DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.009
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
268 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0268-04

去甲二氢愈创木酸对 VEGF 及其受体 KDR 基因表达影响的研究

孙慧勤[1],陈意生[1],史景泉[1],卞修武[1],邹仲敏[2],郭德玉[1],辛 榕[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院病理学研究所;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨去甲二氢愈创木酸(NDGA)对血管生成因子(VEGF)及其相应受体KDR基因表达状况的影响及其意义。方法 采用免疫组化、原位杂交及图像分析等技术方法观测NDGA作用下人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞VEGF基因、人脐静脉内皮细胞系ECV-304细胞VEGF的相应受体KDR基因表达的变化。结果 ①100 μmol/L的NDGA处理胶质瘤细胞1~3 d,引起VEGF蛋白及mRNA表达水平的降低;②100 μmol/L的NDGA处理内皮细胞1~3 d,受体KDR的蛋白表达也呈下降趋势,且KDR基因表达的降低较胶质瘤细胞VEGF的降低更为明显。结论 NDGA对胶质瘤细胞VEGF的表达有抑制作用,NDGA也抑制了内皮细胞KDR的表达,此抑制作用可能是NDGA抗血管生成的重要分子基础。

关键词:去甲二氢愈创木酸;胶质瘤;内皮细胞;血管内皮细胞生长因子
中图法分类号:R392.13;R977.3 文献标识码:A

Effect of nordihydroguaiaretic acid on expressions of VEGF and its receptor KDR *in vitro*

SUN Hui-qin, CHEN Yi-sheng, SHI Jing-quan, BIAN Xiu-wu, ZOU Zhong-min, GUO De-yu, XIN Rong (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract Objective To explore the effect of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, kinase-inserted domain containing receptor (KDR) and the possible mechanism. Methods The expression of VEGF in human malignant glioma cell line SHG-44 and that of KDR in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) line ECV-304 were observed 1~3 d after NDGA treatment with immunohistochemistry, *in situ* hybridization and image analysis. Results The expression of VEGF was declined at protein or mRNA levels in SHG-44 cells after treated with 100 μmol/L NDGA for 1 to 3 d. The expression of KDR in endothelial cells with 100 μmol/L NDGA treatment for 1 to 3 d was decreased too, in a more obvious way compared with the decline of VEGF expression in SHG—44 cells. Conclusion The results suggest that NDGA inhibits the expression of VEGF in glioma cells as well as that of VEGF receptor KDR in endothelial cells, which may be the important molecular mechanism of anti-angiogenesis of NDGA.

Key words: nordihydroguaiaretic acid, glioma, endothelial cell, vascular endothelial growth factor

在肿瘤的血管生成(Angiogenesis)过程中,由瘤细胞产生的血管生成因子如血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、PDGF等,是启动并调控血管生成的重要介质。大量的资料表明VEGF在肿瘤血管的形成中发挥中心作用。在胶质瘤,VEGF也是起重要作用的因子之一[1]。VEGF是内皮细胞特异的强效有丝分裂原,并有增加血管通透性、诱导内皮细胞迁移、成型和维持内皮细胞的存活等功能[2~4];在已发现的3种VEGF受体中,VEGFR-2即flk-1/KDR (Kinase-inserted domain containing receptor, KDR)与内皮细胞的分化和增生相关,是血管形成(Vasculogenesis)和血管生成中的主要调节者[3,5]。显然,血管生成因子及其相应的受体在胶质瘤的发生和发展中具有重要作用。如能有效控制这些因子及相关受体的表达,对控制内皮细胞增殖及抗血管生成具有重要意义。我们已经发现去甲二氢愈创木酸(Nordihy droguaiaretic acid, NDGA)能有效抑制内皮细胞及胶质瘤细胞诱导的内皮细胞的增殖、迁移等抑血管生成效应[6~8],本实验研究NDGA的抑血管生成作用是否与其降低胶质瘤细胞VEGF及内皮细胞相应受体的表达有关,从而探讨NDGA抗胶质瘤血管生成的分子机制。

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(Email:bianxiuwu@263.net)
收稿日期:2001-01-15;修回日期:2001-03-02

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞系ECV-304(ATCC CRI-1998)和人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞(引自苏州医学院附二院脑肿瘤研究室),分别在含10%新生小牛血清(BS)、双抗的M199和RPMI-1640培养基中常规培养。

1.2 实验分组、标本收集与处理

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)。生长于盖玻片上的SHG-44、ECV-304细胞,分试验和对照组各加入NDGA(终浓度为100 μmol/L)及等量PBS,于处理后1~3 d收集,4%多聚甲醛固定,—20 ℃存放,备用。

