维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0284－04

丁酸钠诱导人脑胶质瘤细胞系 SHG－44 凋亡的初步探讨

詹 彦，支兴刚

(重庆医科大学临床学院神经外科，重庆 400016)

【摘 要】目的：研究短链脂肪酸盐丁酸钠对培养人脑胶质瘤细胞系 SHG－44 的增殖抑制和凋亡诱导。方法：通过细胞体外培养的方法，以 2mmol/L 和 4mmol/L 丁酸钠处理 SHG－44 细胞，用 MTT 比色试验和 PCNA 免疫组化染色观察细胞增殖，电子显微镜、线粒体跨膜电位($\triangle\psi m$)检测以鉴定细胞凋亡。结果：①SHG－44 细胞增殖受到明显抑制，PCNA 表达减弱；②4mmol/L 丁酸钠明显诱导 SHG－44 细胞凋亡，电镜下可见细胞膜内陷自行分割包裹碎裂的核片段和部分胞浆，脱离细胞主体，形成凋亡小体；罗丹明 123 染色示凋亡细胞$\triangle\psi m$下降。结论：丁酸钠能抑制人脑胶质瘤 SHG－44 细胞的增殖，4mmol/L 丁酸钠能诱导 SHG－44 细胞发生线粒体途径凋亡。

【关键词】丁酸钠；胶质瘤；凋亡

【中国图书分类法分类号】R73－36；R739.41；Q255 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－04

Effects of sodium butyrate on the growth and apoptosis of human glioma cell line SHG－44

ZHAN Yan, et al

(*Department of Neurosurgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of sodium butyrate, the most important short chain fatty acids, on growth suppression and apoptosis of SHG－44 glioma cell line. *Methods*: Human glioma SHG－44 cells were treated with 2 mmol/L and 4 mmol/L sodium butyrate. The inhibition of cell growth was assessed by MTT spectropotometric analysis and immunohistochemisty methods. The apoptosis was observed by reverted microscope and transmission electron microscope. And mitochondrial transmembrane potential was detected by rhodamine 123 dyeing, which confirmed that SHG－44 cells suffered a mitochondrial path apoptosis. *Results*: Sodium butyrate treatment resulted in significant inhibition of cell growth, with proliferating cell nuclear antigen expression weakened. Furthermore, 4 mmol/L sodium butyrate could induce the SHG－44 cells apoptosis. It was proved that cellular membrane shrunk, vacuoles existed in plasm, and apoptosis bodies occurred by morphologic observation. In addition, the $\triangle\psi m$ was decreased in apoptosis cells after 4 mmol/L sodium butyrate treatment. *Conclusion*: These results indicate, in malignant glioma SHG－44 cells, sodium butyrate could not only suppress cell growth, but also induce apoptosis by a mitochondrial path.

【Key words】Butyrate; Glioma; Apoptosis

肿瘤研究的资料显示，与肿瘤细胞的恶性增殖和分化受阻一样，细胞凋亡异常在许多肿瘤的发生都具有重要意义。由于抗凋亡信号的增加或/和促凋亡信号的降低，加之癌基因活性的增强或/和抗癌基因的丢失，肿瘤细胞周期调控往往失控，恶性增殖，凋亡受阻。因此，选择性的抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡成为了目前肿瘤治疗的基本策略之一。本实验采用体外细胞培养的方法，就丁酸钠对人脑胶质瘤 SHG－44 细胞增殖和凋亡的影响进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人脑恶性星形胶质瘤细胞系 SHG－44 细胞(122 代)引自苏州大学附属第二医院脑肿瘤研究室。细胞用含 10%小牛血清 RPMI 1640 培养液(Hyclone，美国)，另添加抗生素(100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素)，置于 37℃、5%CO_2 饱和湿度的培养箱培养。2～3 天换新鲜培养液，4～5 天或按照实验需要消化传代。传代前用 0.12%胰酶消化。

1.2 药物处理

作者介绍：詹 彦(1978－)，男，硕士，住院医师，主要研究方向：脑肿瘤治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

丁酸钠(上海化学试剂有限公司)用 10 mmol/L 的 PBS 配制成 50mmol/L 浓度溶液,调整 pH 值至 7.2,高压灭菌后 4℃冰箱中储存。SHG-44 细胞分处理组和对照组,传代时在培养液中分别同时加入丁酸钠和等体积的 PBS,丁酸钠终浓度分别为 2 mmol/L 或 4 mmol/L,PBS 为对照。

