DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.004
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
254 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0254-03

去甲二氢愈创木酸对SHG-44胶质瘤细胞GFAP基因表达的影响

姚 莉,卞修武,陈自强 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨去甲二氢愈创木酸(NDGA)诱导恶性胶质瘤细胞分化过程中对GFAP基因表达的影响及其意义。方法 用免疫组织化学和原位杂交方法定性、定量检测人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞GFAP基因的表达水平。结果 NDGA处理后,瘤细胞GFAP蛋白及mRNA表达水平明显增高($P<0.01$)。结论 NDGA具有诱导恶性胶质瘤细胞GFAP基因表达的作用,推测GFAP基因表达上调可能是NDGA诱导胶质瘤细胞分化的作用机制之一。

关键词:去甲二氢愈创木酸;胶质瘤;诱导分化;胶质纤维酸性蛋白
中图法分类号:R730.264;R977.3 文献标识码:A

Effects of nordihydroguaiaretic acid on the expression of GFAP gene of human malignant glioma cell line SHG-44

YAO Li, BIAN Xiu-wu, CHEN Zi-qiang (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene and its significance in the process of glioma cell differentiation induced by nordihydroguaiaretic acid (NDGA). **Methods** Immunohistochemistry (IHC) and *in situ* hybridization were used to detect the expression changes of GFAP protein and GFAP mRNA qualitatively and quantitatively. **Results** The expression levels of GFAP protein and GFAP mRNA in NDGA treatment group were significantly increased compared with the control group ($P<0.01$). **Conclusion** NDGA could induce GFAP gene in malignant glioma cells and the up-regulation of this gene expression might be one of the mechanisms by which NDGA induces glioma differentiation.

Key words: nordihydroguaiaretic acid (NDGA); glioma; differentiation therapy; glial fibrillary acidic protein (GFAP)

近年来的研究发现,去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid, NDGA)对多种实体瘤及培养的瘤细胞有抑制增殖作用。我室既往研究发现,NDGA对人恶性胶质瘤细胞系SHG-44有诱导分化和抑制血管生成作用[1,2]。但NDGA诱导分化作用的确切机制尚不完全清楚。本实验对NDGA诱导人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞分化过程中胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)基因的表达进行研究,探讨NDGA对GFAP基因表达的影响及其意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肿瘤细胞 人脑恶性胶质瘤细胞系SHG—44细胞引自苏州医学院附属二院脑肿瘤研究室。

1.1.2 试剂 NDGA的来源和配制同文献[1];即用型兔抗GFAP抗体为福州迈新公司产品,寡聚核苷酸(oligonucleotide)3'末端地高辛配基(DIG)标记试剂盒为Boehringer Mannheim公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脑恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞按常规方法培养,细胞用RPMI 1640完全培养基,置37 ℃、5%CO_2孵箱(相对湿度为95%)中培养。

1.2.2 实验分组和时相点设置及样本收集 生长旺盛的SHG-44细胞经0.25%胰蛋白酶消化液消化,用RPMI 1640完全培养液配成10^5个/ml,接种于预先置有干净消毒盖玻片的6孔培养板,分以下3组进行实验:①NDGA处理组:于接种后12 h加NDGA液(终浓度为100 μmol/L)。②PBS对照组:于接种后12 h加等体积、等pH值的PBS液。③空白对照组:不加任何液体。观测时相点包括处理后6、12、24、48、72 h。每组每个时相点设3个复孔。在各时相点末取出盖玻片,用PBS洗涤两次,75%酒精固定30 min,自然晾干,4 ℃保存,用于常规HE染色和免疫组化染色;或用DEPC水配制的4%PFA固定,—20 ℃保存,用于原位杂交。

1.2.3 免疫组织化学染色 收集各组各时相点细胞(培养于盖玻片上),采用S-P法,在盖玻片上按试剂盒操作说明进行。用已知GFAP表达阳性的胶质瘤细胞系CHG-5和星形细胞瘤切片作阳性对照,以0.01 mol/L PBS代替GFAP抗体进行上述染色为阴性对照。染色结果判定:阳性染色主要定位于细胞质,呈棕黄色,核不着色。采用Tiger 920图像分析仪进行图像分析。测定条件:物镜放大倍数40×,随机测定100个细胞,分别测定阳性反应细胞的总面积和积分光密度(IOD)。

1.2.4 细胞原位杂交 GFAP基因序列来自Gene Bank,根据Primer软件设计寡核苷酸探针,其序列为:5'-GTT AGT TGG AGT TGC TGG GTG CTG GGT GGG TGC CGT CTG G-3';将该序列输入Gene Bank,经检索与人类其它基因无同源性。探针由上海细胞生物研究所合成,PAGE胶纯化;用寡聚核苷酸3'末端DIG标记试剂盒标记,严格按说明操作。采用试剂盒提供的定量检测条,按说明进行标记有效性的检测;原位杂交操作步骤按文献[3,4]进行;染色结果判定:阳性染色主要定位于细胞质,呈蓝色细颗粒,核不着色。采用Tiger 920图像分析仪进行图像分

