DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.006
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
670 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0670-04

去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系CHG-5生长的影响

徐承平,卞修武,章 容,殷育松 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 观察去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)对人恶性胶质瘤细胞系CHG-5体内外生长的影响。方法 采用MTT法、流式细胞仪、光镜等技术观察CHG-5细胞体外增殖、细胞周期、凋亡和裸鼠移植瘤生长情况。结果 NDGA可显著抑制CHG-5细胞体外增殖,G_0/G_1期细胞明显增多,S、G_2/M期细胞减少,凋亡细胞增加。采用接种后第5天按50 mg/kg腹腔内注射给药,治疗组移植瘤体积较对照组缩小,未见明显的毒副作用。结论 NDGA对CHG-5细胞的体内外生长具有一定的抑制作用,其作用可能与细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡有关。

关键词:去甲二氢愈创木酸;胶质瘤;细胞周期;凋亡;异种移植
中图法分类号:R73-354;R730.264;R979.1 文献标识码:A

Effects of NDGA on the growth of a human malignant glioma cell line CHG-5

XU Cheng-ping, BIAN Xiu-wu, ZHANG Rong, YIN Yu-song (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on the growth of a human malignant glioma cell line CHG-5 *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Colorimetric MTT assay, flow cytometry, and light microscopy were used to investigate the proliferation *in vitro*, cell cycles, apoptosis of CHG-5 cells, and the growth of xenografted tumor in nude mice. **Results** NDGA significantly inhibited the proliferation of CHG-5 cells *in vitro*. Cells in G_0/G_1 phase increased, but cells in S, G_2/M phases decreased, and apoptotic cells increased significantly. After treatment of NDGA (50 mg/kg, intraperitoneally) at 5 d after the inoculation of tumor cells, the xenografted tumor volume reduced remarkably without causing significant toxic and side effects. **Conclusion** The inhibitory effect of NDGA on the growth of CHG-5 cells may be correlated with the regulation of cell cycles and induction of apoptosis.

Key words: nordihydroguaiaretic acid; glioma; cell cycle; apoptosis; xenograft

恶性胶质瘤是最常见的脑肿瘤之一,由于其位置的特殊性和肿瘤本身的高侵袭性,目前对该瘤的治疗尚缺乏理想的治疗方法。积极探索更有效的抗胶质瘤药物对临床治疗胶质瘤具有十分重要的意义。近年研究发现,从常青灌木中提取的一种天然物质—去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA),具有多种生物学功能,其中以其对多种肿瘤的发生和发展的抑制作用最为引人注目[1],但其对人脑恶性胶质瘤的作用目前尚缺乏深入研究。本实验通过观察NDGA对人恶性胶质瘤细胞系CHG-5生长的影响作用,旨在探讨其抗胶质瘤作用以及可能机制,并为其进一步临床应用提供理论依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970268)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970268)
作者简介:徐承平(1972-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事血管生成和诱导分化治疗方面的研究。电话:(023)68752246
通信作者:卞修武,E-mail:bianxiuwu@263.net
收稿日期:2003-05-11;修回日期:2003-09-20

1 材料与方法

1.1 胶质瘤细胞来源及培养

人脑间变性星形细胞瘤细胞系CHG-5由本室建立[2],按本室常规方法培养,即用含10%小牛血清(Hyclone公司)的RPMI 1640(Hyclone公司)完全培养基,另添加适量HEPES、双抗(100 U/ml青霉素及100 μg/ml链霉素)、3%谷氨酰胺,置37 ℃、5% CO_2混合气体孵箱中培养,细胞换液时间为1~2 d,每3~5天传代1次,传代前用0.25%胰酶消化。

