

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.03.014

正丁酸钠对涎腺腺样囊性癌细胞株 ACC-2 侵袭、迁移的影响及机制研究*

王 越¹, 吴娟娟², 刘 昕¹, 李亦捷¹, 王 雨¹, 魏 丹¹, 宋 琦¹, 李 萍^{1△}

(1. 遵义医学院口腔组织病理学教研室, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省贵阳市口腔医院预防科 550000)

[摘要] **目的** 探讨不同浓度正丁酸钠对涎腺腺样囊性癌细胞株 ACC-2 侵袭、迁移的影响与其作用机制。**方法** 噻唑蓝 (MTT) 法探索正丁酸钠作用 ACC-2 细胞的最佳浓度, Transwell 小室实验检测正丁酸钠对 ACC-2 细胞侵袭、迁移能力的影响, Western blot 和实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 分别检测 5 组浓度药物作用后 ACC-2 细胞中高迁移率蛋白 1 (HMGB1)、TLR4 的 mRNA 和蛋白的表达。**结果** 与对照组相比, 0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mmol/L 5 组浓度的正丁酸钠均能抑制 ACC-2 细胞增殖 ($P<0.05$) 且呈明显浓度依赖性; 5 组浓度正丁酸钠对细胞侵袭能力的影响差异无统计学意义 ($P>0.05$); 2.500、5.000、10.000 mmol/L 浓度正丁酸钠可以抑制 ACC-2 细胞的迁移能力 ($P<0.05$), 同时降低 ACC-2 细胞 HMGB1、TLR4 的 mRNA 及蛋白表达 ($P<0.05$); 相关性分析显示 TLR4 蛋白表达的降低与 HMGB1 的抑制呈正相关 ($r=0.810, P<0.05$)。**结论** 正丁酸钠能够抑制 ACC-2 细胞增殖, 浓度较高时可以抑制 ACC-2 细胞的迁移能力, 同时降低 HMGB1、TLR4 的 mRNA 与蛋白表达, 提示 NaB 对 ACC-2 迁移能力抑制可能通过下调 HMGB1、TLR4 的 mRNA 及蛋白表达来实现。

[关键词] 涎腺肿瘤; 癌, 腺样囊性; 正丁酸钠; 高迁移率蛋白-1; toll 样受体-4; 侵袭; 迁移
[中图分类号] R73-37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)03-0332-04

The effect and mechanism of sodium butyrate on the invasion and migration in human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line ACC-2*

Wang Yue¹, Wu Juanjuan², Liu Xin¹, Li Yijie¹, Wang Yu¹, Wei Dan¹, Song Qi¹, Li Ping^{1△}

(1. Department of Oral Histopathology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China;
2. Department of Oral Preventive, Guiyang Stomatological Hospital, Guiyang, Guizhou 550000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of sodium butyrate on the invasion and migration of human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line ACC-2 in vitro and to investigate the underlying mechanisms. **Methods** The cultured ACC-2 cells were treated with different concentrations of sodium butyrate for 24 h, and detected the viability rate of the cells by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay; the drug's influence on invasion and migration on ACC-2 were detected by Transwell experiment, while the protein and mRNA expression of HMGB1 and TLR4 explored by Western-blot and RT-PCR assay; the relationship between TLR4 expression and HMGB1 was investigated. **Results** Compared with control group, 0.625, 1.250, 2.500, 5.000, 10.000 mmol/L groups of sodium butyrate inhibited the proliferation of ACC-2 cells ($P<0.05$); the influence of sodium butyrate on the invasion of ACC-2 cells of all groups had no significant difference ($P>0.05$); only 2.500, 5.000 and 10.000 mmol/L groups inhibited ACC-2 cells migration and down-regulated the protein and mRNA of HMGB1 and TLR4 ($P<0.05$). Correlation analysis showed a positive correlation between the TLR4 protein and HMGB1 protein ($r=0.810, P<0.05$). **Conclusion** Sodium butyrate could inhibit ACC-2 cells proliferation and high concentration gropes inhibit ACC-2 cells migration, while reducing HMGB1 and TLR4 mRNA and protein expression, suggesting that NaB might inhibite ACC-2 cells migration through down-regulated the mRNA and protein expression.

