维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)02－0148－05

生殖激素对卵巢癌细胞株 H0－8910 体外生长的调控

胡琢瑛，邓晓谷，姚珍薇

(重庆医科大学临床学院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨雌二醇(F_2)、孕酮(P)及卵泡刺激素(FSH)对人卵巢癌细胞株 H0－8910 细胞体外增殖及凋亡的调控作用。方法:选用人卵巢癌细胞株 H0－8910 进行体外培养,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖,流式细胞仪(FCM)测定细胞周期和凋亡率,透射电子显微镜进行形态学观察,终末脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)计数凋亡细胞,FCM 间接免疫荧光技术检测细胞内 bcl－2 蛋白的表达。结果:1×10^{-12}mol/L E_2 和 10ng/ml FSH 作用 48h 能显著促进癌细胞增殖,E_2 和 FSH 分别使 S 期和 G_2/M 期细胞比例增加。P 浓度为 $1\times10^{-7}\sim1\times10^{-5}$mol/L 时,作用 24、48、72h 均明显抑制 H0－8910 细胞的增殖,并具有剂量依赖性。P 作用后 G_0/G_1 期细胞增加,并伴随凋亡率升高,凋亡细胞计数明显多于对照组,电镜可观察到细胞凋亡的形态学改变;细胞内 bcl－2 蛋白检测显示,P 能降调 bcl－2 蛋白表达。结论:卵巢癌细胞株 H0－8910 的生长受到生殖激素的调控,低浓度 E_2 和高浓度 FSH 具有促癌细胞增殖作用,P 则对癌细胞的生长产生明显的抑制效应。P 的这种抗癌作用与诱导细胞凋亡有关,抗调亡某因 bcl－2 蛋白表达下降可能是诱发细胞凋亡的机理之一。

【关键词】卵巢肿瘤;雌激素;孕激素;促性腺激素;激素/治疗应用;凋亡

【中国图书分类法分类号】R737.31;R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－07－12

Study of the regulatory effects of reproductive hormones on growth of ovarian cancer cell line H0－8910 in vitro

HU Zhuoying, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the regulatory effects of estradiol(E_2), progesterone(P) and follicle－stimulating hormone(FSH) on proliferation and apoptosis in ovarian cancer cell line H0－8910 in vitro. *Methods*: Ovarian cancer cell line H0－8910 was cultured in vitro. Cell proliferation was measured by 3－(4,5－dimethylthiazol－z－yl)－2,5－dipheny tetrazolium blue(MTT) colorimetric assay. Cell cycle and apoptotic percentage were detected by flow cytometry; morphological changes of apoptotic cells were observed by electron microscopy, and apoptotic cells were quantitatively determined by terminal deoxynucleotidyl transferase－mediated dUTP nick end labeling(Tunel). In addition, expression of intracellular bcl－2 protein was analysed by flow cytometric indirect immunofluorescent technique. *Results*: After incubation with 1×10^{-12}mol/L E_2 or 10ng/ml FSH for 48 hours, cell proliferation increased significantly. E_2 and FSH increased the cells percentage in S phase and G_2/M phase of cell cycle respectively. Progesterone of $1\times10^{-7}\sim1\times10^{-5}$ mol/L inhibited H0－8910 cell growth significantly in a dose－dependent manner after 24, 48 and 72 hours. After treatment with progesterone, the enhanced G_0/G_1 arrest was accompanied with the enhanced apoptotic percentage, and apoptotic cells were found more than those in control group. By electron microscopy, there were many morphological characteristics of apoptosis. Analysis on expression of intracellular bcl－2 protein showed that progesterone could down－regulate bcl－2 protein. *Conclusion*: It is suggested that E_2 with low concentration and FSH with high concentration can stimulate the proliferation of epithelial ovarian cancer cell, while progesterone can inhibit cell growth and there is an accordant dose－response relationship. Its anticancer effect seems to be due to induction of apoptosis which may be a result of down－regulation of the anti－apoptotic protein bcl－2.

