

雌二醇联合孕激素对卵巢癌细胞凋亡及 microRNA-15a 表达的影响

沈倩倩¹, 罗仪¹, 谢玉莲¹, 韩克² (1. 复旦大学附属中山医院青浦分院, 上海 201700; 2. 南京大学附属南京鼓楼医院, 南京 210000)

摘要: 目的 探讨雌二醇(E2)联合孕激素(P4)对 microRNA-15a(miR-15a)表达的影响。方法 采集手术中切除的卵巢癌组织标本进行细胞培养, 分 3 个处理组: E2 组, P4 组和雌二醇联合孕激素(E2+P4)组。激素处理后, MTT 法检测细胞存活率; 流式细胞技术检测细胞凋亡与细胞周期; qRT-PCR 法检测 Bcl-2, Bax 和 miR-15a 的相对表达量。结果 高浓度(浓度均为 10^{-4} mol·L⁻¹)的 E2, P4, E2+P4 能够降低卵巢癌细胞的存活率, 并表现为时间依赖性; 低浓度($\leq 10^{-8}$ mol·L⁻¹)E2 能够提高卵巢癌细胞的存活率。与对照组相比, 高浓度 E2, P4 和 E2+P4 能够增加卵巢癌细胞的凋亡率($P < 0.001$), 并且 E2+P4 的作用最明显; 低浓度 E2 能够抑制肿瘤细胞的凋亡($P < 0.001$)。E2, P4 和 E2+P4 对细胞周期的影响没有统计学差异。高浓度的 E2, P4 和 E2+P4 能够下调 Bcl-2 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 上调 Bax 的表达($P < 0.001$); 但是低浓度 E2 作用却相反。高浓度的 E2+P4 能够促进 miR-15a 的表达($P < 0.001$)。结论 高浓度的 E2, P4 和 E2+P4 能够降低细胞的存活率促进细胞凋亡, 下调 Bcl-2 的表达, 上调 Bax 的表达; 低浓度 E2 的作用则相反; 高浓度的 E2+P4 能够促进 miR-15a 的表达。

关键词: 雌二醇; 孕激素; 卵巢癌; Bcl-2; Bax; microRNA-15a(miR-15a)

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)13-1643-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.13.009

引用本文: 沈倩倩, 罗仪, 谢玉莲, 等. 雌二醇联合孕激素对卵巢癌细胞凋亡及 microRNA-15a 表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1643-1647.

Effect of Estradiol Combined with Progestogen on Apoptosis of Ovarian Cancer Cell and Expression of MicroRNA-15a

SHEN Qianqian¹, LUO Yi¹, XIE Yulian¹, HAN Ke² (1. Qingpu Branch of Zhong Shan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China; 2. The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effect of estradiol(E2) combined with progestogen(P4) on expression of microRNA-15a(miR-15a). **METHODS** The primary ovarian cancer cells from clinical ovarian cancer tissues were isolated and cultured, and divided into 3 groups: E2 group, P4 group, E2 combined with P4(E2+P4) group. The survival rate of ovarian cancer cells after the treatment was analyzed by MTT assay. Apoptosis rate and cell cycle were measured by flow cytometry. Moreover, the relative abundance of miR-15a, Bcl-2 and Bax expressions were detected by qRT-PCR. **RESULTS** High concentration (10^{-4} mol·L⁻¹) of E2, P4 and E2+P4 inhibited the survival rate of ovarian cancer cells with a time dependent manner. However, low concentration($\leq 10^{-8}$ mol·L⁻¹) of E2 induced the survival rate of ovarian cancer cells. Compared with control group, high concentration of E2, P4 and E2+P4 induced apoptosis of ovarian cancer cells($P < 0.001$), and the most obvious effect of promoting apoptosis was E2+P4. However, low concentration of E2 reduced apoptosis of ovarian cancer cells($P < 0.001$). E2, P4 and E2+P4 had no effect on cell cycle. High concentration of E2, P4 and E2+P4 reduced the expression of Bcl-2($P < 0.05$ or $P < 0.001$), but they induced the expression of Bax($P < 0.001$). However, the effect of low concentration of E2 was opposite. Moreover, high concentration of E2+P4 could promote the expression of miR-15a($P < 0.001$). **CONCLUSION** High concentration of E2, P4 and E2+P4 significantly inhibit the survival and promote the apoptosis, reduce the expression of Bcl-2, and induce the expression of Bax in ovarian cancer cells. However, the effect of low concentration of E2 is opposite. High concentration of E2+P4 can induce the expression of miR-15a.

