

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0262-04

NDGA 对 HT-29 结肠癌细胞生长抑制及对端粒酶表达影响的研究

夏光涛¹, 张源潮¹, 武森森², 张尚忠²(1. 山东大学山东省立医院风湿免疫科, 济南 250021; 2. 山东大学齐鲁医院消化科, 济南 250012)

[摘要] **目的:** 探讨脂氧合酶抑制剂 NDGA 在体外对结肠癌 HT-29 细胞株生长抑制、诱导凋亡, 并对端粒酶表达的影响进行研究。**方法:** 应用 MTT 法绘制生长曲线, 倒置相差显微镜观察细胞形态变化; 扫描电镜观察细胞超微结构变化, 观察凋亡小体; RT-PCR 检测端粒酶催化活性亚单位 (hTERT) 表达水平变化。**结果:** 不同浓度 NDGA 处理 HT-29 结肠癌细胞, 随着药物浓度加大, 细胞形态变圆, 体积缩小, 从瓶壁上逐步脱落, 肿瘤细胞生长抑制。应用扫描电镜可见凋亡小体形成。对照组结肠癌 HT-29 细胞 hTERT mRNA 呈阳性表达, 随着药物浓度上升, hTERT mRNA 表达水平逐步下降。**结论:** NDGA 对结肠癌 HT-29 细胞具有抑制生长、诱导凋亡作用, 并且具有剂量依赖效应。端粒酶参与其诱导凋亡的过程。

[关键词] 脂氧合酶; NDGA; 结肠癌; 生长抑制; 凋亡; 端粒酶

[中图分类号] R735.3 [文献标识码] A

The Inhibitory Effect of NDGA on the Growth of Colon Cancer Cell Line HT-29 and Its Impact on the Expression of Telomerase

XIA Guang-tao¹, ZHANG Yuan-chao¹, WU Sen-sen², ZHANG Shang-zhong²(1. Department of Rheumatism, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China; 2. Department of Digestion, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of NDGA, the lipoxygenase inhibitor, on colon cancer cell line HT-29 *in vitro* from the aspects of cell growth inhibition, cell apoptosis and its impact on the expression of telomerase. **Methods:** We applied respectively i) MTT to draw the growth curve. ii) inverted phase contrast microscope to observe morphologic change of cells, iii) scanning electron microscope to observe changes of cell's ultra-microstructure and apoptotic body. iv) RT-PCR to detect the changes of the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). **Results:** Different concentrations of NDGA were used to dispose cancer cells separately, with the rise of the drug's concentration, the form of cells became round, the volume waned, cells abscised from the inner surface of the bottle. and growth inhibition became increasing obvious. Also through scanning electron microscope, apoptic bodies could be found colon cancer cell line HT-29 showed positive expression of hTERTmRNA, which became weaker following the rising of the drug's concentration. **Conclusions:** NDGA which, displays the relying effect of doses, can inhibit the growth of colon cancer cell line HT-29 and induce its apoptosis, telomerase plays an active role in this course.

[Key words] lipoxygenase; NDGA colon cancer; growth inhibition; apoptosis; telomerase

花生四烯酸的代谢分为环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 和脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 两个途径。COX 是环氧化酶途径的关键酶, 抑制 COX 活性能够诱导结肠癌细胞凋亡, 抑制癌细胞转移, 对这一点国内外很多学者已达成共识。而对于抑制 LOX 途径能否抑制结肠癌细胞生长、诱导凋亡, 目前国内外鲜有报道。本文应用 LOX 抑制剂去甲二氢愈创木酸 (nordihydroguaiaretic acid, NDGA) 处理 HT-29 结肠癌细胞株, 研究其

抑制肿瘤细胞生长, 诱导凋亡的情况及对端粒酶表达影响进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

[作者简介] 夏光涛 (1974-), 男, 山东茌平人, 医学博士、博士后, 主要从事肿瘤、自然免疫病的相关治疗的研究

HT-29 结肠癌细胞株购自山东省医学科学院肿瘤生物治疗中心。NDGA 购自 Calbiochem 公司, 四氮唑盐 (MTT) 购自 Sigma 公司, RPMI-1640 培养液和胰蛋白酶购自 Gibco 公司, 新生小牛血清购自中国杭州四季青生物工程材料研究所。酶联免疫检测仪 (BIORAD450 型), 稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂), PCR 扩增仪 (MiniCycler 公司), JSM-T300 扫描电镜 (日本 JEOL 公司) 以及其他培养细胞设备。常规培养 HT-29 结肠癌细胞, 采用指数生长期的细胞进行实验。

