DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.014
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
280 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0280-04

去甲二氢愈创木酸对内皮细胞影响的形态学观察

孙慧勤[1],陈兆珍[2],陈意生[1],史景泉[1],卞修武[1],辛 榕[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院病理学研究所;[2]高原军事医学系中心实验室;重庆 400038)

提 要:目的 探讨去甲二氢愈创木酸(NDGA)对内皮细胞形态的影响及特点。方法 采用倒置显微镜、光镜、电镜和流式细胞仪观察分析不同浓度NDGA作用下人脐静脉内皮细胞系ECV-304细胞形态和细胞凋亡峰的变化。结果 ①不同浓度(50~200 μmol/L)的NDGA处理ECV-304细胞24~72 h后或一定浓度(100 μmol/L)的NDGA处理ECV-304细胞不同时间(1~7 d)后,内皮细胞由多角形变长,呈梭形,细胞稀疏,核分裂像明显减少,显示细胞增殖的抑制,上述变化与NDGA的浓度和作用时间有关;②NDGA处理后,部分细胞呈现出凋亡样形态学改变,以48 h为明显。流式细胞仪检测也出现明显高于对照的凋亡峰即亚G_0峰,12 h时相点最高(20.42%)。此外,处理后的细胞也有变性、坏死等病理变化,与NDGA的浓度呈正比。结论 NDGA对内皮细胞的生长和增殖有抑制,形态学初步证明也有诱导凋亡等作用,这在影响血管生成中可能具有一定意义。

关键词:去甲二氢愈创木酸;内皮细胞;凋亡;形态学
中图法分类号:R322.12;R977.3 文献标识码:A

Effect of nordihydroguaiaretic acid on the morphological changes of endothelial cells *in vitro*

SUN Hui-qin, CHEN Zhao-zheng, CHEN Yi-sheng, SHI Jing-quan, BIAN Xiu-wu, XIN Rong (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate morphological changes of endothelial cells after nordihydroguaiaretic acid (NDGA) treatment *in vitro*. Methods The morphological changes of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cell line ECV-304 and the cell apoptosis rate in sub-G_0 phase were observed with invert, light and electron microscope and flow cytometry after NDGA treatment at different concentrations or with PBS (0.01 mol/L) as control. Results ①After the treatment of NDGA at 50~200 μmol/L for 1~3 d or up to 8 d at 100 μmol/L, ECV-304 cells tended to elongate into a shuttle-like sparse appearance and those in mitosis were decreased, indicating the suppression of cell proliferation. All these alteration was in a time-and dose-dependent manner. ②NDGA-treated ECV-304 cells displayed morphological features of apoptosis, especially at the 48th h after the treatment. With flow cytometry, the cells in sub-G_0 phase were significantly increased, and reached its peak at hour 12 (20.42%) after NDGA treatment. In addition, the degeneration and necrosis of ECV-304 cells were related to the concentrations of NDGA. Conclusion NDGA can inhibit the proliferation and growth of endothhelial cells, and induce apopotosis, which might also inhibit angiogenesis.

Key words: nordihydroguaiaretic acid; endothelial cells; morphology; apopotosis

近年来对血管生成的研究有了长足的进步,病理条件下(如肿瘤、类风湿关节炎等)的血管生成发生的意义也获得了足够的重视,采用有效的血管生成抑制剂进行抗血管生成疗法也正接近临床。去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid,NDGA)具有抑制多种肿瘤的发生和发展的作用[1],但具体作用机制不清。本室多年的研究也发现NDGA对人恶性胶质瘤不但具有显著的抑制生长和诱导分化作用,而且对胶质瘤的血管生成也有影响[2]。我们在近来的研究中发现NDGA可抑制在体的血管生成,对内皮细胞的增殖活性、胶质瘤诱导的内皮细胞迁移、成型也有抑制[3~5]。血管内皮细胞是血管生成(Angiogenesis)过程中的最基本和最重要的角色,本研究采用形态学观察的方法,着重探讨NDGA影响内皮细胞增殖、生长和凋亡的形态学基础,进一步拓展其抗血管生成的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞系ECV-304(ATCC CRL-1998)细胞,在含10%新生小牛血清(BS)、双抗(青霉素100 U/ml,链霉素100 μg/ml)的M199培养基(Gibco产品)中于37 ℃、5%CO_2混合空气的孵箱(湿度为95%)中常规培养,每3 d左右换液1次,约3~5 d经0.25%胰酶、0.01%EDTA消化后传代。