[Key words] salivary gland neoplasms; carcinoma, adenoid cystic; sodium butyrate; high mobility group box-1; toll like receptor-4; invasion; migration

涎腺腺样囊性癌 (salivary adenoid cystic carcinoma, SACC) 是唾液腺高发的恶性肿瘤, 它具有局部侵袭性强、易沿神经鞘及组织间隙扩散、易发生远处转移等特点。正丁酸钠 (sodium butyrate, NaB) 是存在于结肠内的天然副产品, 具有调节哺乳动物细胞内的基因、阻滞细胞周期、抑制细胞增殖、促进凋亡、参与细胞分化的作用, 因此被认为是具有潜力的化疗药物^[1]。本实验主要探索正丁酸钠对涎腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞株侵袭、迁移能力的影响, 并初步探讨其作用机制, 为筛选临床靶向药物, 治疗涎腺腺样囊性癌提供初步的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 ACC-2 细胞株 (中国典型培养物保藏中心), 胎牛

血清 (FBS, 杭州四季青生物科技有限公司), NaB (sigma, 美国), 噻唑蓝 (MTT, 中国索莱宝公司), 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜, Millipore, 美国), 高迁移率蛋白 1 (HMGB1) 多克隆抗体 (Santa Cruz, 美国), TLR4 多克隆抗体 (Bioworld, 美国), 800CW 荧光二抗 (中国基因有限公司), 蛋白电泳系统、电转移系统 (BIO-RAD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ACC-2 细胞常规复苏, MEM 完全培养液 (含 1% 双抗、1% 谷氨酰胺、10% FBS)、37℃、5% CO₂、100% 湿度, 传代培养。

1.2.2 MTT 法对实验组药物浓度的筛选 对数期细胞接种

* 基金项目: 遵义市汇川区科技局红花岗科技局项目 [遵红科合社字 (2013) 16 号]; 遵义医学院研究生教育创新计划项目 [遵研创合 CX 字 (2013) 13 号]。 作者介绍: 王越 (1989—), 在读硕士, 主要从事口腔颌面部肿瘤研究。 △ 通讯作者, E-mail: 391613734@qq.com。

于96孔板,每孔细胞密度 5×10^3 ,100 μ L/孔、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养。NaB浓度0~ $\leq$ 20 mmol/L,每次实验选择5个药物浓度(对照组0 mmol/L),100 μ L/孔、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂,培养20 h。避光加入0.5%MTT液20 μ L,培养4 h,每孔加150 μ L DM-SO,酶标仪于490 nm检测各孔的光密度(OD)值。按以下公式计算:细胞存活率=(实验组OD值-调零组OD值)/(对照组OD值-调零组OD值) $\times$ 100%,并绘制剂量-效应曲线。每组实验重复3次。

1.2.3 Transwell小室的侵袭和迁移实验 按说明书配胶、铺胶,1 $\times$ 10⁵个/孔细胞悬液接种于上室,对照组加100 μ L不含药物的基础培养基,实验组分别加入0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mmol/L浓度NaB 100 μ L。下室加含20% FBS的培养基,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂,培养24 h。取出小室,淋洗、晾干、固定、染色、切下Transwell膜、中性树脂封片。随机选出10个视野在显微镜下观察、拍照、计数,每组实验重复3次。细胞迁移实验中除了Transwell小室不铺胶,细胞悬液为1 $\times$ 10⁴个/孔外,其余方法同侵袭实验。

1.2.4 Western blot对HMGB1、TLR4蛋白表达的测定 取对数期细胞待贴壁后分为对照组和实验组,对照组不做干预,实验组细胞用0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mmol/L浓度NaB处理、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂,培养24 h、提取蛋白、电泳, HMGB1蛋白使用12%分离胶,TLR4使用8%分离胶,转膜,5%脱脂奶粉,封闭1 h,分别用HMGB1多克隆抗体(1:500)、TLR4多克隆抗体(1:500)与800 CW荧光二抗(1:10 000)孵育2 h。ODYSSEY扫描蛋白条带,读取灰度值,收集蛋白印记图。每组实验重复3次。