1.3 生长曲线

采用 MTT 比色法。指数期生长的 SHG-44 细胞以 1×10^4 密度接种子 96 孔培养板。每 24 h 取一板,吸弃培养液后每孔加入不含血清培养液 200μl,并加入 5mg/ml MTT (Sigma,美国)20μl,继续培养 4h 后吸弃上清液,每孔加入二甲基亚砜 150μl,待结晶物充分溶解,选择 450nm 波长,以二甲基亚砜为空白对照,在自动酶联免疫检测仪(BIO-RAD,美国)上测定各孔光吸收值。

1.4 免疫组化染色

取指数生长期细胞,接种于预先覆有盖玻片的 6 孔培养板中,药物处理 96h 后取出盖玻片,PBS 洗涤两次,95% 乙醇固定 30min,自然晾干后常规免疫组化染色(S-P 法),DAB (二氨基联苯胺)显色。S-P 试剂盒以及即用型鼠抗人增殖细胞核抗原(PCNA)均为福州迈新生物技术开发公司产品。

1.5 凋亡细胞的形态学观察

在倒置显微镜下分别观察比较对照组和处理组细胞,并收集药物处理 96h 后的细胞,PBS 洗涤后经 4% 戊二醛预固定和 1% 四氧化锇后固定,按透射电镜标本常规脱水、包埋、切片、染色后在电子显微镜镜(日立 H-600,日本)下观察。

1.6 线粒体荧光探针流式术检测细胞凋亡

药物处理 96h 后,收集细胞 1×10^6 个,PBS 离心洗涤两次,悬浮于 0.5mlPBS 中,加入 Rho123 染液(Sigma,美国),终浓度为 10 mg/L,37℃避光孵育 45min。PBS 洗去 Rho123 染料后,将细胞悬液与等体积 PI 染液混合均匀,37℃孵育 15min。放入流式细胞仪(Becton-Dickinson,美国)样品室,激发波长 488nm 测定,Modfit LT2.0 软件分析。

1.7 统计分析

记量资料用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。流式细胞仪检测结果采用方差分析之多个样本均数间 q 检验(Newman-Keuls 法),免疫组化染色分析采用成组设计的两样本均数 t 检验。检验水平 α 取 0.05,$P\leqslant0.05$ 时,认为有显著差异。

2 结 果

2.1 丁酸钠对 SHG-44 细胞的增殖抑制

MTT 比色试验是一种检测细胞生长的方法。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉淀在细胞中,二甲基亚砜能溶解这些结晶,用酶联免疫检测仪测定其光吸收值高低,可以间接的反映活细胞数量的多少。以时间为横轴,光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线,可见 SHG-44 细胞经丁酸钠处理后增殖速度显著减慢(如图 1)。

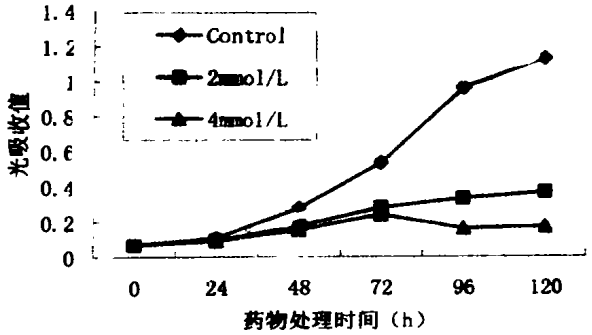


图 1 丁酸钠对 SHG-44 细胞增殖的影响

2.2 PCNA 免疫组化染色

PCNA 蛋白定位于胞核,DAB 染色呈棕黄色。本研究中,对照组细胞 PCNA 表达呈强阳性,2mmol/L 丁酸钠作用 96h 后,PCNA 表达减弱(如图 2)。经医学图像分析管理系统测定分析,对照组和处理组的平均光密度分别为 0.71±0.10 和 0.19±0.70,有显著差异($P<0.05$)。

