

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.08.007

◇ 药学研究 ◇

丁酸钠调控 HepG2 细胞的增殖、凋亡和侵袭

王英¹, 吴庆柏¹, 沈鹏², 谢睿², 季国忠³, 王宏刚²作者单位:¹淮南市第二人民医院药学部, 江苏 淮安 223000;²南京医科大学附属淮安第一医院消化内科, 江苏 淮安 223300;³南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 江苏 南京 210011

摘要:目的 研究丁酸钠对人肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的影响,并探讨可能的作用机制。方法 用不同浓度丁酸钠处理 HepG2 细胞后,MTT 方法检测细胞的增殖能力,流式细胞技术检测细胞周期的分布和细胞凋亡,Transwell 小室检测丁酸钠对 HepG2 细胞侵袭能力的影响。免疫荧光法检测 HDAC4 蛋白在 HepG2 细胞中的表达及定位。蛋白质印迹法(Western Blot)检测 HDAC4 蛋白的表达水平。结果 随着丁酸钠处理浓度的增加和处理时间的延长,HepG2 细胞增殖能力明显受抑制,细胞周期也发生阻滞,G1 期细胞比例明显增加,而 S 期细胞比例明显减少。不同浓度(0,1,5,10 mmol/L)丁酸钠处理 HepG2 细胞 24 h 后,早期凋亡率分别为 2.7%、4.5%、6.5%、6.7%,差异有统计学意义($F=15.1, P=0.001$)。丁酸钠显著抑制细胞侵袭能力,侵袭细胞百分比分别降至 72.7% (1 mmol/L)、41.7% (5 mmol/L)、21.3% (10 mmol/L),差异有统计学意义($F=202.1, P<0.001$)。HDAC4 蛋白在 HepG2 细胞中呈阳性表达,主要位于细胞质中。丁酸钠明显抑制 HDAC4 蛋白的表达,并呈浓度依赖性。结论 丁酸钠抑制肝癌细胞系 HepG2 的增殖,调控细胞周期、促进凋亡,抑制细胞的侵袭能力。

关键词:丁酸钠; HepG2 细胞; 增殖; 凋亡

Sodium butyrate regulates the proliferation, apoptosis and invasion of HepG2 cells

WANG Ying¹, WU Qingbai¹, SHEN Peng², XIE Rui², JI Guozhong³, WANG Honggang²Author Affiliations:¹Department of Pharmacy, Huai'an Second People's Hospital, Huai'an, Jiangsu 223000, China;²Department of Gastroenterology, Huai'an First People's Hospital, Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China; ³Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Diseases, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210011, China

Abstract: **Objective** To determine the effect of sodium butyrate on HepG2 cells growth, apoptosis, invasion and to explore the potential mechanism. **Methods** HepG2 cell line was treated with different concentrations of NaBu, and MTT assay was conducted to detect cell viability. Cell cycle distribution and apoptosis was evaluated with flow cytometry. Cell invasion was analyzed by transwell assays. Immunofluorescence staining was used to detect HDAC4 protein expression and localization in HepG2 cells. Western Blot test was performed to determine the expression of HDAC4 protein. **Results** With the increase of NaBu concentration and the treatment time, the cell proliferation was significantly inhibited and the cell cycle was significantly blocked with the proportion of G1 cells increased significantly and the proportion of cells in the phase S significantly decreased. The early apoptotic rates of HepG2 cells treated with NaBu at different concentrations (0, 1, 5, 10 mmol/L) for 24 h were 2.7%, 4.5%, 6.5% and 6.7%, respectively, and the difference was statistically significant ($F=15.1, P=0.001$). NaBu significantly inhibited cell invasion, and the percentage of invasive cells decreased to 72.7% (1 mmol/L), 41.7% (5 mmol/L) and 21.3% (10 mmol/L), respectively. The difference was statistically significant ($F=202.1, P<0.001$). HDAC4 protein was positively expressed in HepG2 cells and mainly located in cytoplasm. NaBu significantly inhibited the expression of HDAC4 protein in a concentration dependent manner. **Conclusion** NaBu inhibited the proliferation of HepG2 cells by regulating cell cycle, promoting apoptosis and inhibiting invasion ability.

