

胃泌素/CCK-B 受体环在多种肿瘤中的表达*

汪 闯**, 周建奖, 谢 渊, 赵 艳***

(贵阳医学院 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 研究胃泌素(GAS)在多种肿瘤中的表达。方法: 应用免疫组织化学检测由 40 例肿瘤组织组成(含 87 个点)的组织芯片中 GAS 的表达,同时检测临床相应的肿瘤组织和胃癌细胞 SGC-7901、AGS、肺癌细胞 A549、肝癌 HepG2、乳腺癌细胞 MCF-7 中 GAS 和胃泌素受体(CCK-BR)的表达。结果: GAS 主要表达于细胞质,组织芯片检测发现 GAS 在食管鳞状细胞癌、胃癌、结肠腺癌、肝细胞性肝癌、肺鳞状细胞癌、乳腺浸润性导管癌中表达;GAS 在临床肿瘤标本胃癌、肝癌、肺癌、乳腺癌和胃癌细胞 SGC-7901、AGS、肺癌细胞 A549、肝癌细胞 HepG2 及乳腺癌细胞 MCF-7 中证实 GAS 阳性表达,同时发现 CCK-BR 也在胃癌、肝癌、肺癌和乳腺癌组织及 SGC-7901、AGS、A549、HepG2、MCF-7 细胞株中表达。结论: GAS 和 CCK-BR 在消化道和非消化道肿瘤中表达,胃泌素/CCK-B 受体环可能在胃癌、肺癌、肝癌及乳腺癌中起重要作用。

[关键词] 胃泌素; 肿瘤; 受体,胃泌素; 免疫组织化学; 组织微阵列/组织芯片技术

[中图分类号] R34-33;R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)02-0143-05

Expression of Gastrin/CCK-B Receptor Loop in Various Tumors

WANG Chuang, ZHOU Jianjiang, XIE Yuan, ZHAO Yan

(The Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of gastrin in various tumors. **Methods:** Immunohistochemical method was adopted. The expression of gastrin was detected in tissue chips of 40 cases of tumor tissues (87 points included). As well, gastrin and gastrin receptor (CCK-BR) expression in clinical corresponding tumor tissues and gastric cancer cells SGC-7901, and AGS, lung cancer cells A549, liver cancer cells HepG2, breast cancer cells MCF-7 were detected. **Results:** Gastrin expression was mainly found in cytoplasm. Tissue chip results showed that gastrin expression was found in esophageal squamous cell carcinoma, gastric adenocarcinoma, colon adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma, lung squamous cell carcinoma and breast invasive ductal carcinoma. The positive expression of gastrin was proved in clinical specimens of gastric cancer, liver cancer, lung cancer, and breast cancer, and in gastric cancer cells SGC-7901, and AGS, lung cancer cell A549, liver cancer cell HepG2, and breast cancer cell MCF-7. CCK-BR expression was further confirmed in the tissues of gastric cancer, liver cancer, lung cancer, breast cancer and cell strains of SGC-7901, AGS, A549, HepG2, and MCF-7. **Conclusion:** Gastrin expression occurs in digestive tract and non-digestive tract tumors, and the autocrine loop constructed by gastrin and CCK-BR have important function in gastric cancer, lung cancer, liver cancer and breast cancer.

[Key words] gastrin; tumor; receptors,gastrin; immunohistochemical method; tissue microarray/ tissue chip

*[基金项目] 国家自然科学基金(81260303); 贵州省科技攻关计划项目(黔科合 SY 字[2011]3067 号); 贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2011)2039 号]

** 贵阳医学院 2011 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail:joyzy7@aliyun.com

网络出版时间:2014-04-25 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140425.2000.015.html

组织微阵列/组织芯片技术(tissue microarray/tissue chip)是一种高通量的研究工具,可以同时数十至上千小组织进行分子水平的检测,具有广阔的应用前景^[1]。胃泌素(GAS)是一种自分泌生长因子,主要由胃窦、十二指肠和上段空肠的G细胞分泌,与胃泌素受体(也称胆囊收缩素受体,CCK-BR)结合后发挥作用^[2]。GAS生理作用是刺激胃液、胃蛋白酶及胆汁的分泌,促进胃肠运动。近年来的研究表明GAS不仅能促进正常胃肠道黏膜的生长,对细胞恶性转化、癌细胞生长也有重要作用,并认为GAS与CCK-BR在一些胃肠道肿瘤中的异常表达可能与肿瘤的发生发展有关^[3]。但是,GAS/CCK-BR环是否存在于其它肿瘤,尤其是消化系统外的肿瘤并不清楚,因此本研究利用组织芯片技术检测消化道内、外肿瘤中GAS的表达,同时检测组织标本和细胞株中CCK-BR的表达,探讨GAS/CCK-BR环的表达谱。

