论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0306-04

苯丁酸钠和全反式维甲酸对宫颈癌细胞株 Hela 的影响

丁慧青 (710032 浙江 宁波,宁波第一医院妇产科)

【摘要】 **目的** 研究组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)抑制剂苯丁酸钠(Sodium 4-Phenylbutyrate,SPB)和全反式维甲酸(all transretinoic acid,ATRA)单独及联合运用对宫颈癌细胞株 Hela 生长及侵袭能力的影响,探讨苯丁酸钠和全反式维甲酸联用的效果。**方法** 体外培养宫颈癌细胞株 Hela 细胞,根据处理因素不同分为 4 组,A 组:对照组,PBS 液(1ml)处理组;B 组:1 μmol/L ATRA 单药处理组;C 组:1 mmol/L SPB 单药处理组;D 组 1 μmol/L ATRA +1 mmol/L SPB 处理组。应用细胞生长曲线、四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法、细胞克隆形成试验观察细胞生长的抑制作用;采用流式细胞术测定细胞周期分布的变化;用 Transwell 小室法检测药物处理前后细胞侵袭力的变化。**结果** 与对照组、单用药组相比,ATRA 和 SPB 联用时宫颈癌细胞株 Hela 细胞的生长速度明显减慢,克隆形成抑制率达 80.37% ($P<0.05$),细胞周期被阻滞在 G_0/G_1 期,S 期细胞数减少;药物处理后宫颈癌细胞株 Hela 的侵袭能力降低,和对照组、单用药组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 组蛋白去乙酰化酶抑制剂苯丁酸钠和全反式维甲酸联用时有明显的增效作用。

【关键词】 苯丁酸钠;全反式维甲酸;宫颈癌

【中图法分类号】 R73-361;R737.33;R979.1 【文献标志码】 A

Effect of sodium 4-phenylbutyrate and all transretinoic acid on cervical cancer Hela cell line

Ding Huiqing (Department of Obstetrics and Gynecology, Ningbo First Hospital, Ningbo, Zhejiang Province, 710032, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of sodium 4-phenylbutyrate (SPB) and all transretinoic acid (ATRA), two histone deacetylase inhibitors, on invasion ability of cervical cancer Hela cells. **Methods** Cervical cancer Hela cells cultured *in vitro* were divided into groups A-D as 1 ml PBS treatment group (control group), 1 μmol/L ATRA treatment group, 1 mmol/L SPB treatment group, and 1 μmol/L ATRA plus 1 mmol/L SPB treatment group, respectively. Cell growth curve, MTT and clonogenic assay *in vitro* were used to observe the inhibitory effects of SPB and ATRA on cell proliferation. Distribution of cell cycles was detected by flow cytometry, and invasion ability of Hela cells was determined by Transwell chamber assay. **Results** The growth of Hela cells was significantly slower in 1 μmol/L ATRA +1 mmol/L SPB treatment group than in control and 1 μmol/L ATRA treatment group or 1 mmol/L SPB treatment group, with an inhibition rate of colony formation of 80.37% ($P<0.05$). The cell cycle was arrested at the G_0/G_1 phase, the number of cells in S phase was decreased after combined treatment with SPB with ATRA. The invasion ability of Hela cells was significantly weaker in 1 μmol/L ATRA +1 mmol/L SPB treatment group than in control group and 1 μmol/L ATRA treatment group or 1 mmol/L SPB treatment group ($P<0.05$). **Conclusion** SPB and ATRA used in combination have an obvious synergistic effect on the invasion ability of cervical cancer Hela cells.

【**Key words**】 sodium 4-phenylbutyrate; all transretinoic acid; cervical cancer cells

Corresponding author: Ding Huiqing, E-mail: phoenix1a1@163.com

子宫颈癌是一种常见的妇科恶性肿瘤,近年来宫颈癌的发病率有上升和年轻化趋势。目前治疗宫颈癌以手术为主,但根治术的 5 年生存率较低,因此寻找有效的子宫颈癌化疗药物具有重要意义。全反式维甲酸(all transretinoic acid,ATRA)是对肿瘤细胞普遍适用的分化诱导剂,目前已开始用于临床上的分化治疗,但长期应用,副作用仍较大[1-3]。需要与其他药物联合使用,缩短其用药时间,降低其毒副作用。组蛋白去乙酰化酶抑制剂苯丁酸钠(sodiumphenylbutyrate,SPB)同时作为一种诱导分化恶性肿瘤的新药,具有广谱、高效、低毒的特性[4],对白血病、淋巴瘤以及多种实体瘤具有诱导分化和治疗作用[5-6]。在本实验中观

