

瘦素及瘦素受体在胃癌组织和胃癌细胞株中的表达

赵晓龙, 朱兆华, 黄开红, 程树红

(中山大学附属第二医院消化科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨胃癌细胞株和胃癌组织是否有瘦素和瘦素受体表达, 以及瘦素对胃癌细胞株的增殖作用。【方法】免疫组化和 RT-PCR 检测胃癌细胞株及胃癌组织中瘦素和瘦素受体表达, MTT 法测定瘦素对胃癌细胞株 SGC7901、MGC803、MKN45 的增殖作用。【结果】胃癌细胞株 SGC7901、MGC803 及 MKN45 均有瘦素及瘦素受体表达; 47 例胃癌组织石蜡切片标本检测有瘦素表达 20 例, 有瘦素受体表达 23 例, 两者共同表达 17 例; 19 例新鲜胃癌组织标本, 有瘦素 mRNA 表达 13 例, 瘦素受体 mRNA 表达 12 例, 两者共同表达 10 例; 与对照组相比, 100 ng/mL 的瘦素可使胃癌细胞株 SGC7901、MGC803、MKN45 的增殖率分别为 1.45、1.56 及 1.54。【结论】胃癌细胞株及胃癌组织普遍存在瘦素和瘦素受体表达, 瘦素可促进胃癌细胞株增殖。

关键词:瘦素; 瘦素受体; 胃癌

中图分类号: R347.921

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0249-04

Expression of Leptin and Leptin Receptor in Gastric Cancer Cell Line and Gastric Cancer Tissue

ZHAO Xiao-long, ZHU Zhao-hua, HUANG Kai-hong, CHENG Shu-hong

(Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the expression of the leptin and leptin receptor in gastric cancer cell line and gastric cancer tissue and the proliferative effect of leptin in gastric cancer cell line.【Methods】The expression of leptin and leptin receptor was detected with the immunohistochemistry and RT-PCR respectively. The proliferative effect of leptin was investigated with MTT assay.【Results】Leptin and leptin receptor were expressed in gastric cancer cell line and gastric cancer tissue. Among 47 paraffin section specimen 20 specimen expressed leptin, 23 specimen expressed leptin receptor and 17 specimen expressed both of them through immunohistochemical staining. Among 19 fresh gastric cancer specimen, 13 specimen expressed leptin mRNA, 12 specimen expressed leptin receptor mRNA and 10 specimen expressed both of them through RT-PCR. Compared with control group, the proliferation rate of gastric cancer cell line SGC7901, MCG803 and MKN45 with 100 ng/mL leptin in cell culture medium was 1.45, 1.56 and 1.54 respectively.【Conclusions】Leptin and leptin receptor are expressed in gastric cancer cell line and gastric cancer tissue. Leptin can promote the proliferation of gastric cancer cell line.

Key words: leptin; leptin receptor; gastric cancer

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(3):252 - 255]

瘦素 (leptin) 是机体调节体重的重要物质, 近年来流行病学调查和基础研究证实瘦素与肿瘤的

发生密切相关^[1, 2]。胃癌组织是否有瘦素及瘦素受体的表达是认识瘦素参与胃癌发病机制的基础, 目

收稿日期: 2003-10-20

作者简介: 赵晓龙 (1975 -), 男, 浙江诸暨人, 博士生, 医师. E-mail: xiaolongzhao@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

前国内外尚未见文献报道,本研究检测胃癌细胞株及胃癌组织是否有瘦素及瘦素受体的表达,并观察瘦素对胃癌细胞株增殖的影响,为人们认识瘦素可能作为一种新的生长因子参与胃癌的发病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

47 例石蜡切片标本来源于 1996 年 12 月至 1999 年 12 月在广州中山医科大学附属第二医院行胃癌手术切除的病例,低分化腺癌 18 例,印戒细胞癌 7 例,黏液腺癌 2 例,未分化癌和单纯癌 8 例,管状腺癌 12 例。19 例新鲜胃癌组织标本来源于 2003 年 1 月至 2003 年 10 月在该院行胃癌手术切除标本,取材后迅速放入液氮中,后转移至 -70℃ 冰箱备用,术后病理证实为管状腺癌 6 例,低分化腺癌 7 例,未分化癌 3 例,印戒细胞癌 2 例,黏液腺癌 1 例。以来源于大网膜正常脂肪组织作为阳性对照。胃癌细胞株 SGC7901、MGC803 及 MKN45 由本科消化研究室保存。

1.2 细胞培养

人胃癌细胞株 SGC7901、MGC803 及 MKN45 用体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37℃、体积分数 5% CO₂ 条件下常规培养。

