

生长激素促进体外培养的 Bel-7402 肝癌细胞增殖

刘建平, 陈 涛, 陈小萱, 区庆嘉
(中山大学附属第二医院普外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】了解重组人生长激素(rhGH)对体外培养的 Bel-7402 肝癌细胞增殖的影响。【方法】应用放射性配体法了解 GHR 在 Bel-7402 肝癌细胞株的表达情况;采用肿瘤细胞计数、噻唑蓝比色法和集落形成实验了解 Bel-7402 肝癌细胞株在不同浓度 rhGH(0、1、10、100、1 000、10 000 ng/mL)作用下的药物敏感性,计算细胞生长率,集落形成率;并用 $^3\text{H-TdR}$ 渗入法了解肿瘤细胞 DNA 代谢情况。【结果】放射配体法发现 Bel-7402 肝癌细胞表达 GHR, rhGH 对体外培养的 7402 肝癌细胞的生长具有一定程度的刺激作用,表现为 rhGH 在 100 ng/mL 的浓度时促进肝癌细胞的增殖较为显著,而 rhGH 在其它浓度时(1、10、1 000、10 000 ng/mL)的部分时段,对肝癌细胞的增殖虽也能表现出一定程度的促进作用,但总体效果较 rhGH 在 100 ng/mL 浓度时为弱。【结论】一定浓度范围的 rhGH 对 7402 肝癌细胞的增殖有促进作用,原因可能与 7402 肝癌细胞表达 GHR 有关。

关键词: 重组人生长激素;生长激素受体;原发性肝癌;细胞培养;放射配体分析法
中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2008)04-0418-05

RhGH Increase Proliferation of Human Hepatic Carcinoma Cell Line Bel-7402 in Vitro

LIU Jian-ping, CHEN Tao, CHEN Xiao-xuan, OU Qing-jia

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

Abstract: 【Objective】 To study the effect of rhGH with different concentrations on the growth of Bel-7402 human hepatic carcinoma cell lines in vitro. 【Methods】 Radioligand assay was used to detect the growth hormone receptor (GHR) expression of the hepatic carcinoma cell lines. Tumor cell count, thiazole blue chromatometry, and colony forming test were introduced to determine the sensibility of Bel-7402 to the different concentrations of rhGH (0, 1, 10, 100, 1 000, and 10 000 ng/mL). Growth rate of tumor cells was calculated. Metabolism of DNA of tumor cells was determined by the method of mixture of $^3\text{H-TdR}$. 【Results】 Radioligand assays showed GHR in Bel-7402 hepatic carcinoma cell strain. The rhGH had certain effects of the growth of 7402 hepatic carcinoma cell line. It showed positive effect to accelerate the proliferation on the growth of the hepatic carcinoma cells when the concentration of rhGH reached 100 ng/mL ($P < 0.05$, compared with control group). Although other rhGH concentrations (1, 10, 1 000, and 10 000 ng/mL) also had positive effects, they were much weaker than that at 100 ng/mL 24 hours after rhGH injection. 【Conclusion】 Certain concentrations of rhGH stimulated the growth of Bel-7402 hepatic carcinoma cell line in vitro in varying extent. The reason might be concerned with GHR expressed by 7402 hepatic carcinoma cell line.

Key words: growth hormone; growth hormone receptor; hepatocellular carcinoma; radioreceptor assay; cell culture

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(4):418-422]

重组人生长激素 (recombine human growth hormone, rhGH) 在调节代谢、降低外科病人死亡率

方面疗效卓著^[1-3]。然而 rhGH 能否用于肿瘤患者, 目前存在较大争议^[4]。动物实验发现, 使用 GH 治

收稿日期: 2008-03-04

基金项目: 广东省科技计划项目(2006B36002019)