1.2 NDGA溶液的配制

准确称取NDGA粉剂,用PBS配置浓度为4 mmol/L的溶液,37 ℃水浴并调整pH值直至完全溶解为止(溶液呈浅棕黄色,pH 7.4),过滤除菌,备用。

1.3 细胞形态观察及生长曲线测定

实验分为对照组和试验组,试验组设4个浓度(NDGA终浓度为50,100,150,200 μmol/L),每一浓度设12、24、48、72 h四个时相点。取对数生长期的单层培养CHG-5细胞配制成1×10^4个/ml的细胞悬液,于96孔培养板接种200 μl/孔。培养12 h待细胞完全贴壁后弃掉旧培养基,分别加入用新鲜培养基稀释的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相应终浓度 NDGA 溶液 200 μl/孔, 培养 72 h 后每孔加入 MTT 溶液(Sigma 公司, 5 mg/ml)25 μl, 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸尽孔内培养上清液。每孔加入二甲亚砜(DMSO)150 μl, 振荡 10 min, 使细胞中形成的蓝紫色结晶物彻底溶解, 在 Wellscan MK3 型酶标仪上测波长 570 nm 处吸光度(*A*)值。实验重复 3 次取均值。

1.4　细胞周期检测

取生长良好的细胞, 制成单细胞悬液并调节细胞浓度在 1×10^5 个/ml, 分别接种于 50 ml 培养瓶中, 12 h 后加入 NDGA(终浓度为 100 μmol/L)和 PBS, 分别于给药后 12、24、48 h 收集细胞, PBS 离心洗涤两次, 注入 70% 冷乙醇固定并制成单细胞悬液用于细胞周期检测。检测前用 PBS 洗 1 次后加入 RNA 酶, 37 ℃ 孵育 30 min, 冰浴终止消化, 碘化丙锭(PI)染色 2 h, FACStarplus 型流式细胞仪检测, 每个样本随机测定 1×10^4 个细胞。每组、每时相点重复 3 次试验, 取均值计算。

1.5　细胞凋亡检测

实验分组同周期检测, 采用碘化丙锭(PI)和 Annexin V 双标法, 严格按照 Annexin-V-Fluos Staining Kit(Roche 公司)说明书操作。取 1×10^6 细胞以 PBS 洗 1 次, 离心收集细胞, 以新鲜配制的双标染色液室温孵育 10 ~ 15 min 后立即在流式细胞仪上检测凋亡峰。

1.6　动物体内抗瘤实验

使用本校实验动物中心引进的近交系雌性 BALB/c nu/nu 无胸腺裸小鼠, 体质量 15 ~ 20 g, 鼠龄 5 ~ 7 周, 饲养于 SPF 级无菌净化室内。胶质瘤皮下移植动物模型的建立采用胸前腋下接种 CHG-5 单细胞悬液 1×10^6 个/只; 原位移植模型的建立参照本科实验方法[3], 接种细胞量为 1×10^4 个/只, 并将裸鼠随机分为 NDGA 处理组和生理盐水对照组(每组 5 只)。于接种后第 5 天治疗组开始腹腔注射 NDGA 溶液(按 50 mg/kg, 每周 3 次), 对照组给予等体积生理盐水。定期观察裸鼠的生存情况、移植瘤形成和体积变化情况。分别在接种后 3 周和 4 周终止观察, 并进行光镜检查, 体积计算公式: V(体积) = $L\times W^2/2$ (mm^3)(L 为肿瘤最长径, W 为与 L 相垂直的最宽径)。

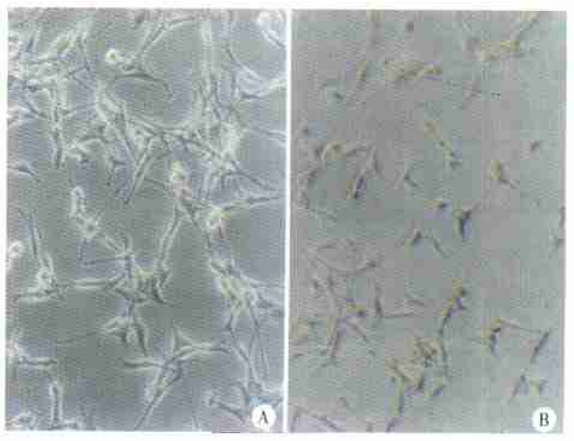
1.7　统计学处理

所有计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 专用数理统计分析软件对数据进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　NDGA 对 CHG-5 细胞形态及生长曲线的影响