1.2 实验分组

试验组为NDGA组,给不同浓度的NDGA(Sigma产品,);对照组为PBS组,给等体积0.01 mol/L的PBS(pH 7.2)。

1.3 NDGA对内皮细胞形态影响的观测

取生长良好的ECV-304细胞,消化制备单细胞悬液,按1×10^5/ml密度接种于预先置有干净消毒盖玻片的培养板(Gibco产品)或培养瓶中,次日细胞已贴壁生长,分试验组和对照组

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570295),重庆市科委应用基础研究资助项目
作者简介:孙慧勤(1964—),女,云南省昆明市人,博士,副教授,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68752246
通信作者:卞修武(E-mail:bianxiuwu@263.net)
收稿日期:2001-01-17;修回日期:2001-03-06

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

加入 NDGA(终浓度分别为 50、100、150 和 200 μmol/L)和 PBS 液, 然后于处理后不同时间进行不同指标的观测。

1.3.1　倒置显微镜观察　　经处理的活细胞于不同时相点在有恒温装置的倒置显微镜下观察并摄像记录形态学变化。

1.3.2　普通光镜观察　　100 μmol/L NDGA 作用后 1~7 d 的细胞分别经常规固定、HE 染色后, 在普通光镜下观察、摄像。

1.3.3　电镜观察　　分别将经 PBS、100 μmol/L NDGA 处理后 1~3 d 的细胞, 用 0.25% 的胰酶消化, PBS 离心洗涤, 收集, 3% 戊二醛磷酸缓冲液固定, 经常规包埋、切片、染色, 在 JEM-2000EX 型透射电镜下观察、照像。

1.4　流式细胞仪检测细胞凋亡

取生长良好的内皮细胞制备单细胞悬液, 以 1×10^4/ml/孔的量接种于 24 孔培养板中, 次日加入 NDGA 和 PBS 液, 使 NDGA 终浓度为 100 μmol/L, 于处理后 12、24、48、72 h 消化、收集细胞, 经 PBS 离心洗涤两次, 用微量移液器通过 350 目尼龙网注入 70% 冷乙醇中, 使成单细胞悬液, −20 ℃固定, 用于凋亡细胞检测。每组、每时相点 3 孔细胞, 取均值计算, 重复 3 次试验。

检测前, 倒掉乙醇, 用 PBS 洗 1 遍后加入 RNA 酶, 37 ℃温育 30 min 后, 放入冰浴中中止消化。经碘化丙锭染色 2 h 后以 FACStar^{plus}型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测, 用 LYSIS 软件分析测定凋亡细胞所特有的亚 G_0 峰。每个样本随机测定 1×10^4 个细胞。

1.5　数据统计学处理

所有计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用本校数理统计教研室提供的统计程序包 SPMR, 进行两样本均数间显著性检验; 计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　NDGA 作用下内皮细胞形态的变化

培养的内皮细胞在倒置显微镜或 HE 染色的普通光镜下观察呈单层生长, 细胞多角形或短梭形, 呈典型的卵石状镶嵌排列。胞核圆形或椭圆形, 有 1~2 个清晰的核仁, 可见双核细胞, 胞浆较丰富, 易见分裂像的细胞, 见图 1。

经 NDGA 处理后, 在倒置显微镜下可见细胞增殖受抑, 细胞数目较对照组减少, 细胞胞体由椭圆形变长, 呈梭形, 细胞透亮性(折光性)下降, 胞质粗糙, 颗粒感增强, 边缘不光滑, 部分细胞胞突回缩变圆, 甚至脱落呈悬浮状, 细胞碎片增多。上述变化随给 NDGA 后时间的延长和剂量的增加而加重, 100 μmol/L NDGA 作用 24 h 便出现明显的形态变化, 48 h 尤为明显, 72 h 更重。相同时相, 不同剂量的 NDGA 作用后, 50 μmol/L NDGA 引起的变化轻微, 100 μmol/L 的变化明显, 150、200 μmol/L 者则更重, 但与同等剂量、同一时相的 NDGA 作用后的胶质瘤细胞系 SHG-44 细胞相比, 其细胞增殖抑制(数目减少)程度、形态变化要轻。经固定、HE 染色后的细胞爬片镜下见内皮细胞分布稀疏, 细胞多呈梭形, 易见细胞老化如胞浆出现空泡, 核分裂像减少等现象; 部分细胞胞体缩小, 核浓缩, 核、浆深染, 并可见细胞正在形成含部分深染核及胞浆的多个小体或已形成的小片状结构, 形似凋亡细胞及凋亡小体, 见图 2, 此变化以 48 h 组最为多见。

