

正丁酸钠对涎腺腺样囊性癌细胞株 ACC-M侵袭、迁移的影响及机制研究

刘昕¹, 吴娟娟^{1,2}, 李萍¹, 王越¹, 李亦婕¹, 王雨¹, 魏丹¹, 宋琦¹

1. 遵义医学院口腔组织病理学教研室, 贵州 遵义 563000 ;
2. 贵阳市口腔医院预防科, 贵州 贵阳 550002

[摘要] 背景与目的: 有研究证实, 正丁酸钠(sodium butyrate, NaB)对肿瘤细胞具有抑制增殖、诱导分化和促凋亡的作用, 但对涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)的作用机制尚不明确。该研究主要探讨不同浓度NaB对SACC细胞株ACC-M侵袭、迁移的影响及其作用机制。方法: MTT法探索NaB作用ACC-M细胞的最佳浓度并观察细胞的生长情况, Transwell小室实验检测NaB对ACC-M细胞侵袭、迁移能力的影响, 实时荧光定量PCR(real-time PCR, RT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)分别检测5组浓度药物作用后ACC-M细胞中高迁移率蛋白-1(high mobility group box-1, HMGB1)、toll样受体-4(toll like receptor-4, TLR4) mRNA和蛋白的表达。结果: 与对照组相比, 加入NaB 0.625、1.25、2.5、5及10 mmol/L的5组均能抑制ACC-M细胞增殖且呈明显浓度依赖性($P<0.05$)。5组浓度NaB均可抑制ACC-M细胞体外侵袭和迁移能力($P<0.05$), 同时能降低ACC-M细胞HMGB1、TLR4 mRNA及蛋白的表达($P<0.05$); 相关性分析显示TLR4蛋白表达的降低与HMGB1的抑制呈正相关($r=0.810$, $P<0.05$)。结论: NaB可抑制ACC-M细胞增殖, 显著降低ACC-M细胞的侵袭和迁移能力, 同时降低HMGB1、TLR4 mRNA和蛋白的表达, 且2者表达量呈明显正相关, 提示NaB可能是通过下调HMGB1、TLR4 mRNA和蛋白的表达来实现对ACC-M细胞侵袭、迁移能力的抑制。

[关键词] 涎腺腺样囊性癌; 正丁酸钠; 高迁移率蛋白-1; Toll样受体-4; 侵袭; 迁移

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.04.007

中图分类号: R73-37 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)04-0281-06

The effect and mechanism of sodium butyrate on the invasion and migration in human salivary adenoid cystic carcinoma cell line ACC-M LIU Xin¹, WU Juanjuan^{1,2}, LI Ping¹, WANG Yue¹, LI Yijie¹, WANG Yu¹, WEI Dan¹, SONG Qi¹ (1.Department of Oral Histopathology, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563000, China; 2.Prevention Section, Guiyang Stomatological Hospital, Guiyang Guizhou 550002, China)

Correspondence to: Li ping E-mail: 391613734@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** Researches demonstrated that the butyric acid sodium salt (sodium butyrate, NaB) has effect on the inhibition of tumor cell proliferation, differentiation and apoptosis-promoting, while the mechanism on salivary adenoid cystic carcinoma(SACC) is still uncertain. This study mainly probed into the impact of different concentration of sodium butyrate on the migration and invasion of SACC cell line ACC-M, and its mechanism of action. **Methods:** MTT assay explored the optimal concentration of sodium butyrate on the cell ACC-M and the observation of cell growth. Transwell assay was used to detect the effects of sodium butyrate on the ACC-M cells on the aspect of invasion and migration ability. Fluorescence real-time quantitative PCR (RT-PCR) and Western blot were used to test respectively the expression of HMGB1, TLR4 mRNA and protein in ACC-M after functioned by 5 group drugs with different concentrations. **Results:** Compared with the control group, on the one hand, the concentration 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 mmol/L of sodium butyrate could effectively inhibit cell proliferation and apparently showing concentration-dependence ($P<0.05$); On the other hand, 5 sets concentration of sodium butyrate could also effectively inhibit invasion and migration ability of ACC-M cells *in vitro* ($P<0.05$), as well as reducing the expression of HMGB1, TLR4 mRNA and protein in ACC-M cells ($P<0.05$). Furthermore related analysis showed that the decline of TLR4 protein expression was positively correlated with inhibition of HMGB1 ($r=0.810$, $P<0.05$). **Conclusion:** Sodium butyrate has

an effect on inhibiting ACC-M cell proliferation, significantly reducing ACC-M cell invasion and migration capabilities, and reducing expression of HMGB1, TLR4 mRNA and protein, and both expression amount are positively correlated, Meanwhile the positively correlation suggests that sodium butyrate probably achieve the inhibition ability by lowering the expression of HMGB1, TLR4 mRNA and protein in ACC-M cell.