1.3 免疫组化

石蜡切片标本经常规脱蜡、水化后,用柠檬酸盐缓冲液高压锅法抗原修复 1 min,细胞标本经常规细胞铺片后用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定,链霉菌抗生物素蛋白—生物素—过氧化物酶免疫组化染色超敏两步法(试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司,试剂编号 kit-9709,kit-9710)检测瘦素及其瘦素受体的表达,具体操作按试剂说明书进行。一抗为兔抗人瘦素多克隆抗体 Ob(A-20)(Santa Cruz 公司)和山羊抗人瘦素受体多克隆抗体 Ob-R(M-18)(Santa Cruz 公司),抗体稀释度均为 1:50,以 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.4 RT-PCR

按 Trizol(Gibco)说明书操作提取胃癌组织 RNA,取 5 μg RNA 用 MMLV 逆转录酶(Promega)逆转录成 cDNA,在 25 μL 反应体系中分别加入 5 U/μL 的 LA Taq 酶 0.25 μL,2 × 缓冲液 12.5 μL,4 × dNTP 混合物(各 10 mmol/L) 1 μL,模板 DNA 1 μL,引物各 0.25 μL,灭菌蒸馏水 9.75 μL。PCR 反

应条件:94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,最后 72℃ 终止 5 min,40 循环,GAPDH 作内参照,PCR 产物 2 μL 经 2 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测。引物由上海生工合成,序列参照文献[4],引物序列如下:Leptin 特异性引物上游引物为 5'-CCA AGA TGG ACC AGA CAC TG-3',下游引物为 5'-GCC ACC ACC TCT GTG GAG TA-3',扩增片段为 220 bp;Leptin receptor 特异性引物上游引物为 5'-TTG TGC CAG TAA TTA TTT CCT CTT-3',下游引物为 5'-CTG ATC AGC GTG GCG TAT TT-3',扩增片段为 438 bp;内参照 GAPDH 特异上游引物为 5'-GGT CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG-3',下游引物为 5'-CCT CCG ACG CCT GCT TCA CCA A-3',扩增片段为 782 bp。

1.5 MTT 细胞增殖实验

以 SGC7901、MGC803 及 MKN45 为研究对象,参照 Schneider 等^[4]方法,取对数生长期细胞,胰酶消化后混匀,用体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 调整细胞浓度为 2.5 × 10⁵/mL,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 200 μL,培养 12 h 后,换为 0.5 g/mL 牛血清白蛋白的 Hanks 液培养 12 h 细胞同步后加入瘦素。设 2 个瘦素浓度组(10 ng/mL、100 ng/mL),以不加瘦素组作为空白对照组,每组设 8 个复孔。培养 12 h 后终止实验,每孔加入 MTT (5 mg/mL)20 μL,在温箱继续孵育 4 h,弃上清液,加入二甲基亚砷 150 μL,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上选择 492 nm 波长测定各孔光吸收值(A₄₉₂),以空白孔调零。按下述公式计算细胞增殖率(proliferation rate,PR):

$$\text{增殖率(PR)} = \frac{\text{实验组 } A_{492}}{\text{对照组 } A_{492}} \times 100\%$$

1.6 统计学处理

结果用均数 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用 SPSS10.0 统计软件处理,组间比较用方差分析,各组之间两两比较用 LSD 方法。

2 结果

2.1 免疫组化

胃癌细胞株 SGC7901、MGC803 及 MKN45 均有瘦素及瘦素受体的表达,瘦素及瘦素受体以胞浆表达为主;47 例胃癌组织石蜡切片标本中,有瘦素表达 29 例(62%),瘦素受体表达 23 例(49%),瘦素及瘦素受体均表达有 17 例(36%),见图 1,表 1。

