

论著

文章编号:1000-5404(2014)16-1684-05

## 胆囊收缩素对人胆管癌 QBC<sub>939</sub> 细胞分泌 MMPs、TIMPs 水平的影响

杨 星,张丰深,孙 海,邓小明,陈 焱 (400020 重庆,解放军第324医院肝胆外科)

**[摘要]** **目的** 观察胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)对人胆管癌 QBC<sub>939</sub> 细胞基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其内源性组织抑制剂(tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs)表达的影响,阐明 CCK 促进胆管癌周围神经浸润(perineural invasion, PNI)可能的分子机制。**方法** 将人胆管癌 QBC<sub>939</sub> 细胞分为对照组与实验组。对照组为未经处理的胆管癌细胞 QBC<sub>939</sub>;实验 1~8 组分别加入  $10^{-13}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$  mol/L CCK<sub>8s</sub>,  $10^{-7}$  mol/L L18(CCK-A 受体拮抗剂)、 $10^{-7}$  mol/L L60(CCK-B 受体拮抗剂)、 $10^{-7}$  mol/L CCK<sub>8s</sub> +  $10^{-7}$  mol/L L18、 $10^{-7}$  mol/L CCK<sub>8s</sub> +  $10^{-7}$  mol/L L60 的 QBC<sub>939</sub>, 孵育 48 h, 采用 Transwell 细胞侵袭实验比较各组 QBC<sub>939</sub> 细胞侵袭能力的差异,并用 Real-time PCR 和 Western blot 检测各组 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 mRNA 和蛋白表达情况。各组间比较采用方差分析,采用 Spearman 法进行相关性检验。**结果** CCK<sub>8s</sub> 能够明显促进 QBC<sub>939</sub> 细胞的侵袭能力,L18 及 L60 均能明显减弱 CCK<sub>8s</sub> 对 QBC<sub>939</sub> 细胞的作用。与对照组相比,实验 1~4 组 MMP-2 及 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高( $P < 0.01$ ),TIMP-1 及 TIMP-2 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低( $P < 0.01$ );实验 5~6 组 MMP-2 及 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低( $P < 0.01$ ),TIMP-1 及 TIMP-2 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高( $P < 0.01$ );实验 7~8 组 MMPs 及 TIMPs mRNA 和蛋白表达水平与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验 1~4 组 MMP-2 mRNA 和蛋白的表达水平与 CCK 浓度呈正相关(相关系数  $r$  分别为 0.972、0.963,  $P < 0.01$ ),而 TIMP-2 mRNA 和蛋白的表达水平与 CCK 浓度呈负相关(相关系数  $r$  分别为 -0.974、-0.952,  $P < 0.01$ )。MMP-9、TIMP-1 的变化与 CCK 浓度间无明显相关性;实验组 5 与实验组 6 比较、实验组 7 与实验组 8 比较,MMP-2、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** CCK 能明显促进 QBC<sub>939</sub> 细胞侵袭能力及 MMPs 的表达、降低 TIMPs 的表达,可能主要通过影响 MMP-2、TIMP-2 平衡的途径增加胆管癌细胞的侵袭能力从而促进胆管癌的 PNI。