[**Key words**] Salivary adenoid cystic carcinoma; Sodium butyrate; High mobility group box-1; Toll like receptor-4; Invasion; Migration

涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)是一种最常见的涎腺恶性上皮源性肿瘤,它具有生长缓慢、嗜神经侵袭性强、易发生远处转移等特点,其中肺是其常见的远处转移部位^[1]。正丁酸钠(sodium butyrate, NaB)是一种研究较多的组蛋白脱乙酰酶抑制剂,它通过抑制结肠癌、胃癌等癌细胞株的增殖并诱导其凋亡从而显著地抑制其生长^[2],而对ACC-M细胞的作用却少见报道。本研究通过体外实验探索NaB对ACC-M细胞侵袭、转移的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

ACC-M细胞株购自中国典型培养物保藏中心,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物科技股份有限公司,NaB购自美国Sigma公司,MTT购自北京索莱宝科技公司,PVDF膜购自美国Millipore公司,高迁移率蛋白-1(high mobility group box-1, HMGB1)多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,toll样受体-4(toll like receptor-4, TLR4)多克隆抗体购自美国Bioworld公司,800CW荧光二抗购自中国基因有限公司,蛋白电泳系统、电转移系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养

ACC-M细胞常规复苏, MEM完全培养基(含1%双抗、1%谷氨酰胺、10%胎牛血清)、37℃、CO₂体积分数为5%、100%湿度条件下温育24 h,传代培养。

1.3 MTT法对实验组药物浓度的筛选

取对数期细胞接种于96孔板,细胞密度 5×10^3 个/孔,100 μL/孔、置于37℃、CO₂体积分

数为5%条件下培养。选取NaB浓度>0 mmol/L、≤20 mmol/L之间的15个浓度作用于ACC-M细胞24 h,每组试验选择5个药物浓度(对照组0 mmol/L),100 μL/孔、37℃、CO₂体积分数为5%条件下温育20 h。避光加入0.5% MTT液20 μL,培养4 h,每孔加150 μL DMSO,酶标仪于490 nm检测各孔的(D)值。按以下公式计算:细胞存活率=($D_{\text{实验组}} - D_{\text{调零组}}$)/($D_{\text{对照组}} - D_{\text{调零组}}$)×100%,并绘制剂量-效应曲线。每组实验重复3次。

1.4 Transwell小室的侵袭和迁移实验

按说明书配胶、铺胶,1×10⁵/孔细胞悬液接种于上室,对照组不做干预,实验组分别加入100 μL浓度为0.625、1.25、2.5、5及10 mmol/L的NaB。下室加含20%胎牛血清的培养基、37℃、CO₂体积分数为5%条件下培养24 h。取出小室,淋洗、晾干、固定、染色、切下Transwell膜、中性树胶封片。随机选出10个视野在显微镜下观察、拍照、计数、取平均值,每组实验重复3次。在细胞迁移实验中除了Transwell小室不铺胶,细胞悬液为1×10⁴/孔外,其余方法同侵袭实验。

1.5 蛋白质印迹法(Western blot)测定HMGB1、TLR4蛋白的表达

取对数期细胞待贴壁后随机分为对照组和实验组,对照组不做干预,实验组细胞用浓度为0.625、1.25、2.5、5及10 mmol/L的NaB处理、37℃、CO₂体积分数为5%条件下培养24 h,提取蛋白、电泳, HMGB1蛋白使用12%分离胶,TLR4使用8%分离胶,转膜,5%脱脂奶粉,封闭1 h,分别用HMGB1多克隆抗体(1:500)、TLR4多克隆抗体(1:500)与800 CW荧光二抗(1:10 000)温育2 h。ODYSSEY扫描蛋白条带,读取灰度值,收集蛋白印记图。每组

