

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.30.005

文章编号: 1005-8982(2017)30-0026-10

临床研究·论著

胃饥饿素对结肠癌细胞增殖和侵袭的影响及机制探讨

岳朝驰¹, 杨向东², 李俊¹, 陈小朝², 屈景辉²

(1. 西南医科大学附属医院 中医科, 四川 泸州 646000; 2. 成都肛肠专科医院
结直肠外科, 四川 成都 610015)

摘要: **目的** 探讨胃饥饿素(Ghrelin)对结肠癌细胞增殖、侵袭的影响及作用机制。 **方法** 收集 90 例行手术切除的结肠癌(CRC)组织及癌旁组织, 免疫组织化学染色检测组织 Ghrelin 表达, 分析 Ghrelin 表达与结肠癌患者临床资料、生存预后的关系。按照转染类型将细胞分为 3 组: 空白对照组(WT)、阴性对照组(NC)和 sh-Ghrelin 转染组。采用短发夹 RNA(shRNA)技术抑制结肠癌 HT29、SW480 细胞 Ghrelin 表达, CCK-8 法检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞周期及早期凋亡的情况, 划痕实验检测细胞迁移能力, Transwell 实验检测细胞侵袭能力, Western blot 检测磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)表达水平。 **结果** 结肠癌组织 Ghrelin 高表达率为 64.4%(58/90), 癌旁组织 Ghrelin 高表达率为 27.8%(25/90), 两者差异有统计学意义($\chi^2=24.347$, $P=0.001$)。肿瘤直径 ≥ 5 cm 组 Ghrelin 高表达率高于肿瘤直径 < 5 cm 组, III、IV 期组 Ghrelin 高表达率高于 I、II 组, 淋巴结转移组 Ghrelin 高表达率高于无淋巴结转移组, 组间比较差异有统计学意义($P<0.05$); Ghrelin 表达与性别、年龄及肿瘤分级无关($P>0.05$)。生存曲线分析显示, Ghrelin 高表达组总生存期和无病生存率均低于 Ghrelin 低表达组($P<0.05$)。在结肠癌 HT29 和 SW480 细胞中, sh-Ghrelin 组细胞增殖能力低于 NC 组和 WT 组, 处于 S 期比例、早期凋亡比例高于 NC 组和 WT 组($P<0.05$)。处于 G₀/G₁ 期比例低于 NC 组和 WT 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。sh-Ghrelin 组细胞迁移距离、侵袭细胞数少于 NC 组和 WT 组($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示, 在 HT29、SW480 细胞中, sh-Ghrelin 组 PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白相对表达量低于 NC 组和 WT 组($P<0.05$), NC 组、WT 组间 PI3K、Akt、p-Akt、mTOR 及 p-mTOR 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。 **结论** 结肠癌组织 Ghrelin 表达上调, 并与结肠癌患者生存预后有关。干扰 Ghrelin 表达能够抑制结肠癌细胞增殖、侵袭, 其作用机制可能与抑制 PI3K-Akt-mTOR 信号通路有关。

关键词: 胃饥饿素; 结肠癌; 增殖; 细胞周期; 侵袭; 信号通路

中图分类号: R735.35

文献标识码: A

Regulation of Ghrelin in proliferation and invasion of colon carcinoma

Chao-chi Yue¹, Xiang-dong Yang², Jun Li¹, Xiao-zhao Chen², Jun-hui Qu²

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Colorectal Surgery, the Anorectal Specialist Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610015, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Ghrelin on cellular proliferation and invasion of colon carcinoma and potential mechanisms. **Methods** A total of 90 patients diagnosed with colon carcinoma were included in this study, and cancer as well as paracancerous normal tissue was collected. Expression of Ghrelin was measured by Immunohistochemical staining assay; Co-relationship analysis between ghrelin expression and clinical manifestation of patients including survival rate was performed. Expression of Ghrelin

in colon carcinoma cell line HT29 and SW480 was genetically inhibited by short hairpin RNA (shRNA). Cellular proliferation, cell cycle as well as apoptosis, migration, and cell invasion were determined by CCK-8 assay, Flow cytometry, Wound heal assay, and Transwell assay, respectively. Expression levels of PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR protein were measured by Western blot. **Results** Expression of Ghrelin in cancer tissue, group with tumor diameter ≥ 5 cm, and group with tumor under III~IV phase was upregulated when compared with that in paracancerous tissue, group with tumor diameter < 5 cm group, group with tumor under metastasis-free phase, respectively ($P < 0.05$). No correlation between Ghrelin expression and gender, age and tumor grade respectively was observed ($P > 0.05$). Overall survival and disease-free survival in group with highly expressed Ghrelin was significantly lower than that in group with lowly expressed Ghrelin ($P < 0.05$). Proliferation, migration and invasion capacity of HT29 and SW480 cells decreased while ratio of cells in S phase and early apoptosis increased significantly in sh-Ghrelin group when compared with those in NC group and WT group ($P < 0.05$). In HT29 and SW480 cells expression levels of PI3K, p-Akt, p-mTOR protein were dramatically down-regulated in sh-Ghrelin group when compared with those in NC group and WT group ($P < 0.05$). No statistical difference in the expression of PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR protein in NC group and WT group was observed ($P > 0.05$). **Conclusions** The expression of Ghrelin is up-regulated in colon carcinoma tissue, which is closely associated with disease prognosis. Beneficial effect of Ghrelin is potentially mediated through inhibition of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway.

Keywords: Ghrelin; colon carcinoma; proliferation; cell cycle; invasion; signaling pathway

结肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界范围内常见的恶性肿瘤,居癌症相关死亡的第4位^[1]。尽管结肠镜等腔镜技术的发展和普及有利于结肠癌早期发现,然而据世界卫生组织调查显示^[2],全球每年结肠癌发病人口依然 >100 万,其中,60%的 CRC 患者确诊时已是中晚期。即使给予手术、放、化疗等,结肠癌患者远期生存依然不容乐观。因此了解结肠癌的发病机制具有重要的临床意义。胃饥饿素(Ghrelin)^[3-4]是由胃合成和分泌的一种生长激素,在调控人体食欲、食物摄取及机体能量平衡方面发挥重要作用。近年来有研究报道^[5-6],胃饥饿素对不同细胞的增殖和迁移有不同的影响,如胃饥饿素能够促进胰腺癌细胞的增殖,但对肺癌细胞则有抑制作用。也有报道称^[7],饥饿素能促进肠道恶性肿瘤的发生和进展,结肠癌患者血清胃饥饿素水平高于正常人群,并且胃饥饿素水平与患者预后密切相关。但是关于胃饥饿素与结肠癌发病的关系及作用机制尚未见报道。鉴于此,本研究分别检测结肠癌组织和细胞胃饥饿素表达水平,并探讨不同胃饥饿素表达水平对结肠癌细胞增殖、侵袭的影响及作用机制,旨在为结肠癌的预防、治疗和诊断提供潜在的作用靶点。