1.2 细胞形态学观察

1.2.1 倒置显微镜观察

细胞传代后, 每隔 6 小时分别用高倍镜及低倍镜观察 HT-29 结肠癌细胞的形态学变化, 细胞生长情况, 培养液的情况。贴壁后, 每隔 4 小时观察 1 次。药物处理后每隔 2 小时观察 1 次细胞生长及形态学变化。

1.2.2 扫描电镜观察

将 HT-29 结肠癌细胞接种于内置载玻片的 24 孔板中, 培养 24 h 后, 在相应的孔内加入 NDGA (对照组终浓度 0 $\mu\text{mol/L}$, 实验组终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$), 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中常规培养 48 h。然后在超净工作台内从 24 孔板内分别取出对照组及实验组长有癌细胞的载玻片, 经 3% 戊二醛固定, 再用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 1% 四氧化锇 (锇酸) 固定 1 h, PBS 液清洗 3 次, 梯度乙醇脱水, 醋酸异戊脂置换, CO_2 临界点干燥、黏托、镀金, JSM-T300 扫描电镜 15 kV 加速电压观察, 拍照。

1.3 MTT 比色法绘制 HT-29 结肠癌细胞生长曲线

将 HT-29 结肠癌细胞应用细胞培养液制成单细胞悬液, 以 $10^4/\text{ml}$ 的浓度接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200 μl 。培养 24 h 后, 分为 4 组: 对照组 (NDGA 0 $\mu\text{mol/L}$)、实验组 (NDGA 分别为 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$), 每组设 5 个平行孔。分别在继续培养 24, 48, 72 h 后取出 1 块培养板检测细胞光密度 (OD)。取出的培养板中每孔加入新鲜配制的 MTT 液 (5 mg/ml) 20 μl , 继续培养 4 h, 小心吸去孔内培养上清液, 每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 150 μl , 振荡 10 min, 结晶物充分溶解后在酶联免疫检测仪上应用双波长 (490, 570 nm) 测光密度值。以时间为横轴, OD 值为纵轴绘制生长曲线。

1.4 RT-PCR 检测 HT-29 结肠癌细胞端粒酶催化亚单位 mRNA (hTERT mRNA) 表达变化

分别收集对照组及不同浓度药物 (1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 结肠癌细胞, 放入无菌 EP 管中保存于 -80°C 冰箱中备用。采用异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA, 并逆转录 cDNA。hTERT mRNA 引物序列:

上游引物: 5'- TTCCTGCACTGGCTGATGAGTGT- 3'; 下游引物: 5'- CGCTCGGCCCTCTTCTCTG- 3' 扩增片断长度为 329 bp。 β -action 作为内参照物, 上游引物: P1 5'- GTGGGGCGCCCCAGGCACCA- 3'; 下游引物: P2 5'- CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC- 3', 扩增片断长度为 539 bp。所有引物由上海博亚生物公司合成。PCR 循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环 35 次, 末次延长 7 min, 2% 琼脂凝胶电泳鉴定。紫外线灯下观察、照相。凝胶电泳图像输入美国 Kogak 凝胶分析系统, 应用 1D Image Analysis Software 进行表达强度分析, 测出 5-LOX 表达强度, 计算相对系数, 根据相对系数作统计学分析。

$$\text{相对系数} = 5 - \frac{\text{LOX 表达强度}}{\beta\text{-action 表达强度}}$$

1.5 统计学处理

定量资料数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计计算采用 SPSS12.0 统计软件进行处理, 进行方差分析、*t* 检验、Dunnnett *t* 检验以及其他统计处理, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 NDGA 作用 HT-29 结肠癌时细胞形态学观察

2.1.1 倒置显微镜进行细胞形态学观察

对照组 HT-29 结肠癌细胞呈类圆形, 部分伸展的癌细胞可呈现梭形, 以贴壁方式生长。经过 NDGA 作用 24 h 后, 细胞开始发生形态变化, 表现为细胞变圆, 体积缩小, 细胞内颗粒、空泡增多, 细胞黏附性降低, 有较多细胞从瓶壁脱落, 悬浮于培养液中 (图 1)。随药物浓度增大, 时间延长, 这种变化越来越明显。

