

DOI: 10.11844/cjcb.2013.06.0027

重组人生长激素联合化疗对Bel-7402 肝癌细胞的体外影响

彭一峰 陈 谦* 喻亚群 廖维甲 李淑群

(桂林医学院附属医院肝胆胰外科, 桂林 541000)

摘要 探讨重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)联合化疗药物阿霉素(adriamycin, ADM)对体外培养的Bel-7402肝癌细胞的影响。该实验设计分组为对照组、不同浓度rhGH组、不同浓度rhGH+阿霉素(ADM)组及ADM组,共8组,运用体外细胞培养技术、四甲基偶氮唑蓝比色(methyl thiazolyl terazolium, MTT)和流式细胞技术等研究方法,检测不同浓度的rhGH及不同浓度rhGH+ADM对体外培养的Bel-7402肝癌细胞的生长率、生长曲线、细胞周期及增殖指数(proliferation index, PI)等的影响。48 h后,MTT法检测结果提示:与对照组比较,中、高浓度rhGH组生长率明显升高($P<0.05$);ADM组明显抑制Bel-7402肝癌细胞生长($P<0.05$);与ADM组比较,rhGH+ADM各组抑制率明显降低($P<0.05$)。依据生长曲线图可以得出,rhGH各组较对照组明显升高,尤其rhGH2组升高明显,rhGH各组间变化不明显;rhGH+ADM各组间变化不明显;与rhGH+ADM各组比较,ADM组明显降低。细胞周期结果显示,与对照组比较,rhGH2、rhGH3组的G₂/M期比例和增殖指数(PI)显著升高($P<0.05$),ADM组的G₂/M期比例和PI显著降低($P<0.05$),与ADM组相比较,不同浓度rhGH+ADM组的G₂/M期比例和PI明显升高($P<0.05$)。生长激素可促进体外培养的Bel-7402肝癌细胞生长;生长激素联合阿霉素治疗,可降低化疗药物的抗癌效果。

关键词 重组人生长激素;阿霉素;肝癌细胞;细胞周期

Effects of Recombinant Human Growth Hormone Combined with Chemotherapy on the Growth of Bel-7402 Human Hepatic Carcinoma Cell Lines *in vitro*

Peng Yifeng, Chen Qian*, Yu Yaqun, Liao Weijia, Li Shuqun

(Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541000, China)

Abstract This study aimed at investigating the effect in hepatocarcinoma Bel-7402 cells by combining recombinant human growth hormone with ADM. Eight groups were assigned as control group, rhGH groups, rhGH+ADM groups and ADM group. Bel-7402 cells were cultured with various concentrations of rhGH and rhGH+ADM. Cell culture technique, MTT assay and flow cytometry were used to assess the growth rate, growth curve, cell cycle and PI on liver tumor cell Bel-7402. The results showed that the growth rate in medium and high concentration of rhGH groups were significantly increased compared with the controls ($P<0.05$); ADM

收稿日期: 2013-01-17 接受日期: 2013-03-07

2012年广西壮族自治区卫生厅重点项目(批准号: 重2012005)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0773-2824373, E-mail: qianchen98@yahoo.com

Received: January 17, 2013 Accepted: March 7, 2013

This work was supported by the Key Project of Health Department of the Guangxi Zhuang Autonomous Region (Grant No.zhong2012005)

*Corresponding author. Tel: +86-773-2824373, E-mail: qianchen98@yahoo.com

网络出版时间: 2013-05-27 16:27 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130527.1627.001.html>

group obviously decrease the growth of Bel-7402 cells ($P<0.05$); compared with the ADM group, inhibition rate of rhGH+ADM groups were significantly decreased ($P<0.05$); growth curve indicated that the growth of rhGH groups were increased compared with the control group, especially rhGH2 group; compared with rhGH+ADM groups, growth of ADM group was decreased ($P<0.05$). The cell cycle assay indicated that the G₂/M phase and PI in the rhGH2 and rhGH3 groups were obviously increased compared with the control group; G₂/M phase and PI in rhGH+ADM groups were increased compared with ADM group ($P<0.05$). The results suggested that the rhGH stimulated the growth of Bel-7402 hepatic carcinoma cell line *in vitro*; rhGH combined with ADM will weaken the inhibitory effect of the ADM.

