

# 丁酸钠抑制人结肠癌细胞SW480上皮间质转化的机制

王宁, 曲朝晖, 杨兴华, 陈洋

王宁, 杨兴华, 中国医科大学附属第一医院普通外科 辽宁省沈阳市 110001

曲朝晖, 沈阳市儿童医院外科 辽宁省沈阳市 110032

陈洋, 中国医科大学附属第一医院中心实验室 辽宁省沈阳市 110001

王宁, 副教授, 医学博士, 主要从事结直肠癌分子生物学的研究。辽宁省教育厅基金资助项目, No. L2010600

作者贡献分布: 本文实验设计、数据分析由王宁与曲朝晖完成; 研究过程由陈洋与杨兴华完成; 论文撰写由王宁、曲朝晖、杨兴华及陈洋共同完成。

通讯作者: 王宁, 副教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院普通外科。

wn232@hotmail.com

电话: 024-83283330

收稿日期: 2014-07-01 修回日期: 2014-08-07

接受日期: 2014-08-17 在线出版日期: 2014-10-08

## Sodium butyrate inhibits epithelial-mesenchymal transition in human colon cancer cell line SW480

Ning Wang, Zhao-Hui Qu, Xing-Hua Yang, Yang Chen

Ning Wang, Xing-Hua Yang, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Zhao-Hui Qu, Department of Surgery, Shenyang Children's Hospital, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Yang Chen, Central Laboratory, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Foundation of the Department of Education of Liaoning Province, No. L2010600

Correspondence to: Ning Wang, Associate Professor, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wn232@hotmail.com

Received: 2014-07-01 Revised: 2014-08-07

Accepted: 2014-08-17 Published online: 2014-10-08

## Abstract

**AIM:** To investigate whether sodium butyrate (NaB) inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human colon cancer cells and the underlying mechanism.

**METHODS:** The differential expression of EMT markers, E-Cadherin and Vimentin, between human colon epithelial cells (HCoEpiC) and colon cancer cells (SW480) were compared. The abilities of migration and invasion of SW480

cells were assessed following treatment with 0.2 mmol/L NaB for 72 h. The relative expression levels of E-Cadherin, Vimentin and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) were determined by Western blot analysis.

**RESULTS:** The relative expression level of E-Cadherin in SW480 cells was significantly lower than that in HCoEpiC cells; however, the expression level of Vimentin in SW480 cells was significantly higher than that in HCoEpiC cells ( $P < 0.05$ ). After treatment with NaB, the migration and invasion abilities of SW480 cells were significantly inhibited ( $P < 0.05$ ). Following treatment with NaB, compared with the control group, treatment with NaB significantly up-regulated E-Cadherin expression ( $0.07 \pm 0.02$  vs  $0.23 \pm 0.04$ ,  $P < 0.05$ ), and down-regulated Vimentin ( $0.32 \pm 0.05$  vs  $0.17 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ) and HIF-1 $\alpha$  expression ( $0.15 \pm 0.04$  vs  $0.07 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ) in SW480 cells.

**CONCLUSION:** Compared with normal human colon epithelial cells, significant EMT occurs in SW480 cells. NaB can inhibit the abilities of migration and invasion and EMT of SW480 cells, possibly through inhibition of HIF-1 $\alpha$  expression.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Colon cancer; Epithelial-mesenchymal transition; Sodium butyrate

Wang N, Qu ZH, Yang XH, Chen Y. Sodium butyrate inhibits epithelial-mesenchymal transition in human colon cancer cell line SW480. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(28): 4317-4320 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4317.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i28.4317>

## 摘要

**目的:** 探讨丁酸钠(sodium butyrate, NaB)是否能够抑制人结肠癌细胞上皮间质转化(epithelium-mesenchymal transition, EMT)及其机制。

## ■背景资料

结肠癌肿瘤浸润和转移是其主要致死原因, 目前认为肿瘤浸润和转移与上皮间质转化(epithelium-mesenchymal transition, EMT)相关。如何抑制或逆转EMT成为新的研究方向。

## ■同行评议者

杜雅莉, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

## ■ 研发前沿

结肠癌与EMT的关系及机制是目前研究热点。如何抑制或逆转EMT已达到治疗结肠癌的目的已成为亟待研究的问题。

**方法:** 比较正常人结肠上皮细胞(human colon epithelium cell, HCoEpiC)与结肠癌细胞SW480间EMT标志物E-Cadherin、Vimentin的表达差异。再以0.2 mmol/L丁酸钠处理SW480 72 h, 观察其迁移和侵袭能力的变化; Western blot检测EMT标志物E-Cadherin、Vimentin和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )等蛋白浓度变化。