KEYWORDS: estradiol; progesterone; ovarian cancer; Bcl-2; Bax; microRNA-15a(miR-15a)

卵巢是多种激素作用的靶器官, 卵巢癌的发病率居妇科恶性肿瘤第 3 位, 其起病隐匿, 约 2/3 的患者初诊时已是中晚期, 手术及化疗效果欠佳, 5 年生存率 $<30\%$ ^[1-2]。长期临床工作发现多产妇和长期服用避孕药的妇女发生卵巢癌的风险明显降低,

其具体机制不明。

近年来大量的研究表明^[3], miRNA 参与调控卵巢癌的增殖、凋亡及转移。本研究探讨了女性激素对卵巢癌细胞增殖调控、Bcl-2、Bax 及 miR-15a 的影响。

作者简介: 沈倩倩, 女, 硕士 Tel: 18116016011 E-mail: seasy84@126.com

1 材料

1.1 样本

无菌条件下取得 60 例卵巢浆液性腺癌患者组织标本,均选自江苏省南京市鼓楼医院妇科(2011 年 6 月—2016 年 12 月),所有标本经病理学确诊。患者年龄范围 35~80 岁,平均年龄 53 岁。

1.2 仪器与试剂

15%胎牛血清、DMEM、青-链霉素双抗(美国 Gibco 公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT 溶液, PBS 配制)、二甲基亚砷(DMSO)、雌二醇(E2,批号: E2758-1G)、孕激素(P4,批号: P0130-25)(美国 Sigma 公司);细胞凋亡、细胞周期试剂盒(BD 公司,批号: APOAF-20TS7, NG-CR002);RNA 逆转录试剂盒、PCR 反应试剂盒(日本 TAKARA 公司,批号: NG-CR002)。

721-100 型紫外分光光度计(美国 PerkinElmer 公司);2720 型 PCR 扩增仪和 7500 型实时荧光定量 PCR 系统为美国 Applied Biosystems 公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养

无菌条件下剪碎组织,经 0.25%的胰酶消化,400 目过滤网滤过后得到单细胞悬液,加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液,差速贴壁法去除成纤维细胞使细胞纯度达到 95%。将细胞置于含 5% CO₂ 的 37 °C 温箱孵育。用于实验的细胞传代不超过 4 代,且均处于对数生长期。

2.2 MTT 检测细胞的生存率

E2 和 P4 经无水乙醇溶解,用培养液制成工作液备用。设置 4 个 E2、P4 和 E2+P4 的浓度: 10⁻¹⁰, 10⁻⁸, 10⁻⁶, 10⁻⁴ mol·L⁻¹。收集对数生长期的细胞(浓度 1×10⁵·mL⁻¹),铺于 96 孔板中,每孔 100 μL,24 h 后换液,每块 96 孔板设置 1 个空白对照组,1 个阴性对照组,1 个阳性对照组,12 个实验组,每个组设 5 个复孔。阴性对照组含细胞和培养液;阳性对照组是含乙醇的培养液和细胞;空白对照组只有培养液,实验组是含不同浓度药物的培养液,每孔均 200 μL。加药后置于培养箱内孵育 24, 48, 72 h。试验时间结束后弃去培养液加入无血清培养液再加入 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 溶液 20 μL,继续培养 3 h。吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,置于平板振荡器,避光水平震荡 10 min,酶标仪(波长 490 nm)上检测吸光度(A)值。重复 3 次,取其均值并计算细胞生存率。