Key words recombinant human growth hormone; adriamycin; hepatoma cells; cell cycle

我国是肝癌高发国, 肝癌往往以肝细胞型肝癌高发为主, 患者大多经历肝炎病毒感染、肝炎后肝硬化, 最终发展至肝癌。肝癌患者常常伴有肝功能异常、激素代谢紊乱、营养不良、免疫功能低下等, 晚期常发展成恶病质。重组人生长激素可提高患者免疫功能, 纠正低蛋白血症, 改善患者全身一般情况。但是, 在围手术期使用生长激素, 在改善患者一般情况的同时, 是否会促发原有肝癌的生长、复发及转移等, 国内外学者一直存有争议。本实验根据国内以肝细胞型肝癌高发为特征, 将来源于国内的肝细胞型肝癌细胞株——Bel-7402肝癌细胞株定为研究对象, 用重组人生长激素联合化疗药物阿霉素对其进行体外干预, 观察生长激素联合化疗药物对体外培养的肝癌细胞的影响, 为临床上生长激素的使用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

Bel-7402人肝癌细胞株由北京大学肝病研究所提供; 重组人生长激素(美国Peprotech公司产品); 注射用盐酸阿霉素(ADM, 浙江海正药业股份有限公司); DMEM高糖培养液(Hyclone公司); 小牛血清(Hyclone公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, SIGMA公司); 二甲基亚砷(DMSO, SIGMA公司); Bio-Tek酶联免疫检测仪(美国); 碘化丙啶(PI, Sigma公司); RNase酶(Sigma公司), 流式细胞仪(AriaIII, 美国BD公司)。

1.2 实验分组

本实验分为8组: 对照组、不同浓度rhGH组、不同浓度rhGH+阿霉素(ADM)组及ADM组; 不同浓度分组见表1。

1.3 细胞培养

Bel-7402肝癌细胞培养于含10%小牛血清、青

表1 组别及药物浓度	
Table 1 Group and drug concentration	
组别 Groups	药物名称及浓度 Drug name and concentration
Control group	DMEM high glucose medium
rhGH1	rhGH 50 ng/mL
rhGH2	rhGH 100 ng/mL
rhGH3	rhGH 1 000 ng/mL
rhGH1+ADM	rhGH 50 ng/mL+ADM 4 μg/mL
rhGH2+ADM	rhGH 100 ng/mL+ADM 4 μg/mL
rhGH3+ADM	rhGH 1 000 ng/mL+ADM 4 μg/mL
ADM group	ADM 4 μg/mL

霉素与链霉素各100 U/mL的DMEM高糖培养液中, 并置于37 ℃、5% CO₂及95%空气饱和湿度的培养箱中。取对数生长期细胞, 经0.25%胰酶消化成单细胞悬液, 分瓶传代培养。

1.4 MTT法检测肝癌细胞活性

将瓶中生长状态良好的肝癌细胞, 经胰酶消化, 细胞计数, 取3.0×10⁴/mL浓度接种于96孔板, 180 μL/孔, 每组设3个复孔。4 h肝癌细胞全部贴壁后, 按分组要求加入药物20 μL/孔(两种药物按体积1:1加入, 总体积一样), 终浓度见表1; 置于培养箱中培养48 h, 实验结束前4 h加入MTT液20 μL/孔(终浓度为5 mg/mL), 4 h后, 倒去板内液体, 每孔加入150 μL二甲基亚砷, 平板震荡仪震荡5~10 min, 置于Bio-Tek酶联免疫检测仪上, 以492 nm波长(参考波长630 nm)测定各孔吸光度D值。重复上述实验3次, 按公式计算细胞生长率和抑制率。生长率=实验组平均D值/对照组平均D值×100%, 抑制率=1-(实验组平均D值/对照组平均D值)×100%。根据以上方法, 将肝癌细胞培养24, 48, 72 h, 并重复实验3次, 获取不同时段各孔D值, 描绘出细胞生长曲线。

1.5 流式细胞仪测定

取对数生长期的细胞,以 1×10^6 /瓶接种于细胞培养瓶,4 h细胞完全贴壁后,按分组要求分别给予药物处理。培养48 h后,收集细胞,PBS洗2次,离心,每次均弃去上清液,获取约 1×10^6 /mL以上细胞,用70%的预冷冰乙醇固定,放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存过夜,一周后,取出用2 000 r/min离心10 min,弃去70%冰乙醇,用预冷的PBS洗涤2次,再用0.5 mL RNase悬浮细胞后,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min,最后加入25 μL PI,避光染色30 min。上流式细胞仪检测细胞周期。同法重复上述步骤3次。根据细胞周期分析结果,按下式计算细胞增殖指数(PI)。PI=(S期细胞+G₂/M期细胞)/(G₀/G₁期细胞+S期细胞+G₂/M期细胞) $\times 100\%$ 。

