

论著·基础研究

胆囊收缩素受体 B 在人体多种肿瘤组织和细胞中的表达*

王冬梅,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** 探讨胆囊收缩素受体 B(CCK-BR)在人体多种肿瘤组织和细胞中的表达情况。**方法** 使用逆转录-PCR(RT-PCR)、蛋白免疫印迹(Western blot)方法检测人胃癌细胞 AGS 和 SGC-7901、人肝癌细胞 HepG-2、人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y、人肺癌细胞 A549 和 NCI-H446、人前列腺癌细胞 DU145、人膀胱癌细胞 T24 共计 8 种肿瘤细胞株中 CCK-BR mRNA 及蛋白的表达。免疫组织化学或免疫细胞化学法检测临床标本胃癌组织、乳腺癌组织、宫颈癌组织、膀胱癌组织、肺癌组织、肝癌组织及 AGS、SGC-7901 细胞中 CCK-BR 的表达。**结果** 人体 8 种肿瘤细胞株均表达 CCK-BR mRNA 和蛋白,并定位在细胞质和细胞膜,6 种肿瘤组织中 CCK-BR 表达阳性。**结论** CCK-BR 在人体多种肿瘤组织和肿瘤细胞中表达。

关键词:受体,胆囊收缩素 B;肿瘤;基因表达
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.019 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)13-1584-03

Expression of cholecystokinin receptor B in a variety of human tumor tissues and cells*

Wang Dongmei, Wang Chuang, Zhou Jianjiang[△], Xie Yuan, Zhao Yan
(Molecular Biology Key Laboratory, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract:**Objective** To investigate the expression of cholecystokinin receptor B(CCK-BR) in a variety of human tumor tissues and cells. **Methods** RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression of CCK-BR mRNA and protein in human gastric cancer AGS and SGC-7901 cells, human hepatoma cancer HepG-2 cells, human neuroblastoma SH-SY5Y cells and human lung cancer A549 and NCI-H446 cells, human prostate cancer DU145 cells, human bladder cancer T24 cells. CCK-BR expression was detected in the clinical cancer tissues including the stomach, breast, cervical, bladder, lung and liver and AGS and SGC-7901 cells by immunohistochemical and immunocytochemical methods. **Results** CCK-BR mRNA and protein were express in the cytoplasm and cell membrane of the above 8 cell lines. Positive expression of CCK-BR was discovered in the above cancer tissues. **Conclusion** CCK-BR are expressed in a variety of human tumor tissues and cells.

Key words: receptor, cholecystokinin B; carcinoma; gene expression

胆囊收缩素受体(cholecystokinin receptor, CCKR)属七次跨膜 G 蛋白偶联受体超家族,主要分为 CCK-AR、CCK-BR 等几种亚型,其中胃泌素主要是通过 CCK-BR 结合发挥生理和病理功能,因此, CCK-BR 也称为胃泌素受体。本研究前期实验结果证实,胃泌素与 CCK-BR 结合不仅能促进正常胃肠道黏膜的生长,对细胞恶性转化、癌细胞增殖也有重要作用。大量研究发现多种胃肠道肿瘤均复合表达胃泌素和 CCK-BR,推测肿瘤细胞自分泌的胃泌素通过与瘤细胞表达的 CCK-BR 结合,促进了胃肠道肿瘤的发生,并建立了胃泌素促进肿瘤细胞生长的自分泌环假说^[1-2]。目前,发现 CCK-BR 主要在消化道细胞和神经细胞中表达^[3-4],而在其他细胞中是否表达尚不清楚,因此,本研究进一步探讨 CCK-BR 在其他肿瘤组织和肿瘤细胞中的表达。

1 材料与方法

1.1 材料 在患者知情同意及贵阳医学院伦理委员会批准的情况下,经组织病理学确诊,收集贵阳医学院附属医院 2011 年间手术切除的胃癌组织、乳腺癌组织、宫颈癌组织、膀胱癌组织、肺癌组织及肝癌组织各 3 例。人胃癌细胞株 AGS 和 SGC-7901、人肝癌细胞株 HepG-2、人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y、人肺癌细胞株 A549 和 NCI-H446、人前列腺癌细胞株 DU145、人膀胱癌细胞株 T24 均由本课题组保存。胎牛血清购自 Gibco 公司,高糖 DMEM、改良型 RPMI-1640 培养基、双

