

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.07.010

• 基础研究 •

人绒毛膜促性腺激素对甲状腺乳头状癌的细胞增殖及周期的影响

周雅琪, 周 争, 王家东

Effects of Human Chorionic Gonadotropin on Growth of Papillary Thyroid Carcinoma

ZHOU Yaqi, ZHOU Zheng, WANG Jiadong

*Department of Head and Neck Surgery, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China**Corresponding Author: WANG Jiadong, E-mail: drjiadongw@aliyun.com*

Abstract: Objective To research the effects of human chorionic gonadotropin (hCG) on proliferation and cell cycle of papillary thyroid carcinoma. **Methods** The thyroid cancer cell line IHH-4 was involved in this experiment. Tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) and flow cytometry (FCM) were used to test the effects of hCG on proliferation activity and cell cycle of IHH-4 at different concentration for 24, 48 and 72 h, respectively. **Results** hCG could promote cell viability of IHH-4, significantly at the concentration of 100 IU/ml. Treated with hCG in concentration of 100 IU/ml for 48h, G₂M+S phase of IHH-4 cells were 67.1%, significantly higher than control group. **Conclusion** Human Chorionic Gonadotropin (hCG) could promote proliferation activity and accelerate cell cycle of papillary thyroid carcinoma cell.

Key words: Papillary thyroid neoplasms; Human chorionic gonadotropin; Proliferation

摘要: 目的 研究人绒毛膜促性腺激素(hCG)对甲状腺乳头状癌细胞增殖活力及细胞周期的影响。**方法** 选用甲状腺乳头状癌细胞株IHH-4为研究对象,采用细胞增殖活性实验MTT(四甲基偶氮唑盐比色法)及流式细胞术检测不同浓度、不同作用时间hCG对IHH-4细胞增殖活力、细胞周期的影响。**结果** hCG能刺激IHH-4细胞的活力,浓度为100 IU/ml时最为明显;在100 IU/ml的hCG作用48 h后, IHH-4细胞G₂M+S期的百分比为67.1%,显著高于对照组。**结论** 人绒毛膜促性腺激素对甲状腺乳头状癌细胞的生长活力有促进作用,并能加快其细胞周期。

关键词: 甲状腺乳头状癌; 人绒毛膜促性腺激素; 增殖

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A

0 引言

甲状腺肿瘤是发病率最高的内分泌肿瘤,约占所有新诊断肿瘤的1%,它的发生发展与环境和遗传因素密切相关^[1]。妊娠期由于机体的激素水平及个人情绪等因素波动较大,对甲状腺癌的发生及发展都有重大影响^[2-4]。人绒毛膜促性腺激素(hCG)是由胎盘绒毛组织分泌的一种糖蛋白激素。在妊娠期, hCG水平成倍增加,是体内浓度变化最大最明显的激素。邢艳等^[5]的研究发现hCG对卵巢癌有明显促进作用,而Lopez等^[6]却发现纯化的hCG能诱导乳腺癌的凋亡,其在不同肿瘤中完全不同的作用引起了我们极大的兴趣和思考。hCG对甲状腺癌是否有影响,目前仍没有定论,本研

究主要通过体外实验从细胞水平探寻人绒毛膜促性腺激素对甲状腺乳头状癌细胞增殖活力及细胞周期的影响,从而对临床处理妊娠期甲状腺癌提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 主要试剂 人甲状腺乳头状癌细胞株IHH-4来源于日本国家生物医学创新研究所(national institute of biomedical innovation, JCRB);标准胎牛血清(FBS)、RPMI 1640培养液和DMEM培养液(美国Invitrogen公司);细胞周期分析试剂盒(美国BD公司);人绒毛膜促性腺激素和MTT(美国Sigma公司)。

1.1.2 细胞培养 人甲状腺乳头状癌细胞株IHH-4复苏成功后,用含10%胎牛血清、2 mM谷氨酰胺、50 u/ml青霉素、50 ug/ml链霉素的由RPMI 1640和DMEM按1:1配置的培养液中。所有的细胞均在37℃

收稿日期: 2013-05-27; 修回日期: 2013-09-29

基金项目: 上海市卫生局科研课题资助项目(2012029)

