

丁酸钠诱导COLO205结肠癌细胞凋亡及其对caspase-3的调控

刁波, 唐瑛, 文晔, 王晓昆

■背景资料

结肠癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一, 严重的威胁了国民身体健康。对筛选结肠癌防治药物的研究具有重要的临床意义。丁酸钠是一种组蛋白脱乙酰基酶抑制剂, 主要通过改变组蛋白的乙酰化程度来改变染色质的构象, 参与基因表达调控, 其控制多种肿瘤细胞生长, 诱导癌细胞分化成熟及癌细胞凋亡。通过对其作用机制的探讨, 寻找到治疗结肠癌分子靶点。

刁波, 唐瑛, 文晔, 王晓昆, 中国人民解放军广州军区武汉总医院医学实验科 湖北省武汉市 430070

作者贡献分布: 本实验设计由刁波完成; 唐瑛为实验负责人; 实验操作由文晔与王晓昆完成。

通讯作者: 唐瑛, 430070, 湖北省武汉市, 中国人民解放军广州军区武汉总医院医学实验科, maotou01@163.com

电话: 027-68878659

收稿日期: 2008-12-03 修回日期: 2009-03-23

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-05-28

Sodium butyrate induces apoptosis and regulates caspase-3 in colorectal cancer cells COLO205

Bo Diao, Ying Tang, Ye Wen, Xiao-Kun Wang

Bo Diao, Ying Tang, Ye Wen, Xiao-Kun Wang, Department of Medicine Experiment, Wuhan General Hospital of Chinese PLA Guangzhou Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Correspondence to: Ying Tang, Department of Medicine Experiment, Wuhan General Hospital of Chinese PLA Guangzhou Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China. maotou01@163.com

Received: 2008-12-03 Revised: 2009-03-23

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-05-28

Abstract

AIM: To observe the regulatory effects of sodium butyrate on caspase-3 in COLO205 colorectal cancer cells, and to investigate the mechanisms of apoptosis in COLO205 induced by sodium butyrate.

METHODS: 1, 2, 4 mmol/L sodium butyrate were co-cultured with COLO205 cells for 48 h, respectively; the viability of COLO205 was detected using MTT method; the expression of caspase-3, using immunohistochemical method; the rate of apoptosis in COLO205, using flow cytometry.

RESULTS: Compared with negative control group, the viability of COLO205 (0.47 ± 0.09 , 0.40 ± 0.03 , 0.37 ± 0.02 vs 0.55 ± 0.09 , $P < 0.05$ or 0.01) was lower obviously; sodium butyrate promoted the masculine expression of caspase-3 (31.9 ± 1.15 , 40.6 ± 1.04 , 51.7 ± 1.17 vs 29.4 ± 1.02 , $P < 0.05$

or 0.01), and elevated the rate of apoptosis ($8.27\% \pm 0.42\%$, $15.1\% \pm 0.72\%$, $21.6\% \pm 0.95\%$ vs $7.0\% \pm 0.33\%$, $P < 0.05$ or 0.01) in COLO205.

CONCLUSION: Sodium butyrate induces the apoptosis of COLO205 through enhancing the expression of caspase-3 gene.

Key Words: Sodium butyrate; Colorectal cancer; Apoptosis; Caspase-3

Diao B, Tang Y, Wen Y, Wang XK. Sodium butyrate induces apoptosis and regulates caspase-3 in colorectal cancer cells COLO205. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1558-1560

摘要

目的: 观察丁酸钠对COLO205结肠癌细胞株caspase-3的调控, 并探讨其诱导COLO205细胞株凋亡的机制。

方法: 1、2、4 mmol/L丁酸钠与结肠癌细胞共同培养48 h; MTT法测定细胞活性; 免疫组织化学法检测细胞中caspase-3的蛋白表达; 流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

