DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.005

去甲二氢愈创木酸对恶性胶质瘤细胞增殖和分化的影响*

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

提 要 目的:观察去甲二氢愈创木酸(NDGA)对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44细胞增殖和分化的影响。方法:细胞培养、免疫组化、光镜和电镜观察及流式细胞仪检测。结果:① 在 200μmol/L浓度范围内,NDGA对 SHG-44细胞有增殖抑制和诱导分化作用,且这种作用与浓度呈正相关;② 在 NDGA处理 96 h内,NDGA对 SHG-44细胞的增殖抑制作用以处理后 24 h最明显;③ NDGA处理后,SHG-44细胞增殖受阻于 G1→S期。结论:NDGA对 SHG-44细胞有明显的增殖抑制和诱导分化作用,且这种作用有周期特异性。

关键词 去甲二氢愈创木酸(NDGA);胶质瘤;诱导分化
中图法分类号 R739.4

去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是从常青灌木 *Larrea divaricata* 中提取的一种天然成分,是脂氧化酶的强抑制剂,具有抗氧化作用,国外曾作为食物添加剂使用,以防止食物酸败。近年来发现 NDGA具有抗肿瘤作用[1-3],如抑制实验诱发的大鼠乳腺癌和大肠癌的发生,抑制糖皮质激素诱导的淋巴瘤细胞的增殖等。本研究旨在观察 NDGA对人脑恶性胶质瘤细胞系 SHG-44细胞增殖和分化的影响。

1 材料和方法

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。细胞用含 10%小牛血清(杭州四季青生物材料研究所生产)的 RPMI-1640培养基(Gibco),另添加适量的 HEPES、抗生素(100 U/ml青霉素和 100μg/ml链霉素)和 3%谷氨酰胺(10μl/ml)置 37℃、5% CO_2混合气体的孵箱中培养,细胞换液时间为 1~2 d,传代 3~5 d,传代前用 0.25%胰酶消化。

1.2 NDGA溶液配制

用蒸馏水先配制 0.01 mol/L pH7.2的 PBS液,用孔径 0.22μm微孔滤膜过滤除菌,作为对照液。NDGA(Sigma)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 光镜观察及免疫组化染色

生长旺盛的 SHG-44细胞按 10^5/ml密度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,5 h细胞贴壁后加入 NDGA液,使其终浓度分别为 10、50、100、150和 200μmol/L,药物作用后 24 h和 48 h取出盖玻片,用 PBS洗涤两次,95%乙醇固定 30 min或冷丙酮 4℃固定 10 min,自然晾干,4℃保存。临用前用玻璃刀将盖玻片 1分为 9,常规 HE和免疫组织化学染色(SP法)。一抗鼠抗人增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、胶质原纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)、波形蛋白 Vimentin单抗购自中山生物技术有限公司,SP试剂盒购自 ZYMED公司,抗体稀释度 PCNA、GFAP、Vimentin为 1∶25,DAB显色。

1.4 电镜

经 NDGA处理后的细胞 PBS冲洗,0.25%胰酶消化,离心后收集细胞沉淀,2.5%戊二醛固定,常规电镜包埋、制样、观察。

1.5 细胞周期分析

细胞按上述密度接种于 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 200μmol/L,药物作用 24 h后取样(各 3孔)。另将上述细胞密度接种的 24孔培养板分 3组:A组接种时加 NDGA液,使其终浓度为 100μmol/L,B组接种时加等体积、等 pH的 PBS液,C组接种时不加任何液体,于药物作用 12、24、48、72和 96 h后取样(各 3孔)。方法为:用 0.25%胰酶消化细胞,吹打使其分散成单个细胞,用 PBS离心洗涤两次,调节每个样品细胞数为 2×10^6/ml,用微量移液器通过 350目尼龙网注入 70%冷乙醇中,4℃固定。测定前,倒掉酒精,用 PBS洗一遍后加入 RNA酶,37℃温育 30 min后,放入冰浴中终止消化。用碘化丙锭(PI)染色 2 h。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+G2/M)/(G1+S+G2/M)×100%。

1.6 细胞计数

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,用 0.4%台盼蓝排除试验计数活细胞平均

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670296
** 郭德玉,男,31岁,讲师,博士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

