·论著·

脂氧合酶抑制剂 NDGA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞生物学特性的影响

未德成 王忠荣 张燕敏 王 亮

【摘要】 **目的** 探讨脂氧合酶抑制剂去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid,NDGA)对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞生长的影响。 **方法** 采用 MTT 比色法、群体倍增时间、HE 染色、TUNEL 染色法等观察和检测 NDGA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖与凋亡的影响。 **结果** NDGA (5~100 μmol/L)可显著抑制 SK-N-SH 细胞增殖,并诱导其凋亡,其作用呈剂量和时间依赖性。 **结论** 脂氧合酶抑制剂 NDGA 可于体外抑制人神经母细胞瘤细胞的增殖,并诱导其凋亡。

【关键词】神经母细胞瘤;脂氧合酶抑制剂

Effects of lipoxygenase inhibitior NDGA on human neuroblastoma cellline SK-N-SH *in vitro*. *WEI De-cheng, WANG Zhong-rong, ZHANG Yan-min. Department of Pediatric Surgery, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei, 230001, China*

【**Abstract**】 **Objective** To explore the effects of lipoxygenase inhibitior NDGA on proliferation and apoptosis of human neuroblastoma cellline SK-N-SH. **Methods** MTT colorometric assay, average doubling time of SK-N-SH ,HE staining,TUNEL staining were used to study the proliferation inhibition and apoptotic induction of SK-N-SH cells by NDGA in vitro. **Results** Proliferating inhibition rate and apoptotic rate of SK-N-SH cells were increased with dose and action time by NDGA (5 ~ 100 μmol / L). **Conclusions** NDGA can inhibit the proliferation of SK-N-SH cells and induce the apoptosis.

【**Key words**】 Neuroblastoma;Lipoxygenase Inhibitors

去甲二氢愈创木酸 (nordihydroguaiaretic acid, NDGA) 能够抑制花生四烯酸通过脂氧合酶途径代谢，是脂氧合酶强烈抑制剂。近年来的研究发现，NDGA 具有多种生物学功能，以其抗肿瘤作用最引人关注[1]。NDGA 能在体外阻止乳腺癌、肾癌、前列腺癌、大肠癌及胶质瘤等多种肿瘤的发生[2-4]。本研究通过体外细胞培养，旨在探讨 NDGA 对神经母细胞瘤细胞增殖和凋亡的影响。

材料与方法

一、实验材料

人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库,NDGA 购自美国 Sigma 公司,细胞凋亡原位检测试剂盒 (TUNEL 染色法)购自德国 Roche 公司,二甲基亚砜 (DNSO)和四偶氮唑盐(MTT)购自北京索莱宝科技有限公司,胎牛血清购自杭州四季青生物技术材料公司,培养基为 RPMI 1640(购自 Gibco 公司),含 10%胎牛血清、青霉素 1×10^5 μ/mL、链霉素 0.1 g/L。NDGA 以 PBS 溶解配制成 4 mmol/L 母液，实验当日以新鲜培养基 RPMI 1640 稀释成所需浓度。

二、实验方法

1、细胞培养:人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞培养于含 10% 胎牛血清及双抗的 RPMI 1640 的培养液中,常规置于含 5%CO_2、37℃ 温箱中,隔天换液,3~5 d 传代。

2、MTT 比色法：采用 MTT 比色法检测 NDGA 对细胞增殖的影响。设实验组 5 组，包括对照组及不同药物浓度的药物组 4 组 (浓度分别为 5 μmol/L、10 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L)，每组设 4 个复孔。将 SK-N-SH 单细胞悬液以 10^4 个/ml 接种于 4 块 96 孔培养板中,每孔 200 μl。培养 24 h,PBS 洗涤,加入不同浓度的 NDGA,分别再培养 24 h、48 h、72 h 后取出,每孔加入 20 μl MTT(5 g/L)溶液,

作者单位：安徽医科大学附属安徽省立医院小儿外科 (合肥，230001)，通讯作者；王忠荣 E-mail:Wangzr1950@126.com

万方数据

继续培养 4 h，弃上清，每孔加入 200 μL DMSO，振荡 5 min，以全自动酶标仪在 490 nm 波长下检测各孔吸光度值(OD)，计算抑制率，并以抑制率为纵轴，以药物浓度为横轴绘制量-效曲线。抑制率 = (1 - 药物组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。