CHG-5 细胞经不同浓度 NDGA 溶液处理以后, 分别于各时相点在倒置显微镜下观察, 结果见细胞在给药后 6 h 以内未见明显异常改变, 仅透亮性下降, 胞浆内颗粒稍增多。12 h 后见细胞开始以 100 μmol/L 浓度处理点为中心表现为两种情况, 浓度越低, 细胞增殖越活跃, 突起明显增多, 细胞透亮度、折光性增强; 相反, 浓度越高, 细胞增殖越低, 细胞活力下降(图 1)。以各时相点光吸收值(A_{570})平均值绘制生长曲线(图 2), 从细胞生长曲线图中可见, 与对照组相比, 50、100、150、200 μmol/L NDGA 对 CHG-5 细胞生长均有抑制作用, 并随着浓度的增加而愈加明显, 且在相同浓度时, 细胞数随时间延长而明显减少, 即呈剂量-时相依赖性。按作图法求得 NDGA 对 CHG-5 细胞生物活性影响的半数生长抑制浓度 IC_{50} 值为 52 μmol/L。



A: NDGA 50 μmol/L; B: NDGA 150 μmol/L

图 1　**CHG-5 细胞经 NDGA 作用 24 h 后, 低浓度组较高浓度组细胞透亮度增强, 突起变长**　(倒置显微镜× 100)

Fig 1　Brightness of CHG-5 cells in group A enhanced and processes extended at 24 h after treatment with 50 μmol/L, as compared with that in group B　(Inverted microscope × 100)

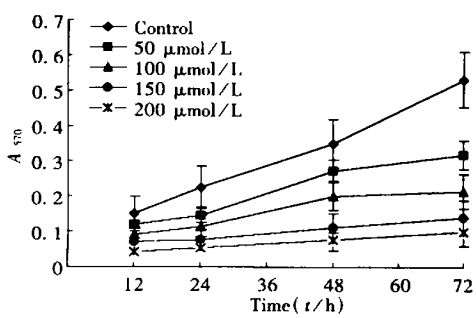


图 2　**不同浓度 NDGA 对 CHG-5 细胞生长的影响**

Fig 2　Effects of NDGA (various concentrations) on the growth of CHG-5 cells

2.2　NDGA 对 CHG-5 细胞生长周期的影响

NDGA 对 CHG-5 细胞生长周期的影响见表 1。从表中可见, 与对照组相比, 在 100 μmol/L NDGA 的作用下, CHG-5 细胞 G_0/G_1 期在 12、24、48 h 分别增加了 18%、25% 和 32%, S 期和 G_2/M 期则明显减少。从细胞增殖指数来看, NDGA 对细胞增殖表现出明显抑制作用, 且随着作用时间的延长, 其抑制作用愈加明显。

表 1　**NDGA 对 CHG-5 细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s$)**

Tab 1　Effects of NDGA on cell cycles of CHG-5 cells ($\bar{x}\pm s$)

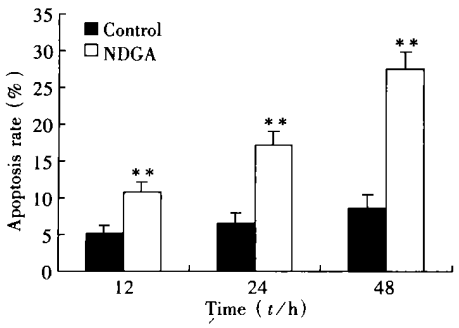
Cell cycle	Control	Cell numbers after NDGA treatment at different time points (%)		
		12 h	24 h	48 h
G_0/G_1	55.10±2.19	65.11±9.52 **	68.89±8.91 **	72.94±7.73 **
S	30.25±3.36	24.01±2.76 *	21.99±4.85 **	19.61±2.20 **
G_2/M	14.65±2.19	11.43±1.37 **	10.69±3.54 *	8.01±2.61 **