Key words: Sodium butyrate; HepG2 cells; Proliferation; Apoptosis

肝癌是人类较为常见的恶性肿瘤,在男性恶性肿瘤中死亡率排第二位,而在女性肿瘤病人中,死亡率排第六位^[1]。2008 年,全球约有 75 万新发肝

癌病人,我国死亡者约占一半^[2]。肝癌的早期诊断比较困难,血清中循环无细胞 DNA 联合分子标志物检测有助于提高诊断率^[3]。目前肝癌的临床疗效

有限,亟需寻找有效的靶向药物及新的作用靶点,改善病人预后。组蛋白去乙酰化酶(HDAC)催化组蛋白发生去乙酰化,应用HDAC抑制剂可通过调控靶基因的转录,抑制肿瘤细胞发生发展。HDAC4是属于Ⅱ类HDACs,可能与肿瘤发生发展有关。短链脂肪酸被认为是有效的HDAC抑制剂,调控多种癌细胞的生长、分化以及凋亡过程。丁酸钠(Sodium butyrate)是其中一种短链脂肪酸,可在肠道细菌分解纤维素时产生。丁酸钠在1978年^[4]被发现具有抑制HDAC作用,显示出潜在的抗肝癌作用^[5]。丁酸钠能导致多种肿瘤细胞如结肠癌、肝癌、乳腺癌细胞周期阻滞,促进细胞凋亡,诱导肿瘤细胞分化^[6-7],其机制可能是通过使组蛋白过乙酰化而发挥生物学作用。笔者研究丁酸钠对肝癌细胞HepG2的增殖、凋亡和细胞侵袭能力的影响,探讨可能的作用机制。

本研究起止时间为2013年3月至2015年9月。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 HepG2细胞系培养于含10%小牛血清和100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的DMEM培养液中。将含培养液的细胞培养瓶置于含5%二氧化碳的细胞培养箱培养。每24~36小时换液1次,待细胞长至约80%单层时,用0.25%胰酶溶液进行消化、传代,取生长良好的细胞进行实验。

1.2 细胞活力测定(MTT法) 取对数生长期细胞,制成 1×10^6 个/毫升单细胞悬液,接种于96孔板,每孔180 μL,随即加入不同浓度的丁酸钠溶液20 μL,使药物终浓度分别为0、0.5、1、2、5、10 mmol/L,每组设6个平行复孔,对照组加入等量磷酸盐缓冲液(PBS),分别培养24 h、48 h和72 h后,每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μL,继续孵育4 h后,弃上清液,加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μL,震荡10 min,待结晶溶解后用酶标仪570 nm波长检测吸光度。

1.3 细胞周期和凋亡检测(流式细胞仪检测) 细胞培养于六孔板中,过夜贴壁,待细胞长至约80%时,用丁酸钠处理细胞,使药物终浓度分别为0、1、5、10 mmol/L,24 h后胰酶消化,收集细胞,PBS清洗细胞2次(1 000 r/min,5 min),予100 μg/mL核糖核酸酶(RNase)处理,50 μg/mL碘化丙啶(PI)避光染色,流式细胞仪检测细胞周期。细胞凋亡按照Annexin V-FITC试剂盒操作说明进行操作,流式细胞仪检测。

1.4 细胞侵袭实验(Transwell侵袭实验) 将-20℃保存的Matrigel置于冰上过夜融化,制备稀

释的含Matrigel液体,加入到Transwell上室,覆盖整个聚碳酸酯膜,置于细胞培养箱使Matrigel聚合成凝胶。将已用不同浓度丁酸钠处理24 h的HepG2细胞接种于Transwell培养板上室,下室加入500 μL含10%小牛血清的培养液,培养24 h后,用棉签轻轻擦去上室Matrigel凝胶和聚碳酸酯膜上表面的细胞。小心取出上室,用冰预冷的甲醇固定30 min,结晶紫染色1 min。小心将聚碳酸酯膜自上室基底切取下来,置载玻片上,中性树脂封片。附着于聚碳酸酯膜下表面的细胞在显微镜下观察。将聚碳酸酯膜分为100个网格,按随机数字表法选取10个网格在高倍镜下(400倍)观察侵袭细胞并计数,取平均数。

1.5 免疫荧光实验 对单层生长细胞,在传代培养时,将细胞接种到预先放置有处理过的盖玻片的培养皿中,待细胞接近长成单层后取出盖玻片,PBS洗涤后,予多聚甲醛固定细胞,再进行通透处理,通透后用PBS洗涤,使用封闭液对细胞进行封闭,抗体孵育4℃过夜。PST漂洗后加入二抗,室温避光孵育1 h,漂洗后封片,荧光显微镜检测。

1.6 蛋白质印迹法(Western Blot) 用PBS洗涤各组细胞3次,每孔加入蛋白裂解液,在冰上裂解30 min后,立即用细胞刮棒刮下细胞,4℃离心后取上清液,加入上样缓冲液,100℃水浴锅中变性。每组按50 μL蛋白上样量进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,用150 mA恒流转膜1 h至聚偏氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h,加一抗4℃孵育过夜,PBS漂洗后,加二抗室温孵育1 h,PBS漂洗。暗室内加入ECL发光液,X线片感光,显影,定影。