**[关键词]** 胆囊收缩素;基质金属蛋白酶;胆管癌;周围神经浸润

**[中图分类号]** R345;R735.8;R977.1

**[文献标志码]** A

## Effect of cholecystokinin on expression of MMPs and TIMPs in human cholangiocarcinoma QBC<sub>939</sub> cells

Yang Xing, Zhang Fengshen, Sun Hai, Deng Xiaoming, Chen Yan (Department of Hepatobiliary Surgery, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing, 400020, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of cholecystokinin (CCK) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) in human cholangiocarcinoma QBC<sub>939</sub> cells. **Methods** Human cholangiocarcinoma QBC<sub>939</sub> cells were assigned into a control group and 8 experimental groups. The experimental groups (group 1 to group 8) were treated with  $10^{-13}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  and  $10^{-7}$  mol/L L18 (a CCK-A receptor antagonist),  $10^{-7}$  mol/L L60 (a CCK-B receptor antagonist),  $10^{-7}$  mol/L CCK<sub>8s</sub> +  $10^{-7}$  mol/L L18, and  $10^{-7}$  mol/L CCK<sub>8s</sub> +  $10^{-7}$  mol/L L60, respectively, for 48 h. Transwell Matrigel invasion assay was used to study the impact on the invasion ability of QBC<sub>939</sub> cells. The mRNA and protein expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 were detected by real-time PCR and Western blotting. All the data were analyzed using the analysis of variance and Spearman rank correlation. **Results** CCK<sub>8s</sub> could promote invasion ability of QBC<sub>939</sub> cells significantly. The mRNA and protein expression of MMP-2 and MMP-9 in experimental groups 1 to 4 were significantly higher than those of

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5159)

**[通信作者]** 张丰深, E-mail: zfs-cq@sohu.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140621.0850.008.html> (2014-06-21)

the control group ( $P < 0.01$ ), and the mRNA and protein expression of TIMP-1 and TIMP-2 were significantly lower ( $P < 0.01$ ). The mRNA and protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in experimental groups 5 and 6 were obviously lower than those of the control group ( $P < 0.01$ ), and the expression of TIMP-1 and TIMP-2 were obviously higher ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the mRNA and protein expression of MMPs and TIMPs among experimental groups 7 and 8 and the control group. The mRNA and protein expression of MMP-2 in experimental groups 1 to 4 were positively correlated with the concentrations of CCK ( $r = 0.972, 0.963; P < 0.01$ ), while those of TIMP-2 were negatively correlated with the concentrations of CCK ( $r = -0.974, -0.952; P < 0.01$ ). **Conclusion** CCK can significantly promote the invasion ability of QBC<sub>939</sub> cells and the expression of MMPs, but decrease the expression of TIMPs in QBC<sub>939</sub> cells. CCK may promote perineural invasion of cholangiocarcinoma mainly through impacting the balance between MMP-2 and TIMP-2.

[**Key words**] cholecystokinin; matrix metalloproteinase; cholangiocarcinoma; perineural invasion

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2010BB5159). Corresponding author: Zhang Fengshen, E-mail:zfs-cq@sohu.com

胆管癌是来源于胆道系统导管上皮的一种高致死率的恶性肿瘤,总体5年生存率仅为5%<sup>[1]</sup>,早期发生浸润转移是导致其预后差的主要原因。沿胆管周围神经浸润(perineural invasion, PNI)是胆管癌浸润转移的重要特点<sup>[2]</sup>,但参与调节的主要因子及其分子机制尚不清楚。我们前期研究发现,胆管癌表达胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)受体,且CCK具有降低胆管癌QBC<sub>939</sub>细胞粘附、促进其运动的能力,是胆管癌PNI的重要调节因子之一<sup>[3]</sup>,但其具体的分子机制尚少见报道。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解、细胞迁移通道的形成是肿瘤实现浸润转移的关键步骤,其中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)起决定性作用<sup>[4]</sup>,而其内源性组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMPs)与MMPs结合而抑制MMPs对ECM的降解。MMPs与TIMPs的失衡与肝门部胆管癌PNI密切相关<sup>[5]</sup>。目前偶有报道CCK及其同族的胃泌素对胃癌、大肠癌和胰癌细胞系MMP表达和分泌有一定的促进作用<sup>[6-7]</sup>,并与胰癌的PNI相关<sup>[8]</sup>;而CCK与胆管癌细胞MMPs、TIMPs平衡的关系及其在胆管癌PNI中的作用尚少见相关报道。本研究以体外培养的人胆管癌QBC<sub>939</sub>细胞系为靶细胞,分析CCK对其侵袭能力及MMPs、TIMPs的mRNA、蛋白表达的影响,以期为进一步探讨胆管癌细胞PNI的分子机制提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