1.3 免疫组织化学染色

采用S-P法(Zymed公司产品)对SHG-44细胞进行VEGF

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

(PcAb, 1∶20, Santa Cruz 公司产品)的免疫组化染色; ECV-304 细胞进行 KDR(PcAb-IgG1, 1∶30, Santa Cruz 公司产品)染色。结果的判定与分析: 以细胞浆呈明确的棕黄色为阳性染色, 并用德国 Leica 公司 MD20 型真彩色图像分析仪进行图像分析。测定条件: 目镜及物镜放大倍数各为× 10、× 25, 随机测定 100 个细胞, 分别测出阳性反应细胞的总面积(Area)和积分光密度(IOD), 然后求出平均光密度(D_λ)值。

1.4　原位杂交

cDNA 质粒(VEGF121、KDR)质粒分别由刘吉奎(西南医院肝胆外科中心)、刘海鹏(附属新桥医院神经外科)博士惠赠, 探针 DNA 的制备参照金冬雁等编译的《分子克隆实验指南》进行; 采用地高辛标记的随机引物法, 严格按 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit 1 (Boehringer Mannheim 产品)的说明操作, 进行 VEGF、KDR 探针 DNA 的标记; 参照蔡文琴等[9]方法进行原位杂交, 染色结果以细胞出现明确的紫蓝色细颗粒为阳性染色, 并用德国 Leica 公司 MD20 型真彩色图像分析仪进行图像分析。测定条件: 物镜放大倍数× 25, 随机测定 100 个细胞, 分别测出阳性反应细胞的总面积(Area)和积分光密度(IOD)并计算平均光密度(D_λ)。

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 Microsoft Excel 提供的统计程序, 进行两样本均数间 t 检验。

2　结果

2.1　NDGA 对SHG-44 细胞 VEGF 基因表达的影响

2.1.1　NDGA 对 SHG-44 细胞 VEGF 蛋白表达的影响　SHG-44 细胞 VEGF 蛋白表达均较强, 主要定位于瘤细胞的胞浆。NDGA 处理细胞 1～3 d 后, SHG-44 细胞 VEGF 蛋白表达的阳性减弱, 平均光密度(D_λ)较对照组明显减少, 见表 1, 统计学差异显著($P < 0.01$)。

2.1.2　NDGA 对 SHG-44 细胞 VEGF 基因 mRNA 表达的影响　SHG-44 细胞 VEGF121 原位杂交见瘤细胞的胞浆内出现较强的蓝紫色颗粒, 显示较强的 VEGF 基因 mRNA 表达, 见图 1。NDGA 处理细胞 1～3 d 后, SHG-44 细胞表达的阳性减弱, 胞浆内见淡蓝色颗粒, 见图 2。图像分析表明 NDGA 处理组 VEGF 基因 mRNA 表达的平均光密度(D_λ)值较对照组明显减少, 见表 1, 统计学差异显著。结果与免疫组化检测的蛋白表达一致。

表 1　NDGA 处理不同时间后 SHG-44 细胞 VEGF 蛋白、mRNA 表达平均光密度的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of expression VEGF gene protein and mRNA level in SHG-44 cell after NDGA treatment($\bar{x} \pm s$)

Group		t/ d		
		1	2	3
Control	Protein	0.476±0.077	0.453±0.092	0.481±0.061
	mRNA	0.609±0.092	0.605±0.103	0.599±0.096
NGDA	Protein	0.388±0.073 **	0.334±0.046 **	0.41±0.07 **
	mRNA	0.515±0.147 *	0.457±0.077 **	0.501±0.1 **

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

2.2　NDGA 对 ECV-304 细胞 KDR 表达的影响

2.2.1　NDGA 对 ECV-304 细胞 KDR 蛋白表达的影响　ECV-304 细胞 KDR 蛋白表达均较强, 主要定位于细胞的胞浆, S-P 法染色见胞浆内有较强的棕黄色颗粒, 见图 3。NDGA 处理细胞 1～3 d 后, ECV-304 细胞蛋白表达的阳性减弱, 见图 4, 平均光密度(D_λ)较对照组明显减少, 见表 2, 统计学差异显著($P < 0.01$)。