2.3 凋亡细胞形态学观察

在倒置显微镜下,除了观察到 SHG-44 细胞贴

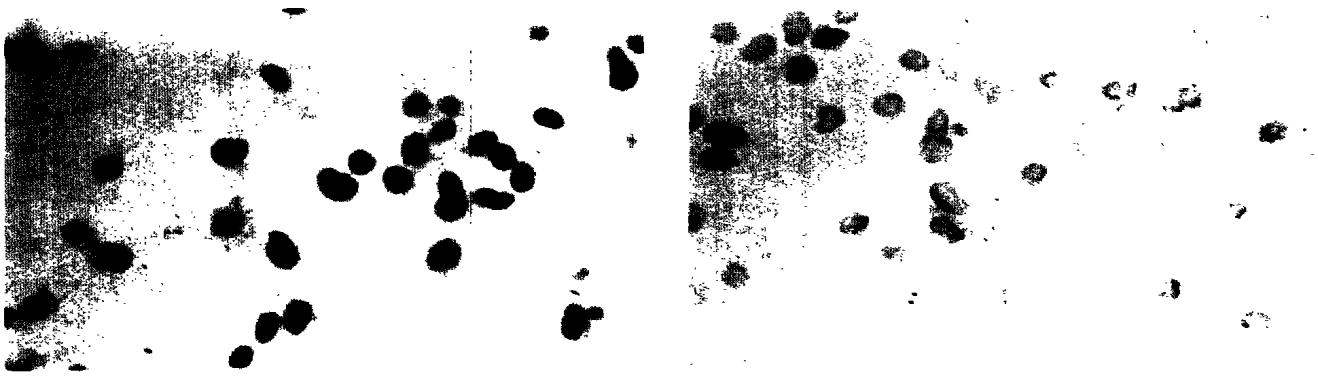


图 2 丁酸钠对 SHG-44 细胞 PCNA 表达的影响

①对照组 PCNA 表达(96h,S-P×400);②处理组 PCNA 表达(96h,S-P×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

壁变明显,胞体显著增大,细胞突起增多呈星形等分化表现外,在 4mmol/L 丁酸钠组还观察到:部分细胞膜皱缩,胞浆中出现空泡,细胞表面凸起呈小泡状,并有小泡脱离细胞主体,悬浮于培养液中;细胞核密度增高,并出现颗粒样物质。

在电子显微镜下,4 mmol/L 丁酸钠组的许多细胞核中染色质凝集,细胞皱缩,胞浆出现空泡变性,部分胞浆脱落,呈现凋亡早期图像;并有细胞膜内陷自行分割包裹碎裂的核片段和部分胞浆,脱离细胞主体,形成凋亡小体,同时,细胞膜结构却仍然完整。而在 2mmol/L 组则鲜有以上表现。

2.4 *细胞流式术检测细胞凋亡*

SHG-44 细胞以 PI 和 Rho123 双重染色,其中 PI 为膜非通透性核酸染料,活细胞拒染;而 Rho123 是亲脂性阳离子染料,由线粒体特异性吸收,其摄取量与线粒体跨膜电位(Mitochondrial transmembrane potential,$\triangle\psi m$)呈正相关。经流式细胞仪检测分析,可见 3 个细胞亚群,即呈现完整细胞膜和稳态 $\triangle\psi m$ 的活细胞($PI^- Ph0123^+$);细胞膜完整但线粒体 $\triangle\psi m$ 下降的凋亡细胞($PI^- Pho123^-$);以及细胞膜和线粒体 $\triangle\psi m$ 均受损的坏死细胞($PI^+ Pho123^-$)。

经丁酸钠处理 96h 后,2mmol/L 丁酸钠组有 2.92%SHG-44 细胞发生凋亡;而经过 4mmol/L 丁酸钠诱导,25.05% 的 SHG-44 细胞发生了凋亡;在对照组则有 1.50% 自发凋亡(见表 1)。显然,4mmol/L 丁酸钠能明显诱导人脑胶质瘤 SHG-44 细胞线粒体 $\triangle\psi m$ 下降,从而发生细胞凋亡。

表 1 流式细胞仪检测丁酸钠诱导的 SHG-44 细胞凋亡(%)

组 别	不同细胞亚群分布(%)		
	$PI^- Pho123^+$	$PI^- Pho123^-$	$PI^+ Pho123^-$
Control	89.52	1.50	3.56
2mmol/L	83.21	2.92	8.38
4mmol/L*	58.26	25.05	10.20

*: $P<0.05$ vs Control

3 讨 论

丁酸是食物中纤维成分在肠道菌丛的发酵作用下产生的短链脂肪酸,和乙酸、丙酸一起被认为是最主要的三种短链脂肪酸。我们在先前的研究中已经发现,2mmol/L 丁酸钠能诱导 SHG-44 细胞由分化不良向分化良好发生明显演进[1]。在本研究中,我们又发现丁酸钠对人脑胶质瘤细胞的凋亡诱导作用。虽然多种药物能诱导细胞凋亡,但由于丁酸是正常人体代谢产物,不良反应少,在动物实验中即使以高浓度给药也来发现可知的药物毒性[2],因而引起了广泛的关注。

