DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.01.002

丁酸对人肺癌细胞的生长、细胞周期和形态的影响

余立清 仇玉福（第三军医大学训练部 病理教研室） 630038

提 要 运用鉴别细胞群体生物学特性的常规方法和流式细胞光度术（FCM），我们研究了正丁酸对人肺癌细胞（PLA-801D）的某些生物学作用。当培养液中含2或3 mmol/L丁酸时，细胞分裂和增生受到明显抑制，群体倍增时间几乎延长1倍，细胞周期行进受阻，大多数细胞阻断在G1期，平皿集落形成率从23.9%降为1.9%，饱和密度从237.4万/ml降至48.8万/ml，细胞群体提前3 d进入饱和状态。与此同时，细胞变扁平，几乎丧失叠堆生长能力，表面膜活动减弱，核形趋于规则，染色质颗粒分散变稀疏，细胞间粘着连接明显增多。以上发现提示丁酸可使PLA-801D肺癌细胞获得一些相对正常的生长特性和表型，显示丁酸对该细胞有一定程度的分化诱导作用和潜在的抗癌作用。

关键词 丁酸；人肺癌细胞；细胞生长；细胞周期；细胞形态

丁酸是1种短链脂肪酸，对培养的哺乳类细胞有广泛的生物学作用。低浓度丁酸就能可逆性地抑制许多肿瘤细胞的生长和DNA合成，阻断细胞周期行进，调节肿瘤细胞表型和某些基因的表达[1]。丁酸也可作为分化诱导因子诱导Friend红白血病细胞等癌细胞分化，增强X射线和一些抗肿瘤药物的体外抗肿瘤作用[2]，体内应用可缓解儿童急性白血病[3]。丁酸的上述生物学效应使人们认为它可能是一种潜在的抗癌剂。由于不同种类细胞对丁酸的反应有差异，本文选用国内新建人肺癌细胞株，对其在丁酸作用下某些生长特性、细胞周期和形态的改变作了初步观察，以探讨丁酸对该株细胞的分化诱导作用和抗增殖作用。

1 材 料 与 方 法

1.1 细胞和细胞培养

PLA-801D细胞是人肺巨细胞癌PLA-801细胞系的1个克隆株[4]，培养于含10%新生牛血清和双抗的RPMI-1640培养液中。第17～33代的细胞作研究用。

1.2 丁酸处理和实验分组

正丁酸溶于双蒸水，用浓NaOH中和至pH7.2，配成1mol/L浓度的贮存液，高压蒸气灭菌后存于－20℃冰箱，使用时按所需终浓度用培养液稀释。除生长曲线外，下述各组实验都分2组，实验组细胞接种时或接种1d后用2或3 mmol/L丁酸处理，对照组细胞除不用丁酸处理外，培养条件与实验组完全相同。

1.3 细胞增殖能力判定

参照细胞培养的常规方法[5]，对各实验组和对照组细胞的生长曲线、分裂指数和平皿集落形成率进行对比分析，从生长曲线求出细胞群体倍增时间、饱和密度和达到饱和的时间及最大增殖倍数。

1.4 DNA相对含量和细胞群体在各周期时相中分布比例的FCM分析

取3 mmol/L丁酸作用3 d的细胞和相应对照组细胞及正常人淋巴细胞，无水乙醇固定，RNA酶和1% Triton X-100处理后，碘化丙锭染色，180目尼龙网过虑，在美国COULTER EPICS^{R}C型流式细胞仪上进行细胞光度术分析，激发波长为488nm，荧光检测波长为610nm，每组各测5万个细胞，在EASY 88计算机上进行多正态总体拟合分析，得出DNA相对含量和细胞群体在各周期时相中的分布比例。

1.5 形态学观察

每天常规在倒置显微镜下观察各组培养细胞的生长情况和形态变化并照相记录。取各组细胞离心成团，常规电镜制样、透射电镜观察。取培养在盖玻片上的各组细胞，经3%戊二醛和0.1%锇酸固定、乙醇脱水、