【Key words】Ovarian neoplasms; Estrogen; Pogesterone; Gonadotropin; Hermones, Therapeutic use; Apoptosis

卵巢癌是妇科肿瘤中死亡率最高的恶性肿瘤,近年来,众多学者对卵巢癌的内分泌因素进行了广

作者介绍:胡琢瑛(1972－),女,主治医师,硕士,主要研究方向:妇科肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

泛深入的研究,认为上皮性卵巢癌的发生发展同多种激素有关[1]。改变卵巢癌患者体内的内分泌环境,对抗激素对肿瘤的刺激作用有可能阻止肿瘤的发展;同时卵巢癌细胞具有激素的特异受体[2],从而使激素治疗肿瘤成为可能。本研究采用多种检测手段,观察雌激素、孕激素和促性腺激素对卵巢癌细胞株 HO-8910 体外生长的调控作用,并进一步探讨孕激素对细胞凋亡的影响,以期寻找治疗卵巢癌的有效辅助措施。

1 材料与方法

1.1 细胞株

卵巢癌细胞株 HO-8910 来源于人卵巢浆液性囊腺癌,由中国科学院上海细胞生物所提供。E_2、P、FSH 和 MTT 均为美国 Sigma 公司产品。细胞凋亡检测试剂盒 TUNEL 为德国宝灵曼公司产品。鼠抗人 bcl-2 单克隆抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中山生物技术公司。

1.2 MTT 法测定细胞增殖

取对数生长期 HO-8910 细胞胰酶消化[3],制成单细胞悬液,以每孔 6×10^3 个细胞加入 96 孔培养板中,置于 37℃、5%CO_2 培养箱中培养,第 2 天待大部分细胞贴壁后 4℃ 培养 1h,以促成细胞同步化生长[3];换培养液 200μl,实验组加入不同浓度的 E_2、P、FSH 各 20μl,E_2 组终浓度分别为 1×10^{-12}mol/L、1×10^{-10}mol/L、1×10^{-8}mol/L、1×10^{-6}mol/L,P 组终浓度分别为 1×10^{-8}mol/L、1×10^{-7}mol/L、1×10^{-6}mol/L、1×10^{-5}mol/L,FSH 组终浓度分别为 0.4ng/ml、1ng/ml、4ng/ml、10ng/ml,每一浓度均设 8 个平行孔,对照组加入 20μl 空白培养液(下同)。继续培养 24、48h 及 72h 后,每孔加入 20μl MTT 溶液(浓度为 5mg/ml),轻振培养板,放回培养箱内再孵育 4h 后,吸尽上清液,每孔中加二甲亚砜 200μl,振荡器上振荡 5~10min,用酶标光度计地波长为 570nm 时测定每孔的吸光度(A)值。每个实验均重复 3 次。

1.3 细胞周期和凋亡率的测定

将浓度为 3×10^4 个/ml 的 HO-8910 细胞 20ml 接种于培养瓶中,同步化处理后换培养液,实验组分别为 1×10^{-12}mol/L E_2,10ng/ml FSH 和 1×10^{-7}mol/L、1×10^{-6}mol/L、1×10^{-5}mol/L 的 P。E_2 和 FSH 组培养 48h、P 组培养 72h 后收集细胞,预冷 70%乙醇固定,碘化丙啶染色后置流式细胞仪分析。细胞凋亡率为(凋亡细胞数/总细胞数)×100%,共计数 500 个细胞。

1.4 细胞超微结构观察

将浓度为 3×10^4/ml 的细胞悬液 20ml 接种于培养瓶中,实验组分别加入 1×10^{-6}mol/L、1×10^{-5}mol/L 的 P,培养 72h 后收集细胞,固定、包埋、切片、染色,采用透射电子显微镜观察。