3、HE 染色观察　取对数生长期的 SK-N-SH 细胞，以 4×10^7 / L 接种于置有盖玻片的 24 孔培养板中，每孔 500 μL。24 h 后待细胞完全贴壁，分为对照组和浓度为 5 μmol / L、100 μmol / L 的 NDGA 组，每组设 3 个复孔。继续培养 48 h，取出细胞爬片，用 PBS 轻洗 2 次，加 80%的冷丙酮 4 ℃固定 30 min，依次经苏木素染色 2 min、10 ml/ L 的盐酸酒精分化 1 s，42 ℃温水蓝化 2 ~ 5 min 及伊红染色 10 s 后，常规脱水封片，观察结果。

4、TUNEL 染色检测细胞凋亡　细胞接种及分组加药方法同 HE 染色。继续培养 48 h、72 h，取出细胞爬片，按 TUNEL 染色试剂盒的说明书进行染色。光镜下观察，细胞核内出现棕褐色沉淀者为阳性细胞，计数不少于 1 000 个细胞，并计算凋亡率。

5、统计学处理　计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析（t 检验），以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

一、NDGA 对细胞增殖的抑制作用

实验结果显示，NDGA(5 ~ 10 μmol / L)能明显抑制 SK-N-SH 细胞增殖，与药物浓度和药物作用时间有明显依赖关系，其作用呈浓度时间依赖性，见表 1、图 1。

表 1　不同浓度 NDGA 作用于 SK-N-SH 细胞不同时段 OD 值

NDGA (μmol/L)	OD 值		
	48h	72h	24h
0	0.639±0.020	0.588±0.060	0.351±0.010
5	0.585±0.030	0.559±0.040	0.321±0.030
10	0.559±0.010	0.490±0.020	0.320±0.030
50	0.437±0.050	0.339±0.040*	0.269±0.020
100	0.358±0.030△	0.269±0.030△	0.256±0.010

注：* 与对照组相比，$P < 0.05$，△与对照组比 $P < 0.01$

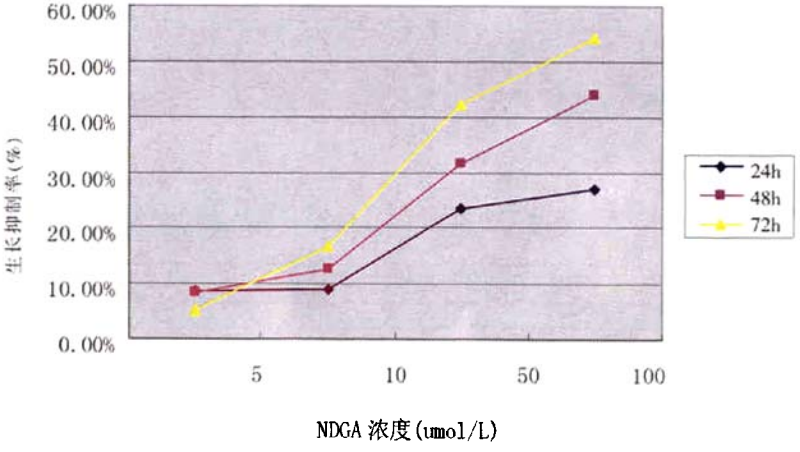

图 1　NDGA 对 SK-N-SH 细胞生长抑制作用量效曲线

二、细胞群体倍增时间

对照组细胞群体倍增时间为 25.71 h，5 μmol / L NDGA 组、10 μmol / L NDGA 组细胞群体倍增时间分别为 25.22 h 和 25.45 h，与对照组比较，差异无明显统计学意义，表明低浓度的 NDGA 对 SK-N-SH 细胞增殖无明显影响。当 NDGA 浓度增加到 50 umol / L 时，其群体倍增时间延长到 34.57 h，当 NDGA 浓度增加到 100 μmol / L 后，细胞群体倍增时间显著延长，达 45.19 h，细胞增生周期延长，而细胞增生速度减慢，表明一定浓度下的 NDGA 作用于 SK-N-SH 细胞，能够抑制 SK-N-SH 细胞的增殖。

万方数据

三、HE 染色观察

以 5 μmol / L、100 μmol / L 的 NDGA 作用 48 h 后，SK-N-SH 细胞的数目明显减少，细胞内空泡增多，细胞聚集成团，体积缩小，可见到胞质及核染色质浓缩深染的凋亡细胞，见图 2～4。

四、细胞凋亡的 TUNEL 染色检测

以5 μmol / L、100 μmol / L 的 NDGA 作用 48 h、72 h，可见明显深染棕褐色的 SK-N-SH 凋亡细胞，其凋亡率呈剂量和时间依赖性，见表 2、图 5～6。