**结果:** E-Cadherin在SW480中表达显著低于HCoEpiC; Vimentin在SW480中表达显著高于HCoEpiC,  $P<0.05$ 。丁酸钠处理后SW480, 迁移和侵袭能力明显下降,  $P<0.05$ 。E-Cadherin在SW480实验组、对照组中相对含量分别为 $0.07\pm 0.02$ 和 $0.23\pm 0.04$ , 显著增高,  $P<0.05$ 。Vimentin在SW480实验组、对照组中相对含量分别为 $0.32\pm 0.05$ 和 $0.17\pm 0.03$ , 显著降低,  $P<0.05$ 。HIF-1 $\alpha$ 在实验组、对照组中相对含量分别为 $0.15\pm 0.04$ 和 $0.07\pm 0.03$ , 显著降低,  $P<0.05$ 。

**结论:** SW480与正常结肠上皮细胞相比发生了显著的EMT。丁酸钠可抑制SW480细胞的迁移和侵袭能力, 可能是通过抑制HIF-1 $\alpha$ , 进而实现抑制人结肠癌细胞SW480的EMT。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 结肠癌; 上皮间质转化; 丁酸钠

**核心提示:** 本研究通过对比研究发现结肠癌细胞发生了上皮间质转化(epithelium-mesenchymal transition, EMT), 丁酸钠(sodium butyrate, NaB)可抑制结肠癌EMT, 而且还抑制重要的缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )。揭示了NaB抑制结肠癌EMT的可能机制。

王宁, 曲朝晖, 杨兴华, 陈洋. 丁酸钠抑制人结肠癌细胞SW480上皮间质转化的机制. 世界华人消化杂志 2014; 22(28): 4317-4320 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4317>. asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i28.4317>

## 0 引言

结肠癌为消化系常见恶性肿瘤, 随着生活方式的改变, 其发病率有逐渐增高趋势, 其致死原因主要与肿瘤浸润和转移有关。在我们的前期研究中发现, 丁酸钠(sodium butyrate, NaB)可诱导人结肠癌细胞SW480分化, 并使与预后呈负相关的抑癌基因p53结合蛋白1表达增高<sup>[1,2]</sup>。癌细胞的低分化和上皮间质转化(epithelium-mesenchymal transition, EMT)均与其侵袭、转移有关。那

么, NaB能否抑制SW480迁移、侵袭以及EMT呢? 带着以上问题我们展开如下研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 正常人结肠上皮细胞HCoEpiC购自ScienCell公司; 人结肠癌细胞SW480细胞来自中国医科大学细胞生物教研室; NaB购自Sigma公司; DMEM、RPMI 1640细胞培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自Hyclone公司; E-Cadherin小鼠抗人单克隆抗体购自Abcam公司; Vimentin小鼠抗人单克隆抗体购自Santa Cruz公司; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )小鼠抗人单克隆抗体购自Santa Cruz公司; Western blot用二抗-辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG, GAPDH内参抗体购自碧云天生物技术有限公司; 二氟化树脂(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜购自Milipore公司; ECL Plus<sup>TM</sup>发光液购自GE公司; Transwell(8  $\mu$ m微孔膜)细胞培养小室购自Corning Costar公司; Matri-gel购自BD公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** SW480细胞以含10%胎牛血清的RPMI 1640细胞培养液于37  $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub>的孵箱内孵育。HCoEpiC以DMEM培养液培养, 其他条件同上。传代24 h后, 加入含0.2 mmol/L NaB的培养液, 每日换液。72 h后收取细胞进行以下步骤实验。

**1.2.2 细胞迁移和侵袭能力检测:** 外室置入含15%FBS的培养液600  $\mu$ L; 以不含FBS的培养液100  $\mu$ L混悬 $5\times 10^5$ 个细胞置入内室, 于37  $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub>孵箱内孵育48 h。40 g/L多聚甲醛固定, 苏木素染色, 分别取5个视野, 计数迁移细胞。侵袭能力检测时, 细胞混悬液置入内室前, 以1:7不含FBS的培养液稀释Matri-gel后100  $\mu$ L覆盖微孔膜。其余实验步骤同上。