1 资料与方法

1.1 样本收集

选取 2010 年 4 月 -2011 年 4 月本院收治的 90 例结肠癌患者。纳入标准:①入组前未接受任何抗癌治疗;②入院后拟行手术治疗;③术前签署知情同意书,并自愿捐献组织样本供本研究使用;④术后经病

理学确诊。排除标准:合并其他恶性肿瘤、严重自身免疫性疾病及不宜或拒绝手术者。所有患者术中切除结肠癌组织及配对的癌旁组织(距癌组织切缘 > 5 cm),组织样本取出后分成两部分,一部分立即置于液氮中保存,另外一部分用 10%甲醛固定用于免疫组织化学(免疫组化)染色。术后对患者进行电话随访或门诊复查,定义无病生存期(disease-free survival, DFS):从术后第 2 天开始至疾病复发、远处转移或因结肠癌死亡的时间;总生存期(overall survival, OS):从术后第 2 天开始至因任何原因引起死亡的时间。本研究随访截止时间 2016 年 12 月 31 日。本研究样本的采集、患者的治疗均得到医院伦理委员会的批准。

1.2 细胞来源

人结肠上皮细胞 HIEC、人结肠癌细胞 HT29 及 SW480 均购自美国菌种保藏中心(美国弗吉尼亚州),所有细胞均接种于 DMEM 培养基(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。培养基含 10%胎牛血清、100 u/ml 青霉素及 100 u/ml 链霉素,在培养箱中 37℃、5%二氧化碳 CO₂ 培养。每隔 2 天更换 1 次培养基,细胞融合达 80%~90%时传代,选择传 >3 代细胞用于后续实验。

1.3 实验试剂

pGPU6/GFP/Neo-sh-Ghrelin 表达载体(购自上海吉玛制药技术有限公司),短发夹 RNA (shRNA)序列,正向引物:5'-GUAAGAGGAGGGCUAUUA-3',反向引物:5'-CGU AUGCGCGUACUCUAAUTT-3'。

Lipofectamine 2000™ 购自 (美国 Invitrogen 公司), Trizol 试剂、RIPA 裂解液(购自广州碧云天生物技术研究所),逆转录试剂盒、蛋白浓度检测试剂盒(购自美国 Fermentas 公司),CCK-8 增殖活性测定试剂盒(购自长沙贝博生物科技有限公司),细胞周期检测试剂盒(购自北京雷根生物技术有限公司),Transwell 小室、Matrigel 人工基底膜(购自美国 Sigma 公司)。抗 Ghrelin(1:100,武汉博士德生物公司)、抗磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase,PI3K)(1:50,上海生工生物工程有限公司)、抗哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)(1:500,海门碧云天生物技术研究所)、抗磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylation mTOR,p-mTOR)(phosphorylation Akt,p-Akt)(1:200,海门碧云天生物技术研究所)、抗蛋白激酶 B(protein kinase B,Akt)(1:100,上海生工生物工程有限公司)、抗磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylation Akt,p-Akt)(1:100,上海生工生物工程有限公司)、抗 β -actin(1:200,武汉博士德生物公司),流式细胞仪(购自美国 BD 公司),PVDF 膜、ECL 化学发光试剂盒(购自美国 Millipore 公司)。

1.4 方法

1.4.1 免疫组化染色检测结肠癌组织 Ghrelin 表达 将甲醛固定的结肠组织和癌旁组织常规石蜡包埋,制成 5 μ m 的切片,脱蜡至水,加热修复抗原,加入 H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶。滴加 2、3 滴 Ghrelin 抗体,4℃ 孵育过夜。PBS 冲洗 3 次,滴加 1、2 滴二抗,37℃ 孵育 15 min,DAB 显色液显色 10 min,显微镜下观察图像。染色强度参考以下标准,0 分:无染色,1 分:弱阳性染色,2 分:阳性染色,3 分:强阳性染色。阳性细胞比例参考以下标准,1 分:0~25%,2 分:26%~75%,3 分:76%~100%。每张切片随机选择 5 个视野,由 2 位病理科医师采用双盲法进行评价,若判定结果不一致,则由第 3 位医师做出最后判定。免疫染色评分(immunoreactive score,IRS)以染色强度和阳性细胞比例综合判定,两者相乘,IRS 评分 0~9 分,其中 0 分为阴性,1~2 分为低表达,3~9 分为高表达。

1.4.2 细胞转染 转染前 24 h,将 HT29 和 SW480 铺于 6 孔板,细胞密度为 1×10^6 个/孔,加入培养基培养,待细胞达 80% 融合度,利用 Lipofectamine 2000™ 转染质粒。按照转染类型将细胞分为 3 组:空白对照组(WT)、阴性对照组(NC)和 sh-Ghrelin

转染组,空白对照组加入等量 Lipofectamine 2000™ 试剂,阴性对照组加入阴性对照的质粒和 Lipofectamine 2000™ 试剂,sh-Ghrelin 转染组加入 sh-Ghrelin 质粒和 Lipofectamine 2000™ 试剂。质粒和 Lipofectamine 2000™ 试剂按照 1:3 比例进行配置,转染 6 h 后,再向每孔中加入 300 μ l FBS,转染 24 h 后更换为 DMEM 培养基,转染 72 h 后采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测 Ghrelin mRNA 表达以评价转染效率。

1.4.3 qRT-PCR 检测 Ghrelin mRNA 表达 取生长旺盛期细胞,弃去培养基,PBS 冲洗 3 次,加入 Trizol 试剂,按照试剂说明书依次氯仿抽提、异丙醇沉淀、乙醇洗涤;将 1 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA,参考 SYBR GREEN 定量 PCR 说明书进行 PCR 反应,总反应体系 30 μ l。反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,总计 40 个循环。Ghrelin 正向引物:5'-GTTGGGTGTGATG GAGGGAAG-3',反向引物:5'-CCTTCTCAGTGGTGC AACTGTG-3'; β -actin 正向引物:5'-CACCATTGGC AATGAGGGGTTC-3',反向引物:5'-AGGTCTTTGCG GATGTCCACGT-3'。定量分析结果以 Ct 值表示,以 β -actin 作为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 作为目的基因相对表达量。

1.4.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性 将细胞铺于 96 孔板中(2×10^3 个/孔),同时设置试剂空白对照孔和细胞空白对照空,孵育 24 h 后于每孔中加入预先配置好的 CCK-8 试剂(10 μ l/孔),37℃ 继续孵育,于 450 nm 处检测吸光度值,并以标准曲线读出样品的光密度值(OD)。

1.4.5 流式细胞术检测细胞生长周期 细胞铺于 6 孔板中(1×10^6 个/孔),继续培养 24 h,收集贴壁细胞,加入 75%乙醇固定,4℃ 过夜;第 2 天弃去固定液,加入 RNA 酶以消除 RNA 的干扰;再加入 PI 染液(10 μ l),上机检测,每次实验操作 3 次,取平均值。