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

醋酸异戊酯置换、临界点干燥，真空镀膜后，在JSM-T300扫描电镜上观察细胞表面结构。

2 结　果

2.1 丁酸对细胞生长的影响

在丁酸作用下，PLA-801D细胞生长受到明显抑制。抑制作用随丁酸浓度增加而加强，具有剂量相关性，1mmol/L～6mmol/L丁酸使细胞几乎处于停止增殖状态。撤去丁酸后，细胞增殖逐渐恢复，呈现可逆性（图1）。在2 mmol/L 丁酸作用下，PLA-801D细胞指数生长期平均群体倍增时间延长，最大增殖倍数和饱和密度降低，细胞群体达到饱和的时间缩短（表1）。

丁酸明显地抑制细胞分裂（图2）。接种时开始用3 mmol/L丁酸处理，接种后第1天核分裂象即减少，至第4天降为5.5‰。对照组细胞分裂旺盛，接种后第2天核分裂象最多，分裂指数为52.2‰，然后缓慢下降，至第4天仍为44.8‰。

表1　丁酸对PLA-801D细胞某些生长特性的影响

Tab. 1　Effect of butyrate on several growth properties of PLA-801D cells

	DT(h)	MPT	SD ($\times10^4$/ml)	The day to SD
2 mmol/L butyrate	42.5	7.04	48.8	Fourth
Control	27.0	32.09	237.4	Seventh

DT: Doubling time; MPT: Maximum time of proliferation

SD: Saturation densities

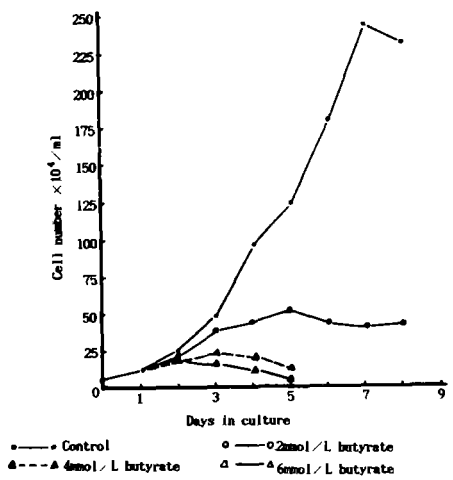


图1　细胞生长曲线

Fig. 1　Cell growth curve

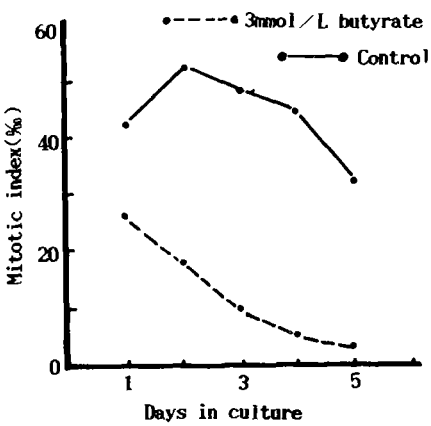


图2　细胞分裂指数

Fig. 2　Cell mitotic index

接种次日开始用3 mmol/L丁酸处理PLA-801D细胞，第7天时平皿集落形成率（PE）仅为1.9%，而此时对照组PE为23.9%，且细胞集落普遍比实验组大，单个集落中的细胞数多。

2.2 丁酸对DNA合成和细胞周期的影响

FCM显示：从接种时开始用3 mmol/L丁酸处理PLA-801D细胞3 d后，DNA荧光分布呈双峰型，期S峰细胞减少形成峰谷，表明DNA合成受抑制。对照组细胞DNA荧光呈广泛分布型，S期峰谷不明显（图3），从多正态总体的计算机拟合分析结果（表2）可知，丁酸主要使细胞阻滞于G1期，用效正残差进行