结果: 与阴性对照组比较, 1、2、4 mmol/L丁酸钠组细胞活性下降(0.47 ± 0.09 , 0.40 ± 0.03 , 0.37 ± 0.02 vs 0.55 ± 0.09 , $P < 0.05$ 或 0.01); 丁酸钠能显著促进caspase-3蛋白的阳性表达(31.9 ± 1.15 , 40.6 ± 1.04 , 51.7 ± 1.17 vs 29.4 ± 1.02 , $P < 0.05$ 或 0.01), 增加COLO205细胞的凋亡率($8.27\% \pm 0.42\%$, $15.1\% \pm 0.72\%$, $21.6\% \pm 0.95\%$ vs $7.0\% \pm 0.33\%$, $P < 0.05$ 或 0.01)。

结论: 丁酸钠能通过上调caspase-3基因的表达并诱导COLO205细胞凋亡。

关键词: 丁酸钠; 结肠癌; 细胞凋亡; Caspase-3

刁波, 唐瑛, 文晔, 王晓昆. 丁酸钠诱导COLO205结肠癌细胞凋亡及其对caspase-3的调控. *世界华人消化杂志* 2009; 17(15): 1558-1560

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1558.asp>

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科; 周士胜, 教授, 大连大学医学院医学研究中心

0 引言

结肠癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一,居胃肠道肿瘤的第3位。好发部位为直肠及直肠与乙状结肠交界处,男女之比为2-3:1。丁酸钠是一种组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,主要通过改变组蛋白的乙酰化程度来改变染色质的构象,参与基因表达调控。丁酸钠可抑制多种肿瘤细胞生长^[1-3],诱导癌细胞分化成熟及癌细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌细胞株购置上海中科院细胞库;丁酸钠购置Sigma公司;caspase-3抑制剂Z-DEVD-FMK、碘化丙啶(PI)-Annexin-FITC凋亡检测试剂盒购置碧云天生物技术研究;胎牛血清购置Gibco公司;RPMI 1640细胞培养基购置Hyclone公司;caspase-3抗体及sABC试剂盒均购自武汉博士德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: COLO205细胞培养在含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640细胞培养基中,置于37℃, 50 mL/L CO₂, 95%湿度, CO₂培养箱中。调整细胞数至 1×10^9 个/L,将细胞悬液按100 μL/孔接种于96孔板中,2 mL/孔接种于6孔板,5 mL/瓶接种于25 cm³的细胞培养瓶每3天换液1次。实验时细胞应处在对数生长期,并具有>90%的细胞存活率。实验处理前,COLO205细胞需生长在不含胎牛血清的培养中,饥饿24 h,阴性对照组不加任何处理因素,实验组加入含终浓度为1、2、4 mmol/L丁酸钠的全培养基共同培养24 h。收集细胞,进行实验检测^[4]。

1.2.2 MTT法检测细胞活性: 实验分组处理24 h后,吸走每孔的上清液,加入MTT 25 μL(5.0 μg/L),继续于37℃, CO₂培养箱内温育4 h,终止培养,小心弃去孔内培养上清液,每孔加入150 μL DMSO,充分振荡10 min,使结晶充分溶解。用酶标仪于492 nm波长处测定各孔的吸光度,用该值代表细胞活性。

1.2.3 caspase-3表达量的测定: 应用细胞爬片技术,按上述进行实验分组,干预因素处理完毕后,冰丙酮固定30 min,自然晾干。用30 mL/L H₂O₂甲醇溶液,除去内源性过氧化氢酶;洗涤,100 mL/L羊血清封闭20 min;加入一抗(1:100兔抗鼠caspase-3抗体)4℃冰箱过夜;PBS洗涤3次;二抗(1:100生物素化山羊抗兔)37℃孵育20 min;PBS洗涤3次;DAB显色,复染,脱水,透明,封片。每张免疫组织化学片随机10视野,采用

HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统,选用阳性单位(positive unit, PU)指标定量表达免疫组织化学阳性反应^[5]。