1.2.5 实时荧光定量PCR(RT-PCR)对HMGB1、TLR4 mRNA含量测定 30 μ L DEPC水溶解提取的RNA沉淀。光谱图和D260/D280来判定RNA的提取质量,将每组的RNA浓度用DEPC水稀释为200 ng/ μ L,反转录合成cDNA。PCR检测HMGB1及TLR4的表达,反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变形3 min、1循环,95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s、40循环,55 $^{\circ}$ C延伸10 s、81循环。引物由日本TaKaRa生物工程公司合成。引物如下,HMGB1上游引物:5'-AGG ATC CCA ATG CAC CCA AG-3',下游引物:5'-CGC AAC ATC ACC AAT GGA CA-3';TLR4上游引物:5'-TGA GCA GTC GTG CTG GTA TC-3',下游引物:5'-CAG GGC TTT TCT GAG TCG TC-3'; β -action为内对照,上游引物:上游5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3',下游引物:5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'。琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物,于GelDoc XR凝胶成像系统上观察。

1.3 统计学处理 采用SPSS17.0进行统计,计量资料均以

$\bar{x}\pm s$ 表示,采用*t*检验,两种蛋白之间的关系采用线性相关分析。以*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT法对实验组药物浓度的筛选 MTT结果显示,选取NaB浓度0~ $\leq$ 20 mmol/L 15个浓度作用ACC-2 24 h后,与对照组相比,浓度为0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mmol/L时,NaB对ACC-2细胞增殖有抑制作用(*P*<0.05);且随着药物浓度的增加,细胞存活率逐渐降低,其作用呈明显浓度依赖性;浓度为0.150、0.300、0.600 mmol/L时NaB对细胞增殖无抑制作用(*P*>0.05),当药物在1.000、2.000、4.000、8.000、16.000 mmol/L浓度时,虽均对细胞增殖有抑制作用,但在16.000 mmol/L左右时到达了平台浓度,且线性关系不够突出,见图1。

2.2 Transwell小室实验对细胞迁移和侵袭能力的测定 与对照组相比,NaB浓度仅在2.5、5.0、10.0 mmol/L时可以抑制ACC-2细胞的迁移能力(*P*<0.05);与对照组相比,5个浓度组的NaB作用后ACC-2细胞的侵袭能力差异无统计学意义(*P*>0.05),见图2。

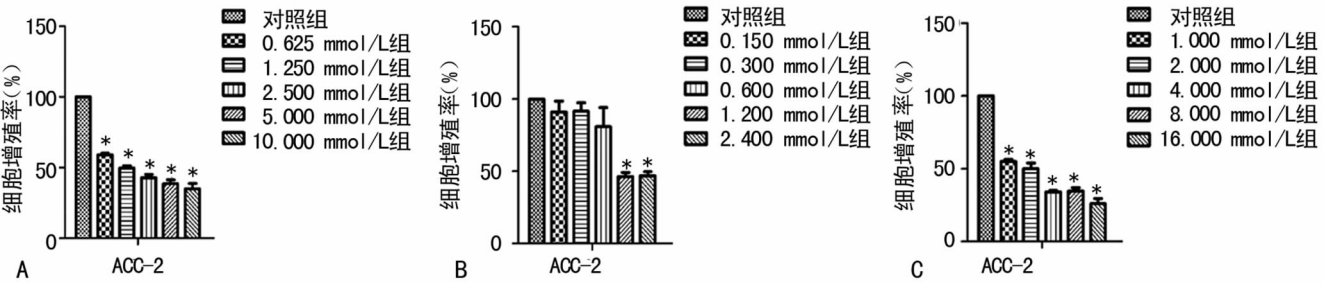
2.3 RT-PCR实验对HMGB1、TLR4 mRNA含量的测定
2.3.1 HMGB1与TLR4 mRNA的相对表达量 RT-PCR结果显示,与对照组相比,药物浓度在2.5、5.0、10.0 mmol/L浓度药物可以使HMGB1、TLR4的相对表达量降低(*P*<0.05),其余浓度组药物的作用均差异无统计学意义(*P*>0.05),见表1。

