论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1066-03

丁酸钠与顺铂联用对非小细胞性肺癌细胞生长的抑制作用

高 娟,饶进军,吴少瑜,文晓芸,吕 琳,徐 伟,吴曙光 (南方医科大学药学院,广州 510515)

提 要:目的 研究丁酸钠和顺铂联合作用对非小细胞性肺癌A549细胞增殖的影响及作用机制。**方法** 采用CCK-8细胞计数法测定丁酸钠、顺铂联用对A549细胞增殖活性的影响,流式细胞法检测细胞周期和细胞凋亡的改变,RT-PCR法检测p21基因的表达。**结果** 丁酸钠、顺铂联用可抑制A549细胞增殖且呈剂量依赖性,联用后的IC_{50}降低至5.44 μmol/L,与单用DDP的IC_{50}(10.25 μmol/L)相比降低了46.93%($P<0.01$)。联用可使细胞周期阻滞于G_0/G_1期,同时诱导细胞凋亡和p21基因表达的上调。**结论** 丁酸钠与顺铂联用能抑制A549细胞生长,其作用机制与促进细胞凋亡及诱导p21基因表达有关。

关键词: 丁酸钠;顺铂;细胞周期阻滞;非小细胞肺癌;p21

中图法分类号: R329.28; R734.2; R979.1 **文献标识码:** A

Combination of sodium butyrate and cisplatin has antiproliferative effects on non-small lung cancer cell line

GAO Juan, RAO Jin-jun, WU Shao-yu, WEN Xiao-yun, LU Lin, XU Wei, WU Shu-guang (School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To investigate the antiproliferative effect of combination of sodium butyrate (NaB) and cisplatin (DDP) on non-small cell lung cancer cell line A549 and its possible mechanism. **Methods** The antiproliferative effects of combination NaB and DDP were evaluated using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. The changes of the cell cycle and the apoptosis were observed by flow cytometry. The mRNA expression level of p21 gene was detected by RT-PCR. **Results** The combination of NaB and DDP could inhibit the growth of A549 cell line in a dose and time dependent manner. The IC_{50} of the combination group was 5.44 μmol/L and the IC_{50} of DDP group was 10.25 μmol/L. The combination of NaB and DDP induced cell cycle arrest at G_0/G_1 phase, and induced cell apoptosis and up-regulation of mRNA expression of p21 gene. **Conclusion** The combination of NaB and DDP has antiproliferative effects on non-small lung cancer cells, and the mechanism may be related to promoting cell apoptosis and inducing the expression of p21 gene.

Key words: sodium butyrate; cisplatin; cell cycle arrest; non-small cell lung cancer; p21

肺癌是世界上发病率及病死率最高的恶性肿瘤之一。顺铂(cisplatin,DDP)作为临床治疗肺癌有效的化疗药物,主要通过DNA损伤和p53介导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用[1]。由于顺铂在化疗中耐药性的产生,影响了治疗的效果,因而限制其在临床的应用[2]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)是一类新的抗肿瘤药物,研究表明HDACi与化疗药物联用可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性[3,4]。HDACi通过抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的活性,使组蛋白尾端的氨基乙酰化,从而抑制肿瘤细胞的生长[5,6],目前已有一些HDACi进入了临床试验阶段[7]。丁酸钠(sodium butyrate,NaB)是一种组蛋白去乙酰化酶的抑制剂,能抑制多种肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞的凋亡[5]。本实验旨在研究丁酸钠与顺铂合用对人肺腺癌A549细胞的生长抑制作用,并对其作用的机制进行探讨,为肺癌的临床治疗提供新的思路。

作者简介:高 娟(1980-),女,重庆市人,硕士研究生,药师,主要从事抗肿瘤新药筛选和作用机制方面的研究,现在第三军医大学西南医院药剂科。电话:(020)62789055,E-mail: maple0229@126.com