1.2.4 细胞凋亡率的检测: 弃除各组细胞上清培养基, PBS(pH7.2-7.4)轻洗2次, 2.5 g/L胰蛋白酶干消化3 min, RPMI 1640培养基重悬细胞,并调整细胞浓度为 10^4 个/L, 1000 g离心5 min,弃除上清, PBS重悬细胞, 1000 g离心5 min,弃除PBS。FITC细胞结合液195 μL重悬细胞,加入5 μL Annexin-FITC, 25℃避光孵育10 min, 1000 g离心5 min,弃上清, FITC细胞结合液190 μL重悬细胞,加入10 μL PI染液及300 μL PBS共同冰孵5 min, 30 min内上机检测各组细胞凋亡率^[6]。每组重复做4次。

1.2.5 caspase-3活性抑制实验: 根据上述实验选出丁酸钠诱导COLO205细胞凋亡的最佳浓度,以此浓度为作用基础,在加入丁酸钠前1 h加入终浓度为50 μmol/L的Z-DEVD-FMK,再加入丁酸钠溶液。共同培养24 h后,取出细胞检测caspase-3蛋白的表达及细胞凋亡率。

统计学处理 实验数据以mean±SD表示,采用统计软件SPSS8.0进行单因素方差分析及t检验。

2 结果

2.1 丁酸钠对COLO205细胞活性的影响 实验结果显示,与阴性对照组比较,丁酸钠干预组细胞活性明显下降,并具有浓度依赖性(表1)。

2.2 丁酸钠对caspase-3表达量的影响 免疫组织化学法检测发现,阴性对照细胞caspase-3的阳性单位值低于丁酸钠干预组,并具有统计学意义,证实丁酸钠具有上调caspase-3蛋白表达的功能(表1)。

2.3 丁酸钠对细胞凋亡率的影响 丁酸钠3个剂量组均能明显增加COLO205细胞的凋亡率,具有统计学意义。当丁酸钠浓度越高,细胞凋亡率越高,呈现一定的浓度依赖性(表1)。

2.4 caspase-3活性抑制实验 当COLO205细胞经Z-DEVD-FMK处理完后,再加入终浓度为4 mmol/L丁酸钠进行干预,检测结果发现, caspase-3蛋白表达及细胞凋亡率与单纯丁酸钠干预组比较均下降,并具有统计学意义(表2)。

3 讨论

丁酸钠由厌氧菌分解发酵结肠中未经消化吸收的食物中的碳水化合物和蛋白产生,是结肠上皮细胞主要的能量来源,并能刺激结肠肽或生

■研发前沿

目前公认的治疗结肠癌的方法是以手术为主、并辅以化疗、免疫治疗、中药以及其他支持治疗的综合治疗。但术后复发和转移是患者死亡的重要原因。因此,筛选出结肠癌治疗的靶向药物,减轻患者的痛苦是目前研究结肠癌的重点及重点。

■应用要点

本文通过添加了caspase-3抑制剂,进一步证实丁酸钠可以通过激活caspase途径来诱导结肠癌细胞凋亡。因此,可以通过针对凋亡途径设计靶向药物诱导癌细胞凋亡。

■同行评价

本文主要介绍丁酸钠诱导凋亡的可能机制,有一定的研究意义和价值。

表 1 各组细胞活性(I)、凋亡率及caspase-3的PU值

分组	细胞活性(I)	凋亡率(%)	caspase-3(PI)
阴性对照组	0.55 ± 0.09	7.0 ± 0.33	29.4 ± 1.02
NaB 1 mmol/L	0.47 ± 0.09 ^a	8.27 ± 0.42 ^a	31.9 ± 1.15 ^a
2 mmol/L	0.40 ± 0.03 ^b	15.1 ± 0.72 ^b	40.6 ± 1.04 ^b
4 mmol/L	0.37 ± 0.02 ^b	21.6 ± 0.95 ^b	51.7 ± 1.17 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 阴性对照组, NaB: 丁酸钠。

表 2 caspase-3抑制实验中各组细胞凋亡率及PU值

分组	凋亡率(%)	caspase-3(PI)
阴性对照组	7.5 ± 0.46	33.5 ± 1.14
NaB	24.7 ± 0.88 ^b	53.9 ± 1.25 ^b
NaB+Z-DEVD-FMK	9.3 ± 0.69	42.4 ± 1.21