数(每孔重复计数 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%。

1.7 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的统计学处理。

2 结果

2.1 形态学观察

对照组瘤细胞大部分呈椭圆形或短梭形,胞体丰满,核分裂像多见,电镜下见核形状不规则,有较深的核沟,并见核内假包涵体,胞浆中细胞器较少,部分细胞见稀疏、短小的胶质细丝。NDGA处理组细胞经 NDGA处理后,在倒置显微镜下观察可见细胞透亮性(折光性)下降,并见颗粒,但台盼蓝试验阴性。HE染色见细胞分裂像减少,细胞胞体呈短梭形,胞突细而长,电镜下见瘤细胞核异型性降低,核仁小,胞浆内出现较多的胶质细丝,细胞器较丰富,部分有退变。

2.2 免疫组织化学染色

PCNA阳性呈棕黄色,位于胞核。GFAP、Vimentin阳性呈棕黄色,位于胞浆。对照组瘤细胞大部分 GFAP呈阴性,少数细胞呈弱阳性,见图 1;几乎所有瘤细胞均呈 Vimentin强阳性,PCNA阳性反应,标记指数(Labeling index, LI)为 65%。NDGA处理 24 h后瘤细胞 GFAP反应较对照组增强,见图 2,Vimentin反应减弱,PCNA的 LI降低为 40%。

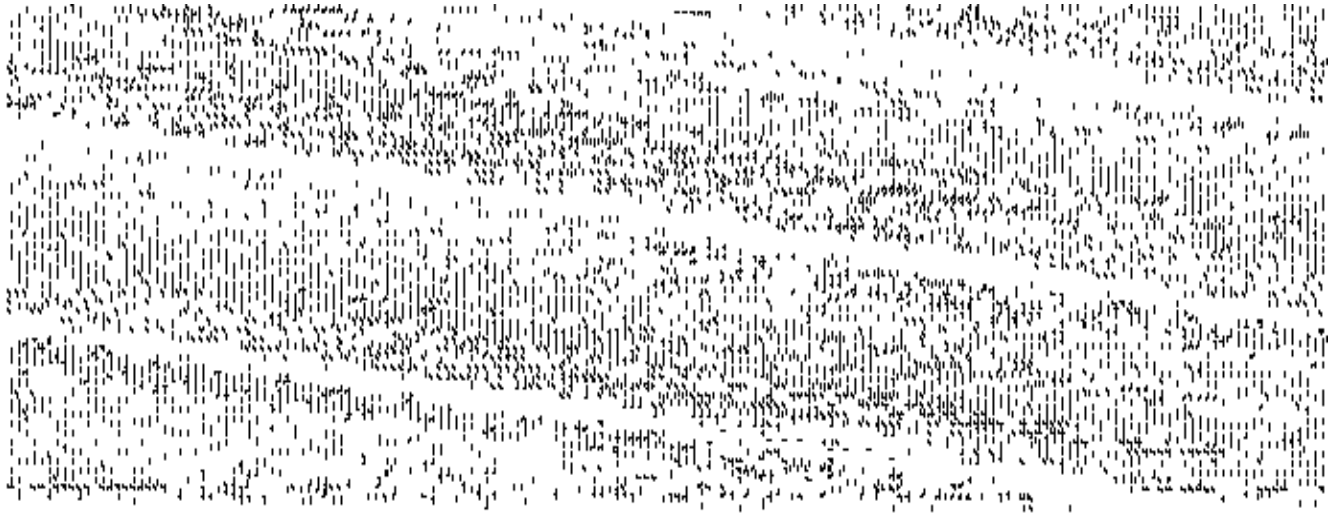


图 1 SHG-44细胞胞浆 GFAP表达较弱 对照组 24 h (S-P× 200)

Fig 1 Weaker positive staining of GFAP in the SHG-44 cytoplasm control 24 h (S-P× 200)

图 2 SHG-44细胞胞浆 GFAP表达增强 NDGA组 24 h (S-P× 200)

Fig 2 Stronger positive staining of GFAP in the SHG-44 cytoplasm 24 h after NDGA treatment (S-P× 200)