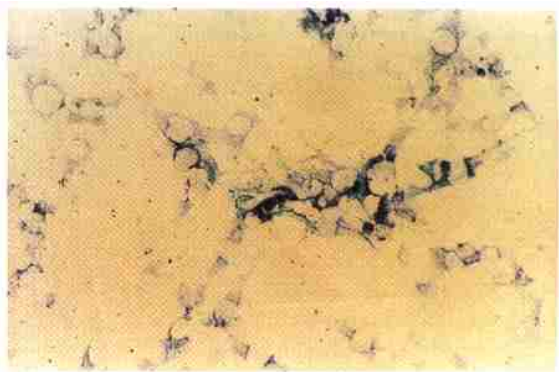


图 1　对照组 48 h, SHG-44 细胞, 细胞 VEGF mRNA 表达较强　(ISH× 200)

Fig 1　SHG-44 cells in control group at 48 h, relative strong VEGF mRNA expression　(ISH× 200)



图 2　NDGA 组 72 h, SHG-44 细胞, 细胞 VEGF mRNA 表达减弱　(ISH× 200)

Fig 2　SHG-44 cells in NDGA treatment group at 72 h, VEGF mRNA expression weakened　(ISH× 200)



图 3　对照组 48 h, ECV-304 细胞, 细胞 KDR 蛋白表达强　(S-P× 200)

Fig 3　ECV-304 cells in control group at 48 h, immunohistochemistry for KDR showed higher level of expression　(S-P× 200)

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

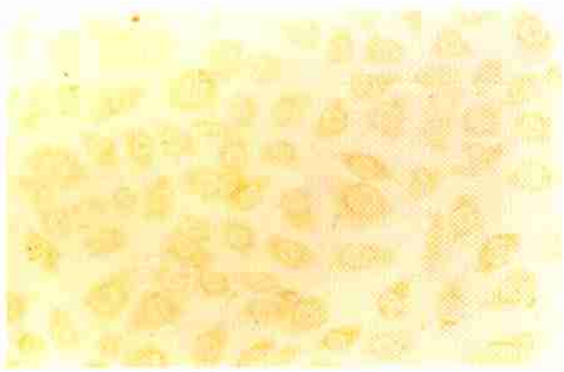


图 4 NDGA 组 72 h ECV-304 细胞, 细胞 KDR 蛋白表达减弱 (S-P× 200)

Fig 4 ECV-304 cells in NDGA treatment group at 72 h, immunohistochemistry for KDR showed lower level of expression (S-P× 200)

表 2 NDGA 处理不同时间后 ECV-304 细胞 KDR 蛋白、mRNA 表达平均光密度的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of expression KDR gene protein and mRNA level in ECV-304 cell after NDGA treatment($\bar{x}\pm s$)

Group		t/ d		
		1	2	3
Control	Protein	0.648±0.085	0.607±0.073	0.621±0.081
	mRNA	0.543±0.07	0.534±0.068	0.508±0.085
NGDA	Protein	0.499±0.046 **	0.431±0.06 **	0.496±0.107 **
	mRNA	0.413±0.085 **	0.367±0.068 **	0.33±0.047 **

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

2.2.2 NDGA 对 ECV-304 细胞 KDR 基因 mRNA 表达的影响 原位杂交见 ECV-304 细胞 KDR 基因 mRNA 表达较强, 主要位于细胞的胞浆。NDGA 处理 1~3 d 后, 阳性表达减弱, 平均光密度(D_λ)较对照组明显减少, 见表 2, 统计学差异显著($P<0.01$), 结果与免疫组化检测的蛋白表达结果一致。

3 讨论

对肿瘤血管生成的研究表明: 促血管生成因子及其相应的受体是肿瘤血管生成中的最重要调控者。肿瘤细胞产生和释放的血管生成因子与内皮细胞上的特异性受体相结合, 通过一系列的信号传递途径与机制, 引起内皮细胞的增殖、迁移、成型等, 从而实现血管生成过程。对此进行干预, 是抗肿瘤血管生成的关键靶点。人 VEGF 基因位于染色体 6 p21.3, 全长 14 kb, 编码 VEGF121 等 5 种转录产物, 其中以 VEGF165 和 VEGF121 最具特征性[3]。在其受体中 VEGFR-2(flk-1/KDR)是血管形成(Vasculogenesis)和血管生成中的主要调节者, 由于单独阻止 flk-1/KDR 即可控制 VEGF 介导的肿瘤的血管生成和生长, 所以认为 flk-1/KDR 在肿瘤血管生成中也具有重要作用。