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

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 NDGA 对 CHG-5 细胞凋亡的影响

NDGA 对 CHG-5 细胞凋亡的影响如图 3 所示，与对照组相比，CHG-5 细胞在 100 μmol/L NDGA 的作用下，12 h 后即出现了明显的细胞凋亡峰，并随作用时间的增加而愈加明显，其中 24 h 和 48 h 的凋亡细胞数均较对照组增加了大约 3 倍，差异非常显著（$P<0.01$）。



**：$P<0.01$，*vs* control

图3 NDGA 处理不同时间后 CHG-5 细胞凋亡变化情况

Fig 3 Effect of NDGA on apoptosis rate of CHG-5 cells in various time

2.4 NDGA 对 CHG-5 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

本实验所有裸鼠在接种后全部存活。原位移植瘤治疗实验于接种后 21 d，皮下移植治疗实验于接种后 28 d 全部终止观察并活杀取材，常规病理检查、固定，分别测量各移植瘤的最长径和与之垂直的最宽径并计算出平均体积。结果皮下移植治疗组平均体积为（96.74±18.36）mm^3，较对照组（163.95±24.31）mm^3 明显缩小，差异显著（$P<0.05$）；原位移植治疗组平均体积为（11.20±3.04）mm^3，较对照组（13.53±3.22）mm^3 也减小，但差异不显著（$P>0.05$）。组织学检查见对照组移植瘤细胞排列紧密，成片团状分布，浸润性生长，可见较多核分裂像和丰富的微血管；而治疗组瘤细胞排列较稀疏，呈分散的小团块状或束状分布，核分裂像及微血管较少。所有裸鼠的肝、肾、肺、脾等主要脏器均未见明显的病变。

3 讨论

脂氧化酶抑制剂 NDGA 是从常青灌木 *Larrea divaricata* 和 *Guaiacum officinale* 中提取的一种天然成分，是一种相对无毒性且具有抗肿瘤作用等多种生物学活性的多功能分子，具有广谱的药理学活性，在抗炎症、抗病毒、抗过敏、损伤、止痛、肿瘤、糖尿病以及癌症预防等方面均有一定作用。研究者已先后发现其对胰腺肿瘤、前列腺癌、恶性黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、结肠癌、纤维肉瘤等多种实体瘤细胞的生长具有一定的抑制作用，并有预防肿瘤形成的作用，且对肿瘤转移和体内移植瘤的生长也有显著的抑制作用[1,4,5]。尤其近年随着 NDGA 类化合物在肿瘤治疗研究中所表现出来的良好的抗肿瘤作用，日益引起了人们的广泛关注[6~8]。Wilson 等早在 1989 年和 1990 年就报道了 NDGA 对体外培养的大鼠 C6、9L 和人 A-172、T98G 胶质瘤细胞具有增殖抑制作用，并获得了 NDGA 诱导人多形性胶质母细胞瘤细胞分化的超微结构证据。本科既往研究也显示 NDGA 对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 具有显著的抑制增殖和诱导分化作用，但关于 NDGA 对人恶性胶质瘤的作用，尤其是体内实验的研究报道甚少[9]。

