

重组人类生长激素对胃癌细胞的体外增殖研究

费哲为 欧敬明 董 谦 刘颖斌 方国恩[△]

(上海第二军医大学附属长海医院 普外科 上海 200433)

摘要 目的 通过体外实验 研究重组人类生长激素对胃癌细胞的增殖的影响。方法 实验分为空白组 重组人类生长激素组 奥沙利铂组和重组人类生长激素 + 奥沙利铂组。用不同浓度的重组人类生长激素处理 SGC-7901 细胞 采用 MTT 法和流式细胞仪检测人胃癌细胞株的细胞抑制率 细胞周期和 DNA 抑制率。结果 体外实验结果表明 重组人类生长激素对 SGC-7901 细胞株增殖没有明显的促进作用 重组人类生长激素组和空白组以及重组人类生长激素 + 奥沙利铂组和奥沙利铂组之间没有统计显著性 ($P>0.05$) 细胞抑制率和停止生长的细胞在 G0-G1 期明显增加 ($P<0.01$) 同时重组人类生长激素 + 奥沙利铂组和空白组以及奥沙利铂组在 S 期 细胞数依次下降 DNA 抑制率依次增加。重组人类生长激素 + 奥沙利铂组与奥沙利铂组相比 细胞抑制率有明显上升趋势。结论 体外实验表明 重组人类生长激素并不加快人类胃癌细胞的增殖 与抗癌药物一同使用时 有增加治疗功效的作用。

关键词 重组人类生长激素 胃癌细胞 增殖

中图分类号 R284.2 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)20-3849-04

Effects of Recombinant Human Growth Hormone on Growth of Human Gastric Cancer Cell Line in Vitro

FEI Zhe-wei, OU Jing-ming, DONG Qian, LIU Ying-bin, FANG Guo-en[△]

(The general surgery department of the affiliated Changhai hospital, Shanghai Second Military Medical University, Shanghai, 200433)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of recombinant human growth hormone (rhGH) on growth of human gastric cancer cell line in vitro. **Methods:** Cells were divided into control group, rhGH group, oxaliplatin (L-OHP) group and rhGH+L-OHP group. Cell inhibitory rate, cell cycle and DNA inhibitory rate of human gastric cancer line SGC-7901, at different concentrations of rhGH treatment were detected by cell culture, MTT assay and flow cytometry. **Results:** There was not distinctly accelerated effect of rhGH on multiplication of SGC-7901 cell line in vitro. There was no statistical significance between rhGH group and control group, or between rhGH+L-OHP group and L-OHP group ($P>0.05$). Cell inhibitory rate and cell arrested in G0-G1 phase increased. Meanwhile, cells in S phase distinctly decreased and DNA inhibitory rate increased in rhGH+L-OHP group in comparison with L-OHP group ($P<0.01$). **Conclusion:** rhGH does not accelerate the multiplication of human gastric cancer cells. It may increase the therapeutic efficacy when used in combination with anticancer drugs.

Key words: Recombinant human growth hormone (rhGH); Human gastric cancer cell line; Growth

Chinese Library Classification(CLC):R284.2 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)20-3849-04

前言

重组人类生长激素有促进蛋白质合成、促进脂肪动员和加速氮平衡的作用。国外研究证实重组人生长激素(rhGH)能改善营养不良患者的营养状况,提高机体耐力^[1],并能改善机体免疫功能^[2]。而国内的研究也发现 rhGH 对老年慢阻肺及其他慢性病合并的营养不良能促进蛋白质代谢,改善营养状况^[3,4]。重组人类生长素在医院广泛用于严重外伤、烧伤或者术后的病人的新陈代谢状态的调整等。重组人类生长素也是肿瘤病人术后用的一种药,但是就重组人类生长激素是否会促进肿瘤细胞的增殖还存在争议。本实验通过体外实验探究了重组人类生长激素

对人胃癌细胞株 SGC-7901 的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人胃癌细胞株 SGC-7901(上海细胞资源中心) rhGH(雪兰诺公司) 奥沙利铂(L-OHP)(江苏恒瑞医药股份公司) 胰蛋白酶(华美生物工程公司) RPMI Medium 1640(Invitrogen Corporation) 二甲基亚砷(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)(Sigma 公司)。

1.2 试验仪器

超净工作台(苏州净化设备厂);微型台式高速离心机(5415D)(德国 Eppendorf 公司);CO₂ 培养箱(日本三洋公司);LD4-2A 离心机(北京医用离心机厂) 96 孔板(美国 Corning 公司);XDS-1B 倒置显微镜(重庆光学仪器厂);流式细胞仪(EPICXU)。