1.4.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞铺于 6 孔板中(1×10^6 个/孔),继续培养 24 h,收集贴壁细胞,依次加入 Annexin V(400 μ l)和 Annexin V-FITC(5 μ l)染液,避光孵育 15 min,再加入 PI 染液(10 μ l),上机检测,每次实验操作 3 次,取平均值。

1.4.7 Transwell 小室法检测细胞侵袭能力 用不含血清的培养基将转染后细胞浓度调整为 1.0×10^5 个/ml,Transwell 上室每孔接种 150 μ l 细胞,下室加入 600 μ l 含有 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养

基作为趋化剂,37℃培养 48 h,轻轻拭去表面非侵袭性细胞,4%多聚甲醛固定,结晶紫染色 10 min,显微镜下统计穿透滤膜的细胞数。

1.4.8 划痕实验检测细胞迁移能力 将细胞接种于 6 孔板,Marker 笔在培养板后均匀划间距为 0.5 cm 的横线,每孔中铺 1×10^5 个细胞,细胞融合度 $\geq 80\%$ 时用无菌用移液枪枪头在单层细胞沿底部划出“—”字划痕,PBS 冲洗 3 次后,培养 24 h 后在显微镜下测量划痕愈合的宽度。

1.4.9 Western blot 检测 PI3K、Akt、p-Akt、mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达 取对数生长期细胞,弃去培养液,PBS 冲洗,加入离心管中,再加入 1 ml RIPA 裂解液置于冰浴上裂解 30 min,4℃条件下离心 15 min,BCA 蛋白浓度试剂盒检测蛋白纯度。将 20 μ g 蛋白提取液置于 10% SDS-PAGE 电泳分离,常规湿法转膜,加入 5%脱脂牛奶孵育封闭 2 h。分别加入 PI3K、Akt、p-Akt、mTOR 及 p-mTOR 抗体,4℃孵育 24 h。再滴加二抗 37℃孵育 2 h。PBS 冲洗 3 次,按照 ECL 化学发光显影试剂盒显影,以 β -actin 作为内参照,分析目的条带相对表达量。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验,计数资料以构成比(%)表示,分析用 χ^2 检验,Kaplan-Meier 法绘制 ROC 曲线,比较用 Log-rank χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ghrelin 在肺癌组织中表达

免疫组化染色结果显示,Ghrelin 蛋白主要位于细胞浆和细胞质,出现棕色颗粒为阳性细胞(见图 1)。结肠癌组织 Ghrelin 高表达率为 64.4%(58/90),癌旁组织 Ghrelin 高表达率为 27.8%(25/90),结肠癌组织 Ghrelin 高表达率高于癌旁组织($\chi^2=24.347, P=0.001$)。

2.2 Ghrelin 表达与结肠癌患者临床资料及生存预后的关系

Ghrelin 表达与肿瘤大小、TNM 分期及淋巴结转移有关,肿瘤直径 ≥ 5 cm 组 Ghrelin 高表达率高于肿瘤直径 <5 cm 组,Ⅲ、Ⅳ期组 Ghrelin 高表达率高于Ⅰ、Ⅱ组,淋巴结转移组 Ghrelin 高表达率高于无淋巴结转移组,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$);

Ghrelin 表达与性别、年龄及肿瘤分级无关($P > 0.05$) (见附表)。90 例结肠癌患者共计有 82 例获得完整随访,其中,低表达随访 30 例,高表达随访 52 例。生存曲线分析显示,Ghrelin 高表达总生存期和无病生存率均低于 Ghrelin 低表达($\chi^2=4.983$ 和 $4.001, P=0.034$ 和 0.043)。见图 2。

2.3 靶向 Ghrelin shRNA 抑制目的基因 mRNA 的表达

HIEC、HT29 及 SW480 细胞 Ghrelin mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义($F=7.210, P=0.000$)。

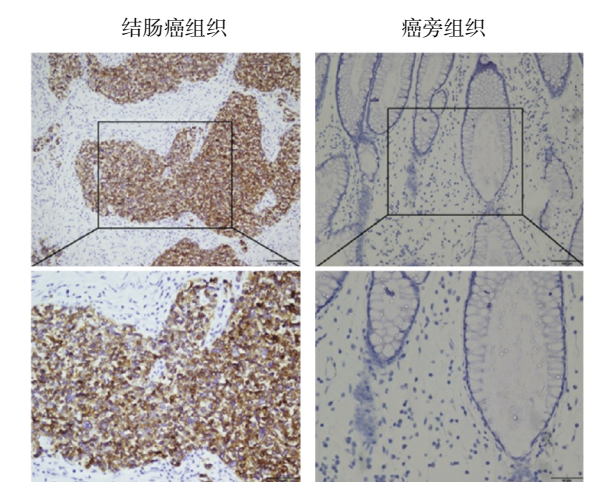


图 1 结肠癌和癌旁组织 Ghrelin 表达 (免疫组化)
附表 Ghrelin 表达与结肠癌患者临床资料的关系

病理特征	例数	Ghrelin		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
性别					
男性	50	29	21	2.039	0.153
女性	40	29	11		
年龄					
<60 岁	57	40	17	2.228	0.136
≥60 岁	33	18	15		
肿瘤大小					
<5 cm	41	19	22	10.771	0.001
≥5 cm	49	39	10		
TNM 分期					
I、II	42	21	21	7.171	0.007
III、IV	48	37	11		
肿瘤分级					
G ₁ ~G ₂	14	43	22	1.595	0.207
G ₃ ~G ₄	22	15	10		
淋巴结转移					
有	15	13	2	3.879	0.049
无	75	45	30		

HT29、SW480 细胞 Ghrelin mRNA 相对表达量高于 HIEC 细胞 ($P<0.05$), HT29、SW480 细胞间 Ghrelin mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$) (见图 3A)。NC、WT 及 sh-Ghrelin 组 HT29 细胞和 SW480 细胞的 Ghrelin mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义 ($F=5.431$ 和 $6.193, P=0.014$ 和 0.000), sh-Ghrelin 组 HT29 和 SW480 细胞的 Ghrelin mRNA 相对表达量低于 WT 组和 NC 组 ($P<0.05$) (见图 3B、C)。NC、WT 及 sh-Ghrelin 组 HT29 细胞和 SW480 细胞的 Ghrelin 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F=4.037$ 和 $5.172, P=0.031$ 和 0.025), sh-Ghrelin 组 HT29 和 SW480 细胞的 Ghrelin 蛋白相对表达量低于 WT 组和 NC 组 ($P<0.05$) (见图