人脑间变性星形细胞瘤细胞系 CHG-5 由本室自行建株（WHO Ⅱ级），NDGA 对其作用尚少见报道。为此，本实验在本所前期研究基础上，初步观察了 NDGA 对人 CHG-5 胶质瘤细胞体外生长的影响并初步探讨了其可能的作用机制，同时进一步观察了其对皮下和原位异种移植瘤生长的作用。体外实验结果表明 NDGA 对 CHG-5 胶质瘤细胞的生长具有明显的抑制增殖作用，且提示这种作用可能与其使细胞阻滞在 G_1 期、诱导细胞凋亡等密切相关，而诱导细胞分化和诱导细胞凋亡的作用机制一直是 NDGA 在抗肿瘤治疗研究中最重要的内容之一。Seufferlein 等[1] 发现 NDGA 在抑制人胰腺癌和宫颈癌体外生长和延缓其相应裸鼠移植瘤生长的同时也诱导了这些细胞的凋亡，并认为这种作用可能与 NDGA 选择性抑制了细胞周期蛋白 D1 的表达和一种丝状肌动蛋白细胞骨架的破坏有关。而在乳腺癌中，Tong 等[10] 认为其诱导细胞凋亡作用与激活细胞色素 c 和 caspase-9 途径以及改变 Bcl-2 家族蛋白水平等密切相关，因此，关于 NDGA 对细胞周期和凋亡影响的具体作用机制尚有待于进一步研究。动物体内实验是临床前期试验的一个重要而必经阶段，近年，有关 NDGA 体内抗肿瘤作用的报道日渐增多，并显示出良好的抗肿瘤作用，如对恶性黑色素瘤、结肠癌等移植瘤的生长均具有显著抑制作用。鉴于胶质瘤本身位置、生物学特性及生长微环境的特殊性，本研究采用原位移植和皮下移植模型进行了体内治疗试验，初步探讨 NDGA 的体内抗胶质瘤作用。结果在 50 mg/kg 腹腔给药下，皮下移植和原位移植治疗组移植瘤平均体积均较对照组缩小，组织学检查发现治疗组瘤细胞排列稀疏，核分裂像及微血管均较对照组明显减少，但两种治疗模型中以皮下移植组的抑制作用差异显著，而原位移植组的抑制作用相对较低，显著不差异，这种现象是否与血脑屏障、原位移植瘤的生物学特性等因素有关，尚待进一步研究。另外，本研究提示，积极探索 NDGA 在胶质瘤原位移植模型中的治疗作用可能更具有实际意义和临床价值。

结合本所以往研究及本实验结果，本研究初步表

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

明, 同其它肿瘤一样, NDGA 对人恶性胶质瘤细胞的体外生长及其异种移植瘤的生长也具有显著的抑制作用, 提示 NDGA 在胶质瘤治疗中具有一定研究和开发应用价值。尽管目前 NDGA 抑制肿瘤生长的具体作用机制尚不完全清楚, 但相信随着各项实验研究的不断深入完善, 提高 NDGA 在原位移植模型治疗实验中的有效性后, NDGA 有望成为一种新型的抗胶质瘤药物, 为胶质瘤的临床治疗提供一种新的治疗手段。

参考文献:

[1] Seufferlein T, Seckl M J, Schwarz E, *et al*. Mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced growth inhibition and apoptosis in human cancer cells [J]. Br J Cancer, 2002, 86(7): 1188－1196.

[2] 陈自强, 卞修武, 辛　榕, 等. 人脑胶质瘤细胞系 CHG-5 的建立及其生物学特性的分析[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(12): 880－883.

[3] 徐承平, 卞修武. 人 CHG-5 胶质瘤细胞裸鼠原位移植模型的建立及其生物学特性分析[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(4): 287－290.

[4] Moody T W, Leyton J, Martinez A, *et al*. Lipoxygenase inhibitors prevent lung carcinogenesis and inhibit non-small cell lung cancer growth[J]. Exp Lung Res, 1998, 24(4): 617－628.

[5] Ding X Z, Kuszynski C A, El-Metwally T H, *et al*. Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266(2): 392－399.

[6] McDonald R W, Bunjobpon W, Liu T, *et al*. Synthesis and anticancer activity of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and analogues[J]. Anticancer Drug Des, 2001, 16(6): 261－270.