实验重复3次。

1.6 实时荧光定量PCR(real-time PCR, RT-PCR)测定HMGB1、TLR4 mRNA含量

30 μL DEPC水溶解提取的RNA沉淀。光谱图和 D_{260}/D_{280} 判定RNA的提取质量,将每组的RNA浓度用DEPC水稀释为200 ng/ μL ,反转录合成cDNA。RT-PCR检测HMGB1及TLR4的表达,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s、40个循环,55 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s、81个循环。引物如下:HMGB1上游引物5'-AGGATCCCAATGCACCCAAG-3',下游引物5'-CGCAACATCACCAATGGACA-3';TLR4上游引物5'-TGAGCAGTCGTGCTGGTATC-3',下游引物5'-CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC-3'; β -action为内对照,上游引物5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3',下游引物5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物,于GelDoc XR凝胶成像系统上观察。

1.7 统计学处理

实验结果采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并进行 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。两种蛋白之间的关系采用线性相关分析。

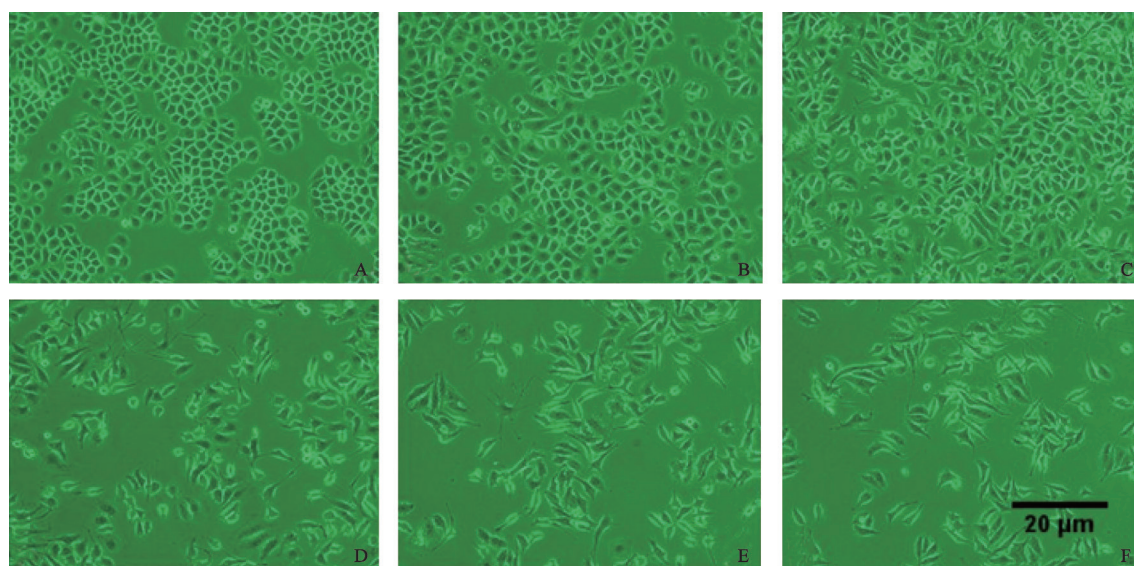
2 结果

2.1 细胞观察

ACC-M细胞株为扁平的多边形,边界清楚,体积较大,细胞质丰富,细胞核为圆形,位于细胞中央,核分裂象较多见,细胞贴壁生长、紧密相靠、互相衔接,生长活跃时密度较大,可呈重叠式生长,细胞被压缩变小。与对照组相比,随着NaB浓度升高,细胞密度降低,间隙变大,逐渐成为梭形细胞,并伸出较长的“突起”,细胞折光率降低,细胞核固缩,细胞脱壁,漂浮在培养基中(图1)。