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970268)
作者简介:姚 莉(1971—),女,山西省垣曲县人,硕士,讲师,主要从事肿瘤诱导分化方面的研究,发表论文6篇,现在北京军医学院病理学教研室,北京 100071。电话:(010)66947710
通信作者:卞修武(Email:bianxiuwu@263.net)
收稿日期:2000-10-18;修回日期:2001-01-15

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

析。测定条件同上。

1.3　统计学处理

所有计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用第三军医大学数理统计教研室提供的统计程序包 SPMR, 进行多组样本均数间两两比较。

2　结果

2.1　NDGA 对SHG-44 细胞 GFAP 蛋白 表达的影响

两对照组大部分瘤细胞 GFAP 蛋白表达呈阴性, 少数细胞呈弱阳性; NDGA 处理组瘤细胞在处理后 12、24、48、72 h 可见 GFAP 蛋白表达较对照组相应时相点增强。NDGA 处理 6 h 后 GFAP 蛋白表达与对照组 6 h 相比差异不明显, 处理 12、24、48 h 组间差异无显著性, 但与处理 6 h 组及相应时相点的两对照组相比均差异显著($P<0.01$); NDGA 处理 72 h 后, GFAP 表达均显著高于NDGA 处理组其它时相点($P<0.01$)及两对照组72 h ($P<0.01$), 见表 1。

2.2　NDGA 对SHG-44 细胞 GFAP mRNA 表达的影响

对照组大部分瘤细胞 GFAP mRNA 表达呈阴性, 少数细胞胞浆内见弱阳性表达; NDGA 处理后 12、24、48、72 h 瘤细胞 GFAP mRNA 表达较对照组增强, 见图 1、2。图像分析结果显示, NDGA 处理 6 h 后 GFAP mRNA 表达与对照组 6 h 相比无明显差异, 处理 12、24、48 h 组间无显著性差异, 但与处理 6 h 组及相应时相点的两对照组相比均差异非常显著($P<0.01$); NDGA 处理 72 h 后, GFAP 表达均显著高于 NDGA 处理组其它时相点($P<0.01$)及两对照组 72 h($P<0.01$), 见表 2。

表 1　各组 SHG-44 细胞 GFAP 蛋白表达总面积的检测结果(μm^2, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The result of total areas of GFAP protein expression in different groups(μm^2, $\bar{x}\pm s$)

Time	Control	PBS	NDGA
6 h	2 490.1±251.6	2 581.9±253.7	2 954.7±511.7
12 h	2 766.2±280.5	2 767.3±297.6	3 909.5±782.3 *
24 h	2 720.7±310.2	2 731.6±312.4	4 564.2±543.7 *
48 h	2 640.8±300.3	2 648.1±309.5	4 659.8±688.6 *
72 h	2 580.4±260.3	2 597.4±267.4	5 518.9±756.4 *△

*: $P<0.01$ *vs* PBS, control; △: $P<0.01$ *vs* other time points of NDGA group

表 2　各组 SHG-44 细胞 GFAPmRNA 表达总面积的检测结果(μm^2, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The result of total areas of GFAP mRNA expression in different groups(μm^2, $\bar{x}\pm s$)

Time	Control	PBS	NDGA
6 h	3 254.8±446.8	3 283.8±453.2	3 616.3±652.8
12 h	3 412.2±476.8	3 421.6±497.3	6 954.2±632.5 *
24 h	3 400.1±420.2	3 397.6±421.8	7 481.8±707.3 *
48 h	3 345.4±501.5	3 348.9±502.6	7 627.5±674.6 *
72 h	3 310.8±489.2	3 302.7±497.1	9 877.4±716.8 *△