细胞存活率=(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值)×100%。

2.3 流式细胞技术检测细胞凋亡率及细胞周期

取对数生长期的肿瘤细胞接种于 6 孔板中,每孔 3 mL(浓度为 5×10⁴·mL⁻¹),培养箱中孵育 24 h 后换液,根据 MTT 结果选择 E2、P4 和 E2+P4 的浓度都为 10⁻⁴ mol·L⁻¹,E2 低浓度(10⁻⁸ mol·L⁻¹)。用药 48 h 后用不含 EDTA 胰酶收集细胞,洗涤后加入 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide 混匀,室温下避光反应 15 min,流式细胞仪分析凋亡率,试验重复 3 次。

在细胞周期检测中,获得单细胞悬液的步骤与检测细胞凋亡率的前期步骤相同,在获得单细胞悬液后用 75%冰乙醇固定过夜(在 4 °C 条件下保存),离心后用 PBS 洗涤 2 次,加入 PI 染液 500 μL,避光室温下反应 30 min 经流式细胞仪分析细胞周期,重复 3 次。

2.4 qRT-PCR 检测细胞 RNA 的表达量

2.4.1 提取 RNA 细胞悬液接种于 6 孔板中,每孔 3 mL(细胞浓度是 5×10⁴·mL⁻¹),过夜贴壁后换液,设为 4 个组: E2、P4 和 E2+P4(10⁻⁴ mol·L⁻¹)和对照组。加药后孵育培养 48 h,trizol 法提取 RNA。

提取的 RNA 用核酸蛋白测定仪测定混合物的浓度和纯度,测定 A_{260/280} 值在 1.8~2.0 之间,表明所提 RNA 纯度良好。溶解后 RNA 保存于-80 °C 冰箱待用。

2.4.2 逆转录 根据 RNA 逆转录试剂盒要求配置逆转录体系,然后在 PCR 扩增仪中进行逆转录。逆转录条件: 42 °C, 15 min; 85 °C, 5 s; 酶失活反应: 4 °C, +∞; 反应完成后将 cDNA 置于-20 °C 冰箱保存。

逆转录引物:

miR-15a: 5'-CTCAACTGGTGTCTGCTGGACTCG GCAATTCAGTTGAGCACAAACC-3';

U6: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';

Bcl-2: 5'-CCCAGCATGCGGCCTCTGTTT-3';

Bax: 5'-GACCCGGTGCCTCAGGATGC-3';

GAPDH: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'。

2.4.3 PCR 反应 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; PCR: 95 °C, 5 s; 60 °C, 34 s, 扩增 40 个循环; 熔解反应: 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min; 95 °C, 15 s。每个基因 2 个复孔,每个样本重复 3 次。根据 PCR 反应试剂盒要求配置 PCR 的反应体系。

Bcl-2 引物:

上游 5'-CCCAGCATGCGGCCTCTGTTT-3';

下游 5'-GCTCCCACCAGGGCCAAACT-3'。

Bax 引物:

上游 5'-GACCCGGTGCCTCAGGATGC-3';

下游 5'-GTCTGTGTCCACGGCGGCAA-3'。

GAPDH 引物:

上游 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3';

下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

miR-15a 引物:

上游 5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCAGCACA

TAATGG-3';

下游 5'-TGGTGTCTGTTGAGTCG-3'。

U6 引物:

上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';

下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

反应结果由 ABI 7500 软件分析, 计算 C_t 值,

Bcl-2 和 Bax 以 GAPDH 做为内参基因, miR-15a 以 U6 做为内参基因, 使用比较法($\Delta\Delta C_t$)来计算 Bcl-2、Bax、miR-15a 的相对表达量。各组目的基因 mRNA 相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。 $\Delta\Delta C_t = (\text{实验组目的基因 } C_t \text{ 值} - \text{实验组内参基因 } C_t \text{ 值}) - (\text{对照组目的基因 } C_t \text{ 值} - \text{对照组内参基因 } C_t \text{ 值})$ 。

2.5 统计学处理

用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理, MTT 的结果进行单因素方差分析检验。细胞凋亡率和细胞周期及 PCR 结果用 t 检验进行统计学分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 E2、P4、E2+P4 对卵巢癌细胞存活率的影响

3.1.1 E2 对卵巢癌细胞存活率的影响 在 4 个浓度组中, 高浓度 E2($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够降低卵巢癌细胞的存活率, 存在时间依赖性, 且差异具有统计学意义($P<0.001$); 当 E2 浓度是 $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够提高卵巢癌细胞的存活率, 结果见表 1。