1 材料与方法

1.1 材料 人类多器官癌组织芯片购买于上海芯超生物科技有限公司,组织芯片中病例病史资料齐全,其中鳞状细胞食管癌5例、胃腺癌6例、结肠腺癌5例、肝细胞性肝癌6例、肾透明细胞癌6例、肺腺癌2例、肺鳞状细胞癌4例、乳腺浸润性导管癌6例,每例癌分2点;癌旁组织各1例,各1点。临床组织标本来源于病理科2012~2013年手术切除胃癌、肺癌、乳腺癌、肝癌的石蜡包埋标本各10例,所有标本均经病理确认,患者知情同意及医院伦理委员会同意。胃癌AGS细胞、胃癌SGC-7901细胞、肝癌HepG-2细胞、肺癌A549细胞和乳腺癌MCF-7细胞来源中科院上海细胞库,课题组保存。

1.2 试剂 GAS兔抗人多克隆抗体(编号RAB-0080)、生物素标记二抗工作液(编号KIT-5004)和DAB试剂盒均购自福建迈新生物技术开发有限公司。人CCK-BR单克隆抗体购自Santa cruz公司(SC-166690)。

1.3 免疫组织化学染色 将组织芯片、组织切片放于60℃烤箱中烤15 min,二甲苯脱蜡和梯度酒精水化,PBS冲洗5 min×3次,柠檬酸盐缓冲液抗原修复,微波高火煮沸后,低火10 min,PBS冲洗5 min×3次,3%过氧化氢室温避光孵育20 min,滴加兔多克隆抗人GAS抗体(1:400)或鼠单克隆抗人CCK-BR抗体(1:100),PBS代替一抗作为空白

对照,湿盒内4℃孵育过夜,,PBS冲洗5 min×3次,滴加HPR-羊抗兔或羊抗鼠二抗,37℃孵育30 min,PBS冲洗5 min×3次,滴加DAB室温显色,显微镜下观察,双蒸水冲洗终止反应,自来水泡5 min,苏木素复染1 min,自来水冲洗2 min,1%盐酸酒精分化,自来水返蓝2 h,分级酒精(70、80、90、100%)脱水、二甲苯透明、树胶封片,显微镜下拍照。

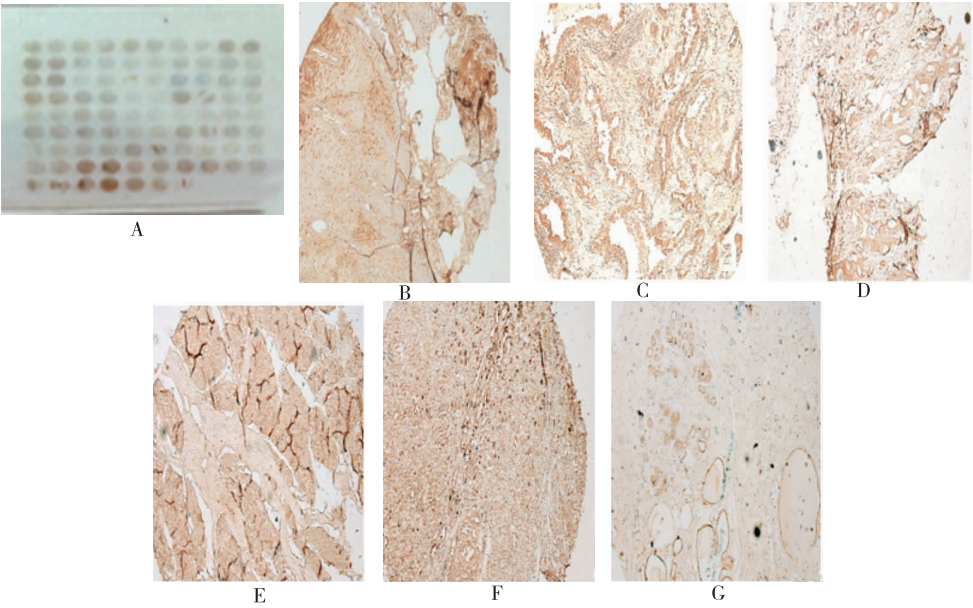
1.4 免疫细胞化学染色 分别对AGS细胞、SGC-7901细胞、HepG-2细胞、A549细胞、MCF-7细胞进行GAS和CCK-BR的免疫化学染色。操作如下:将盖玻片放入6孔板,加0.1%的多聚赖氨酸2 mL,4℃过夜,37℃温箱1 h后PBS冲洗5 min×3次,紫外线消毒备用。取对数生长期的细胞,经0.25%胰酶消化后制成细胞悬液,以 1×10^5 个细胞数加入备用的6孔板中,制成细胞爬片,PBS冲洗5 min×3次,加无水乙醇固定40 min,PBS冲洗5 min×3次,3%过氧化氢室温封闭30 min,PBS冲洗5 min×3次,0.3% Triton×100室温20 min,PBS冲洗5 min×3次,余下操作与免疫组织化学相同。将细胞内出现淡黄色至褐黄色细小颗粒判定为GAS阳性或CCK-BR阳性。

