DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.025
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 200

文章编号:1000-5404(2003)11-0993-04

论著

丁酸钠对人脑胶质瘤细胞系SHG-44增殖分化的影响

詹 彦,支兴刚 (重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

提 要:目的 研究丁酸钠对培养人脑胶质瘤SHG-44细胞的增殖抑制和分化诱导。方法 以2 mmol/L丁酸钠处理SHG-44细胞,用MTT比色、核仁组成区银染观察细胞增殖抑制,用流式细胞术、电镜观察超微结构、免疫组织化学染色、凝集试验鉴定细胞分化。结果 SHG-44细胞经丁酸钠处理后:①细胞增殖受到明显抑制,并具有时间、剂量依赖性;②细胞周期受阻,S期细胞比例减少;③电镜观察发现细胞核变规则,异染色质增多,胞浆中线粒体、粗面内质网等细胞器增多并趋于正常;④胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达增强,改型蛋白(Vimentin)表达减弱;⑤细胞凝集度明显变低。结论 丁酸钠能抑制人脑胶质瘤SHG-44细胞的增殖,2 mmol/L丁酸钠能诱导SHG-44细胞发生明显分化。

关键词:丁酸盐;胶质瘤;诱导分化
中图法分类号:R329.28;R739.41;R914.4 文献标识码:A

Effect of sodium butyrate on the growth and differentiation of human glioma cell line SHG-44

ZHAN Yan, ZHI Xing-gang (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of sodium butyrate on the growth suppression and cellular differentiation of cultured SHG-44 glioma cell line. Methods Human glioma SHG-44 cells were treated with 2 mmol/L sodium butyrate. The inhibition of cell growth was assessed by MTT spectrophotometric analysis and AgNORs analysis. The cellular differentiation was determined by flow cytometry, electron microscopy, immunohistochemical method and agglutination test. Results Treatment of SHG-44 cells with sodium butyrate resulted in significant inhibition of cell growth and G1-S transition in time-dependent and dose-dependent manners. Sodium butyrate could induce differentiation of SHG-44 cells with regularized nuclei and increased heterochromatins. The mitochondria and rough endoplasmic reticulum increased in density in normal state. Furthermore, SHG-44 cells expressed more GFAP but less vimentin, and the agglutination degree decreased obviously. Conclusion Sodium butyrate may suppress glioma cells growth and induce differentiation of human glioma cells.

Key words: butyrate; glioma; induced differentiation

肿瘤可看做是细胞分化异常的疾病,肿瘤细胞区别于正常细胞的一个重要特征就是分化障碍。传统认为肿瘤细胞的去分化状态是不能逆转的,但近来研究表明,阻碍分化的基因在一定条件下是可逆的。诱导肿瘤分化正是基于以上认识,逐渐成为肿瘤生物治疗的新策略[1]。本实验用丁酸钠作为诱导剂处理人脑胶质瘤细胞系SHG-44细胞,应用四唑蓝(MTT)法、流式细胞术、免疫组化等方法,观察研究处理前后细胞形态结构等生物学特征,为进一步研究人脑胶质瘤的分化治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人脑胶质瘤细胞系SHG-44细胞(第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%小牛血清的RPMI-1640培养基(HyClone),置37 ℃、5% CO_2 孵箱培养。2~3 d换液,3~5 d传代,传代前用0.12%胰酶消化。

1.2 药物处理

丁酸钠(上海化学试剂有限公司)用0.01 mol/L的PBS配制成50 mmol/L浓度溶液,调pH至7.2,压力灭菌后4 ℃贮存。细胞分处理组和对照组,传代时分别同时加入丁酸钠和等体积的PBS,丁酸钠终浓度为2 mmol/L(特殊说明除外)。

1.3 生长曲线

采用MTT比色法。把细胞以1×10^4/ml的密度接种于96

作者简介:詹 彦(1978-),男,浙江省兰溪市人,硕士研究生,主要从事脑肿瘤的治疗方面的研究。电话:(023)69012239

收稿日期:2002-06-05;修回日期:2002-08-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

