论著

文章编号:1000-5404(2007)19-1848-04

丁酸钠抑制人喉癌裸鼠皮下移植瘤的实验研究

高 岭,董明敏,程秀莲 (郑州大学第一附属医院耳鼻咽喉科,郑州 450052)

提 要:目的 研究丁酸钠对人喉癌裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用,探讨其作用机制。**方法** 将人喉癌细胞株Hep-2细胞接种于12只裸鼠皮下,建立喉癌移植瘤模型。分为实验组和对照组,每组6只,分别给予丁酸钠和磷酸盐缓冲液(PBS)治疗4周。治疗过程中定期测量肿瘤大小及裸鼠体质量,于治疗结束时取肿瘤组织切片进行HE染色、电镜观察、TUNEL标记及免疫组化S-P法检测Ki-67、survivin蛋白表达情况,取心、肝、肺、脾、肾等组织切片进行药物毒性评估。**结果** 治疗组肿瘤体积明显小于对照组,肿瘤组织内坏死面积增大,细胞凋亡率显著增高,Ki-67核抗原、survivin蛋白表达水平降低。治疗过程中裸鼠生长良好,无明显毒性反应。治疗结束时,心、肝、肺、脾、肾组织切片光镜下检查未见异常。**结论** 丁酸钠对人喉癌裸鼠皮下移植瘤有明显的生长抑制作用,其机制可能与抑制survivin表达而诱导细胞凋亡及抑制Ki-67表达有关。治疗剂量的丁酸钠对裸鼠心、肝、肺、脾、肾等组织无毒性。

关键词:丁酸钠;喉癌;移植瘤;抑制

中图法分类号:R73-35;R73-361;R739.65 **文献标识码**:A

Inhibitory effect of sodium butyrate on human laryngeal carcinoma xenograft model in nude mice

GAO Ling, DONG Ming-min, CHENG Xiu-lian (Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect and its mechanism of sodium butyrate on human laryngeal carcinoma in nude mice. Methods Human laryngeal carcinoma cell line Hep-2 was seeded in the subcutaneous layer of 12 nude mice to built laryngeal carcinoma xenograft model. Then they were randomly and equally divided into 2 groups. Sodium butyrate was given in experimental group while phosphatic-buffered saline (PBS) was used in control group for 4 weeks. Tumor size and body weight of the mice were measured at regular time-intervals. The tumor, heart, liver, lungs, spleen and kidneys were removed at the end of treatment. Tumor sections were examined by electronic microscopy. TUNEL method and immunohistochemical S-P method were used for detecting the expression of Ki-67 nuclear antigen and survivin protein. The heart, liver, lung, spleen and kidney sections were examined after HE staining for assessment of toxicity. Results In experimental group, the volume of tumors was reduced, the area of necrosis in tumors was widened, the apoptotic rate was increased obviously and the expression level of Ki-67 nuclear antigen and survivin protein was decreased as compared with control group. During treatment, all the nude mice grew well and there were no toxic reactions. At the end of treatment, there were no abnormal changes in heart, liver, lung, spleen and kidney sections examined under light microscope. Conclusion Sodium butyrate can significantly inhibit the growth of human laryngeal carcinoma xenograft in nude mice. Its mechanism may be related to the apoptosis in tumor cells by inhibiting the expression of survivin protein and Ki-67 nuclear antigen. There is no toxicity to heart, liver, lungs, spleen and kidneys at a treatment dose of sodium butyrate.