表 2 NDGA 对不同时段 SK-N-SH 细胞凋亡率的影响

NDGA 浓度 (μmol/L)	凋亡率(%) 48h	72h
0	1.52±0.140	2.17±0.130
5	2.73±0.010	5.62±0.170*
100	6.94±0.180△	16.01±0.370△

注：* 与对照组相比 $P < 0.05$，△与对照组比 $P < 0.01$

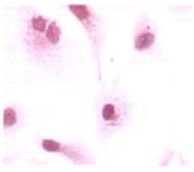

图 2 5μmol/L NDGA 作用 48 h 镜下图(× 400)

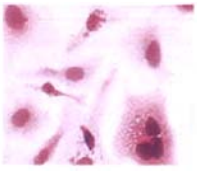

图 3 50μmol/L NDGA 作用 48 h 镜下图(× 400)

图 4 100μmol/L NDGA 作用 48h 镜下图(× 400)

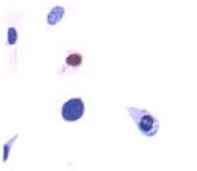

图 5 100μmol/L NDGA 作用 48 h 镜下图(× 400)

图 6 100μmo /L NDGA 作用 72 h 镜下图(× 400)

讨　论

近年来研究发现，某些不具有环氧合酶(COX)选择性的非甾体抗炎药(NSAID)可通过作用于脂氧合酶（Lipoxygenase,LOX）通路而抑制肿瘤生长。Hong 等[5]研究认为，LOX 抑制剂抑制肿瘤生长的作用比 COX 抑制剂更强。研究发现，与其他良性神经组织相比，神经母细胞瘤含有较高水平的花生四烯酸，而花生四烯酸的代谢产物可以促进多种肿瘤的生长和增殖。(NDGA)能够抑制花生四烯酸通过脂氧合酶途径代谢，是脂氧合酶强烈的抑制剂。

正常细胞在生长过程中，增殖和凋亡处于相对平衡状态，以维持生命个体的正常发展。肿瘤的发生和发展不仅与细胞的过度增殖有关，而且与细胞凋亡减少有关。多数抗肿瘤药物正是通过抑制细胞增殖或诱导细胞凋亡来发挥作用，从本研究结果来看，NDGA 对 SK-N-SH 细胞具有以上两方面作用。

本研究采用 MTT 法，研究结果方差分析显示，各浓度组之间有显著差异($P < 0.05$)，且 NDGA 对 SK-N-SH 细胞的生长抑制与药物浓度和时间有明显依赖关系。在细胞群体倍增时间方面，观察 NDGA 作用于体外神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞，后者增殖周期延长，细胞增殖速度减慢。表明不同浓度 NDGA 均能抑制 SK-N-SH 细胞增殖，呈剂量和时间依赖性。HE 染色显示，NDGA 具有诱导 SK-N-SH 细胞凋亡的作用。为进一步加以证实，利用特异性较强的 TUNEL 染色法检测 SK-N-SH 细胞凋亡情况，也为细胞凋亡提供了有力的证据。

本研究认为，NDGA 在神经母细胞瘤的治疗中有一定的研究和开发价值，具有良好的应用前景。尽管目前 NDGA 抑制肿瘤的机制尚不完全清楚，但相信随着各项实验研究的不断深入和完善，NDGA 有望成为一种新型的抗神经母细胞瘤药物，为神经母细胞瘤的临床治疗提供一种新的治疗手段。

参 考 文 献

1 Seufferlein T, Seckl MJ, Schwarz E, *et al.* Mechanisms of nordihydroguaiaretic acid -induced growth inhibition and apoptosis in human cancer cells [J]. Br J Cancer, 2002, 86 (7):23-25.

2 Matsayama M, Yoshimura R, Mitsnhashi M, *et al.* 5 Lipoxygenase inhibitors attenucete growth of human renal cell carcinoma and induce apoptosis through arachidonic acid pathway [J]. Oncol Rep, 2005, 14(1):73-79.

3 夏光涛，张源潮，武森森，等. 脂氧合酶抑制剂 NDGA 对 HT 29 结肠癌细胞诱导凋亡的研究 [J]. 中国现代普通外科进展，2006，9(1)：23.

4 Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breas cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(8):942-948.