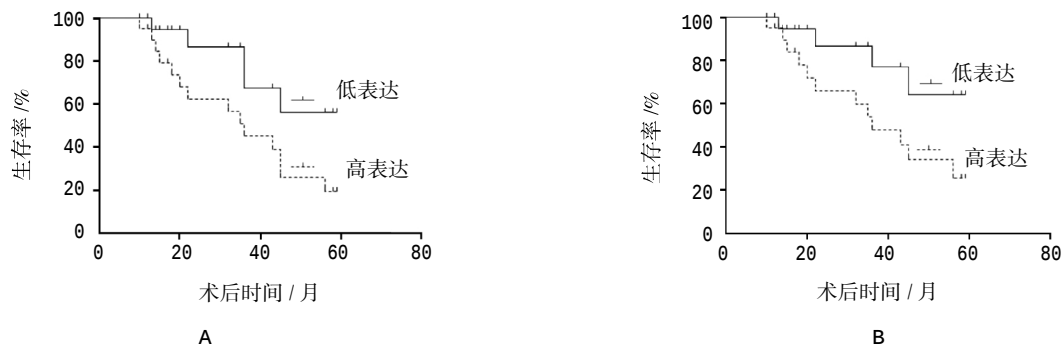
3D、E), 证实 sh-RNA 转染成功。

2.4 靶向 Ghrelin shRNA 抑制结肠癌细胞的增殖

对 HT29 和 SW480 细胞的 CCK-8 检测结果显示, 从培养的 24 ~ 120 h, NC 组和 WT 组细胞增殖能力比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 从 48 ~ 120 h, sh-Ghrelin 组细胞增殖能力低于 NC 组和 WT 组 ($P<0.05$) (见图 4A、B)。细胞周期检测结果显示, 在 HT29 和 SW480 细胞中, sh-Ghrelin 组细胞处于 S 期的比例高于 NC 组和 WT 组 ($F_{HT29}=18.043, P_{HT29}=0.000$; $F_{SW480}=19.247, P_{SW480}=0.000$), 而 NC 组、WT 组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 4C、D。

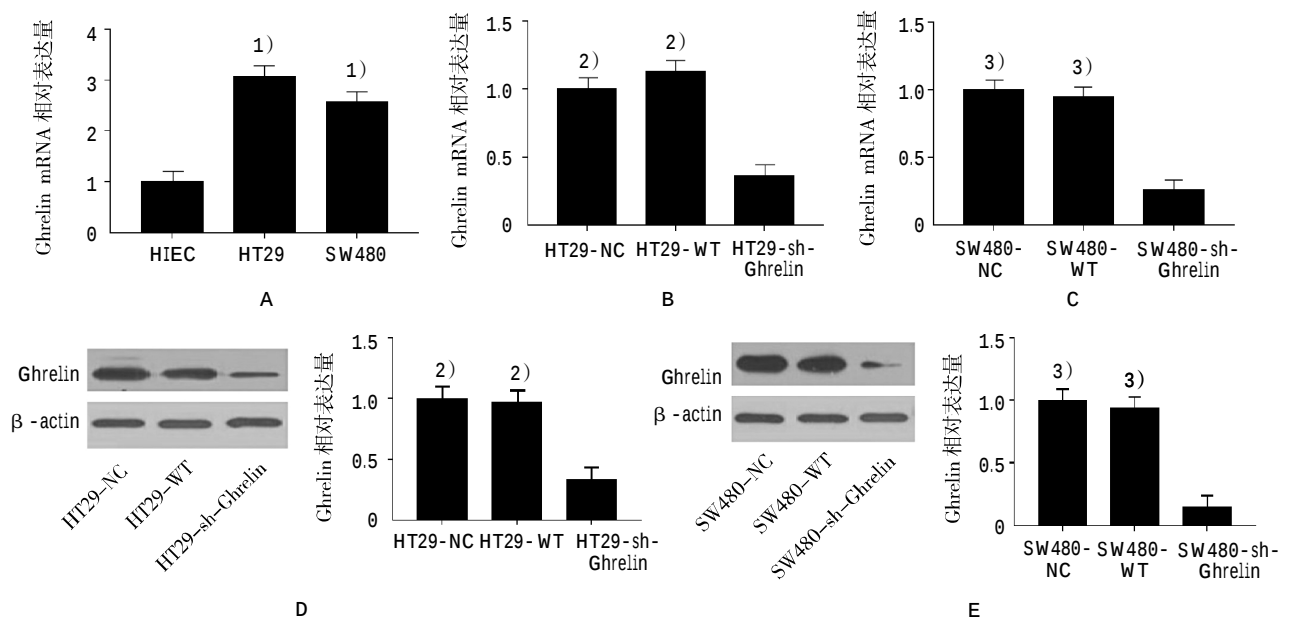
2.5 靶向 Ghrelin shRNA 促进结肠癌细胞凋亡

利用流式细胞仪检测细胞早期凋亡情况, 结果



A: 不同 Ghrelin 表达水平结肠癌患者无病生存率; B: 不同 Ghrelin 表达水平结肠癌患者总生存率

图 2 Ghrelin 表达与结肠癌患者生存预后的关系



A: HIEC、HT29、SW480 细胞 Ghrelin mRNA 相对表达量; B: 转染空质粒、未转染质粒及转染 sh-Ghrelin 干扰质粒的 HT29 细胞 Ghrelin mRNA 相对表达量; C: 转染空质粒、未转染质粒及转染 sh-Ghrelin 干扰质粒的 SW480 细胞 Ghrelin mRNA 相对表达量; D: 转染空质粒、未转染质粒及转染 sh-Ghrelin 干扰质粒的 HT29 细胞 Ghrelin 蛋白相对表达量; E: 转染空质粒、未转染质粒及转染 sh-Ghrelin 干扰质粒的 SW480 细胞 Ghrelin 蛋白相对表达量。1) 与 HIEC 细胞比较, $P<0.01$; 2) 与 HT29-sh-Ghrelin 组比较, $P<0.01$; 3) 与 SW480-sh-Ghrelin 组比较, $P<0.01$

图 3 各组细胞 Ghrelin mRNA 表达水平

显示 NC、WT 及 sh-Ghrelin 组 HT29 和 SW480 细胞早期凋亡比例比较,差异有统计学意义($F=14.910$ 和 12.943 ,均 $P=0.000$),在 HT29 和 SW480 细胞中,sh-Ghrelin 组细胞早期凋亡比例高于 NC 组和 WT 组($P<0.05$),NC 组、WT 组间细胞早期凋亡比例比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 5。

2.6 靶向 Ghrelin shRNA 抑制结肠癌细胞侵袭和转移

划痕实验显示,NC、WT 及 sh-Ghrelin 组 HT29、SW480 细胞的迁移距离比较差异有统计学意义($F=75.016$ 和 72.940 ,均 $P=0.000$),HT29、SW480 细胞中,sh-Ghrelin 组细胞迁移距离少于 NC 组和 WT 组($P<0.05$),NC 组、WT 组间细胞迁移距离比较差异无统计学意义($P>0.05$)(见图 6A、B)。Transwell 小

室实验结果显示,NC、WT 及 sh-Ghrelin 组 HT29、SW480 细胞的侵袭细胞数比较差异有统计学意义($F=25.401$ 和 20.745 ,均 $P=0.000$),HT29、SW480 细胞中,sh-Ghrelin 组侵袭细胞数少于 NC 组和 WT 组($P<0.05$),NC 组、WT 组间侵袭细胞数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 6。

