DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.018

文章编号:1000-5404(2000)03-0245-04

论著

NDGA对内皮细胞增殖抑制的作用研究

孙慧勤,陈意生,史景泉,卞修武,辛 榕 (第三军医大学附属西南医院病理研究所,重庆 400038)

提 要 目的:探讨去甲二氢愈创木酸(NDGA)对内皮细胞增殖活性的影响及特点。方法:采用形态学观察、细胞计数、流式细胞仪分析、免疫组织化学等技术方法观测不同浓度NDGA作用下人脐静脉内皮细胞ECV-304细胞增殖活性的变化。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(1~8 d)后,均出现NDGA抑制细胞增殖的作用,且这种作用与NDGA的浓度和作用时间有关。②NDGA处理细胞后出现细胞增殖活性降低,主要表现为有丝分裂计数和细胞增殖指数降低,细胞的生长抑制率增加,细胞生长减慢,免疫组化显示PCNA、BrdU标记指数下降等。结论:NDGA对内皮细胞增殖有明显抑制作用,此抑制作用可能是其影响血管生成的主要原因之一。

关键词 去甲二氢愈创木酸;血管生成;ECV-304细胞;内皮细胞;细胞增殖
中图法分类号 R329.28;R977.3 文献标识码 A

Inhibitory effects of NDGA on endothelial cell proliferation

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

Abstract Objective: To investigate the proliferation inhibition and survival of endothelial cells in response to NDGA. Methods: The effects of NDGA on the growth and survival of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cell line ECV-304 were determined with light microscopy, flow cytometry and immunhistochemistry. Results: A concentration-dependent proliferation inhibition and survival were demonstrated in the ECV-304 cells incubated for 1~3 days in the presence of NDGA. The proliferation inhibition was shown as the lessened cell growth, decreased counting of mitotic cells, proliferation index, PCNA-positive cell rate and BrdU labeling index. Conclusion: The inhibition of endothelial cell proliferation by NDGA may be the important cause for angiogenetic suppression by NDGA.

Key words NDGA; angiogenesis; ECV-304 cell; endothelial cell; proliferation

去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是从常青灌木Larrea divaricata和Guaiacum officinale中提取的一种天然药物成分,近年发现其具有抑制多种肿瘤的发生和发展的作用[1,2],但具体作用机制不清。本室既往的研究也发现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[3],而且亦能减低移植瘤和实验性胶质瘤的微血管密度,提示NDGA可能对胶质瘤的血管生成有影响。对此进行深入研究,不仅有利于阐明NDGA抗肿瘤机制,也为临床应用NDGA提供更多依据。在血管生成(Angiogenesis)过程中,血管内皮细胞的增殖是血管新生化发生的最基本和最重要的环节[4],本研究拟通过观测NDGA对内皮细胞增殖活性的影响,探讨NDGA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 CRI-1998)细胞,在含10%新生小牛血清(BS)、双抗(青霉素100单位/ml,链霉素100 μg/ml)的M199培养基(Gibco产品)中于37°C、5% CO_2 混合空气的孵箱(湿度为95%)培养,每3 d左右换液1次,约3~5 d经0.2%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(pH7.2)。

作者简介:孙慧勤(1964.1),女,云南省昆明市人,博士,讲师,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752246

收稿日期:1999-08-20;修回日期:1999-12-14

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 NDGA 对内皮细胞核分裂指数影响的观察

不同浓度(50、100、150 和 200 μmol/L)NDGA 和 PBS 处理后的细胞分别在倒置显微镜和经常规固定、HE 染色后于普通光镜下观察,同时测算细胞的核分裂指数,其方法为随机观察 500 个细胞,计算其中核分裂像的细胞所占的百分比为其分裂指数,每时相点计算 5 次取均值。

1.4 NDGA 对内皮细胞 PCNA、BrdU 标记影响的观察

生长于盖玻片上的细胞各经 100 μmol/L NDGA 和 PBS 处理后 1~3 d,每日于收集前 2 h 加入 BrdU 液(Sigma 产品),使其终浓度为 5 μmol/L,作用 2 h 后取出,PBS 洗后,4% 多聚甲醛固定,以 SP 法进行 PCNA(Dako 公司,1∶10)、BrdU(Zymed 公司,1∶20)免疫组化染色,结果进行半定量分析,测定标记指数(LI)。