人胆管癌细胞系QBC<sub>939</sub>由第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所王曙光教授惠赠。Matrigel胶购自美国BD公司,CCK<sub>8s</sub>、PVDF膜购自美国Sigma公司,L18及L60由Evans BE教授(Merck Co, USA)惠赠,RPMI1640培养基、Transwell小室购自美国Hyclone公司,胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)购自

美国Gibco公司,MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2一抗及相应二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司,市售青霉素、链霉素,Real-time PCR试剂盒购自德国Roche公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 将QBC<sub>939</sub>细胞在37℃,相对湿度100%,5%CO<sub>2</sub>培养箱中,于含10%胎牛血清,100 kU/L青霉素,100 mg/L链霉素的RPMI1640培养基的条件下培养;每1~2天换液1次,0.25%胰蛋白酶每3~4天消化并传代1次。实验采用对数生长期细胞,消化传代后,在含10%小牛血清的DMEM培养基中培养贴壁,再换成无血清培养液。

1.2.2 实验分组 分为对照组及实验组。对照组为未经处理的胆管癌细胞QBC<sub>939</sub>;实验1~8组为分别加入10<sup>-13</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-7</sup> mol/L的CCK<sub>8s</sub>,10<sup>-7</sup> mol/L L18(CCK-A受体拮抗剂)、10<sup>-7</sup> mol/L L60(CCK-B受体拮抗剂)、10<sup>-7</sup> mol/L CCK<sub>8s</sub> + 10<sup>-7</sup> mol/L L18、10<sup>-7</sup> mol/L CCK<sub>8s</sub> + 10<sup>-7</sup> mol/L L60的胆管癌细胞QBC<sub>939</sub>。

1.2.3 Transwell细胞侵袭实验 参考文献[9]的方法,取对数生长期的QBC<sub>939</sub>细胞,用0.25%的胰酶消化、离心、洗涤后重悬于无血清的RPMI1640培养基中,取20 μL稀释为1 mg/mL Matrigel均匀铺满Transwell小室底部、凝固,Transwell小室上室加200 μL 1 × 10<sup>5</sup>个QBC<sub>939</sub>细胞悬液,下室加入含10%胎牛血清RPMI1640培养基500 μL;根据实验分组分别在上室内加入10<sup>-13</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-7</sup> mol/L的CCK<sub>8s</sub>,10<sup>-7</sup> mol/L L18、10<sup>-7</sup> mol/L L60、10<sup>-7</sup> mol/L CCK<sub>8s</sub> + 10<sup>-7</sup> mol/L L18、10<sup>-7</sup> mol/L CCK<sub>8s</sub> + 10<sup>-7</sup> mol/L L60,每组平行3个样本。37℃,5%CO<sub>2</sub>温箱内孵育48 h。棉签擦去内层膜表面未透膜的细胞,4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液室温固定,台盼蓝染色,400倍显微镜下计数随机3个视野的穿过膜的细胞数,计算各组平均值来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.2.4 Real-time PCR检测 MMPs(MMP-2、MMP-9)、TIMPs(TIMP-1、TIMP-2)mRNA含量 根据实验分组设计分别加入CCK<sub>8s</sub>和(或)L18、L60作用细胞48 h后,采用RNAiso Plus提取各组培养QBC<sub>939</sub>细胞的总RNA,Primscript™ RT reagent Kit行逆

转录反应,操作按试剂说明书进行,引物序列和产物长度见表1。用SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒行RT-PCR检测,反应条件按照试剂盒说明书设置。根据融解曲线及琼脂糖凝胶电泳确保产物正确。采用制作标准曲线的方法得到数据。