1.6 统计学方法

实验数据通过SPSS18.0统计软件分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有明显统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长率及抑制率

培养48 h后测得的实验各组D值,如表2所示。结果显示:与对照组比较,rhGH2、rhGH3组生长率明显提高($P < 0.05$),rhGH1组生长率无统计学意义($P > 0.05$);不同浓度rhGH+ADM各组与ADM组比较,抑制率明显降低($P < 0.05$),不同浓度rhGH+ADM各组间差异不明显。

2.2 细胞生长曲线

从图1得出结果,rhGH各组较对照组明显升高,rhGH2组较其他各组明显升高,不同浓度rhGH各组间变化不明显;不同浓度rhGH+ADM组与组之间变化不明显,ADM组较rhGH+ADM各组明显降低($P < 0.05$)(图1)。

2.3 细胞周期分析及增值指数(PI)

从表3得出结论,与对照组比较,rhGH2、rhGH3组的G₂/M期比例和PI显著升高($P < 0.05$),ADM组的G₂/M期比例和PI显著降低($P < 0.05$)。与ADM处理组比较,不同浓度rhGH+ADM组的G₂/M期比例和PI明显升高($P < 0.05$),但不同浓度rhGH+ADM组与组之间无显著性差异($P > 0.05$)。

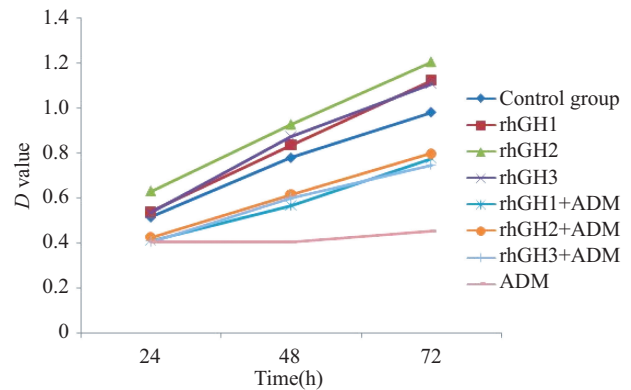


图1 各组细胞生长曲线

Fig.1 Cell growth curves of different groups

表2 48 h后实验各组D值

Table 2 D value of each experimental groups after 48 h

分组 Groups	D值 D value	生长率(%) Growth rate(%)	抑制率(%) Inhibition rate(%)
Control	0.78 $\pm$ 0.02	100.00	0
rhGH1	0.83 $\pm$ 0.01	107.07	-7.07
rhGH2	0.93 $\pm$ 0.04	119.15*	-19.15
rhGH3	0.87 $\pm$ 0.02	112.08*	-12.08
rhGH1+ADM	0.56 $\pm$ 0.03	72.49	27.51 [#]
rhGH2+ADM	0.62 $\pm$ 0.03	79.04	20.96 [#]
rhGH3+ADM	0.60 $\pm$ 0.05	76.99	23.01 [#]
ADM	0.41 $\pm$ 0.03	52.06*	47.94

* $P < 0.05$, 与对照组比较; [#] $P < 0.05$, 与阿霉素(ADM)处理组比较。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs ADM group.

表3 Bel-7402细胞周期及增殖指数(%)
Table 3 The cell cycle and proliferation index of Bel-7402(%)

组别 Groups	G ₀ /G ₁ 期 G ₀ /G ₁ phase	S期 Synthesis phase	G ₂ /M期 G ₂ /M phase	PI Proliferation index
Control group	53.56±0.51	39.67±1.18	6.77±0.67	46.43±0.51
rhGH1	52.57±0.42	39.59±0.79	7.84±0.38	47.43±0.42
rhGH2	47.75±0.24	42.49±0.16	9.76±0.40*	52.25±0.24*
rhGH3	48.23±0.52	41.92±0.71	9.85±0.19*	51.77±0.52*
rhGH1+ADM	67.55±0.33	28.3±0.380	4.15±0.29 [#]	32.45±0.33 [#]
rhGH2+ADM	66.05±0.69	29.69±1.10	4.26±0.42 [#]	33.95±0.69 [#]
rhGH3+ADM	67.18±0.59	28.71±0.78	4.11±0.19 [#]	32.82±0.59 [#]
ADM	78.54±0.43	18.59±0.15	2.87±0.34*	21.46±0.43*

* $P<0.05$, 与对照组比较; [#] $P<0.05$, 与阿霉素(ADM)处理组比较。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs ADM group.