孔培养板，药物终浓度分别为 0.5、1、2、4、8 mmol/L。每 24 h 取一板，每孔加入 5 mg/ml MTT(Sigma) 20 μl，继续培养 4 h 后，吸弃上清，每孔加入 DMSO 150 μl，待结晶物充分溶解，选择 450 nm 波长，以 DMSO 为空白对照，在自动酶联免疫检测仪(BIO-RAD Model 2550 EIA Reader，美国)上测定各孔吸光度值。

1.4 核仁组成区嗜银蛋白(AgNORs)分析

细胞经药物处理 96 h 后，常规制备细胞染色体标本，用新鲜配制的 50% $AgNO_3$ 染色，蒸馏水冲洗，油镜下随机计数 100 个细胞，统计每个胞核内 AgNORs 平均数。

1.5 细胞周期分析

常规消化离心后，PBS 洗两次，用 4 ℃预冷的 70% 乙醇快速打散固定，RNA 酶处理后，碘化丙啶染色 30 min，流式细胞仪(BD FACScan calibur，Facslber)检测，Modfly 软件分析。

1.6 倒置显微镜及透射电镜观察

在倒置显微镜下观察细胞形态变化，并收集药物处理 96 h 后的细胞，PBS 洗涤后经 2.5% 戊二醛固定，按透射电镜标本常规包埋、制样，在透射电镜(日立 H-600，日本)下观察。

1.7 免疫组织化学染色

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 96 h 后取出盖玻片，PBS 洗涤两次，95% 乙醇固定 30 min，自然晾干后常规免疫组化染色(S-P 法)，DAB 显色。S-P 试剂盒以及一抗，即用型鼠抗人胶质纤维酸性蛋白(GGlial fibrillaryacidic protein，GFAP)和即用型鼠抗人波形蛋白(Vimentin)，均为福州迈新公司产品。

1.8 凝集试验

收集药物处理 96 h 后的细胞，常规消化离心后用 RPMI-1640 培养液洗两次并制成悬液。悬液中加入植物凝集素(Phytahemaloagylutinin，PHA)，终浓度为 20 mg/L，震荡 30 s 后培养 40 min，倒置显微镜下观察。

1.9 统计学分析

所得实验数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用统计分析软件 SAS 处理，分别进行两样本均数 t 检验，计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 酸钠对 SHG-44 细胞的增殖抑制

对照组细胞增殖旺盛，而处理组细胞增殖速度显著减慢，见图 1。经 0.5、1、2、4、8 mol/L 药物处理 48 h 后，细胞生长抑制率分别是 21.3%、32.1%、36.1%、44.0%、61.0%。处理 96 h 后，细胞生长抑制率分别是 28.7%、48.0%、65.6%、83.1%、88.9%。这表明，丁酸钠对 SHG-44 细胞的增殖抑制作用随浓度的增加而增加，随药物作用时间的增加而增加，即具有时间、剂量依赖性。

2.2 AgNORs 计数

AgNORs 是核仁内高度磷酸化对银有亲和作用的非组蛋白，其含量能反映细胞增殖的活性。对照组多数细胞核有 1～4 个 AgNORs，平均(2.82±1.13)个/核。处理组细胞核中 AgNORs 萎缩，体积较小，平均(1.69±1.04)个/核。两组有显著性差异($P<0.05$)。

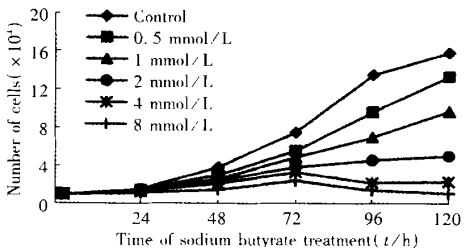


图 1 丁酸钠对 SHG-44 细胞增殖的影响

Fig 1 Effects of sodium butyrate on the growth of SHG-44 cells

2.3 酸钠对 SHG-44 细胞周期时相的影响

SHG-44 细胞经丁酸钠处理后，G_0/G_1 期细胞群比例增加，S 期细胞群比例明显减少，而且这种趋势具有时间、剂量依赖性，见表 1。

表 1 丁酸钠对 SHG-44 细胞周期时相的影响(%)