2.3 NDGA对 SHG-44细胞生长的影响

2.3.1 NDGA影响 SHG-44细胞生长的剂量效应 从图 3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。不同浓度(10、50、100、150、200 μmol/L)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%。

2.3.2 NDGA影响 SHG-44细胞生长的时间效应 从图 4可看出,与对照组相比,给 NDGA后 SHG-44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,细胞总数较对照组减少越明显。100 μmol/L的 NDGA处理不同时间后对 SHG-44细胞的生长抑制率 24 h为 31.6%,48 h为 68.1%,72 h为 75.0%,96 h为 75.6%。

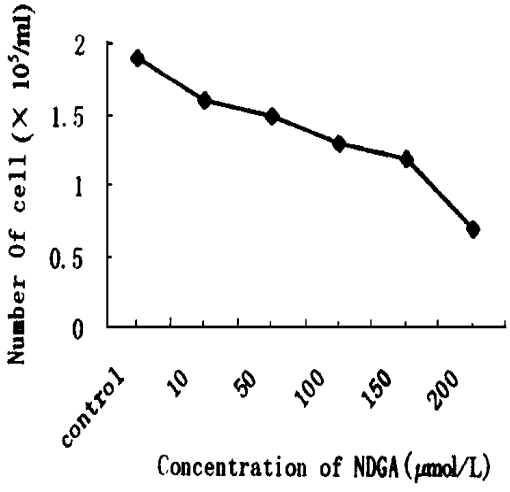


图 3 NDGA影响 SHG-44细胞生长的剂量效应

Fig 3 Dose effect of NDGA on the growth of SHG-44 cells

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

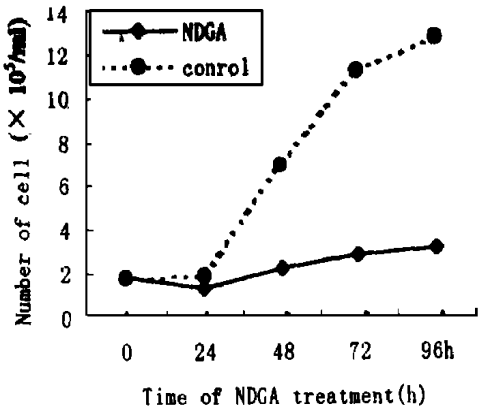


图 4　NDGA影响 SHG-44细胞生长的时间效应

Fig 4　Time effect of NDGA treatment on the growth of SHG-44 cells

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　Effects of different NDGA concentrations on the cell cycle and PI of SHG-44 cells(%)

	Control	Concentration of NDGA(μmol/L)				
		10	50	100	150	200
G1	67.0	74.3	73.2	77.2*	77.3*	83.1**
S	28.2	20.2*	23.1*	19.8*	19.5*	13.6**
G2/M	4.7	5.6	3.8	3.0*	3.2*	3.2*
PI	32.9	25.8	26.9	22.8*	22.7*	16.8*

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

2.4　细胞周期分析

2.4.1　NDGA影响 SHG-44细胞周期的剂量效应　　见表 1,与对照组相比,10~200μmol/L不同浓度 NDGA对 SHG-44细胞周期均有作用,使 G1期细胞增多(由 67.0%→83.1%),S期和 G2/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,即有明显的剂量依赖性。

2.4.2　NDGA影响 SHG-44细胞周期的时间效应　　见表 2,与对照组相比,100μmol/L NDGA处理细胞后 24~72 h,使 SHG-44细胞周期中 G1期细胞增多,S期和 G2/M期细胞减少,细胞增殖指数降低,且这种作用程度与作用时间有关,以给 NDGA后 24 h最明显(G1期由 68.0%→81.1%、S期由 27.7%→17.2%、G2/M期由 4.3%→1.7%,细胞增殖指数由 32.0%→18.9%,$P<0.01$)。而给 PBS后各时相点与对照组差异不显著($P>0.05$)。

表 2　不同处理时间 NDGA对 SHG-44细胞周期的影响(%)

Tab 2　Effects of different durations of NDGA treatment on the cell cycle of SHG-44 cells(%)