作者单位: 200127 上海, 上海交通大学医学院附属仁济医院头颈外科

通信作者: 王家东, E-mail: drjiadongw@aliyun.com

作者简介: 周雅琪(1988-), 女, 硕士在读, 主要从事耳鼻咽喉及头颈部肿瘤外科诊治和基础研究

和5% CO₂及饱和湿度的条件下培养,每1~2天换液,细胞铺满培养瓶后以0.25%胰蛋白酶-EDTA按1:3消化传代,选用对数期生长的细胞进行实验^[7]。

1.2 实验方法

1.2.1 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)

MTT即 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,主要用来检测细胞的生长与活力。取对数期生长的人甲状腺乳头状瘤细胞株IHH-4接种于96孔板中,设置实验孔、对照孔及空白孔,每组均设置5个复孔,待细胞贴壁后于含有不同浓度的人绒毛膜促性腺激素的培养液中(10 mIU/ml、100 mIU/ml、500 mIU/ml、1 IU/ml、10 IU/ml、100 IU/ml)培养24、48、72 h,加入MTT溶液后再培养4 h,之后每孔加入二甲亚砜(DMSO)低速振荡10 min,用酶标仪(Multiskan MK3)设定560 nm波长检测每孔OD值。舍弃差异较大的复孔OD值,实验结果取各组复孔平均值^[6]。

1.2.2 流式细胞术检测细胞周期 将对数期生长的IHH-4细胞接种于6孔板中,待细胞贴壁后予以含不同浓度hCG(1、10、100 IU/ml)的培养液中培养24、48、72 h后收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗两次后予以70%乙醇固定,4℃条件下过夜后碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪检测细胞周期并用CellQuest软件分析结果^[8]。

1.3 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件SAS 9.3对数据进行t检验、方差齐性检验、正态分布检验。多组间采用随机单位组设计资料的方差分析(two-way ANOVA),各组内样本采用单因素方差分析(ANOVA),计量资料采用成组设计的t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

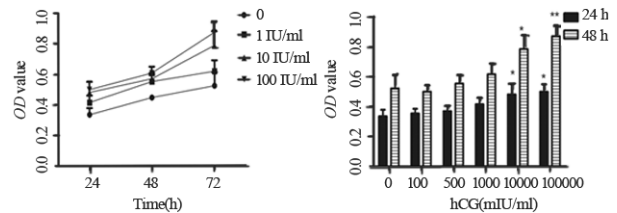
2.1 hCG对甲状腺乳头状癌细胞增殖活性的影响

培养24、48、72 h,组间有明显变化,IHH-4细胞的增殖活力增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),于不同浓度处理24~72 h后观察发现,于hCG浓度10 IU/ml、100 IU/ml处理的细胞具有明显的增殖活力,与对照组相比差异有统计学意义,见图1。

2.2 hCG对甲状腺乳头状癌细胞周期的影响

应用流式细胞术检测在不同hCG浓度以及不同作用时间下IHH-4细胞周期的变化情况,结果显示在hCG的作用下S+G₂M期的百分比有明显的增加。与对照组相比,hCG浓度为100 IU/ml时细胞周期改变最为显著,暴露于100 IU/ml hCG 48 h的实验组S+G₂M期的百分比为67.1%,显著高于未处

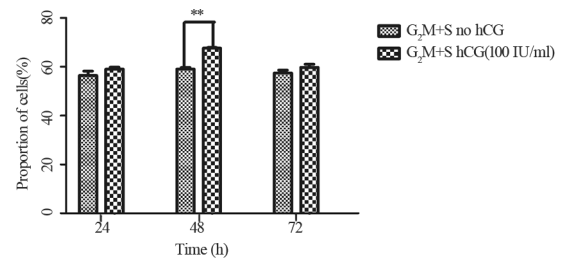
理对照组。而随着时间的延长,持续作用至72 h,其效应逐渐减弱,见图2。



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

图1 hCG在不同浓度和不同时间对甲状腺乳头状癌细胞IHH-4增殖的影响

Figure 1 The proliferation activity of papillary thyroid carcinoma cell line IHH-4 influenced by hCG at different concentration and different time



** : $P < 0.01$

图2 hCG在不同时间及浓度对甲状腺乳头状癌细胞IHH-4周期的影响

Figure 2 The cell cycle in papillary thyroid carcinoma cell line IHH-4 influenced by hCG in different concentration and different time

3 讨论

当hCG在1927年被首次发现以来,一直是作为妊娠相关因子被人们所熟知的。正常人的hCG水平应 < 0.1 ng/ml,在妊娠期hCG水平发生剧烈改变,妊娠第4周hCG水平开始升高,第7周达3 278 ng/ml,第10周是最高峰,高达10 352 ng/ml,之后开始下降,13周以后维持在2 000 ng/ml左右^[9]。高浓度的hCG对维持妊娠有重要作用。

