

丁酸钠引起人类食管癌细胞株 Eca-109 的“分化”

周启玲 邢国仁 郑德存 柳青梅 陈去恶

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

正丁酸是一种天然存在的短链脂肪酸, 其数毫克分子浓度的钠盐就能深刻影响某些培养中的肿瘤细胞。例如使小鼠神经母细胞瘤细胞 cAMP 含量升高^[1]; 使小鼠红白血病细胞停止生长^[2], 并使其发生分化而能合成血红蛋白^[2-3]; 使人类 Hela 子宫颈癌细胞 DNA 合成严重受抑^[4], 停止生长^[5], 碱性磷酸酶活性升高^[6], 糖鞘脂含量增多^[7], 细胞变成具有神经突样突起的异常形状^[5,7]。1982 年 Kruh 写了一篇综述^[8], 他指出丁酸钠可能代表一种研究基因活化机制以及细胞生长调控的优良药理学工具。

为探讨丁酸钠对食管癌治疗作用, 我们进行了实验: 1) 丁酸钠能否引起人类食管癌细胞株分化。2) 丁酸钠是否影响食管癌细胞的 DNA 重接修补能力。

一、材料与方 法

人类食管癌细胞株 Eca-109 得自中国科学院肿瘤医院研究所。丁酸钠(北京化工厂生产)用 1M NaOH 中和到 pH 7.0, 稀释到 0.5M 高压消毒, 贮于冰箱; 用时加到生长培养基(含小牛血清 20%) 中, 最终浓度为 5mM。细胞分化实验和 γ 射线照后 DNA 重接修补保温所用的生长培养基, 都用 10mM HEPES 代替普通的碳酸 pH 缓冲系统^[9], 以避免培养时因 CO₂ 跑失、pH 值升高而损害细胞。本文中凡是用 HEPES 缓冲的培养基都加上“H”记号。

1. 细胞分化实验 细胞悬于 H-199 生长培养基中, 每次取 6ml 加到用 24 × 50mm 盖片覆盖的 60mm 培养皿中, 摺放在饭盒中; 盒内同时放盛有无菌蒸馏水的小烧杯, 以保持湿

度, 制止培养基水份蒸发。在普通温箱中(37℃)培养 3 天, 生长成小的细胞集落。然后将处理组换上 6ml 含 5mM 丁酸钠的 H-199 培养基; 对照组换上新的 H-199 培养基。培养三天后取出盖片, 用经 37℃ 预温的生理盐水洗, 95% 乙醇固定, Giemsa 染色, 干后封片, 观察。

2. DNA 重接修补能力实验 细胞在培养瓶中生长 3 天, 然后将处理组换上含 5mM 丁酸钠的 H-1640 培养基, 对照组换上不加丁酸钠的 H-1640 培养基。再培养 3 天后, 用无钙及镁的 PBS 洗涤, 经胰蛋白酶处理, 在 H-1640 培养基中制成细胞悬液, 分装于试管中, 每管 0.8ml, 含细胞 2—6.8 × 10⁵ 个。分组情况见图 2。每次实验各组均有两管。

用 ⁶⁰Co γ 射线照射 5,000rad (1119—1112rad/分)。照射前后细胞样品均暂存于冰瓶中。DNA 重接修补实验样品在照后每管补加 0.8ml H-1640, 放入 37℃ 温箱保温 1.5 小时。丁酸钠处理组照后每管加入 0.8ml 含丁酸钠 10mM 的 H-1640, 使细胞于 5mM 丁酸钠的浓度下进行 DNA 修补。依照 Parodi 等^[10]的 Kohn 碱液洗脱结合荧光测定的方法, 检测细胞 DNA 受照断链及重接修补。上述洗脱法是我们简化的^[11], 不用蠕动泵。

二、结 果

对照组是在正常培养条件下生长 6 天的细胞; 处理组的细胞先在正常条件下生长 3 天后, 再以 5mM 丁酸钠处理 3 天。

1. 丁酸钠引起 Eca-109 细胞的“分化”:

