

GABA及GABA_A受体激动剂对胰腺癌细胞增殖及MMP-2表达的影响

张利凡, 余胜利, 王 营, 费素娟

■背景资料

γ-氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统内的一种抑制性递质, 在人脑能量代谢过程中起重要作用。近年来研究发现, GABA作为神经递质参与了消化系统肿瘤的发生和转移过程, 国内有研究者利用流式细胞技术检测了GABA作用于胰腺癌SW1990细胞后细胞周期的变化, 发现其能促进SW1990细胞的生长, 但未能明确通过哪一受体介导。

张利凡, 湖北黄石四医院内科 湖北省黄石市 435006
余胜利, 王营, 费素娟, 江苏徐州医学院附属医院消化内科
江苏省徐州市 221000
通讯作者: 张利凡, 435006, 湖北黄石市, 湖北黄石四医院内科。
ysl71759379@126.com
电话: 0714-5433546
收稿日期: 2009-02-25 修回日期: 2009-05-30
接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-08

Effect of GABA and GABA_A receptor activator on the proliferation of pancreatic cancer cells and the expression of MMP-2 in cancer cells

Li-Fan Zhang, Sheng-Li Yu, Ying Wang, Su-Juan Fei

Li-Fan Zhang, the Forth Hospital of Huangshi, Huangshi 435006, Hubei Province, China
Sheng-Li Yu, Ying Wang, Su-Juan Fei, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Li-Fan Zhang, the Forth Hospital of Huangshi, Huangshi 435006, Hubei Province, China. ysl71759379@126.com
Received: 2009-02-25 Revised: 2009-05-30
Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-08

Abstract

AIM: To investigate the influence of γ-aminobutyric acid (GABA) and GABA_A receptor activator on proliferation of pancreatic cancer cells and the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in cancer cells.

METHODS: The effect of GABA, THIP on proliferation of pancreatic cancer cell line SW-1990 was investigated using MTT assay, and the effect of different concentrations of GABA (80, 160, 320 μmol/L) and GABA (80 μmol/L) + THIP (20, 40, 80 μmol/L) receptor activator on the expression of MMP-2 in cancer cells was explored. The expression of MMP-2 protein was determined using Real-time quantitative PCR.

RESULTS: GABA and THIP promoted the proliferation of SW-1990 cell and showed a dose-dependent manner. Compared with the control

group, cells were promoted by GABA and THIP significantly ($P < 0.01$ or 0.05). Compared with the control group, the expression of MMP-2 in SW-1990 cell was promoted by GABA, THIP significantly (60.15 ± 4.16 , 66.28 ± 4.27 , 71.23 ± 4.30 vs 26.04 ± 4.54 ; 75.01 ± 4.64 , 80.86 ± 4.67 , 86.35 ± 4.89 vs 26.04 ± 4.54 , $P < 0.01$ or 0.05), and the expression of MMP-2 mRNA was increased markedly (39.35 ± 3.24 , 52.46 ± 4.16 , 63.45 ± 5.12 vs 7.34 ± 2.75 ; 78.3 ± 5.39 , 84.27 ± 7.64 , 97.38 ± 6.64 vs 7.34 ± 2.75 , $P < 0.01$ or 0.05).

CONCLUSION: GABA could promote the proliferation of SW-1990 cell probably through GABA_A receptor, GABA can promote SW-1990 cell invasion through up-regulating expressions of MMP-2.

Key Words: γ-aminobutyric acid; Pancreatic cancer cell; Matrix metalloproteinase-2

Zhang LF, Yu SL, Wang Y, Fei SJ. Effect of GABA and GABA_A receptor activator on the proliferation of pancreatic cancer cells and the expression of MMP-2 in cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1982-1985

摘要

目的: 探讨γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)及其A受体激动剂THIP对胰腺癌SW1990细胞系增殖及表达基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的调控作用。

方法: MTT法检测SW1990细胞的生长; 免疫共聚焦技术观察不同浓度GABA(80、160、320 μmol/L)、GABA(80 μmol/L)+THIP(20、40、80 μmol/L)作用细胞后MMP-2表达强度; 通过荧光定量PCR(real-time PCR)检测MMP-2 mRNA的表达。

结果: GABA、THIP作用细胞后, 均能促进其生长, 且呈剂量依赖性, GABA组与对照组比差异显著($P < 0.01$ 或 0.05); 与对照组比较, GABA、THIP作用后细胞中MMP-2的表达明显增强(60.15 ± 4.16 , 66.28 ± 4.27 , 71.23 ± 4.30 vs 26.04 ± 4.54 ; 75.01 ± 4.64 , 80.86 ± 4.67 ,

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

86.35±4.89 vs 26.04±4.54, $P<0.01$ 或0.05), MMP-2 mRNA表达也明显增强(39.35±3.24, 52.46±4.16, 63.45±5.12 vs 7.34±2.75; 78.3±5.39, 84.27±7.64, 97.38±6.64 vs 7.34±2.75, $P<0.01$ 或0.05).

