

# 雌激素孕激素及促性腺激素对卵巢癌细胞株 H0-8910 体外生长的调控

陈红<sup>1</sup>, 胡琢英<sup>2</sup>, 邓晓谷<sup>2</sup>

(1. 深圳宝安区人民医院妇产科 广东 深圳 518101; 2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科, 四川 重庆 400016)

**摘要:** 【目的】探讨雌激素(E<sub>2</sub>)、孕激素(P)及促性腺激素(FSH)对卵巢癌细胞株体外生长的调控。【方法】采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法比较细胞数目,用流式细胞仪检测细胞周期。【结果】10<sup>-12</sup> mol/L E<sub>2</sub> 和 10 μg/L FSH 作用 48 h 能显著促进卵巢癌细胞株 H0-8910 细胞增殖, E<sub>2</sub> 和 FSH 分别使 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例增加。P 能抑制卵巢癌细胞株 H0-8910 细胞生长, 且对细胞生长的抑制作用对剂量有依赖性。【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<sub>2</sub> 和高浓度 FSH 具有促癌细胞增殖作用, 孕激素则对癌细胞的生长产生明显的抑制效应。

**关键词:** 卵巢肿瘤/药物治疗; 雌激素/药理学; 孕激素/药理学; 促性腺激素/药理学; 激素/治疗应用

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)01-0029-04

## Study of the Regulatory Effects of Estrogen Progesterone and Gonadotropins on Growth of Ovarian Cancer Cell Line H0-8910 *in Vitro*

CHEN Hong<sup>1</sup>, HU Zuo-ying<sup>2</sup>, DENG Xiao-gu<sup>2</sup>

(1. Baoan District People's Hospital, Shenzhen 518101, China;

2. The First Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** 【Objective】The study was carried out to investigate the effects of estradiol(E<sub>2</sub>), follicle-stimulating hormone(FSH) and progesterone(P) on the proliferation of ovarian cancer cell line H0-8910 *in vitro*. 【Method】Cultivating human ovarian serous cystadenocarcinoma cell line H0-8910 *in vitro*, comparing cell numbers using MTT method, flow cytometry detecting cell cycle. 【Results】After incubation with 10<sup>-12</sup> mol/L E<sub>2</sub> or 10 μg/L FSH for 48 hours, cell proliferation increased significantly. E<sub>2</sub> and FSH increased the cells percentage in S phase and G<sub>2</sub>/M phase of cell cycle respectively P could inhibit H0-8910 cells growth significantly in a dose-dependent manner. 【Conclusion】It is suggested that E<sub>2</sub> and FSH can stimulate the proliferation of ovarian cancer cell, P can inhibit cell growth.

**Key words:** ovarian neoplasm/drug therapy; estrogen/pharmacology; progesterone/pharmacology; gonadotropins/pharmacology; hormones/therapeutic use

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发生机理进行了研究和探讨,认为卵巢癌是激素依赖性肿瘤<sup>[1]</sup>。卵巢表面上皮可以对类固醇激素及促性腺激素产生反应,正常卵巢及大部分卵巢肿瘤组织中含有雌激素受

体(ER)和孕激素受体(PR),说明激素对卵巢癌的发生发展有重要作用。本实验选用人卵巢浆液性囊腺癌细胞株 H0-8910 进行体外培养,观察不同浓度的雌激素、孕激素及促性腺激素对卵巢癌细胞株 H0-8910 细胞增殖的影响,以了解激素对卵巢癌细

收稿日期: 2000-06-15

作者简介: 陈红(1966-),女,广东汕头人,中山医科大学 90 届毕业校友,学士,主治医师,现在深圳宝安区人民医院妇产科工作(518101); 1998 年就读重庆医科大学在职研究生,导师邓晓谷。

胞的生长调控作用,有助于进一步探讨卵巢癌激素治疗的机理,对卵巢癌的治疗及预后均具有重要的临床意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株

卵巢癌细胞株 H0-8910 来源于人卵巢浆液性囊腺癌,已证实含有 ER 和 PR<sup>[6]</sup>,由上海细胞生物所提供。

### 1.2 主要试剂

雌二醇、孕酮、卵泡刺激素及 PI 染液(碘化丙啶)均由美国 Sigma 公司提供。RPMI-1640 完全培养基(按说明用三蒸水配制,临用前按 10%浓度加灭活的新生小牛血清)。MTT[3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑](购自北方同正公司);二甲基亚砜(购自重庆试剂公司)。