本研究采用丁酸钠对人脑胶质瘤 SHG-44 细胞进行了持续处理,结果显示:SHG-44 细胞的生长随丁酸钠浓度的增加而减慢,免疫组化染色显示 PCNA 表达明显减弱。PCNA 是一种细胞周期蛋白,主要表达在 S 期,作为 DNA 聚合酶 δ 的附属因子,促进 DNA 聚合酶延伸 DNA,直接参与细胞增殖过程的 DNA 复制,其表达反映了细胞的增殖活性。PCNA 表达减弱从细胞周期蛋白水平证实了 SHG-44 细胞增殖抑制。这和我们先前研究中核仁组成区嗜银蛋白表达减弱和细胞周期阻滞是一致的。

在本研究中,4mmol/L 丁酸钠诱导 SHG-44 细胞 96h 后,25.05% 的细胞发生了凋亡。在电子显微镜下可见典型的凋亡小体,从形态上证实丁酸钠诱导 SHG-44 细胞发生凋亡。而在 PI 和 Rho123 双重染色后通过流式细胞仪检测到凋亡细胞所伴有的 $\triangle\psi m$ 下降则显示了丁酸钠诱导 SHG-44 细胞凋亡的线粒体途径,或者说至少体现了线粒体功能紊乱在其中的重要性。

$\triangle\psi m$ 的维持依赖于线粒体膜通透性转运孔(Mitochondrial permeability transition pore,MPT),在生理情况下,MPT 呈周期性开放,使线粒体外室的质子进入基质,从而防止质子在外室过度蓄积。丁酸钠使 MPT 受到破坏,呈持续开放状态,产生 $\triangle\psi m$ 和呼吸链脱偶联、GSH(还原型谷胱甘肽)耗竭、基质 Ca^{2+} 外流以及线粒体膜间蛋白的释放等严重后果,这些因素又进一步导致 MPT 的开放和 $\triangle\psi m$ 的破坏。MPT 的开放破坏了线粒体基质和外室之间的离子平衡,使线粒体基质处于高渗状态,后者导致线粒体容量失调,进而引起线粒体外膜的破坏。线粒体外膜的物理性损伤导致定位于线粒体外室的 Caspase 活化物——细胞色素 C 以及凋亡诱导因子(Apoptosis-inducing factor,AIF)的释放。在 ATP 的参与下,细胞色素 C 结合并活化凋亡活化因子-1 和 Caspase-9,活化的 Caspase-9 作为始动 Caspase 则进一步触发 Caspase 级联放大反应,而 AIF 可直接活化下游 Caspase,从而迅速导致凋亡的发生[3]。

关于细胞凋亡调控机制,目前研究发现细胞凋亡受一系列凋亡相关基因的调控,其中最重要的就是 Bcl-2 基因家族。Bcl-2 基因家族主要可分为

维普资讯 http://www.cqvip.com

两类：以 Bcl－2、Bcl－XL 为代表的凋亡抑制基因和以 Bax、Bcl－XS 为代表的凋亡诱导基因。研究认为，Bcl－2 发挥抑制凋亡的作用必须通过与其同系物 Bax 结合成异源二聚体 Bcl－2/Bax 来实现。若异源二聚体 Bcl－2/Bax 比例大于同源二聚体 Bax/Bax，则细胞凋亡被抑制，反之细胞发生凋亡。Bcl－2 表达的下调和 Bax 表达的增高同样能导致细胞凋亡。另外，丁酸钠还能直接影响 Bcl－XL 的表达。在只表达 Bcl－XL 的间皮瘤，丁酸钠通过下调 Bcl－XL 的表达同样诱导了凋亡的发生[4]。可见，Bcl－2 基因家族和丁酸引起的肿瘤细胞凋亡密切相关。

根据最新的研究表明[5~7]，Bcl－2 的表达和 MPT 的重要组分 PBR(Peripheral benzdiazepine recepter)的表达在时间上密切相关。Bcl－2 和 Bcl－XL 能够抑制 MPT 开放和维持$\triangle\psi m$，进而阻止线粒体内细胞色素 C 和 AIF 的释放。Bcl－XL 也能特异的结合细胞色素 C，从而降低胞浆内细胞色素 C 的可利用性。相反，Bcl－XS 则阻止 Bcl－XL 和细胞色素 C 的结合。我们认为，这可能就是丁酸钠通过 Bcl－2 基因家族调控 SHG－44 细胞发生线粒体途径凋亡的机理所在。

一个非常值得关注的问题是，对于肿瘤细胞，在经过丁酸钠的处理后到底是向成熟分化还是发生凋亡呢？比如，为什么 2mmol/L 的丁酸钠更多的是诱导 SHG－44 细胞分化[1]，而 4mmol/L 的丁酸钠却是诱导细胞凋亡呢？对此目前并没有明确的解释，有待进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] 詹 彦，支兴刚. 丁酸钠对人脑胶质瘤细胞系 SHG－44 增殖分化的影响[J]. 第三军医大学学报，2003；25(11)：993－996.