1.5 NDGA 对内皮细胞增殖动力学影响的观测

1.5.1 NDGA 对生长曲线及活细胞百分率影响的测定 实验组和对照组各给 100 μmol/L NDGA 与 PBS,于给药后的 1~8 d,每日以 0.4% Trypan-blue 染色后计算细胞密度及活细胞数,并求出细胞生长抑制率。

$$细胞生长抑制率(\%)=\frac{对照组活细胞数-NDGA组活细胞数}{对照组活细胞数}\times 100\%$$

每组、每时相点各 3 孔细胞,取均值计算。

1.5.2 不同剂量 NDGA 对内皮细胞计数及活细胞百分率影响

实验组给 50、100、150、200 μmol/L 的 NDGA,对照组给等体积 PBS,给药后 1、2、3 d 进行上述指标的观测。

1.6 细胞增殖指数的检测

将 100 μmol/L NDGA 或 PBS 处理后 12、24、48、72 h 的细胞制成单细胞悬液,于 70% 冷乙醇中 −20°C 固定,经 RNA 酶 37°C 消化 30 min,碘化丙锭染色 2 h,用 FACStar^{plus}型流式细胞仪(Becton dickinson 公司)检测,以 CeLLFIT 软件分析测定细胞周期,每个样本随机测定 104 个细胞,每组、每时相点 3 孔细胞,重复 3 次试验。求出细胞的增殖指数(PI),计算方法为:

$$PI=\frac{S+G_2/M}{G_0/G_1+S+G_2/M}\times 100\%$$

1.7 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 对内皮细胞核分裂指数的影响

培养的 ECV-304 细胞多角形,呈典型的卵石状镶嵌排列,有分裂像的细胞较多。NDGA 处理后,细胞稀疏,胞体变长,细胞透亮性(折光性)下降,脱落细胞及碎片增加,并可见酷似凋亡细胞及凋亡小体的形态学变化(另文发表)。此变化随给 NDGA 后时间的延长和剂量的增加而加重,HE 染色核分裂像明显减少,核分裂指数降低($P<0.01$),见表 1。

表 1 NDGA 处理不同时间后 ECV-304 细胞核分裂指数的变化(%)

Tab 1 Changes in proliferation index of ECV-304 cells after NDGA treatment (%)

Groups	Time(d)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	8.15±0.98	8.8±1.64	8.2±2.17	11±0.82	9.68±0.64	9.4±1.52	8.04±0.57
NDGA	2.3±1.01△	2.88±0.76△	1.8±0.84△	4.5±1.29△	3.08±0.58△	4.6±0.89△	2.8±0.63△

△: $P<0.01$ *vs* control

2.2 PCNA、BrdU 免疫组织化学染色结果

ECV-304 细胞的 PCNA、BrdU 阳性反应较强,LI 分别在 33%和 25%左右;NDGA 处理后阳性表达减弱,LI 降低,分别在 20%和 15%左右。见图 1。

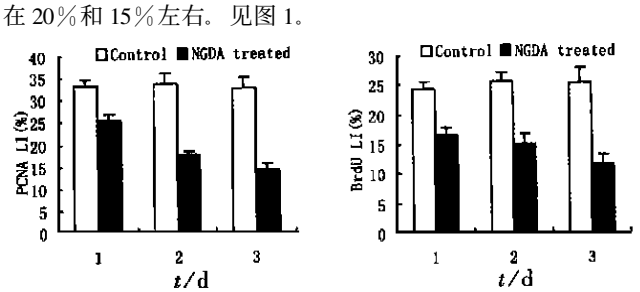


图 1 NDGA 对 ECV-304 细胞 PCNA(左)、BrdU(右)标记指数的影响

Fig 1 Effects of NDGA on PCNA (left), BrdU (right) labeling index of ECV-304 cells