【通信作者】 丁慧青,E-mail:phoenix1a1@163.com

察了苯丁酸钠和全反式维甲酸对人宫颈癌细胞株 Hela 细胞的作用，旨在探讨两者的协同关系，为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI1640 培养液、胎牛血清和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司。SPB 购自德国 Merck 公司，用 PBS 配制成 1 mmol/L 备用。全反式 RA 购自美国 Sigma 公司，用 PBS 配制成 1 μmol/L 备用。5% 四甲基偶氮唑蓝（MTT 溶液，上海华美生物工程公司）。流式细胞仪（COULTER XL，Coulter），酶标仪（GENIOS，Tecan 公司）。

1.2 细胞培养和实验分组

人宫颈癌细胞株 Hela 购自美国典型物种保藏中心（american type culture collection，ATCC），培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 中，置饱和湿度 5% CO_2、37 ℃ 恒温培养箱中培养。Gimsa 染色后进行光学显微镜观察。细胞以 1×10^6/100 ml 培养瓶，常规培养 24 h 后如下分组进行药物处理，实验分为 4 组：对照组：PBS 液（1 ml）处理；ATRA 单药组：1 μmol/L ATRA 单药处理；SPB 单药组：1 mmol/L SPB 单药处理；ATRA + SPB 组：1 μmol/L ATRA + 1 mmol/L SPB 处理[7]。

1.3 细胞生长曲线测定

在 24 孔板上按 1.5×10^4/孔接种 Hela 细胞，按 1.2 分组给予相关处理，每组设 3 个复孔。第 2 天起，每天同一时间消化每组细胞 3 个孔，精确计数，连续 5 d，绘制各组细胞的生长曲线图。

1.4 四甲基偶氮唑蓝（MTT）比色实验

在 96 孔板上按 5×10^4/孔接种 Hela 细胞，按 1.2 分组给予相关处理，每组设 3 个平行重复孔，置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养 48 h 后，弃去培养液，生理盐水漂洗 1 遍，每孔加 MTT 20 μl（浓度为 5 mg/ml），放置孵箱内 4 h 后弃上清加入 10% 的 SDS（十二烷基磺酸钠）200 μl，过夜。震荡 15 min，用全自动酶标仪检测 570 nm 处的光密度值[D(570)]。

抑制率 = [$D(570)_{对照} - D(570)_{实验}$]/[($D(570)_{对照} - D(570)_{空白}$] × 100%

1.5 平板克隆形成实验

在 6 孔板上按 250/孔均匀接种 Hela 细胞，培养过夜，使细胞贴附，分别加入用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液，按 1.2 分组给予相关处理，每组 3 个平行孔，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 7 d，去除培养液，PBS 洗 2 次，95% 乙醇固定 10 min，Gimsa 染液染色 10 min，自来水冲洗，晾干，用 Quantity One 软件计算克隆数，按以下公式计算克隆形成率和克隆形成抑制率。

克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 × 100%

克隆形成抑制率 = (1 − 实验组克隆数/对照组克隆数) × 100%

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

收集如 1.2 分组的不同处理组细胞，调整细胞浓度为 1×10^6/L，冷 PBS 洗涤 2 次，加入 70 % 的冷乙醇（4 ℃）固定 24 h。洗涤细胞，与含 10 μg/ml RNA 酶的 Tris-HCl 缓冲液（pH = 7.4）共同孵育 30 min。50 μg/ml 碘化丙啶（PI）进行细胞 DNA 染色，1 h 内通过流式细胞仪；分析细胞 DNA 含量分布，计算出各个周期细胞的百分率。

