

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.004

# 胃泌素及其受体拮抗剂对人胃癌细胞株 MKN45 增殖及 HB-EGF 表达的影响

穆媛媛, 吴会超, 杨莹莹, 苏薇

## Effects of Gastrin and Its Antagonist on Cell Proliferation and Expression of HB-EGF in Human Gastric Cancer Line MKN45

Mu Yuanyuan, Wu Huichao, Yang Yingying, Su Wei

Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

Corresponding Author: Wu Huichao, E-mail: wuhuichao985@163.com

**Abstract: Objective** To explore the effects of gastrin-17 and its antagonist PGL on cell proliferation and the expression of HB-EGF in human gastric cancer line MKN-45. **Methods** MKN45 cells were incubated in the medium with gastrin-17 ( $10^{-6} \sim 10^{-10}$  mol/L), proglumide ( $10^{-2} \sim 10^{-4}$  mol/L) or combination of two agents ( $10^{-8}$  mol/L gastrin-17 and  $10^{-2} \sim 10^{-4}$  mol/L proglumide). Cell growth and proliferation of MKN45 were analyzed by MTT assay, and expression of HB-EGF by Western blot. **Results** MTT showed gastrin-17 significantly promoted cell proliferation at the concentration of  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  mol/L ( $P < 0.05$ ), PGL at the concentration of  $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L significantly inhibited the proliferation of MKN45 cells ( $P < 0.05$ ). In the combination of two agents, PGL ( $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L) significantly inhibited the proliferation of MKN-45 cells induced by gastrin-17 ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, MKN45 had the expression of HB-EGF protein which significantly up-regulated by Gastrin-17 at the concentration of  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  mol/L. In the combination of two agents, PGL ( $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L) significantly inhibited the expression of HB-EGF stimulated by gastrin-17 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Gastrin-17 could promote cell proliferation of MKN45 cells in human gastric cancer, which strongly down-regulated by its antagonist PGL. Gastrin-17 significantly promoted the expression of HB-EGF, contrastly and inhibited an antagonist PGL.

**Key words:** Gastrin-17; Proglumide; Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor; Gastric cancer

**摘要: 目的** 探讨胃泌素-17 及其受体拮抗剂丙谷胺对人胃癌细胞株 MKN45 增殖及肝素结合表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)表达的影响。**方法** MTT 法观察细胞增殖活力; Western blot 测定肝素结合表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)蛋白的表达。**结果** MTT 结果显示胃泌素-17 在  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  mol/L 时具有明显的促 MKN45 细胞增殖作用( $P < 0.05$ ); 丙谷胺在  $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L 时显著抑制 MKN45 细胞增殖( $P < 0.05$ ); 胃泌素 + 丙谷胺组中, 丙谷胺( $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L)能阻断并抑制胃泌素对胃癌细胞 MKN45 的促增殖作用( $P < 0.05$ )。同时, Western blot 结果显示胃癌细胞株 MKN45 中有 HB-EGF 蛋白的表达。胃泌素-17 在  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  mol/L 时可显著增强 MKN45 细胞株中 HB-EGF 蛋白表达( $P < 0.05$ ); 丙谷胺( $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L)能阻断并抑制 G-17( $10^{-8}$  mol/L)诱导的 HB-EGF 蛋白表达上调( $P < 0.05$ )。**结论** 胃泌素-17 促进人胃癌细胞 MKN45 增殖, 其受体拮抗剂丙谷胺能阻断这一促进作用。胃泌素受体拮抗剂丙谷胺能抑制人胃癌细胞 MKN45 增殖。胃癌细胞株 MKN45 中有 HB-EGF 蛋白的表达, 胃泌素-17 促进 HB-EGF 蛋白表达上调, 其受体拮抗剂丙谷胺能阻断并抑制这一促进作用。

**关键词:** 胃泌素; 丙谷胺; 肝素结合表皮生长因子样生长因子; 胃癌

中图分类号: R735.2, R73-35 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)02-0133-04