*: $P<0.01$ *vs* PBS, control; △: $P<0.01$ *vs* other time points of NDGA group

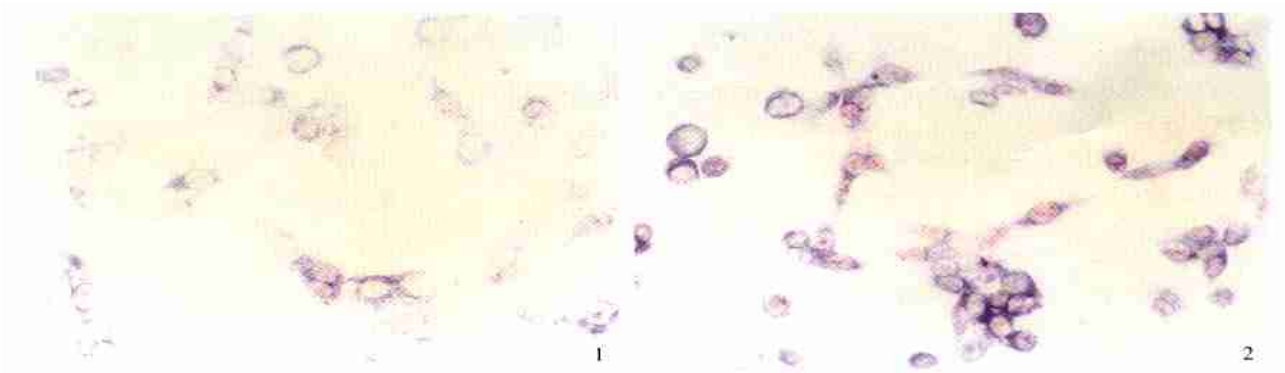


图 1　对照组 24 h SHG-44 细胞　细胞 GFAP mRNA 表达弱阳性　(ISH×200)

Fig 1　SHG-44 cells in control group (24 h)　The cells showed weak expression of GFAP mRNA　(ISH×200)

图 2　NDGA 处理组 72 h SHG-44 细胞　细胞 GFAP mRNA 表达强阳性　(ISH×200)

Fig 2　SHG-44 cells in treatment group (72 h)　The cells showed strong expression of GFAP mRNA　(ISH×200)

3　讨论

人胶质纤维酸性蛋白(GFAP)基因位于 17 号染色体(17q21), GFAP 是主要存在于星形细胞的一种中间丝结构蛋白。尽管目前对中间丝的研究备受关注, 但 GFAP 的确切功能尚不十分清楚。研究表明 GFAP 的表达与星形细胞的发育和分化有密切关系。随着星形细胞的成熟, GFAP 的表达逐渐增强, 因此, 国内外学者已将 GFAP 作为星形细胞及其肿瘤的特异分化标记物[4], 深入研究星形细胞肿瘤发生和分化过程中 GFAP 的表达具有重要意义。近年研究发现, 改变 GFAP 表达可影响胶质细胞分化。Sadatomo 等[5] 采用脂质体将 GFAP 基因转染至不表达 GFAP 的髓母细胞瘤瘤细胞中也取得同样结论。反之, Rutka 等[6] 采用反义 GFAP cDNA 转染 GFAP 阳性细胞株(U-251MG)可使细胞形态向恶性转化, 细胞缺乏长突起, 呈现扁平的上皮样细胞形态; 细胞增殖活性增高, 瘤细胞的侵袭力和转移能力增高。表明上调和(或)下调 GFAP 表达均可影响胶质细胞分化状态, 提示 GFAP 基因及其蛋白水平对胶质瘤瘤细胞的恶性行为有重要影响, 推测 GFAP 基因功能状态可能在控制胶质细胞的分化状态上有重要的决定作用。

NDGA 是一种天然抗氧化剂, 它对花生四烯酸代谢中脂氧化酶强烈、特异的抑制作用以及对花生四烯

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

酸引起的豚鼠肺组织条收缩的抑制作用，使 NDGA 成为一种新型的抗炎药物[7]。近年来 NDGA 抗肿瘤作用引起人们极大的关注。人们先后发现 NDGA 对恶性黑色素瘤、胶质瘤、非小细胞性肺癌的裸鼠移植瘤、乳腺癌、鼠膀胱癌等实体瘤和单层培养细胞有抑制增殖和转移的作用[8~11]。卞修武等[1]研究证实 NDGA 对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 细胞及其移植瘤有明显的诱导分化作用，并发现其具有抗血管生成作用[2]。但 NDGA 对肿瘤细胞诱导分化的机制尚未完全阐明。研究业已证实，NDGA 处理人恶性胶质瘤细胞 SHG-44 后，细胞增殖能力明显下降，可见核周胞浆和突起内出现较多平行或紊乱排列的胶质细丝，呈现分化现象，同时可见线粒体退行性变，溶酶体增多。本研究结果显示 GFAP 蛋白和 mRNA 表达水平增高，证实 GFAP 的表达水平可被 NDGA 诱导而上调，提示可以通过改变 GFAP 基因的功能及其表达水平来影响瘤细胞，最终诱导细胞分化。本研究结果表明，GFAP 基因上调可能是 NDGA 诱导分化作用机制中的一个重要环节。

参考文献：

[1] 卞修武，史景泉，辛 榕 等. 去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 生长和分化的影响[J]. 中华病理学杂志，1997，26(5)：285－288.

[2] 孙慧勤，卞修武，陈意生，等. 去甲二氢愈创木酸对胶质瘤细胞 SHG-44 迁移的影响[J]. 中华病理学杂志，2000，29(1)：30－33.

[3] 苏慧慈 主编. 原位杂交[M]. 北京：中国科学技术出版社，1994. 59－90.