Tab 1 Effects of sodium butyrate on cell cycle phase of SHG-44 cells(%)

Time (days)	Concentration (mmol/L)	Cell cycle phase distribution %		
		G_0/G_1	S	G_2+M
2	0(Control)	59.71	31.72	8.57
	1	60.1	29.81	10.09
	2	68.35*	23.08*	8.57
4	0(Control)	57.28	33.24	9.48
	1	63.76	22.23*	14.01
	2	75.49*	14.87*	9.64

*: $P<0.05$ *vs* control

2.4 酸钠对 SHG-44 细胞形态结构的影响

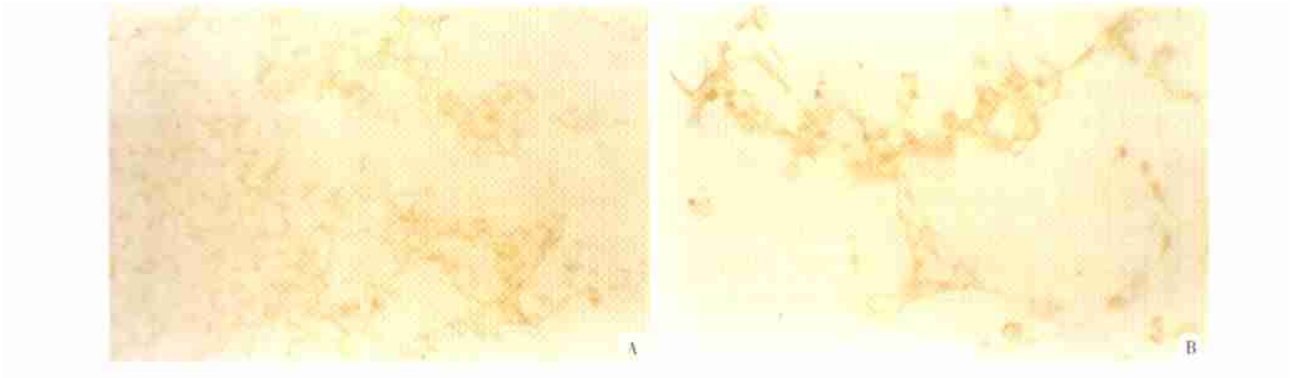
在倒置显微镜下观察，SHG-44 细胞大多没有细胞突起，胞体向两端伸长呈长梭形，少数有细胞突起呈星形。经过 2 mmol/L 丁酸钠诱导后，SHG-44 细胞贴壁变明显，胞体显著增大，细胞突起增多，且有接触抑制现象。

在透射电镜下，SHG-44 细胞外形不规则，核大且不规则，可见双核、多核，核浆比例大，常染色质丰富；胞浆中细胞器稀少，以游离核糖体为主，内质网数量少，散在分布。经过 2 mmol/L 丁酸钠诱导 96 h，胞核变规则，多呈圆形，核浆比例变小，异染色质增多；胞浆中细胞器数量明显增多，可见形态正常的线粒体，其周围有多量粗面内质网。

2.5 酸钠对 SHG-44 细胞 GFAP 和 Vimentin 表达的影响

GFAP、Vimentin 均定位于胞浆，DAB 显色阳性呈棕黄色。对照组细胞 GFAP 多呈弱阳性，少数呈阴性，而 Vimentin 表达为强阳性。2 mmol/L 丁酸钠诱导 96 h 后，GFAP 表达较对照组增强，而 Vimentin 表达明显降低，见图 2，3。经医学图像分析管理系统测定平均吸光度分析，处理组和对照组有显著差异，见表 2。