2.3 NDGA 对内皮细胞增殖动力学的影响

2.3.1 NDGA 对 ECV-304 细胞生长曲线的影响 100 μmol/L 的 NDGA 处理后 1~8 d,细胞的生长明显受到抑制,24 h 后细胞总数较对照组明显减少,且作用时间越长,差异越明显,虽然 NDGA 明显削弱了内皮细胞生长的峰值,但细胞的增殖高峰出现时间仍较一致,见图 2。100 μmol/L 的 NDGA 处理后细胞的生长抑制率 1 d 为 75.2%,2 d 为 65%,3 d 为 65.1%,4 d 为 64.7%,5 d 为 64.2%,6 d 为 76.2%,7 d 为 62.0%,8 d 为 68.6%。

2.3.2 NDGA 抑制 ECV-304 细胞生长的剂量效应 与对照组相比,50~200 μmol/L 浓度的 NDGA 对 ECV-304 细胞数均有影响,且 NDGA 浓度越高,这种影响越明显,即呈明显的剂量依赖性;50 μmol/L、100 μmol/L 组活细胞百分率与对照组无显著差异,但 150 μmol/L、200 μmol/L 组其活细胞百分率则显著低于对照组,并随作用时间的延长而亦明显。50、100、150 和 200 μmol/L 的 NDGA 处理细胞 24 h 后,细胞的生长抑制率分

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

别为 16.1%、50.2%、51% 和 54.7%; 48 h 为 7.7%、45%、45.5%和 72%; 72 h 为 22%、68.7%、76.4%和 92.9%。

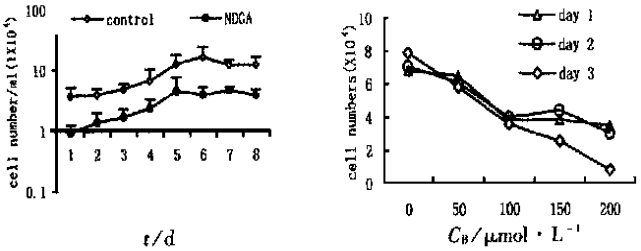


图 2　NDGA 对 ECV-304 细胞生长影响的时间效应(左)和剂量效应(右)

Fig 2　Time (left)-and dosage (right) effect of NDGA on the growth of ECV-304 cells

2.4　NDGA 对 ECV-304 细胞增殖指数的影响

与对照组相比, 100 μmol/L NDGA 处理后 12～72 h, 细胞周期中 G_1 期细胞增多, S 期和 G_2/M 期细胞减少, 细胞增殖指数降低, 见表 2, 且这种作用程度与作用时间有关, 以给 NDGA 的 48 h 最明显。

表 2　NDGA 对 ECV-304 细胞增殖指数的影响(%)

Tab 2　Changes of proliferation index of ECV-304 cells after NDGA treatment (%)

Groups	Time(h)			
	12	24	48	72
Control	52.47	52.70	48.09	46.55
NDGA	43.85	37.98	30.43	36.15

3　讨论

本研究观察了 NDGA 对 ECV-304 细胞作用的量效及时效关系, 结果发现, 不同浓度(50～200 μmol/L)的NDGA 处理 ECV-304 细胞 24 h 以后或一定浓度(100 μmol/L)的NDGA 处理 ECV-304 细胞不同时间, 均对 ECV-304 细胞有明显的增殖抑制作用, 表现为细胞有丝分裂计数和细胞增殖指数降低、细胞生长减慢、PCNA 和 BrdU 表达减弱与标记指数下降等, 且这种作用有明显的剂量依赖性和时间依赖性, 即在 50～200 μmol/L 浓度范围内, NDGA 浓度越高, 这种作用越明显; 在 100 μmol/L 的 NDGA 处理 1～8 d 内, 以处理后 48 h 这种增殖抑制作用最为明显, 在给药后的第 2 天, 形态学观察也发现内皮细胞数目明显较对照组减少, 并随时间延长或药量增加而愈加明显。同时本实验还发现, 当将 NDGA 处理后的细胞置于新鲜(不含NDGA)培养基中培养, 则细胞可恢复原有的增殖分裂能力, 提示 NDGA 对 ECV-304 细胞的这种抑制作用是可逆的, 且相对无毒性, 这与 Dethlefsen 等[5] 的观察相符合。