1.7 统计学方法 用SPSS 18.0软件进行统计分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丁酸钠抑制HepG2细胞的增殖能力 不同浓度(0.5、1、2、5、10 mmol/L)丁酸钠对HepG2细胞的增殖能力的影响不同。低浓度(0.5 mmol/L)丁酸钠处理24 h后对细胞生长有轻微的促进作用。但随着丁酸钠浓度的增加(1、2、5、10 mmol/L)和处理时间的延长(24、48、72 h),HepG2细胞呈现出明显的生长抑制状态(图1)。10 mmol/L丁酸钠处理HepG2细胞24、48和72 h后,活细胞百分比分别为64.3%、41.7%、9.1%,差异有统计学意义($F = 212.8, P < 0.001$)。

2.2 丁酸钠影响HepG2细胞周期分布 不同浓度(0、1、5、10 mmol/L)丁酸钠处理HepG2细胞24 h

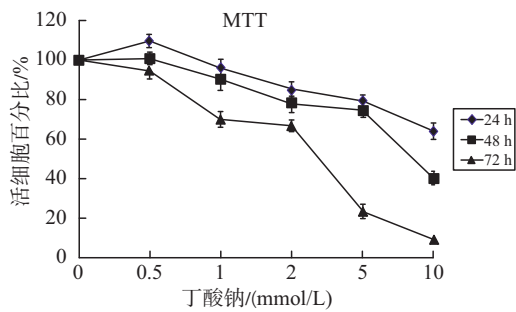


图1 丁酸钠抑制 HepG2 细胞的增殖能力

后,流式细胞技术检测细胞周期。1 mmol/L 丁酸钠处理后,HepG2 细胞 G1 期细胞比例稍增加,S 期细胞比例稍减少。但随着丁酸钠浓度的增加,细胞周期

明显发生阻滞,G1 期细胞比例明显增加,而 S 期细胞比例明显减少(图 2)。0、1、5、10 mmol/L 丁酸钠处理 HepG2 细胞 24 h 后,S 期细胞比例分别为 27.4%、29.1%、12.8%、10.5%,差异有统计学意义($F=33.7, P<0.001$)。

2.3 丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡 与对照组(0 mmol/L 丁酸钠)相比,不同浓度(1、5、10 mmol/L)丁酸钠处理 HepG2 细胞 24 h 后,凋亡细胞百分比明显增加,早期凋亡率分别为 2.7%、4.5%、6.5%、6.7%,差异有统计学意义($F=15.1, P=0.001$)。这提示丁酸钠对 HepG2 细胞的促凋亡作用呈药物浓度依赖性(图 3)。