抗、0.25%胰蛋白酶购自 HyClone 公司。总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, RNA 逆转录试剂购自 Promega 公司, PCR 试剂购自上海生工公司、DNA 标记物购自北京天根科技公司, PCR 引物由上海生工合成。鼠抗人 CCK-BR mAb 购自 Santa cruz 公司。二步法抗兔/鼠通用型免疫组织化学检测试剂盒购自 DAKO 公司,多聚赖氨酸购自 BD 公司。聚乙烯二氟(PVDF)膜、ECL-Plus 发光试剂、高效显影胶片购自 Amersham 公司,蛋白预染 Marker 购自 Fermentas 公司,细胞培养箱(日本 SANYO MCO-18AIC), Olympus 荧光倒置显微镜(IX51)。PCR 仪(ABI 9902 型),核酸定量仪(Beckman),核酸电泳仪 DYY-7C 型(北京六一仪器厂生产),凝胶成像分析系统(Syngene G Box),蛋白电泳及转膜系统(Bio-Rad),酶标仪(美国 Bio-tec ELX 800)。

1.2 细胞培养 AGS、SGC-7901、A549、NCI-H446、T24 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清及 100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液, HepG-2、SH-SY5Y、DU145 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清及 100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的高糖 DMEM 培养液,在 5% CO₂, 37 ℃培养箱中培养。

1.3 逆转录-PCR(RT-PCR) Trizol 一步法提取细胞总 RNA,按 RNA 逆转录试剂盒行逆转录合成 cDNA,引物以 Premier 5 软件自行设计, CCK-BR 上游引物序列为:5'-GTG ACA GCG ACA GCC AAA GC AG-3',下游引物序列为:5'-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060122);贵州省科技攻关计划基金资助项目(黔科合 SY 字[2011]3067 号);贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 J 字[2012]2039 号)。 作者简介:王冬梅(1973—),检验技师,硕士,主要从事肿瘤分子生物学的研究。 [△] 通讯作者, Tel:13985459925;E-mail:jianjiangzhou@sina.cn。

参考文献:

- [1] Sharma P, Kumar J, Garg G, et al. Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients[J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 27(7): 357-365.
- [2] Jiang Y, Zhang J, Xiong J, et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor inhibit homocysteine-induced DNA methylation of inducible nitric oxide synthase gene[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(5): 366-376.
- [3] Ying AK, Hassanain HH, Roos CM, et al. Methylation of the estrogen receptor- α gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46(1): 172-179.
- [4] Yideng J, Jianzhong Z, Ying H, et al. Homocysteine-mediated expression of SAHH, DNMTs, MBD2, and DNA hypomethylation potential pathogenic mechanism in VSMCs[J]. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(8): 603-611.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [6] Kima VN, Nam JW. Genomics of microRNA[J]. *Trends Genet*, 2006, 22(3): 165-173.
- [7] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. *Nature*, 2005, 436(748): 214-220.
- [8] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 228-233.
- [9] 于海娇, 马琳娜, 徐支芳, 等. 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞周期及 P27 和 CyclinA 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(36): 4487-4492.
- [10] Huang Y, Peng K, Su J, et al. Different effects of homocysteine and oxidized low density lipoprotein on methylation status in the promoter region of the estrogen receptor α gene[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(1): 19-26.
- [11] 王丽珍, 张敬各, 王树人. 同型半胱氨酸对人血管平滑肌细胞 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因启动子甲基化修饰及 mRNA 表达的影响[J]. *卫生研究*, 2007, 36(3): 291-294.
- [12] Jiang Y, Sun T, Xiong J, et al. Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(9): 657-667.
- [13] Yi-Deng J, Tao S, Hui-Ping Z, et al. Folate and ApoE DNA methylation induced by homocysteine in human monocytes[J]. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(10): 737-744.
- [14] Kim CS, Kim YR, Naqvi A, et al. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66^{Shc} [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(3): 466-475.
- [15] Li D, Yang P, Xiong Q, et al. MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells[J]. *J Hypertens*, 2010, 28(8): 1646-1654.