### 1.3 方 法

1.3.1 细胞培养 H0-8910 细胞按常规方法培养在含 10%新生小牛血清(FCS)RPMI 1640 完全培养基中,培养条件为:37℃,5%CO<sub>2</sub>,相对湿度 90%。

1.3.2 四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法测定细胞增殖 对数生长期细胞用胰酶消化后,以  $6 \times 10^3$  个/孔细胞数加入 96 孔培养板,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,第 2 天待大部分细胞贴壁后置入 4℃恒温箱 1 h,以促成细胞同步化生长。吸去上清液,加入含 10%新生小牛血清(FCS)RPMI 1640 培养液,200 uL/孔,按实验设计分组。具体如下:细胞对照组, E<sub>2</sub> 组终浓度分别为  $10^{-12}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-8}$  和  $10^{-6}$  mol/L, FSH 组终浓度分别为 0.4、1.4、10 μg/L, P 组终浓度分别为  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L,每一浓度均设 8 个平行孔。继续培养 24、48、72 h 后,各孔分别加入 20 uL MTT 溶液(浓度为 5 g/

L),轻轻震荡培养板,放回培养箱内再孵育 4 h,然后吸尽上清液,于各孔中加二甲亚砜 200 uL,置震荡器上震荡 5~10 min,用酶标光度计测出每孔中波长为 580 nm 的吸光值(A=580),A=580 值与活细胞数量成正比。

1.3.3 细胞周期分析分组培养 对照组、 $10^{-12}$  mol/L E<sub>2</sub> 组、10 μg/L FSH 组、 $10^{-7}$  mol/L P 组,按  $3 \times 10^4$ /mL 细胞浓度接种,同步化后换培养基并加处理因素,在培养瓶中分别培养 48、72 h 后去培养液,胰酶消化,收集细胞,用冰生理盐水重悬后缓慢加入 70%乙醇 3 mL,4℃保存。取细胞悬液,PBS 洗涤 2 次,去乙醇,加 PI 染液 1.0 mL 4℃放置 30 min,离心去剩余 PI 液,上流式细胞仪测定细胞时相分布。以正常人淋巴细胞调整细胞参数使其荧光通道在合理位置,然后调整上机液细胞数,光源为  $\lambda=488$  nm 氩离子激光,PI 受激发后发出红色荧光,以  $\lambda=599$  nm 波长通滤片用于荧光信号检测,数据输入 Macintosh 650 计算机分析,并 Modfit 1.0 软件判断。

### 1.4 统计处理

采用 SAS 统计软件对计量资料进行方差分析,用 SNK 法(Student-Newman-Keul)进行两两比较。

## 2 结 果

### 2.1 不同激素对细胞增殖的影响

2.1.1 雌二醇和卵泡刺激素对细胞生长的作用 用 MTT 比色法结果显示:24 h 不同浓度 E<sub>2</sub> 处理组和对照组相比,A 值有不同程度升高,但均无统计学意义;48 h  $10^{-12}$  mol/L E<sub>2</sub> 组 A 值较对照组明显升高,且与其他浓度 E<sub>2</sub> 相比较,差异也有显著性( $P < 0.05$ ),72 h 各处理组和对照组无显著差异,见表 1。

表 1 不同浓度 E<sub>2</sub> 作用不同时间后的吸光值 A

Table 1 The absorbency in different time after dealing with varies concentration of E<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s$ , mol/L)

t/h	Control	E <sub>2</sub>			
		$10^{-12}$	$10^{-10}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$
24	0.214±0.016	0.233±0.024	0.240±0.037	0.248±0.019	0.216±0.032
48	0.438±0.034	0.585±0.027 <sup>1)</sup>	0.468±0.042	0.408±0.036	0.398±0.023
72	0.678±0.046	0.682±0.025	0.690±0.023	0.667±0.045	0.670±0.042

1) Compared with group control  $P < 0.05$

不同浓度 FSH 作用 24、48、72 h 后 A 值均较对照组升高, 但仅  $10 \mu\text{g/L}$  FSH 作用 48 h 差异有显著性, 说明高浓度 FSH 作用明显, 见表 2。

2.1.2 孕激素对卵巢癌细胞生长的抑制作用 培养体系中加入不同浓度的 P 后 24 h 即出现细胞生长抑制现象, 与对照组比较差异有极显著意义 ( $P < 0.01$ ); 且具剂量-效应依赖关系, 见表 3。