[2] Engelhard HH, Duncan HA, Kim S, et al. Therapeutic effects of sodium butyrate on glioma cells in vitro and in the rat C6 glioma model[J]. Neurosurgery, 2001；48(3)：616－625.

[3] 曾益新. 肿瘤学[M]. 北京：人民卫生出版社，1999：154－156.

[4] Cao XX, Mohuiddin I, Ece F, et al. Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl－xl gene expression leads to apoptosis cell death in mesothelioma[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001；25(5)：562－568.

[5] Yang E, Korsmeyer S. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL－2 family and cell death[J]. Blood, 1996；88(2)：386－401.

[6] Wang HG, Reed JC. Mechanisms of Bcl－2 protein function[J]. Histol Histopathol, 1998；13(2)：521－530.

[7] Staunton MJ, Gaffney EF. Apoptosis: basis concepts and potential significance in human cancer[J]. Arch Pathol Lab Med, 1998；122(4)：310－319.

(上接第 272 页)中度贫血、消瘦体形、精神欠佳、皮肤无色素沉着及黄染，胸颈部数枚蜘蛛痣，无瘀点瘀斑，颈腋腹股沟扪及多个蚕虫大小活动的肿大淋巴结，甲床、睑结膜、舌质苍白，肝大，右肋下 4cm，剑下 5cm，质中，脾达左侧腹股沟，超过正中线 2cm，质硬无叩压痛、表面光滑。实验室检查肝功：白/球 22.7/79.7g/L，其余正常。肾功、尿常规正常，血：WBC2.3×10^9/L　RBC3.28×10^{12}/L　PLT71×10^9/L　Hb82g/L。B 超肝大，脾长径 29.8cm。免疫学检测 Kala－azar 诊断试条 Dipshck 法检测黑热病抗体阳性(为两条带，与阳性对照一致，图略)，骨髓涂片见红细胞内外均存在利一杜小体(图略)。

2 治疗方案

用葡萄糖酸锑钠(0.6 克/支)治疗两个疗程，其间间隔 7 天。第一疗程 10 天：1～10 天，每日 1 支，第二疗程 7 天：每日 1 支。用药过程中心电监护，观察心电图无异常。在第一疗程治疗过程中，患者仅感右下腹间隙性、痉挛性疼痛，可自行缓解。在第二疗程最后两天，腹痛加重，不能忍受，停药休息两天后缓解，最终完成治疗。治疗结束时复查：肝功白/球 30.9/103.6g/L，肾功、尿常规正常，血图：WBC 4.3×10^9/L，RBC3.78×10^{12}/L，PLT 71×10^9/L，Hb 106g/L。B 超脾长径 22.7cm。

3 讨 论

黑热病是由利什曼原虫引起的慢性地方性传染病，在流行病学上大致分为三种不同类型，即人源型、犬源型、自然疫源型，分别以印度地中海盆地，中亚细亚荒漠内的黑热病为典型代表，我国由于包括平原，山丘、荒漠三种不同类型的地区，故三种不同类型的黑热病在国内都能见到。中华白岭作为主要传播媒介，四季散发，10 岁以下儿童发病率高，成人少见。典型黑热病表现为长期不规则发热、消瘦、贫血、肝脾进行性肿大，全血细胞减少。但由于生态的变化、人口流动性增加，在不是疫区的地方出现病例，发病初期，症状不典型，如果认识不足，很容易漏诊和误诊。本例患者先后到过甘肃、新疆，以长期间隙发热、出汗、乏力等症状为突出症状，后来半年上述症状好转，随后多汗、乏力加重，不能坚持劳动。从发病到确诊共 13 月，辗转多家医院，患者的临床表现和体征较典型，延误诊断的根本原因是认识不足。由于该病早期临床症状不典型，后期临床表现无特异性，表现错综复杂，加之近年社会人口流动性大，非疫区至疫区的机会增多，故对非疫区长期无明原因发热者，均应警惕该病。锑剂治疗期间可因毒作用导致严重后果，需密切监测。