(收稿日期: 2013-11-17 修回日期: 2014-02-11)

(上接第 1586 页)

- Coexpression of cholecystokinin-B/gastrin receptor and gastrin gene in human gastric tissues and gastric Cancer cell line[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(6): 791-794.
- [12] 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, 144(3): 338-348.
 - [13] pathogenesis MI. Diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(1): 35-47.
 - [14] Song Y, Xu Y, Wang Z, et al. MicroRNA-148b suppresses cell growth by targeting cholecystokinin-2 receptor in colorectal Cancer[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(5): 1042-1051.
 - [15] Berna MJ, Jensen RT. Role of CCK/gastrin receptors in gastrointestinal/metabolic diseases and results of human studies using gastrin/CCK receptor agonists/antagonists in these diseases[J]. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(12): 1211-1231.

(收稿日期: 2013-12-18 修回日期: 2014-02-28)

欢迎投稿

欢迎订阅

CGA GGC GTA GCT CAG CAA GTG A-3', 扩增片段长度 383 bp; β -actin 上游引物序列为: 5'-TGG AGA AAA TCT G GC ACC AC-3', 下游引物序列为: 5'-GAG GCG TAC AGG GAT AGC AC-3', 扩增片段长度 190 bp。扩增体系为: 2.5 U/ μ L Taq 酶 0.5 μ L, 10 μ mol/L CCK-BR 上、下游引物各 0.8 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 2.5 μ L, 2.5 mol/L dNTP 2.5 μ L, 10 μ mol/L cDNA 2 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L, 程序为: 94 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 45 s, 57 $^{\circ}C$ 45 s, 72 $^{\circ}C$ 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 7 min; 4 $^{\circ}C$ 保存。扩增结束后取 PCR 产物上样, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, SyngeneG Box 凝胶成像系统摄片并分析结果, 实验重复 3 次。

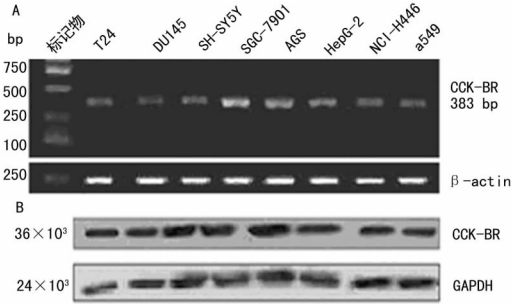
1.4 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法 所有细胞采用 RIPA 裂解液进行充分裂解, 然后提取总蛋白, 取 50 μ g 总蛋白通过 10% 浓度的十二烷基酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行蛋白电泳后转印到 PVDF 膜上。1% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 CCK-BR (1 : 800 稀释), GAPDH (1 : 2 000 稀释) 4 $^{\circ}C$ 过夜。山羊抗鼠二抗 (1 : 5 000 稀释) 37 $^{\circ}C$ 孵育 2 h。ECL 发光后, 胶片曝光备用, 实验重复 3 次。

1.5 免疫组织化学或免疫细胞化学染色 所有的组织块均经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋。细胞爬片用 95% 乙醇固定, 0.4% Triton X-100 室温打孔。组织和细胞均采用免疫化学 SP 法进行染色。一抗使用鼠抗人 CCK-BR (1 : 200) 4 $^{\circ}C$ 孵

育过夜。以 PBS 代替一抗作空白对照。生物标记的二抗 37 $^{\circ}C$ 孵育 30 min, DAB 显色, 显微镜下拍照。每种肿瘤组织做 3 例标本。