表1 RT-PCR检测各组HMGB1 mRNA与TLR4 mRNA的相对表达量($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	HMGB1 mRNA	TLR4 mRNA
对照组	3	1.67 $\pm$ 0.55	1.53 $\pm$ 0.41
0.625 mmol/L NaB组	3	1.32 $\pm$ 0.49	1.06 $\pm$ 0.67
1.250 mmol/L NaB组	3	0.94 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.11
2.500 mmol/L NaB组	3	0.76 $\pm$ 0.03 ^a	0.73 $\pm$ 0.03 ^a
5.000 mmol/L NaB组	3	0.47 $\pm$ 0.05 ^a	0.30 $\pm$ 0.10 ^a
10.000 mmol/L NaB组	3	0.32 $\pm$ 0.02 ^a	0.13 $\pm$ 0.02 ^a

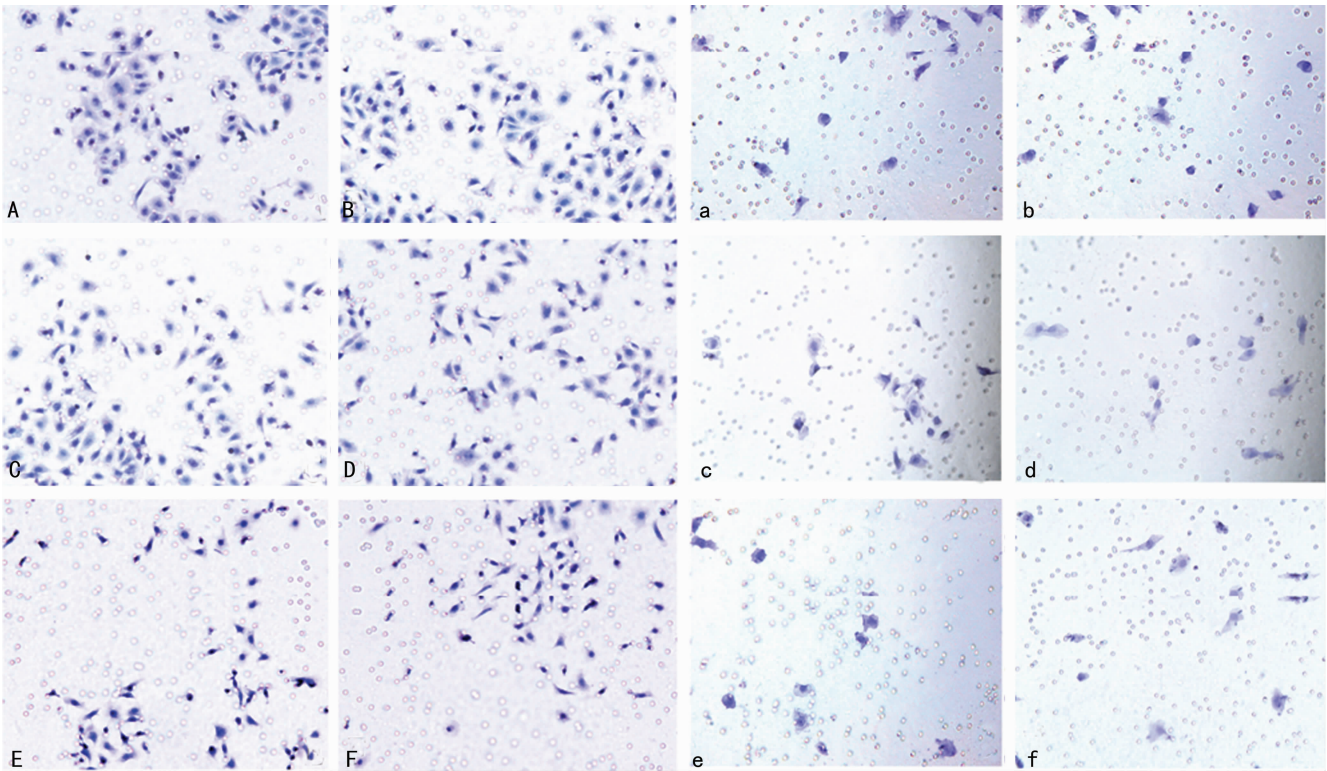
^a:*P*<0.05,与对照组比较。

2.3.2 HMGB1、TLR4、 β -actin扩增产物的鉴定 根据引物说明书,HMGB1、TLR4、 β -actin的扩增产物分别为110、167、186 bp片段,经琼脂糖凝胶电泳后在相应的区域出现条带,且条带灰度较为均一,说明扩增产物无误,且为单一产物,见图3。