## 0 引言

近年研究发现胃泌素及其受体在胃癌等多种

消化道恶性肿瘤中表达并促进癌细胞增殖<sup>[1-2]</sup>, 其受体拮抗剂能拮抗胃泌素的这一作用<sup>[3]</sup>。我们的前期研究发现, 胃泌素能促进胃癌细胞 EGF 分泌, 其受体拮抗剂丙谷胺能阻断这一作用<sup>[4]</sup>。肝素结合表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)是 EGF 家族成员之一, 是目前各种肿瘤研究的热点因子, 在结肠癌、乳腺癌和膀胱癌等多种肿瘤中大量表达并有有力的诱导肿瘤细胞的生长与血管形成<sup>[5]</sup>, 但在胃癌中的相关研究报道较少, 胃泌素对胃癌的

收稿日期: 2011-04-13; 修回日期: 2011-10-08

基金项目: 贵州省科技厅社会攻关计划资助项目(SY [2010]3085)

作者单位: 563003 贵州遵义, 遵义医学院附属医院消化内科

通信作者: 吴会超, E-mail: wuhuichao985@163.com

作者简介: 穆媛媛(1982-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事胃肠道肿瘤防治的研究

促增殖作用是否通过 HB-EGF 所介导,尚待研究。本实验采用 MTT 及 Western blot 法研究胃泌素及其受体拮抗剂丙谷胺对人胃癌细胞 MKN45 的促增殖作用及对 HB-EGF 蛋白表达的影响,探讨胃泌素的促癌细胞增殖作用与 HB-EGF 表达的关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

人低分化胃癌细胞株 MKN45 由遵义医学院基础学院微生物学教研室惠赠。胃泌素(美国 Gen-Script 公司),丙谷胺(湖北健源化工有限公司),MTT(AMERESCO 公司)兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

#### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞株 MKN45 常规培养,实验时取对数生长期细胞,0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液。

1.2.2 MTT 法测定胃泌素及丙谷胺对胃癌细胞 MKN45 增殖的影响 取对数生长期 MKN45 胃癌细胞予 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,调整细胞浓度至  $3 \times 10^4$ /ml,每孔 200  $\mu$ l 接种于 96 孔培养板,细胞贴壁后加入无血清培养液同步化 24 h。实验分 5 组:(1)空白组:不含细胞;(2)对照组:培养液不加五肽胃泌素或丙谷胺;(3)五肽胃泌素组:终浓度为  $10^{-6} \sim 10^{-10}$  mol/L;(4)丙谷胺组:终浓度为  $10^{-2} \sim 10^{-4}$  mol/L;(5)五肽胃泌素加丙谷胺组:胃泌素终浓度为  $10^{-8}$  mol/L,丙谷胺终浓度为  $10^{-2} \sim 10^{-4}$  mol/L,每组平行 6 孔,结束培养前 4 h 每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20  $\mu$ l。作用 4 h 后,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ l 终止反应。酶标仪 490 nm 波长处检测各孔的光密度值,并以空白对照孔的 OD 值调零。结果以均数  $\pm$  标准差表示,重复 3 次。按下述公式计算细胞生长抑制率(Inhibition rate, IR)和增殖率(Proliferation rate, PR):细胞生长抑制率(IR) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/(对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)  $\times$  100%;细胞增殖率(PR) = (1 - 抑制率)  $\times$  100%。

1.2.3 Western blot 法测 HB-EGF 表达 取胃泌素、丙谷胺处理 48 h 后的各组细胞,蛋白定量后与 Buffer 以 5:1 比例混合,95 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。常规行 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜,兔抗人 HB-EGF 抗体为第一抗体,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体。化学发光法显色,将免疫印记结果扫描。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计量结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析进行统计学处理, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃泌素对 MKN45 胃癌细胞增殖的影响

与对照组相比,胃泌素-17 在  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  mol/L 时有明显促 MKN45 细胞增殖作用( $P < 0.05$ ),  $10^{-8}$  mol/L 时作用最明显,  $10^{-10}$  mol/L 时,无明显促进增殖作用( $P > 0.05$ );NaCl 对细胞生长无影响( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 胃泌素对人胃癌细胞 MKN45 增殖的影响  
Table 1 The effects of gastrin-17 on cell proliferation in human gastric cancer line MKN45