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

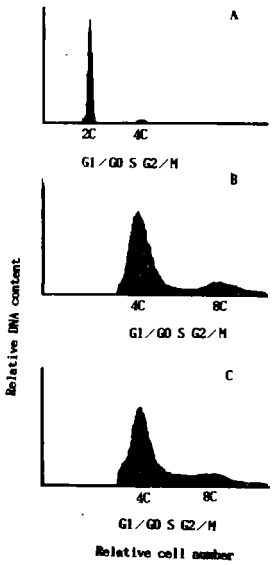


图3 PLA-801D细胞DNA含量和分布及丁酸对它们的影响(FCM)

Fig. 3 DNA Content and distribution (FCM)
A. Human lymphocyte;
B. 3 mmol/L butyrate
C. Control group

统计分析，$P<0.0001$，说明各组细胞相同周期细胞数有非常显著差异。用正常人淋巴细胞DNA荧光强度作对照，发现PLA-801D细胞为近四倍体细胞，丁酸短期作用对该细胞倍体主流没有产生显著影响（图3、表2）。

2.3 丁酸对细胞形态的影响

倒置显微镜下见PLA-801D细胞有明显的肿瘤细胞表型特征：细胞近似圆形，胞浆铺展差，叠堆生长明显（图4A）。2或3 mmol/L丁酸作用1天后细胞形态即出现明显变化。细胞先伸出胞浆长突，长突及胞体渐趋扁平，在培养底物上铺展面积大。细胞相互间的叠堆生长很少见，排列较有规律(图4B)。

扫描电镜观察发现PLA-801D细胞表面大多不平整，膜活动性高，可见较多分布不均的粗长微绒毛、小泡状突起和皱褶，有较多丝状伪足（图5A）。丁酸作用2 d后见许多细胞变扁平，表面较平整，微绒毛变细呈倒伏状，有的细胞微绒毛明显减少，仅散见极短的棒状微绒毛，泡状突起和皱褶均少见（图5B）。

透射电镜观察发现PLA-801D细胞核形极不规整，深切迹和核内假包涵体常见，核膜内缘异染色质颗粒较多，核仁数目、大小和形态变化大，常边移（图6A）。胞浆中游离核糖体丰富，可见成排的粗面内质网，细胞连接发育差，仅见少数粘着连接。经2 mmol/L丁酸作用4 d后，细胞核形趋于规整，深

表2 丁酸对PLA-801D细胞细胞周期行进的影响

Tab 2 Effect of butyrate on cell cycle progression of PLA-801D cells

	CN of various parts of the cycle (%)			RDC (C)	
	G1/G0	S	G2/M	Peak 1	Peak 2
Lymphocyte	85.86	8.11	6.04	56.00	—
3 mmol/L butyrate	75.65	12.29	12.05	111.98	198.88
Control	66.94	17.79	15.25	112.48	194.21

CN: Cell number; RDC: Relative DNA content

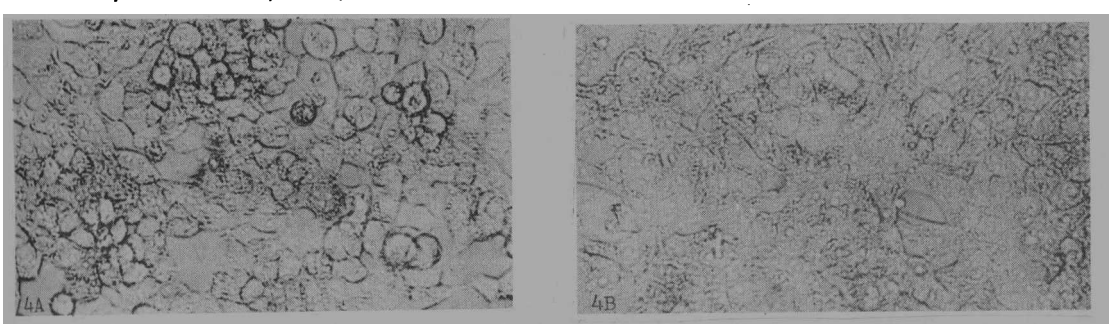


图4A、4B 相差显微镜见未经丁酸处理的细胞多近似圆球形、铺展差，叠堆生长明显(4A)，×890。经3 mmol/L丁酸作用3 d后，细胞变扁平、充分铺展、单层生长(4B)，×890

