DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.002

文章编号:1000-5404(1999)10-0702-03

去甲二氢愈创木酸对恶性胶质瘤细胞裸鼠移植瘤的作用*

郭德玉** 陈意生 杜林林 卞修武 (第三军医大学基础医学部病理学教研室) 重庆,400038

提 要 **目的**:探讨去甲二氢愈创木酸(Nordihydrognaiaretic acid,NDGA)对恶性胶质瘤细胞裸鼠移植瘤的作用。**方法**:采用光镜和电镜观察移植瘤细胞的形态变化;用流式细胞仪进行细胞周期分析;用免疫组化检测肿瘤细胞中GFAP、PCNA的蛋白表达情况。**结果**:①NDGA可明显降低裸鼠移植瘤的成瘤率;②NDGA能抑制移植瘤细胞的生长和诱导其分化,使细胞增殖受阻于G_1→S期。**结论**:NDGA在体内与体外有相同的抗胶质瘤作用。

关键词 去甲二氢愈创木酸;胶质瘤;裸鼠;移植瘤
中图法分类号 R739.41 **文献标识码**:A

去甲二氢愈创木酸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,近年来发现其对胶质瘤等多种体外培养的肿瘤细胞具有抗肿瘤作用[1~3]。但其对体内肿瘤的作用如何,文献报道较少。本实验旨在通过观察NDGA对人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞裸鼠移植瘤生长和分化的影响,初步探讨其体内抗胶质瘤作用。

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,按我室常规方法培养。

1.2 裸鼠移植瘤模型制作

按本室建立的裸鼠移植瘤模型和文献[4]的方法进行。采用第三军医大学实验动物中心引进的远交系BALB/C nu/nu无胸腺裸鼠。鼠龄5~7周,体重15~20 g,两性兼用,饲养于净化室内。

1.3 实验分组

将裸鼠随机分为NDGA治疗组、生理盐水对照组和无移植瘤空白对照组,每组各6只。前两组裸鼠均用第5代移植瘤细胞悬液在胸前皮下接种瘤细胞约1×10^7个。治疗组于接种后第2周开始按27 mg/kg腹腔注射10 mmol/L NDGA,生理盐水对照组注射同体积的生理盐水。每隔3 d同剂量注射上述液1次。空白对照组不接种瘤细胞,也不做任何处理。接种后第40天终止观察,活杀取材(移植瘤、脑、心、肝和肾)。

1.4 观察指标

1.4.1 动物一般状况,移植瘤成瘤情况。

1.4.2 移植瘤生长特性 每周测量移植瘤短径(a)和长径(b),按文献[4]方法计算瘤重(RW),公式为:$RW=a^2\times b/2$。

1.4.3 细胞动力学检测 取移植瘤细胞悬液,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1×10^4个细胞,并求出细胞增殖指数。计算方法为:增殖指数(%)$=(S+G_2/M)/(G_1+S+G_2/M)\times100\%$。

1.4.4 移植瘤形态学观察 取移植瘤组织进行常规光、电镜制样、观察。

1.4.5 移植瘤免疫组化染色 取移植瘤组织进行胶质原纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acid protein,GFAP)、增殖细胞核抗原(Proliferated cell nuclear antigen,PCNA)免疫组化染色(S-P法)。所有载玻片均经APES处理,石蜡切片者经微波抗原修复15 min。

1.5 统计学处理

采用本校数理统计教研室的统计程序,进行两样本均数比较。$P<0.05$为差异显著,$P<0.01$为差异非常显著。

2 结果

2.1 荷瘤裸鼠情况

接种后裸鼠行动表现无特殊,于接种后1周末见皮下有1皮丘,较硬,后渐消退,并重新再生长出移植瘤。生理盐水对照组裸鼠净体重于接种第2周末开始下降,第3周末与NDGA治疗组差异显著($P<0.05$),第4、5周末两者差异非常显著($P<0.01$)。裸鼠净体重的变化情况见图1。

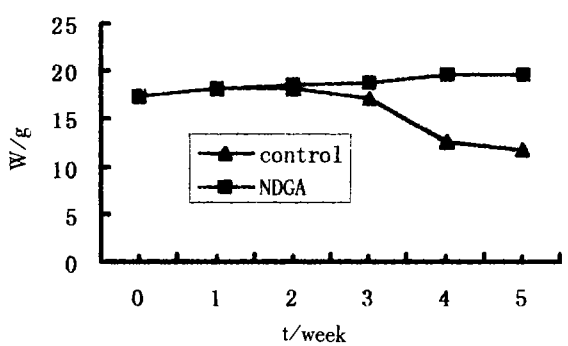


图1 裸鼠净重的变化

Fig 1 Changes of net weight of nude mice

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670296

** 郭德玉,男,32岁,讲师,博士

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

2.2　移植瘤成瘤和生长情况

生理盐水对照组于接种第 2 周末裸鼠移植瘤接种成瘤率为 100%(6/6)，而 NDGA 治疗组为 50%(3/6)，至第 4 周末 NDGA 治疗组仍为 50%，至第 5 周末 NDGA 治疗组才发展为 83%，空白对照组裸鼠均未见肿瘤发生。