Groups	OD	PR(%)
Control	0.433 $\pm$ 0.04	0
NaCl	0.441 $\pm$ 0.02	1.92
$10^{-6}$ mol/L	0.470 $\pm$ 0.01*	8.62
$10^{-7}$ mol/L	0.510 $\pm$ 0.02**#	17.94
$10^{-8}$ mol/L	0.596 $\pm$ 0.02***#	37.68
$10^{-9}$ mol/L	0.483 $\pm$ 0.03***#	11.62
$10^{-10}$ mol/L	0.451 $\pm$ 0.02	4.20

Note: \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  vs. control; # :  $P < 0.05$ , ## :  $P < 0.01$  vs. above

### 2.2 丙谷胺对 MKN45 胃癌细胞增殖的影响

与对照组相比,丙谷胺在  $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L 时有显著抑制 MKN45 细胞增殖作用( $P < 0.05$ ),  $10^{-2}$  mol/L 时作用最明显,  $10^{-4}$  mol/L 时无明显抑制细胞增殖作用( $P > 0.05$ );NaHCO<sub>3</sub> 对细胞生长无影响( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 丙谷胺对 MKN45 细胞增殖的影响  
Table 2 The effects of PGL on cell proliferation in human gastric cancer line MKN45

Groups	OD	IR(%)
Control	0.433 $\pm$ 0.04	0
NaHCO <sub>3</sub>	0.439 $\pm$ 0.02	1.42
$10^{-2}$ mol/L	0.245 $\pm$ 0.01***#	-43.50
$10^{-3}$ mol/L	0.371 $\pm$ 0.03***#	-14.40
$10^{-4}$ mol/L	0.420 $\pm$ 0.01##	-2.96

Note: \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  vs. control; # :  $P < 0.05$ , ## :  $P < 0.01$  vs. above

### 2.3 胃泌素及丙谷胺联合应用对 MKN45 胃癌细胞增殖的影响

胃泌素-17 促进 MKN45 细胞增殖作用可以被

丙谷胺阻断,胃泌素 + 丙谷胺组中,丙谷胺( $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L)明显阻断并抑制胃泌素对胃癌细胞 MKN45 的促增殖作用( $P < 0.05$ ), $10^{-2}$  mol/L 时作用最明显, $10^{-4}$  mol/L 时无明显抑制作用( $P > 0.05$ ),见表 3。

表 3 胃泌素( $10^{-8}$  mol/L)及其受体拮抗剂丙谷胺对 MKN45 细胞增殖的影响

Table 3 The effects of gastrin-17( $10^{-8}$  mol/L) and its antagonist PGL on cell proliferation in human gastric cancer line MKN45

Groups	OD	IR(%)
Control	$0.433 \pm 0.04$	
$10^{-8}$ mol/L	$0.596 \pm 0.02^{**}$	37.68
$10^{-8}$ mol/L + $10^{-2}$ mol/L	$0.332 \pm 0.02^{**\#}$	-23.40
$10^{-8}$ mol/L + $10^{-3}$ mol/L	$0.557 \pm 0.05^{**\#}$	28.60
$10^{-8}$ mol/L + $10^{-4}$ mol/L	$0.584 \pm 0.04^{**}$	34.91

Note: \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  vs. control; # :  $P < 0.05$ , # # :  $P < 0.01$  vs. gastrin-17( $10^{-8}$  mol/L)

#### 2.4 不同浓度胃泌素对 HB-EGF 表达的影响

胃癌细胞株 MKN45 中有 HB-EGF 蛋白的表达。胃泌素-17 在  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  mol/L 时可显著增强 MKN45 细胞株中 HB-EGF 蛋白表达, $10^{-8}$  mol/L 时作用最明显; $10^{-10}$  mol/L 时无明显促进作用,见图 1。

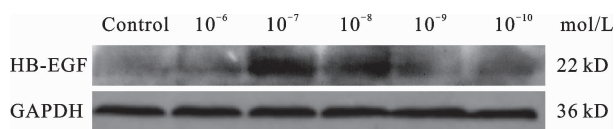


图 1 Western blot 检测胃泌素对胃癌细胞 MKN45 中 HB-EGF 蛋白表达的影响

Figure 1 The effects of gastrin-17 on the expression of HB-EGF protein in human gastric cancer line MKN45 detected by Western blot