1.3 细胞株的培养

作者简介 费哲为(1962-) 男 博士研究生 教授 主任医师 主要研究方向 胃癌临床基础研究。E-mail:Xyxy1978@126.com

[△]通讯作者 方国恩 主任医师 博士生导师 教授 主要研究方向 胃癌临床基础研究。Tel: 13817756636

(收稿日期 2011-06-07 接受日期 2011-06-30)

培养液为含 10%小牛血清，青霉素 100u·ml⁻¹，链霉素 100u·ml⁻¹ 的 RPMI1640 在 37℃.5%CO₂ 培养箱中培养，每 1~2 天更换培养液一次。

1.4 实验分组

实验分为四组：空白对照组（ ），奥沙利铂 L-OHP 组（ ），人类重组生长激素 rhGH 组（ ），人类生长激素 + 奥沙利铂组（ ）(表 1)。

表 1 试验分组以及药物浓度

Table 1 Experimental groups and concentrations of drugs	
药物名称及浓度(Names and concentration of durgs)	
	RPMI1640
	L-OHP 4μg / ml
a	rhGH 62.5ng / ml
b	rhGH 125ng / ml
c	rhGH 250ng / ml
d	rhGH 500ng / ml
a	rhGH 62.5ng / ml+L-OHP 4μg / ml
b	rhGH 125ng / ml+L-OHP 4μg / ml
c	rhGH 250ng / ml+L-OHP 4μg / ml
d	rhGH 500ng / ml+L-OHP 4μg / ml

1.5 MTT 法测定细胞生长抑制率

选择对数期的胃癌细胞，调整细胞个数为 1× 10⁵ 个 / ml，接种于 96 孔培养板，每组 6 个复孔，每孔 100μl。细胞贴壁后按表 1 加药，每孔 10μl，于 12, 24, 48h 后，每孔分别加入 5g·L⁻¹ 的 MTT 20μl，37℃孵育 4h，弃上清加入 150μl 的 DMSO，在平板摇床微振荡 10min 后，用全自动酶标仪在波长 490nm 处测每孔吸光度(OD)，根据 OD 值计算生长抑制率，生长抑制率 = ((未处理组吸光度 - 处理组吸光度) / 未处理组吸光度) × 100%。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期和 DNA 抑制率

选择对数生长期的胃癌细胞，调整细胞数为 3× 10⁵ 个 / ml 接种 6 孔培养板中，每孔 2ml，24h 后更换培养液，按表 2 加药，每组 6 个复孔，继续培养 24h。待测样本支撑单细胞悬浮液，离心 5min，4℃预冷的 70%冷乙醇固定 24h 后备用。0.5ml PBS 重悬细胞并转至试管中轻轻吹打，Rnase-A 至浓度约为 50μ·ml⁻¹，37℃水浴加热 30min；加碘化丙啶至终浓度为 65μg·ml⁻¹，在水浴中避光染色 30min，用 300 目尼龙网过滤，用流式细胞仪上机检测。进行 DNA 细胞周期分析(G₀ / G₁.S.G₂ / M 期)，计算细胞 DNA 抑制率(DI)，DI = (被测样品细胞 G₀ / G₁

峰均值 / 正常细胞 G₀ / G₁ 峰均值) × 100%。

1.7 数据处理

所有数据均以均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，统计方法采用单因素方差分析，统计数据采用 SPSS 10.0 处理。

2 结果与分析

2.1 rhGH 对人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞生长抑制作用

与空白组和 rhGH 组相比，L-OHP 组和 rhGH+L-OHP 组对胃癌细胞的细胞抑制率明显要高 (P < 0.01)。尽管 rhGH+L-OHP 组和 L-OHP 组相比没有显著性差异 (P > 0.05)，但后者的抑制率要与前者。空白组和 rhGH 组抑制率变化没有剂量依赖性(表 3)。

2.2 rhGH 对人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞周期的影响

L-OHP 组和 rhGH+L-OHP 组细胞周期明显发生变化。在 G₀-G₁ 期，L-OHP 组和 rhGH+L-OHP 组的细胞数目明显比空白组和 rhGH 组多 (P < 0.01)，rhGH 组和空白组相比、L-OHP 组和 rhGH+L-OHP 组相比细胞数都没有明显的差别 (P > 0.05)。在 S 期，L-OHP 组和 rhGH+L-OHP 组的细胞数比空白组和 rhGH 组少 (P < 0.01)，但空白组和 rhGH 之间没有统计显著性。在 G₂-M 期，L-OHP 组和 rhGH+L-OHP 组中的细胞数比空白组和 rhGH 组少 (P < 0.01)，空白组和 rhGH 组、L-OHP 组和 rhGH+L-OHP 组之间都没有统计显著性。在 S 和 G₂-M 期 rhGH+L-OHP 组中细胞数变化没有剂量依赖性(表 4)。