移植瘤大小也明显不同，接种第 2 周末生理盐水对照组移植瘤最大达 1.2 cm×1.2 cm×1.0 cm，平均重量为(622±327) mg，而 NDGA 治疗组移植瘤最大为 0.4 cm×0.8 cm×1.0 cm，平均重量为(21±31)mg，至第 4 周末生理盐水对照组移植瘤平均重量为(8 970±2 565)mg，并见部分移植瘤表面形成溃疡，而 NDGA 治疗组移植瘤平均重量为(583±709)mg，两者差异非常显著($P<0.01$)，裸鼠移植瘤重量的变化情况见图 2。

移植瘤细胞周期测定结果表明，NDGA 治疗组第 40 天($S+G_2/M$)期细胞比例显著低于同时相点生理盐水对照组，而 G_0/G_1 期细胞比例则高于生理盐水对照组，细胞增殖指数明显降低(49.0%—30.2%)，细胞增殖受阻于 $G_1 \rightarrow S$ 期。各组移植瘤细胞周期分析结果见表 1。

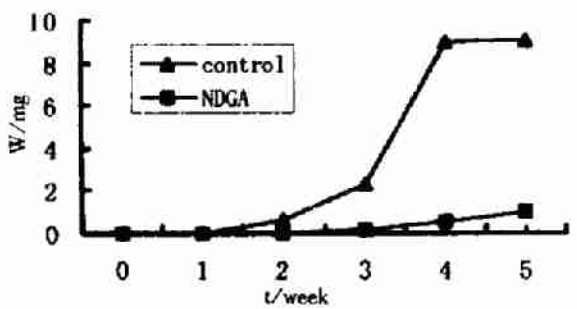


图 2　裸鼠移植瘤重量的变化

Fig 2　Changes of weight of xenograft

表 1　移植瘤细胞周期分析(%)

Tab 1　Analysis of cell cycle of xenograft cells (%)

Groups	Cell cycle		
	G_1	S	G_2/M
NDGA	69.9±1.61*	26.9±1.03*	3.3±0.16
Control	50.9±1.35	45.0±1.17	4.0±0.12

*：$P<0.01$ *vs* control group

2.3　移植瘤形态学观察

对照组：移植瘤肿块较大，与皮肤粘连紧密，部分肿块表面见溃疡形成，见图 3。光镜下见移植瘤组织由密集的成束排列的瘤细胞组成，瘤细胞呈粗梭形，平行或交织状排列，核大深染，以单核为主，病理性核分裂象常见。间质较少，仅有薄壁微血管。瘤细胞向周围包膜内浸润性生长。部分瘤组织中央区域出现一些变性、坏死。移植瘤不同区域瘤细胞形态和分化程度基本一致。电镜下见瘤细胞核膜内陷形成核内小管及核内假包涵体，核仁易见。大部分瘤细胞胞浆内胶质细丝稀疏而短或缺乏。细胞突起较少，有少量微绒毛。

治疗组：移植瘤肿块较小，与皮肤粘连不如对照组紧密，表面未见溃疡形成，见图 3。光镜下见瘤细胞排列较对照组稀疏，呈细梭形，出现大片和灶性高分化区。胞浆较丰富、红染，核细长，分裂象少见。电镜下见瘤细胞的胞浆内出现成束的胶质细丝，有些胞浆线粒体嵴断裂、空泡化和髓鞘样结构形成，细胞外间隙内见很多细长的胞突和不规则的微绒毛交织在一起，并见一些细小伪足形成。部分瘤组织区域内见瘤细胞核异染色质边集、结块或核固缩，胞浆内细胞器稀少。



图 3　接种后 40 天部分裸鼠

上排：NDGA 治疗组；下排：生理盐水对照组

Fig 3　Parts of nude mice, 40 d after implantation

Upper: NDGA group; Lower: Control group

2.4　免疫组化染色结果

对照组移植瘤细胞 GFAP 弱阳性，PCNA 标记指数较高，平均为 62.4%，治疗组瘤细胞 GFAP 增强，PCNA 标记指数降低为 43.6%，两组比较差异显著($P<0.05$)，见图 4。