2.2 MTT法对实验组药物浓度的筛选

与对照组相比,当NaB浓度在0.625、1.25、2.5、5及10 mmol/L时,这5个浓度对ACC-M细胞增殖均有抑制作用($P<0.05$),且随着药物浓度的升高,细胞存活率逐渐降低,作用呈明显浓度依赖性(图2)。当NaB浓度为0.15、0.3、0.6、1.2及2.4 mmol/L时,前3个浓度组对ACC-M细胞的增殖无抑制作用($P>0.05$)。当药物浓度在1、2、4、8及16 mmol/L时,虽然5个浓度均对细胞增殖有抑制作用($P<0.05$),但当其为16 mmol/L时达到平台期。



($\times 100$)

图1 光学显微镜下观察ACC-M细胞形态改变

Fig. 1 Morphology change of ACC-M cells under light microscope

A: Control group; B: 0.625 mmol/L group; C: 1.25 mmol/L group; D: 2.5 mmol/L group; E: 5 mmol/L group; F: 10 mmol/L group.

2.3 Transwell小室实验对细胞侵袭和迁移能力的测定结果

与对照组相比,浓度为0.625、1.25、2.5、5及10 mmol/L的NaB均可抑制ACC-M细胞的侵袭能力和迁移能力,且随着浓度的增加,穿过的细胞数减少,差异具有统计学意义($P<0.05$,图3,表1、2)。

2.4 Western blot测定HMGB1、TLR4蛋白表达

结果显示ACC-M细胞实验组与对照组均有HMGB1和TLR4蛋白的表达。与对照组相比,0.625、1.25、2.5、5及10 mmol/L浓度的NaB可

使ACC-M细胞内HMGB1和TLR4蛋白表达逐渐降低($P<0.05$)。将ACC-M细胞各组的HMGB1与TLR4蛋白表达作相关分析,TLR4蛋白表达与HMGB1蛋白表达呈正相关($r=0.810$, $P<0.05$,图4)。

2.5 RT-PCR测定HMGB1、TLR4 mRNA含量

2.5.1 HMGB1与TLR4 mRNA的相对表达量

与对照组相比,0.625、1.25、2.5、5及10 mmol/L浓度的NaB可使ACC-M细胞内HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA相对表达量降低($P<0.05$),且随着药物浓度升高,表达量呈逐渐下降趋势(表3)。

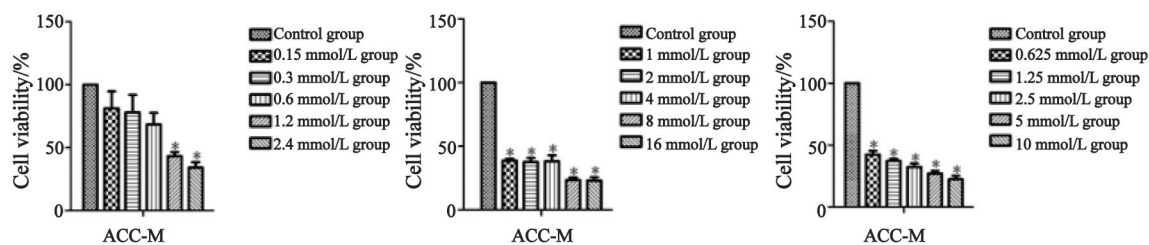
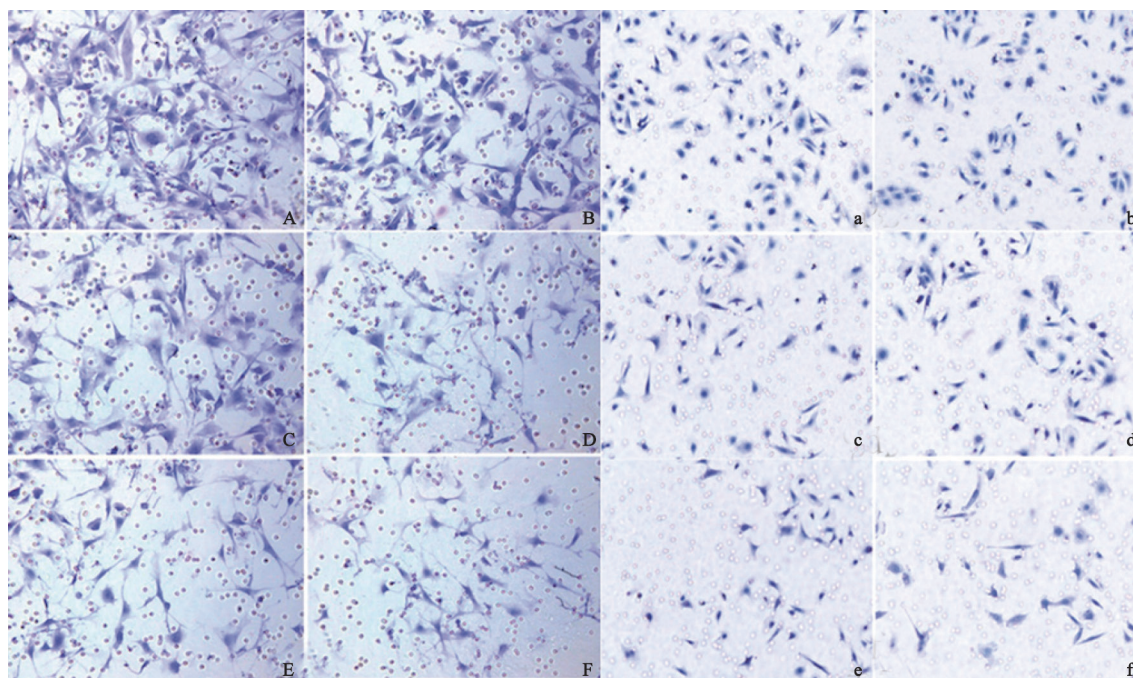