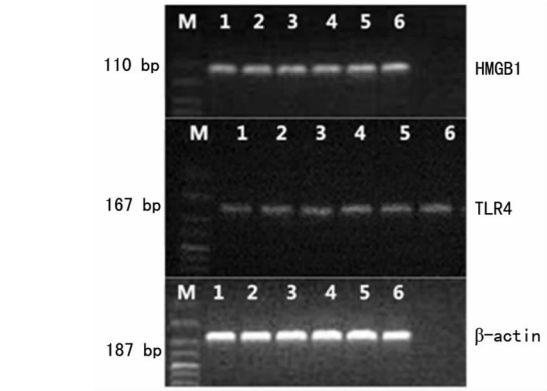
*: *P*<0.05,与对照组比较;A:NaB 0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mmol/L组比较;B:NaB 0.150、0.300、0.600、1.200、2.400 mmol/L浓度组比较;C:NaB 1.000、2.000、4.000、8.000、16.000 mmol/L浓度组比较。

图1 不同浓度NaB对ACC-2细胞增殖的影响



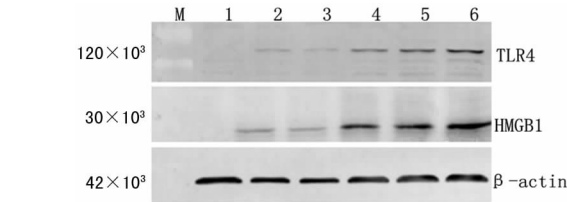
A~E:不同浓度的正丁酸钠对 ACC-2 细胞迁移的影响;a~e:不同浓度的正丁酸钠对 ACC-2 细胞侵袭的影响。A/a:对照组;B/b:0.625 mmol/L 组;C/c:1.250 mmol/L 组;D/d:2.500 mmol/L 组;E/e:5.000 mmol/L 组;F/f:10.000 mmol/L 组。

图 2 不同浓度的 NaB 对 ACC-2 细胞迁移与侵袭的影响(HE ×100)



1: 对照组;2:0.625 mmol/L 组;3:1.250 mmol/L 组;4:2.500 mmol/L 组;5:5.000 mmol/L 组;6:10.000 mmol/L 组。

图 3 HMGB1、TLR4、β-actin 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

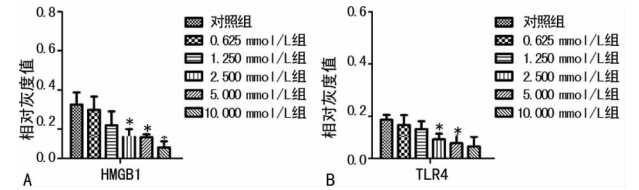


M: Marker;1:10.000 mmol/L NaB;2:5.000 mmol/L NaB;3:2.500 mmol/L NaB;4:1.250 mmol/L NaB;5:0.625 mmol/L NaB;6:0 mmol/L NaB。

图 4 Western-blot 检测 ACC-2 细胞 TLR4、HMGB1、β-actin 蛋白表达

2.4 Western-blot 实验对 HMGB1、TLR4 蛋白表达的测定
实验结果:ACC-2 细胞实验组与对照组均有 HMGB1 和 TLR4 蛋白的表达,见图 4。与对照组相比,NaB 浓度为 2.5、5.0、

10.0 mmol/L 可使 ACC-2 细胞中 HMGB1、TLR4 蛋白的表达降低($P<0.05$),见图 5。相关分析显示 ACC-2 细胞各组的 HMGB1 与 TLR4 蛋白表达呈正相关,Pearson 相关系数 $r=0.810$, $P<0.05$,见图 6。