1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡

接种 3×10^4 个/ml 细胞于置盖玻片的 24 孔培养板,实验组 P 浓度为 1×10^{-6}mol/L、1×10^{-5}mol/L,各设 8 个平行孔。培养 72h 后,取出盖玻片,4%多聚甲醛固定,按 TUNEL 试剂盒说明进行操作,光学显微镜观察凋亡细胞。细胞核呈棕褐色着色者为阳性凋亡细胞,阴性者细胞核呈蓝色。每张盖玻片均计数 5 个低倍镜视野,每低倍视野中阳性细胞数少于 1/3 者为(+),1/3~2/3 者为(++),大于 2/3 者为(+++)。

1.6 细胞内 Bcl-2 蛋白表达的测定

接种 3×10^4/ml 细胞悬液 20ml 于培养瓶内,实验分为细胞对照组,P 浓度为 1×10^{-6}mol/L、1×10^{-5}mol/L 实验组,培养 72h,每组分别收集约 1×10^6 个 HO-8910 细胞,多聚甲醛室温固定 15min,加入接 1:50 稀释的鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体 20μl,4℃ 冰浴 1h。每组均设空白对照,即以磷酸盐缓冲液代替一抗。加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 20μl,4℃ 暗处孵育 30min,置 FCM 检测。

1.7 统计处理

采用 SAS 统计软件对计量资料进行方差分析,用 Student-Newman-Keuls(SNK)法进行两两比较。计数资料用 χ^2 检验及秩和检验。

2 结 果

2.1 E_2 和 FSH 对细胞生长的作用

MTT 比色法结果显示:24h 不同浓度 E_2 和对照组相比,A 值有不同程度升高,但均无统计学意义;1×10^{-12}mol/L E_2 作用 48h A 值较对照组明显升高,且与其它浓度 E_2 比较,差异也有显著性($P<0.05$);72h 各处理组和对照组无显著差异,见表 1。不同浓度 FSH 作用 24、48、72h 后 A 值均较对照组升高,但仅 10ng/ml FSH 作用 48h 差异有显著性,说明高浓度 FSH 作用明显(表 2)。

2.2 P 对卵巢癌细胞生长的抑制作用

P 浓度为 1×10^{-8}mol/L 时细胞生长受到轻度抑制,但与对照组比较,差异无显著性($P>0.05$)。当浓度为 1×10^{-7}~1×10^{-5}mol/L 时,对细胞生长有明显的抑制效应,与对照组比较,差异均有极显著性($P<0.01$)。在每一时间段,随着 P 浓度的增加,A 值呈现明显的下降趋势,显示剂量-效应依赖关系,结果见表 3。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同浓度 E_2 不同培养时间的 A 值($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(h)		
	24	48	72
对照组	0.214±0.016	0.438±0.034	0.678±0.046
实验组(mol/L)			
1×10^{-12}	0.233±0.024	0.585±0.027*	0.682±0.025
1×10^{-10}	0.240±0.037	0.468±0.042	0.690±0.023
1×10^{-8}	0.248±0.019	0.408±0.036	0.667±0.045
1×10^{-6}	0.216±0.032	0.398±0.023	0.670±0.042

注:* 与对照组比较,$P<0.05$

表 2 不同浓度 FSH 不同培养时间的 A 值($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(h)		
	24	48	72
对照组	0.225±0.045	0.381±0.088	0.689±0.061
实验组(ng/ml)			
0.4	0.265±0.055	0.407±0.124	0.689±0.063
1	0.234±0.048	0.405±0.046	0.735±0.042
4	0.269±0.041	0.439±0.064	0.725±0.025
10	0.259±0.037	0.579±0.044*	0.755±0.031

注:* 与对照组比较,$P<0.05$

表 3 不同浓度 P 不同培养时间的 A 值($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(h)		
	24	48	72
对照组	0.303±0.026	0.421±0.082	0.598±0.031
实验组(mol/L)			
1×10^{-8}	0.302±0.012	0.398±0.025△	0.570±0.016△△
1×10^{-7}	0.207±0.017**	0.258±0.037**△	0.343±0.039**△△
1×10^{-6}	0.204±0.057**	0.161±0.028**△	0.165±0.024**△△
1×10^{-5}	0.169±0.029**	0.060±0.133**△	0.075±0.013**△△