结论: GABA可能是通过A受体介导胰腺癌SW1990细胞增殖, 并通过促进MMP-2蛋白的表达来影响胰腺癌SW1990细胞的侵袭和转移.

关键词: γ -氨基丁酸; 胰腺癌细胞; 基质金属蛋白酶-2

张利凡, 余胜利, 王莹, 费素娟. GABA及GABA_A受体激动剂对胰腺癌细胞增殖及MMP-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1982-1985
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1982.asp>

0 引言

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统内的一种抑制性递质, 在人脑能量代谢过程中起重要作用. 近年来研究发现, GABA作为神经递质参与了消化系统肿瘤的发生和转移过程, 国内有研究者^[1]利用流式细胞技术检测了GABA作用于胰腺癌SW1990细胞后细胞周期的变化, 发现其能促进SW1990细胞的生长, 但未能明确通过哪一受体介导. Johnson *et al*^[2] RT-PCR法检测胰腺癌和正常组织, 发现癌组织GABA_A受体mRNA过度表达, 而正常组织没有. 研究表明, 胰腺癌细胞的侵袭转移是通过控制MMPs的分泌而实现的, 因MMP-2是胰腺癌细胞侵袭的关键酶, 本研究旨在探讨GABA及A受体激动剂THIP对胰腺癌SW1990细胞系增殖及其表达MMP-2的调控作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺癌SW1990细胞, 上海交通大学附属第一医院王兴鹏教授惠赠. GABA、THIP购自上海舒伯伟化工仪器有限责任公司. Sigma产品, 鼠抗人MMP-2单抗及FITC标记羊抗鼠单抗, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司. MMP-2引物和探针由中山大学达安基因中心设计合成, 激光共聚焦显微镜(奥林巴斯, 日本).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 胰腺癌SW1990细胞系, RPMI 1640培养基, 50 mL/L CO₂培养箱37℃培养.

1.2.2 GABA及A受体激动剂THIP对细胞生长影响的检测: 分为GABA组(80、160、320 μ mol/L)、

表 1 MMP-2引物和探针序列

引物和探针序列	
引物	正义 5'-GGCCCCACAGGAGGAGAA-3' 反义 5'-GGTGCTGGCTGAGTAGATCCA-3'
探针	5'-FAM-CTGTGTTCTTTCAGGGAATGAAT-TAMRA-3'

GABA(80 μ mol/L)+THIP组(20、40、80 μ mol/L)和对照组, 对照组为培养液, 其余各成分与实验组相同. 应用MTT法, 每孔10⁵个细胞接种, GABA、THIP终末浓度梯度分别为80、160、320 μ mol/L; 20、40、80 μ mol/L. 培养12、24、48 h后加入MTT液20 μ L/孔, 37℃培养4 h时终止反应, 置酶标仪上570 nm波长测定各孔的吸光度(A值). 实验重复3次.

1.2.3 免疫荧光共聚焦技术: 培养的SW1990细胞加入GABA、THIP处理48 h后终止培养, 固定液(丙酮: 甲醇 = 1: 1)室温固定15 min. 加入抗MMP-2, 4度过夜. PBS室温洗涤, 加入FITC标记抗鼠二抗, 于37℃孵育30 min; 而后碘化丙啶复染细胞核, 激光共聚焦扫描显微镜下双通道观察, 绿色通道波长488 nm, 红色通道波长568 nm. 每个视野扫描5个层面, 计算机重建图像取图, 并定量分析阳性信号荧光强度, 重复实验3次.

1.2.4 RNA提取和cDNA合成: 用Tiandz公司的RNAout提取细胞总RNA, 测RNA的 A_{260} 、 A_{280} 的吸光度值, $1.8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2.0$, 计算出RNA含量, 将提取的RNA样本按 20 μ L反应体系逆转录RNA, 反应条件为37℃ 1 h, 95℃ 3 min, 合成cDNA, 置 -20℃保存备用.