A:ACC-2 细胞 HMGB1 蛋白表达;B:ACC-2 细胞 TLR4 蛋白表达。*: $P<0.05$,与对照组比较。

图 5 Western-blot 检测 ACC-2 各组细胞中 HMGB1 蛋白与 TLR4 蛋白的相对表达量

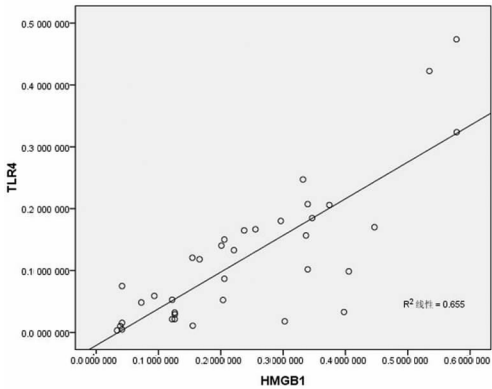


图 6 HMGB1 与 TLR4 蛋白的相关分析

3 讨 论

NaB 是食物纤维在肠道中经细菌酵解的一种只含 4 个碳

原子的简单有机酸盐,是一种有效的组蛋白抑制剂,有报道指出 NaB 能减少 c-myc 基因的 mRNA 水平,从而抑制细胞分裂增殖,促进凋亡,参与细胞分化,直接或间接地影响细胞周期的自发转换率^[2-3]。在恶性黑色素瘤的研究中发现,NaB 可将细胞周期阻滞在 G₁/G₀ 期和 S 期,抑制细胞的增殖^[4]。通过查阅相关文献,将 NaB 对细胞株作用的浓度锁定在 0~20 mmol/L。本实验采用 MTT 法,选取了该范围内 3 组浓度梯度的 NaB 用于探索其有效抑制浓度,并发现 0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mmol/L 浓度的 NaB 作用 24 h 后,可以有效抑制 ACC-2 细胞增殖,且随着药物浓度的增加,细胞存活率逐渐降低,其作用呈浓度依赖性。因此将这 5 个浓度作为随后实验浓度。

肿瘤的转移是一个复杂的生物学过程,涉及癌细胞从原发灶脱落,分泌细胞因子,如基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)破坏穿透基底膜降解细胞外基质及向远处转移^[5]。Transwell 小室常用于体外检测细胞迁移和侵袭能力。有实验证实 MMP-2 与 MMP-9 在 ACC 中的阳性表达率均明显高于正常唾液腺组织,但远远低于腺样囊性癌细胞高转移株 ACC-M 细胞^[6]。本实验中各浓度组的 NaB 对 ACC-2 细胞的侵袭能力均无明显影响($P>0.05$),且只有较高浓度的 NaB(浓度在 2.5、5.0、10.0 mmol/L)作用于 ACC-2 时,才能抑制细胞的迁移能力。这可能是由于 ACC-2 细胞自身侵袭能力较弱,破坏细胞外基质的能力有限,外界药物对其影响有限。提示 NaB 对于恶性表型相对较低的 ACC-2 细胞作用并不突出。

NaB 是 HMGB1 的抑制剂,NaB 可通过抑制脱乙酰基酶,引起高乙酰化 HMGB1 在细胞中聚集,从而被溶酶体摄取分解并排入胞外,减少 HMGB1 的产生和释放,下调其基因的表达^[7]。HMGB1 可以激活 p38、JNK、和 p42/p44 等 MAPK 信号通路,继而激活 MMP-2、MMP-9,使得细胞外基质降解,促进肿瘤浸润和迁移。HMGB1 是模式识别受体(toll-like receptor, TLRs)的内源性配体,当大鼠缺乏 TLR4 就会减少发展为肠内肿瘤的风险,且 TLR4 在人类许多肿瘤中过表达^[8]。在本实验中,RT-PCR 和 Western Blot 分别从基因和蛋白两个不同的角度检测不同浓度 NaB 作用 ACC-2 细胞后 HMGB1 和 TLR4 的表达,得到了一致的结果:较高浓度的 NaB 作用于 ACC-2 时,可以降低 HMGB1 和 TLR4 mRNA 和蛋白的表达($P<0.05$);通过 HMGB1 与 TLR4 蛋白相关分析显示:两者为正相关,提示 TLR4 的表达是随着 HMGB1 表达的减少而减少, HMGB1 与 TLR4 蛋白线性相关系数 $r=0.810$ ($P<0.05$),说明两者关系较为密切,TLR4 是能与 HMGB1 结合的受体之一,他们的结合能调节血管内皮生长因子,增加血管密

et al. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation[J]. Gut, 2003, 52(3): 439-451.