2 结果

2.1 GAS在多种肿瘤组织芯片中的表达 组织芯片经免疫组织化学染色后无掉片、重叠、扭曲移位、皱褶及脱片现象(图1A)。GAS主要表达于细胞质,在食管鳞状细胞癌、胃腺癌、结肠腺癌、肝细胞性肝癌、肺鳞状细胞癌及乳腺浸润性导管癌组织中GAS表达阳性,肾透明细胞癌组织中GAS表达阴性,见图1B~G。

2.2 GAS和CCK-BR在多种肿瘤病理切片中的表达 为了对组织芯片中阳性表达的标本进行验证,取相应肿瘤的手术切除病理标本,用免疫组织化学检测GAS和CCK-BR的表达,结果可见胃腺癌、肝细胞性肝癌、肺鳞状细胞癌、乳腺浸润性导管癌中GAS和CCK-BR的表达均为阳性(图2)。

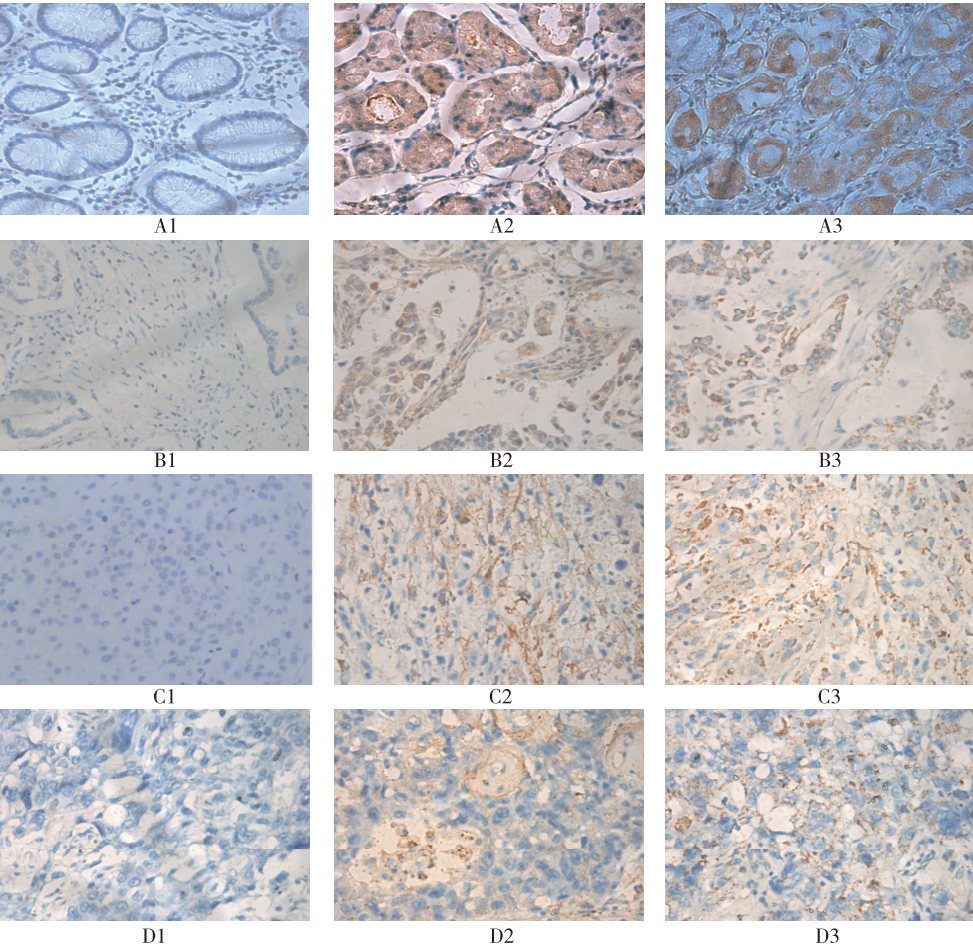
2.3 GAS和CCK-BR在体外肿瘤细胞株的表达 为了进一步证实GAS/CCK-BR环在多种肿瘤中存在,本研究用免疫细胞化学检测胃癌SGC-7901细胞、胃癌AGS细胞、肺癌A549细胞、肝癌HepG2细胞及乳腺癌MCF-7细胞中GAS和CCK-BR的表达,结果均为阳性(图3)。