作者简介: 刘建平(1968-), 广东广州人, 医学博士, 副教授, 副主任医师, E-mail: liuzhunlong@126.com

疗具有潜在致癌性,超生理剂量 GH 能诱发各种恶性肿瘤^[5]。

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一,由于肝脏是体内生长激素受体 (growth hormone receptor, GHR) 存在最多的部位,为 GH 的主要靶器官^[6],因此在肝癌患者使用 rhGH,其安全性更为临床所关注。1990 年有学者于部分肝癌组织未检测到 GHR,而认为在肝癌组织该受体消失^[7],其后临床普遍认为生长激素可安全适用于肝癌病人;近期虽随着方法学的改进,国内外学者陆续发现肝癌组织可表达低水平的 GHR^[4,8],但对于肝癌的 GHR 是否存在功能、生长激素能否适用于肝癌患者远未达成共识^[5]。

GH 需要通过与其受体 GHR 结合方能发挥作用^[6],既往曾有学者发现生长激素对表达 GHR 的 HepG2 肝癌细胞株的生长有促进作用^[9],但由于 HepG2 肝癌细胞株的病理来源于欧美人的小儿肝母细胞瘤^[10],而我国的原发性肝癌则以肝细胞肝癌为主,其生物学特性与肝母细胞瘤存在较大差异。因此本研究的目的,旨在了解不同剂量 rhGH 对病理来源于我国肝细胞肝癌的 Bel-7402 肝癌细胞株(可表达 GHR)增殖的影响,对 rhGH 在肝癌外科的适用性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 细胞株与实验材料

人 Bel-7402 肝癌细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所,中山大学药学院动物中心保种;¹²⁵I 标记的人生长激素 (¹²⁵I-hGH),美国杜邦公司产品;人生长激素标准品,中国科学院上海细胞生物研究所基因工程组惠赠;人催乳素,美国 Sigma 公司产品;RPMI 1640 培养液(美国 Hyclon 公司),胎牛血清(美国 GIBCO 公司),噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司)。重组人生长激素 rhGH(思真,瑞士 Serono 公司惠赠),³H-TdR(中国原子能科学研究所生产,1.85 × 10⁵ Bq/mL),放射记数仪:上海日环工司产品。

1.2 观察指标与检测方法

1.2.1 细胞培养 Bel-7402 肝癌细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清、青霉素及链霉素各 100 个单位每 mL 的 1640 培养液中,37 °C、体积分数为 5%

的 CO₂ 培养箱传代培养,实验设空白对照组、对照组和 rhGH 实验组,实验组加入 rhGH,对照组仅加 1640 培养液,取细胞进行实验,每次实验重复 3 次。

1.2.2 rhGH 作用下肝癌细胞生长曲线测定 将生长状态良好的细胞,以 2.0 × 10⁴ 个/mL 浓度接种于 24 孔培养板(每孔 1 mL),随机分为 6 组(一组对照和五组实验组),待细胞贴壁后分别于实验组中加入不同浓度的 rhGH,使其在培养液中的浓度分别为 1、10、100、1 000、10 000 ng/mL。在加药前每组各取 6 孔培养细胞经消化后计数作为细胞基数。加药以后连续培养 4 d,每天从各组中取 6 孔细胞进行计数(每孔培养细胞重复计数 3 次,取平均值),根据每组所得结果的平均值绘制不同浓度 rhGH 作用下肝癌细胞的生长曲线,计算各实验组肿瘤细胞的生长率:

生长率(%) = 实验组的细胞数 / 对照组的细胞数 × 100%

1.2.3 噻唑蓝(MTT)比色法 肿瘤细胞稀释为 2.0 × 10⁴ 个/mL,以每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板。每组设 8 个复孔,接种后 24 h 更换培养液,实验组加入含上述浓度 rhGH 的培养液。另设阴性对照和空白对照,阴性对照不加药,空白对照只加培养液无细胞。加药后分别于 24、48、72、96 h 加入 20 μL MTT,孵育 4 h 后吸出上清,加入 150 μL DMSO 振荡溶解 10 min,空白对照调零,用 Bio-TEK 酶联仪检测,波长 490 nm,测定各孔的吸光值。