1.2.5 Real-time PCR: MMP-2引物和探针由中山大学达安基因中心设计合成(表1). 50 μ L反应体系中 5×定量Buffer 10 μ L, MMP-2上下游引物各 1 μ L, 荧光探针各1 μ L, Taq酶1.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, cDNA模板5 μ L和ddH₂O 30 μ L, 同时将定量模板稀释做标准曲线, 在Amp5700型实时检测扩增仪上进行扩增, 反应条件为: 93℃ 2 min, 93℃ 1 min, 55℃ 1 min, 共40个循环. 检测结果根据标准曲线由计算机软件计算后给出样本荧光定量反应的绝对定量值. 定量的单位是B = 拷贝数/ μ L cDNA.

统计学处理 所有数据用SPSS11.5软件进行t检验, $P<0.05$ 为有显著统计学意义.

2 结果

2.1 MTT结果 胰腺癌SW1990细胞培养48 h后,

■ 研发前沿

GABA及其受体与胰腺癌的研究才刚刚起步, 其具体的作用方式及机制还有待于进一步研究.

■相关报道

国外研究资料表明,人胃癌组织中GABA含量增高,GAD活性增强,且GABA可影响大鼠胃癌的生长,而国内研究结果显示GABA能促进胰腺癌细胞的增殖.尽管后者研究提示GABA与胰腺癌细胞的增殖有关,但未能进一步揭示其介导途径.

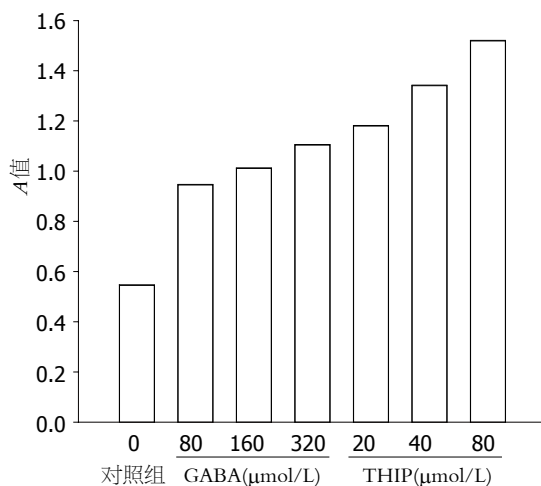


图1 GABA、THIP对SW1990细胞生长的影响.

表2 在SW细胞中GABA、THIP对MMP-2 mRNA表达强度的影响 (mean ± SD)

分组	MMP-2 mRNA
对照组	7.34 ± 2.75
GABA(μmol/L)	
80	39.35 ± 3.24 ^b
160	52.46 ± 4.16 ^b
320	63.45 ± 5.12 ^b
GABA(80 μmol/L)+THIP(μmol/L)	
20	78.37 ± 5.39 ^b
40	84.27 ± 7.64 ^b
80	97.38 ± 6.64 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

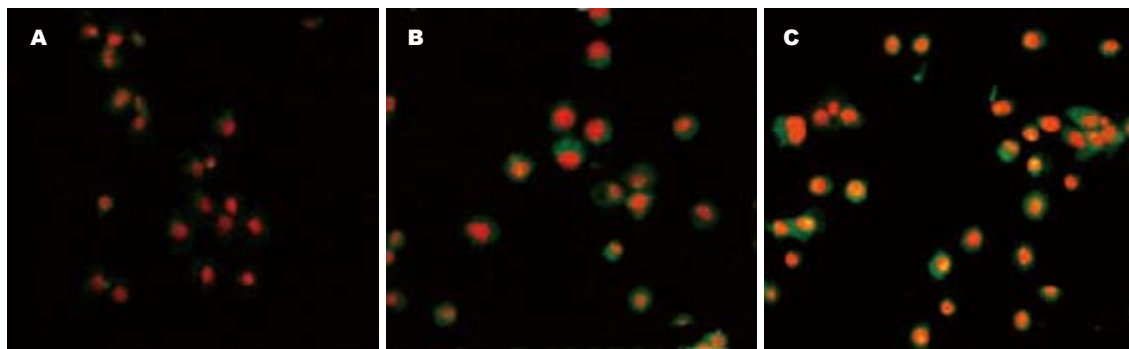


图2 MMP-2在SW1990细胞中的表达($\times 200$). A: 对照组; B: GABA(80 μmol/L); C: THIP(20 μmol/L).