2.7 靶向 Ghrelin shRNA 抑制 PI3K-Akt-mTOR 信号通路

Western blot 检测结果显示,NC、WT 及 sh-Ghrelin 组 HT29 细胞中 PI3K、p-Akt 以及 p-mTOR 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F_{PI3K}=7.641$, $P_{PI3K}=0.001$; $F_{p-Akt}=6.218$, $P_{p-Akt}=0.000$; $F_{p-mTOR}=4.732$, $P_{p-mTOR}=0.002$),NC、WT 及 sh-Ghrelin 组 SW480 细胞中 PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白相对表达量比较差

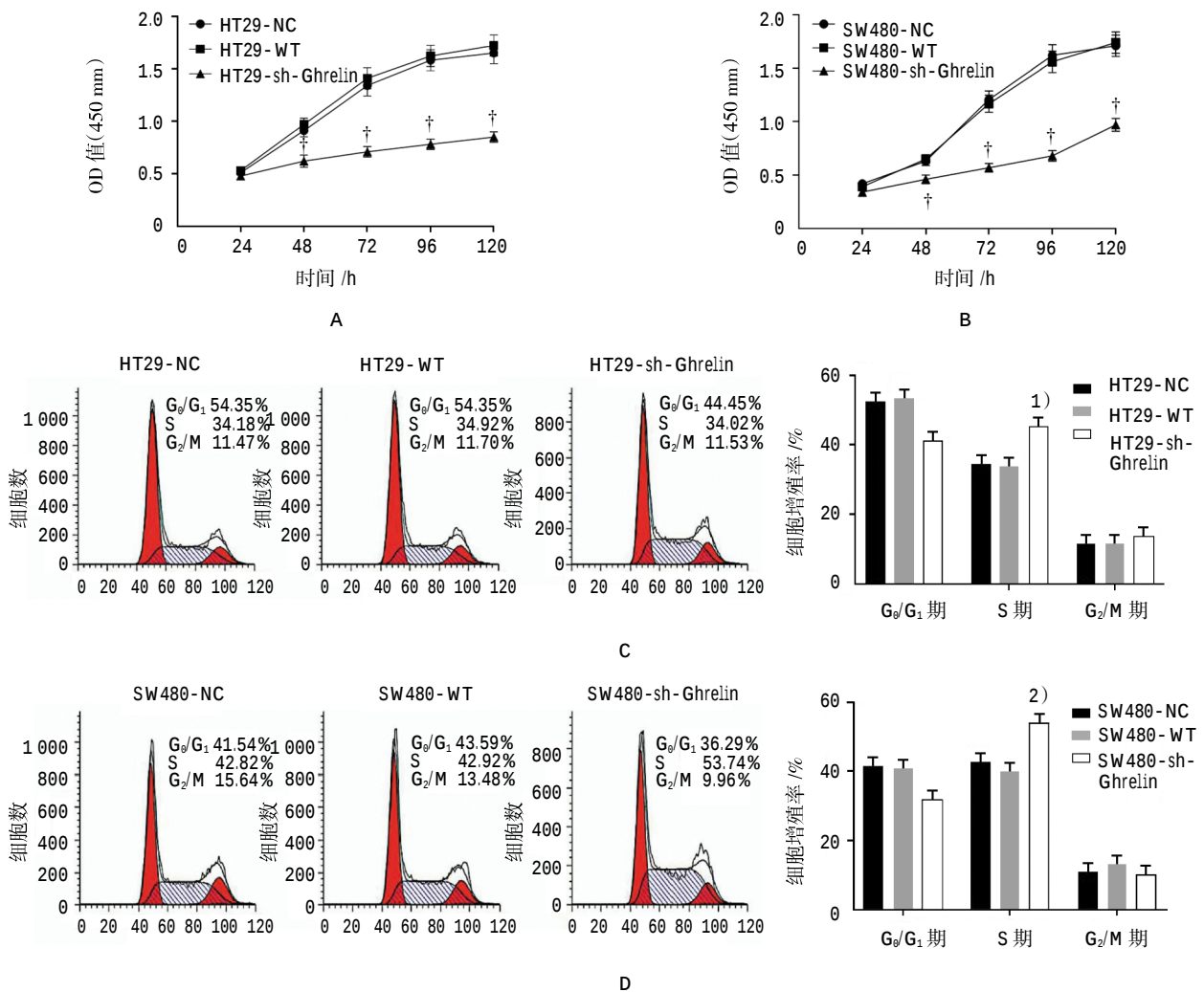
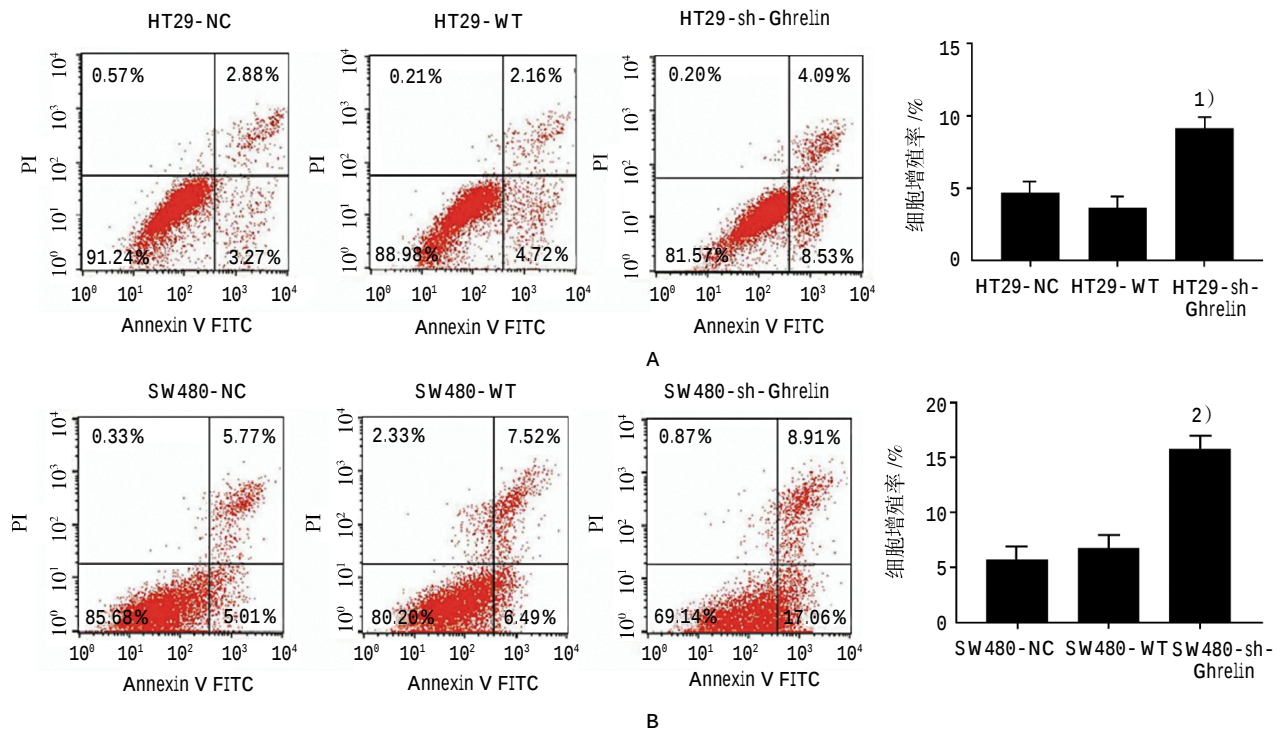