A: 组织芯片;B: 食管鳞状细胞癌;C: 胃腺癌;D: 结肠腺癌;E: 肝细胞性肝癌;F: 肺鳞状细胞癌;G: 乳腺浸润性导管癌

图 1 GAS 在肿瘤组织芯片中的表达(×100)

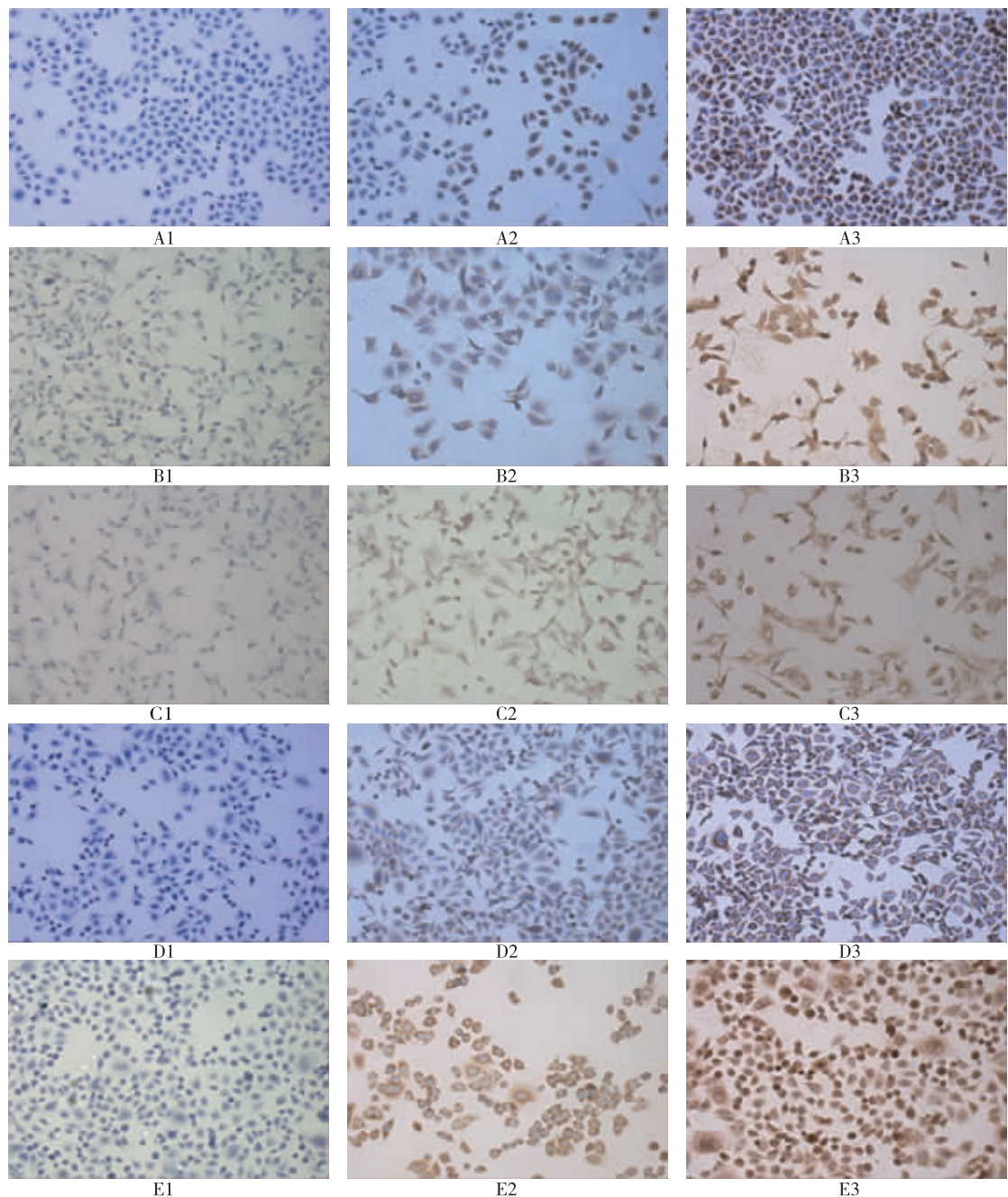
Fig.1 Expression of gastrin in tumor tissue chips(×100)