3.1.2 P4 对卵巢癌细胞存活率的影响 在 P4 的 4 个浓度组中, 每个组 48 h 和 72 h 对细胞存活率的影响差异都具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。当 P4 浓度在 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对细胞存活率的影响更明显, 并且在 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 作用 72 h 降低细胞存活率最明显($P<0.001$)。结果见表 1。

表 1 雌二醇、孕激素和雌二醇联合孕激素对卵巢癌细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 1 Estradiol, progesterone and estradiol combined with progesterone at different concentrations affected the survival rate of ovarian cancer cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	卵巢癌细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
阴性对照组	—	100	100	100
雌二醇	10^{-4}	84.5 $\pm$ 2.6 ²⁾	73.1 $\pm$ 2.3 ²⁾	62.5 $\pm$ 2.3 ²⁾
	10^{-6}	101.2 $\pm$ 2.1	98.4 $\pm$ 2.5	98.6 $\pm$ 2.2
	10^{-8}	107.3 $\pm$ 2.2	103.9 $\pm$ 2.5	105.7 $\pm$ 2.0
	10^{-10}	105.6 $\pm$ 2.0	103.9 $\pm$ 2.4	106.8 $\pm$ 1.9
孕激素	10^{-4}	102.0 $\pm$ 3.6	94.9 $\pm$ 4.0 ²⁾	82.9 $\pm$ 4.5 ²⁾
	10^{-6}	95.5 $\pm$ 1.9	97.7 $\pm$ 1.9 ¹⁾	99.2 $\pm$ 2.1 ¹⁾
	10^{-8}	96.7 $\pm$ 2.0	101.5 $\pm$ 2.1 ¹⁾	101.1 $\pm$ 2.2 ¹⁾
	10^{-10}	102.3 $\pm$ 2.2	109.3 $\pm$ 2.1 ²⁾	104.0 $\pm$ 2.2 ²⁾
雌激素联合孕激素	10^{-4}	77.3 $\pm$ 6.0 ¹⁾	61.8 $\pm$ 5.0 ¹⁾	40.6 $\pm$ 3.0 ²⁾
	10^{-6}	100.6 $\pm$ 5.0	90.1 $\pm$ 4.0 ¹⁾	77.4 $\pm$ 3.0 ²⁾
	10^{-8}	106.7 $\pm$ 5.0 ¹⁾	94.6 $\pm$ 4.0	85.4 $\pm$ 3.0
	10^{-10}	111.7 $\pm$ 4.0 ¹⁾	99.9 $\pm$ 4.0 ¹⁾	88.9 $\pm$ 4.0 ²⁾

注: 与阴性对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with negative control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

3.1.3 E2+P4 对卵巢癌细胞存活率的影响 E2+P4 对细胞存活率的影响表现为时间-剂量依赖性。浓度在 10^{-10} , 10^{-8} , $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 24 h 内表现为增加肿瘤细胞的存活率, 但只有浓度在 $10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 有统计学意义($P<0.05$); 浓度在 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h 内 E2+P4 能够抑制肿瘤细胞的存活率, 并且具有统计学意义($P<0.05$)。当 E2+P4 浓度在 10^{-10} , 10^{-6} , $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 48 h 和 72 h 内表现为抑制肿瘤细胞的存活率, 以 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用最明显, 且有明显的统计学差异($P<0.001$)。结果见表 1。

3.2 E2、P4、E2+P4 对卵巢癌细胞凋亡率的影响

E2、P4 和 E2+P4 在浓度为 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够促进卵巢癌细胞的凋亡($P<0.001$), 并且 E2+P4 促进细胞凋亡最明显($P<0.001$); 当 E2 浓度为 $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 表现为抑制卵巢癌细胞的凋亡($P<0.001$)。结果见表 2。