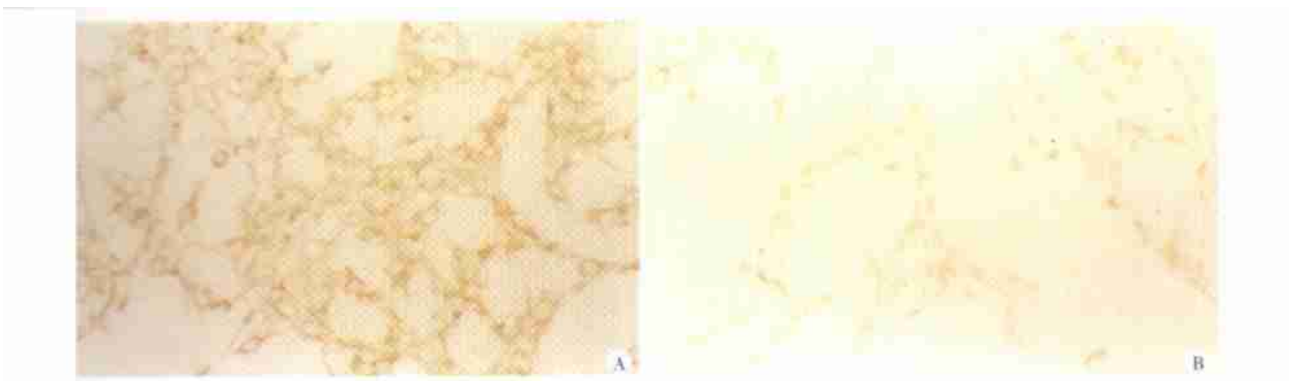
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: Control group 96 h; B: Sodium butyrate group 96 h

图 2　SHG-44 细胞 GFAP 的表达　(S-P× 200)

Fig 2　Expression of GFAP in SHG-44 cells Left　(S-P× 200)



A: Control group 96 h; B: Sodium butyrate group 96 h

图 3　SHG-44 细胞 Vimentin 的表达　(S-P×200)

Fig 3　Expression of Vimentin in SHG-44 cells　(S-P× 200)

表 2　丁酸钠对 SHG-44 细胞 GFAP 和 Vimentin 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Effects of sodium butyrate on the expressions of GFAP and Vimentin of SHG-44 cells($\bar{x} \pm s$)

Antigen	Control	Sodium Butyrate
GFAP	0.03 ±0.02	0.07 ±0.02 *
Vimentin	0.16 ±0.05	0.06 ±0.03 *

*: $P < 0.05$ *vs* control

2.6　酸钠对细胞凝集的影响

PHA 处理 40 min 后, 对照组细胞凝集程度高, 凝集块中细胞数多达数 10 个。而经过丁酸钠处理 96 h 的细胞凝集度明显变低, 绝大部分细胞为单细胞, 仅有少数细胞呈 4~5 个凝集。

3　讨论

丁酸盐是食物纤维成分在肠道菌丛作用水解下产生的短链脂肪酸盐。研究显示, 纤维性食物的吸收减少和结肠癌的发生具有密切的关系[2]。体外实验表明, 丁酸钠对结肠癌、肝癌、白血病等许多不同肿瘤细胞均有抑制增殖和诱导分化的作用[3~5]。但在脑胶质瘤却报道甚少。

本实验利用低剂量丁酸钠作用于体外培养的人脑胶质瘤 SHG-44 细胞, 结果显示: 细胞增殖受到显著抑制, 细胞周期进程受阻, S 期细胞比例减少, G_0/G_1 期细胞明显增多。这是细胞分化的早期效应, 那些滞留于 G_0/G_1 期的细胞退出旺盛增殖状态, 进而分化。细胞形态学观察发现, 细胞贴壁明显, 胞体增大; 电镜观察证实, 丁酸钠处理后的细胞核变规则, 核浆比例变小, 异染色质增多, 胞浆中细胞器明显丰富, 线粒体、粗面内质网增多并趋于正常形态。这说明丁酸钠使 SHG-44 细胞向成熟分化。