通讯作者:吴曙光,电话:(020)61648530

收稿日期:2007-03-03;修回日期:2007-03-27

1　材料与方法

1.1　材料

丁酸钠（美国 Sigma 公司）；顺铂（齐鲁制药有限公司）；RPMI1640 培养基，胰蛋白酶与胎牛血清（美国 Gibco 公司）；细胞计数试剂 CCK-8 kit（日本同仁化学研究所）；RT-PCR（AMV）试剂盒和 DL 2000 DNA 标准（日本 TaKaRa 公司）；RNA 提取试剂 Trizol（美国 Invitrogen 公司）；p21 基因引物[7]：正义：5′-GCGATGGAACTTCGACTTTGT-3′，反义：5′-GGGCTTCCTCTTGGAGAAGAT-3′；GAPD 基因引物[8] 正义：5′-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3′，反义：5′- CAAAGTTGTCATGGATGACC -3′（上海英骏生物技术公司合成）。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　人非小细胞性肺癌细胞株 A549（购自美国典型培养物中心，ATCC）置于含 10% 胎牛血清，RPMI1640 培养基中（内含 0.1 % 青霉素、链霉素）培养，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育。

1.2.2　CCK-8 法测定丁酸钠与顺铂对细胞增殖的影响　CCK-8 法原理与 MTT 法类似，是在 MTT 法基础上的改进细胞活性测定方法，灵敏度和重现性均有所增强，操作简单，可直接在细胞培养液中加入试剂进行测定[9]。取对数生长期 A549 细胞，接种于 96 孔培养板中，每孔细胞数 1×10^5 个。培养 24 h 后，每孔内分别加入各浓度（0.5 ~ 16 mmol/L）的 NaB，继续培养 24、48、72 h。用低浓度的 NaB（0.5 mmol/L）预处理细胞 48 h 后，换 DDP 培养 48 h，与单独使用 DDP（1.25 ~ 160 μmol/L）作用 48 h 相比较，每组样本 5 个复孔，同时设立阴性对照组。药物处理后加入 10 μl 的 CCK-8 试剂，孵育 2 h 30 min，酶标仪上测定 450 nm 处光密度值[$D(450)$]。其中细胞抑制率 =［对照组 $D(450)$ - 加药组 $D(450)$］/对照组 $D(450)\times100\%$。

1.2.3　流式细胞仪检测药物对细胞周期和凋亡率的影响　0.5 mmol/L 的丁酸钠预处理细胞 48 h 后，再用 5.44 μmol/L 的顺铂培养 48 h 与单独使用顺铂相比较，测定细胞周期及凋亡率的变化。收集细胞，调细胞浓度为 1×10^6/ml。用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，再用 70% 预冷的乙醇固定 24 h 以上，用 1 mg/ml RNaseA 消化，离心，加碘化丙啶（PI）染色，经 200 目尼龙网筛滤，用流式细胞仪分析细胞周期，Modfit 软件计算细胞周期百分比和凋亡细胞比例。

1.2.4　RT-PCR 检测 p21 基因 mRNA 表达　　收集 5×10^7 个细胞，采用 Trizol 法提取总 RNA（参见 Invitrogen 公司说明书），在紫外分光光度计上进行定量。逆转录反应合成 cDNA，反应物直接进行 PCR 反应（参照 TaKaRa 公司 RNA PCR Kit 3.0 产品说明书），逆转录反应体系如下：样品 RNA 1 μg，AMV 0.5 μl，10 × RT buffer 1 μl，Radom 9 mers 0.5 μl，dNTP mixture（10 mmol/L）1 μl，RNase Inhibitor（40 U/μl）1 μl，总体积 10 μl。反应条件如下：30 ℃ 10 min，50 ℃ 25 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min；PCR 反应体系：p21 基因、GAPDH 基因引物上下游引物各 0.5 μl，5 × PCR Buffer 10 μl，TaKaRa *Ex Taq* HS 0.25 μl，PCR 反应条件如下：94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，30 个循环，72 ℃ 3 min，PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析，两个样本均数比较用 SNK 检验。半数抑制浓度（50 percent inhibitory concentration，IC_{50}）用 Bliss 法计算。

2　结果

2.1　NaB、DDP 单用及联用对 A549 细胞生长的抑制作用

NaB（0.5 ~ 16 mmol/L）作用 24、48、72 h 后，可抑制 A549 细胞的增殖，作用 48 h 后，在 0.5 mmol/L 剂量未见明显细胞毒性，2 mmol/L 时显现明显的抗增殖作用（$P<0.05$），抑制率为 19.5%，作用 48 h 的 IC_{50} 为 2.71 mmol/L。随着 NaB 浓度的增加，抑制作用明显增强。