Key words: sodium butyrate; laryngeal carcinoma; xenograft tumor; inhibition

喉癌是我国常见的头颈部恶性肿瘤之一,近年来发病率呈明显上升趋势[1]。虽然近几十年来传统的治疗方式如手术、放疗、化疗等有了很大的改进,但手术对喉功能的破坏以及放、化疗的严重副作用仍使以

作者简介:高 岭(1971-),男,河南省郑州市人,博士研究生,主治医师,主要从事头颈部肿瘤防治方面的研究,发表论文8篇。电话:(0371)66097680,E-mail:gaolings@126.com

收稿日期:2007-01-04;修回日期:2007-02-02

上治疗方式受到极大限制。丁酸钠(sodium butyrate, SB)是食物纤维在结肠内发酵过程中产生的一种无毒的四碳短链脂肪酸，是组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDIs)之一。自 20 世纪 70 年代中期 Wright 和 Leder 报道 SB 能抑制细胞生长，诱导白血病细胞内血红蛋白合成以来，SB 作为一种细胞分化诱导剂已用于肿瘤研究。近年来体外实验证实，SB 能抑制多种肿瘤细胞增殖，诱导其分化和凋亡[2]，但有关 SB 对喉癌的影响及相关的动物实验研究较少。本实验以人喉癌 Hep-2 细胞株建立裸鼠移植瘤模型，应用适当浓度的 SB 进行分组治疗实验，观察移植瘤的变化以及荷瘤裸鼠的毒性反应，探讨 SB 的抑瘤作用及其机制，为 SB 的开发和药物治疗喉癌提供新思路。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

SB 购于日本和光纯药工业株式会社。TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒购自洛阳华美生物工程公司。鼠抗人 Ki-67 核抗原单克隆抗体、兔抗人 survivin 蛋白多克隆抗体、通用型 S-P 检测试剂盒均为北京中杉生物技术有限公司产品。H600 型透射电镜为日本日立公司产品，HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统为同济医科大学千屏影像工程公司产品。

1.2　肿瘤细胞株与实验动物

人喉上皮样癌细胞株(Hep-2)购自中国科学院上海细胞生物学研究所。BALB/c 遗传背景的先天性细胞免疫缺陷动物，nu/nu 裸小鼠 12 只，雌性，鼠龄 4 周，体质量 18～22 g，购自中国医学科学院实验动物科研所。

1.3　细胞培养

细胞接种于含体积分数 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素各 100 U/ml 的 RPMI1640 培养液中，置 37℃、体积分数为 5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养，25 g/L 胰蛋白酶消化传代。

1.4　裸鼠饲养

12 只裸鼠在无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)条件下饲养，每 3 天更换垫料，定期补充无菌饲料及饮用水，严格无菌操作。

1.5　人喉癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立

常规培养 Hep-2 细胞至对数生长期，胰酶消化，PBS 液洗涤 2 次，1 000 r/min 离心 5 min，制成 1×10^8/ml 细胞悬液备用。以 TB 空针抽取细胞悬液注入实验裸鼠腋部皮下。穿刺点距注射部位 1.2 cm，每只鼠皮下接种 1 点，每点 0.2 ml，含 2×10^7 个细胞。

1.6　分组与治疗

12 只裸鼠皮下移植瘤模型分为实验组和对照组，每组 6 只。实验组于接种 2 周出现粟粒大小肿瘤时，每日向肿瘤组织局部注射 SB，剂量为 2.2 mg/g，共治疗 4 周。对照组注射同体积 PBS 液。各组同时结束治疗。

1.7　观察指标

1.7.1　生长检测　　每日观察裸鼠的精神、饮食及活动状况，接种后每天观察肿瘤形成及有无红肿、溃破，成瘤后检查移植瘤的表面形态及活动度，每周用游标卡尺测量瘤体长径(a)和短径(b)，根据公式 $V=\frac{1}{6}\pi ab^2$ 计算各组瘤体积，绘制肿瘤生长变化曲线。治疗结束时，按以下公式计算抑瘤率：抑瘤率(%)=(1－实验组平均瘤体积/对照组平均瘤体积)×100%。每周用精密电子天平测量裸鼠体质量，进行药物毒性评价，即治疗末体质量(FBW)/治疗初体质量(IBW)≥0.8 为无毒性反应；<0.8 为有毒性反应。

