DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.005
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

文章编号:1000-5404(2001)03-0257-03

论著

CDK4在去甲二氢愈创木酸抑制恶性胶质瘤细胞增殖中的作用

郭德玉,陈意生,卞修武,史景泉,陈自强,辛 榕 (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 探讨细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶4(CDK4)在去甲二氢愈创木酸(NDGA)抑制人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞增殖中的作用。方法 采用细胞培养、细胞计数、流式细胞仪检测、免疫沉淀、免疫组化及图像分析等技术方法。结果 ①在10~200μmol/L浓度范围内,NDGA可使SHG-44细胞增殖受阻,且NDGA液浓度越高,这种作用越明显,即呈明显的剂量依赖性;②NDGA对细胞周期抑制作用主要表现于G_1→S期;③NDGA处理后,SHG-44细胞CDK4蛋白激酶的活性降低,且这种作用与NDGA的处理浓度呈正相关,与NDGA对SHG-44细胞的增殖抑制作用相一致;④NDGA处理后,SHG-44细胞CDK4基因的蛋白表达明显减弱。结论 CDK4蛋白激酶活性降低在NDGA抑制SHG-44细胞增殖中起着十分重要的作用。

关键词:去甲二氢愈创木酸;胶质瘤;细胞增殖;细胞周期
中图法分类号:R345;R730.264;R977.3 文献标识码:A

Roles of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) in nordihydroguaiaretic acid-induced inhibitory effect on proliferation of human malignant glioma cells

GUO De-yu, CHEN Yi-sheng, BIAN Xiu-wu, SHI Jing-quan, CHEN Zi-qiang, XIN Rong (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate roles of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) in nordihydroguaiaretic acid (NDGA)-induced inhibitory effect on proliferation of human malignant glioma cells. Methods The techniques of cell culture, cell counts, flow cytometry, immunoprecipitation, immunohistochemistry and image analysis were employed in this study. Results ①A concentration-dependent inhibition of proliferation was demonstrated in the SHG-44 cells incubated for 24 hours in the presence of NDGA, and cell proliferation was blocked in the G_1→S phase. ②The activity of CDK4 was decreased apparently in the SHG-44 cells treated for 24 hours with 10 to 200 μmol/L NDGA in a concentration-dependent way. ③The expression of CDK4 gene was downregulated in the cells after NDGA treatment. Conclusion CDK4 plays an important role in NDGA-induced inhibition of glioma cell proliferation.

Key words: nordihydroguaiaretic acid (NDGA); glioma; cell proliferation; cell cycle

去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是从常青灌木中提取的一种天然成分,是脂氧化酶的抑制剂,近年来发现其具有抗肿瘤作用[1~3]。我们既往的研究结果发现,NDGA能抑制人脑恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞的增殖,并将它们阻滞于G_1→S期[4],但其分子机制尚不清楚。最近细胞周期调控的研究进展表明,在细胞周期G_1→S期的转变中,Cyclin D与CDK4(Cyclin-dependent kinase 4)形成的二聚体复合物Cyclin D-CDK4即CDK4蛋白激酶起着重要的调节作用。本实验检测了NDGA对SHG-44细胞CDK4基因的蛋白表达及CDK4蛋白激酶活性的影响,旨在探讨NDGA抑制SHG-44细胞增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脑恶性胶质瘤细胞系SHG-44(第110代)引自苏州医学院附属二院脑肿瘤研究室。细胞按我室常规方法进行培养。

1.2 NDGA溶液配制

用蒸馏水先配制0.01 mol/L pH 7.2的PBS液,用孔径0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,作为对照液。NDGA(Sigma公司)液用上述PBS液配制,浓度为5 mmol/L,37 ℃水浴并调整pH值直至完全溶解为止(溶液呈浅棕黄色),过滤除菌,备用。

1.3 细胞计数

生长旺盛的SHG-44细胞按10^5个/ml密度接种于24孔培养板中,然后加入NDGA液,使NDGA终浓度分别为10、50、100、150和200 μmol/L,药物作用24 h后取样(各3孔),用0.4%台盼蓝排除试验计数活细胞平均数(每孔计算重复3次取均值),并求出细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%)=(对照组活细胞数−NDGA组活细胞数)/对照组活细胞数×100%。