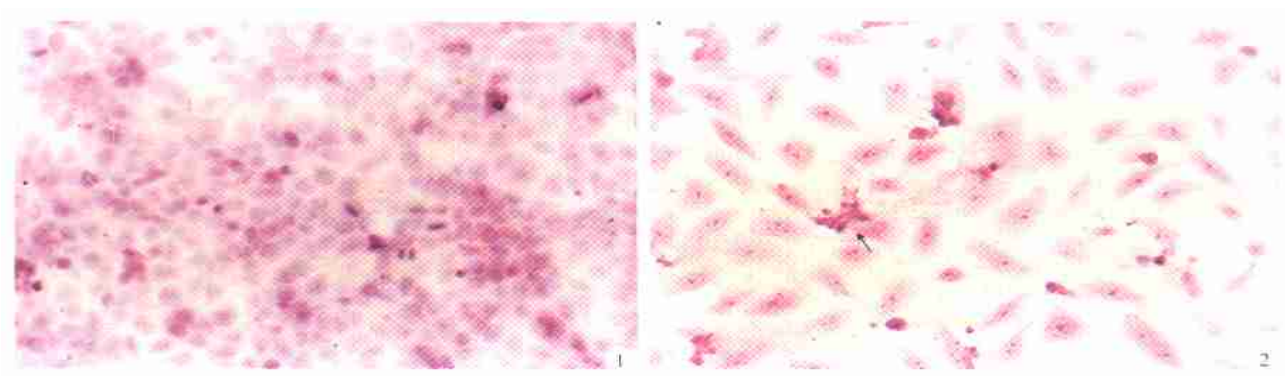


图 1　对照组 48 h, ECV-304 细胞　细胞多角形或短梭形, 核较大, 易见核分裂像, 细胞密集呈卵石状镶嵌排列　(HE× 200)

Fig 1　**ECV-304 cell (in control group, 48 h)**　Cells polycorner shape, nuclei rather large and more cells at mitotic phase. Cells exhibited a cobblestone-like appearance　(HE× 200)

图 2　NDGA 组 48 h, ECV-304 细胞　细胞细长呈长梭形, 排列稀疏, 部分细胞胞浆浊肿, 易见凋亡细胞和正在形成的凋亡小体(→)　(HE× 200)

Fig 2　**ECV-304 cell (in NDGA treatment group, 48 h)**　Cells slender or shuttle-like appearance, cytoplasm swellen in some cells, apoptosis cell and apoptotic body(→) were commonly seen　(HE× 200)

2.2　NDGA 作用下内皮细胞形态的超微变化

电镜下 ECV-304 细胞核大淡染, 呈圆形或椭圆形, 多有 1~2 个较大的核仁, 胞浆中线粒体、粗面内质网等细胞器丰富, 并可见 Weibel-Palade(W-P)小体, 胞膜有丰富的微绒毛。NDGA 处理后 24 h, 细胞胞浆内可出现局灶性变性, 细胞器如线粒体肿胀、空化; 线粒体嵴不同程度的断裂、紊乱, 见图 3A。至 48 h 变化更加明显, 胞浆内局灶性变性、肿胀、空化程度最为严重; 内质网扩张、空化也呈上升趋势; 溶酶体增多, 并易见细胞的溶解性坏死。部分细胞可见核体积缩小, 染色质浓缩、边集, 见图 3B, 并可见有含部分核或细胞器的膜包小体。处理后 72 h, 前述变化依然可见, 但细胞的溶解性坏死变化减少, 有些细胞有同心层状结构排列的髓鞘样结构形成, 细胞溶酶体数目增多, 次级溶酶体内可见有退变的线粒体等结构, 细胞突起增多, 可见大泡形成(Blebbing)。