(1) “分化”表现 Eca-109 细胞经 5mM 丁酸钠处理 3 天后, 便在生长附着面上扩展开,

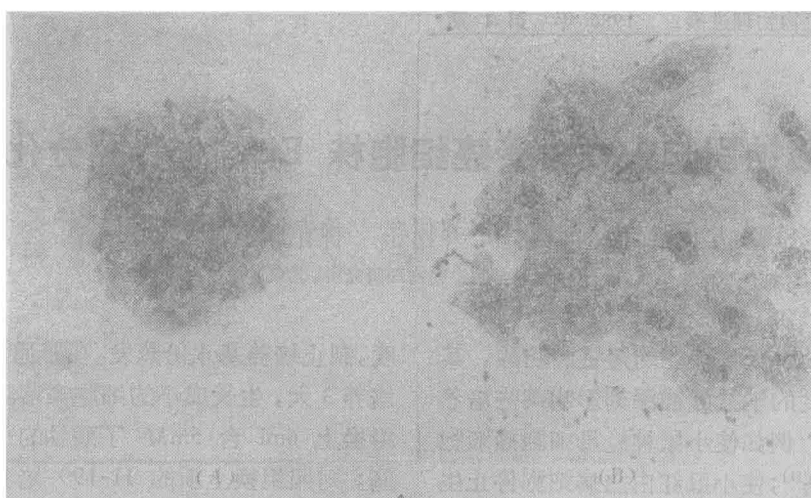


图1 丁酸钠引起 Eca-109 细胞的“分化”(×520)

A: 对照 B: 丁酸钠处理组

表1 丁酸钠处理3天后细胞体、核及核仁

指 标		组 别	对照组 ($\bar{X} \pm S. E.$)	处理组 ($\bar{X} \pm S. E.$)	P 值
胞体大小, (μ)	长		44.9 $\pm$ 1.7	64.3 $\pm$ 1.6	<0.01
	宽		29.0 $\pm$ 0.9	45.2 $\pm$ 1.9	<0.01
核直径, (μ)	长径		18.6 $\pm$ 0.4	18.8 $\pm$ 0.4	>0.05
	短径		13.6 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.3	>0.05
核 仁	直径, μ		2.1 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.5	>0.05
	个数/细胞		3.2 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.1	<0.01

(每组随机测量集落边缘非分裂细胞 50 个)

因细胞体增大,因而集落中的各细胞核间的距离加大;处在集落边缘的细胞因有可扩展的空间,细胞体增大更为明显,呈多角形,外观类似于正常的分化上皮细胞(图1)。

显微测量并观察每组 50 个非分裂细胞其结果列于表1。可以看出,丁酸钠处理组的细胞体增大,细胞的核仁数目减少;且两者均有统计学显著性 ($P < 0.01$);而细胞核及核仁大小都没有显著变化 ($P > 0.05$)。

(2) 丁酸钠抑制 Eca-109 细胞生长: 随机地统计处理组和对照组各 100 个细胞集落的细胞数,得出两组每集落的平均细胞数,分别为 5.4 ± 0.6 和 14.0 ± 0.7 个;处理组仅为对照组的 38%,表明丁酸钠明显抑制 Eca-109 细胞的生长 ($P < 0.05$)。

2. 丁酸钠处理 3 天对细胞 DNA 重接修补能力的影响 碱液洗脱中,滤膜上 DNA 相对剩留量下降,表示细胞 DNA 发生主链断裂;受照射细胞保温后,膜上相对剩留量回升,表示细胞进行过 DNA 重接修补^[11]。从图 2 可以看出,未照射的细胞经丁酸钠处理或 37℃ 保温 1.5 小时, DNA 断链数略有增加(比较 a 与 A 组或 c 与 A 组),但均无统计学意义 ($P > 0.05$)。经丁酸钠处理后再保温,则 DNA 断链又增多(见 c 组),与单纯保温组(a 组)及单纯丁酸钠处理组(c 组)相比,其相对剩留量的差别均属显著 ($P < 0.05$)。当细胞受照后, DNA 断链数大幅度增加(见 B, D, E 组) ($P < 0.01$);照后 37℃ 保温 1.5 小时,断链数又减少到接近照前水平(见 b, d, e 组),可见 DNA 断链基

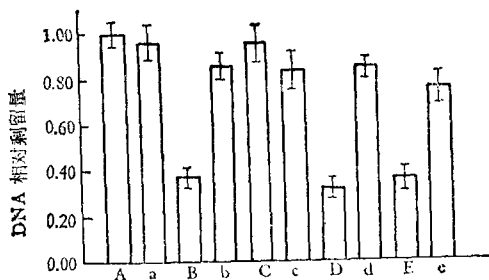


图2 经5mM 丁酸钠处理的 Eca-109 细胞的 DNA 重接修补能力 ($\bar{x} \pm S. E.$)