图 4 各组细胞周期和增殖
A: 干扰 Ghrelin 表达对 HT29 细胞增殖的影响; B: 干扰 Ghrelin 表达对 SW480 细胞增殖的影响; C: 干扰 Ghrelin 表达对 HT29 细胞周期的影响; D: 干扰 Ghrelin 表达对 SW480 细胞周期的影响。1) 与 HT29-NC 组或与 HT29-WT 组比较, $P<0.01$; 2) 与 SW480-NC 组或与 SW480-WT 组比较, $P<0.01$

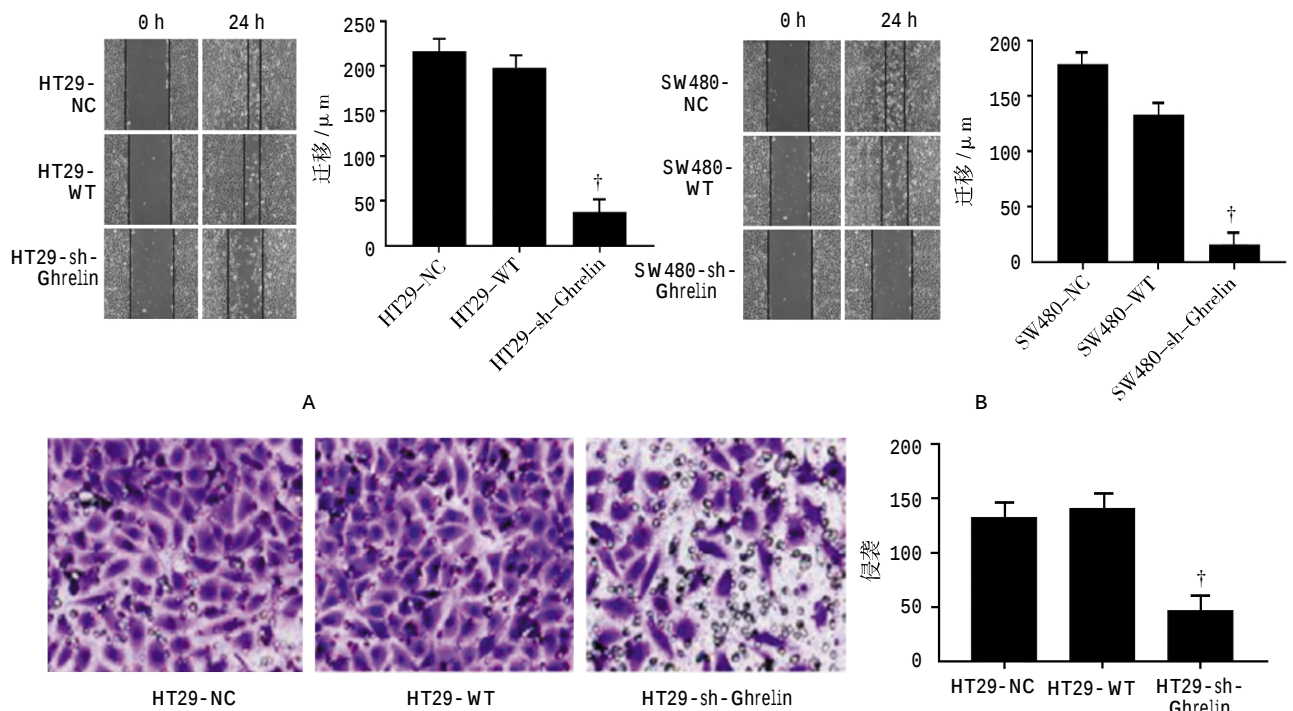


A: 干扰 Ghrelin 表达对 HT29 细胞凋亡的影响, B: 干扰 Ghrelin 表达对 SW480 细胞凋亡的影响。1) 与 HT29-NC 组或与 HT29-WT 组比较, $P < 0.01$; 2) 与 SW480-NC 组或与 SW480-WT 组比较, $P < 0.01$

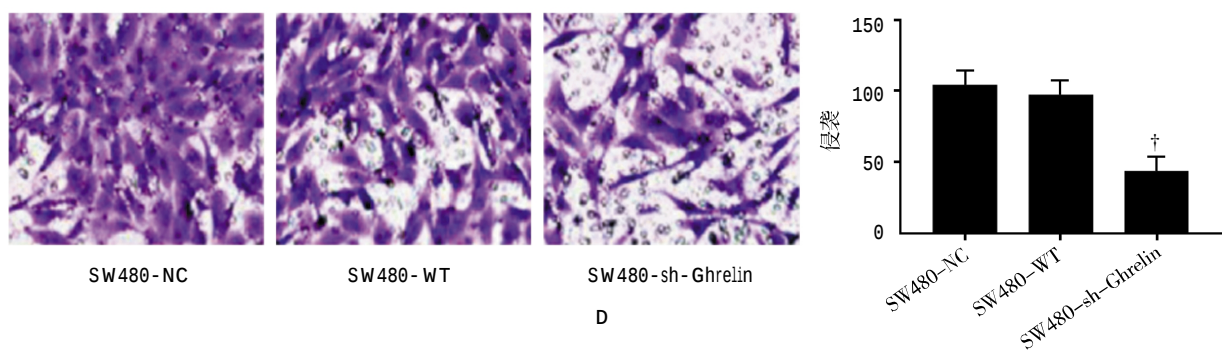
图 5 各组细胞凋亡的影响

异有统计学意义 ($F_{PI3K}=6.590, P_{PI3K}=0.000; F_{p-Akt}=7.321, P_{p-Akt}=0.000; F_{p-mTOR}=5.470, P_{p-mTOR}=0.011$), 在 HT29、SW480 细胞中, sh-Ghrelin 组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白相对表达量低于 NC 组和 WT 组 ($P < 0.05$), NC

组、WT 组间 PI3K、Akt、p-Akt、mTOR 及 p-mTOR 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 7。