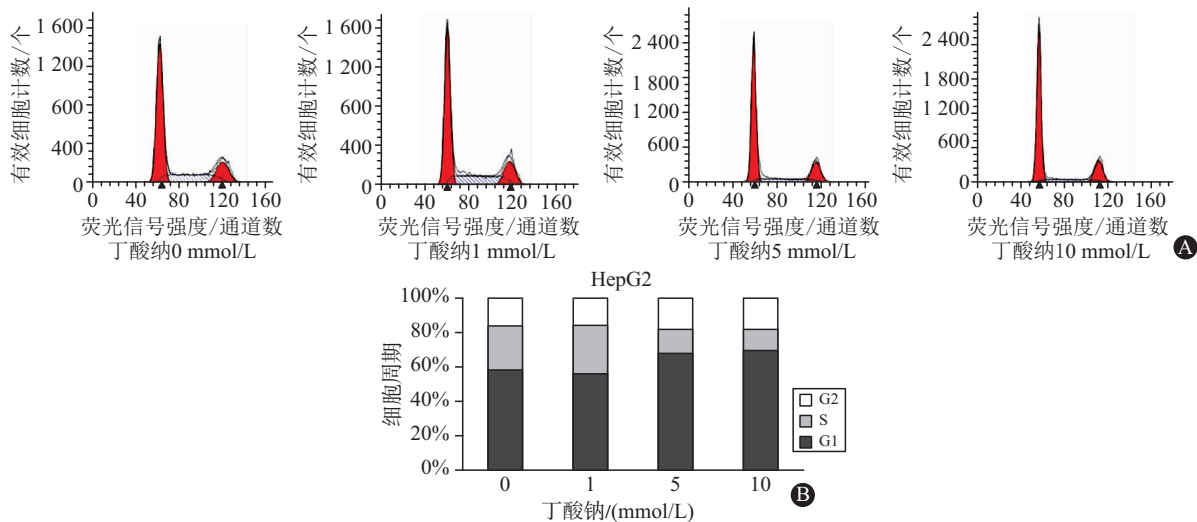
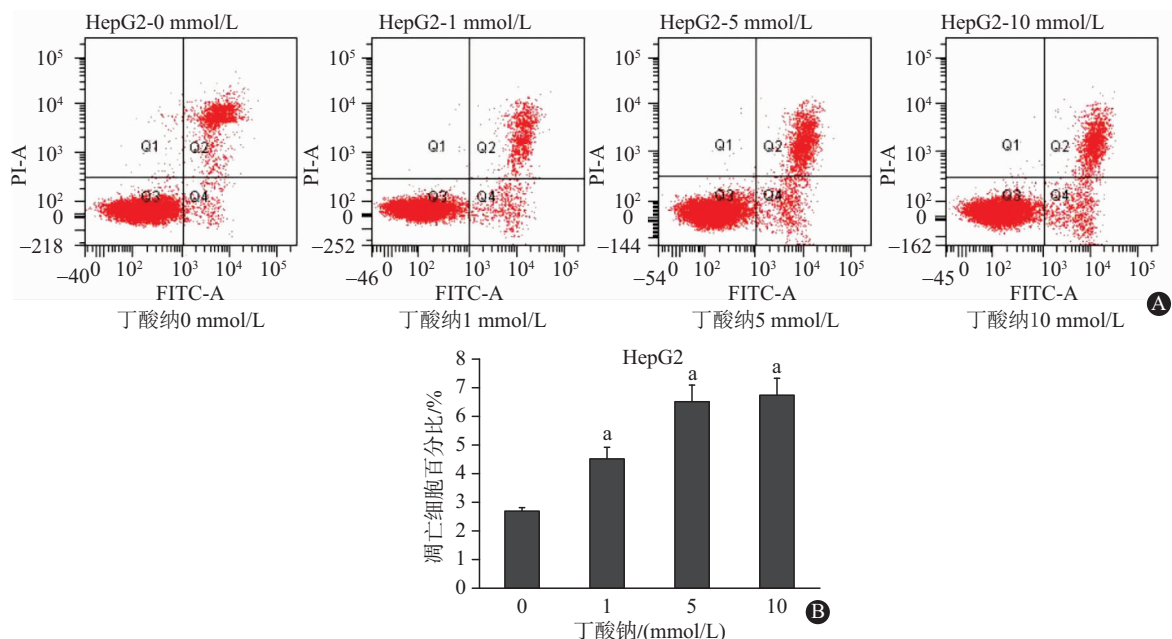


图2 丁酸钠影响 HepG2 细胞周期分布:A 为不同浓度(0、1、5、10 mmol/L)丁酸钠处理 HepG2 细胞 24 h 后,细胞周期的变化;B 为丁酸钠处理后,细胞周期 G1 期、S 期、G2 期的量化



注:与对照组(0 mmol/L 丁酸钠)相比,^a $P<0.05$

图3 丁酸钠诱导 HepG2 细胞凋亡:A 为不同浓度(0、1、5、10 mmol/L)丁酸钠处理 HepG2 细胞 24 h 后,细胞凋亡增加;B 为丁酸钠处理后,凋亡细胞百分比的量化

2.4 丁酸钠抑制 HepG2 细胞侵袭能力 本研究采用 Transwell 小室实验检测丁酸钠对肝癌细胞的侵袭能力。高浓度丁酸钠明显抑制了 HepG2 细胞的侵袭,并呈药物浓度依赖性(图4)。相对于0 mmol/L 丁酸钠组,1、5、10 mmol/L 丁酸钠组的侵袭细胞百分比分别降至 72.7%、41.7%、21.3%,差异有统计学意义($F=202.1, P<0.001$)。

2.5 HDAC4 蛋白在 HepG2 细胞中的表达及定位 应用免疫荧光法检测 HDAC4 蛋白的表达,发现 HDAC4 在 HepG2 细胞中表达阳性,细胞质和细胞核均有一定程度的表达,但主要位于细胞质(图5)。

2.6 丁酸钠显著抑制 HDAC4 蛋白表达 丁酸钠是一种 HDAC 抑制剂,可使组蛋白过乙酰化。不同浓度丁酸钠处理 HepG2 细胞后,Western Blot 法检测 HDAC4 蛋白的表达,发现随着处理浓度的增加,HDAC4 表达显著减少(图6)。