2.1.2 扫描电镜对细胞超微结构观察

对照组 HT-29 结肠癌细胞呈贴壁生长, 呈类圆形, 部分癌细胞伸展为梭形, 细胞饱满, 表面有丰富微绒毛, 癌细胞之间连结紧密, 表面微绒毛之间相互交叉, 经过 NDGA (100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 48 h 癌细胞形成相互分隔的芽状突起, 形成凋亡小体 (图 2)。

2.2 NDGA 对 HT-29 结肠癌细胞生长曲线的影响

对照组 HT-29 结肠癌细胞生长迅速, 1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 NDGA 对 HT-29 结肠癌细胞生长均有抑制作用。1 $\mu\text{mol/L}$ 药物作用组各个时间段分别与对照组相比, 虽然 OD 值有下降趋势, 但与对照组相比, 差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。随着 NDGA 药物浓度的增大 (10, 100 $\mu\text{mol/L}$), OD 值分别与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NDGA 作用组 OD 值与对照组相比, 有显著差异 ($P < 0.01$), 说明 HT-29 结肠癌细胞受抑制的程度随药物

浓度的升高而增强(表1,图3)。

图1 倒置显微镜下观察 HT-29 结肠癌细胞变化

Fig.1 The changes of colon cancer line HT-29 observed with inverted microscope

A: HT-29 colon cancer cell in control group;
B: HT-29 colon cancer cell disposed with NDGA (100 μmol/L) for 48 h

表1 NDGA 对结肠癌细胞株 HT-29 OD 值的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 1 NDGA's influence on OD reckons of HT-29 colon cancer cells

NDGA (μmol/L)	24 h	48 h	72 h
Control	0.560 ± 0.067	0.712 ± 0.058	0.930 ± 0.112
1	0.487 ± 0.039	0.662 ± 0.050	0.837 ± 0.053
10	0.432 ± 0.072 [△]	0.473 ± 0.032*	0.555 ± 0.032*
100	0.218 ± 0.138*	0.352 ± 0.018*	0.456 ± 0.063*

△ P < 0.05, * P < 0.01

图2 扫描电镜观察 NDGA 作用后 HT-29 结肠癌细胞超微结构变化

Fig. 2 Changes of cell ultrastructure observed by scan electron microscope after colon cancer cell disposed with NDGA

A: The cells show well-stacked, a lot of microvilli on the surface; B: Apoptotic body found after cell disposed for 48 h

2.3 NDGA对HT-29结肠癌细胞hTERTmRNA的影响

β-actin 条带表现为扩增长度为 539 bp, 宽窄及深浅基本一致的条带, 而 hTERT mRNA 条带表现为扩增片断长度为 329 bp 的条带, 随着药物浓度增高, 条带

逐步变窄, 变暗。提示 hTERT mRNA 表达逐步降低。根据 hTERT mRNA 和 β-actin 的表达强度计算相对系数, 对照组相对系数为 0.948 ± 0.063。分别经 1 μmol/L, 10 μmol/L, 100 μmol/L 浓度的 NDGA 作用后 HT-29 结肠癌细胞的相对系数分别为 0.653 ± 0.025, 0.276 ± 0.046, 0.146 ± 0.011; 分别与对照组相比有显著差异 (P < 0.01) (表2, 图4)。

图3 NDGA 对结肠癌 HT-29 细胞生长曲线的影响

Fig. 3 NDGA's influence on growth curve of HT-29 colon cancer cell

表2 NDGA 对 HT-29 细胞 hTERT mRNA 表达影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab. 2 NDGA's influence on cell's expression of hTERT mRNA

NDGA(μmol/L)	hTERT mRNA/β-action
0	0.948 ± 0.063
1	0.653 ± 0.025
10	0.276 ± 0.046
100	0.146 ± 0.011

Compared with the control group (0 μmol/L); P < 0.01

3 讨论

对于花生四烯酸代谢途径与肿瘤的关系, 是近年来肿瘤研究方面的一个热点。抑制 COX 途径能够诱导肿瘤细胞的凋亡, 抑制肿瘤细胞的转移, 这一点已经形成共识。国内外学者开始认识到花生四烯酸另一条代谢途径-LOX 途径在肿瘤发生中的重要性。花生四烯酸经脂氧合酶途径进行生化代谢, 产生白三烯(leukotriene, LT) 及 HETE(hydroxyeicosatetraenoic acids)。LOX 的代谢物 LT 与 12HETE (12hydroxyeicosatetraenoic acids) 可调节白细胞的功能, 改变白细胞的趋向性。其中 LTB₄(leukotriene B₄) 是已知最强的白细胞趋