图2 不同浓度NaB对ACC-M细胞增殖的影响

Fig. 2 Proliferation effect of different NaB concentration on ACC-M cells

*: $P<0.05$, compared with the control group.



(HE, $\times 100$)

图3 不同浓度NaB对ACC-M细胞侵袭、迁移的影响

Fig. 3 Invasion and migration effect of different NaB concentration on ACC-M

A/a: Control group; B/b: 0.625 mmol/L group; C/c: 1.25 mmol/L group; D/d: 2.5 mmol/L group; E/e: 5 mmol/L group; F/f: 10 mmol/L group.

表 1 Transwell检测各组细胞侵袭数
Tab. 1 Invasion cell counts of each group by Transwell experiment

Group	n	ACC-M
Control	6	128.06±15.48
NaB 0.625 mmol/L	6	81.10±16.15*
NaB 1.25 mmol/L	6	61.97±11.11*
NaB 2.50 mmol/L	6	45.73±7.05*
NaB 5 mmol/L	6	29.97±7.01*
NaB 10 mmol/L	6	23.20±6.98*

*: P<0.05, compared with the control group.

表 2 Transwell检测各组细胞迁移数
Tab. 2 Migration cell counts of each group by Transwell experiment

Group	n	ACC-M
Control	6	130.07±21.83
NaB 0.625 mmol/L	6	83.32±15.86*
NaB 1.25 mmol/L	6	76.77±20.57*
NaB 2.50 mmol/L	6	75.02±18.30*
NaB 5 mmol/L	6	57.86±12.31*
NaB 10 mmol/L	6	54.23±10.71*

*: P<0.05, compared with the control group.

表 3 RT-PCR检测各组HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA的相对表达量

Tab. 3 HMGB1 mRNA and TLR4 mRNA relative expression of each group by RT-PCR

Group	n	HMGB1 mRNA	TLR4 mRNA
Control	3	4.87±0.96	2.51±0.23
NaB 0.625 mmol/L	3	1.49±0.74*	1.25±0.08*
NaB 1.25 mmol/L	3	1.04±0.17*	1.06±0.08*
NaB 2.5 mmol/L	3	0.80±0.04*	0.64±0.23*
NaB 5 mmol/L	3	0.40±0.02*	0.39±0.02*
NaB 10 mmol/L	3	0.20±0.02*	0.24±0.09*

*: P<0.05, compared with the control group.