1.7.2　光学显微镜观察　　于治疗结束 6 h 内处死裸鼠，取肿瘤及心、肝、肺、脾、肾等脏器，以 10% 福尔马林固定，石蜡包埋切片，HE 染色，光镜下观察肿瘤和各重要脏器变化。

1.7.3　透射电镜观察　　两组裸鼠处死后立即切除肿瘤，切取大小为 1 mm^3 的标本，经 3% 戊二醛 4 ℃固定 2 h，磷酸盐缓冲液洗涤 2 次，1% 锇酸后固定 2 h，丙酮梯度脱水，环氧树脂包埋，超薄切片，醋酸铀-枸橼酸铅染色，日立 H600 型透射电镜下观察。

1.7.4　TUNEL 法检测细胞凋亡　　取肿瘤组织石蜡切片，经脱蜡水化后，按试剂盒说明进行 TUNEL 法染色。光学显微镜下观察，细胞核着棕黄色者为凋亡细胞。每张切片随机取 5 个非重复高倍视野(40×10)，每视野计数 100 个细胞中凋亡细胞所占的比率，取均值作为该片凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.7.5　免疫组化 S-P 法检测 Ki-67、survivin 蛋白表达　　肿瘤组织石蜡切片常规脱蜡水化后，按试剂盒说明操作，检测 Ki-67、survivin 蛋白表达，DAB 显色。Ki-67 表达阳性结果为细胞核着棕黄色，survivin 表达阳性结果为细胞质着棕黄色。以已知阳性切片作为阳性对照，以 PBS 替代一抗作为阴性对照。采用郑州大学医学院病理学教研室 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统对染色结果进行定量分析，每个标本观察 1 张切片，每张切片选取阳性颗粒清晰、无非特异性背景着色，并能反映该切片染色强度的部位，测量 5 个 200 倍视野阳性细胞的平均光密度值(mean optical density, MOD)，取其均值为该标本的测量结果。

1.8　统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　各组裸鼠肿瘤生长情况与抑瘤率

各组移植瘤生长情况：肿瘤细胞接种 2 周出现粟粒大小肿瘤，成瘤率 100%。2 周后，对照组肿瘤呈膨胀性生长，体积逐渐增大，质硬，活动，少数因生长过快，中心缺血坏死，结痂。实验组肿瘤生长较慢，肿瘤体积小于对照组，且随治疗时间延长，这种抑制效果更加明显。治疗结束时，两组肿瘤体积存在显著性差异($P<0.05$)(表 1)，抑瘤率达 58.81%。

药物毒性评价：药物治疗过程中，裸鼠精神状态良好，生长发育、饮食、活动正常，未见明显不良反应。对照组治疗前后裸鼠体质量分别为：(19.14±1.57)、(26.27±1.22) g；实验组分

别为:(18.62±1.17)、(24.78±1.44) g,各组 FBW/IBW 值均>0.8,无毒性反应。

表1　不同治疗时间各组肿瘤体积比较(V/cm^3,$n=6$,$x\pm s$)

组别	治疗时间				
	0周	1周	2周	3周	4周
对照组	0.025±0.014	0.083±0.031	0.236±0.070	0.661±0.289	1.265±0.621
实验组	0.029±0.021	0.057±0.029	0.145±0.065	0.321±0.160	0.521±0.256
t	0.468	1.438	2.319	2.520	2.713
P	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2　光学显微镜观察