表1 MMPs及TIMPs PCR引物序列和扩增片段长度

基因	上游引物	下游引物	产物长度(bp)
MMP-2	TGATGCCTTTGCTCGTGC	AAGGGGTATCCATCGCCA	129
MMP-9	ATGCTGCTGTTTCAGCCGG	CCTCGTGCCTGTCCAAAG	121
TIMP-1	CTGTTGGCTGTGAGGAATGC	CTGGAAGCCCTTTTCAGAGC	119
TIMP-2	GCACCACCCAGAAGAAGAGC	ACCCAGTCCATCCAGAGCC	124
β-Actin	TGACGTGGACATCCGCAAAG	CTGGAAGTGGACAGCGAGG	205

1.2.5 Western blot 检测 MMPs (MMP-2、MMP-9)、TIMPs (TIMP-1、TIMP-2) 蛋白含量 根据实验分组设计分别加入CCK<sub>8s</sub>和(或)L18、L60作用细胞48 h后,预冷PBS液漂洗2次,细胞裂解液提取细胞总蛋白,应用BCA试剂盒检测MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2蛋白浓度。灌制10%和4%的SDS-聚丙烯酰胺分离胶和浓缩胶,电泳槽中加入Tris-甘氨酸电泳缓冲液,将提取的蛋白高温水浴后与SDS上样缓冲液混匀,上样。电泳完毕后用湿转膜法将蛋白转印于PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭4℃过夜,依次加入一抗、二抗孵育,应用发光试剂显影,及X胶片成像。扫描胶片后应用Labworks4.6软件进行灰度分析。

### 1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,各组间比较采用方差分析,实验1~4组的MMPs、TIMPs mRNA和蛋白的表达水平与CCK浓度的相关性检验采用Spearman法。

## 2 结果

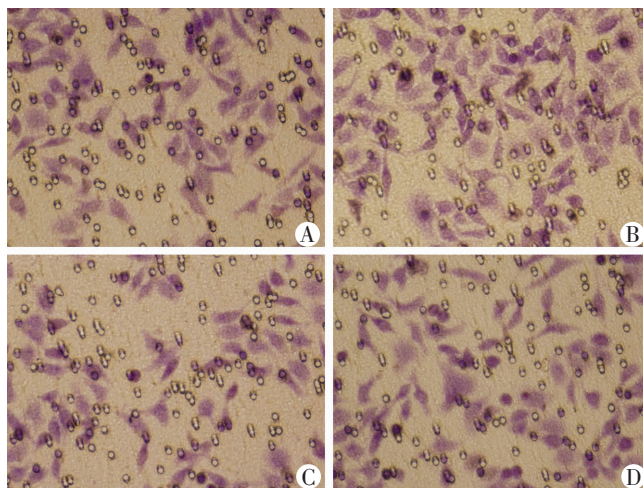
### 2.1 CCK及其受体拮抗剂对QBC939细胞侵袭能力的影响

CCK<sub>8s</sub>在 $10^{-13}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$  mol/L不同浓度时,能够明显促进QBC<sub>939</sub>细胞的侵袭能力,且这种促进作用随CCK<sub>8s</sub>的浓度增加而逐渐增强;而CCK受体拮抗剂L18及L60均能明显减弱CCK<sub>8s</sub>对QBC<sub>939</sub>细胞的作用,且两种CCK受体拮抗剂的作用无显著差异(图1,表1)。

表1 CCK及其受体拮抗剂对QBC939细胞侵袭能力的影响

组别	细胞数
对照组	289.1 ± 11.2
实验组1	341.4 ± 13.2 <sup>a</sup>
实验组2	412.5 ± 13.7 <sup>b</sup>
实验组3	543.6 ± 12.9 <sup>b</sup>
实验组4	702.8 ± 14.8 <sup>b</sup>
实验组5	164.7 ± 13.5 <sup>b</sup>
实验组6	158.3 ± 11.8 <sup>b</sup>
实验组7	278.6 ± 12.9
实验组8	281.4 ± 11.4

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较



A: 对照组; B: 加入CCK后侵袭力明显增强(实验组4); C: 同时加入CCK + L18(实验组7); D: 同时加入CCK + L60(实验组8)