2.3 rhGH 对人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞 DNA 抑制率

如表 5 所示，rhGH+L-OHP 组与 rhGH 组相比，DNA 抑制率明显上升。

3 讨论

L-OHP 是一种与顺铂和卡铂具有相似作用的新型铂化合物，L-OHP 的作用机制是在 DNA 分子中相邻的两个鸟嘌呤或在鸟嘌呤和腺苷之间插入铂原子而使 DNA 破裂，从而使 DNA 不能复制和转录，它并不是一个细胞的特异性抗癌药物，在体外实验中本研究是根据药理学剂量上其在血浆中的最大浓度以及 Limburg 和 Heckman 准则来确定其浓度的。在这个浓度的基础上合理设计浓度梯度，通过体外抗癌药物的筛选实验发现 L-OHP 影响胃癌细胞株 SGC-7901 的 IC₅₀ 是 4μg / ml。大多数数据表明 rhGH 在体外的浓度为 50ng / ml 或者 100ng / ml 适宜 [5]。Qi XP 根据临床实验设计出最大浓度为 200ng / ml [6,7]，但 Estrov J 又指出，rhGH 在高浓度时(250ng / ml-300ng / ml)会促进人类血癌细胞的增殖[8]。所以建议这个浓度。这种药物的持续周期为 48h，根据人胃癌细胞株 SGC-7901 增加一倍所需要的时间，rhGH 被脑垂腺隐藏，它能使与严重地分解代谢状态有关的营养异常和新陈代谢异常恢复。实验已证

表 2 每组用药情况

Table 2 Table 2 Scheme of drugs in each group										
分组(group)			a	b	c	d	a	b	c	d
L-OHP(μl)	/	50	/	/	/	/	50	50	50	50
rhGH(μl)	/	/	10	20	40	80	10	20	40	80
RPMI1640(μl)	150	100	140	130	110	70	90	80	60	20

表 3 rhGH 以及 L-OHP 对胃癌细胞株 SGC-7901 的影响(n=4 ,mean± SD)
Table 3 Effects of rhGH and L-OHP on SGC-7901 cells(n=4 ,mean± SD)

组 (Groups)	OD 值 (OD values)	存活率 (Survival rate)%	抑制率 (Inhibitory rate)
	0.903± 0.172	100	0
	0.501± 0.086*	55.48*	44.52*
a	0.963± 0.142	106.64	-6.64
b	0.918± 0.220	101.66	-1.66
c	0.877± 0.346	97.12	2.87
d	0.873± 0.196	96.67	3.32
a	0.358± 0.240*	39.64*	60.35*
b	0.336± 0.038*	37.20*	62.79*
c	0.336± 0.018*	37.22*	62.79*
d	0.306± 0.200*	33.88*	66.11*

*P<0.01 vs control group or rhGH group.

表 4 在细胞周期的不同阶段的人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞率(n=3 ,mean± SD)
Table 4 Percentages of SGC-7901 cells in various phases of cell cycle(n=3 ,mean± SD)

分组(Group)	G ₀ -G ₁ (%)	S(%)	G ₂ -M(%)
	48.95± 0.78	34.63± 0.49	16.42± 0.21
	86.23± 1.77*	6.55± 0.64*	7.22± 1.13*
a	58.04± 4.31	30.37± 7.47	11.59± 3.40
b	56.43± 4.55	30.53± 6.19	13.04± 1.88
c	56.43± 4.94	31.57± 8.17	12.00± 3.29
d	53.21± 5.94	31.64± 8.89	15.15± 3.07
a	88.37± 2.62*	5.69± 3.88*	5.94± 1.82*
b	91.82± 2.07*	4.17± 1.88*	4.01± 0.40*
c	88.63± 0.47*	6.51± 4.99*	4.86± 5.61*
d	91.13± 2.87*	3.30± 1.61*	6.01± 1.27*

*P<0.01 vs control group or rhGH group.