3 讨论

生长激素是由腺垂体分泌的一种激素, 具有促进细胞生长、增加细胞生长速度的作用, 同时它还可以改善患者负氮平衡状态, 纠正低蛋白血症, 增强机体的免疫功能等; 肝癌是一种高消耗性疾病, 晚期常发展成恶病质^[1]。肝癌患者围手术期间使用生长激素, 在改善患者全身一般情况的同时, 是否会促进肿瘤的增殖、转移等, 国内外学者一直存有争议^[2-4]。

Bel-7402肝癌细胞株^[5]是20世纪70年代由我国陈瑞铭等教授原代培养保留下来的肝癌细胞株, 它来源于我国一位男性肝细胞型肝癌患者, 此细胞株具有肝细胞癌的恶性特征, 可分泌AFP, 生物学特性与临床肝细胞型肝癌相似。我国肝癌以肝细胞型肝癌为主, 故本实验以Bel-7402肝癌细胞为研究对象, 研究结论与我国肝癌患者的临床治疗密切相关。

生长激素与相应的生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)结合, 从而产生相应的生物学作用。生长激素与相应的生长激素受体结合, 产生同型二聚体, JAK2被激活, 进而伴随着转磷酸, 触发多级信号级联放大效应, 通过Elk-1和STATs等转录因子, 诱导胰岛素样生长因子表达, 促进细胞的生长^[6-8]。据研究显示, Bel-7402肝癌细胞呈GHR(+)表达^[9]。本实验中, rhGH作用于Bel-7402肝癌细胞, rhGH2和rhGH3组肝癌细胞明显增殖, 尤其在100 ng/mL浓度条件下, 肝癌细胞生长显著。说明生长激素可促进GHR(+)的肝癌细胞生长, 并且在100 ng/mL浓度下, 肝癌细胞生长最快。研究报道, 生长激素作用于生长激素受体, 对其有诱导或者抑制作用^[10]; 但不同浓度的生长激素作用于生长激素受体, 对其诱导或抑制的具体生物学机制仍需进一步研究。

在肝癌患者治疗过程中, 阿霉素是常用的化疗药物, 主要通过阻滞肝癌G₀/G₁期细胞进入S期, 进而导致细胞死亡。目前, 根据相关研究进展, 认为rhGH联合化疗药物治疗是相对安全的, 甚至可以增强化疗的效果^[11-12]。段体德等^[13]将生长激素联合顺铂、丝裂霉素, 发现其可有效地诱导胃癌细胞凋亡, 提高抗癌效果。高潺潺等^[14]将生长激素联合氟尿嘧啶作用于GHR不同表达的人结肠癌细胞, 发现其在作用于GHR(+)表达的结肠癌细胞, 对5-FU化疗有抵抗, 而对不表达GHR的结肠癌细胞, 则无上述作用。侍方方等^[15]认为, 生长激素联合氟尿嘧啶作用于GHR高表达的胃癌细胞, 可减弱氟尿嘧啶的抗癌作用, 而对GHR低表达的胃癌细胞, 则对氟尿嘧啶的抗癌作用影响不大。在本次实验中, 重组人生长激素可明显促进体外培养的Bel-7402肝癌细胞生长, 与对照组相比, 在低浓度rhGH组中, 促进肝癌增殖不明显, 但在中、高浓度条件下, 对肝癌细胞有明显的促进生长作用, G₂/M期比例和PI明显升高; 这可能与Bel-7402肝癌细胞GHR(+)表达, rhGH作用于生长激素受体后, 产生进一步的生物学效应有关, 但其具体生物学机制尚不清楚; 观察细胞周期变化, 与对照组相比, ADM组抑制率明显升高, 且G₀/G₁期比例明显升高, G₂/M期比例和PI显著降低, 阿霉素有明显的抑制肿瘤增殖作用。与ADM组比较, 各浓度rhGH+ADM组的抑制率明显降低, G₂/M期比例和PI显著升高。

由于生长激素具有纠正低蛋白血症、增强患者免疫力等改善患者全身一般情况的优点, 已受到国内外广泛关注。但因其可能导致肿瘤的生长、复发等严重后果, 尚不可贸然在临床上使用。本实验通

过rhGH联合化疗作用于体外培养的肝细胞型肝癌细胞, 观察肝癌的生长情况。结果显示, rhGH能促进Bel-7402肝癌细胞生长, 减弱ADM对Bel-7402肝癌细胞的抗癌作用。故在临床上, 不建议将生长激素单独应用于肝细胞型肝癌患者; 而生长激素联合阿霉素治疗肝癌患者, 虽然降低了阿霉素的抗癌效果, 但也明显减弱了生长激素的促生长作用, 且可改善患者全身的一般情况, 故在临床上可根据患者病情, 慎重考虑联合治疗方案。