注:与对照组比较,* $P<0.05$ ** $P<0.01$;组内两两比较,△ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

表 4 不同浓度 P 的细胞周期分布和细胞凋亡率

组别	细胞周期分布(%)			细胞凋亡率
	G_0/G_1	S	G_2/M	(%)
对照组	61.86	25.78	12.36	
实验组(mol/L)				
1×10^{-7}	70.33**	22.16	7.51*	
1×10^{-6}	72.14**	16.84*	11.02	10.38
1×10^{-5}	83.45**△△	10.13**△	6.42**	35.78△△

注:与对照组比较,* $P<0.05$ ** $P<0.01$;组内两两比较,△ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

表 5 H0-8910 细胞的凋亡情况(低倍镜视野数)

结果	对照组	P 实验组(mol/L)	
		1×10^{-6}	1×10^{-5}
(-)	35	20	5
(+)	5	5	0
(++)	0	10	10
(+++)	0	5	25

2.3 细胞凋亡率和细胞周期分布情况

培养 48h 后对照组细胞周期分布为:G_0/G_1 占 66.08%,S 期 25.33%,G_2/M 期 8.59%。1×10^{-12} mol/L E_2 和 10ng/ml FSH 作用后,分别为 17.37%、68.52%、14.11% 和 33.68%、26.74%、39.58%,G_0/G_1 值比对照组明显减少。E_2 组细胞 S 相比例显著升高,FSH 则使 G_2/M 期细胞增多,分别是对照组的 2.7 和 4.6 倍。不同浓度 P 处理后的细胞周期变化和细胞凋亡率见表 4。对照组未发现细胞凋亡,P 浓度为 1×10^{-7}mol/L 时细胞也无凋亡产生,



图 1 P 处理后,细胞缩小,胞浆电子密度增高,染色质固缩呈新月状,可见质膜甩绕的核碎片,细胞即将分割形成凋亡小体 透射电镜×5000

但与对照组比较,G_0/G_1 期比例增加,S 期细胞减少。随着 P 浓度的增加可观察到细胞凋亡峰(亚二倍体峰)的出现,并伴随 G_0/G_1 期细胞明显增加。当 P 浓度为 1×10^{-6}、1×10^{-5}mol/L 时,细胞凋亡率分别为 10.38%、35.78%($P<0.01$),说明 P 对 H0-8910 细胞凋亡的诱导也呈剂量依赖趋势。

2.4 形态学变化

通过电镜对细胞超微结构观察发现,对照组极少见到凋亡细胞和凋亡小体。实验组可见较多凋亡细胞,表现为细胞体积变小,胞膜皱缩,胞浆密度增大、色变深,染色质致密固缩聚集于核膜呈境界分明

维普资讯 http://www.cqvip.com

的块状或新月形小体，核裂解，常有凋亡小体，见图1。

2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡情况

对照组阳性凋亡细胞数很少，实验组凋亡细胞阳性表达随 P 剂量增加而增多，均显著高于对照组（$P<0.05$），结果见表5。

2.6 Bcl-2 蛋白表达情况

对照组 bcl-2 蛋白表达率为 71.07%，P 浓度为 1×10^{-6}mol/L 时，bcl-2 蛋白表达率下降至 61.25%，与对照组比较，差异有显著性（$P<0.05$）。当 P 浓度增至 1×10^{-5}mol/L 时，bcl-2 蛋白表达率明显降低，为 9.40%，几乎阻断了 bcl-2 蛋白的表达，明显低于对照组以及 P 浓度为 1×10^{-6}mol/L 时（$P<0.01$）。