在正常脑组织 VEGF 及其 VEGFR-1 的表达或无或只是低水平的, 低级别的胶质瘤表达也较低, 但在恶性胶质瘤尤其是多形性胶质母细胞瘤(GBM), 不但 VEGF 及其 VEGFR-1 的表达明显增加, VEGFR-2(KDR)表达也出现并显著加强。人脑胶质瘤有 VEGF、bFGF、TGF-α、β 和 PDGF 等因子的表达和释放, 但以 VEGF 与血管生成的关系最为密切, VEGF 可介导其它所有因子的作用, FGF、PDGF 等由肿瘤细胞自分泌/旁分泌产生的因子作用于肿瘤细胞, 一方面使肿瘤细胞增殖, 另一方面也促进肿瘤细胞分泌 VEGF, 后者再作用于内皮细胞, 使内皮细胞增殖、血管新生化发展; 同时增加血管通透性, 使瘤周水肿形成; 还可促进血液高凝性, 微血管内血栓形成, 肿瘤发生坏死[10]。在裸鼠模型, VEGF 抗体和 VEGF 受体/flk-1 的显性阴性突变体均可防止 GBM 细胞的生长, 提示肿瘤血管生成主要由旁分泌机制所调节, VEGF 和 KDR 在胶质瘤血管生成和恶性进展中发挥重要作用[11]。

本研究发现, 恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 细胞 VEGF 蛋白、mRNA 水平均有较高表达, 提示该细胞系具有强的促血管生成活性。在 NDGA 的作用下, 胶质瘤细胞 VEGF、内皮细胞 KDR 从基因到蛋白水平的表达均降低, 并随作用时间的延长差异越明显, 且 KDR 的降低较 VEGF 的降低更为明显, 说明 NDGA 对 VEGF 及受体 KDR 的表达有下调作用, 虽然具体机制尚未清楚, 但我们认为仍应从 NDGA 是脂氧化酶抑制剂的角度来解释。已有的资料表明花生四烯酸(AA)及其代谢产物既可作为一些递质、激素和生物活性因子的第二信使, 或与其它第二信使共同调节细胞功能(细胞内作用); 也可作为第一信使作用于周围细胞, 通过另外的第二信使产生效应(胞外作用)。目前至少已知能引起细胞内钙增加、激活 MAPKs 通路的外部 ERKs。在有血清或肿瘤条件培养基的条件下其中所含的生长因子可与细胞的特异受体结合引起信号传递, 从而引起相关基因的表达[12]。在有 NDGA 的情况下, 其抑制了 AA 代谢产物的产生, 减弱了其作为信使的功能, 降低了相关基因的表达, 因此表现 NDGA 作用后胶质瘤细胞 VEGF、内皮细胞受体 KDR 表达的降低。这种作用可能不存在特异性, 因为我们在对其它血管生成因子及受体的观察中发现 NDGA 也降低了它们的表达。这些因子及受体的降低, 对自身或其它细胞的刺激减弱, 所以表现出细胞增殖抑制等功能变化。此 NDGA 对血管生成因子 VEGF 及其受体 KDR 表达的抑制作用, 进一步揭示了其抗血管生成的作用机制。

(致谢: 感谢本校分子遗传学教研室王燕副教授、本所陈自强讲师对原位杂交给予的帮助。)

参考文献:

[1] Lund E L, Spang-Thomsen M, Skovgaard-Poulsen H, *et al*. Tumor angiogenesis-a new therapeutic target in gliomas[J]. Acta Neurol Scand, 1998, 97(1): 52—62.

[2] Stephan C C, Brock T A. Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide[J]. P R Health Sci J, 1996, 15(3): 169—178.

[3] 宋述梅, 寿成超. 血管内皮细胞生长因子及其受体的分子生物学研究进展[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 1997, 19(6): 245—250.

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

[4] Nor J E, Christensen J, Mooney D J, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression[J]. Am J Path, 1999, 154(2): 375—384.
[5] Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, *et al*. High affinty VEGF binding and developmental expression suggest FLK-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis[J]. Cell, 1993, 72(6): 835—846.
[6] 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.
[7] 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尿囊膜实验观察[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(2): 128—129.
[8] 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.
[9] 蔡文琴, 王伯行 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 401—427.
[10] Jensen R L. Growth factor-mediated angiogenesis in the malignant progression of glial tumors: a review[J]. Surg Neurol, 1998, 49(2): 189—196.
[11] Plate K H, Breier G, Weich H A, *et al*. Vascular endithelial growth factor and glioma angiogenesis: Coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms[J]. Int J cancer, 1994, 59(4): 520—529.
[12] Madamanchi N R, Bukoski R D, Runge M S, *et al*. Arachidonic acid activates JUn N-terminal Kinase in vascular smooth muscle cells[J]. Oncogene, 1998, 16(3): 417—422.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2001)03-0271-01