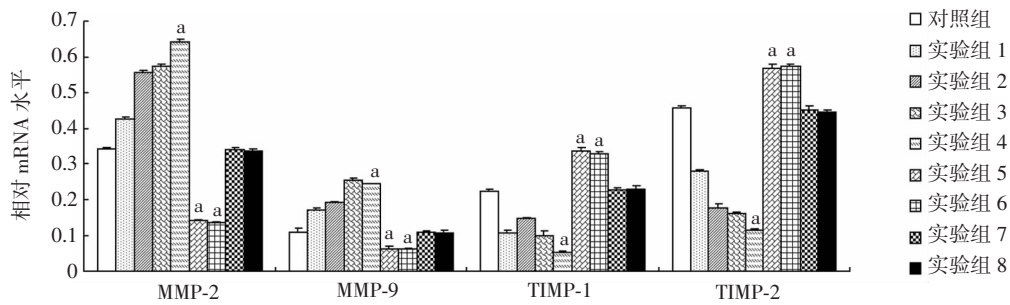
图1 不同浓度CCK及其受体拮抗剂作用于QBC<sub>939</sub>细胞对其侵袭能力的影响(×400)

### 2.2 Real-time PCR检测MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 mRNA表达水平

与对照组相比,实验1~4组,MMP-2及MMP-9 mRNA的表达水平明显升高( $P < 0.01$ ),TIMP-1及TIMP-2 mRNA的表达水平明显降低( $P < 0.01$ ),且MMP-2 mRNA的表达水平与CCK浓度呈正相关( $r = 0.972, P < 0.01$ ),TIMP-2 mRNA的表达水平与CCK浓度呈负相关( $r = -0.974, P < 0.01$ ),而MMP-9、TIMP-1的变化与CCK浓度间无明显相关性( $P > 0.05$ );实验组5及实验组6与对照组比较,MMP-2及MMP-9 mRNA的表达水平明显降低( $P < 0.01$ ),TIMP-1及TIMP-2 mRNA的表达水平明显升高( $P < 0.01$ );实验组7、8的MMP-2、MMP-9、TIMP-1及TIMP-2 mRNA表达水平与对照组比较无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验组5与实验组6比较、实验组7与实验组8比较,MMP-2、MMP-9、TIMP-1及TIMP-2 mRNA表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图2)。

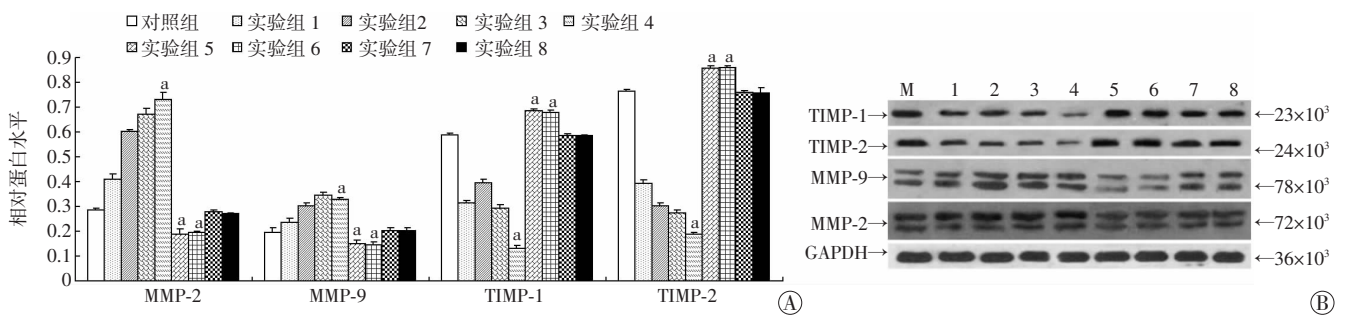
### 2.3 Western blot检测MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2蛋白的表达水平