Fig. 4A, 4B. Phase-contrast micrographs of PLA-801D cell culture before(A) and after(B) exposure to 3 mmol/L butyrate for 3 days. ×890. A) Most of PLA-801D cells are round and poor-extended, and grow in multilayers with overlapping. B) Cells become flat and well-extended, and grow in a monolayer without overlapping.

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

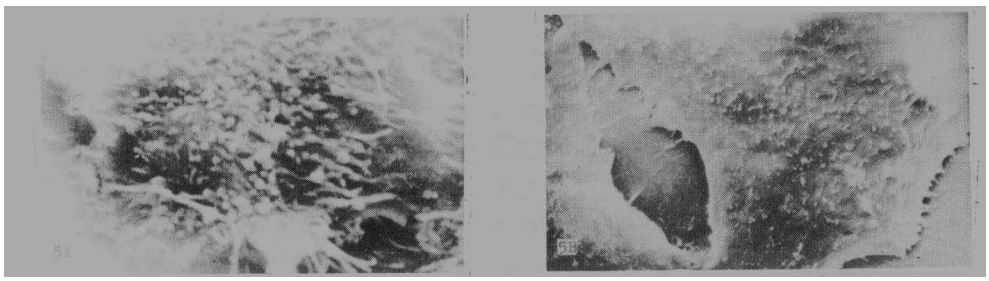


图5A、5B 未处理的细胞(5A)和经3mmol/L丁酸处理2 d的细胞(5B)，SEM ×10 000
5A)：细胞表面可见分布不均的微绒毛和小泡状突起。5B)：细胞表面平整、散见短棒状微绒毛，泡状突起少见。

Fig.5A,5B SEM (×10 000) of untreated PLA-801D cell (A) and PLA-801D cell exposed to 3mmol/L butyrate for 2days(B). A) Note dorsal vesicular processes and microvilli. B) Note smooth cell surface. The flat and thin lamellar structure of cytoplasm reveals the elaborate cytoskeletal elements.

切迹和核内假包涵体少见，核膜内缘异染色质颗粒明显减少，染色质变得细而分散（图6B）。许多细胞浆中质脂贮积、游离核糖体明显减少（图6C）。细胞连接明显增多，可见较多的粘着连接（图6D）。