GABA组A值从 0.947 ± 0.022 增加到 1.106 ± 0.024 ,与对照组比较差异显著($P < 0.01$); THIP组A值从 1.182 ± 0.031 增加到 1.521 ± 0.034 ,与GABA组相比差异显著($P < 0.05$,图1).

2.2 GABA、THIP对胰腺癌SW1990细胞MMP-2表达强度的影响 免疫荧光共聚焦结果显示:对照组SW1990细胞表达MMP-2水平为 26.04 ± 4.54 ; GABA处理后,其表达水平分别为 60.15 ± 4.16 、 66.28 ± 4.27 、 71.23 ± 4.30 ,与对照组比较差异显著($P < 0.01$); THIP处理后,其表达水平分别为 75.01 ± 4.64 、 80.86 ± 4.67 、 86.35 ± 4.89 ,与对照组、GABA组相比差异显著($P < 0.05$,图2).

2.3 GABA、THIP对胰腺癌SW1990细胞MMP-2 mRNA表达的影响 荧光定量PCR结果显示,SW细胞经GABA、THIP处理后,MMP-2表达强度明显增加,GABA组与对照组比较差异显著($P < 0.01$),且随着GABA浓度的增加,MMP-2 mRNA表达强度依次增加; THIP组与GABA组相比差异显著($P < 0.05$),也随着THIP浓度的增加,MMP-2 mRNA表达强度依次增加(表2).

3 讨论

Gilon *et al*^[3]首次报道了GABA与细胞分化之间的关系,他们的研究表明,在发育胚胎的胰腺和十二指肠快速生长及成熟后可检测到一个GABA高峰,这一结果与以往关于大脑发育的研究是一致的^[4].已有的研究发现,GABA在消化系统肿瘤的发病机制上起重要作用,且其作用存在组织差异性,国外研究资料表明,人胃癌组织中GABA含量增高,GAD活性增强^[5],且GABA可影响大鼠胃癌的生长^[6],而国内^[1]研究结果显示GABA能促进胰腺癌细胞的增殖.尽管后者研究提示GABA与胰腺癌细胞的增殖有关,但未能进一步揭示其介导途径;研究表明MMP-2分解基底膜的主要成分IV型胶原,是参与胰腺癌侵袭和转移的关键酶^[7].但对GABA与MMP-2的关系未作研究.

本研究表明,GABA能促进胰腺癌SW1990细胞的生长.随着浓度的提高,A值亦依次增加,加入GABA_A受体激动剂THIP后,与GABA组相比,A值增加更为显著,这一结果提示,GABA对胰腺癌SW1990细胞的促生长作用可能是通

过A受体介导的;同时,本研究发现,在胰腺癌SW1990细胞培养技术基础上,应用GABA、THIP处理细胞,通过免疫荧光共聚焦技术和荧光定量PCR检测,发现MMP-2表达强度和MMP-2 mRNA表达增加,呈现一定的浓度效应.初步表明了GABA在胰腺癌SW1990细胞中对MMP-2的表达起促进作用.

上述研究表明,GABA可能是通过A受体介导胰腺癌SW1990细胞增殖的,并通过促进MMP-2蛋白的表达,从而影响胰腺癌SW1990细胞的侵袭和转移.GABA及其受体与胰腺癌的研究才刚刚起步,其具体的作用方式及机制还有待于进一步研究.

4 参考文献

1 王莹,余胜利,刘军权,费素娟,陈剑群,许统俭,王人

- 灏,刘伟. GABA对胰腺癌细胞株SW1990生长的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2337-2339
- 2 Johnson SK, Haun RS. The gamma-aminobutyric acid A receptor pi subunit is overexpressed in pancreatic adenocarcinomas. *JOP* 2005; 6: 136-142
- 3 Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1995; 46: 423-462
- 4 Ong J, Kerr DI. GABA-receptors in peripheral tissues. *Life Sci* 1990; 46: 1489-1501
- 5 Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 2002; 213: 1-47
- 6 Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nakaizumi A, Ichii M, Taniguchi H. Inhibition by gamma-amino-n-butyric acid and baclofen of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res* 1990; 50: 4931-4934
- 7 王爱东,吕光成. 胃癌组织中MMP-9表达、微血管生成与胃癌侵袭和转移. *肿瘤* 2002; 22: 57-59

■同行评价

本文对GABA促进SW细胞增殖的途径进行了探讨,得出初步结论,具有一定的科学性.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-08)