使用灰度扫描比较得出MMPs(MMP-2、MMP-9)及TIMPs(TIMP-1、TIMP-2)蛋白与GAPDH的相对表达水平,结果表明:与对照组相比,加入不同浓度CCK<sub>8s</sub>的实验组1~4 MMP-2及MMP-9蛋白的表达水平明显升高( $P < 0.01$ ),TIMP-1及TIMP-2蛋白的表达水平明显降低( $P < 0.01$ ),且MMP-2蛋白的表达水平与CCK浓度呈正相关( $r = 0.963, P < 0.01$ ),TIMP-2蛋白的表达水平与CCK浓度呈负相关( $r = -0.952, P < 0.01$ ),而MMP-9、TIMP-1的变化与CCK浓度间无明显相关性( $P > 0.05$ );加入CCK受体拮抗剂的实验组5和实验组6 MMP-2及MMP-9蛋白的表达水平较对照组明显降低( $P < 0.01$ ),TIMP-1及TIMP-2蛋白的表达水平明显升高( $P < 0.01$ );而同时加入CCK<sub>8s</sub>及CCK受体拮抗剂的实验组7和实验组8的MMP-2、MMP-9、TIMP-1及TIMP-2蛋白表达水平与对照组比较无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验组5与实验组6比较、实验组7与实验组8比较,MMP-2、MMP-9、TIMP-1及TIMP-2蛋白的表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图3)。



对照组:未经处理的胆管癌细胞 QBC<sub>939</sub>;实验1~8组:分别为加入 10<sup>-13</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-7</sup> mol/L 的 CCK<sub>8s</sub>, 10<sup>-7</sup> mol/L L18、10<sup>-7</sup> mol/L L60、10<sup>-7</sup> mol/L CCK<sub>8s</sub> + 10<sup>-7</sup> mol/L L18、10<sup>-7</sup> mol/L CCK<sub>8s</sub> + 10<sup>-7</sup> mol/L L60 的 QBC<sub>939</sub>; a: P < 0.01, 与对照组比较

图2 Real-time PCR 检测不同浓度 CCK 及其受体拮抗剂对 QBC<sub>939</sub> 细胞 MMPs、TIMPs mRNA 表达的影响



A: 半定量分析结果; B: Western blot 图像 M: 对照组; 1~8: 分别为加入 10<sup>-13</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-7</sup> mol/L 的 CCK<sub>8s</sub>, 10<sup>-7</sup> mol/L L18、10<sup>-7</sup> mol/L L60、10<sup>-7</sup> mol/L CCK<sub>8s</sub> + 10<sup>-7</sup> mol/L L18、10<sup>-7</sup> mol/L CCK<sub>8s</sub> + 10<sup>-7</sup> mol/L L60 的 QBC<sub>939</sub>; a: P < 0.01, 与对照组比较

图3 Western blot 检测不同浓度 CCK 及其受体拮抗剂对 QBC<sub>939</sub> 细胞 MMPs、TIMPs 蛋白表达的影响

### 3 讨论

PNI 是胆管癌浸润转移的重要特点,也是导致胆管癌患者预后差的重要原因,但参与其中调节的主要因子及其分子机制尚不明确<sup>[10]</sup>。近来研究<sup>[11]</sup>发现,CCK 不仅是一种能引起胆囊收缩的胃肠道多肽激素,还广泛存在于中枢及外周神经系统,并以神经递质或神经调质的形式通过与靶细胞膜上的 CCK 受体结合而发挥重要的生理作用,其作用可被 CCK 受体拮抗剂所抑制。根据受体对硫酸酯化及非硫酸酯化的 CCK 激动剂及选择性拮抗剂的相对亲和性,一般将 CCK 受体分为两型:CCK-A 受体和 CCK-B 受体。我们前期研究<sup>[5]</sup>发现,在胆管周围有大量的 CCK 肽能神经纤维,80% 的胆管癌有 CCK-A 受体及 CCK-B 受体表达,更重要的是,有 CCK 受体表达的胆管癌其 PNI 指数明显升高,呈正相关,浸润转移范围明显扩大,预后较差;神经纤维可能通过分泌 CCK 导致胆管癌细胞的嗜神经性,证明 CCK 是胆管癌 PNI 的重要调节因子之一,但其具体的分子机制尚不明确。