A: 胃腺癌;B: 肺鳞状细胞癌; C: 肝细胞性肝癌; D: 乳腺浸润性导管;1: 空白对照;2: GAS 阳性;3: CCK - BR 阳性

图 2 GAS 及 CCK-BR 在肿瘤组织中表达(×400)

Fig.2 Expression of gastrin and CCK-BR in tumor tissues(×400)



A: 胃癌 SGC-7901 细胞; B: 胃癌 AGS 细胞; C: 肺癌 A549 细胞; D: 肝癌 HepG2 细胞; E: 乳腺癌 MCF-7 细胞。
1: 空白对照; 2: GAS 阳性; 3: CCK-BR 阳性

图 3 GAS 及 CCK-BR 在肿瘤细胞中表达 (×200)
Fig. 3 Expression of gastrin and CCK-BR in tumor cell lines (×200)

3 讨论

近年的研究发现, GAS 作为一种自分泌生长因子, 广泛存在于胃肠道和胰腺组织内, 可通过自分泌, 旁分泌及神经内分泌方式发挥作用。GAS 的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关。研究发

现, GAS 与 CCK-BR 结合后不仅能促进正常胃肠道黏膜的生长, 对细胞恶性转化、癌细胞生长也会产生影响^[4]。Michael 等^[5]指出胃癌患者血清 GAS 水平明显升高, 手术切除肿瘤后, 血清胃泌素明显下降, 肿瘤复发时 GAS 水平又再次升高, 提示 GAS 的升高可以作为胃癌的早期诊断、监测治疗、预测复发的一个较好的生物学标志物。高水平 GAS 及

其中间代谢物对不同大肠癌肿瘤细胞株具有明显的促生长作用,并可以促进结肠上皮组织增生,增加结直肠癌发病的概率^[6]。也有研究表明,GAS 处理胃癌细胞后,通过 CCK-BR 可能激活蛋白激酶 C、磷脂酰肌醇-3-激酶及丝裂酶原蛋白激酶等肿瘤生长相关蛋白的信号途径,从而导致胃癌细胞的增殖与转移^[7]。随着研究的不断深入,发现在胃癌、直肠癌、胰腺癌等恶性肿瘤中,GAS 与 CCK-BR 都有不同程度的表达,尤其在胃肠道肿瘤中均复合表达 GAS 与 CCK-BR^[8-10],因此推测肿瘤细胞自分泌的 GAS 通过与瘤细胞表达的 CCK-BR 结合,促进了胃肠道肿瘤的发生,并建立了 GAS 促进肿瘤细胞生长的自分泌环假说^[11-13]。有文献报道除了胃肠消化道肿瘤以外,GAS/CCK-BR 在其它恶性肿瘤中可能也有重要作用^[14-15]。