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

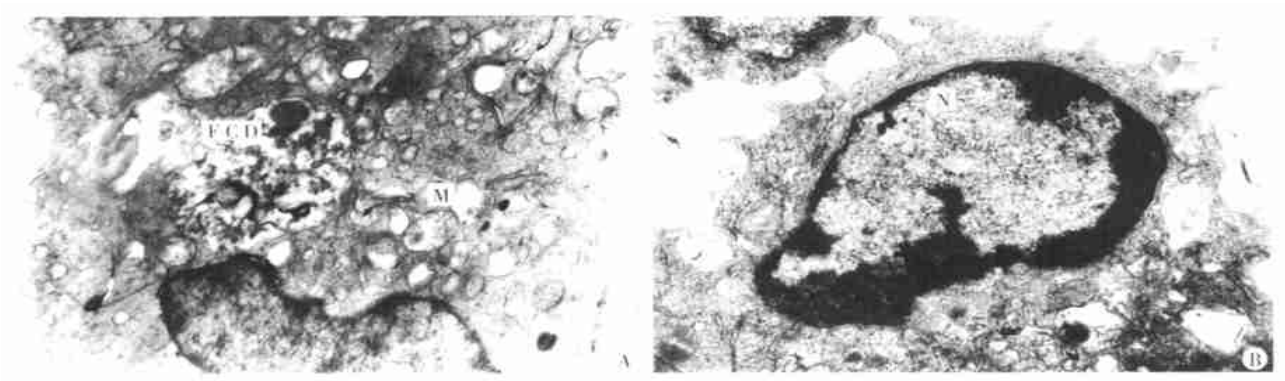


图3 NDGA组48 h ECV-304细胞 (TEM×10 000)

A: 局灶性胞浆变性(FCD), 并有部分线粒体(M)肿胀、空化; B: 细胞核(N)染色质浓缩、边集呈环状位于核膜下

Fig 3 ECV-304 cell (in NDGA treatment group, 48 h) (TEM× 10 000)

A: Showed focal cytoplasm degeneration(FCD) with mitochondrion(M) swelling and cavitation; B: Chromatin of nucleus pyknotic, gathered at edge with annulate appearence under the nuclear(N) membrane (TEM×10 000)

2.3 NDGA 对ECV-304 细胞凋亡峰-亚 G_0 峰的影响

给NDGA 后, 内皮细胞出现了明显高于对照的凋亡峰即亚 G_0 峰, 12 h时相点最高, 凋亡发生比率为 20.42%($P<0.01$), 后续处理时相点(24、48 h)仍明显增高($P<0.05$), 提示 NDGA 诱导内皮细胞发生凋亡, 见表1。

表1 NDGA处理后ECV-304细胞凋亡发生率-亚 G_0 峰的变化(%)

Tab 1 The changes of ECV-304 cell apoptosis rate in sub-G0 phase after NDGA treatment(%)

Group	t/h			
	12	24	48	72
Control	6.06	5.89	10.67	11.58
NDGA	20.42**	12.49*	12.92*	9.14*

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

3 讨论

本实验观测了NDGA 对人脐静脉内皮细胞系ECV-304 细胞形态变化的影响, 发现NDGA 处理后, 细胞数目减少, 培养过程中悬浮细胞及细胞碎片增多, 细胞老化、退变现象增强, 同时光、电镜下都出现了细胞变性、坏死以及凋亡的形态学变化, 流式细胞仪检测也出现了明显的凋亡峰一亚 G_0 峰。上述变化与我们报告的NDGA 对内皮细胞的增殖抑制作用相符[5]。

细胞凋亡是近年研究较多的与有丝分裂相对立、与细胞坏死相并列的新的细胞生物学概念, 它是细胞衰老、死亡的一种特殊的、主动的过程, 通常按照一定的程序进行, 故又称细胞的程序死亡。形态学上表现早期细胞体积逐渐缩小, 而细胞膜和胞质线粒体等细胞器仍保持完整, 细胞核染色质浓缩、边集形成周边染色质帽; 进一步发展, 细胞表面形成一些芽泡, 进而裂解为一些有生物膜包绕的碎块(凋亡小体), 并为周围的细胞所吞噬、消失[6]。细胞凋亡是调节细胞生长状态的重要途径之一, 由于其多受基因的调控, 因而可采用药物、射线等诱发, 从而达到调控细胞生长状况的目的。本室既往的研究已发现NDGA 抑制胶质瘤细胞的生长与诱导凋亡发生有关[7]。NDGA 对内皮细胞生长状况的影响是否存在这一作用, 尚未见报道。