MMPs 是锌离子依赖型肽链内切酶,是迄今为止发现的与肿瘤侵袭和转移关系最密切的一类蛋白水解

酶<sup>[12]</sup>。MMPs 几乎能降解 ECM 的所有成分,促进癌细胞对周围正常组织的侵袭,导致肿瘤的扩散和转移,其内源性组织抑制剂 TIMPs 与 MMPs 结合而抑制 MMPs 对 ECM 的降解<sup>[13]</sup>。Fava 等<sup>[14]</sup>在对胆管癌发生的步骤与分子生物学机制的研究中也证实了胆管癌的浸润转移与 MMPs 过表达有关。目前研究发现,MMPs 与 TIMPs 的失衡与胆管癌 PNI 密切相关<sup>[15]</sup>,且 CCK 对胰癌细胞系 MMPs 表达和分泌有一定的促进作用<sup>[16]</sup>,所以我们推测 CCK 可能通过影响胆管癌细胞 MMPs、TIMPs 平衡促进其 PNI。

自从 1962 年 Gross 等发现第一种间质胶原酶并命名为 MMP-1 至今,MMP 家族至少已发现 23 个成员;在所有的基质金属蛋白酶中分布较广,与肿瘤侵袭转移关系较密切的主要是 MMP-2 及 MMP-9<sup>[17]</sup>。因此本实验在既往研究的基础上,以人胆管癌 QBC<sub>939</sub> 细胞为研究对象,首先通过 Transwell 细胞侵袭实验再次证明了 CCK<sub>8s</sub> 能够明显促进 QBC<sub>939</sub> 细胞的侵袭能力,CCK-A 受体拮抗剂 L18 及 CCK-B 受体拮抗剂 L60 均能明显减弱 CCK<sub>8s</sub> 对 QBC<sub>939</sub> 细胞的作用,且两种 CCK 受体拮抗剂的作用无显著差异。应用 Real-time PCR 及 Western blot 等方法检测经 CCK<sub>8s</sub>、L18、L60 等作用



后 QBC<sub>939</sub> 细胞 MMP-2、MMP-9 及其相应的内源性组织抑制剂 TIMP-2、TIMP-1 mRNA 及蛋白的表达, 结果发现: 加入不同浓度 CCK 的实验组 1~4 与对照组相比, MMPs mRNA 及蛋白的表达水平明显升高, TIMPs 的表达水平明显降低, 说明 CCK 对胆管癌基质降解能力有促进作用。进一步行组间比较发现, 实验组 1~4 的 MMP-2 mRNA 和蛋白的表达水平与 CCK 浓度呈正相关, TIMP-2 mRNA 和蛋白的表达水平与 CCK 浓度呈负相关, 但 MMP-9、TIMP-1 的变化与 CCK 浓度间无明显相关性, 说明 CCK 这种对 ECM 降解能力的促进作用可能主要是通过影响 MMP-2、TIMP-2 的平衡来实现的。

加入 CCK-A 受体拮抗剂 L18 的实验组 5 和加入 CCK-B 受体拮抗剂 L60 的实验组 6 与对照组比较, MMPs mRNA 和蛋白的表达水平明显降低, TIMPs 的表达水平明显升高, 但两组间各指标比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 而同时加入 CCK 和 L18 的实验组 7 及同时加入 CCK 和 L60 的实验组 8 与对照组比较, MMPs 及 TIMPs mRNA 和蛋白表达水平与对照组比较无明显差异, 两组间比较也无明显差别 ( $P > 0.05$ )。既往研究提示, 胆管癌细胞 QBC<sub>939</sub> 有 CCK-A 和 CCK-B 受体存在; 本研究也证实了 L18 及 L60 均能明显减弱 CCK<sub>8s</sub> 对 QBC<sub>939</sub> 细胞 MMPs 表达的促进作用, 且两种 CCK 受体拮抗剂的作用无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 提示其可能对胆管癌的侵袭转移过程有抑制作用。这些 CCK 受体拮抗剂的出现, 使以 CCK 受体为靶向的治疗策略有了更多的选择。