## 2.2 细胞周期变化

表 2 不同浓度 FSH 作用不同时间后的吸光值 A

Table 2 The absorbency in different time after dealing with varies concentration of FSH ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{g/L}$ )

t / h	Control	FSH			
		0.4	1	4	10
24	0.225 ± 0.045	0.265 ± 0.055	0.234 ± 0.048	0.269 ± 0.041	0.259 ± 0.037
48	0.381 ± 0.088	0.407 ± 0.124	0.405 ± 0.046	0.439 ± 0.064	0.579 ± 0.044 <sup>1)</sup>
72	0.689 ± 0.061	0.689 ± 0.063	0.735 ± 0.042	0.725 ± 0.025	0.755 ± 0.031

Note: 1) Compared with group control  $P < 0.05$

表 3 不同浓度 P 作用不同时间后的吸光值 A

Table 3 The absorbency in different time after dealing with varies concentration of P ( $\bar{x} \pm s$ , mol/L)

t / h	Control	P		
		$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$
24	0.303 ± 0.026	0.207 ± 0.017 <sup>2)</sup>	0.204 ± 0.057 <sup>2)</sup>	0.169 ± 0.029 <sup>2)</sup>
48	0.421 ± 0.082	0.258 ± 0.037 <sup>1)</sup>	0.161 ± 0.028 <sup>2)</sup>	0.133 ± 0.060 <sup>2)</sup>
72	0.598 ± 0.031	0.343 ± 0.039 <sup>2)</sup>	0.165 ± 0.024 <sup>2)</sup>	0.075 ± 0.013 <sup>2)</sup>

Compared with group control: 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$

表 4 不同激素对 H0-8910 细胞时相分布的影响

Table 4 The affection of cell cyclic distribution after dealing with different hormone (%)

t / h	Cell cycle	Control	E <sub>2</sub>	FSH	P
48	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	66.08	17.37	33.68	66.46
	S	25.33	68.52	26.74	24.75
	G <sub>2</sub> /M	8.59	14.11	39.58	8.79
72	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	61.86	55.61	46.67	70.33
	S	25.78	35.26	26.01	22.16
	G <sub>2</sub> /M	12.36	9.13	27.32	7.51

## 3 讨论

### 3.1 雌激素促性腺激素对卵巢癌细胞的增殖作用

性激素在某些妇科肿瘤的发生上有重要作用已较肯定, Langdon 等<sup>[2]</sup>在对 ER 阳性 PE04 细胞株的研究显示,  $10^{-12}$  mol/L 至  $10^{-6}$  mol/L E<sub>2</sub> 可刺激生长, 以  $10^{-10}$  mol/L 作用最强, 当浓度  $> 10^{-6}$

表 4 可见,  $10^{-12}$  mol/L E<sub>2</sub> 和  $10 \mu\text{g/L}$  FSH 作用后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 值比对照组明显减少。E<sub>2</sub> 组细胞 S 相比比例显著升高, 作用 48 h 和 72 h 分别是对照组的 2.7 倍和 1.4 倍。FSH 使 G<sub>2</sub>/M 期细胞增多, 尤以 48 h 作用最明显, 为对照组的 4.6 倍。卵巢癌细株 H0-8910 经  $10^{-7}$  mol/L P 处理后, 进入 S 期的细胞减少, 相反 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 值较对照组高, 显示轻度 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞。

mol/L 时则表现抑制生长现象。已证实卵巢癌细胞株 H0-8910 细胞含有 ER 和 PR, 提示可能为性激素依赖细胞<sup>[3]</sup>。本文研究结果表明,  $10^{-12}$  mol/L E<sub>2</sub> 对 H0-8910 细胞生长有促进作用, 以 48 h 最为明显, 其它浓度 E<sub>2</sub> 对细胞生长影响不大, 故认为雌激素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雌激素作用于靶细胞, 促使细胞分泌

肽类生长因子经自分泌或旁分泌机制调控细胞增殖或抑制。本实验对细胞周期的分析发现  $10^{-12}$  mol/L  $E_2$  作用 48 h 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。