1.2.4 克隆形成实验 制备单细胞悬液,将肿瘤细胞分散为 200 个/mL 接种于 6 孔培养板中,设实验组与对照组,每组 4 孔。各实验组分别加入上述不同浓度的 rhGH,连续培养 14 d,待细胞形成明显的集落后停止培养,洗掉培养液,Hank's 液洗两次,甲醛固定 30 min, Giemsa 液染色 30 min。显微镜下计算集落数:以 50 个细胞以上者为一个集落,计数每孔集落数,取 4 孔集落数的平均值,计算集落形成率:

集落形成率(%) = 平均集落数 / 种入的单个细胞数 × 100%

1.2.5 ³H-TdR 掺入 DNA 法 调节肝癌细胞浓度为 2.0 × 10⁴ /mL,接种于 24 孔细胞培养板中培养,24 h 后换以含上述浓度 rhGH 的体积分数为 10%的血清 RPMI 1640 培养液,测定 DNA 合成前 18 h,每孔加 ³H-TdR 1.85 × 10⁵ Bq/mL,胰蛋白酶和 EDTA 混合液消化,细胞全部悬浮后,用 DYQ-II

型多头收集器将空内细胞收集于 49 型纤维滤纸上,红外线烤干,置微杯中,加闪烁液,用 FJ2105 全自动液闪计数器计数。实验进行两次,每次实验中每份样品六个复孔。以每分钟计数(counts per minute, cpm)/孔代表 $^3\text{H-TdR}$ 掺入 DNA 的量。

1.2.6 细胞放射受体分析 对照组肝癌细胞接种于培养瓶中,待细胞长满瓶底约 75% 左右时,胰酶消化,制成新鲜肝癌细胞悬液。将肝癌细胞悬液用无血清 1640 液洗 3 次,磷酸缓冲液重悬,细胞人工计数。放射受体反应的总体积为 300 μL ,其中 $^{125}\text{I-hGH}$ 100 μL (约 200 000 cpm/mL),不同浓度的 hGH 100 μL (0 ~ 3 nmol/L)分为 7 ~ 9 个浓度梯度)、肝癌细胞悬液 100 μL (细胞密度 $> 3.0 \times 10^6/\text{mL}$),依此加入,振荡后 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。抽滤法去除游离配体,对沉淀物进行放射计数。实验设有复管。受体位点数(Site)和平衡解离常数(K_d)采用 Scatchard 法计算,每一数值重复测 3 次,结果用细胞数(10^6)校正。

1.3 统计方法

采用 SPSS12.0 统计处理软件,单因素方差分析(one way ANOVA)对资料进行统计学处理,计量资料采用 t 检验或 t' 检验,以 $P < 0.05$ 作为是否

有统计学差别的指标。

2 结 果

2.1 人 7402 肝癌细胞放射受体分析

人 7402 肝癌细胞的放射性配体分析数据经 Scatchard 转换后,Scatchard 图呈直线图形,提示检测到单一的 GH 特异性结合位点(即 GHR),肝癌细胞 GHR 位点数量(Site, $10^3/\text{cell}$)为 7.348 ± 0.891 ,平衡解离常数 K_d 为 $(0.630 \pm 0.046)\text{nmol/L}$ 。

2.2 各实验组和对照组在 rhGH 作用后 24、48、72 和 96 h 的肿瘤细胞计数

rhGH 与 7402 肝癌细胞接触 24 h 后,除 100 ng/mL 组平均细胞计数的差别有显著性外,余 4 组与对照组之间无差别,而当时间延长到 48 h,药物对肿瘤细胞生长的影响较为明显:10 ng/mL、100 ng/mL、1 000 ng/mL 与 10 000 ng/mL 组在 48h 的细胞计数均高于对照组相比($P < 0.05$),但在 72 h,只有 100 ng/mL 组与对照组相比有显著性($P < 0.05$),而在 96 h,100 ng/mL、1 000 ng/mL 与 10 000 ng/mL 组的细胞计数又明显高于对照组($P < 0.05$,表 1)。

表 1 不同浓度 rhGH 作用下各个时点 7402 肝癌细胞计数结果

Table 1 The cell count of 7402 hepatic carcinoma cells at various rhGH concentrations and various time ($\bar{x} \pm s$)