GFAP 和 Vimentin 均为中间丝蛋白, 两者在星形胶质细胞间变和分化过程中的表达呈相反趋势, 分化好的细胞 GFAP 阳性明显, Vimentin 反应弱; 分化差的细胞则相反[6]。本实验利用免疫组化方法表明, 经 2 mmol/L 丁酸钠处理 96 h 后, GFAP 表达明显增强, 而 Vimentin 表达减弱, 进一步证实了丁酸钠对 SHG-44 细胞的分化诱导作用。另外, 丁酸钠使 SHG-44 失去凝集反应, 说明丁酸钠对于改变细胞膜表面 PHA 受体数量或者结构具有显著作用, 这可能也是丁酸钠对 SHG-44 诱导分化的结果。

丁酸钠诱导胶质瘤细胞分化的机制目前并不完全清楚。研究表明[7], 由于组蛋白的赖氨酸残基在组蛋

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

白乙酰转移酶的催化下乙酰化，又在组蛋白脱乙酰酶的作用下去乙酰基，丁酸钠作为组蛋白脱乙酰酶抑制剂，能使组蛋白处于高度乙酰化状态。而组蛋白的乙酰化在调节染色体的结构、稳定性及转录活性中都具有重要的意义，它能抑制维持肿瘤恶性表型的相关基因的表达。研究发现，经丁酸钠处理后，DNA 的稳定性和转录活性明显下降，p21/WAF1 则表达增强。而细胞周期素(Cyclin)和细胞周期素依赖激酶(Cyclin-dependent kinase, CDK)的复合物作为 Rb 蛋白的激酶，磷酸化 Rb 蛋白，使细胞从 G_1 期进入 S 期。p21/WAF1 表达的增强则抑制了 Cyclin-CDK 复合物对 Rb 蛋白的磷酸化作用，从而使细胞周期受阻于 G_1 期。除此之外，组蛋白乙酰化也能通过影响参加细胞周期进程的其他重要基因的表达，如 *c-myc*、*c-myb*，来发挥其抑制细胞增殖和诱导细胞分化的作用。

在丁酸钠对非胶质瘤细胞的诱导分化研究中，其作用机制主要体现在以下几个方面[8]：①调节 Cyclin D1 的表达；②活化 p21，抑制 CDK 活性；③下调 C 端 src 激酶表达；④诱导酪氨酸磷酸化，活化 MAP 激酶(丝裂原活化蛋白激酶)；⑤活化丝氨酸/苏氨酸磷酸酶；⑥诱导凋亡等。在人脑胶质瘤，Ito 等[9] 研究发现，胶质瘤细胞 U251MG、U87MG 经丁酸钠诱导后，p21 和 CyclinD1 的含量增加。研究认为，p21 作为 CDK 抑制因子，能和 Cyclin-CDK 复合物结合并抑制相应 CDK 活性，阻碍其磷酸化 Rb 蛋白，从而抑制细胞周期由 G_1 期向 S 期过渡；而 Cyclin D1 是细胞对生长信号的感受器，和 p21 相反，其浓度和活性的增加能促进细胞周期由 G_1 期进入 S 期。在丁酸钠诱导的细胞周期阻滞中，p21 具有重要意义，并且它对细胞周期的抑制作用显然超过了实验中 Cyclin D1 增加对细胞周期的正调节作用。尽管在 DNA 损伤时 p21 表达的增加和 p53 密切相关，但在野生型 p53 的 U87MG 细胞和突变型 p53 的 U251MG 细胞都观察到了 p21 表达的增加，这说明丁酸钠诱导的 p21 含量增加可能并不依赖于 p53[9]。

可见，丁酸钠诱导肿瘤细胞分化的分子机制是非常复杂的，弄清其中的关键基因及其调节方式必将为脑胶质瘤的分化治疗开辟新的途径。

(致谢：感谢本校病理生理学教研室骆云鹏教授、病理学教研室李昱博士给予本实验的帮助。)