Groups	12 h			24 h			48 h			72 h			96 h		
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
NDGA	72.0	22.4	5.5	81.1**	17.2**	1.7*	79.2	8.1*	2.7*	74.1*	19.6	6.4*	80.2	18.2	1.5
PBS	76.3	19.8	3.9	67.0	28.6	4.4	73.8	15.3	10.9	65.1	22.0	12.9	72.4	22.7	4.9
Control	76.7	19.5	3.9	68.0	27.7	4.3	74.2	17.7	8.1	62.4	18.5	19.1	74.3	23.1	2.6

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

3　讨论

肿瘤细胞增殖活性是目前肿瘤病理检验和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[4]。以往有关 NDGA的抗肿瘤作用,多集中于肿瘤的促发阶段,而对已形成的肿瘤的作用报道较少。本实验检测了 SHG-44细胞生长情况、DNA含量(流式细胞仪检测)和 PCNA标记指数(免疫组化)等多种反映细胞增殖活性的指标,观察 NDGA对 SHG-44细胞增殖的影响。结果发现,NDGA对 SHG-44细胞有明显的增殖抑制作用,具体表现为 NDGA处理后细胞增殖指数降低、细胞生长减慢、免疫组化显示细胞 PCNA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 10~200μmol/L浓度范围内,NDGA浓度越高,这种作用越明显,即呈剂量依赖性;在 100μmol/L NDGA处理 SHG-44细胞 96 h内,以处理 24 h这种增殖抑制作用最明显。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 NDGA对 SHG-44细胞的这种抑制作用是可逆的,从另一侧面说明 NDGA对细胞的相对无毒性。

GFAP一直被视为星形细胞及其肿瘤的特异性标记物,在诊断及鉴别诊断上具有重要价值,我们既往的

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

研究显示 GFAP可与另一种中间丝蛋白 Vimentin共同表达于人脑星形细胞肿瘤中,与肿瘤的分化程度密切相关,国外报道也是如此[5]。本实验结果发现,SHG-44细胞 GFAP表达很弱或不表达,Vimentin强表达,当 NDGA处理 SHG-44细胞后,细胞 GFAP表达明显增强,Vimentin表达明显减弱,且电镜下观察发现细胞胞浆中胶质细丝明显增多,这些均显示细胞向成熟星形细胞分化,提示 NDGA有诱导 SHG-44细胞分化成熟的作用。

不同的抗恶性肿瘤化疗药物对细胞增殖动力学的影响不同,因此根据药物对细胞周期的影响分成了周期特异性药物和周期非特异性药物两类。本实验研究结果表明,NDGA对 SHG-44细胞周期有明显的影响,NDGA处理后,SHG-44细胞 G1期细胞比例明显增多,S期和 G2/M期细胞比例明显减少,使细胞增殖受阻于 G1→S期,显示 NDGA能够通过有效作用于细胞周期某一时相(G1→S期),从而抑制胶质瘤细胞的生长和增殖。

综上所述,NDGA对人脑恶性胶质瘤细胞系 SHG-44细胞有明显的增殖抑制和诱导分化作用,且这种增殖抑制作用具有周期特异性,但其作用机制尚有待进一步研究。

参考文献

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

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

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

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

5 Rutka J T, Murakami M, Dirs P B, *et al*. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. J Neurosurg, 1997, 87(3): 420

(收稿: 1998-06-03;修回: 1998-12-04)

(编辑 冯崇英)

Effects of nordihydroguaiaretic acid on proliferation and differentiation of human malignant glioma cells*

Guo Deyu, Chen Yisheng, Shi Jingquan, Bian Xiuwu, Xin Rong (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on proliferation and differentiation of human malignant glioma cell line SHG-44. Methods: Cell culture, immunohistochemistry, flow cytometry, light and electron microscopy were employed in this study. Results: ① NDGA with a concentration within 200μmol/L inhibited the proliferation of SHG-44 cells and this effect was positively correlated to the concentration. ② The most conspicuous inhibition of the proliferation was found at the 24^{h} h after treatment with 100μmol/L NDGA for up to 96 h. ③ Cell cycle revealed that the cell proliferation was blocked in the phase of G1 to S after treatment with NDGA. Conclusion: NDGA can inhibit proliferation and induce differentiation of human malignant glioma cells and this effect is cycle-specific.

Key words nordihydroguaiaretic acid; glioma; induced differentiation

* 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