表 5 rhGH+L-OHP 组与 rhGH 组中 DNA 的抑制率(n=3,mean± SD)
Table 5 DNA inhibitory rate in rhGH group and rhGH+L-OHP group(n=3, mean± SD)

组号(group)	DNA 抑制率(DNA inhibitory rate)%
a	118.5± 9.4
a	180.5± 6.8
b	115.2± 9.8
b	187.5± 4.0
c	115.2± 10.5
c	181.1± 1.9
d	108.7± 12.4
d	186.2± 7.6

实 rhGH 可以促进蛋白质的合成 ,改善氮平衡 ,加快伤口愈合 ,维持宿主细胞免疫功能 ,缓解术后疲劳综合征等。
研究表明 ,rhGH 能在恶性肿瘤病人术后代谢调理过程中

起到加强氮平衡的作用 ,但由于 hGH 有促进正常细胞和肿瘤细胞增殖的作用 ,就 rhGH 是否能作为肿瘤病人术后用药仍存在争议。Estrov J 报道说 ,高浓度的 rhGH 可增加患白血病和实体瘤的风险^[8]。Ogilyi-Stuart AL 认为 ,当给肿瘤病人较高浓度的 rhGH 时 ,将增加肿瘤的风险 ,特别对于结肠癌患者^[9]。Akaza H 发现 rhGH 能提高化学诱导鼠膀胱癌的癌变几率^[10]。Ng EH 表明 GH 可以增加植有肿瘤细胞的小鼠的非整倍数细胞的均衡^[11]。其他一些研究表明 ,rhGH 刺激肿瘤细胞的增殖^[12-14] ,而 Harrison^[15]表明 rhGH 并不促进胰腺癌细胞的生长。Tacke et al^[16]认为 rhGH 作为术后短期用药 ,有助于免疫功能恢复 ,可以增强天然杀伤细胞的活力 ,帮助清除蛋白质癌细胞并且有一只肿瘤细胞的再生作用。Fiebig et al^[17,18]报道说在体外实验中 ,rhGH 并不能促进肿瘤细胞的增殖。Bartlett et al^[19]认为在蛋白质缺陷动物中 GH 可以抑制癌细胞的增长。当然还有一些研究表明 rhGH 并不促进肿瘤细胞的增殖。

本实验主要通过体外实验探究了 rhGH 对胃癌细胞的影响 ,结果表明 rhGH 并没有明显的刺激肿瘤细胞的生长。rhGH

和空白组以及 rhGH+L-OHP 组和 L-OHP 组的细胞抑制率, G0-G1 期、S 期和 G2-M 期细胞数, DNA 抑制率并没有明显的差别($P>0.05$)。结果与其他的临床报道^[20]吻合。体外试验显示, rhGH 并没有促进胃癌细胞的增殖, 另外 rhGH+L-OHP 组和 L-OHP 组细胞的增殖率在 S 期和 G2-M 期相似, 表明 rhGH 并不刺激肿瘤细胞的增殖; 在 S 期和 G2-M 期, rhGH+L-OHP 组与空白组相比, rhGH+L-OHP 组与 L-OHP 组相比细胞抑制率明显增加。结果表明 rhGH 有增强 L-OHP 对肿瘤细胞药效的作用。这为 rhGH 在临床上的应用提供了理论基础。RhGH 在肿瘤病人术后新陈代谢恢复、晚期癌症病人体质改善, 以及化疗对病人的有害影响的减轻等方面都有效用。

RhGH 对肿瘤细胞的增殖的作用机理仍不清楚, 但有报道证实 GH 可以与肿瘤细胞表面的 IGF-1 受体结合间接地刺激肿瘤细胞的增殖。另有一些研究表明, rhGH 不促进肺癌细胞的增殖是由于减少了 IGF-1 受体的表达^[22]。Wennbo H 发现在基因改造的老鼠中催乳素受体的活化而不是生长激素受体使乳腺肿瘤细胞减少^[21]。RhGH 对肿瘤细胞的作用机理仍不清楚。综上所述, 体外实验显示, rhGH 并不能促进胃癌细胞的增殖和分裂, 相反, 它能加强抗癌药物对胃癌细胞的作用。阻滞细胞 G0-G1 期向 S 期的进程, 形成 G0-G1 期阻滞, 使之不进入或延迟进入 S 期和 G2-M 期, 干扰了 DNA 的合成, 胃癌细胞因而丧失了进行有丝分裂的基础, 从而有效抑制了人胃癌细胞株 SGC-7901 的分裂增殖。

参考文献(References)