表 2 雌二醇、孕激素和雌二醇联合孕激素对卵巢癌细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 2 Estradiol, progesterone and estrogen combined with progesterone affected the apoptosis of ovarian cancer cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率/%
对照组	8.98 $\pm$ 0.656
孕激素($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	24.40 $\pm$ 0.188 ¹⁾
雌二醇($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	19.47 $\pm$ 0.155 ¹⁾
雌二醇($10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.45 $\pm$ 0.500 ¹⁾
雌二醇+孕激素($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	40.17 $\pm$ 4.736 ¹⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.001$ 。

3.3 E2、P4、E2+P4 对卵巢癌细胞周期的影响

E2、P4 和 E2+P4 对卵巢癌细胞周期没有影响,说明激素促进或者抑制卵巢癌细胞凋亡不是通过阻滞细胞周期实现的。结果见表 3。

表 3 雌二醇、孕激素和雌二醇联合孕激素对卵巢癌细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 3 Estradiol, progesterone and estradiol combined with progesterone affected the cell cycle of ovarian cancer cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照组	79.405±2.206	9.913±1.313	10.682±1.235
孕激素(10^{-4} mol·L ⁻¹)	79.722±2.469	8.177±1.628	12.101±1.295
雌二醇(10^{-4} mol·L ⁻¹)	79.044±2.159	6.952±1.650	14.004±1.327
雌二醇(10^{-8} mol·L ⁻¹)	76.348±2.555	12.620±1.991	11.032±1.320
雌二醇+孕激素(10^{-4} mol·L ⁻¹)	79.405±11.03	9.913±1.314	10.682±6.174

3.4 E2、P4、E2+P4 对 Bcl-2 表达的影响

E2、P4 和 E2+P4 在浓度为 10^{-4} mol·L⁻¹ 时下调 Bcl-2 的表达($P<0.05$), 而且 E2+P4 的作用更明显($P<0.001$)。当 E2 浓度是 10^{-8} mol·L⁻¹ 时, 却上调 Bcl-2 的表达。结果见表 4。

3.5 E2、P4、E2+P4 对 Bax 表达的影响

E2、P4 和 E2+P4 在浓度为 10^{-4} mol·L⁻¹ 时上调 Bax 的表达($P<0.001$), E2+P4 组与对照组相比较差异更明显。当 E2 浓度是 10^{-8} mol·L⁻¹ 时表现为下调 Bax 的表达。结果见表 4。

表 4 雌二醇、孕激素和雌二醇联合孕激素对 Bcl-2、Bax 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 4 Estradiol, progesterone and estradiol combined with progesterone affected the expression of Bcl-2 and Bax($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	Bcl-2 mRNA 相对表达量	Bax mRNA 相对表达量
对照组	8.403±1.715	0.883±0.059
孕激素(10^{-4} mol·L ⁻¹)	3.110±0.277 ¹⁾	1.358±0.191 ²⁾
雌二醇(10^{-4} mol·L ⁻¹)	4.428±0.560 ¹⁾	1.335±0.057 ²⁾
雌二醇(10^{-8} mol·L ⁻¹)	17.311±1.087 ²⁾	0.497±0.029 ²⁾
雌二醇+孕激素(10^{-4} mol·L ⁻¹)	2.986±0.626 ²⁾	1.757±0.326 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

3.6 高浓度的 E2+P4 对 miR-15a 的影响

E2+P4(10^{-4} mol·L⁻¹)能够促进 miR-15a 的表达($P<0.001$), 结果见表 5。

4 讨论

据统计, 2013 年美国约有 22 240 例新发卵巢癌患者, 约有 14 030 例患者死于卵巢癌^[4]。并且卵巢癌发病率每年上升约 20%, 绝经前妇女患卵巢癌比率较大, 绝经后妇女卵巢癌发病率为 1 : 2 500^[5]。

表 5 雌二醇联合孕激素对 microRNA-15a 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 5 Estradiol combined with progesterone affected the expression of microRNA-15a($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	microRNA-15a 相对表达量
对照组	1.030±0.211
雌二醇+孕激素(10^{-4} mol·L ⁻¹)	4.607±0.954 ¹⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.001$ 。