Drug concentrations (ng/mL)	n (well)	24 h	48 h	72 h	96 h
0 (control)	6	6.8 ± 0.3	14.4 ± 1.2	36 ± 5	45 ± 5
1	6	6.9 ± 0.7	15.9 ± 1.4	36 ± 5	47 ± 8
10	6	7.4 ± 0.6	$17.2 \pm 1.1^{1)}$	37 ± 4	49 ± 5
100	6	$8.3 \pm 0.8^{1)}$	$20.8 \pm 1.5^{1)}$	$46 \pm 7^{1)}$	$62 \pm 3^{1)}$
1 000	6	7.6 ± 0.5	$18.0 \pm 1.7^{1)}$	38 ± 6	$52 \pm 6^{1)}$
10 000	6	7.5 ± 0.6	$19.0 \pm 1.5^{1)}$	36 ± 3	$54 \pm 7^{1)}$

1): Compared to the control group at same phase, $P < 0.05$

2.3 rhGH 对肿瘤细胞 MTT 显色活性的影响

rhGH 与肝癌细胞接触 24 h 后,除 100 ng/mL 组与对照组相比有显著性外,余实验组与对照组之间无差别;而当接触时间延长,药物对肿瘤生长的影响也越明显,在 48、72 h,除 100 ng/mL 组外,1 000 ng/mL 与 10 000 ng/mL 组 MTT 值均高于对照组($P < 0.05$),在 96 h,100 ng/mL 组、100 ng/mL 组、1 000 ng/mL 的 MTT 值均高于对照组($P < 0.05$,表 2)。

2.4 rhGH 对 7402 肝癌细胞集落形成率的影响

rhGH 在 1 000 ng/mL、10 000 ng/mL 组集落形成率较对照组有所降低($P > 0.05$),但在 10 ng/mL、100 ng/mL 剂量组集落形成率较对照组明显升高($P < 0.05$,表 3)。

2.5 rhGH 对 7402 肝癌细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量的影响

各实验组 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量均较对照组有所增高,但只有 100 ng/mL 组与对照组相比有显著性($P < 0.05$,表 4)。

表2 7402 肝癌细胞株 MTT 显色活性(吸光度 A)的变化

Table 2 MTT coloration activities (absorption A) variation of 7402 hepatic carcinoma cell lines

($\bar{x} \pm s$)

Drug concentrations (ng/mL)	n (well)	24 h	48 h	72 h	96 h
0 (control)	6	0.364 ± 0.021	0.524 ± 0.045	0.91 ± 0.06	1.16 ± 0.07
1	6	0.380 ± 0.021	0.528 ± 0.057	0.96 ± 0.08	1.22 ± 0.09
10	6	0.401 ± 0.028	0.561 ± 0.023	0.96 ± 0.07	1.31 ± 0.07 ¹⁾
100	6	0.471 ± 0.047 ¹⁾	0.623 ± 0.039 ¹⁾	1.11 ± 0.12 ¹⁾	1.43 ± 0.12 ¹⁾
1 000	6	0.372 ± 0.019	0.585 ± 0.024 ¹⁾	1.00 ± 0.06 ¹⁾	1.30 ± 0.12 ¹⁾
10 000	6	0.382 ± 0.022	0.582 ± 0.022 ¹⁾	1.00 ± 0.04	1.25 ± 0.04

1): compared to the control group at same phase, $P < 0.05$

表3 rhGH 对人 7402 肝癌细胞集落形成的影响

Table 3 The effects of rhGH on the colony formation of

7402 hepatic carcinoma cells ($\bar{x} \pm s$)

Drug concentrations (ng/mL)	n	Inoculated cell populations	Amounts of colony formation	Rates of colony formation (%)
0 (control)	4	200	146 ± 12	72.9
1	4	200	143 ± 20	71.4
10	4	200	162 ± 6 ¹⁾	80.9
100	4	200	173 ± 11 ¹⁾	86
1 000	4	200	142 ± 5	70.9
10 000	4	200	135 ± 8	67.4