本实验初步证实了 CCK 可能通过影响 MMPs、TIMPs 平衡的途径增加胆管癌细胞的侵袭能力从而促进胆管癌的 PNI, 为进一步了解胆管癌细胞 PNI 的分子机制提供新的线索和证据, 下一步我们拟利用 QBC<sub>939</sub> 细胞与脊髓背根神经节共培养模型及胆管癌裸鼠肝门部原位移植后浸润生长模型进一步证实 CCK 对 MMPs、TIMPs 的影响及对胆管癌 PNI 的作用。

#### 参考文献:

[1] Yin X, Zhang B H, Qiu S J, *et al.* Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features, treatment modalities, and prognosis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(9): 2869-2876.  
[2] Murakami Y, Uemura K, Sudo T, *et al.* Perineural invasion in extrahepatic cholangiocarcinoma: prognostic impact and treatment strategies[J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(8): 1429-1439.

[3] 郑秀海, 张丰深, 马宽生, 等. 人胆管癌细胞神经周围浸润模型的构建与初步观察[J]. *消化外科*, 2005, 4(5): 354-356.  
[4] Sato H, Takino T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(4): 843-847.  
[5] 杨福全, 戴显伟, 赵海鹰, 等. 肝门胆管癌基质金属蛋白酶 MMP-2 及其组织抑制因子 TIMP-2 表达及意义的研究[J]. *中国现代普通外科进展*, 2002, 5(2): 80-84.  
[6] Yin Y, Grabowska A M, Clarke P A, *et al.* Helicobacter pylori potentiates epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer: links to soluble HB-EGF, gastrin and matrix metalloproteinase-7[J]. *Gut*, 2010, 59(8): 1037-1045.  
[7] Zugowski C, Lieder F, Muller A, *et al.* STAT3 controls matrix metalloproteinase-1 expression in colon carcinoma cells by both direct and AP-1-mediated interaction with the MMP-1 promoter[J]. *Biol Chem*, 2011, 392(5): 449-459.  
[8] Okada Y, Eibl G, Guha S, *et al.* Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21(4): 285-292.  
[9] Liu W, Tian F, Jiang P, *et al.* Aberrant expression of laminin gamma2 correlates with poor prognosis and promotes invasion in extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Surg Res*, 2014, 186(1): 150-156.  
[10] Shirai K, Ebata T, Oda K, *et al.* Perineural invasion is a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *World J Surg*, 2008, 32(11): 2395-2402.  
[11] Rehfeld J F, Friis-Hansen L, Goetze J P, *et al.* The biology of cholecystokinin and gastrin peptides[J]. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(12): 1154-1165.  
[12] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.  
[13] Halberszadt A, Halon A, Pajak J, *et al.* The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis[J]. *Ginek Pol*, 2006, 77(1): 63-71.  
[14] Fava G, Lorenzini I. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. *Int J Hepatol*, 2012, 2012: 630543.  
[15] Shen F Z, Zhang B Y, Feng Y J, *et al.* Current research in perineural invasion of cholangiocarcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 24.  
[16] Smigielski J, Piskorz L, Talat-Wojnarowska R, *et al.* The estimation of metalloproteinases and their inhibitors blood levels in patients with pancreatic tumors[J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 11: 137.  
[17] Edwards J G, McLaren J, Jones J L, *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(10): 1553-1559.

(收稿: 2014-01-20; 修回: 2014-03-16)

(编辑 龙亮)