孕激素对卵巢癌细胞株体外生长的作用研究结果趋于一致。孕激素对卵巢癌细胞体外生长具有抑制作用, 且呈剂量依赖性^[6]。对缺乏孕激素受体的卵巢癌细胞株 OVCAR3, 孕激素浓度在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 才有显著抑制作用。目前孕激素抗癌作用的机制尚不清楚。Rodrguez 等^[7]报道, 孕激素介导的凋亡与卵巢表面上皮转化生长因子(TGF)表达转换密切相关。Li 等^[8]的实验表明, 孕激素可以下调卵巢癌细胞 SKOV3 的血管内皮细胞生长因子 mRNA 的表达。Paleari 等^[9]研究发现, 孕激素与孕激素受体结合调控卵巢癌细胞 Bcl-2 表达, 从而调控癌细胞的增殖继而影响卵巢癌患者的预后。这些研究表明, 孕激素通过促凋亡因素和抑制增殖因素 2 种途径抑制卵巢癌细胞的增殖。有研究者^[10]提出孕激素能够进入细胞核内直接与受体结合, 激活的受体促使细胞合成抑制蛋白质, 从而使卵巢癌细胞增殖受到抑制。总之孕激素对卵巢癌的抑制作用有统一结论。本研究的实验结果提示, P4 能够通过下调 Bcl-2 和上调 Bax 的表达来抑制卵巢癌细胞的增殖, 促进细胞凋亡。

与孕激素相比, 雌激素对卵巢癌细胞生长影响仍存在许多不同的观点, 雌激素与卵巢癌的发生发展是否相关一直是学术界争论的焦点。大样本的流行病学调查显示, 围绝经期雌激素能够促进卵巢癌的发生^[11]。Laviolette 等^[12]通过动物模型试验发现雌激素可促使卵巢肿瘤发展, 缩短整体存活时间。然而 Li 等^[13]研究提示, 高剂量雌激素对卵巢癌细胞的增殖有抑制作用。高浓度 E2 能够降低肿瘤细胞的存活率, 促进细胞凋亡; 然而低浓度 E2 却能够提高肿瘤细胞生存率, 并以 10^{-8} mol·L⁻¹ 的作用最强; 后续研究结论提示, 低浓度 E2 能够促进 Bcl-2 的表达, 下调 Bax 的表达; 高浓度 E2 对 Bcl-2 和 Bax 的作用恰好与低浓度 E2 的作用相反, 由此推断 E2 对肿瘤细胞生存率和凋亡率的影响与其影响 Bcl-2 和 Bax 的表达相关。

Bcl-2 家族是最早被发现的与细胞凋亡相关的蛋白^[14]。在这个家族中, Bcl-2 的主要作用是抑制凋亡; Bax 主要作用为促进细胞凋亡^[15]。小分子 RNA(microRNA)是一类非编码 RNA, 它通过与目的基因的信使 RNA 的 3'端非编码区结合抑制基因的表达, 调控细胞的发育、增殖、分化和凋亡^[16-17]。越来越多的证据表明^[3], MiRNA 表达异常会促进疾病的发生和发展, 影响患者的预后, 尤其是肿瘤患者。Bonci 等^[18]提出 miR-15a 和 miR-16 在癌组织中的表达低于正常组织。另有研究表明^[19-20]miR-15 和 miR-16 能够下调目标基因 Bcl-2 的表达, 从而抑制肿瘤的发生和发展。因为通过表达 Bcl-2 蛋白质与许多类型癌症的发生相关, 进而 Cimmino 等^[21]和 Sanchez 等^[22]提出 miR-15a 能够抑制 Bcl-2 基因的表达, 从而抑制肿瘤的发生和转移。关于 E2 联合 P4 作用于卵巢癌的研究较少, 本研究结论提示无论从生存率还是凋亡率, 甚至在基因表达的水平上, E2 联合 P4 对卵巢癌细胞的抑制作用更明显。而且笔者所在团队发现 E2+P4 能够促进卵巢癌细胞 miR-15a 的表达, 说明 E2+P4 通过调节 miR-15a 的表达来调控 Bcl-2 的表达从而达到抑制癌细胞的增殖。但是 E2+P4 是通过何种途径调节 miR-15a 的表达是需要进一步研究的内容, 其可能机制有激素通过膜受体作用后影响细胞内相关信号通路的作用来调节 miR-15a 的表达, 或者直接影响 Pten 等相关微小 RNA 调节蛋白来影响 miR-15a 的表达。