经验与短篇

B 超引导下经皮穿刺置管引流治疗腹部脓肿

Treatment of intra-abdominal and retroperitoneal abscess with percutaneous drainage catheter directed by B-ultrasound

陈 敏, 马宽生, 黄小兰, 陈 平, 董家鸿 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院, 重庆 400038)

腹部脓肿以往多采用开腹或经腰背部切开引流的手术方法治疗。近年来, 我们采用 B 超引导下经皮穿刺置管引流治疗腹部脓肿 11 例, 疗效满意。

1 资料与方法

一般资料: 本组 11 例患者, 男性 10 例, 女性 1 例。平均年龄 42 岁。胆道术后 4 例, 重症胰腺炎引流术后 7 例。患者术后 15～20 d 出现体温持续高热, 上腹钝痛、腰背部剧痛。B 超及 CT 提示: 右隔下脓肿 6 个, 左膈下脓肿 14 个, 左腹膜后脓肿 4 个。单发性脓肿 4 例, 多发性脓肿 7 例, 脓肿最大直径 11.6 cm。

仪器及导管: 日本 HITACHI EUB-405 型 B 超仪, 3.5 MHz 普通探头。胸腔闭式引流穿刺套管 1 套, 导管直径 1.5 cm、长 10～15 cm, 10 号尿管。

方法: 患者平卧位或左、右侧卧位, 常规消毒, 普通探头酒精消毒 3 次, B 超定位, 于探头的后侧方作为穿刺点, 16G PTC 针穿刺入脓腔内满意位置, 避开腹腔及腹膜后大血管及重要脏器。抽出脓液后, 拔出穿刺针, 在 B 超引导下沿原针道用胸腔闭式引流穿刺套管针穿刺入脓腔内, 确定在脓腔内并位置满意时可拔出针芯, 沿导管放入 10 导尿管并固定, 向脓腔内低压注射 0.5% 甲硝唑注射液, 反复冲洗至抽出液清亮后, 于腔内注入庆大霉素 16×10^4 U 或其它敏感的抗菌素。对于脓液稠厚者可先用生理盐水或透明质酸酶稀释, 再抽吸脓液。对多发性脓肿应分别定位穿刺。置管引流 3～5 d 后复查 B 超, 如发现又有脓腔出现应再行穿刺。全部患者于治疗后 1、3、6 月复查 B 超。

术后处理: 术后观察生命体征的改变, 保持引流管通畅, 全身抗感染治疗, 必要时予支持治疗或手术治疗。如脓液较稠厚、引流不畅时可在 B 超引导下更换引流管。B 超显示脓腔萎缩、脓液消失时, 可拔除引流管。

2 结果

11 例患者, 24 个病灶, 共穿刺 49 次, 治愈 10 例(90.9%), 其中 1 次穿刺治愈 2 例(20%), 2 次穿刺治愈 4 例(40%), 3 次穿刺治愈 3 例(30%), 4 次穿刺以上治愈 1 例(10%)。一次性抽脓最多为 450 ml。1 例因重症胰腺炎后腹膜后脓腔内坏死组织较多、组织块较大, 引流后开始症状好转, 但半月后又出现高热, 症状反复, 最后行急诊手术引流。全组未发生出血、腹腔脏器受损等严重并发症。平均引流 30 d。出院后 1～3 个月复查 B 超及 CT 未发现残余感染灶。

3 讨论

腹部脓肿系指急性腹膜炎局限后, 渗出液未被吸收, 被为肠壁、脏器、肠系膜或大网膜及其间的粘连所包围而形成[1]。腹部脓肿以往多采用手术切开引流, 病人需经受开腹手术的痛苦, 经济负担较重, 而且心肺肝肾功能不全者不宜手术。近年来我院采用 B 超引导下经皮穿刺置管引流治疗腹部脓肿, 取得了良好疗效。

本法治愈腹部脓肿的关键是正确把握穿刺时机及穿刺部位。脓肿引流的基本原则是选择捷径、低位引流[2,3]。在全身治疗的同时, 应密切观察脓肿的超声图像的改变。一旦脓肿内有液化灶形成即可在脓肿低位穿刺引流治疗。B 超引导下经皮穿刺置管引流治疗腹部脓肿具有以下优点: ①适应范围广, 可适用于不宜手术的心肺肝肾功能不全的患者; ②操作简便、

作者简介: 陈 敏(1962—), 女, 四川省崇州市人, 主管技师, 主要从事内窥镜诊治及 B 超方面的研究, 发表论文 8 篇。电话: (023)68754168

收稿日期: 2000-08-24; 修回日期: 2001-01-15

(下转 275 页)

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