#### 2.5 不同浓度丙谷胺对胃泌素促进的 HB-EGF 蛋白表达的阻断作用

丙谷胺( $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L)能阻断并抑制 G-17( $10^{-8}$  mol/L)诱导的 HB-EGF 蛋白表达上调, $10^{-2}$  mol/L 时作用最明显, $10^{-4}$  mol/L 时无明显抑制作用,见图 2。

### 3 讨论

目前有大量研究证实胃泌素能够促进胃癌的发生发展。本研究以胃泌素受体阳性的 MKN45 胃癌细胞株为研究对象,MTT 法观察外源性胃泌素-17 对胃癌细胞 MKN45 增殖的影响。结果证实,胃泌素在  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  mol/L 时具有明显促进 MKN45 细胞增殖作用( $P < 0.05$ ),联用丙谷胺时该促进作

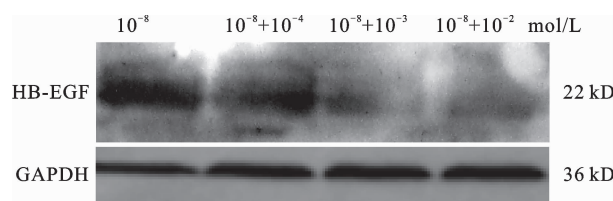


图 2 Western blot 检测丙谷胺对胃泌素促进的胃癌细胞 MKN45 中 HB-EGF 蛋白表达上调的影响

Figure 2 The effects of PGL on gastrin-induced HB-EGF protein up-regulation in human gastric cancer line MKN45 detected by Western blot

用被阻断。表明胃泌素通过其受体介导刺激体外培养的胃癌细胞增殖,与国内外报道结果相符<sup>[6]</sup>。另外,丙谷胺在  $10^{-2} \sim 10^{-3}$  mol/L 时有显著的抑制 MKN45 细胞增殖作用,说明体外培养的 MKN45 细胞能分泌胃泌素从而促进胃癌细胞生长,与国内外报道结果一致<sup>[7]</sup>。

由于国内外对胃泌素促癌机制的相关报道较少,因此对胃泌素促癌机制的研究就显得尤为重要。虽然胃泌素受体拮抗剂已应用于临床肿瘤治疗,但由于个体差异及药物的特异性和敏感度较低,疗效不佳。故胃泌素调控的下游因子便成为目前研究与探讨的焦点。早期有研究表明,胃泌素可以促进十二指肠旁黏膜 EGF 的分泌<sup>[4]</sup>,这一研究结果提示胃泌素通过 EGF 刺激胃黏膜增殖,为胃泌素的促癌作用提供了新的思路。我们前期的研究发现:胃泌素能促进胃癌细胞 EGF 分泌,而胃泌素受体拮抗剂丙谷胺能够阻断这一作用<sup>[4]</sup>。HB-EGF 作为 EGF 家族成员之一,是近年来逐渐受到关注的一种生长因子,在生理状态下大多数组织中均有表达,受到肿瘤刺激物等诱导后在肿瘤组织中过表达,在多种肿瘤细胞中被陆续发现并证实参与了肿瘤的发生发展。

由于胃泌素受体只存在于壁细胞和肠嗜铬样细胞(enterochromaffin-like cell, ECL cell),而位于腺颈部的增殖带细胞无胃泌素受体存在,因此胃泌素可能通过一种间接作用促进胃黏膜上皮细胞增生,即释放一些生长因子如 HB-EGF 等而发挥作用<sup>[8-9]</sup>。有研究表示,从正常胃组织到肠化生组织到早期胃癌再到进展期胃癌中,HB-EGF 表达逐渐升高<sup>[10]</sup>。在体和离体试验均表明,作为 HB-EGF 的特异性抑制剂,CRM197 能有效阻止肿瘤细胞的扩散<sup>[11]</sup>。因此,我们考虑,胃泌素与 HB-EGF 及胃癌之间或者存在着某种复杂的联系。本实验用 Western blot 法检测了不同浓度胃泌素( $10^{-6} \sim 10^{-10}$ ) mol/L 作用下 HB-EGF 蛋白的表达情况及胃泌素受体拮抗剂丙谷胺对胃泌素促进