[7] Bobrov VA, Karpov PF. Microecological disorders in the intestines of patients with chronic kidney failure and the arterial hypertension syndrome[J]. Ter Arkh, 1993, 65(6): 41-43.

[8] Hooper LV, Wong MH, Thelin A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine[J]. Science, 2001, 291(555): 881-884.

[9] Kavukçu S, Türkmen M, Soylu A, et al. Intestinal urea metabolism; could the bacteria involved in Nitrogen cycle lead to

度,从而促进肿瘤的发展^[9]。所以 NaB 抑制 HMGB1 表达从而改变 ACC 细胞体外生物学行为,可能是通过与其受体 TLR4 结合来实现的。

综上所述,正丁酸钠作为一种结肠内的天然副产物,其毒副作用小,并且可以抑制人体诸多肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移,有望成为一种新型化疗药物。

参考文献

[1] Sun B, Liu R, Xiao ZD, et al. c-MET protects breast cancer cells from apoptosis induced by sodium butyrate[J]. PloS One, 2012, 7(1): 235-238.

[2] Kang SJ, Park YI, So B, et al. Sodium butyrate efficiently converts fully reprogrammed induced pluripotent stem cells from mouse partially reprogrammed cells[J]. Cellular Reprogramming, 2014, 16(5): 345-354.

[3] Gurtowska N, Kloskowski T, Olkowska J, et al. Carboplatin and sodium butyrate, separate—yes, but combined—never[J]. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2013, 70(1): 153-161.

[4] 卢友光, 周鸿鹰, 丁林灿, 等. 涎腺腺样囊性癌高低转移细胞系基因表达谱及基质金属蛋白酶表达差异[J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(5): 505-510.

[5] Li W, Li S, Liang D, et al. Decreased MT1-MMP in gastric cancer suppressed cell migration and invasion via regulating MMPs and EMT[J]. Tumor Biology, 2015, 36(9): 6883-6889.

[6] 谢宏亮, 张彬, 徐志英, 等. 转化生长因子 β 1、基质金属蛋白酶 2 和 9 在唾液腺腺样囊性癌中的表达[J]. 中华口腔医学研究杂志, 2011, 5(2): 11-15.

[7] Gardella S, Andrei C, Ferrera D, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway[J]. EMBO Rep, 2002, 3(10): 995-1001.

[8] Yamazaki T, Hannani D, Poirier-Colame V, et al. Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists[J]. Cell Death Differ, 2014, 21(1): 69-78.

[9] Xu X, Zhu H, Wang T, et al. Exogenous high-mobility group box 1 inhibits apoptosis and promotes the proliferation of lewis cells via RAGE/TLR4-dependent signal pathways[J]. Scand J Immunol, 2014, 79(6): 386-394.

(收稿日期: 2015-08-25 修回日期: 2015-10-20)

reutilization of intestinal urea Nitrogen in uremic rabbits? [J]. J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo), 2002, 48(1): 24-29.

[10] 雷萍, 关洪全, 王昊, 等. 不同产地人参水煎剂对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 218-220.

[11] 胡彦武. 东北刺人参茎对免疫力低下小鼠免疫功能的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2): 780-781.

[12] 蔡长茂, 李威. 大黄防治胃肠黏膜屏障损伤的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(2): 376-378.

[13] 张雪侠, 苗明三. 机体肠道免疫和药物调节[J]. 中医学报, 2012, 27(6): 766-769.

(收稿日期: 2015-08-22 修回日期: 2015-10-21)

(上接第 331 页)