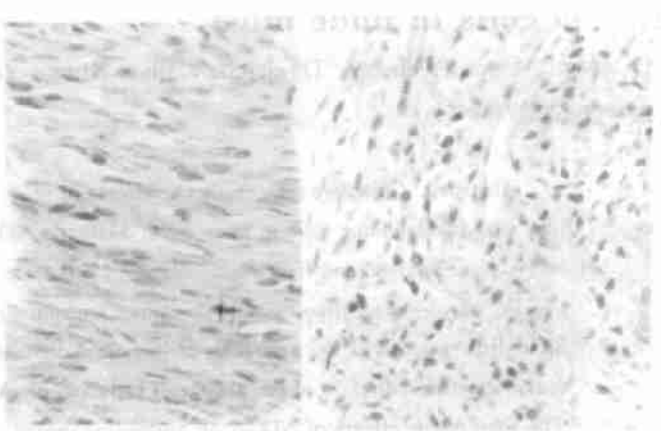


图 4　移植瘤细胞 PCNA 蛋白表达情况

左：NDGA 治疗组；右：生理盐水对照组　(S-P×200)

Fig 4　Protein expression of PCNA in xenograft cells

Left: NDGA group; Right: Control group　(S-P×200)

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

2.5 荷瘤裸鼠主要脏器观察

光镜下未发现心、肝、脑和肾有明显病变。

3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤，因其位置特殊和侵袭性生长，手术很难切净，复发率高，预后极差，因此，化疗常是必不可少的治疗措施。而传统的化疗方法毒副作用大，且易产生抗药性，所以，寻找低毒高效的药物新疗法对临床治疗恶性胶质瘤十分有意义，其中诱导分化治疗是一种特别有吸引力的治疗策略[5~7]。

肿瘤的诱导分化治疗不同于传统的化疗，它不直接杀伤癌细胞，而是诱导其重新获得向成熟细胞分化的能力。最近发现NDGA能抑制体外培养的多种肿瘤细胞的增殖和诱导其分化，但到目前为止，对体内肿瘤细胞生长、分化作用的报道较少。本实验结果表明，NDGA有抑制人脑胶质瘤裸鼠移植瘤的形成、生长和诱导其分化的作用，主要表现为裸鼠移植瘤成瘤率降低、所形成的肿瘤生长缓慢、瘤细胞异型性减小、胞浆中胶质细丝增多，瘤细胞增殖活性减弱、细胞增殖受阻于G_1→S期等。这些改变与体外实验结果一致，且对荷瘤裸鼠主要脏器无明显毒性。结果初步证实了NDGA不仅对体外培养的胶质瘤细胞有增殖抑制和诱导分化作用，而且对裸鼠体内移植瘤细胞具有相同的抗胶质瘤作用，为NDGA的临床应用提供了实验依据。

参考文献

1 Wilson D E, Di Gianfilippo A, Orey F G, *et al*. Effect of nordihydroguaiaretic acid on culture rat and human glioma cell proliferation. J Neurosurg, 1989, 71(4): 551

2 Wilson D E, Anderson K M, Seed T M, *et al*: Ultrastructural evidece for differentiation in a human glioblastoma cell line treated with inhibitor of eicosanoid metabolism. Neurosurgery, 1990, 27(4): 523

3 郭德玉，陈意生，史景泉，等. 去甲二氢愈创木酸对恶性胶质瘤细胞增殖和分化的影响. 第三军医大学学报，1999，21(1)：9

4 黄 强，杜子威，徐庚达，等. 人脑胶质瘤细胞系裸小鼠实体瘤模型NHG-1的建立及其特征的研究. 中华肿瘤杂志，1987，9(4)：269

5 Ebert P S, Salcman M. Differentiation therapy is potentiated by chemotherapy and hyperthermia in human and canine brain tumor cells *in vitro*. Neurosurgery, 1994, 34(4): 657

6 Beere II M, Hickman J A. Differentiation: A suitable strategy for cancer therapy? Anticancer Drug Des, 1993, 8(4): 299

7 Engelhard H H, Duncan H A, Canto M D. Molecular characterization of glioblastoma cell differentiation. Neurosurgery, 1997, 41(4): 886

(收稿：1999-04-10；修回：1999-07-15)

(编辑 汪勤俭)

Effects of nordihydroguaiarctic acid on xenograft of human malignant glioma cells in nude mice*

Guo Deyu, Chen Yisheng, Du Linlin, Bian Xiuwu (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To study the effects of nordihydroguaiarctic acid (NDGA) on the xenograft of human malignant glioma cells in nude mice. Methods: The morphological changes of xenograft cells were observed under optical and elecrron microscopy, cell cycle analysed by flow cytometry; and expression of GFAP and PCNA of xenograft cells were measured with immunohistochemistry in our study. Results: ①NDGA inhibited the growth of the xenograft of human malignant glioma cell line SHG-44 in nude mice. ②NDGA induced the differentiation of the xenograft cells and blocked the cell growth cycle in G_1→S phase. Conclusion: The therapeutic effects of NDGA on human malignant glioma *in vivo* are similar to those *in vitro*.

Key words nordihydroguaiarctic acid; glioma; nude mouse; xenograft

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670296

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