1.4 细胞周期分析

细胞按上述方法接种于24孔培养板中,经上述NDGA处理后取样本各3孔,常规流式细胞仪制样,FACStar^{plus}型流式细胞仪(Becton Dickinson公司)检测。每个样本随机测定10^4个细胞,并求出细胞增殖指数。计算方法为:增殖指数(%)=($S+G_2/M$)/(G_1+S+G_2/M)×100%。

1.5 CDK4激酶活性的分析

参照文献[5,6]方法并略加改进,具体步骤如下:培养细胞

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670296)
作者简介:郭德玉(1967—),男,湖南省冷水江市人,博士,副教授,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文13篇。电话:(023)68752246
收稿日期:2001-01-05;修回日期:2001-03-02

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

经1%NP-40裂解液4 ℃裂解20 min，3 000 r/min 离心15 min。取100 μl上清液，加入2.5 μl抗 cyclin D1抗体，室温振摇1 h。加入60 μl Protein A-sepharose(0.1 g/ml，Sigma公司产品) 4 ℃过夜，沉淀抗原抗体复合物。4 ℃ 2500 r/min 离心5 min，去上清。A蛋白-抗原-抗体三级复合物经RIPA缓冲液洗涤4次。反应缓冲液(20 mmol/L Tris，4 mmol/L $MgCl_2$，pH 7.5)洗涤3次。加入20 μl含18.5×10^4 Bq[γ-^{32}P]-ATP，50 μmol/L ATP和2 μg GST-Rb(Santa Cruz产品)的反应缓冲液，37 ℃孵育30 min。加入100 mmol/L ATP20 μl终止反应。负压抽取反应液于双层膜，反应缓冲液洗涤数次，10%三氯醋酸(TCA)抽洗2次。80 ℃烘干2 h。加入闪烁液，用芬兰产的LKB1217型液体闪烁计数仪测量转移到GST-Rb上的^{32}P的放射性活度(Bq)。实验设有只加复合物和只加[γ-^{32}P]-ATP两个阴性对照。

1.6 免疫组化染色

细胞按上述方法接种于预先置有干净消毒盖玻片的6孔培养板中或直径为35 mm的培养皿中，经上述NDGA处理后取出盖玻片，用PBS洗涤两次，95%乙醇固定30 min，自然晾干，常规免疫组化染色(S-P法)。一抗兔抗人CDK4购自Santa Cruz公司，S-P试剂盒购自Zymed公司，抗体稀释度为1∶25，DAB显色。染色结果用德国Leica公司MD20型真彩色图像分析仪进行图像分析。每组随机测定100个细胞，分别测出阳性反应细胞的积分光密度(IOD)。

1.7 统计学处理

采用本校数理统计教研室的统计程序包SPMR，进行两样本均数比较的统计学处理。

2 结果

2.1 NDGA对SHG-44细胞生长的影响

从图1可看出，与对照组相比，10～200 μmol/L不同浓度的NDGA对SHG-44细胞数均有影响，且NDGA液浓度越高，这种影响越明显，即呈明显的剂量依赖性。当将NDGA处理后的细胞置于新鲜培养基中(不含NDGA)培养24 h，则细胞恢复原有的增殖分裂能力。10、50、100、150、200 μmol/L不同浓度的NDGA处理细胞24 h后，对细胞的生长抑制率分别为15.8%、21.1%、31.6%、36.8%和63.2%。

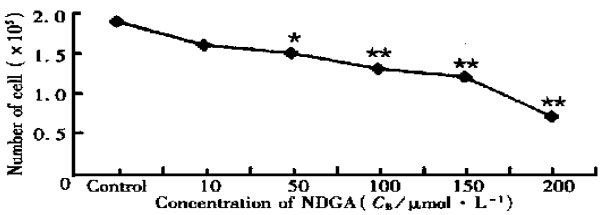


图1 NDGA影响SHG-44细胞生长的剂量-效应

Fig 1 Dose-effect of NDGA on SHG-44 cell growth

*：$P<0.05$；**：$P<0.01$ *vs* control

2.2 NDGA对SHG-44细胞周期的影响

与对照组相比，10～200 μmol/L不同浓度NDGA对SHG-44细胞的细胞周期均有作用，使G_1期细胞增多(由67.0%→83.1%)，S期和G_2/M期细胞减少(分别由28.2%→13.6%、4.7%→3.0%)，细胞增殖指数降低(由32.9%→16.8%)，且NDGA液浓度越高，这种作用越明显，有明显的剂量依赖性，见表1。