向因子,能促进白细胞发生趋化聚集、粒细胞脱粒以及超氧阴离子增多。LTC₄, LTD₄和 LTE₄是已知慢反应性过敏物质(slow reacting substance of anaphylaxis, SRS-A)的主要成分,能增加血管通透性,促进血浆渗出。有研究发现,相对于正常组织,睾丸癌、乳腺癌、结肠癌及肺癌肿瘤组织中 LOX 代谢水平明显升高,提示肿瘤的发生可能与 LOX 代谢途径有关^[1,2]。

图4 RT-PCR检测NDGA对HT-29
癌细胞hTERT mRNA表达影响

Fig. 4 NDGA's influence on cells' expression
of hTERT mRNA using RT-PCR

M: Marker; 1: 100 μmol/L; 2: 10 μmol/L;

3: 1 μmol/L; 4: Control

LOX 又可分为 5- LOX, 12- LOX 及 15- LOX 三种亚型,不同类别的肿瘤细胞表达不同亚型,在大多数肿瘤中表达 5- LOX。国外学者已证实结肠癌细胞株 HT- 29 具有合成 LT 的能力,表明该肿瘤细胞中存在 LOX 代谢途径,提示该细胞中有脂氧合酶抑制剂作用位点。对于 LOX 相关肿瘤的治疗,主要有两个途径,一个途径是直接应用 LT 受体拮抗剂,有学者应用 SC41930, LTB₄拮抗剂作用于结肠癌细胞,发现能够抑制其生长。另一个途径为抑制 LOX 活性。两者相比较而言,应用 LOX 抑制剂作用比较直接,可以直接抑制 LT 的合成,从而使肿瘤细胞内生化代谢紊乱,抑制细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,降低细胞转移能力^[3]。而从细胞培养方面选用 NDGA 处理 HT-29 结肠癌细胞,研究其诱导凋亡的作用,目前这方面报道甚少。

诱导肿瘤细胞发生凋亡的机制比较复杂,端粒酶是近年来研究热点。研究发现在 85% 肿瘤组织中端粒酶检测阳性,而在 90% 以上的正常组织中端粒

酶检测阴性。从而提示肿瘤发生与端粒酶具有密切关系。研究证实,端粒功能如被激活,细胞可获得无限增殖的能力,导致肿瘤的发生^[4]。抑制端粒酶活性,可以抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞发生凋亡,从而达到治疗肿瘤的目的。有学者应用药物降低端粒酶表达,从而能够诱导肺癌细胞生长抑制,使其发生凋亡^[5]。端粒酶有 3 个主要成分:端粒酶 RNA、端粒酶相关蛋白、端粒酶活性催化亚单位(hTERT)。其中,hTERT 是端粒酶活性的限速因子,与端粒酶的活性成正相关,能够反映出端粒酶的活性。本实验中,我们检测 hTERT mRNA 表达代表端粒酶活性。NDGA 在抑制肿瘤细胞生长的同时,hTERT mRNA 表达下降,提示端粒酶活性降低,证明 NDGA 影响端粒酶活性是其作用于 HT-29 结肠癌细胞机制之一。

本研究从 MTT 法、扫描电镜等多个方面证实 NDGA 能够抑制 HT-29 结肠癌细胞生长、诱导凋亡,而且这种作用随着药物浓度的升高而加强,具有剂量依赖效应。在其作用过程中,端粒酶参与其中。本研究为 LOX 抑制剂在临床上治疗结肠癌提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Yoshimura R, Matsuyama M, Mitsuhashi M, *et al.* Relationship between lipoxygenase and human testicular cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2004, 13(3): 389-393.
- [2] Steele VE, Holmes CA, Hank ET, *et al.* Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999, 8(5): 467-483.
- [3] Hong SH, Avis I, Vos MD, *et al.* Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(9): 2223-2228.
- [4] 曹红云. 端粒及端粒酶的研究现状[J]. *龙岩师专学报*, 2004, 22(3): 67-68.
- [5] Woo HJ, Choi YH. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(4): 1017-1023.

[收稿日期] 2005-06-24

[修回日期] 2005-09-15

[本文编辑] 王莹