参考文献：

[1] 周洪语，钟春龙. 神经胶质瘤诱导分化治疗的研究进展[J]. 国外医学神经病学、神经外科学分册，2000，27(3)：113－116.
[2] Terry P, Giovannucci E, Michels K B, *et al*. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(7): 525－533.
[3] 李 丰，吴一迪，王芸庆，等. 丁酸钠诱导的大肠癌细胞成熟分化中的表型变化[J]. 中国医科大学学报，2000，29(6)：404－407.
[4] Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, *et al*. Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Cancer, 1998, 76(6): 897－902.
[5] Rosato R R, Wang Z, Gopalkrishnan R V, *et al*. Evidence of a functional role for the cyclin-dependent kinase-inhibitor p21WAF1/CIP1/MDA6 in promoting differentiation and preventing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by sodium butyrate in human myelomonocytic leukemia cells (U937)[J]. Int J Oncol, 2001, 19(1): 181－191.
[6] 卞修武，史景泉，柳凤轩. 243 例胶质瘤免疫组织化学和超微结构的研究与预后探讨[J]. 中华病理学杂志，1992，21(3)：171－173.
[7] Sowa Y, Sakai T. Butyrate as a model for "gene-regulating chemoprevention and chemotherapy"[J]. Biofactors, 2000, 12(1-4): 283－287.
[8] Engelhard H H, Duncan H A, 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): 616－624.
[9] Ito N, Sawa H, Nagane M, *et al*. Inhibitory effects of sodium butyrate on proliferation and invasiveness of human glioma cells[J]. Neurosurgery, 2001, 49(2): 430－436.

(编辑 薛国文)

(上接 992 页)

口，烧灼至造口穿透囊壁为至。造口孔直径约 0.5～0.8 cm 圆孔(根据囊腺的大小选择造口孔大小)，5 cm 以下的囊肿，造口直径可在 0.5 cm 左右；5 cm 以上囊肿，造口直径可在 0.8 cm 左右。造口孔边缘用激光烧为焦状，使组织凝固、不易粘连或出血，然后放出囊腔内积液，将囊腔液挤净，用碘伏溶液冲洗囊腔，不需放引流条，让造口孔开放，以便引流通畅。术后保持会阴清洁，每日清洁、消毒外阴和造口处，必要时给予抗生素预防感染。

2 结果

38 例造口引流术顺利，手术时间只需 1～2 min，术后立即肿胀消失，疼痛减轻或消失。术后 1 周随访，38 例均无粘连，无缩小，引流通畅，36 例局部红肿痛在 3 d 内完全消失，1 例因局部感染严重经治疗 7 d 痊愈，1 例术后 2 h 出血经缝合治疗后 7 d 痊愈。半年来无 1 例复发。

3 讨论

激光造口引流术治疗前庭大腺囊肿，是目前开展的新技术之一。与传统的手术治疗相比囊肿切开引流和造口术两种方法只能暂解除临床症状，不能达到根治目的[1]。前庭大腺囊(脓)肿摘除术，能达到根治目的，但需住院或手术治疗、缝线、更换引流条、拆线、费用高、手术时间长、病员痛苦。激光造口与传统的手术治疗方法简单易行，短时间内激光机输出功率密度高，可以极快地使囊肿表面组织气化、凝固形成造口，并对周围组织损伤小，手术时间只需 1～2 min，出血少，愈合快，无副作用，费用低，易接受，术后不需特殊处理，休息 5～10 min 可离院。是目前最新，最理想的治疗方法。

注意事项：激光刀头不准直对人体器官及组织，以免引起正常组织烧伤。

关键词：前庭大腺；激光；造口引流
中图法分类号：R711.340.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 董 悦，赵瑞琳. 现代妇产科治疗手册[M]. 第2版. 北京：北京医科大学出版社，2001.426－427.

(编辑 栾 嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net