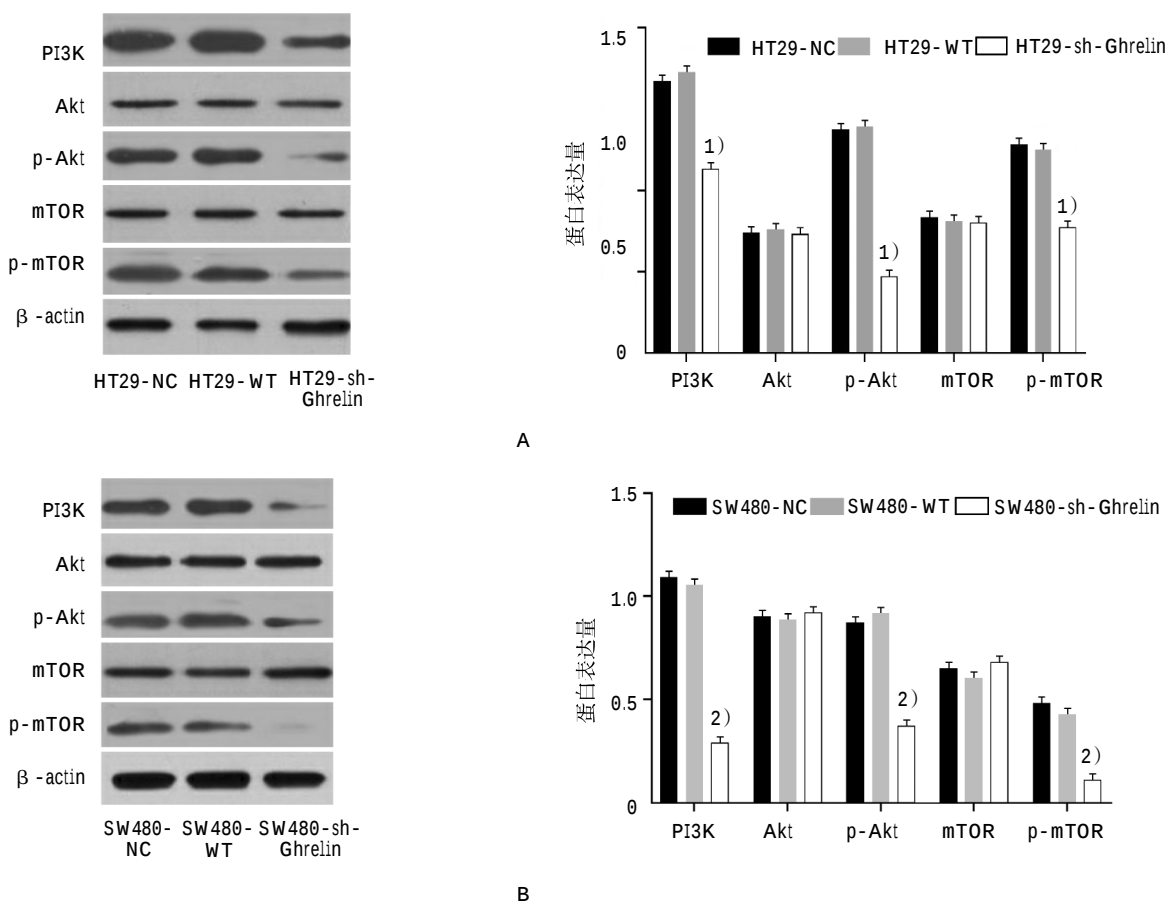


C



A: 划痕实验检测 HT29 细胞迁移能力; B: 划痕实验检测 SW480 细胞迁移能力; C: Transwell 小室实验检测 HT29 细胞侵袭能力; D: Transwell 小室实验检测 SW480 细胞侵袭能力。† 与 NC 组或与 WT 组比较, $P < 0.01$

图 6 各组细胞迁移、侵袭能力



A: HT29 细胞 PI3K、Akt、p-Akt、mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达; B: SW480 细胞 PI3K、Akt、p-Akt、mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达。1) 与 HT29-NC 组或与 HT29-WT 组比较, $P < 0.01$; 2) 与 SW480-NC 组或与 SW480-WT 组比较, $P < 0.01$

图 7 干扰 Ghrelin 表达对 PI3K-Akt-mTOR 信号通路相关蛋白的影响

3 讨论

胃饥饿素是由胃黏膜细胞分泌的一种活性多肽,已被证实与迷走神经的兴奋性有关。胃饥饿素与内源性受体结合,刺激下丘脑摄食中枢,使食欲增加和减少脂肪分解。有研究发现^[9],胃饥饿素能够维持葡萄糖稳态,在糖尿病及其并发症的治疗中展现

潜在的价值。近年来大量研究指出,胃饥饿素在肿瘤的发生、进展方面发挥一定作用。杜成雄^[9]报道,终末期、分化程度低的直肠癌患者血清胃饥饿素升高。TAKIGUCHI 等^[10]也证实,组织胃饥饿素表达水平与胃癌的浸润深度、分化类型及 TNM 分期密切相关。本研究显示,结肠癌组织 Ghrelin 高表达率高于

癌旁组织, Ghrelin 表达水平与结肠癌瘤体大小、TNM 分期及淋巴结转移有关, 提示胃饥饿素在结肠癌中可能起到类似癌基因的作用。TAKIGUCHI 等^[41]对行根治性远端胃切除术的胃癌患者进行随访观察, 结果发现胃饥饿素可以使患者胃排空延迟, 并导致术后化疗相关恶心呕吐; 血浆胃饥饿素水平越高, 患者 3 年生存率越低。本研究对结肠癌患者术后进行规律随访, 结果发现 Ghrelin 高表达组总生存期和无病生存率均低于 Ghrelin 低表达组, 提示胃饥饿素亦可以作为评价结肠癌预后生存的指标之一。

为进一步探讨 Ghrelin 对结肠癌生物学行为的影响及作用机制, 本研究采用 shRNA 技术干扰人结肠癌细胞 HT29 和 SW480 中 Ghrelin 的表达, 结果显示 HT29、SW480 细胞 Ghrelin mRNA 相对表达量高于 HIEC 细胞, 说明结肠癌细胞 Ghrelin 高表达, Ghrelin 可能是结肠细胞恶性病变的标志物。干扰 HT29、SW480 细胞 Ghrelin 表达, sh-Ghrelin 组细胞增殖能力低于阴性对照组(NC 组)和野生组(WT 组), 说明敲除 Ghrelin 基因能够抑制结肠癌细胞的增殖能力。李振远等^[42]报道, Ghrelin 参与维持核糖体的正常功能, 并促进 DNA 的复制和相关蛋白的合成, 这也是肿瘤发生、发展的重要过程。抑制 Ghrelin 的表达, 肿瘤细胞正常功能蛋白合成受阻, 增殖功能也受到影响。细胞的增殖与分裂周期密切相关, 本研究进一步发现抑制 Ghrelin 表达能够引起细胞分裂阻滞 S 期, 从而抑制结肠癌细胞的生长。有研究显示^[43], Ghrelin 能够促进细胞周期相关基因的表达和 Cyclins-CDKs 复合物功能, 使 DNA 合成加速并诱导瘤体生长。也有学者认为^[44], 特异性沉默 Ghrelin 基因, 能够序贯性降低下游 Cyclin D1 基因的表达, 导致调控细胞 S 周期转变“检查点”功能失调, 细胞被特异性阻滞 S 周期。限本研究的设计方案, 尚未深入探讨 Ghrelin 对细胞周期阻滞的具体机制。