但hCG与肿瘤有着错综复杂的关系,许多研究均证实hCG对多种肿瘤细胞的生长有促进作用。Gillott等^[10]研究表明hCG能促进膀胱癌细胞的增殖,具有剂量依赖性,而与抗 β -hCG的抗血清共同孵育会拮抗这些作用,Butler等^[11]认为hCG对膀胱癌细胞的作用主要是通过抑制细胞凋亡而达到,且 β -hCG能抑制TGF β 1诱导的凋亡, β -hCG对宫颈癌细胞也有一定的凋亡抑制作用^[12]。但hCG对不同肿瘤的作用却不尽相同,Lopez等^[6]发现人绒毛膜促性腺激素能诱导乳腺癌细胞的凋亡,在裸鼠成瘤中予以hCG处理组的瘤体可见37%的凋亡率,远远高于对照组14%,处理6天后可见凋亡小体形成及肿瘤完全坏死,通过细胞增殖活力实验还发现hCG能降低多种体外培养乳腺癌细胞

系的活力,部分与表达hcg/LH受体有关。hCG还能促进血管生成和肿瘤细胞的转移,近年有学者报道^[13]hCG与血管内皮生长因子VEGF之间有交互作用,在子宫内膜的血管生成过程中有一定的作用,通过免疫组织化学看到表达 β -hCG的宫颈癌组织具有更多的新生血管^[12]。 β -hCG还能调节E-钙黏蛋白,E-钙黏蛋白是上皮细胞之间重要的连接蛋白,Wu等^[14]发现 β -hCG能下调E-钙黏蛋白,从而促进膀胱癌细胞的浸润和转移。

有些肿瘤细胞能自行分泌 β -hCG,在肺癌、膀胱癌、乳腺癌、口腔癌、胃癌中均有表达,被认为与不良预后和较差的生存率有关,因此常被作为一种恶性肿瘤标志物^[15]。有些甲状腺乳头状癌同样也能分泌hCG,Sakaguchi等^[16]研究甲状腺乳头状癌细胞系B-CPAP异位分泌的hCG对小鼠甲状腺细胞系FRTL-5的作用,发现提纯的异位hCG与标准hCG的作用一样都能促进环磷酸腺苷cAMP的积累和³H胸苷进入细胞,从而促进甲状腺细胞的增值,具有剂量依赖性,而抗 β -hCG抗体能拮抗这些作用。学者们早前已经开始研制基于异位 β -hCG的肿瘤疫苗,经过这么多年,已有了不少更新和进展,现在有选择性hCG疫苗,如抗 β -hCG CTP疫苗、hCG GA68突变型疫苗及人 β -hCG抗树突状细胞相关抗体疫苗,这些疫苗许多已经进行过I期甚至II期临床试验^[15],但并非所有肿瘤细胞都表达 β -hCG,有些正常组织细胞也能低表达 β -hCG,故基于此的基因治疗仍有许多需要考虑和改进的地方。

早在90年代学者们已经开始研究hCG与甲状腺的关系了,但他们之间具体关系却并不明确,也较少有人研究hCG对甲状腺肿瘤细胞本身的作用,Yoshimura等^[17]认为hCG具有与TSH相似的调节碘代谢作用,能竞争性与促甲状腺激素受体TSHR结合继而刺激甲状腺细胞生长,具有剂量依赖性,且适宜浓度与正常妊娠期母体内hCG的浓度相似。但是hCG对甲状腺癌的作用目前仍有争论,在丹麦一个大型的促生育剂队列研究中,发现hCG与甲状腺癌的发生并无显著的相关性^[18]。

本研究发现,高浓度的hCG能显著促进甲状腺乳头状癌细胞的增殖活性,在浓度为10及100 IU/ml时最为明显,细胞周期的结果也证实了这一点。在MTT实验中,我们看到在浓度为100 IU/ml的hCG分别作用24、48、72 h后增殖活力明显增加,但是细胞周期的结果示48 h周期最为活跃,到72 h有所减低,这之间的矛盾可能与培养细胞的营养环境改变有关,72 h处于增殖期的细胞比例会有所下降。

本文通过体外细胞学实验,证实hCG对甲状腺乳头状癌细胞的生长有明显促进作用,对细胞

周期有明显促进,但仍需要更进一步的实验来探讨其作用途径及相关分子水平变化以及不同种类的hCG对甲状腺癌细胞的作用和相互关系。对于临床工作者来说,更需要重视妊娠期甲状腺癌患者,对其密切随访,制定更为有效的治疗方法,以减少肿瘤的复发和转移。