参考文献 (References)

- 1 Chamberlain JS. Cachexia in cancer zeroing in on myosin. *N Engl J Med* 2004; 351(20): 2124-5.
- 2 Graham MR, Davies B, Kicman A, Cowan D, Hullin D, Baker JS. Recombinant human growth hormone in abstinent androgenic-anabolic steroid use: Psychological endocrine and trophic factor effects. *Curr Neurovasc Res* 2007; 4(1): 9-18.
- 3 Cao J, Luo SM, Liang L, Lai J. 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 Parenter Enteral Nutr* 2007; 31(6): 496-501.
- 4 赖佳明, 梁力建, 彭宝岗, 黎东明. 重组人生长激素联合化疗对人肝癌原位移植瘤作用实验. 中山大学学报: 医学科学版 (Lai Jiaming, Liang Lijian, Peng Baogang, Li Dongming. Experimental study of effect of recombined human growth hormone combine with chemotherapy on hepatocellular carcinoma implanted in nude mice. *Journal of Sun Yat-sen University: Medical Sciences*) 2004; 25(4): 315-8.
- 5 陈瑞铭, 朱德厚, 叶秀珍, 沈鼎武. 人体肝癌体外细胞系Bel-7402的建立及其特征. 实验生物学报 (Chen Ruiming, Zhu Dehou, Ye Xiuzhen, Shen Dingwu. The establishment and some characteristics of a human liver carcinoma cell line Bel-7402 *in vitro*. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*) 1978; 11(1): 37-45.
- 6 Chun EY, Belair L, Jolivet G, Djiane J, Jammes H. Transduction pathways of GH in ovine mammary acini involving regulated and functional growth hormone receptors. *Growth Factors* 2005; 23(1): 55-66.
- 7 Waters MJ, Hoang HN, Fairlie DP, Pelekanos RA, Brown RJ. New insights into growth hormone action. *J Mol Endocrinol* 2006; 36(1): 1-7.
- 8 Perry JK, Emerald BS, Mertani HC, Lobie PE. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 2006; 16(5/6): 277-89.
- 9 刘建平, 陈涛, 陈小萱, 区庆嘉. 生长激素促进体外培养的Bel-7402肝癌细胞增殖. 中山大学学报: 医学科学版 (Liu Jianping, Chen Tao, Chen Xiaoxuan, Ou Qingjia. RhGH increase proliferation of human hepatic carcinoma cell line Bel-7402 *in vitro*. *Journal of Sun Yat-sen University: Medical sciences*) 2008; 29(4): 418-22.
- 10 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. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 274(2): 53-9.
- 11 Banerjee I, Clayton PE. Growth hormone treatment and cancer risk. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007; 36(1): 247-63.
- 12 Fiebig HH, Dengler W, Hendriks HR. No evidence of tumor growth stimulation in human tumors *in vitro* following treatment with recombinant human growth hormone. *Anti-Cancer Drug* 2000; 11(8): 659-64.
- 13 段体德, 温先敏, 杨策尧, 刘德权, 王秦秦, 郑南, 等. 生长激素联合顺铂、丝裂霉素诱导前胃癌细胞凋亡的实验研究. 昆明医学院学报 (Duan Tide, Wen Xianmin, Yang Ceyao, Liu Dequan, Wang Qinqin, Zheng Nan, *et al*. The study of apoptosis induced by jointly recombinant human growth hormone with CDDP or MCC on cultured mouse forestomach carcinoma cell. *Academic Journal of Kunming Medical College*) 2003; (3): 34-8.
- 14 高潺潺, 侍方方, 王琳, 陆颖芝, 李苏宜. 重组人生长激素联合氟尿嘧啶体外干预人结肠癌细胞株增殖. 肠外与肠内营养 (Gao Chanchan, Shi Fangfang, Wang Lin, Lu Yingzhi, Li Suyi. The effects of recombinant human growth hormone and 5-FU on the growth of colon cancer cells *in vitro*. *Parenteral and Enteral Nutrition*) 2010; 17(6): 355-8.
- 15 侍方方, 李苏宜, 邵棋. 生长激素联合氟尿嘧啶对生长激素受体不同表达胃癌细胞株的影响. 肠外与肠内营养 (Shi Fangfang, Li Suyi, Shao Qi. Effects of recombinant human growth hormone combined with fluorouracil on GHR2+ or GHR+ human gastric cancer cell lines *in vitro*. *Parenteral and Enteral Nutrition*) 2009; 16(5): 294-7.