1): compared to the control group at same phase, $P < 0.05$ 表4 rhGH 对人 7402 肝癌细胞 ³H-TdR 掺入量的影响Table 4 The effects of rhGH on ³H-TdR incorporatedamounts of 7402 hepatic carcinoma cells ($\bar{x} \pm s$)

Drug concentrations (ng/mL)	n (well)	³ H-TdR incorporated amounts (cpm)
0 (control)	6	9 349 ± 1 049
1	6	9 421 ± 1 308
10	6	10 195 ± 1 183
100	6	12 411 ± 1 267 ¹⁾
1 000	6	10 100 ± 1 102
10 000	6	9 979 ± 1 251

1): compared to the control group at same phase, $P < 0.05$

3 讨论

细胞的体外培养药物试验是药物研究的基本方法之一。既往虽有学者对 rhGH 与肝癌细胞株的生长关系进行了一定的研究工作^[9,10],但其所用 HepG2 肝癌细胞株来源于年轻白种人肝母细胞瘤标本,特性接近于肝细胞(不能分泌 AFP,能分泌血浆蛋白:白蛋白、 α_2 -巨球蛋白等,在免疫抑制

小鼠中不致瘤,与人类正常肝实质细胞具有同源性)^[9];而本研究所用的 Bel-7402 肝癌细胞株来源于一例国内老年男性原发性肝细胞癌患者,具有 HCC 细胞的恶性特征,能分泌 AFP,异种动物移植可存活,生物学特性与临床肝癌细胞相似^[11]。因此,对于了解 rhGH 与肝癌细胞增殖的关系而言,本研究结果可能更具有代表性。

本研究采用了 rhGH 的 6 个等级浓度梯度来了解生长激素对体外培养的 7402 肝癌细胞生长的影响,其中 10 ng/mL 相当于正常人血 GH 的峰浓度^[12],100 ng/mL 相当于 4 ~ 10 U rhGH 皮下注射后肝硬化患者血 GH 的峰浓度(即临床药理浓度)^[13]。结果显示:与对照组相比,一定浓度下的 rhGH 对体外培养的 7402 肝癌细胞株的增殖具有不同程度促进作用,无论从细胞计数、MTT、³H-TdR 掺入量,还是从集落形成等指标来看,均表现为 rhGH 在 100 ng/mL 的浓度时促进肝癌细胞的增殖较为显著;而 rhGH 在其它浓度时(1、10、1 000、10 000 ng/mL)的细胞培养的部分时段,与对照组相比,对肝癌细胞的增殖也有一定程度的刺激作用(其中 1 000、10 000 ng/mL 组的作用又大于 1、10 ng/mL 组),但作用效果总体上仍较 rhGH 在 100 ng/mL 浓度时为弱,并且 rhGH 在高浓度组(1 000、10 000 ng/mL),随着培养时间延长,还表现为对肿瘤细胞集落形成起一定抑制作用。由于 rhGH 只有通过与其受体结合才能发挥作用,本研究发现了 7402 肝癌细胞在蛋白与 mRNA 水平均存在 GHR 的表达,因此 7402 肝癌细胞表达 GHR 应为本研究中 rhGH 促进 7402 肝癌细胞增殖的主要原因,这也说明 7402 肝癌细胞的 GHR 具有一定功能。