1.7 Transwell 小室侵袭实验

在聚碳酸酯微孔滤膜上铺 Matrigel 50 μg/孔，在聚合好的小室下室加入 10% 的胎牛血清做条件培养液，在上室加入按如 1.2 分组处理过的 Hela 细胞悬液 100 μl（细胞总数为 3×10^5/L），置于培养箱中 20 h 后取出，用湿棉签仔细擦掉上室中未穿过的瘤细胞，95% 的乙醇固定 5 min，PBS 轻轻漂洗 3 遍，进行 HE 染色，自然晾干，将上室的聚碳酸酯滤膜沿边缘用手术刀片小心取下，用树脂胶固定于玻片上（膜内面朝上），封片；高倍显微镜下记数穿膜的 Hela 细胞数，每膜记数上、下、左、右、中 5 个视野的侵袭细胞数，计算平均值，每组设 3 个滤膜。

1.8 统计学分析

本研究采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，2 组间连续变量比较用 t 检验，多组间连续变量比较用方差分析，协方差校正。

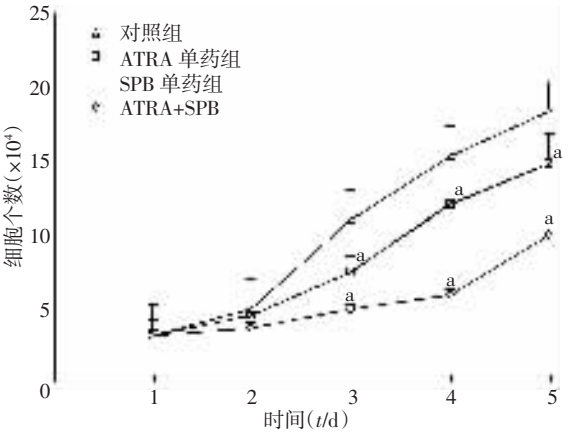
2 结果

2.1 细胞形态学观察

宫颈癌 Hela 细胞 Gimsa 染色后光学显微镜观察，可见 Hela 细胞为上皮样细胞，黏附生长于培养瓶壁上，细胞平坦。形态不规则，可为多角形，梭形等，细胞内可见 2 ~ 3 个核仁。

2.2 细胞生长曲线

对照组细胞生长活跃，经 1 μmol/L ATRA、1 mmol/L SPB 及 1 μmol/L ATRA + 1 mmol/L SPB 处理后细胞的生长增殖能力降低（图 1）。



a：$P<0.05$，与对照组比较

图 1 各处理组不同时间 Hela 细胞生长曲线

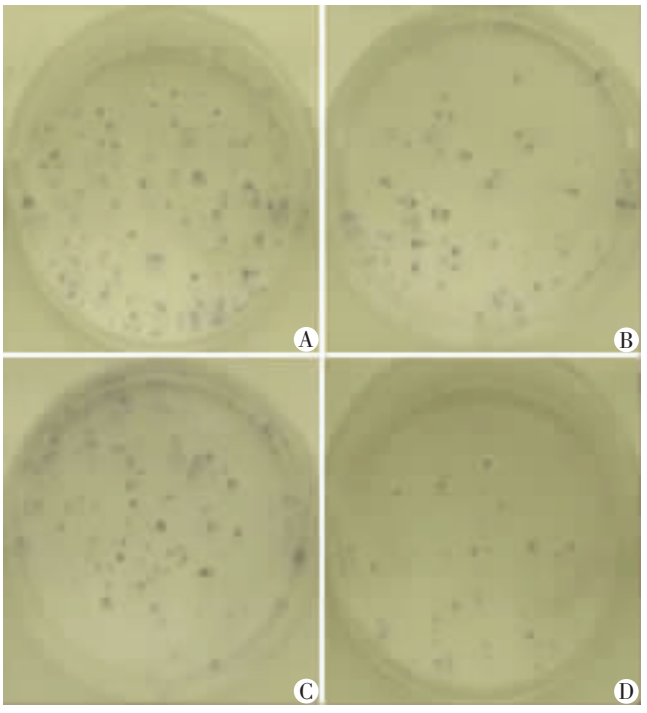
2.3 各组处理后的抑制率

ATRA 单药处理组抑制率为（32.0 ± 0.4）%；SPB 单药处理组抑制率为（31.0 ± 0.2）%；而 1 μmol/L ATRA + 1 mmol/L SPB 处理组两药联用的效果，抑制率为（59.0 ± 0.7）%。说明两者联合作用具有协同效应。