[4] 卞修武. 胶质纤维酸性蛋白基因调控及其在胶质瘤诱导分化中的作用[J]. 中华病理学杂志，1999，28(3)：222－223.

[5] Sadatomo T，Yoshida J，Wakabayashi T，*et al*. New approach for the treatment of medulloblastoma by transfection with glial fibrillary acidic protein gene[J]. Surg Oncol，1996，5(2)：69－75.

[6] Rutka J T，Ackerley C，Hubbard S L，*et al*. Characterization of glial filament-cytoskeletal interactions in human astrocytomas：an immuno-ultrastructural analysis[J]. Eur J Cell Biol，1998，76(4)：279－287.

[7] Skaltsa H，Bermejo P，Lazari D，*et al*. Inhibition of prostaglandin E2 and leukotriene C4 in mouse peritoneal macrophages and thromboxane B2 production in human platelets by flavonoids from Stachys chrysantha and Stachys candida[J]. Biol Pharm Bull，2000，23(1)：47－53.

[8] Saqr H E，Guan Z，Yates A J，*et al*. Mechanisms through which PDGF alters intracellular calcium levels in U-1242 MG human glioma cells[J]. Neurochem Int，1999，35(6)：411－422.

[9] 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.

[10] Cunningham D C，Harrison L Y，Shultz T D. Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid，conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture[J]. Anticancer Res，1997，17(1A)：197－203.

[11] Schulz W A. DNA methylation in urological malignancies (Review)[J]. Int J Oncol，1998，13(1)：151－167.

（编辑 薛国文）

（上接 253 页）

口修补室缺 12 例，其中补片 6 例，经右室斜切口补片修补室缺 4 例，做右室流出道疏通 1 例。经右房房间隔切口做二尖瓣置换 2 例，其中 1 例同时行左房血栓清除、左房折叠，3 例主动脉切口做主动脉置换术。手术中为防止气栓发生，采用具有倒流作用主动脉插管造成主动脉瓣关闭，同时左房引流管置入二尖瓣口，造成二瓣关闭不全，并维持平均动脉压 8.0 kPa 左右，停止呼吸机辅助呼吸。主动脉瓣置换患者，切开右心房时冠状静脉窦插逆行灌注管，阻断主动脉时，灌温血，灌注压 5.3～6.6 kPa，心脏不停跳。

2 结果

5 例换瓣者阻断上下腔静脉时间(98.6±21.8) min，体外循环时间(121.6±36.2) min，术后住院时间(17.1±3.2) d。22 例先心病患者阻断上下腔时间(52.6±13.7) min，体外循环时间(56.4±14.2) min，术后住院时间(11.2±2.1) d。全组无空气栓塞和死亡，均痊愈出院。

3 讨论

随着人们对生活质量的重视，对手术的安全性、减少手术创伤和保持皮肤美观提出了更高的要求。有报道选择采用右侧腋下、右侧小切口施行心内直视[1,2]。本组 27 例手术采用右前外切口第四肋间进胸，体会如下：①该手术难度较大，所用物品器械多，对手术配合有严格的要求。手术护士在术前应了解病人的基本情况，与术者取得联系，了解手术方案，参加术前讨论，作好各方面的准备，同时了解病人有无传染病(肝炎、结核等)，有无运动障碍，有无过敏或特殊体质，有无假牙义眼、隐形眼镜等；②该手术的困难和关键是主动脉插管和下腔套带，采用右第 4 肋间进胸后，升主动脉的位置较深，要求悬吊心包充分。主动脉换瓣，须备好直主动脉阻断钳。下腔静脉插管宜在转流后套带，以免发生意外时有体外循环作保障，因套下腔时可能损伤左右心房壁和下腔后壁。对下腔静脉套带极困难者，切开右心房时经下腔静脉内口缝一荷包线，经前壁穿出收紧，亦可阻断。器械护士在手术配合时，应精神高度集中，相互密切配合，每个步骤都需准确迅速，密切注意手术进程，积极主动协助配合医生，减少术中不必要问答，以免分散医生的注意力，保证手术过程进展顺利。做好各种必要准备，如主动脉插管不顺利再次插管，套带顺序的改变等，做到灵活掌握随机应变；③巡回护士在给病人摆体位时应注意体位垫合适，注意使病人处于功能位，尤其是小儿，防止压伤。正确使用微量输液泵，保持静脉通道通畅。

关键词：外科护理；心内直视手术
中图法分类号：R654.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘迎龙，孙塞松，尚玉强，等. 右外侧剖胸法体外循环下心脏直视手术 37 例报告[J]. 中国循环杂志，1996，11(5)：286.

[2] 贾清仁，姚建发，成杞润，等. 右腋下小切口在先天性心脏病手术中的应用[J]. 中国胸心血管临床杂志，1998，5(1)：25－26.

（编辑 冷怀明）

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