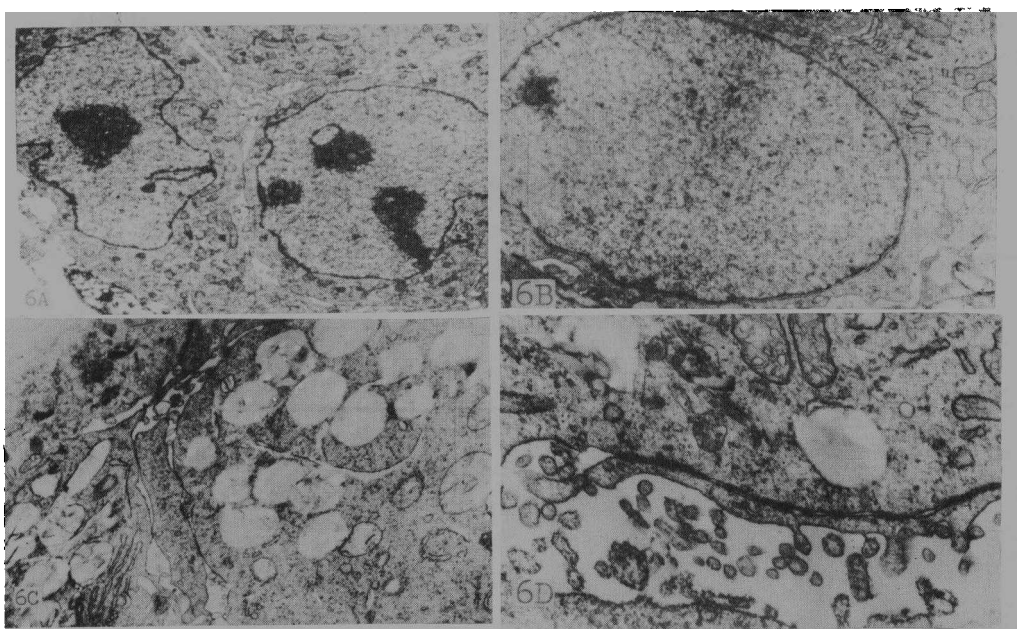


图6A—6D 未经丁酸处理的细胞（A）和经2 mmol/L丁酸作用4 d的细胞（B,C,D）。A）细胞核形不规则，可见假包涵体，染色质颗粒较粗，异染色质明显。可见数目不等、形态不规则的核仁，×4 500。B)核形规则、染色质结构细且分散，×4 500。C)胞浆脂滴增多，×14 000。D)细胞间形成许多粘着连接，×14 000

Fig.6A-6D TEM of untreated PLA-801D cells(A) and PLA-801D cells exposed to 2mmol/L butyrate for 4days(B,C,D). A)Note irregular nuclear shape and pseudoinclusion. The coarseness of chromatin material characterized by condensed clumps of heterochromatin is evident in the nucleus. Nucleoli are apparent. ×4 500.B) Note regular nuclear shape. The fine texture of well-dispersed chromatin structure is evident in the nucleus. ×4500.C) Note increasing cytoplasmic lipid droplets. ×14 000.D) Note formation of adherens junctions(AJ)between closely apposed plasma membranes of neighboring cells. ×14 000

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

3 讨　论

丁酸可逆性地抑制PLA-801D细胞生长，其程度有剂量依赖性，与许多作者在研究其它细胞系时的结果一致[1][2]，表明丁酸的细胞生长抑制作用具有普遍性。一般认为，缺乏密度依赖性抑制，呈现无限制性生长和增殖，平皿集落形成率高是恶性肿瘤细胞的生长特性。丁酸使PLA-801D细胞饱和密度、分裂指数、最大增殖倍数和PE降低，群体倍增时间延长，细胞群体提前进入饱和状态，总的效应是使该细胞获得了相对正常的生长特性，显示了丁酸一定程度的细胞分化诱导作用及用于肿瘤防治的可能性。因此，我们认为丁酸可能一方面通过某种机制抑制PLA-801D细胞增殖，从而使该细胞呈现分化特征；另方面通过其它机制诱导细胞分化，从而使细胞增殖能力降低。

FCM分析发现丁酸使PLA-801D细胞DNA合成受抑制，细胞阻滞于G1期。Darzynkiewicz等[6]用多参数FCM分析亦发现丁酸钠可阻断L1210细胞在G1A处。薛绍白和Rao[7]用早熟染色体凝集法(PCC)还证明5mmol/L丁酸钠使Hela细胞阻断在早G1期。因此，丁酸是细胞周期行进的阻断剂，它可能对周期特异性抗癌药物有辅助作用。

致瘤性细胞在平坦基质上的铺展总是有缺陷的，恶性转化的上皮细胞丧失形成紧密结合的上皮薄层的能力，常形成“堆积的集落”，在细胞的上表面有许多不规则的微绒毛和其它伸展物[8][9][10]。丁酸作用下的PLA-801D细胞变扁平，在生长底物上充分铺展，细胞成单层生长，上表面平整，膜活动减弱，说明在一定程度上呈现了良性表型。我们认为丁酸作用下PLA-801D细胞间粘着连接的明显增多可能对良性表型的呈现起重要作用。