3 讨 论

NaB是一种天然存在于动物脂肪中的无毒四碳短链脂肪酸盐，作为一种去乙酰化酶抑制剂，它能够提高组蛋白乙酰化水平，进而抑制肿瘤细胞的增殖、促进肿瘤细胞的衰老和凋亡^[3]，如结肠癌、肺癌、乳腺癌^[4]及口腔鳞状细胞癌^[5]等均有此类报道，但是对于SACC细胞的报道却十分少见。本研究将NaB作用于

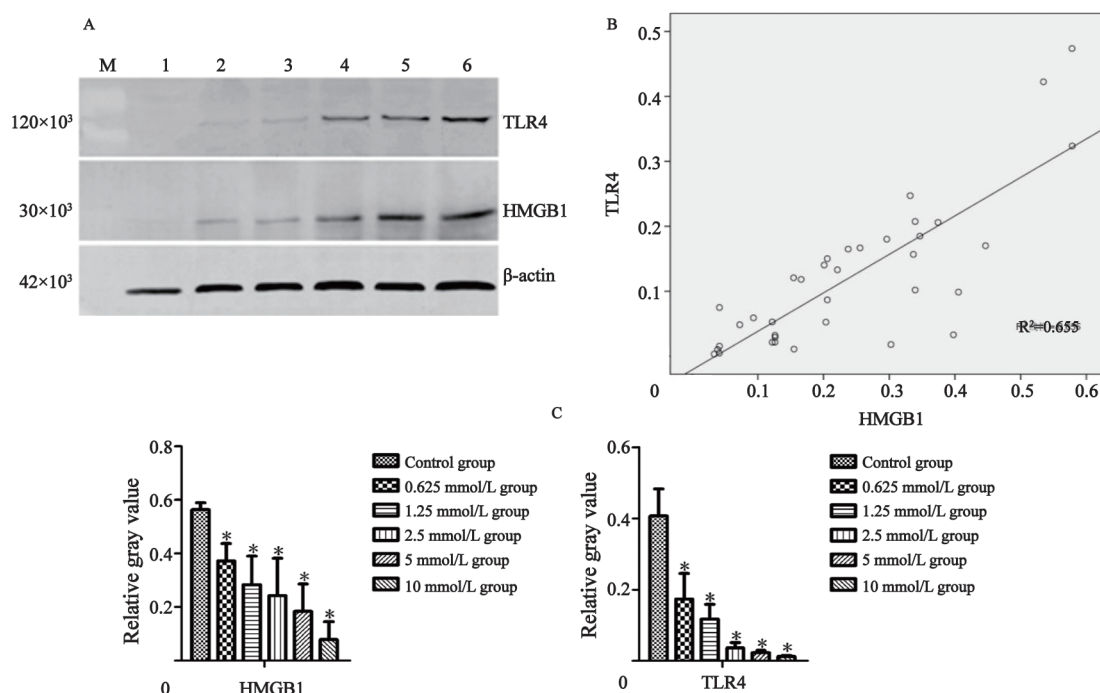


图 4 Western blot测定HMGB1、TLR4蛋白表达

Fig. 4 Expression of HMGB1, TLR4 protein ACC-M cells by Western blot

A: Expression of HMGB1, TLR4 protein, β -actin in ACC-M cells by Western blot (*: TLR4 HMGB1 β -actin; M: Marker; Lane1-6: ACC-M cells were treated NaB of 10 mmol/L group, 5 mmol/L group, 2.5 mmol/L group, 1.25 mmol/L group, 0.625 mmol/L group and ACC-M cells control group). B: Correlation analysis of HMGB1 and TLR4 protein (*: $r=0.810$, $P<0.05$). C: HMGB1 and TLR4 protein expression in ACC-M each group cells by Western blot(*: $P<0.05$, compared with the control group).

ACC-M细胞后观察细胞的生长抑制情况并用MTT法进行分析,结果显示当NaB浓度在0.6~16 mmol/L之间时,NaB可较明显地抑制ACC-M细胞增殖,因此选用0.625、1.25、2.5、5、10 mmol/L这5个浓度做随后的实验。

肿瘤的转移是一个复杂的过程,需要细胞具备强大的自由运动、破坏基底膜和细胞间基质的能力,超过40%的SACC患者发生远处转移,神经侵袭则被认为是术后复发的重要因素之一^[6],表明ACC-M具备较强的局部侵袭和迁移能力。Transwell小室实验常用于体外检测细胞迁移和侵袭能力。本研究结果显示,与对照组相比,0.625、1.25、2.5、5及10 mmol/L浓度的NaB均能抑制ACC-M细胞的侵袭能力($P<0.05$)和迁移能力($P<0.05$),且这种作用呈浓度依赖性,提示NaB对于恶性表型较高的ACC-M细胞侵袭和迁移能力的抑制作用都十分明显。