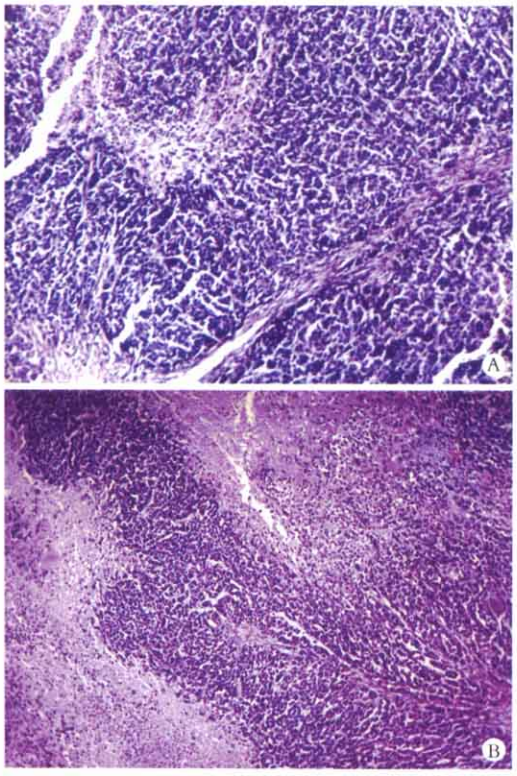
肿瘤的镜下表现:对照组:肿瘤组织内小片坏死,肿瘤细胞异型性明显。实验组:组织内坏死面积增大,细胞异形性较对照组小,可见细胞核固缩等凋亡表现(图1)。各重要脏器镜下观察:各组心、肝、肺、脾、肾均无肿瘤转移及其他异常发现。

2.3　透射电镜观察

对照组细胞表面可见微绒毛,核浆比例增高,核仁增大,可见双仁,核内异染色质增多,细胞质内线粒体丰富。实验组可见典型的凋亡细胞形态学改变:细胞体积变小,细胞膜完整,微绒毛和细胞连接减少或消失,核染色质浓缩成块,边集于核膜下,细胞内空泡增多(图2)。

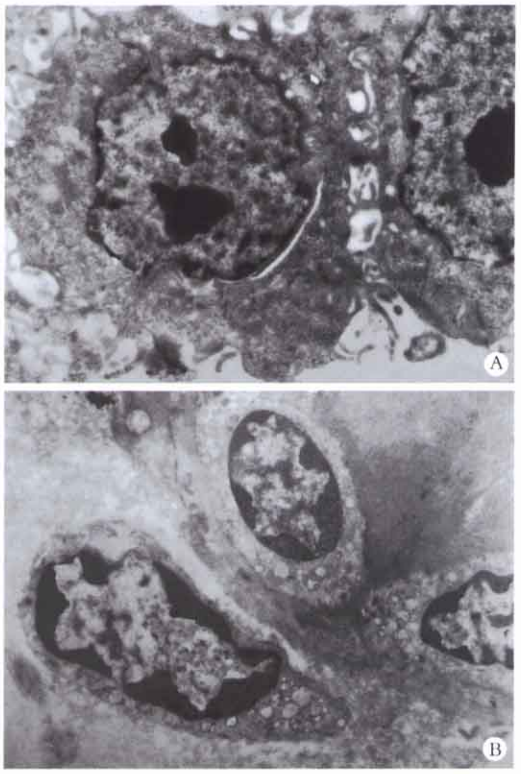
2.4　TUNEL 法检测移植瘤细胞凋亡率

对照组偶见阳性细胞;实验组阳性细胞明显增多,散在分布(图3)。两组细胞凋亡指数差异有显著性($P<0.01$)(表2),表明 SB 对喉癌移植瘤有明显的诱导凋亡作用。