丁酸作用后，PLA-801D细胞核中异染色质减少，染色质颗粒变得细而分散，胞浆游离核糖体减少，脂滴增多，与其它作者报道相符[1][11][12]，表明丁酸明显地调节细胞的代谢方式。

总之，丁酸使PLA-801D细胞获得了一些相对正常的生长特性和表型，似乎使该细胞恢复了细胞形状和生长控制之间的关联性，而这种关联性的恢复可能与细胞转化特征的逆转有关[9]。因此，丁酸是研究恶性肿瘤细胞生长、分化和表型逆转机理的良好药物调节因子，其本身可能有潜在的抗癌作用。

参 考 文 献

1. Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. Mol Cell Biochem 1982;42:65～82
2. Prasad KN. Butyric acid:a small fatty acid with diverse biological functions. Life Sci 1980;27:1351～1358
3. Novogrodsky A,Dvir A,Ravid A, et al. Effect of polar organic compounds on leukemic cells:Butyrate-induced partial remission of acute myelogenous leukemia in child. Cancer 1983;51:9～14
4. 陆应麟　黄靖香　李向红，等。人肺巨细胞癌PLA-801母系细胞系及其克隆化细胞株（A、C、D、E）裸鼠皮下种植后自发转移特性的研究。中华肿瘤杂志　1989；11:3～7
5. Jakoby WB and Pastan IH. Methods in Enzymology. Vol LVIII, Cell Culture. Academic Press Inc 1979:150
6. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Xue SB, et al. Effect of n-butyrate on cell cycle progression and in situ chromatin structure of L1210 cells. Exp Cell Res 1981;136:279～293
7. Xue SB and Rao PN. Sodium butyrate blocks Hela cells preferentially in early G1 phase of the cell cycle. J Cell Sci 1981;51:163～171
8. 潘玉芝　张荣兴　张容华。丁酸对体外培养的人鼻咽癌上皮细胞的影响。实验生物学报　1985；

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

18:317～322
9. Ben-Ze'ev A. The cytoskeleton in cancer cells. Biochem Biophys Acta 1985;780:197～212
10. 何申 刘裕 苏树芸，等译。培养中的肿瘤与正常细胞。北京：人民卫生出版社 1985:116～138
11. Ko LW and Koestner A. Morphologic and morphometric analyses of butyrate-induced alterations of rat glioma cells in vitro. J Natl Cancer Inst 1980;65:1017～1027
12. Nordenberg J, Wasserman L, Peled A, et al. Biochemical and ultrastructural alterations accompany the anti-proliferative effect of butyrate on melanoma cells. Br J Cancer 1987;55:493～497

（收稿：1990.02.09，修回：1990.12.22）

Effects of Butyric acid on the Growth, Cell Cycle, and Morphology of Human Lung Cancer Cells

Yu Liqing and Qiu Yufu (Department of Pathology, Third Military Medical College, Chongqing 630038)

Abstract The effects of butyric acid on cloned human lung cancer cells (PLA-801D) were observed with flow cytometry (FCM) and the conventional methods to identify the biological characteristics of cell lines. Butyric acid (2 or 3 mmol/L)treatment could result in an inhibition of the cell division and the growth rate of the cells,the blocking of the cell cycle progression in the G1 phase,a prolongation in doubling time, a shortening in saturation time, a decrease of saturation densities,and a reduction of plating efficiency. At the same time,there were some normal phenotypes of the cells such as flattening, tendency to grow in a monolayer,weakening of surface membrane activities, regularization of nuclei, and increasing of intercellular junctions.

These findings suggest that after the treatment of butyric acid, the cancer cells (PLA-801D) appeared to acquire relatively normal growth properties and phenotypes. Thus, butyric acid, to a certain extent, can induce differentiation of PLA-801D cells, and be a potential anticancer agent.

Key words butyric acid; human lung cancer cell; cell growth; cell cycle; cell morphology

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