表1 不同浓度NDGA对SHG-44细胞周期及增殖指数(PI)的影响(%)

Tab 1 Effect of different concentration of NDGA on cell cycle and proliferative index (PI) of SHG-44 cells(%)

Item	Control	Concentration of NDGA(C_B/μmol·L^{-1})				
		10	50	100	150	200
G_1	67.0±1.64	74.3±1.76	73.2±1.85	77.2±2.12*	77.3±2.75*	83.1±2.84**
S	28.2±1.24	20.2±1.04*	23.1±0.89*	19.8±1.06*	19.5±1.21*	13.6±1.02**
G_2/M	4.7±0.11	5.6±0.26	3.8±0.13	3.0±0.11*	3.2±0.14*	3.2±0.16*
PI	32.9±1.48	25.8±1.28	26.9±1.27	22.8±2.01*	22.7±1.66*	16.8±1.47*

*：$P<0.05$；**：$P<0.01$ *vs* control

2.3 NDGA对SHG-44细胞CDK4激酶活性的影响

与对照组相比，10～200 μmol/L不同浓度的NDGA处理SHG-44细胞24 h后均可降低SHG-44细胞CDK4蛋白激酶的活性，且这种降低程度与所用NDGA的浓度有关，见图2。当NDGA的浓度为10 μmol/L和50 μmol/L时，NDGA使细胞CDK4蛋白激酶的活性由(2 814±257) Bq分别降为(1 908±273) Bq和(1 692±305) Bq，与对照组相比差异显著($P<0.05$)；当NDGA的浓度为100、150和200 μmol/L时，SHG-44细胞CDK4蛋白激酶的活性分别为(587±141) Bq、(637±170) Bq和(395±78) Bq，与对照组相比差异非常显著($P<0.01$)。

2.4 NDGA对SHG-44细胞CDK4蛋白表达的影响

免疫组化检测结果显示，NDGA处理后，SHG-44细胞CDK4蛋白表达明显减弱，图像分析结果显示，NDGA处理后，该细胞CDK4蛋白表达的阳性反应的IOD值较对照组明显减少，统计学差异显著($P<0.05$)，见图3。

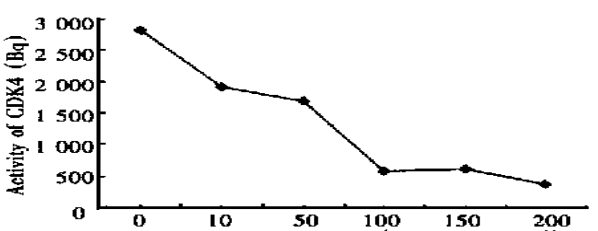


图2 不同浓度的NDGA对SHG-44细胞CDK4激酶活性(Bq)的影响

Fig 2 Effect of different concentration of NDGA on activity of CDK4 in SHG-44 cells

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



图 3　对照组 24 h SHG-44 细胞 CDK4 蛋白表达较强　(S-P× 200)
Fig 3　Strong positive staining of CDK4 in SHG-44 cells in control group (24 h)　(S-P× 200)

3　讨论

肿瘤细胞增殖活性是目前肿瘤病理研究中受到普遍关注的课题, 它不仅决定肿瘤的发生、发展, 而且在肿瘤对化疗、放疗的反应中有着重要意义[7]。肿瘤细胞增殖活性的检测方法很多, 本实验用流式细胞仪检测了 NDGA 对 SHG-44 细胞增殖活性的影响, 结果发现, NDGA 对 SHG-44 细胞有明显的增殖抑制作用, 表现为 NDGA 处理后, SHG-44 细胞 G_1 期细胞比例明显增多, S 期和 G_2/M 期细胞比例明显减少, 细胞增殖指数降低, 细胞生长减慢等, 使细胞增殖受阻于 G_1→S 期, 且这种作用有明显的剂量依赖性。同时本实验结果还发现, 当将 NDGA 处理后的细胞置于新鲜培养基中(不含 NDGA)培养 24 h, 则细胞恢复原有的增殖分裂能力, 提示在一定浓度范围内, NDGA 对 SHG-44 细胞的这种抑制作用是可逆的。