2.4 对 Hela 细胞集落形成的影响

与对照组、ATRA 单药组、SPB 单药组相比，ATRA + SPB 组的细胞克隆形成数明显减少（图 2），说明 ATRA 和 SPB 联用有

效地抑制了 Hela 细胞的克隆形成。克隆形成率和克隆形成抑制率 ATRA + SPB 组较 ATRA 单药组、SPB 单药组降低($P < 0.05$),较对照组明显降低($P < 0.01$,表 1)。



A:对照组;B:ATRA 单药组;C:SPB 单药组;D:ATRA + SPB 组

图 2 不同处理组处理后对 Hela 细胞克隆形成的影响

表 1 SPB 和 ATRA 抑制 Hela 细胞后各组克隆形成率和克隆形成抑制率的比较(%,$\bar{x} \pm s$)

组别	克隆形成率	克隆形成抑制率
对照组	71.24 ± 3.3[b]	27.68 ± 0.7[b]
ATRA 单药组	30.83 ± 1.5[a]	68.29 ± 2.4[a]
SPB 单药组	39.47 ± 2.2[a]	57.48 ± 1.9[a]
ATRA + SPB 组	19.16 ± 0.8	80.37 ± 3.6

a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与 ATRA + SPB 组比较

2.5 流式细胞仪测定细胞周期分布

如表 2 所示,G_1 期细胞 ATRA 单药组、SPB 单药组和 ATRA + SPB 组明显多于对照组,ATRA + SPB 组明显多于 ATRA 单药组和 SPB 单药组,而 S 期细胞相应减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),M 期细胞无明显变化。表明 1 μmol/L ATRA + 1 mmol/ L SPB 两药联用的效果优于单独用药。

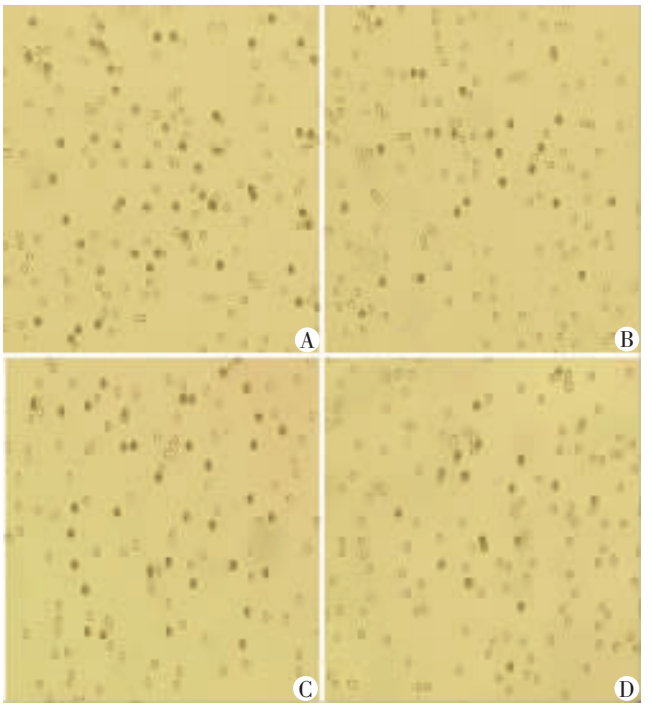
表 2 不同处理组处理后对 Hela 细胞周期的影响($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	G_0/G_1期	S 期	G_2/M 期
对照组	43.2 ± 1.8	48. 9 ± 1.7	7.9 ± 0.3
ATRA 单药组	58.2 ± 25[ab]	33.9 ± 0.7[ab]	7.7 ± 0.9
SPB 单药组	56.7 ± 2.1[ab]	34.0 ± 1.2[ab]	9.5 ± 1.2
ATRA + SPB 组	68.9 ± 3.1[a]	21.3 ± 1.3[a]	10.9 ± 1.4

a:$P < 0.05$,与对照组比较;b:$P < 0.05$,与 ATRA + SPB 组比较

2.6 Hela 细胞体外侵袭力的变化

如图 3 所示,对照组 Hela 细胞穿过滤膜的细胞数量较多,为(108.57 ± 5.32)个,ATRA 单药组[(76.61 ± 4.46)个]、SPB 单药组[(78.85 ± 4.16)个]穿膜细胞数明显减少,ATRA + SPB 组[(45.37 ± 2.74)个]穿膜细胞数最少。实验结果表明 1 μmol/L ATRA + 1 mmol/L SPB 两药联用能更有效的降低 Hela 细胞的侵袭力。