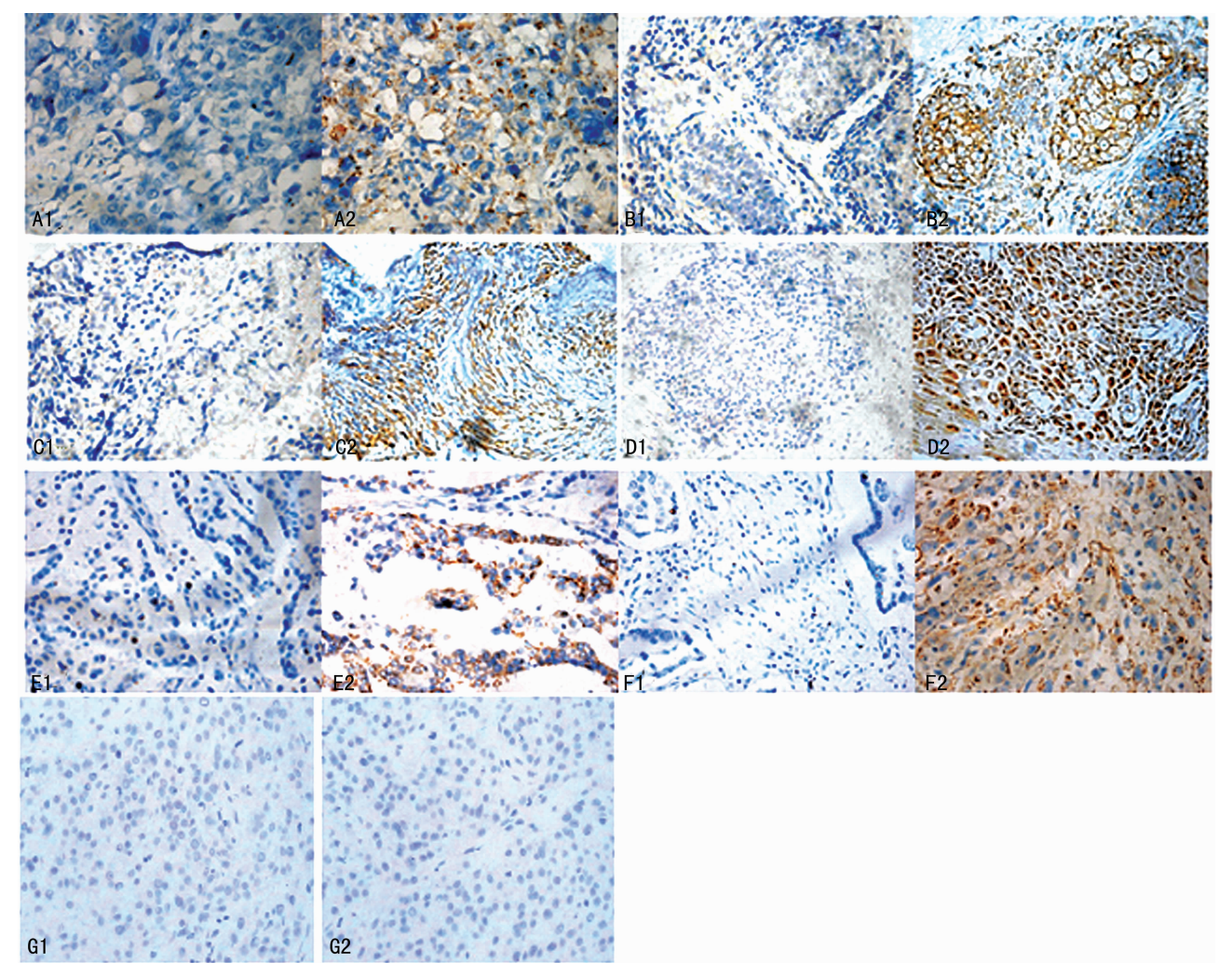
2 结 果

2.1 CCK-BR mRNA 和蛋白在多种细胞株中表达情况 RT-PCR 和 Western Blot 检测发现, 多种肿瘤细胞株包括胃癌细胞株 AGS 和 SGC-7901、肝癌细胞株 HepG-2、肺癌细胞株 A549 和 NCI-H446、前列腺癌细胞株 DU145、膀胱癌细胞株 T24 及神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 均表达 CCK-BR mRNA 和蛋白, 见图 1。