细胞凋亡是真核生物最重要的生长调控机制, 也是影响细胞增殖速度的主要因素。细胞凋亡由一系列凋亡途径所介导, 细胞的凋亡增加, 必然引起细胞增殖能力减弱。国外研究显示^[45], 抑制 Ghrelin 能够下调凋亡抑制基因 Bcl-2 和 p53, 并激活凋亡因子 Caspase 家族成员(Caspase-3、Caspase-9), 导致细胞凋亡加速。本研究利用流式细胞术检测结肠癌细胞凋亡情况, 结果显示, 抑制 Ghrelin 可以提高结肠癌细胞早期凋亡比例。但需要注意的是, 对绝大多数结肠癌细胞, p53 在早期已经发生突变, 理论上无法参

与后续的凋亡信号途径, 因此 Ghrelin 所介导的促凋亡效应可能与其他机制有关。有研究报道称^[46], 胃癌细胞发生 EMT 时, TGF- β 能够促进 Ghrelin 表达, 而 Ghrelin 过表达又能反过来刺激 TGF- β 表达增加, 使细胞获得侵袭、迁移的能力。本研究也发现, HT29、SW480 细胞中, sh-Ghrelin 组侵袭细胞数、细胞迁移距离低于 NC 组和 WT 组, 说明抑制 Ghrelin 可以阻断结肠癌细胞侵袭、迁移等生物学行为。但是本研究尚无法证实侵袭、迁移的抑制是否与阻断 EMT 有关。

PI3K-Akt-mTOR 信号通路是调控肿瘤发生、发展的重要生物学信号转导通路^[17-18], 包括细胞周期调控、血管新生、基因的转录及翻译等。激活磷脂肌醇 3- 激酶可以诱导蛋白激酶 B(Akt)磷酸化, 活化的 Akt 又将信号传递至下游底物雷帕霉素靶体蛋白, 并控制诸如凋亡、转录及翻译等生物学效应。研究显示^[49], 丝苏氨酸激酶抑制剂能够抑制 PI3K-Akt-mTOR 通路, 阻断结肠癌细胞增殖和侵袭等行为。PARK 等^[20]也证实, PI3K-Akt-mTOR 信号通路激活程度可以作为结肠癌患者预后的重要指标。本研究显示, 结肠癌 HT29、SW480 细胞中, sh-Ghrelin 组 PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白相对表达量低于 NC 组和 WT 组, 说明抑制 Ghrelin 表达能够阻断 PI3K-Akt-mTOR 信号通路, 并抑制细胞的增殖和侵袭。上述研究结果也说明 Ghrelin 可能是通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路调控结肠癌细胞增殖和侵袭等生物学行为。

综上所述, 结肠癌组织 Ghrelin 表达上调, 并与结肠癌患者生存预后有关。干扰 Ghrelin 表达能够抑制结肠癌细胞增殖、侵袭, 其作用机制可能与抑制 PI3K-Akt-mTOR 信号通路有关。

参 考 文 献:

- [1] DAMANIA D, SUBRAMANIAN H, BACKMAN V, et al. Network signatures of nuclear and cytoplasmic density alterations in a model of pre and postmetastatic colorectal cancer[J]. J Biomed Opt, 2014, 19(1): 16016.
- [2] POTTER M B. Strategies and resources to address colorectal cancer screening rates and disparities in the United States and globally[J]. Annu Rev Public Health, 2013, 34(1): 413-429.
- [3] KASACKA I, ARCISZEWSKI M, ŁEBKOWSKI W. Extraordinary level of hormone and number of ghrelin cells in the stomach and duodenum of an obese woman[J]. Acta Histochem, 2014, 116(1): 230-234.

- [4] 高寅生, 侯亚勃, 杨晓军, 等. 胃饥饿素 / 肽 YY/ 刺鼠相关蛋白信号在胃旁路手术治疗 2 型糖尿病中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(5): 1247-1249.
- [5] EOM J, HONG M, CONE R D, et al. Zebrafish ghrelin is expressed in pancreatic endocrine cells and regulated by metabolic state[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439(1): 115-120.
- [6] NORTHRUP R, KURODA K, DUUS E M, et al. Effect of ghrelin and anamorelin (ONO-7643), a selective ghrelin receptor agonist, on tumor growth in a lung cancer mouse xenograft model[J]. *Support Care Cancer*, 2013, 21(9): 2409-2415.
- [7] 毕建成, 田伟, 王国文, 等. 结肠癌患者血清脂联素和胃饥饿素水平的临床分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(4): 291-293.
- [8] LIU B W, LU Q, MA C M, et al. The study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and ghrelin in adolescents with family history of type 2 diabetes[J]. *Endocrine*, 2012, 42(3): 599-605.
- [9] 杜成雄. 两种手术方式直肠癌术后应激反应期胃饥饿素的动态变化及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10): 1440-1443.
- [10] TAKIGUCHI S, TAKATA A, MURAKAMI K, et al. Clinical application of ghrelin administration for gastric cancer patients undergoing gastrectomy[J]. *Gastric Cancer*, 2014, 17(2): 200-205.
- [11] TAKIGUCHI S, HIURA Y, TAKAHASHI T, et al. Effect of rikkunshito, a Japanese herbal medicine, on gastrointestinal symptoms and ghrelin levels in gastric cancer patients after gastrectomy[J]. *Gastric Cancer*, 2013, 16(2): 167-174.
- [12] 李振远, 李方方, 张勇, 等. 胃饥饿素:生物学特征及对动物采食量的调控[J]. 动物营养学报, 2016, 28(1): 35-42.
- [13] WASEEM T, DUXBURY M, ASHLEY S W, et al. Ghrelin promotes intestinal epithelial cell proliferation through PI3K/Akt pathway and EGFR trans-activation both converging to ERK 1/2 phosphorylation[J]. *Peptides*, 2014, 52(50): 113-121.
- [14] LEE J H, PATEL K, TAE H J, et al. Ghrelin augments murine T-cell proliferation by activation of the phosphatidylinositol-3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling pathways[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(24): 4708-4719.
- [15] ZHU J, ZHENG C, CHEN J, et al. Ghrelin protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose-induced apoptosis via mTOR/P70S6K signaling pathway[J]. *Peptides*, 2014, 52(2): 23-28.
- [16] RODRÍGUEZ A, GÓMEZ-AMBROSI J, CATALÁN V, et al. The ghrelin O-Acyltransferase-Ghrelin system reduces TNF- α -induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(11): 3038-3050.
- [17] 郭琳, 王强. PI3K/Akt/mTOR 信号传导通路与恶性肿瘤浸润和转移的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(8): 1585-1589.
- [18] 周笑, 杨鹏, 于雁, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路与肿瘤[J]. 国际免疫学杂志, 2016, 39(3): 280-284.
- [19] ZHANG X, SHI H, TANG H, et al. MiR-218 inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(5): 1301-1308.
- [20] PARK J H, KIM J J, BAE Y S. Involvement of PI3K-Akt-mTOR pathway in protein kinase CKII inhibition-mediated senescence in human colon cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 433(4): 420-425.

(王荣兵 编辑)