HMGB1是位于细胞核内的DNA结合蛋白,由炎症反应细胞或坏死细胞释放^[7],在许多癌细胞中已经发现HMGB1的超表达,如结肠癌,它的功能失调可以导致肿瘤的发生、发展^[8]。TLR4是众多模式识别受体(toll-like receptors, TLRs)家族成员中研究较深入的一种模式识别受体,当TLR4与其内源性配体HMGB1相结合后,通过一些细胞内信号转导,启动NF- κ B途径,促进各种炎症反应因子如IL-1、IL-2、IL-6和TNF- α 的释放,形成适合肿瘤生长的微环境,从而促进肿瘤的发生、发展^[9-10]。Mittal等^[10]建立的皮肤癌小鼠实验模型,证明HMGB1能够激活TLR4引起炎症反应细胞的聚集和致瘤因子的产生。NaB作为HMGB1的抑制剂,它可以下调其基因的表达,从而有效地减少HMGB1的产生和释放^[3]。本研究通过RT-PCR和Western blot检测结果显示,NaB可以在mRNA和蛋白水平下调HMGB1和TLR4的表达,具有浓度依赖性,提示NaB可以在ACC-M细胞中通过下调HMGB1和TLR4 mRNA和蛋白的表达,从而降低ACC-M细胞的侵袭和迁移能力。相关分析结果显示,ACC-M细胞各组的TLR4蛋白表

达与HMGB1蛋白的表达呈正相关($r=0.810$, $P<0.05$),说明两者关系较为密切,提示在ACC-M中TLR4是HMGB1的主要受体,参与HMGB1对ACC-M细胞的侵袭和迁移。

综上所述,NaB能够抑制ACC-M细胞的增殖活性,且通过抑制HMGB1与TLR4 mRNA与蛋白的表达,抑制ACC-M细胞侵袭、迁移能力。因此,可将NaB作为潜在的抗ACC药物,为其的治疗提供一个新方向。

[参 考 文 献]

- [1] GE X Y, YANG L Q, JIANG Y, et al. Reactive oxygen species and autophagy associated apoptosis and limitation of clonogenic survival induced by zoledronic acid in salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC-83 [J]. PLOS ONE, 2014, 9(6): e101207.
- [2] MU D, GAO Z, GUO H, et al. Sodium butyrate induces growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer DU145 cells by up regulation of the expression of annexin A1 [J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e74922.
- [3] 龚权, 陈茂剑, 王超, 等. 正丁酸钠通过抑制高迁移率族蛋白 B1的表达与释放减轻刀豆蛋白 A诱导的小鼠急性肝损伤 [J]. 生理学报, 2014, 66(5): 619-624.
- [4] SUN B, LIU R, XIAO Z D, et al. c-MET protects breast cancer cells from apoptosis induced by sodium butyrate [J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e30143.
- [5] 龚玲, 王文梅, 计艳, 等. 丁酸钠对人口腔鳞状细胞癌Tca8113细胞增殖及p27Kip1蛋白表达的影响 [J]. 中华口腔医学杂志, 2010, 45 (10): 619-622.
- [6] SHAO C, TAN M, BISHOP J A, et al. Suprabasin is hypomethylated and associated with metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma [J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e48582.
- [7] WENG H, DENG Y H, XIE Y Y, et al. Expression and significance of HMGB1, TLR4 and NF- κ B p65 in human epidermal tumors [J]. BMC Cancer, 2013, 13: 311.
- [8] ZHANG L, HAN J, WU H, et al. The association of HMGB1 expression with clinicopathological significance and prognosis in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and literature review [J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e110626.
- [9] DONG L, LI J, LIU Y, et al. Toll-like receptor 2 monoclonal antibody or and Toll-like receptor 4 monoclonal antibody increase counts of Lactobacilli and Bifidobacteria in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(1): 110-119.
- [10] MITTAL D, SACCHERI F, VÉNÉREAU E et al. TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells [J]. EMBO J, 2010, 29(13): 2242-2252.

(收稿日期: 2014-12-27 修回日期: 2015-03-10)