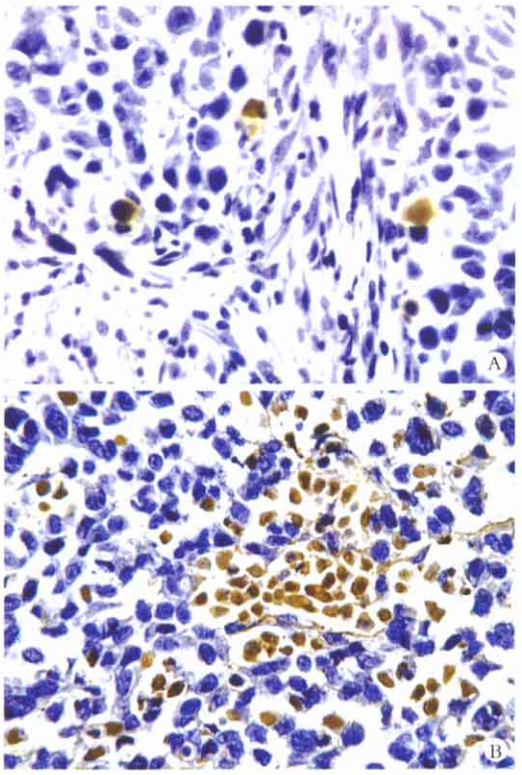
A:对照组;B:实验组

图1　各组肿瘤光镜下表现　(HE×100)



A:对照组　细胞表面可见微绒毛,核浆比例增高,可见双仁;B:实验组　细胞体积变小,微绒毛减少或消失,细胞核染色质浓缩、边集

图2　各组肿瘤电镜下表现　(TEM×5 000)



A:对照组　偶见凋亡阳性细胞;B:实验组　凋亡阳性细胞明显增多

图3　TUNEL 法检测各组肿瘤细胞凋亡情况　(TUNEL×400)

2.5　免疫组化检测 Ki-67、Survivin 蛋白表达

两组 Ki-67 阳性细胞 MOD 值分别为(0.278 ± 0.012)、(0.186 ± 0.010)；两组 survivin 阳性细胞 MOD 值分别为：(0.149 ± 0.007)、(0.098 ± 0.009)。统计学分析，组间差异均有显著性($P<0.01$)。表明 SB 能有效抑制喉癌移植瘤 Ki-67、survivin 蛋白的表达(表 2)。

表 2　两组凋亡指数及 Ki-67、survivin 表达情况($n=6$，$\bar{x} \pm s$)

组别	AI	Ki-67(MOD)	survivin(MOD)
对照组	3.10 ± 0.37	0.278 ± 0.012	0.149 ± 0.007
实验组	29.70 ± 1.84	0.186 ± 0.100	0.098 ± 0.009
t	34.77	14.076	10.678
P	<0.01	<0.01	<0.01

3　讨论

HDIs 是近年来引起人们普遍关注的一类新型抗肿瘤药物，其能通过抑制组蛋白乙酰化酶的活性，使染色体结构和基因转录水平发生变化，引起肿瘤细胞形态和功能的改变，从而达到抑制肿瘤生长的作用，具有广泛的抗肿瘤效应，但其抗肿瘤作用的具体机制尚不清楚[3]。SB 是 HDIs 中的一类小分子物质，由于其可选择性的抑制肿瘤生长而毒性较低[4]，备受肿瘤研究者的关注。我们先前的研究证实 SB 能有效地抑制体外培养的 Hep-2 细胞增殖、诱导其凋亡及细胞周期 G_0/G_1 期阻滞[5,6]。本实验我们以人喉癌裸鼠移植瘤为研究对象，进一步揭示了 SB 在体内环境中对喉癌的影响。结果显示，实验组肿瘤体积明显减小，抑瘤率达 58.81%，光镜下瘤组织内坏死范围明显增加，细胞异型性减小，表明 SB 能有效抑制喉癌移植瘤的生长，降低肿瘤恶性程度。治疗过程中，实验组裸鼠无明显毒性反应，FBW/IBW > 0.8，与对照组相近。病理组织学观察，实验组裸鼠心、肝、肺、脾、肾等重要脏器无明显改变，证明了 SB 的低毒性，与文献[4]报道相似。

