依赖机制内吞入胞,在激素释放到细胞内特定区域后,受体通过再循环机制回到细胞膜上,其再循环时间约1 h左右。当受体处于跨膜期,细胞膜上和细胞浆内同时可见受体表达。

本研究采用CCK-8肽对人胰腺癌细胞株SW1990进行药物干预试验。通过流式细胞仪检测证实CCK-8肽能促进该细胞株的增殖,在CCK-8肽作用6 h后即可检测到胰腺癌细胞株SW1990有部分细胞已提前进入S期。有关CCK促进细胞增殖的机制,目前认为与CCK通过CCKR激活细胞增殖信号转导途径有关。CCK与受体结合后可激活肌醇磷脂信使系统,通过G蛋白激活磷脂酶C而使磷脂酰肌醇二磷酸水解,有1,4,5-三磷酸肌醇和二酰基甘油,并进一步激活蛋白激酶C,从而使胞内多种底物

表1 12 h的CCK-8肽对SW1990细胞周期的影响(mean  $\pm$  SD)

细胞周期	空白对照	$10^{-8}$ g/L	$10^{-7}$ g/L	$10^{-6}$ g/L	$10^{-5}$ g/L	$10^{-4}$ g/L
$G_2/M$	97.57 $\pm$ 0.12	96.46 $\pm$ 0.38	95.71 $\pm$ 0.56	95.15 $\pm$ 0.14	93.85 $\pm$ 0.18	95.38 $\pm$ 0.33
S	0.075 $\pm$ 0.02	1.285 $\pm$ 0.35	2.430 $\pm$ 0.41	3.525 $\pm$ 0.21	5.015 $\pm$ 0.17	4.280 $\pm$ 0.85

蛋白磷酸化,而激活与基因表达有关的激酶,最终引起丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)的激活,直接导致核内转录因子活化而达到调节增殖的作用;转录因子NF- $\kappa$ B也可将活化信号由细胞浆传至细胞核。

尽管不同浓度CCK-8肽都对人胰腺癌细胞株SW1990的增殖(增殖)周期有影响,但本研究结果仍表明当CCK-8肽浓度为 $10^{-5}$  g/L左右时,促进细胞增殖的作用最大,同时抑制细胞凋亡作用也较明显。实验结果表明,CCK-8肽能促进SW1990细胞提前进入S期,随着CCK-8肽浓度的升高进入S期的SW1990细胞比例也逐渐升高;但当CCK-8肽浓度超过 $10^{-5}$  g/L时,增加CCK-8肽的浓度并不明显增加进入S期细胞比例。因此,CCK-8肽浓度为 $10^{-5}$  g/L是人胰腺癌细胞株SW1990增殖的一个较佳浓度,同时也提示一定浓度的CCK在人胰腺癌的发生、发展中起重要作用。

实验中CCK-8肽对人胰腺癌细胞株SW1990的增殖存在一个较佳的浓度,这与人胰腺癌细胞株仅为单因素CCK-8肽作用有关。尽管对正常人体内CCK的作用规律目前知之不深,但由于人体内存在着多种细胞生长因子和细胞生长抑制因子,调控肿瘤细胞增殖的因素更加复杂,机制更加多样,多种因素作用的结果或许对所需的CCK浓度不会太高。本研究表明,不仅CCK-8肽的作用浓度对SW1990的增殖和凋亡均有影响,而且CCK-8肽的作用时间也对细胞的增殖和凋亡有影响。在6 h的 $10^{-5}$  g/L浓度下,SW1990提前进入S期的比例已超过12 h的对照组(1.54%

vs 0.075%);而该浓度12 h S期细胞的比例也比6 h的明显升高(5% vs 1.54%)。表明在 $10^{-8}$ - $10^{-5}$  g/L浓度范围内,CCK-8肽作用时间越长,进入增生期的细胞比例越多。因而提示CCK的浓度及作用时间在促进胰腺癌的发生、发展中均起重要作用。尽管CCK-8肽24 h内的作用结果表明,药物浓度能影响SW1990细胞的增殖和细胞凋亡,但对24 h后的CCK-8肽的作用结果,还有待于进一步研究。

胰腺癌的早期发现、早期诊断和治疗是提高患者生存率的主要策略。尽管目前对胰腺癌采用较多的诊断及治疗方法,但实际效果仍不如人意,深入了解CCK及其受体和其他因素在胰腺癌中的作用,可以筛选出合理有效的胰腺癌生物学标记及药物,更好的用于临床诊断和治疗。

#### 4 参考文献

- 1 Reubi JC, Scheer JC, Waser B. Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 1997; 57:1377-1386
- 2 Caplin M, Savage K, Khan K, Brett B, Rode J, Varro A, Dhillon A. Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2000;87:1035-1040
- 3 Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM, Logsdon CD. Human pancreatic acinar cells do not respond to cholecystokinin. *Pharmacol Toxicol* 2002;91:327-332
- 4 De Weerth A, von Schrenck T, Lohr M, Mirau S, Greten H, Kalthoff H. Human pancreatic cancer cell Lines express the CCKB receptor. *Hepatogastroenterology* 1999;46:472-478
- 5 Tarasova NI, Wank SA, Hudson EA, Romanov VI, Czerwinski G, Resau JH, Michejda CJ. Endocytosis of gastrin in cancer cells ex-pression gastrin/CCK-B receptor. *Cell Tissue Res* 1997; 287:325-333

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 直肠癌病理和分子生物特征与预后的多因素分析

顾军,王梅,李永梅,王雅杰,薛春燕,高伟

顾军,王梅,李永梅,王雅杰,薛春燕,高伟,中国人民解放军解放军第二军医大学附属长海医院肿瘤科 上海市 200433

通讯作者:顾军,200433,上海市杨浦区长海路174号,中国人民解放军解放军第二军医大学附属长海医院肿瘤科. mingqi999@yahoo.com.cn  
电话:021-25072062 传真:021-25070608

收稿日期:2005-03-31 接受日期:2005-04-09

### 摘要

目的:探讨直肠癌临床病理特征和生物学因素与预后的关系。

方法:143例直肠癌患者,青年组31例,中年组60例,

老年组52例,中高分化腺癌101例,其他42例,低于C期的67例,淋巴结转移31例,应用EnVision法分析切片P16<sup>ink4a</sup>、P53、PCNA和PKC- $\alpha$ 的表达,单因素和多因素分析其对预后的影响。

结果:各年龄组5 a生存率分别为56.5%,61.4%和59.4%。单因素分析,预后与病理类型( $\chi^2 = 18.994$ ,  $P = 0.002$ )、淋巴结转移情况( $\chi^2 = 13.311$ ,  $P = 0.021$ )、临床病理分期( $\chi^2 = 17.075$ ,  $P = 0.004$ )及年龄( $\chi^2 = 11.249$ ,  $P = 0.047$ )均