NDGA 处理后, ECV-304 细胞中 G1(含 G0)期细胞比例明显增多, S 期和 G2/M 期细胞比例明显减少, 使细胞增殖指数下降, 说明 NDGA 对内皮细胞周期有明显的影响, 即 NDGA 能够通过有效作用于细胞周期 G1→S 期, 从而抑制内皮细胞生长、增殖。本室已有的研究证实 NDGA 对胶质瘤细胞周期的抑制是与其降低CDK4 活性相关, NDGA 对内皮细胞周期的作用是否也与此相关尚待进一步探讨。

NDGA 是花生四烯酸代谢过程中脂氧化酶的强抑制剂。在花生四烯酸代谢过程中, 其通过环氧化酶(Cyclooxygenase, COX)途径产生前列腺素、前列环素等; 通过脂氧化酶(Lipoxygenase, LOX)通路产生 HETES、白三烯, 这些代谢产物已证明在肿瘤的增生、转移和免疫抑制等方面发挥作用从而促肿瘤生长[6]。研究还发现: 花生四烯酸及其脂氧化酶通路产物通过增加细胞内钙、激活 MAPKs 信号通路的外部 ERKs 等机制而促细胞增生[7,8]。MAPKs 信号通路目前认为是一系列生长因子引起细胞分裂增生的常见通道, NDGA 通过抑制花生四烯酸及其脂氧化酶通路产物的产生而抑制细胞增生; 同时 NDGA 能抑制 fos-jun-DNA 复合物的形成[9], 抑制生长因子激活的 NF-κB 也可抑制细胞增生[10]。因此, 本研究内皮细胞的增殖抑制可能也与上述机制有关, 但对于具体涉及的通路和机制还需要进一步研究证实。对于增殖活性越高的细胞, 花生四烯酸代谢越快, NDGA 抑制作用就表现越强, 这可能是 NDGA 对胶质瘤细胞的抑制作用强于对内皮细胞的原因之一。在肿瘤等血管增殖性疾病中, 血管内皮细胞的增殖活性明显增强, NDGA 对这些增殖强的细胞也应有强的抑制性, 这也提示该药在抑制血管生成方面具有潜在的应用价值。

(本室郭德玉、郭乔楠博士分别为该研究提供了部分抗体, 特此致谢!)

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] Yu A, Hashimura T, Nishio Y, *et al*. Anti-promoting effect of nordihydroguaiaretic acid on N-butyl-N (-hydroxybutyl) nitrosamine and sodium saccharin-induced rat urinary bladder carcinogenesis[J]. Jpn J Cancer Res, 1992, 83(9): 944－948.

[3] 卞修武, 史景泉, 辛榕, 等. 二氢去甲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.

[4] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353－364.

[5] Dethlefsen S M, Shepro D, D'Amore P A. Arachidonic acid

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

metabolites in bFGF-, PDGF-, and serum-stimulated vascular cell growth[J]. Exp Cell Res, 1994, 212(2): 262—273.

[6] Honn K V, Bockman R S, Marnett L J. Prostaglandins and cancer: A review of tumor initiation through tumor metastasis[J]. Prostaglandins, 1981, 21(5): 833—864.

[7] 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.

[8] Parry E W. The prevention of fatalities in cycloheximide challenged mice pretreated with a submicrogram dose of lipopolysaccharide or with a small volume of cell-free Ehrlich ascites tumour fluid[J]. Inflamm Res, 1998, 47(1): 8—11.

[9] Park S, Lee D K, Yang C H. Inhibition of fos-jun-DNA complex formation by dihydroguaiaretic acid and *in vitro* cytotoxic effects on cancer cells[J]. Cancer Lett, 1998, 127(1~2): 23—28.

[10] Brennan P, O′Neill L A. Inhibition of nuclear factor kappa B by direct modification in whole cells-mechanism of action of dihydroguaiaretic acid, curcumin and thiol modifers[J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55(7): 965—973.