Ki-67 抗原为细胞核内与细胞分裂增殖相关的蛋白抗原，是目前检测肿瘤细胞增殖活性最可靠的指标。有实验表明，Ki-67 阳性表达与肿瘤细胞的分化程度有关，Ki-67 低表达的肿瘤细胞分化程度较高[7]。孙余才等[8]报道，Ki-67 阳性表达与喉癌的恶性程度呈正相关，可作为判断喉癌恶性程度的一个重要指标。本研究中，实验组经 SB 作用后，Ki-67 阳性表达量明显降低，细胞异形性减小，分化程度较对照组高，表明 SB 在体内环境中能有效抑制肿瘤细胞的增殖活性，提高其分化程度，从而降低肿瘤恶性程度。

survivin 是近年来发现的一种凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoaptosis protein，IAP)，其主要功能在于直接抑制半胱氨酸蛋白酶 caspase-3 和 caspase-7 的活性[9]，在细胞凋亡中起重要作用。Survivin 在正常组织中一般不表达，但却选择性地表达于多种肿瘤组织，而且肿瘤恶性程度越高，其表达水平越高[10]，提示恶性肿瘤的发生、发展与细胞凋亡之间存在密切联系。本实验中，实验组经 SB 治疗后 survivin 表达水平明显降低，同时 TUNEL 法证实，实验组细胞凋亡指数明显高于对照组，提示 SB 能有效抑制喉癌移植瘤 survivin 蛋白表达水平，促使肿瘤细胞发生凋亡，从而降低肿瘤恶性程度。这可能是其抑制肿瘤生长的一个重要机制。

近年来研究表明，肿瘤细胞 survivin 表达水平与细胞增殖关系密切。苟欣等[10]报道，58 例膀胱癌中 survivin 与 Ki-67 表达存在密切相关性，survivin 的高表达不仅抑制了癌细胞的凋亡，同时还促进了细胞的增殖。肿瘤细胞 survivin 表达增高，可能是导致其增殖活性增高、恶性程度增加的重要机制之一。本研究中，SB 作用后肿瘤细胞 survivin 表达下降，凋亡指数增加，同时 Ki-67 表达水平显著降低，与上述结论相符。

综上所述，SB 能有效抑制喉癌移植瘤的生长而无明显毒副作用，其可能是通过抑制 survivin 表达而诱导肿瘤细胞凋亡，进而抑制其增殖而发挥抗肿瘤作用，在喉癌治疗方面具有较好的应用前景。

参考文献：

[1] 房居高. 喉癌的教学建议[J]. 中国医学文摘：耳鼻咽喉科学，2005，20(4)：215－216.

[2] Wang X M，Wang X F，Li J，*et al*. Effects of 5-azacytidine and butyrate on differentiation and apoptosis of hepatic cancer cell lines[J]. Ann Surg，1998，227(6)：922－931.

[3] Kim D H，Kim M，Kwon H J. Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents[J]. J Biochem Mol Biol，2003，36(1)：110－119.

[4] Takai N，Desmond J C，Kumagai T，*et al*. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells[J]. Clin Cancer Res，2004，10(3)：1141－1149.

[5] 高　岭，董明敏，曹　华，等. 丁酸钠对 Hep-2 细胞的生长抑制和诱导凋亡作用及其对端粒酶活性的影响[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，2007，42(1)：58－63.

[6] 高　岭，董明敏，程秀莲. 丁酸钠对 Hep-2 细胞的生长、凋亡及细胞周期的影响[J]. 郑州大学学报：医学版，2007，42(2)：318－322.

[7] Wong S C，Chan J K，Lee K C，*et al*. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3 and their relationships to cell proliferation，apoptosis and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. J Pathol，2001，194(1)：35－42.

[8] 孙余才，胡国华，朱　江. 细胞增殖抗原 Ki-67 在喉癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医科大学学报，2003，28(5)：573－575，579.

[9] Shin S，Sung B J，Cho Y S，*et al*. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7[J]. Biochemistry，2001，40(4)：1117－1123.

[10] 苟　欣，何卫阳，肖明朝，等. Survivin 在膀胱癌中的表达及其与癌细胞增殖关系的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(4)：377－378.

(编辑　汪勤俭)