[7] Hakimelahi G H, Shia K S, Pasdar M, *et al*. Design, synthesis, and biological evaluation of a cephalosporin-monohydroguaiaretic acid prodrug activated by a monoclonal antibody-β-lactamase conjugate[J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10(9): 2927－2932.

[8] Lambert J D, Meyers R O, Timmermann B N, *et al*. Tetra-O-methylnordihydroguaiaretic acid inhibits melanoma *in vivo*[J]. Cancer Lett, 2001, 171(1): 47－56.

[9] Bian X W, Shi J Q, Xin R. Effects of nordihydroguaiaretic acid on the growth and differentiation of SHG-44 glioma cell line[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 1997, 26(5): 285－288.

[10] Tong W G, Ding X Z, Adrian T E. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(4): 942－948.

（编辑　陈聪连）

（上接 662 页）

观察指标: 给氧前及给氧后 20 min 抽动脉血监测血气变化, 持续指尖 SaO_2 监测。

统计学处理: 采用 SPSS10.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

单纯鼻导管吸氧组吸氧后 PaO_2、SaO_2 略有升高, 而结合碳酸酰过氧化氢组给氧后 PaO_2、SaO_2 较给氧前升高显著($P<0.01$), 同时与单纯鼻塞吸氧组吸氧后相比 PaO_2、SaO_2 也有明显升高($P<0.05$), 有统计学意义。而 $PaCO_2$ 无明显改变, 见表 1。

表 1　单纯鼻塞给氧和结合碳酸酰过氧化氢后的血气分析变化($\bar{x}\pm s$)

血气分析指标	单纯鼻导管吸氧		结合碳酸酰胺过氧化氢	
	给氧前	给氧后	给氧前	给氧后
PaO_2(mmHg)	56.3±11.2	68.2±16.5	56.9±11.8	82.8±15.3 #△
SaO_2(%)	74.5±10.6	86.0±9.6	74.8±9.2	95.5±4.5 #△
$PaCO_2$(mmHg)	51.8±12.0	63.6±9.2	52.0±13.1	52.2±11.3

△: 与单纯吸氧组比较, $P<0.05$; #: 与结合碳酸酰胺过氧化氢组给氧前比较, $P<0.01$

3　讨论

注射用碳酸酰胺过氧化氢能有效地、快速地为机体提供充足的氧, 可以快速提高氧分压及血氧饱和度, 且不会引起二氧化碳潴留, 为抢救治疗争取时间[1]。纤维支气管镜检查过程中患者常出现 PaO_2 下降, 对于已存在低氧血症患者 PaO_2 进一步下降可增加生命危险[2]。以往低氧血症患者行纤支镜检时, 单纯采用鼻塞给氧, 一方面氧浓度提高慢且不显著, 另一方面行纤支镜检需占用一侧鼻腔, 易造成低氧血症加重, 操作不能安全地进行。本组资料表明, 单纯鼻塞给氧不能快速提高动脉血氧分压, 达到安全检查的最低阈值, 而鼻导管吸氧联合碳酸酰过氧化氢可以迅速提高 PaO_2, 避免或减轻纤支镜检查中缺氧对机体的损害, 提高检查的安全性。少数患者在用药过程中出现一过性头晕、恶心、轻咳均能自行缓解[3]。故低氧血症患者行纤支镜检查期间结合碳酸酰过氧化氢的方法值得提倡、推广。

关键词: 碳酸酰胺过氧化氢; 低氧血症; 纤维支气管镜
中图法分类号: R495.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 沈渝菊, 杨和平. 857 例老年肺部疾患的纤维支气管镜检查分析[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(3): 358.

[2] 卢家强, 邢世江, 吴述恒, 等. 注射用碳酸酰胺过氧化氢治疗低氧血症 43 例[J]. 广东医学, 2001, 22(12): 1176.

[3] 崔建军. 碳酸酰胺治疗慢性阻塞性肺病合并呼吸衰竭 19 例[J]. 山西临床医药, 2001, 10(7): 529－530.

（编辑　栾　嘉）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net