既往研究发现,生长激素可以诱导或抑制自身受体的表达^[14]。Barash 等^[15]报道采用无血清培

养的大鼠肝细胞证实人 hGH 可以诱导 GHR 的表达,且具有量效关系。当 hGH 浓度大于 10 ng/mL 时, hGH 可以诱导 GHR; hGH 浓度等于 250 ng/mL 时, 诱导率最高; hGH 浓度大于 1 000 ng/mL 时, hGH 对 GHR 有抑制作用。hGH 对 GHR 的诱导作用在加入 hGH 后 48 h 达到高峰, 96 h 后诱导作用减退。Nuoffer^[16]在探测不同浓度(浓度分别为 0、2、5、12.5、25、50 和 150 ng/mL) 的 20 Ku 与 22 Ku hGH 对刺激肝癌细胞株 HuH7 GHR 和 GHBp 的表达规律时, 发现生理浓度(包括了 2、5、12.5、25、50 ng/mL) 的 20 Ku 与 22 Ku hGH 能引起剂量依赖性的 HuH7 GHR/GHBp 的 mRNA 上调, 而超生理剂量(150 ng/mL) 的 20 Ku hGH 则会引起 HuH7 GHR 与 GHBp mRNA 的下调。在本研究中, 不同浓度的 rhGH 促进 7402 肝癌细胞增殖效应不同, 可能与生理及临床药理浓度(10 与 1 000 ng/mL 的 rhGH 诱导 7402 肝癌细胞 GHR 的表达, 而在高浓度(例如大于 1 000 ng/mL) 的 rhGH 作用下, rhGH 可抑制肝癌细胞 GHR 的表达有关。

参考文献:

- [1] Graham MR, Davies B, Kicman A, et al. Recombinant human growth hormone in abstinent androgenic-anabolic steroid use: psychological, endocrine and trophic factor effects[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2007, 4(1): 9-18.
- [2] Cao J, Luo SM, Liang L, et al. Effects of parenteral nutrition without and with growth hormone on growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis after hepatectomy in hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2007, 31(6): 496-501.
- [3] 赖佳明, 梁力建, 彭宝岗, 等. 重组人生长激素联合化疗对人肝癌原位移植瘤作用实验[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(4): 315-318.
- [4] 刘建平, 褚忠华, 陈涛, 等. 原发性肝癌及其癌旁组织、Bel-7402 肝癌细胞株生长激素受体的定量研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(11): 1319-1321.
- [5] 孙振纲, 陈孝平. 生长激素的研究现状及其对恶性肿瘤的影响[J]. *长江大学学报: 自然科学版*, 2006, 3(1): 310-312.
- [6] Shen XY, Holt RI, Miell JP, et al. Cirrhotic liver expresses low levels of the full-length and truncated growth hormone receptors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(7): 2532-2538.
- [7] Change TC, Lin JJ, Yu SC, et al. Absence of growth hormone receptor in hepatocellular carcinoma and cirrhotic liver[J]. *Hepatology*, 1990, 11(1): 123-126.
- [8] 向春华, 严律南, 林琦远, 等. 生长激素受体在人肝癌组织中的表达[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2002, 9(4): 255-257.
- [9] 王志明, 周乐杜, 陈欲晓, 等. 基因重组人生长激素对人肝癌细胞系生长的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(3): 214-215.
- [10] Amit T, Hacham H, Daily O, et al. The HepG2 cell line in the study of growth hormone receptor/binding protein [J]. *Mol Cell Endocrinology*, 1994, 101(1-2): 29-35.
- [11] 刘建平, 陈涛, 褚忠华, 等. 生长激素受体在 Bel-7402 与 QGY-7701 人肝癌细胞株中的表达[J]. *岭南现代临床外科杂志*, 2005, 5(2): 153-155.
- [12] 杨钢, 万瑜. 垂体前叶激素分泌的节律性[M]. 天津: 天津科技出版社, 1996: 115.
- [13] Baruch Y, Assy N, Amit T, et al. Spontaneous pulsatility and pharmacokinetics of growth hormone in liver cirrhotic patients [J]. *J Hepatol*, 1998, 29(4): 559-564.
- [14] Bennett WL, Ji S, Messina JL. Insulin regulation of growth hormone receptor gene expression. Evidence for a transcriptional mechanism of down-regulation in rat hepatoma cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 274(2): 53-59.
- [15] Barash I, Posner BI. Homologous induction of growth hormone receptors in cultured rat hepatocytes [J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 1989, 62(2): 281-286.
- [16] Nuoffer JM, Fluck C, Deladoey J, et al. Regulation of human GH receptor gene transcription by 20 and 22 KDa GH in a human hepatoma cell line [J]. *J Endocrinol*, 2000, 165(2): 313-320.

(编辑 王晓鹰)