5 Johnsen JI, Lindskog M, Ponthan F, *et al.* Cyclooxygenase-2 is expressed in Neuroblastoma, and nonsteroidal antiinflammatory durgs induce apoptosis and inhibit tumor growth in vivo [J]. Cancer Res, 2004, 64:7210-7215.

万方数据

脂氧合酶抑制剂NDGA对人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞生物学特性的影响

万方数据 WANFANG DATA 文献链接

作者： 未德成， 王忠荣， 张燕敏， 王亮
作者单位： 安徽医科大学附属安徽省立医院小儿外科,合肥,230001
刊名： 临床小儿外科杂志 ISTIC
英文刊名： JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY
年，卷(期)： 2008，7(1)
被引用次数： 1次

参考文献(5条)

1. Johnsen Jl;Lindskog M;Ponthan F Cyciooxygenase-2 is expressed in Neuroblastoma,and nonstemidal antiinnammatory durgs induce apoptosis and inhibit tumor growth in vivo 2004(20)

2. Tong WG;Ding XZ;Adrian TE The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breas cancer cells 2002(08)

3. 夏光涛;张源潮;武森森 脂氧合酶抑制剂NDGA对HT 29结肠癌细胞诱导凋亡的研究[期刊论文]-中国现代普通外科进展 2006(01)

4. Matsayama M;Yoshimura R;Mitsnhashi M 5 Lipoxygenase inhibitors attenucete growth of human renal cell carcinoma and induce apoptosis through arachidonic acid pathway 2005(01)

5. Seufferlein T;Seckl MJ;Schwam E Mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced growth inhibition and apoptosis in human cancer cells 2002(07)

相似文献(1条)

1. 学位论文 未德成 脂氧合酶抑制剂NDGA对人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞增殖和凋亡影响的实验研究 2008

背景:神经母细胞瘤(neuroblastoma，NB)是儿童最为常见的恶性肿瘤之一，严重危害儿童的身心健康。由于现有的各种治疗方法临床疗效不佳，开发新的抗肿瘤药物是全球医药工作者所面临的一项重要任务。在最近的几十年里，细胞的诱导分化治疗得到广泛的研究。我们既往研究发现，去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid,NDGA)对胶质瘤的体内外生长具有显著的抑制作用，但其体外抗神经母细胞瘤作用研究较少。

目的:

本实验通过脂氧合酶抑制剂去甲二氢愈创木酸作用于体外培养的神经母细胞瘤细胞株SK-N-SH，研究NDGA对神经母细胞瘤细胞的生长抑制作用及其可能机制，为神经母细胞瘤的防治探索新依据。

方法:

神经母细胞瘤细胞株SK-N-SH于体外培养，每日在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。不同浓度NDGA处理细胞，于作用的不同时间收集细胞，采用MTT比色法、肿瘤细胞计数、集落形成实验探讨NDGA对神经母细胞瘤细胞株SK-N-SH的增殖是否有抑制作用，HE染色、流式细胞术、TUNEL染色技术检测细胞凋亡和细胞周期分析。

结果:

(1)MTT比色法、肿瘤细胞计数等显示NDGA明显抑制体外培养的SK-N-SH细胞的增殖，并随着浓度的增加和时间的延长而增强，以100μmol/lNDGA作用抑制率最高，达63.6%，各组细胞集落形成率分别为74.8%、23.2%。

(2)NDGA(5μmol/l、100μmol/l)作用于SK-N-SH细胞72小时后，可观察到细胞凋亡的形态学改变。HE染色见凋亡细胞皱缩，核染色质浓缩深染，胞质嗜伊红染增强。

(3)FCM和TUNEL染色一致显示，NDGA(5 μmol/l、100μmol/l)分别作用于SK-N-SH细胞48小时和72小时均可诱导细胞凋亡。但NDGA对细胞周期无明显影响。

结论:

(1)NDGA对体外培养的神经母细胞瘤细胞株SK-N-SH的生长和增殖有抑制作用，呈剂量依赖性和时间依赖性。

(2)NDGA能够明显诱导体外培养的神经母细胞瘤细胞株SK-N-SH的凋亡，其诱导作用呈剂量依赖性和时间依赖性。

引证文献(1条)

1. 贾世军.赵涌.卞修武 诺帝对人卵巢癌细胞3AO和SKOV3增殖、周期及Aurora-A表达的影响[期刊论文]-第三军医大学学报 2009(18)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200801003.aspx
授权使用：黔南民族师范学院(gnnzsfxy)，授权号：1d9d48ce-4839-4967-8e78-9ed30125f8e1
下载时间：2011年4月28日