**1.2.3 Western blot检测:** 取上述细胞超声裂解, 提取蛋白, 二喹啉甲酸法定量。取50-100  $\mu$ g蛋白于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(PAGE-SDS)进行凝胶电泳, 再电转印于PVDF膜上; 5%脱脂牛奶封闭过夜, 一抗1:200室温2 h, 二抗1:4000室温2 h。GAPDH作为内参。PVDF膜以ECL Plus<sup>TM</sup> Western blot检测试剂进行化学发光, 显像并分析。

**统计学处理** 均数以mean $\pm$ SD表示。结果以 $t$ 检验进行统计学分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## ■ 相关报道

Harten和Wang等的研究显示丁酸钠(sodium butyrate, NaB)可抑制肾透明细胞癌和肝细胞癌的EMT。

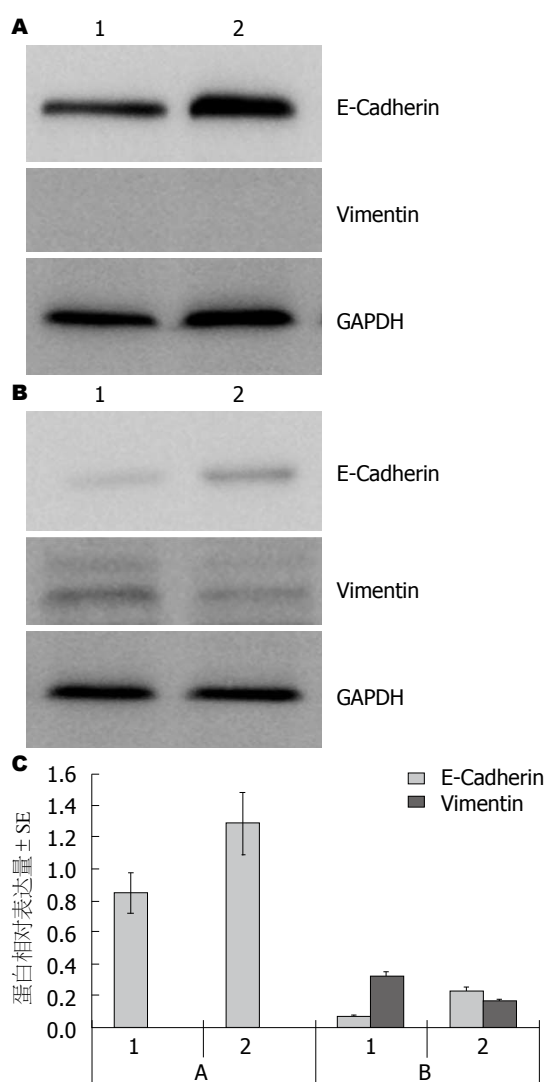


图1 HCoEpiC和SW480细胞经NaB处理前后EMT标志物变化。A: HCoEpiC; B: SW480; C: 蛋白相对表达量。1: NaB 0 mmol/L; 2: NaB 0.2 mmol/L。NaB: 丁酸钠; EMT: 上皮间质转化。

## 2 结果

**2.1 NaB明显降低SW480迁移和侵袭能力** SW480未处理和经0.2 mmol/L NaB处理后迁移细胞数分别为 $78.0 \pm 10.8$ 和 $10.0 \pm 2.6$  ( $P < 0.01$ )。侵袭透过Matri-gel细胞数分别为 $30.0 \pm 5.6$ 和 $17.0 \pm 3.9$ , 显著减少 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 SW480与HCoEpiC相比发生了显著的EMT** 上皮标志物E-Cadherin在HCoEpiC和SW480中相对表达分别为 $0.85 \pm 0.22$ 和 $0.07 \pm 0.02$ 。与HCoEpiC相比上皮标志物E-Cadherin在SW480中表达显著降低,  $P < 0.05$ 。间质标志物Vimentin在HCoEpiC表达测不出; 在SW480中相对表达为 $0.32 \pm 0.05$ , 与HCoEpiC相比间质标志物Vimentin显著增高,  $P < 0.05$  (图1A, C)。