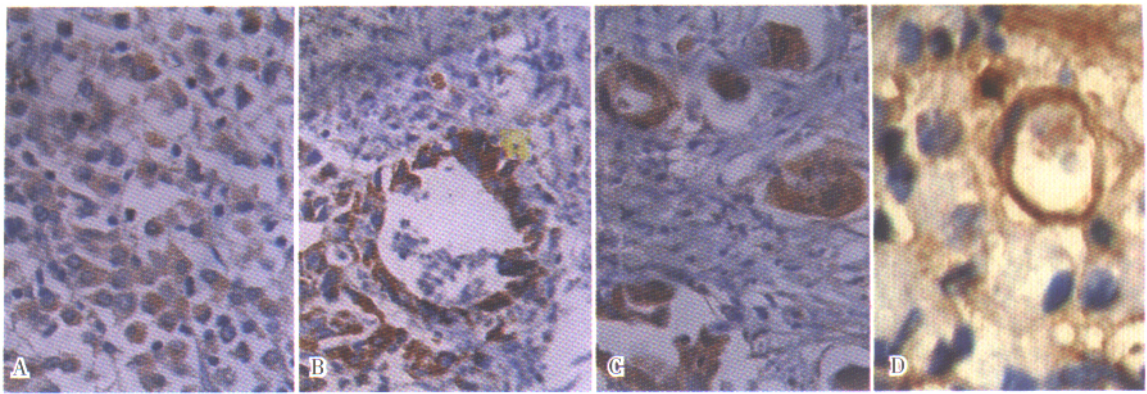


图 1 胃癌组织瘦素及瘦素受体免疫组化检测

Fig. 1 Immunohistochemical examination of leptin and leptin receptor in human gastric carcinoma

A: Leptin positive staining of gastric poorly differentiated adenocarcinoma (×200); B: Leptin positive staining of gastric tubular adenocarcinoma (×200); C: Leptin receptor positive staining of gastric tubular adenocarcinoma (×200); D: Leptin receptor positive staining of gastric signet-ring cell carcinoma (×400)

表 1 免疫组化及 RT-PCR 检测瘦素及瘦素受体在胃癌组织的表达

Table 1 The expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) in gastric carcinoma with immunohistochemistry and RT-PCR n

Pathology type	Immunohistochemistry				RT-PCR			
	N	Ob ⁺	ObR ⁺	Ob ⁺ ObR ⁺	N	Ob ⁺	ObR ⁺	Ob ⁺ ObR ⁺
Tubular adenocarcinoma	12	7	10	6	6	6	6	6
Low poorly differentiated carcinoma	18	9	12	6	7	4	3	2
Undifferentiated carcinoma	8	4	5	3	3	1	1	0
Signet ring cell carcinoma	7	3	2	2	2	2	2	2
Mucus adenocarcinoma	2	0	0	0	1	0	0	0
Total	47	23	29	17	19	13	12	10

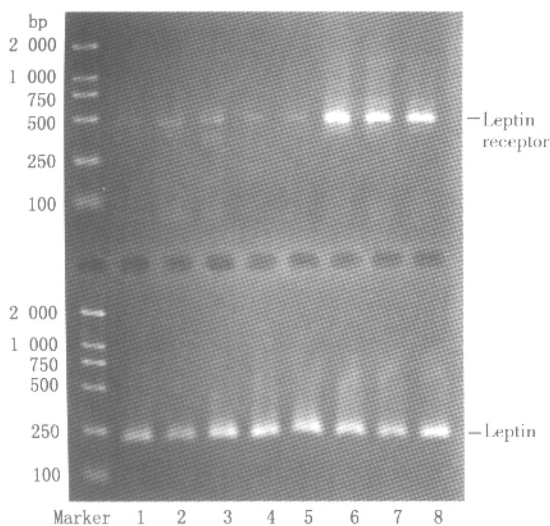


图 2 胃癌细胞株及胃癌组织瘦素及瘦素受体表达的 RT-PCR 分析

Fig. 2 RT-PCR analysis of leptin and leptin receptor in gastric cancer cell line and gastric cancer tissue (2 g/mL agarose electrophoresis)

Lane 1: MKN45; Lane 2: MGC803; Lane 3: SGC7901; Lane 4: Low poorly differentiated carcinoma; Lane 5: Undifferentiated carcinoma; Lane 6: Signet ring cell carcinoma; Lane 7: Tubular carcinoma; Lane 8: Fat control (positive control)

2.2 RT-PCR

胃癌细胞株 SGC7901、MGC803 及 MKN45 均有瘦素及瘦素受体的 mRNA 表达; 19 例新鲜胃癌组织中, 有瘦素 mRNA 表达 13 例 (68%), 有瘦素受体 mRNA 表达 12 例 (63%), 瘦素及瘦素受体 mRNA 共同表达 10 例 (21%), 见图 2, 表 1。

2.3 MTT 细胞增殖实验

瘦素对胃癌细胞株的增殖可见到明显的剂量依赖效应 ($P < 0.01$), 瘦素浓度为 100 ng/mL 时其增殖效应最大, 见表 2。

3 讨论

美国癌症协会流行病学的调查显示: 男性中由胃癌所致的死亡可观察到体重指数较高者发生危险升高的显著趋势^[1], 而肥胖患者中普遍为高瘦素血清水平。胃组织也是瘦素的来源之一, 瘦素可促进胃溃疡黏膜的愈合^[5], 幽门螺旋杆菌 (HP) 感染被世界卫生组织定为胃癌发生的 I 类危险因子, HP 感染可使胃黏膜瘦素蛋白及其