3 讨 论

雌激素是具有促细胞有丝分裂作用的甾体激素，在卵巢癌的发生发展中有一定的作用[4]。Waksmanski 等[5]发现卵巢良性和恶性肿瘤患者中血清雌二醇浓度明显高于对照组。Langdon 等[6]对雌激素受体（ER）阳性的 PEO4 细胞株的研究显示，1×10^{-12}至 1×10^{-6}mol/L E_2 可刺激生长，以 1×10^{-10}mol/L 作用最强，当浓度 $>1\times10^{-6}$mol/L 时则表现生长抑制现象。已证实，H0-8910 细胞含有 ER 和孕激素受体（PR），提示可能为性激素依赖细胞[7]。本研究结果表明，1×10^{-12}mol/L E_2 对 H0-8910 细胞生长有促进作用，以 48h 最为明显，其它浓度 E_2 对细胞生长影响不大，故认为 E_2 对卵巢癌细胞作用与剂量有关。最近研究认为，雌激素影响卵巢癌细胞增殖和分化的机理是通过受体作用于靶细胞，促使细胞分泌肽类生长因子经自分泌或旁分泌机制调节细胞增殖或抑制。有报道在低分化上皮性卵巢癌中，ER 高度表达同细胞增殖加强和凋亡活性降低呈正相关[8]。本实验对细胞周期的分析初步发现 1×10^{-12}mol/L E_2 作用 48h 后 S 期细胞占较大比例，提示细胞增殖活跃，可能卵巢癌细胞在 E_2 作用下产生细胞因子使细胞由 G_1 期向 S 期转化。

研究证实卵巢癌的发生发展与促性腺激素过多有关。FSH 能激活卵巢癌细胞有丝分裂，从而促进细胞生长[9]。本研究显示，0.4～10ng/mlFSH 对细胞生长有促进作用，但仅 10ng/ml 时具统计学意义，提示高浓度 FSH 促细胞增殖作用明显。同时从细胞时相变化上看出，FSH 能在一定程度上促使 G_2/M 期细胞比例增加，这同其他研究观察到的细胞分裂活动增强相一致。

本实验 E_2 和 FSH 的作用在早期并不明显，这可能是小牛血清中其它因子的拮抗作用所致；而后期（72h）两种激素对细胞生长无明显影响，则可能由于受本含量或结构发生了一些变化，使细胞对激素的敏感性降低。

有报道认为[10]，P 能抑制 PR 阳性的 PEO4 卵巢癌移植物生长，但对 PR 阴性的 HOX60 移植物无作用。血清孕激素浓度较高的卵巢癌患者，尤其是合并 PR 阳性者，其生存率明显优于孕激素浓度低者或 PR 阴性患者[8]。目前孕激素抗癌作用的机理尚不十分清楚，可能是通过与受体结合，激活的受体作为转录调节蛋白与 DNA 上激素反应元件结合，进而转录合成 mRNA，进入细胞浆合成各种特异蛋白质，从而使卵巢癌细胞生长受到抑制。本研究通过体外实验证实，P 能够明显抑制卵巢癌细胞株 H0-8910 细胞的生长，其抗增殖效应呈现剂量依赖性。由此可见，孕激素抑制 H0-8910 细胞的生长可能通过 PR 发挥作用。

本研究采用 FCM、TUNEL 法及形态学观察等多种细胞凋亡检测手段观察了孕激素在诱导 H0-8910 细胞凋亡方面的作用，以初步探讨其抗癌机现。结果发现，P 能够诱导 H0-8910 细胞发生凋亡，且随孕激素剂量升高，细胞凋亡作用增强；电镜下可见细胞凋亡的形态学特征。同时还观察到，P 改变了细胞周期时相的分布，使 G_0/G_1 期比例增多。最近，Yu 等[11]研究证实 P 能够诱导卵巢癌细胞 SNU-840 细胞凋亡从而抑制其生长。Rodriguez 等[12]报道，P 介导的凋亡指数回卵巢表面上皮转化生长因子（TGF-β）表达转换（由 β_1 转变成 β_2 或 β_3）密切相关。

细胞凋亡受到基因的调控。bcl-2 是一主要的抗凋亡基因，其编码产物 bcl-2 蛋白具有促进细胞存活，对抗细胞凋亡的作用。bcl-2 蛋白可在多种组织中表达，尤以肿瘤组织表达较强，广泛位于线粒体膜、内质网膜等细胞器膜上。Formby 等[13]对乳腺癌细胞的体外实验观察到，P_1 浓度为 10μmol/L 时作用 72h 后，48% 的乳腺癌细胞发生凋亡，同时