- [1] Chu LW, Lam ks, Tam SC, et al. A randomized controlled trial of low dose recombinant human growth hormone in the treatment of malnourished elderly medical patients [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2001, 36(5):1913-1920
- [2] Saito H, Inoue T, Fukatsu k, et al. Growth hormone and immune response to bacterial infection[J]. *Horm Res*, 1996, 45(12):50-54
- [3] 钱玉英, 陈秉良, 冯明, 等. 重组人生长激素对老年肺部感染患者蛋白代谢的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2004, 24(1):890-892
QIAN Yu-ying, CHEN Bing-liang, FENG Ming, et al. Effects of recombinant human growth hormone on protein metabolism in elderly patients with lung infection [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2004, 24 (1):890-892
- [4] 郭建辉, 胡瑞祥, 龚昆梅, 等. 低热量肠外营养加生长激素对严重应激和重度营养不良病人的治疗体会 [J]. *肠内与肠外营养*, 1998, 5 (3):144-146
GUO Jian-hui, HU Rui-xiang, GONG Kun-mei, et al. Low-calorie parenteral nutrition and growth hormone on severe stress and severe malnutrition in the patient's treatment experience [J]. *Enteral and parenteral nutrition*, 1998, 5 (3):144-146
- [5] Yoshimura Y, Iwashita M, Karube M, et al. Growth hormone stimulates follicular development by stimulating ovarian production of insulin-like growth factor-1 [J]. *Endocrinology*, 1994, 135:887-894
- [6] Qi XP, Li JS, Chen C. Effect of human growth hormone on cell cycle kinetics in Lovo and LS-174-T cells [J]. *Journal of Nanjing University*, 2000, 36:598-602
- [7] Qi XP, Li JS, Chen C. Effect of human growth hormone on cell cycle

kinetics in colonic cancer cells [J]. *Changnei Yu Changwai Yingyang*, 2001, 8:8-10

- [8] Tscke J, Bolder U, Lohlein D. Improved cumulated nitrogen balance after administration of recombinant human growth hormone in patients undergoing gastrointestinal surgery [J]. *Infusionsther Transfusio-nsm*, 1994, 21:24-29
- [9] Ogilvy-Stuart AL, Ryder WD, Gattamaneni HR, et al. Growth hormone and tumor recurrence[J]. *BMJ*, 1992, 304:1601-1605
- [10] Akaza H, Mastuki K, Matsushima H, et al. Stimulatory effects of growth hormone on rat bladder carcinogenesis [J]. *Cancer*, 1991, 68:2417-2421
- [11] Ng EH, Rock CS, Lazarus D, et al. Impact of exogenous growth hormone on host preservation and tumor cell-cycle distribution in rat sarcoma model[J]. *J Surg Res*, 1991, 51:99-105
- [12] Shalet SM, Brennan BM, Reddingius RE. Growth hormone therapy and malignancy[J]. *Horm Res*, 1997, 48(Suppl 4):29-32
- [13] Espat J, Chamberlain RS, Sklar C, et al. Hepatic adenoma associated with recombinant human growth hormone therapy in a patient with Turner's syndrome[J]. *Dig Surg*, 2000, 17:640-643
- [14] Watanabe S, Kobayashi Y. Exogenous hormones and human cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 1993, 23:1-13
- [15] Harrison LE, Blumberg D, Berman R, et al. Effect of human growth hormone on human pancreatic carcinoma growth, protein and cell cycle kinetic[J]. *J Surg Res*, 1996, 61:317-322
- [16] Tacke J, Bolder U, Herrmann A, et al. Long-term risk of gastrointestinal tumor recurrence after postoperative treatment with recombinant human growth hormone[J]. *JPEN*, 2000, 24:140-144
- [17] Fiebig HH, Dengler W, Hendriks HR. No evidence of tumor growth stimulation in human tumors in vitro following treatment with recombinant human growth hormone[J]. *Anticancer Drugs*, 2000, 11:659-664
- [18] Fiebig HH, Dengler WA, Drees M, et al. Human growth hormone is able to reduce tumor induced cachexia in a human tumor xenograft model without tumor stimulation. In: Sagesse G, Stanhope R, eds. *Recent advances on growth and growth hormone therapy* [J]. London: Freund, 1995, 2:239-251
- [19] Bartlett DLT, Stein P, Torosian MH, et al. Effect of growth hormone and protein intake on tumor growth and host cachexia [J]. *Surgery*, 1995, 117:260-267
- [20] Beentjes JA, van Gorkom BA, Sluiter WJ, et al. One year growth hormone replacement therapy does not alter colonic epithelial cell proliferation in growth hormone deficient adults [J]. *Clin Endocrinol*, 2000, 52:457-462
- [21] Wennbo H, Gebre MM, Gritli LA, et al. Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumor in transgenic mice [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100:2744-2751
- [22] Levinovitz A, Husman B, Eriksson LC, Norstedt G, Andersson G. Decreases expression of growth hormone receptor and growth hormone binding protein in rat liver nodules [J]. *Mol Carcinog*, 1990, 3:157-164