表 2 MTT 法测定不同浓度瘦素对人胃癌细胞株增殖指数的影响

Table 2 Effect of leptin on proliferation rate (PR) in gastric cancer cell line through MTT assay (n = 8)

Group	SGC7901		MGC803		MKN45	
	A ₄₉₂	PR	A ₄₉₂	PR	A ₄₉₂	PR
Control	0.44 ± 0.02	1.0	0.50 ± 0.03	1.00	0.48 ± 0.01	1.00
Leptin 10 ng/mL	0.59 ± 0.02 ¹⁾	1.34	0.70 ± 0.03 ¹⁾	1.40	0.64 ± 0.02 ¹⁾	1.33
Leptin 100 ng/mL	0.64 ± 0.01 ^{1),2)}	1.45	0.78 ± 0.02 ^{1),2)}	1.56	0.74 ± 0.02 ^{1),2)}	1.54

1) Compared with control, P < 0.01; 2) Compared with leptin 10 ng/mL group, P < 0.01

mRNA 表达增加,清除 HP 后瘦素表达减少^[6],因此瘦素可能与胃癌发生有关。探究胃癌细胞株及组织是否有瘦素及瘦素受体的表达,是认识瘦素参与胃癌发病机制的基础。我们应用免疫组化及 RT-PCR 的方法从蛋白和核酸两个水平证实:胃癌组织及细胞株普遍存在瘦素及瘦素受体的表达,约 1/3 的肿瘤同时有瘦素及瘦素受体的表达,但不同的病理类型其瘦素及瘦素受体表达的阳性率不一,说明在胃癌组织中瘦素及瘦素受体的表达存在异质性。在体外瘦素可促进胃癌细胞株的增殖,胃癌细胞普遍存在瘦素及瘦素受体的表达,提示瘦素可以自分泌的方式参与了调控胃癌细胞的增殖;此外经脂肪组织分泌入血的瘦素也可经微循环到达胃癌组织,说明瘦素也可以内分泌的方式作用于胃癌细胞。

参考文献:

[1] Calle E E, Rodriguez C, Walker T K, et al. Over-

weight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U. S. adults[J]. N Engl J Med, 2003, 348(17): 1625-38.

[2] Hardwick J C, Van Den Brink G R, Offerhaus G J, et al. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells [J]. Gastroenterology, 2001 121(1): 79-84.

[3] Mix H, Widjaja A, Jandl O, et al. Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach[J]. Gut, 2000, 47(4): 481-6.

[4] Schneider R, Bornstein S R, Chrousos G P, et al. Leptin mediates a proliferative response in human gastric mucosa cells with functional receptor[J]. Horm Metab Res, 2001, 33(1): 1-6.

[5] Konturek P C, Brzozowski T, Sulekova Z. Role of leptin in ulcer healing[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 414(1): 87-97.

[6] Azuma T, Suto H, Ito Y, et al. Gastric leptin and Helicobacter pylori infection[J]. Gut, 2001, 49(3): 324-9.

(编辑 黄小延)

· 简 讯 ·

我校医科 2003 年喜获 10 项教育部提名国家科学技术奖

随着国家科技奖励制度改革,原教育部科学技术奖更名为教育部提名国家科学技术奖,该奖只设一、二等奖。2003 年教育部提名国家科学技术奖评审结果已揭晓,中山大学医科共有 10 个项目获奖,其中有 6 个项目获一等奖,是历年来获教育部科学技术一等奖项目最多的一年。基础医学院吴伟康教授等人完成的《四逆汤抗心肌缺血的作用及其机制研究》、一院陈昱湖教授等人完成的《幽门螺杆菌疫苗的实验研究》、沈靖南教授等人完成的《恶性骨肿瘤的三结合诊断、保肢治疗和基础研究》、陈规划教授等人完成的《原位肝脏移植的系列研究》、二院黄绍良教授等人完成的《脐血造血干细胞移植的基础和临床系列研究》、眼科中心文峰副研究员等人完成的《脉络膜相关疾病眼底形态学系列研究》分别荣获一等奖,一院叶任高教授等人完成的《腹膜转运与防御机制的研究》、二院程桦教授等人完成的《瘦素基因、瘦素、瘦素受体的研究》、眼科中心吴德正教授等人完成的《视觉运动觉系列检测方法的建立及其临床应用》、林跃生教授等人完成的《角膜移植免疫排斥反应的系列防治研究》分别荣获二等奖。

(医学科学处成果专刊)