DDP（1.25 ~ 160 μmol/L）单独作用细胞 48 h 后，IC_{50} 为 10.25 μmol/L，而联合 0.5 mmol/L NaB 作用细胞的 IC_{50} 为 5.44 μmol/L，与单用 DDP 相比降低了 46.93%（$P<0.01$），表明 NaB 与 DDP 联用有较强的协同抑制作用。

2.2　DDP、NaB 单独及联用对 A549 细胞细胞周期和凋亡率的影响

如表 1 所示，NaB 单用组与对照组相比：S 期比例显著下降，G_0/G_1 期比例显著升高（$P<0.05$），而 G_2/M 期比例无显著差异（$P>0.05$）；DDP 单用组与对照组相比：S 期比例显著下降，G_0/G_1 期与 G_2/M 期比例显著升高（$P<0.01$）；NaB + DDP 组与对照组相比：S 期比例显著下降，G_0/G_1 期与 G_2/M 期比例显著升高（$P<0.01$）；NaB + DDP 组与 DDP 单用组相比：S 期比例显著下降（$P<0.01$），G_0/G_1 期比例显著升高，G_2/M 期比例无显著性差异（$P>0.05$）。对照组、NaB 单用组、DDP 单用组及 NaB + DDP 组的细胞凋亡的亚二倍体峰比例分别是（0.32 ± 0.06）%、（2.74 ± 0.21）%、（28.43 ± 5.86）%、（41.63 ± 3.24%），其中 DDP 组，NaB + DDP 组与对照组相比有显著提高（$P<0.05$）；NaB + DDP 组与 DDP 组相比有显著提高（$P<0.05$）。

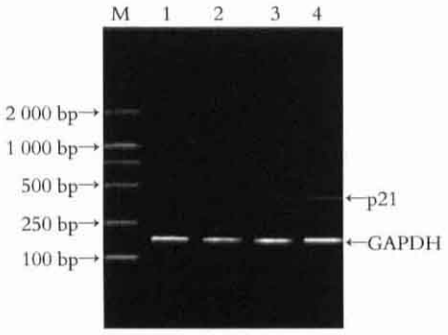
表 1　DDP、NaB 单独及联用对 A549 细胞周期的影响（$n=3$，%，$\bar{x}\pm s$）

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照	58.68 ± 0.86	40.29 ± 1.072	1.21 ± 0.23
NaB（0.5 mmol/L）	61.53 ± 1.20[a]	35.9 ± 0.16[a]	2.63 ± 1.11
DDP（5.44 μmol/L）	68.69 ± 2.81[a]	24.34 ± 4.11[a]	9.56 ± 1.15[a]
NaB + DDP（0.5 mmol/L + 5.44 μmol/L）	73.46 ± 2.35[ab]	15.71 ± 0.59[ab]	11.20 ± 1.32[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 DDP 组比较

2.3　药物对 p21 基因 mRNA 表达的影响

NaB 单独及与 DDP 联合作用均诱导 p21 的表达，NaB + DDP 组 p21 基因表达高于 NaB 单用组，而对照组及 DDP 单用组未见 p21 的表达，GAPDH、p21 条带分别在 185 bp 和 354 bp（图 1）。



M：DNA 标准；1：对照组；2：DDP 单用组；3：NaB 单用组；4：NaB + DDP 组

图1 DDP、NaB 单用及联合应用对 p21 基因表达的影响

3 讨论

丁酸钠作为一种短链脂肪酸类 HDACi，主要通过促使组蛋白乙酰化，诱导细胞凋亡，而抑制肿瘤细胞生长，产生抗肿瘤的作用。目前关于丁酸钠抗肿瘤作用的研究主要集中在消化道及血液病方面的肿瘤。本研究联合丁酸钠与顺铂观察肺癌细胞的生长抑制作用表明，低浓度的 NaB 与 DDP 联用能提高 A549 细胞对 DDP 的敏感性，IC_{50} 从 10.25 μmol/L 降低至 5.44 μmol/L。