在本研究中我们观察到NDGA 处理细胞后出现一些细胞胞体缩小、深染; 核浓缩呈块状, 或见核、浆浓缩的小体。电镜下, 有的细胞出现胞核染色质浓缩呈块状, 位于核膜下, 胞浆中除线粒体丰富外, 其余细胞器少见, 并有含部分核或者细胞器的膜包结构, 其变化恰似正在形成的凋亡细胞和形成的凋亡小体。结合流式细胞仪的检测结果, 我们认为 NDGA 诱导内皮细胞发生了凋亡, 流式细胞仪的凋亡峰出现在给药后的 12 h 最高, 形态学上则以给药后的48 h 较为明显, 其间的差异在于形态学的表现较细胞 DNA 的变化要晚, 在 72 h 点, 流式细胞仪检测对照组凋亡峰升高, 可能与此时细胞培养进入细胞老化、自发性死亡(凋亡)的过程有关, 而NDGA 处理组由于 NDGA 抑制了细胞的生长进程, 我们已发现其可阻滞细胞周期进程, 主要在 G_1-S 期的阻滞[5], 所以它们进入培养细胞的自发性老化、死亡过程就要相对推迟, 从而表现出NDGA 处理组的凋亡峰较对照组降低。另一方面, 我们还发现NDGA 处理细胞后出现胞膜突起增多, 细胞内线粒体肿胀、内质网扩张、空化, 髓鞘样结构增加以及胞浆局灶性变性乃至溶解性坏死等改变, 除考虑与 NDGA 影响膜稳定性之外[8], 我们认为还可能与 NDGA 降低 ATP[9]、影响细胞的能量代谢作用有关, 提示 NDGA 也存在一定的细胞毒性, 需要选择合适的治疗浓度。但本实验还发现, 当将NDGA 处理后的细胞置于新鲜培养基(不含 NDGA)中培养, 则细胞可恢复原有的形态和增殖分裂能力, 说明NDGA 对 ECV-304 细胞的这种抑制作用是可逆和相对无毒的, 这与 Dethlefsen 等[10] 的观察相符合。

已有的研究提示花生四烯酸及脂氧化酶(Lipoxy-

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

genase, LOX)通路的代谢产物在介导生长因子相关的细胞增生和生长方面具有重要作用, 因此细胞存活和凋亡的调控与 LOX 通路密切相关, NDGA 是花生四烯酸代谢过程中 LOX 的强抑制剂, 其可抑制花生四烯酸对凋亡的负效应从而促进凋亡的发生[11,12]。NDGA 能通过下调 bcl-2、c-myc 基因的表达而引起胶质瘤细胞发生凋亡[7], NDGA 诱导内皮细胞凋亡发生是否也通过此途径尚待进一步探讨。

ECV-304 细胞是一种增殖活性较强的内皮细胞, 它的这一特点正好可接近和反应肿瘤等以血管增生为特征疾病中的内皮细胞的特性, NDGA 对其生长的抑制与影响, 说明其在这些疾病治疗中具有潜在的应用价值, 对此作进一步的研究将很有意义与必要。

参考文献:

[1] Wang Z Y, Agarwal R, Zhou Z C, *et al*. Antimutagenic and antitumorigenic activities of nordihydroguaiaretic acid[J]. Mutat Res, 1991, 261(3): 153—162.
[2] 卞修武, 史景泉, 傅晓岚, 等. SHG-44 细胞显微注射 NDGA 诱导分化的初步观察[J]. 临床与实验病理学杂志, 1995, 11(1): 50—53.
[3] 孙慧勤, 卞修武, 陈意生, 等. 去甲二氢愈创木酸对胶质瘤细胞诱导的内皮细胞迁移影响[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(1): 30—33.
[4] 孙慧勤, 陈意生, 史景泉, 等. 去甲二氢愈创木酸抗血管生成的鸡胚绒毛囊膜实验观察[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(2): 128—129.
[5] 孙慧勤, 陈意生, 史景泉, 等. NDGA 对内皮细胞增殖抑制的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 245—248.
[6] Schwartz L M, Osborne B A. Programmed cell death, apoptosis and killer genes[J]. Immunol Today, 1993, 14(12): 582—590.
[7] 郭德玉, 陈意生, 卞修武, 等. NDGA 对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 细胞增殖抑制机理的研究[J]. 中国学术期刊文摘, 1998, 4(9): 1 128—1 129.
[8] Wilson D E, DioGianfilippo A, Ondrey F G, *et al*. Effect of nordihydroguaiaretic acid on cultured rat and human glioma cell proliferation[J]. J Neurosurg, 1989, 71(4): 551—557.
[9] Ballatori N, Wang W D. Nordihydroguaiaretic acid depletes ATP and inhibitor, prevents swelling-activated, ATP-sensitive taurine channel[J]. Am J Physiol, 1997, 272(5 Pt1): C 1 429—1 436.
[10] Dethlefsen S M, Shepro D, D' Amore P A. Arachidonic acid metabolites in bFGF-, PDGF-, and serum-stimulated vascular cell growth[J]. Exp Cell Res, 1994, 212(2): 262—273.
[11] Tang D G, Honn K V. Apoptosis of W256 carcinosarcome cell of the monocytoid origin induced by NDGA involves lipid peroxidation and depletion of GSH: role of 12-lipoxygenase in regulation tumor cell survival[J]. J Cell Physiol, 1997, 172(2): 155—170.
[12] Tang D G, Guan K L, Li L, *et al*. Suppression of W256 carcinosarcome cell apoptosis by arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids [J]. Int J Cancer, 1997, 72(6): 1 078—1 087.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2001)03-0283-01

经验与短篇

人乳头状瘤病毒 16 型 E6 基因的序列及其在 HeLa 细胞中的表达

Sequence of human papillomavirus type 16 E6 gene and its expression in HeLa cell

徐 波[1], 胡丽娜[1], 漆洪波[1], 顾美礼[1], 任 红[2] (重庆医科大学: [1]第二临床学院妇产科; [2]病毒性肝炎研究所; 重庆 400010)

人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)16 型 E6 原癌蛋白作为抗原, 能诱发机体产生细胞免疫和体液免疫, 是宫颈癌治疗性疫苗研究的热点[1]。我们用 PCR 方法从重庆宫颈癌组织中扩增出 HPV16 E6 基因, 并在 HeLa 细胞中成功表达 E6 原癌蛋白, 为宫颈癌治疗性核酸疫苗的研究打下了基础。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 宫颈癌活检组织 取自重庆医科大学附属第二医院门诊患者。病理诊断为宫颈鳞状细胞癌。组织离体后迅速投入液氮, —70 ℃冷冻保存。

1.1.2 引物 根据标准株[2]序列设计, 上下游引物是 5' TTGAAGCTTATGCACCAAAAGAGAACTGCAATG 3' 和 5' CATTCTA-GATTACAGCTGGGTTTCTCTACGTG 3', 分别有 *Hind* Ⅲ, *Xba* Ⅰ 酶切位点。由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 酶及试剂 高保真 TaqDNA 聚合酶为加拿大 Sangon 产品。核酸限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶是 Promeagar 产品。抗 HPV16 E6 单克隆抗体是 Oncogene 产品。免疫组化检测试剂盒购自博士德公司。

1.1.4 菌种、质粒、细胞 受体菌 XL1-blue、JM109, 质粒 pBKS(+)、pCDNA3.1 由任红教授赠送。含标准株 HPV16 DNA 全序列质粒 pBR322-HPV16 由德国 Dr. Zur Hausen 惠赠。HeLa 细胞由第三军医大学免疫教研室白云教授赠送。

1.1.5 仪器 PCR 扩增仪(PE 2400 美国), 核酸电泳仪、电转仪(Bio-Rad 美国)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 以从宫颈癌活检组织中提取的 DNA 为模板, 用常规 PCR 方法扩增 HPV16 E6。

1.2.2 构建 pCDNA3.1-E6 运用分子克隆技术, 先构建 pBKS(+)-E6, 然后用同样方法亚克隆构建 pCDNA3.1-E6。

1.2.3 HPV16 E6 基因的序列测定 由上海基康生物技术有限公司测定。

1.2.4 HeLa-E6 的筛选 取 20 μg pCDNA3.1-E6, 在 220 V,

(下转 286 页)

作者简介: 徐 波(1974—), 男, 重庆市人, 博士研究生, 主要从事妇科肿瘤治疗方面的研究。电话: (023)63849075-2067
收稿日期: 2000-06-30; 修回日期: 2000-12-25

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