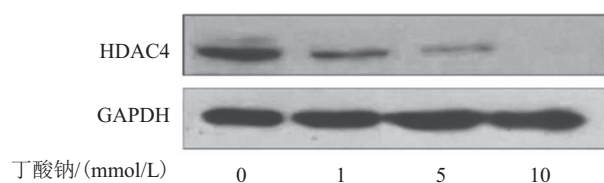


图6 丁酸钠显著抑制 HDAC4 蛋白表达

3 讨论

HDAC4 属于 II 类 HDACs,与多种生物学过程有关,比如神经退行性疾病^[8],内分泌疾病^[9-10]。组蛋白乙酰化过程与肿瘤的发生发展密切相关^[11-12]。可以推测,HDAC4 的抑制剂可能对肝癌有治疗作用。丁酸钠作为一种去乙酰化酶抑制剂,能够提高组蛋白乙酰化水平^[13]。研究发现丁酸钠能够抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞衰老和凋亡等,这可能与其提高组蛋白乙酰化有关。丁酸钠已经应用于肿瘤的临床研究,现已广泛用于畜禽饲料添加。丁酸钠能抑制大部分 HDACs,除了 III 类 HDACs 和 HDAC6、HDAC10^[14]。丁酸钠对多种肿瘤细胞均有抑制作用。丁酸钠可以诱导结肠癌、食管癌、肝癌、骨髓瘤等多种肿瘤细胞凋亡,尤其在消化系统肿瘤的诱导分化和凋亡成为近年研究热点。

本研究发现丁酸钠是一种具有 HDAC4 抑制活性的短链脂肪酸。丁酸钠能抑制 HepG2 肝癌细胞中 HDAC4 的表达。随着处理浓度的增加,丁酸钠明显抑制 HepG2 细胞生长增殖能力,调控细胞周期,促进 HepG2 细胞凋亡,抑制细胞侵袭能力,但其具体作用机制还不清楚。有学者认为组蛋白去乙酰化酶抑制剂 apicidin 抑制了 HDAC4 的表达,从而

抑制卵巢癌细胞的迁移^[15]。研究认为 HDAC4 可能参与了肿瘤的侵袭和转移过程^[16]。我们推测,丁酸钠可能通过抑制 HDAC4 而发挥作用。HDAC4 属于 II 类 HDACs,主要表达于细胞质,但细胞核中也有,提示 HDAC4 在细胞质和细胞核之间可能存在信号传递的作用,有研发靶向 HDAC4 抗肿瘤药物的临床应用前景^[17]。那么,丁酸钠是否通过抑制 HDAC4 而在基因水平调控肿瘤信号通路?我们下一步研究将构建 HDAC4 干扰载体,研究 HDAC4 下游的靶分子及其参与的信号途径,以进一步探讨肝癌的发生发展的机制。

总之,本研究认为丁酸钠抑制肝癌 HepG2 细胞增殖,促进细胞凋亡,抑制细胞侵袭能力。我们推测丁酸钠可能通过抑制 HDAC4,靶向调控肝癌的进展,为研发新型化疗药提供依据。

(本文图4,5见插图8-4)

参考文献

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [3] 陈恩, 丁益宏, 朱郁飞, 等. 肝细胞癌患者血清中循环无细胞 DNA、甲胎蛋白及 a-L-岩藻糖苷酶联合检测的意义 [J]. 安徽医药, 2016, 20(9): 1715-1719.
- [4] CANDIDO EP, REEVES R, DAVIE JR. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells [J]. Cell, 1978, 14(1): 105-113.
- [5] PANT K, YADAV AK, GUPTA P, et al. Butyrate induces ROS-mediated apoptosis by modulating miR-22/SIRT-1 pathway in hepatic cancer cells [J]. Redox Biol, 2017, 12: 340-349.
- [6] SALIMI V, SHAHSAVARI Z, SAFIZADEH B, et al. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment [J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1): 208.
- [7] SEIFRTOVÁ M, HAVELEK R, CAHLÍKOVÁ L, et al. Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells [J]. Phytomedicine, 2017, 35: 1-10.
- [8] LI J, CHEN J, RICUPERO CL, et al. Nuclear accumulation of HDAC4 in ATM deficiency promotes neurodegeneration in ataxia telangiectasia [J]. Nat Med, 2012, 18(5): 783-790.
- [9] OZCAN L, GHORPADE DS, ZHENG Z, et al. Hepatocyte DACH1 is increased in obesity via nuclear exclusion of HDAC4 and promotes hepatic insulin resistance [J]. Cell Rep, 2016, 15(10): 2214-2225.
- [10] GAUR V, CONNOR T, SANIGORSKI A, et al. Disruption of the class IIa HDAC corepressor complex increases energy expenditure