当 NaB 与 DDP 联合应用于抑制 A549 细胞增殖的同时，G_0/G_1 和 G_2/M 期细胞增多，S 期细胞比例减少，发生 G_0/G_1 期细胞阻滞，说明其作用是通过影响细胞周期而实现的。研究结果还提示 NaB 单用及联用均诱导 p21 mRNA 的表达。由于 p21 基因编码的蛋白产物是一种细胞周期素（cyclin）依赖性蛋白激酶抑制剂，可以抑制周期素依赖性激酶（CDK）的活性，从而使细胞的增长终止在 G_0/G_1 期或 G_2/M 阶段期。p21 表达增高主要通过两条途径：一条是依赖 p53 途径，p53 可以与 p21 启动子区结合，正向调控 p21 基因表达；另一条是非依赖 p53 途径，一些生长因子等细胞外信号，如 Sp1 是 p21 启动子强有力的激活剂[10]，可诱导非依赖 p53 途径的 p21 表达。另外也有研究表明，p21 表达上调是由于其启动子 SP1 结合位点邻近组蛋白乙酰化水平升高，直接诱导 p21 的表达，而不需要通过 p53 介导[11]。本研究结果显示 NaB 可以诱导周期素依赖性激酶抑制剂 p21 表达升高，使细胞阻滞于 G_0/G_1 期，从而抑制肿瘤细胞的增殖。

HDACi 的生长阻滞与促细胞凋亡作用是密切相关的，虽然其诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制复杂，但 caspase 途径及 PARP 裂解被认为是促凋亡的主要途径[12]；本实验通过研究 NaB 与 DDP 合用对 A549 细胞的作用，观察到低浓度的 NaB 可以提高 A549 细胞对 DDP 的敏感性，其作用机制可能是通过诱导 p21 基因的表达而使细胞周期阻滞，同时诱导细胞凋亡发挥作用，为临床上 NaB 与 DDP 联合用于治疗肺癌提供一个新的思路。

参考文献：

[1] Osaki S, Nakanishi Y, Takayama K, *et al*. Alteration of drug chemosensitivity caused by the adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene in human lung cancer cells[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(2): 300-307.

[2] Dimitroulis J, Stathopoulos G P. Evolution of non-small cell lung cancer chemotherapy (Review)[J]. Oncol Rep, 2005, 13(5): 923-930.

[3] Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, *et al*. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia[J]. Cancer, 2006, 106(1): 112-119.

[4] Fronsdal K, Saatcioglu F. Histone deacetylase inhibitors differentially mediate apoptosis in prostate cancer cells[J]. Prostate, 2005, 62(3): 299-306.

[5] Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M, *et al*. Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 48(Suppl 1): S20-S26.

[6] 朱 静，邓 兵，王金菊，等. 5-aza 诱导干细胞经乙酰化特异 RNA 之后心肌细胞发育相关基因检测[J]. 第三军医大学学报，2006，28(6)：535-538.

[7] Lin H Y, Chen C S, Lin S P, *et al*. Targeting histone deacetylase in cancer therapy[J]. Med Res Rev, 2006, 26(4): 397-413.

[8] Liu J, Li J, Sidell N. Modulation by phenylacetate of early estrogen-mediated events in MCF-7 breast cancer cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 59(2): 217-225.

[9] Tan A S, Berridge M V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents[J]. J Immunol Methods, 2000, 238(1-2): 59-68.

[10] Pagliuca A, Gallo P, Lania L. Differential role for Sp1/Sp3 transcription factors in the regulation of the promoter activity of multiple cyclin-dependent kinase inhibitor genes[J]. J Cell Biochem, 2000, 76(3): 360-367.

[11] Li G C, Zhang X, Pan T J, *et al*. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of $p21^{WAF1}$ and G1 cell cycle arrest[J]. Int J Urol, 2006, 13(5): 581-586.

[12] Yamashita Y, Shimada M, Harimoto N, *et al*. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells[J]. Int J Cancer, 2003, 103(5): 572-576.

（编辑 栾 嘉）