参考文献:

- [1] Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets [J]. *Mod Pathol*,2008,21 Suppl 2:S37-43.
- [2] Mazzaferrri EL. Approach to the pregnant patient with thyroid cancer[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2011,96(2):265-72.
- [3] Xiang J, Li DS, Wu Y. The impact of pregnancy on differentiated thyroid cancer[J]. *Zhonghua Nei Fen Mi Wai Ke Za Zhi*,2010,4(4):252-4. [向俊,李端树,吴毅.妊娠对分化型甲状腺癌的影响[J].中华内分泌外科杂志,2010,4(4):252-4.]
- [4] Vannucchi G, Perrino M, Rossi S, *et al*. Clinical and molecular features of differentiated thyroid cancer diagnosed during pregnancy[J]. *Eur J Endocrinol*,2010,162(1):145-51.
- [5] Xing Y, Liao Y, Chen ML. The effect of hCG on cell growth and cell cycle of human ovarian cancer cell line 3AO *in vitro*[J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao(Yi Xue Ban)*,2003, 34(2):347-8. [邢艳,廖英,陈曼玲. hCG对人卵巢癌细胞株3AO体外生长和细胞周期的影响[J].四川大学学报(医学版)2003, 34(2):347-8.]
- [6] Lopez D, Sekharam M, Coppola D, *et al*. Purified human chorionic gonadotropin induces apoptosis in breast cancer[J]. *Mol Cancer Ther*,2008,7(9):2837-44.
- [7] Gao Y, Wang C, Shan Z, *et al*. miRNA expression in a human papillary thyroid carcinoma cell line varies with invasiveness[J]. *Endocr J*,2010,57(1):81-6.
- [8] Liu X, Shen J, Zhan R, *et al*. Proteomic analysis of homocysteine induced proliferation of cultured neonatal rat vascular smooth muscle cells[J]. *Biochim Biophys Acta*,2009,1794(2):177-84.
- [9] Cole LA. hCG, the wonder of today's science[J]. *Reprod Biol Endocrinol*,2012,10:24.
- [10] Gillott DJ, Iles RK, Chard T. The effects of beta-human chorionic gonadotrophin on the *in vitro* growth of bladder cancer cell lines[J]. *Br J Cancer*,1996,73(3):323-6.
- [11] Butler SA, Ikram MS, Mathieu S, *et al*. The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free beta subunit of human chorionic gonadotrophin is a result of an anti-apoptosis effect and not cell proliferation[J]. *Br J Cancer*,2000,82(9):1553-6.
- [12] Li D, Wen X, Ghali L, *et al*. hCG beta expression by cervical squamous carcinoma--in vivo histological association with tumour invasion and apoptosis[J]. *Histopathology*,2008,53(2):147-55.
- [13] Herr F, Baal N, Reisinger K, *et al*. HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an *in vitro* study[J]. *Placenta*,2007,28 Suppl A:S85-93.
- [14] Wu W, Walker AM. Human chorionic gonadotropin beta (HCGbeta) down-regulates E-cadherin and promotes human prostate carcinoma cell migration and invasion[J]. *Cancer*,2006,106(1):68-78.
- [15] Talwar GP, Gupta JC, Shankar NV. Immunological approaches against human chorionic gonadotropin for control of fertility and therapy of advanced-stage cancers expressing hCG/subunits[J]. *Am J Reprod Immunol*,2011,66(1):26-39.
- [16] Sakaguchi N, Yoshimura M, Hershman JM, *et al*. Paracrine effect of human chorionic gonadotropin ectopically produced from papillary thyroid cancer cells on growth and function of FRTL-5 rat thyroid cells[J]. *Thyroid*,1997,7(5):779-82.
- [17] Yoshimura M, Nishikawa M, Yoshikawa N, *et al*. Mechanism of thyroid stimulation by human chorionic gonadotropin in sera of normal pregnant women[J]. *Acta Endocrinol (Copenh)*,1991,124(2):173-8.
- [18] Hannibal CG, Jensen A, Sharif H, *et al*. Risk of thyroid cancer after exposure to fertility drugs: results from a large Danish cohort study[J]. *Hum Reprod*,2008,23(2):451-6.

[编辑: 黄国玲; 校对: 邱颖慧]