近年来许多体外试验证实 FSH、LH 可促进卵巢癌细胞生长, 以 FSH 作用最强。促性腺激素处理过的卵巢癌细胞有丝分裂活动加强<sup>[4]</sup>。本研究显示, 以  $0.4 \sim 10 \mu\text{g/L}$  FSH 对细胞生长有增强作用, 但仅  $10 \mu\text{g/L}$  FSH 的作用具有统计学意义, 提示高浓度 FSH 对细胞促增殖作用明显。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, 这同其他作者观察到的细胞分裂活动增强相一致。

本实验中  $E_2$  和 FSH 的作用在早期并不明显, 这可能是由于牛血清中其他因子的拮抗作用所致; 而后期(72 h)两种激素对细胞生长无明显影响则由于受体含量或结构发生了变化, 使细胞对激素的敏感性降低。

雌激素和 FSH 可参与卵巢上皮分化、增殖恶性变以及卵巢癌细胞的生长<sup>[3]</sup>。如果改变卵巢癌患者体内的内分泌环境, 可有助于提高手术或化疗效果, 减少复发。而对高 FSH 血症的绝经后妇女的内分泌进行调整, 有可能减少卵巢癌的发生。

### 3.2 孕激素在卵巢癌治疗中的作用

孕激素对卵巢细胞的抑制作用, 使其有可能用于预防和治疗卵巢癌。卵巢子宫内样癌组织与子宫内膜癌相似, Rendina<sup>[5]</sup> 等用大剂量醋酸甲孕酮(MPA)治疗 33 例晚期卵巢子宫内样癌, 18 例(55%)有效。研究发现, 孕激素有明显的减轻腹水的作用, 与细胞毒素药物联合应用疗效提高, 客观缓解率可高达  $69\% \sim 80\%$ <sup>[8]</sup>。我们通过体外实验证实孕激素能够有效抑制卵巢癌细胞生长。  $10^{-7} \sim 10^{-5}$  mol/L 孕激素具有明显的抗增殖反应, 并呈剂量依赖性。

目前, 孕激素抗癌作用的机理尚不清楚,

认为孕激素进入细胞核内, 可直接与受体结合, 激活的受体, 促使细胞合成各种特异蛋白质, 从而使卵巢癌细胞生长受到抑制<sup>[9]</sup>。有报道指出甲孕酮可降低卵巢癌细胞癌基因 C-erbB<sub>2</sub> 的表达, 同时癌细胞在软琼脂中的集落形成能力下降, 其致瘤性降低<sup>[7]</sup>。由此可见, 孕激素在晚期复发性卵巢癌, 尤其是化疗耐药患者的治疗中有重要的意义。

### 参考文献:

- [ 1 ] Kauppila A. Progestin therapy of endometrial, breast and ovarian carcinoma[ J ]. Acta Obstet Gynecol Scand, 1984, 63(3): 441.
- [ 2 ] Langdon S P, Ritchie A, Yang K, *et al.* Contrasting effects of  $17\beta$ -estradiol on the growth of human ovarian carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [ J ]. Int J Cancer, 1993, 55(3): 459.
- [ 3 ] 牟翰舟, 许沈华, 张奕荫, 等. 人卵巢细胞系 HO-8910 的建立及其生物学特性[ J ]. 中华妇产科杂志, 1994, 29(3): 162.
- [ 4 ] Schiffenbauer Y S, Abramovitch R, Meir G, *et al.* Loss of ovarian function promotes angiogenesis in human ovarian carcinoma[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(24): 13203.
- [ 5 ] Rendina G M, Sadan H. Steroid receptors and progesterone therapy in ovarian endometrioid carcinoma[ J ]. Eur J Gynecol Oncol. 1982, 3(3): 341.
- [ 6 ] Saegusa M, Okayasu I. Progesterone therapy for endometrial carcinoma reduces cell proliferation but does not alter apoptosis [ J ]. Cancer, 1998, 83(1): 111.
- [ 7 ] 丰有吉, 金志军, 张惜阴, 等. 甲孕酮抑制人卵巢上皮性癌细胞增殖的作用[ J ]. 中华妇产科杂志, 1995, 30(2): 93.
- [ 8 ] Whittemore A S, Harris R, Intyre J, *et al.* Characteristics relating to ovarian cancer risk, collaborative analysis of 12 us case-control studies [ J ]. Am J Epidemiol, 1992, 136(10): 1175.

(编辑 关淡庄)

## 通 知

本刊一向于第 1 期刊登编委会名单, 因本校可能近期与中山大学合并, 编委名单或许需修改, 故本期暂不刊登, 如改后再刊出, 敬请原谅。

(学报编辑部)