(编辑 冷怀明)

(上接244页)

2 结果

2.1 VEGF的表达情况

在正常组织中, VEGF主要表达于上皮的棘层及基底细胞层, 结缔组织间质阳性反应较弱, 部分血管内皮细胞呈弱阳性反应; 在炎症组织中, 上皮细胞的染色与正常组基本相同, 另外, 在浆细胞、巨噬细胞以及血管内皮细胞也呈现出阳性反应。炎症组染色程度 $\bar{D}$ 值为 18.36±11.33, 与正常组(11.24±18.72)相比差异显著($P<0.05$)。

2.2 bFGF mRNA 表达情况

bFGF mRNA 阳性反应部位也主要位于胞浆中, 为蓝紫色细颗粒, 各组标本中上皮细胞均为阴性着色。在正常组中, bFGF mRNA 的阳性反应一般较弱, 其表达部位多位于血管内皮细胞和成纤维细胞中, 该组 $\bar{D}$ 值为 17.28±14.74; 在炎症组标本中, bFGF mRNA 的反应程度明显增加, 除血管内皮细胞外和成纤维细胞表达外, 巨噬细胞也有较强表达, $\bar{D}$ 值为 29.04±17.25, 与正常组相比差异非常明显($P<0.01$)。

3 讨论

颌面部损伤与人体其它组织相比, 伤口容易愈合, 且瘢痕较小, 其原因目前多认为与颌面部血运丰富有关。本研究结果显示, 在所有观察的正常组织上皮细胞中均未发现bFGF mRNA的表达, 而在间质中的成纤维细胞和血管内皮细胞中出现表达; VEGF 不仅可由上皮细胞产生和分泌, 血管内皮细胞也可表达。在炎症组织中不仅 VEGF 和 bFGF 阳性反应增强, 而且部分炎细胞中也发现有 VEGF 和 bFGF 的表达。上述结果提示, VEGF和bFGF 无论在正常的口腔软组织, 还是炎症状态下的组织均有丰富的来源, 显示了其可能发挥的作用。

生长因子一般是通过作用于靶细胞上的受体发挥作用的, bFGF 的受体主要位于血管内皮细胞, 显示了该生长因子具有对上皮细胞作用的能力[3]。VEGF 的受体 flt 和 flk/KDR 的表达一般位于内皮细胞[4], 同时, 成骨细胞、单核细胞、造血细胞和部分肿瘤细胞中也有表达[5]。结合本结果提示, bFGF 虽然不能由上皮细胞直接产生和分泌, 但来源于间质成纤维细胞、内皮细胞和巨噬细胞的 bFGF 可以以旁分泌的作用方式刺激上皮增殖, 同时以自分泌方式参与和维持结缔组织中的血管生成和成纤维细胞生长。VEGF 可以同时由上皮细胞和间质中的细胞合成, 分泌出的 VEGF 对上皮细胞和间质生长和代谢, 尤其是新生血管再生发挥着重要作用。本结果还揭示, 在炎症状态下, VEGF 和bFGF 的表达均有明显增强, 并且巨噬细胞等炎细胞也参与合成和分泌, 说明 VEGF 和 bFGF 可能也参与了组织的炎症和修复调节。

关键词 口腔粘膜; 血管内皮生长因子; 成纤维细胞生长因子

中图法分类号 R322.41 文献标识码 B

参考文献

[1] Nissen N N, Polverini P J, Koch A E, *et al*. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing[J]. Am J Pathol, 1998, 152(6): 1 445—1 452.

[2] Taichman N S, Cruchley A T, Fletcher L M, *et al*. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: A possible role in the maintenance of mucosal homeostasis[J]. Lab Invest, 1998, 78(7): 869—875.

[3] Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease[J]. Am J Physiol, 1997, 273(5 Pt 2): H2 091—2 104.

[4] Brown L F, Detman M, TognazziK, *et al*. Uterine smooth muscle cells express functional receptors(flt-1 and KDR) for vasculor permeability factor/vasculor endothelial growth factor[J]. Lab Invest, 1997, 76(2): 245—255.

[5] Carmeliet P, Moons L, Stassen J M, *et al*. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice[J]. Am J Pathol, 1997, 150(2): 761—776.

(编辑 王 红)

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