维普资讯 http://www.cqvip.com

bcl-2 mRNA 和蛋白表达率显著下降。本实验对 bcl-2 蛋白定量测定发现，孕激素能明显降低卵巢癌细胞 H0-8910 的 bcl-2 蛋白表达。bcl-2 蛋白的下降可能是孕激素诱发 H0-8910 细胞凋亡的机理之一，孕激素能够解除 bcl-2 基因对抗细胞凋亡的作用。

参 考 文 献

[1] Boente MP. Early ovarian cancer: a review of its genetic and biologic factors, detection and treatment [J]. Curr Probl Obstet Gynecol Fertil, 1997; 20: 37-66.

[2] Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture[J]. Cancer Res, 1988; 48: 246-253.

[3] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 第 1 版. 北京：北京出版社，1994；78-85.

[4] Blaakaer J. The pituitary-gonadal function in postmenopausal women with epithelial ovarian tumors[J]. APMIS, 1997; 105: 5-27.

[5] Waksmanski B, Dudkiewicz J, Kowalski T. Changes in insulin-like growth factor 1, 17-b-estradiol, and progesterone in postmenopausal women with benign and malignant ovarian tumours[J]. Med Sei Monit, 2001; 7: 919-923.

[6] Langdon SP, Ritchie A, Yong K, et al. Constrasting effects of 17β-estradiol on the growth of human ovarian carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 1993; 55: 459-464.

[7] 牟瀚舟，许沈华，张弈荫，等. 人卵巢癌细胞系 H0-8910 的建立及其生物学特性[J]. 中华妇产科杂志，1994；29：162-164.

[8] Lindgren P, Backstrom T, Mahlck CG, et al. Steriod receptors and hormones in relation to cell proliferation and apoptosis in poorly differentiated epithelial ovarian tumors[J]. Int J Oncol, 2001; 19: 31-38.

[9] Choi KC, Kang SK, Tai CJ, et al. Follicle-stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002; 87: 2245-2253.

[10] Langdon SP, Gabra H, Bartlett JM, et al. Functionality of the progesterone reecptor in ovarian cancer and its regulation by estrogen[J]. Clin Cancer Res, 1998; 4: 2245-2251.

[11] Yu S, Lee M, Shin S, et al. Apoptosis induced by progesterone in human ovarian cancer cell line SNU-840[J]. J Cell Biochem, 2001; 82: 445-451.

[12] Rodriguez GC, Nagarsheth NP, Lee KL, et al. Progestin induced apoptosis in the Macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta[J]. J Natl Cancer Inst, 2002; 94: 50-60.

[13] Formby B, Wilcy TS. Bcl-2, survivin and variant CD44 v7-v10 are downregulated and p53 is upregulated in breast cancer cells by progesterone: inhibition of cell growth and induction of apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 1999; 202: 53-61.

(上接第 133 页)Inhibited by a Direct surfactant protein A-Phospholipase A2 protein interaction[J]. J Clin Invest, 1998; 102(6): 1152-1160.

[9] Hidi R, Vial D, Havet N, et al. Inhibition by pulmonary surfactant Curosurf of secretory phospholipase A_2 express ion in guinea-pig alveolar macrophage [J]. Biochim pharmacol, 1997; 54 (9): 1055-1058.

[10] Wu Y, Singer M, Thouron F, et al. Effect of surfactant on pulmonary expression of typeIIA PLA(2) in an animal model of acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002; 282(4): L743-750.

[11] Cheng IW, Ware LB, Greene KE, et al. Prognostic value of surfactant proteins A and D in patients with acute lung injury [J]. Crit Care Med, 2003; 31(1): 311-313.

[12] Lewis JF, Brackenbury A. Role of exogenous surfactant in acute lung injury[J]. Crit Care Med, 2003; 31(4s): S324-328.