在 MTT 试验中低浓度的 E2 与 P4 均有刺激卵巢癌细胞增殖的作用, 但低浓度 E2 与低浓度 P4 联合作用后表现为抑制肿瘤细胞增殖的作用, 可能机制为经 E2 刺激的肿瘤细胞表达的 P4 受体增加, 进而增加了 P4 的局部作用率导致的相关实验结果为抑制肿瘤细胞增殖。

REFERENCES

- [1] DONG X, MEN X, ZHANG W, et al. Advances in tumor markers of ovarian cancer for early diagnosis [J]. Indian J Cancer, 2014, 51(Suppl 3): e72-e76.
- [2] OZOLS R F, BUNDY B N, GREER B E, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(17): 3194-3200.
- [3] LEE Y S, DUTTA A. MicroRNAs in cancer [J]. Annu Rev Pathol Mech Dis, 2009, 4(1): 199-227.
- [4] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. Ca: Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [5] BAST R C, BREWER M, ZOU C P, et al. Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? [M]//Cancer Prevention. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg: 91-100. Doi: 10.1007/978-3-540-37696-5_9
- [6] RODRIGUEZ G C, TURBOV J, ROSALES R, et al. Progestins inhibit calcitriol-induced CYP24A1 and synergistically inhibit ovarian cancer cell viability: An opportunity for chemoprevention [J]. Gynecol Oncol, 2016, 143(1): 159-167.
- [7] RODRIGUEZ G C, NAGARSHETH N P, LEE K L, et al. Progesterone-induced apoptosis in the Macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta [J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(1): 50-60.
- [8] LI H, SUN H. Effect of estrogen and progesterone on the expression of VEGF mRNA in epithelial ovarian cancer cell line [J]. Chin J Oncol, 2004, 26(5): 264-267.
- [9] PALEARI L, GANDINI S, PROVINCIALI N, et al. Clinical benefit and risk of death with endocrine therapy in ovarian cancer: a comprehensive review and meta-analysis [J]. Gynecol Oncol, 2017, 146(3): 504-513.
- [10] SAEGUSA M, OKAYASU I. Progesterone therapy for endometrial carcinoma reduces cell proliferation but does not alter apoptosis [J]. Cancer, 1998, 83(1): 111-121.
- [11] FOLKERT E J, DOWSETT M. Influence of sex hormones on cancer progression [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(26): 4038-4044.
- [12] LAVIOLETTE L A, GARSON K, MACDONALD E A, et al. 17beta-estradiol accelerates tumor onset and decreases survival in a transgenic mouse model of ovarian cancer [J]. Endocrinology, 2010, 151(3): 929-938.
- [13] LI Z B, CHEN Y X, ZHAO J Y, et al. Effects of pharmacological concentrations of estrogens on growth of 3AO human ovarian cancer cells [J]. Acta Genet Sin, 2006, 33(9): 782-792.
- [14] ADAMS J M, CORY S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy [J]. Oncogene, 2007, 26(9): 1324-1337.
- [15] DATTA S R, RANGER A M, LIN M Z, et al. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis [J]. Dev Cell, 2002, 3(5): 631-643.
- [16] INUI M, MARTELLO G, PICCOLO S. MicroRNA control of signal transduction [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(4): 252-263.
- [17] LI W X, XIE L, HE X H, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma [J]. Int J Cancer, 2008, 123(7): 1616-1622.
- [18] BONCI D, COPPOLA V, MUSUMECI M, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities [J]. Nat Med, 2008, 14(11): 1271-1277.
- [19] CALIN G A, DUMITRU C D, SHIMIZU M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [20] CALIN G A, CIMMINO A, FABBRI M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(13): 5166-5171.
- [21] CIMMINO A, CALIN G A, FABBRI M, et al. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting Bcl2 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(39): 13944-13949.
- [22] SÁNCHEZ-BEATO M, SÁNCHEZ-AGUILERA A, PIRIS M A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas [J]. Blood, 2003, 101(4): 1220-1235.

收稿日期: 2018-08-25
(本文责编: 李艳芳)