A:对照组;B:ATRA 单药组;C:SPB 单药组;D:ATRA + SPB 组

图 3 不同处理对 Hela 细胞侵袭能力的影响 (×40)

3 讨论

宫颈癌是女性常见的生殖道恶性肿瘤,其发病呈年轻化、逐年上升趋势,严重危害女性健康,病死率居女性癌症病死率的第 2 位;手术和放疗是宫颈癌的主要治疗方法,早期以手术治疗为主,中晚期多采用放射治疗[8]。尽管手术技巧、设备和技术不断改进,宫颈癌的治疗效果并无根本性提高。近年来,化疗药物的不断开发及给药途径方法的改进,化学治疗宫颈癌取得了一定疗效。因此不断开发寻找疗效肯定、毒性低的抗癌药物已成为许多医药工作者的普遍共识。组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂是一类具有抗肿瘤活性的新型药物,近年来越来越多的研究资料表明苯丁酸钠(SPB)对白血病、淋巴瘤以及多种实体瘤具有诱导分化和 作用[9-10],同时作为一种诱导分化恶性肿瘤的新药,苯丁酸钠具有广谱、高效、低毒的特性[4]。苯丁酸钠(SPB)是通过染色质组蛋白乙酰化水平提高,因此导致特定基因激活表达,相应地导致细胞的分化或癌细胞的凋亡[11]。故本实验将其应用于宫颈癌的治疗,同时为了进一步提高其对宫颈癌的疗效。必须和其他化疗药物联合应用。

维甲酸可抑制肿瘤细胞的增殖并诱导分化,全反式维甲酸(ATRA)是维生素 A 类化合物,能诱导细胞

分化成熟或恶性逆转,达到治疗肿瘤的目的,是一类颇具潜力的癌细胞分化诱导剂[12-13]。也是临床常用的肿瘤化疗药物。本实验以细胞培养为基础,通过证明SPB和ATRA单药及联合用药对宫颈癌Hela细胞增殖及侵袭能力的抑制作用,以期为临床应用提供实验依据。SPB和ATRA联合应用产生协同效应的可能的机制:ATRA通过在基因水平对C-myc的降调作用起到抑制细胞增殖,逆转肿瘤细胞恶性表达的作用;而SPB可与谷氨酰胺结合,降低血浆中谷氨酰胺的水平,影响DNA的合成,从而阻止细胞的生长而诱发凋亡.其诱导方式和作用环节与维甲酸类不同,因此,SPB和ATRA联合用药,可在多个环节上发挥诱导分化作用起到协同的效果。本实验结果显示,SPB和ATRA联合应用时,宫颈癌Hela细胞核/细胞质比例缩小,核分裂象减少;细胞增殖作用受到严重抑制,对细胞周期的影响表现为G_0/G_1期阻滞,而S期细胞相应减少;同时也在一定程度上降低了,宫颈癌Hela细胞侵袭能力,以上结果表明SPB和ATRA联合应用对卵巢癌有较强的协同关系,改变了宫颈癌Hela细胞的恶性表型,如过度增值、侵袭力等,既抑制了细胞的增殖,同时也提示增加了细胞的分化。与钱林华等[7]SPB和ATRA联合对卵巢癌细胞SKOV3的影响所得的结论一致。

综上所述,SPB和ATRA联合应用有明显的抗肿瘤增效作用,与单用药组相比能有效地提高宫颈癌Hela细胞的抑制效果,为指导临床治疗提供了有益的思路。

参考文献:

[1] BianFL, Jia LX, Yu W, *et al*. Self-assembled micelles of N-phthaloylchitosan-g-polyvinylpyrrolidone for drug delivery[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3): 454-459.