的 HB-EGF 蛋白表达上调的影响。结果证实,胃癌细胞株 MKN45 中有 HB-EGF 蛋白的表达,这一结论与国外研究报道一致<sup>[12]</sup>。同时,胃泌素-17 在  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  mol/L 时可显著增强 MKN45 细胞中 HB-EGF 蛋白表达( $P < 0.05$ ),胃泌素受体拮抗剂丙谷胺能阻断并抑制胃泌素促进的 HB-EGF 蛋白表达上调,说明 HB-EGF 可能是胃泌素促癌作用的下游目标之一。目前胃泌素及其受体拮抗剂丙谷胺对 HB-EGF 蛋白在细胞水平表达的研究国内外尚未见相关报道。

本实验结果证实,在胃癌细胞中 HB-EGF 可被诱导而表达增高,同时胃泌素受体拮抗剂可以阻断并抑制 HB-EGF 的表达并抑制胃癌细胞生长。说明胃泌素通过胃泌素受体的介导促进 HB-EGF 蛋白表达上调,而 HB-EGF 被认为有力地促进了肿瘤细胞生长和血管形成,并参与了肿瘤转移等过程。总之,胃泌素通过其受体介导的 HB-EGF 蛋白高表达在胃癌发生发展过程中具有极其重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] Henwood M, Clarke PA, Smith AM, et al. Expression of gastrin in developing gastric adenocarcinoma[J]. Br J Surg, 2001, 88(4): 564-568.
- [2] Szabó I, Rumi G, Bódis B, et al. Gastrin and pentagastrin enhance the tumour proliferation of human stable cultured gastric adenocarcinoma cells[J]. J Physiol Paris, 2000, 94(1): 71-74.
- [3] Wang HM, Zhang TZ, Zhang QH, et al. Effect of exogenous gastrin on proliferation and apoptosis in gastric cancer[J]. Chin J Exp Surg, 2001, 18(2): 184. [王和明, 张泰臻, 张群华, 等. 外源性胃泌素在胃癌细胞增殖和凋亡中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(2): 184.]
- [4] Wu HC, Zhao K, Wen GR, et al. Effects of gastrin and proglu-
- mid on cell proliferation and epidermal growth factor secretion in gastric cancer cell lines MKN45 in vitro[J]. Shanxi Med J, 2008, 37(7): 800-803. [吴会超, 赵遼, 文国荣, 等. 胃泌素及丙谷胺对胃癌细胞株 MKN45 增殖及 EGF 表达的影响[J]. 陕西医学杂志, 2008, 37(7): 800-803.]
- [5] Fishman S, Brill S, Papa M, et al. Heparin-derived disaccharides modulate proliferation and ErbB2-mediated signal transduction in colon cancer cell lines[J]. Int J Cancer, 2002, 99(2): 179-184.
- [6] Lee HK, Lee HJ, Hur K, et al. Growth effect of gastrin on gastric cancer and its clinical implications for gastric cancer surgery[J]. Oncol Rep, 2005, 14(2): 383-388.
- [7] Heasley LE. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer[J]. Oncogene, 2001, 20(13): 1563-1569.
- [8] Miyazaki Y, Shinomura Y, Tsutsui S, et al. Gastrin induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in rat gastric epithelial cells transfected with gastrin receptor[J]. Gastroenterology, 1999, 116(1): 78-89.
- [9] Kinoshita Y, Ishihara S. Mechanism of gastric mucosal proliferation induced by gastrin[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(Suppl): D7-D11.
- [10] Wang GR, Zheng Y, Chen XM, et al. Expression and significance of HB-EGF in gastric cancer[J]. J Southern Med Univ, 2009, 29(1): 44-46. [王国荣, 郑焱, 车向明, 等. 胃癌中 HB-EGF 的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(1): 44-46.]
- [11] Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, et al. New approach to cancer therapy: heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule[J]. Anticancer Res, 2007, 27(6A): 3713-3721.
- [12] Dickson JH, Grabowska A, El-Zaatari M, et al. Helicobacter pylori can induce heparin-binding epidermal growth factor expression via gastrin and its receptor[J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7524-7531.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]