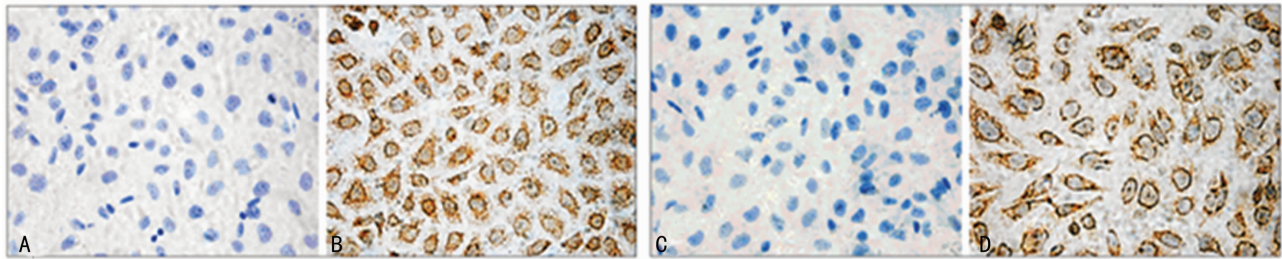
A: RT-PCR 检测各细胞中 CCK-BR mRNA 表达; B: Western blot 检测各细胞中 CCK-BR 蛋白表达。

图 1 各细胞中 CCK-BR mRNA 和蛋白的表达



A1~2: 胃癌组织; B1~2: 乳腺癌组织; C1~2: 宫颈癌组织; D1~2: 膀胱癌组织; E1~2: 肺癌组织; F1~2: 肝癌组织; G1~2: 阴性对照组织 (甲状腺组织)。1: 空白对照; 2: 阳性表达。

图 2 临床肿瘤组织中 CCK-BR 的表达 (IHC $\times$ 400)



A:SGC-7901 细胞空白对照组;B:SGC-7901 细胞阳性表达;C:AGS 细胞空白对照组;D:AGS 细胞阴性表达。

图 3 CCK-BR 免疫细胞化学染色结果(ICC×400)

2.2 多种临床肿瘤组织表达 CCK-BR 为了探讨 CCK-BR 是否在人肿瘤组织中表达,本研究用免疫组织化学检测人多种临床肿瘤组织中 CCK-BR 的表达。结果显示,在人胃癌组织、乳腺癌组织、宫颈癌组织、膀胱癌组织、肺癌组织及肝癌细胞中均有 CCK-BR 的表达,见图 2。

2.3 CCK-BR 在细胞中的定位 为了分析 CCK-BR 在细胞中的定位,随机选取人胃癌细胞 AGS 和 SGC-7901,用免疫细胞化学检测 CCK-BR 的表达,发现两种细胞中 CCK-BR 均为阳性,并主要在细胞质和细胞膜上表达,见图 3。