5,000rad γ 射线照后经 37℃ 保温 1.5 小时, 相对残留量回升, 表示细胞进行过 DNA 重接修补。以正常条件生长、不照射和不保温细胞的膜上 DNA 残留百分数作为基准值 1.0。分组: A, 正常条件生长(6 天), 不照射, 不保温。a, 正常条件生长, 不照射, 保温(1.5 小时)。B, 正常条件生长, 照射, 不保温。b, 正常条件生长, 照射, 保温。C, 正常条件生长 3 天后, 受 5mM 丁酸钠处理 3 天, 不照射, 不保温。c, 同上生长及丁酸钠处理, 不照射, 保温。D, 同上生长及丁酸钠处理, 照射, 不保温。d, 同上生长及丁酸钠处理, 照射, 保温。E, 正常条件生长, 照射, 在含 5mM 丁酸钠的 H-1640 培养基中 0℃ 冷贮 1.5 小时。e, 正常条件生长, 照射, 在含 5mM 丁酸钠的 H-1640 培养基中保温 1.5 小时。

本上被修补。正常条件下生长的细胞照后在 5mM 丁酸钠中保温 (e 组), 重接修补能力似略低(比较 e 与 b 组, 并参看 d 组), 但此差别无统计学意义 ($0.2 > P > 0.05$), 不能确定丁酸钠对 DNA 重接修补是否有直接的抑制作用。

三、讨 论

本研究结果表明, 5mM 的丁酸钠能抑制人类食管癌细胞生长, 使其形态近似于正常分化上皮细胞(图 1 及表 1)。这种“分化”表现与丁酸钠引起 HeLa 细胞变成有很长突起的异常形状^[5,7] 很不相同。从丁酸钠处理组中还见到, 每个 Eca-109 细胞的核仁大小不变但数目减少(表 1), 这可能反映了某些“核仁染色体”的核仁组成区(NOR)机能受抑、核糖体的产量减少, 因为核仁是生产核糖体的处所^[12]。

Eca-109 细胞受丁酸钠处理 3 天, 出现广泛“分化”之后, DNA 断链的重接能力没有明显降低(图 2)。但我们不能仅凭这一点就否定丁酸钠在肿瘤治疗中或许有可利用之处, 因至

今尚不知继续延长处理时间的后果, 以及丁酸钠对食管癌细胞 DNA 切除修补能力的影响如何。

现已知, 丁酸钠能抑制细胞的组蛋白去乙酰酶, 使组蛋白(特别是 H3 及 H4)过度乙酰化^[8,13,14], 而组蛋白的乙酰化与染色质的结构及基因表达的调控有密切关系^[8]。但不知这是否代表丁酸钠的全部作用机制。引人注目的是丁酸钠一方面能抑制离体肿瘤细胞生长^[2,5], 另一方面又能使恶性细胞中原来已被封闭的与血红蛋白合成有关的基因活化^[2,3]。在本研究中 Eca-109 细胞生长受抑和表现分化。这不知是否反映了丁酸钠对致癌基因和分化基因有某种程度的选择作用。最近 Weinberg^[15] 提出, 正常细胞在 10 亿年以上的进化过程中, 仍将原致癌基因(protooncogenes)保留下来, 表明这些基因在细胞癌变前有其正常用途, 它可能是在细胞生长中起重要作用。如果这种推测是正确的, 则丁酸钠抑制肿瘤细胞生长的作用中有可能包括了影响致癌基因的表达。

参 考 文 献

- [1] Sheppard, J. R. et al.: *Life Science*, **12** (Pt. 2), 431, 1973.
- [2] Rastl, E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 4333, 1978.
- [3] Leder, A. et al.: *Cell*, **5**, 319, 1975.
- [4] Hagopian, H. K. et al.: *Cell*, **12**, 855, 1977.
- [5] Ginsbury, E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **70**, 2457, 1973.
- [6] Griffin, M. J. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 619, 1974.
- [7] Henneberry, R. C. et al.: *Exp. Cell Res.*, **103**, 55, 1976.
- [8] Kruh, J.: *Mol. Cell. Biochem.*, **42**, 65, 1982.
- [9] Shipman, C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 305, 1969.
- [10] Parodi, S. et al.: *Mutation Res.*, **54**, 39, 1978.
- [11] 陈去恶, 周启玲: 《生物化学与生物物理进展》, **37**, 1, 1982.
- [12] Maden, B. E. H. et al.: *The Nucleolus* (ed. Jordan, E. G. and Cullis, C. A.), pp. 87, 1982.
- [13] Sealy, L.: *Cell*, **14**, 115, 1978.
- [14] Candido, E. P. M. et al.: *Cell*, **14**, 105, 1978.
- [15] Weinberg, R. A.: *Trends in Biochem. Sci.*, **9**, 131, 1984.

[本文于 1984 年 8 月 25 日收到]