组织芯片是生物芯片技术的一个重要分支。该技术自 1998 年问世以来,以其大规模、高通量、标准化等优点得到大范围的推广应用。本研究采用免疫组织化学方法,运用组织芯片检测发现 GAS 不仅在食管鳞状细胞癌、胃腺癌、结肠腺癌和肝细胞性肝癌等消化道肿瘤表达,也在鳞状细胞肺癌、乳腺浸润性导管癌等非消化道肿瘤中高表达,揭示 GAS 可能在非消化道肿瘤的发生发展中也有重要作用。为了验证这个结果,本研究检测了胃癌、肝癌、肺癌及乳腺癌的病理组织和细胞株,发现 GAS/CCK-BR 环复合表达在胃癌、肝癌、肺癌和乳腺癌组织和细胞株中。除了这 4 种肿瘤外,课题组在前期工作中还发现 CCK-BR 基因和蛋白在脐静脉血管内皮细胞 HUVEC、神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y、肺癌细胞 NCI-H446、前列腺癌细胞 DU145、膀胱癌细胞 T24、胚肾细胞 HEK293、宫颈癌及膀胱癌组织中表达。这些研究结果提示 GAS 和 CCK-BR 构成的自分泌环广泛存在于多种肿瘤组织中,可能在肿瘤的发生发展中起重要作用。

4 参考文献

- [1] 王新允,朱从中,刘婷,等. 组织芯片研制的几点体会[J]. 天津医科大学学报, 2005(1):24-35.
- [2] Han YM, Park JM, Park SH, et al. Gastrin promotes intestinal polyposis through cholecystokinin - B receptor - mediated proliferative signaling and fostering tumor micro-environment [J]. J Physiol Pharmacol, 2013(4):429-437.
- [3] Takaishi S, Okumura T, Wang TC. Gastric cancer stem cells [J]. J Clin Oncol, 2008(17):2876-2882.
- [4] 程兆明,李龙,陈琳娜,等. 血清胃蛋白酶原 I、II 与胃泌素联合检测对胃癌的诊断价值[J]. 中华消化内镜杂志, 2002(1):32-34.
- [5] Michael DB, Andrea V. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors [J]. World Gastroenterol, 2009(1):1-16.
- [6] Copps J, Richard F, Murphy RF, et al. The production and role of gastrin - 17 and gastrin - 17 - Gly in gastrointestinal cancers [J]. Protein Pept Lett, 2009(12):1504-1518.
- [7] Leek H, Koh SA, Kim JR. Hepatocyte growth factor - mediated gastrin - releasing peptide induces IL - 8 expression through Ets - 1 in gastric cancer cells [J]. Oncol Res, 2013(9):393-402.
- [8] Jensen RT. Involvement of cholecystokinin/gastrin - related peptides and their receptors in clinical gastrointestinal disorders [J]. Pharmacol Toxicol, 2002(6):333-350.
- [9] Hreranz R. Cholecystokinin antagonists: pharmacological and therapeutic potential [J]. Med Res Rev, 2003(5):559-605.
- [10] Colucci R, Blandizzi C, Tanini M, et al. Gastrin promotes human colon cancer cell growth via CCK - 2 receptor - mediated cyclooxygenase - 2 induction and prostaglandin E2 production [J]. Br J Pharmacol, 2005(3):338-348.
- [11] 王文玲,周建奖,周西春,等. 阻断自分泌性胃泌素对胃癌 SGC - 7901 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 医学杂志, 2006(28):1989-1989.
- [12] Zhou JJ, Chen ML, Zhang QZ. Human gastric tissues simultaneously express the classical and alternative splicing cholecystokinin - B/astrin receptors [J]. Receptors Channel, 2004(5-6):185-188.
- [13] Ito M, Tanaka S, Maeda M, et al. Role of the gastrin - gastrin receptor system in the expansive growth of human gastric neoplasms [J]. Digestion, 2008(2-3):163-170.
- [14] Ferrand A, Sandrin MS, Shulkes A, et al. Expression of gastrin precursors by CD133 - positive colorectal cancer cells is crucial for tumour growth. [J]. Biochim Biophys Acta, 2009(3):77-88.
- [15] Muenst S, Daster S, Obermann EC, et al. Nuclear expression of snail is an independent negative prognostic factor in human breast cancer [J]. Dis Markers, 2013(5):337-344.

(2013-12-28 收稿, 2014-01-30 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