^bP<0.01 vs NaB+Z-DEVD-FMK组, NaB: 丁酸钠。

长因子的释放,调节结肠黏膜血供促进上皮细胞的增生^[7-9]。但丁酸钠还具有抑制肿瘤细胞增生,促进肿瘤细胞分化,调控肿瘤细胞的周期。丁酸钠是最主要的组蛋白乙酰化酶的抑制剂,增强组蛋白乙酰化酶的活性,导致组蛋白高度乙酰化,使组蛋白与相邻的DNA结合受到抑制,改变了染色质的紧密结合,有利于转录因子激活特异性的基因。如研究证实,丁酸钠作用于恶性间皮瘤细胞后,明显上调bcl-XL基因的表达,促进细胞的凋亡^[10-11]。Bonnotte *et al*^[12]研究发现丁酸钠能够明显增强Fas与FasL结合的灵敏度,促进肿瘤细胞凋亡。

本研究表明,丁酸钠对COLO205细胞的生长具有明显的抑制作用,并具有相应的浓度依赖性,随着药物浓度的增加,细胞活性也在下降。丁酸钠能上调caspase-3基因的表达,诱导COLO205细胞凋亡。当caspase-3被抑制后,丁酸钠诱导COLO205细胞凋亡的能力下降。大量实验研究证实,细胞凋亡途径大致有3条:死亡受体通路、线粒体通路、内质网通路。Nakagawa *et al*研究认为,丁酸诱导肿瘤细胞凋亡的机制是作用与内质网,由caspase级联活化所致。水解caspase-3前体,激活caspase-3蛋白,引发细胞凋亡^[12-13]。这与本实验结果相符。

总之,丁酸钠能体外诱导结肠癌细胞株COLO205细胞凋亡,其机制可能与丁酸钠能上调caspase-3基因的表达进而促进细胞的凋亡。

4 参考文献

- 1 Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1141-1149
- 2 Sung YH, Hwang SJ, Lee GM. Influence of down-regulation of caspase-3 by siRNAs on sodium-butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Metab Eng* 2005; 7: 457-466
- 3 Daehn IS, Varelías A, Rayner TE. Sodium butyrate induced keratinocyte apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 1379-1390
- 4 Tsai CH, Yang SH, Chien CM, Lu MC, Lo CS, Lin YH, Hu XW, Lin SR. Mechanisms of cardiotoxin III-induced apoptosis in human colorectal cancer colo205 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 177-182
- 5 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ). 中国组织化学与细胞化学杂志 1995; 4: 89-91
- 6 Yang L, Zhou X, Yang J, Yin X, Han L, Zhao D. Aspirin inhibits cytotoxicity of prion peptide PrP106-126 to neuronal cells associated with microglia activation in vitro. *J Neuroimmunol* 2008; 199: 10-17
- 7 Blottière HM, Buecher B, Galmiche JP, Cherbut C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* 2003; 62: 101-106
- 8 Mazzoni M, Le Gall M, De Filippi S, Minieri L, Trevisi P, Wolinski J, Lalatta-Costerbosa G, Lallès JP, Guilloteau P, Bosi P. Supplemental sodium butyrate stimulates different gastric cells in weaned pigs. *J Nutr* 2008; 138: 1426-1431
- 9 Rishi P, Pathak S, Ricke SC. Short chain fatty acids influence virulence properties of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Environ Sci Health B* 2005; 40: 645-657
- 10 Cao XX, Mohiuddin I, Ece F, McConkey DJ, Smythe WR. Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 562-568
- 11 Natoni F, Diolordi L, Santoni C, Gilardini Montani MS. Sodium butyrate sensitises human pancreatic cancer cells to both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745: 318-329
- 12 Bonnotte B, Favre N, Reveneau S, Micheau O, Droin N, Garrido C, Fontana A, Chauffert B, Solary E, Martin F. Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. *Cell Death Differ* 1998; 5: 480-487
- 13 Nohara K, Yokoyama Y, Kano K. The important role of caspase-10 in sodium butyrate-induced apoptosis. *Kobe J Med Sci* 2007; 53: 265-273

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