3 讨 论

CCKR 于 1980 首次发现,是一种能引起胆囊收缩的胃肠道多肽激素受体,属 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体超家族,整个受体分子包括 3 个部分:N-端外域,含 N-糖基化位点;跨膜区,含 7 个疏水的跨膜片段;C-端胞浆域。CCKR 受体主要分为 CCK-AR、CCK-BR 等几种亚型,它们均由一个 115 个氨基酸的前激素原剪切而来。其基因定位于人 3 号染色体。其中,CCK-AR 的配体主要为胆囊收缩素,而 CCK-BR 的配体主要为胃泌素。因此,CCK-BR 也叫胃泌素受体,主要介导胃泌素的正常生理和病理功能^[5]。以往研究中,胃泌素和 CCK-BR 在胃肠疾病特别是胃肠肿瘤中的病理作用一直备受争议,其具体机制也不清楚。后有研究发现,在胰腺和胃中,CCK-BR 具有调节细胞生长的作用,当胃泌素与 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、癌细胞生长也产生影响,与胃癌、胰腺癌、直肠癌等胃肠肿瘤的发生发展密切相关^[6-10]。大量研究也发现包括人胃癌、结肠癌组织在内的多种胃肠道肿瘤均复合表达胃泌素和 CCK-BR,从而推测肿瘤细胞自分泌的胃泌素是通过与瘤细胞表达的 CCK-BR 结合,促进了胃肠道肿瘤的发生,在胃癌细胞株 SGC-7901 和结肠癌细胞株 DLD-1 中也证实了胃泌素/CCK-BR 自分泌环的存在^[11-12]。应用靶向 CCK-BR 的 microRNA 和拮抗剂具有延缓肿瘤细胞生长的作用^[13-15]。但本研究发现除了胃癌细胞株 SGC-7901 和 AGS 表达 CCK-BR 外,用 CCK-BR 特异的引物和抗体(与 CCK-AR 无交叉反应)在非消化道的多种肿瘤细胞株如肝癌细胞 HepG-2、人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y、人肺癌细胞 A549 和 NCI-H446、人前列腺癌细胞 DU145、人膀胱癌细胞 T24 中也发现 CCK-BR 的表达,但这些肿瘤细胞表达 CCK-BR 的作用并不清楚,是否与胃泌素/CCK-BR 自分泌环有关尚需进一步研究。

为了进一步研究 CCK-BR 在人体肿瘤组织中的表达情况,选取临床手术切除的肿瘤标本胃癌组织、乳腺癌组织、宫颈癌组织、膀胱癌组织、肺癌组织及肝癌组织,用免疫组织化学法

检测 CCK-BR 的表达。与体外结果一致,在上述肿瘤组织中 CCK-BR 均表达阳性,并在 SGC-7901、AGS 细胞中证实 CCK-BR 主要在细胞质和细胞膜上表达。但是否与消化道肿瘤一样,CCK-BR 在这些肿瘤的发病机制中所起作用尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Jensen RT. Consequences of long-term proton pump blockade; insights from studies of patients with gastrinomas[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006, 98(1): 4-19.

[2] Dufresne M, Seva C, Fourmy D. Cholecystokinin and gastrin receptors[J]. Pysiol Rev, 2006, 86(3): 805-847.

[3] Rai R, Chandra V, Tewari M, et al. Cholecystokinin and gastrin receptors targeting in gastrointestinal Cancer[J]. Surg Oncol, 2012, 21(4): 281-292.

[4] Chung L, Moore SD, Cox CL. Cholecystokinin action on layer 6b neurons in somatosensory cortex[J]. Brain Res, 2009, 1282(1): 10-19.

[5] Staljanssens D, Azari EK, Christiaens O, et al. The CCK(-like) receptor in the animal kingdom: functions, evolution and structures[J]. Peptides, 2011, 32(3): 607-619.

[6] Chao C, Han X, Ives K, et al. CCK2 receptor expression transforms non-tumorigenic human NCM356 colonic epithelial cells into tumor forming cells[J]. Int J Cancer, 2010, 126(4): 864-875.

[7] Fino KK, Matters GL, Mcgovern CO, et al. Downregulation of the CCK-B receptor in pancreatic Cancer cells blocks proliferation and promotes apoptosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 302(11): G1244-G1252.

[8] Jensen RT. Involvement of cholecystokinin/gastrin-related peptides and their receptors in clinical gastrointestinal disorders[J]. Pharmacol Toxicol, 2002, 91(6): 333-350.

[9] Peter SA, D'amato M, Beglinger C. CCK1 antagonists: are they ready for clinical use? [J]. Dig Dis, 2006, 24(1/2): 70-82.

[10] Sturzu A, Klose U, Sheikh S, et al. The gastrin/cholecystokinin-B receptor on prostate cells-A novel target for bi-functional prostate Cancer imaging[J]. Eur J Pharm Sci, 2014, 52(52C): 69-76.

[11] Zhou JJ, Chen ML, Zhang QZ, et al. (下转第 1590 页)