[2] Huang S, Laoukili J, Epping M T, *et al*. ZNF423 is critically required for retinoic acid-induced differentiation and is a marker of neuroblastoma outcome[J]. Cancer Cell, 2009, 15(4): 328-340.

[3] Deimling S J, Drysdale T A. Retinoic acid regulates anterior-posterior patterning within the lateral plate mesoderm of Xenopus[J]. Mech Dev, 2009, 126(10): 913-923.

[4] Carducci M A, Gilbert J, Bowling M K, *et al*. A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on an 120-h infusion schedule[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(10): 3047-3055.

[5] Monneret C. Histone deacetylase inhibitors[J]. Eur J Med Chem, 2005, 40(1): 1-13.

[6] Sachs M D, Ramamurthy M, Poel H, *et al*. Histone deacetylase inhibitors upregulate expression of the coxsackie adenovirus receptor (CAR) preferentially in bladder cancer cells[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(7): 477-486.

[7] 钱林华,张建军,曲芃芃. 5-氮杂脱氧胞苷和苯丁酸钠对卵巢癌细胞SKOV3的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(11): 1634-1638.

[8] Willmott L J, Monk B J. Cervical cancer therapy: current, future and anti-angiogensis targeted treatment[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2009, 9(7): 895-903.

[9] Mani S, Herceg Z. DNA demethylating agents and epigenetic therapy of cancer[J]. Adv Genet, 2010, 70: 327-340.

[10] Vinken M, De-Rop E, Decrock E, *et al*. Epigenetic regulation of gap junctional intercellular communication: more than a way to keep cells quiet?[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1795(1): 53-61.

[11] Peixoto P, Lansiaux A. Histone-deacetylases inhibitors: from TSA to SAHA[J]. Bull Cancer, 2006, 93(1): 27-36.

[12] Bartolini G, Ammar K, Mantovani B, *et al*. Retinoids and cancer: antitumor effect of ATRA and of a new derivative of retinoic acid, IIF, on colon carcinoma cell lines CaCo-2 and HT-29[J]. Anticancer Res, 2004, 24(3a): 1779-1783.

[13] 路太英,杨成梁,王留兴,等. 全反式维甲酸对EC9706细胞体外增殖抑制及诱导凋亡作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2008, 43(6): 1090-1094.

(收稿:2010-09-24 修回:2010-11-09)
(编辑 张 维)

(上接305页)

能退症时有报道[1]。甲状腺功能减退症合并CK升高的具体机制尚不清楚。可能与甲状腺功能减退时机体激素分泌水平、自身免疫、低代谢状态等诸多因素相关[2]。而甲减患者的肌肉容积增加,收缩和松弛减慢,肌肉肥大触之较硬,压痛明显,临床易于表现出乏力,肌肉疼痛、强直、痉挛、水肿和肥大[3]。

查阅以前的文献报道极少涉及病患的体型,月经史,身长发育情况的描述。本病例以多发性肌痛为主要表现,伴有肢体无力,肌酶谱异常增高,如未详细查体,极易被误诊为多发性肌炎从而延误病人治疗。我们的2次查体时关注到了患者身材较同龄人明显矮小,月经未来潮,颈项粗壮等一系列问题从而引领了我们向患者是否有遗传或内分泌疾病方面的思考。因此,风湿专科医生临床上遇到以关节肌肉疼痛,肌体无力而心肌酶谱显著增高的患者,在考虑肌炎的同时还应警惕甲状腺功能减退的可能性,详细查体,不放过任何疑点,才能更好地进行早期诊断,避免误诊、漏诊。

参考文献:

[1] 李晓岚,邓丹琪,周晓鸿,等. 原发性甲状腺功能减退症误诊为风湿病3例分析[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(1): 71,74.

[2] Scott K R, Simmons Z, Boyer P J. Hypothyroid myopathy with a strikingly elevated serum creatine kinase level[J]. Muscle Nerve, 2002, 26(1): 141-144.

[3] 董亚苒,董辉苒,王夏涟,等. 甲减患者肌酸激酶改变及相关因素分析[J]. 中国临床医生, 2008, 36(8): 30-31.

(收稿:2010-11-08 修回:2011-01-06)
(编辑 栾 嘉)