近年有关细胞周期调控的分子机制已有较大进展。现认为细胞周期受一系列正负信号的调节, 这些信号的扰乱可能与恶性肿瘤的生长失控有密切关系。在哺乳动物细胞中, Cyclin 与 Cyclin 依赖性激酶(CDKs)形成的二聚体复合物为细胞周期调控的核心机制, CDK4 蛋白激酶在细胞由 G_1→S 期转化中起重要的调节作用。NDGA 使 SHG-44 细胞增殖受阻于 G_1→S 期, 因此, 有理由推测 NDGA 的抗胶质瘤细胞增殖作用与 CDK4 蛋白激酶活性改变有关。本实验研究结果显示, 10 ~200 μmol/L 不同浓度的 NDGA 处理细胞 24 h 后, 均可引起 SHG-44 细胞 CDK4 蛋白激酶活性降低, 且这种作用具有剂量依赖性, 与 NDGA 对 SHG-44 细胞的增殖抑制作用相一致。结果提示 NDGA 引起的 SHG-44 细胞的增殖抑制与细胞CDK4蛋白激酶活性的降低密切相关, 后者可能是 NDGA 抑制该细胞增殖的重要机制之一。

细胞 CDK4 蛋白激酶的活性受多种因素的影响[8], CDK4 基因编码的 CDK4 蛋白是影响 CDK4 蛋白激酶活性的重要因素之一。CDK4 蛋白作为 CDK4 蛋白激酶的催化亚基, 与调节亚基 Cyclin D 结合组成 Cyclin D-CDK4 复合物, 行使 CDK4 蛋白激酶的功能。本实验免疫组化染色结果表明, NDGA 处理细胞后, SHG-44 细胞 CDK4 蛋白的表达水平明显降低, 与 NDGA 引起的 SHG-44 细胞 CDK4 蛋白激酶的活性降低密切相关。结果提示, CDK4 基因表达水平的降低, 可能是 NDGA 诱导的 SHG-44 细胞 CDK4 蛋白激酶活性降低的主要原因之一。这一结果与用 DMSO 诱导 N1E115 细胞分化时发现的 CDK2 蛋白激酶活性降低的机制相似[9]。

上述结果提示, NDGA 抑制 SHG-44 细胞增殖的机制之一, 可能是 NDGA 通过抑制细胞 CDK4 基因的表达, 进而引起细胞 CDK4 蛋白激酶活性的降低来实现的, CDK4 蛋白激酶活性的降低在 NDGA 抑制恶性胶质瘤细胞增殖中起着十分重要的作用。

参考文献:

[1] McCormick D L, Spicer A M. Nordihydroguaiaretic acid suppression of rat mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea[J]. Cancer Lett, 1987, 37(2): 139－146.

[2] Birkenfeld S, Zaltsmam Y A, Krispin M, *et al*. Antitumor effects of inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors[J]. Dis Colon Rectum, 1987, 30(1): 43－46.

[3] Wilson D E, DiGianfilippo A, Orey F G, *et al*. Effect of nordihydroguaiaretic acid on culture rat and human glioma cell proliferation[J]. J Neurosurg, 1989, 71(4): 551－557.

[4] 郭德玉, 陈意生, 卞修武, 等. 去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 增殖和分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 9－12.

[5] Patel V, Jakus J, Harris C M, *et al*. Altered expression and activity of G1/S cyclins and cyclin-dependent kinases characterize squamous cell carcinomas of the head and neck[J]. Int J Cancer, 1997, 73(4): 551－555.

[6] 张乾勇, 糜漫天, 郎海滨, 等. 视黄酸类物质诱导 HL-60 细胞分化过程中 CDKs 激酶活性变化[J]. 中国公共卫生学报, 1997, 16(5): 316－318.

[7] Wilson G D, Saunders M I, Dische S, *et al*. Direct comparison of bromodeoxyuridine and Ki-67 labelling indices in human tumors[J]. Cell Prolif, 1996, 29(3): 141－152.

[8] Morgan D O. Principles of CDK regulation[J]. Nature, 1995, 374(6 518): 131－134.

[9] Kranenburg O, Scharnhorst V, Van-der EbAJ. Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells[J]. J Cell Biol, 1995, 131(1): 227－234.

（编辑　王　红）

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