**2.3 NaB明显抑制SW480的EMT** 经0.2 mmol/L NaB处理后E-Cadherin在HCoEpiC和SW480中

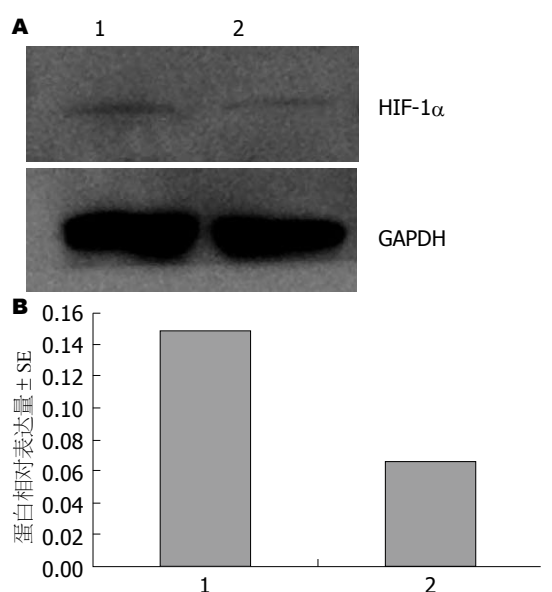


图2 SW480细胞经NaB处理后HIF-1 $\alpha$ 的变化。A: Western blot; B: 蛋白相对表达量。1: NaB 0 mmol/L; 2: NaB 0.2 mmol/L。NaB: 丁酸钠; HIF-1 $\alpha$ : 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 。

相对表达分别为 $1.29 \pm 0.35$ 和 $0.23 \pm 0.04$ , 分别为未处理组的1.52和3.29倍,  $P < 0.05$ 。间质标志物Vimentin在SW480中相对表达为 $0.17 \pm 0.03$ , 为未处理组的0.53倍,  $P < 0.05$  (图1B, C)。

**2.4 SW480经NaB处理后HIF-1 $\alpha$ 显著降低** SW480未经NaB与经0.2 mmol/L丁酸钠处理后HIF-1 $\alpha$ 的相对表达分别为 $0.15 \pm 0.04$ 和 $0.07 \pm 0.03$ , 为未处理组的0.47倍,  $P < 0.05$  (图2)。

## 3 讨论

越来越多的证据显示在人类大肠癌形成和肿瘤侵袭过程中发生了EMT。在EMT的过程中, 上皮细胞间联接消失, 并转化为间质性质的成纤维样细胞, 使细胞获得了迁移和侵袭基质的能力。其典型的表现为上皮标志物E-Cadherin等表达降低; 而间质标志物Vimentin等表达增高<sup>[3,4]</sup>。

我们的结果也显示, 人结肠癌细胞SW480与正常结肠上皮细胞HCoEpiC相比, 上皮标志物E-Cadherin表达明显降低; 而间质标志物Vimentin表达则显著增高。说明SW480也发生了显著的EMT。

丁酸钠是一种短链脂肪酸, 是膳食纤维在结肠内由微生物降解生成的。他兼具组蛋白去乙酰化酶抑制剂、肿瘤细胞分化诱导剂及促进凋亡等作用<sup>[5-7]</sup>。近年来的研究表明, NaB可抑制肾透明细胞癌和肝细胞癌的EMT<sup>[8,9]</sup>。那么, NaB能否抑制结肠癌细胞的EMT呢? 我们的结果表明, NaB可明显抑制人结肠癌细胞SW480的

### ■创新盘点

目前尚未见NaB抑制结肠癌EMT的报道。本研究不但发现NaB可抑制结肠癌EMT, 而且还抑制重要的低氧信号转导因子缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )。揭示了NaB抑制结肠癌EMT的可能机制。

## ■同行评价

本文探讨了NaB如何抑制结肠癌的EMT, 为临床应用NaB治疗结肠癌提供了理论依据。

EMT, 抑制结肠癌细胞SW480的迁移和侵袭能力。同时增强正常结肠上皮细胞的上皮表型。以往对结肠癌的研究也表明, 富含膳食纤维的食物能降低结肠癌的发病率<sup>[10,11]</sup>。该结论也支持我们的NaB促进维持正常结肠黏膜上皮细胞的上皮表型的结果。

文献报道, HIF-1 $\alpha$ 可促进肿瘤细胞的EMT<sup>[12,13]</sup>。而我们的结果显示, NaB可减低SW480中HIF-1 $\alpha$ 的表达。HIF-1 $\alpha$ 是重要的低氧信号传递因子, 普遍存在于大多数实体肿瘤中。HIF-1 $\alpha$ 可激活多种信号转导通路。体内外实验证明HIF-1 $\alpha$ 通过调节转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )的表达水平, 协同TGF- $\beta$ 发挥促肿瘤作用, 进而影响肿瘤的发展及预后。目前, TGF- $\beta$ 也被认为是介导EMT的关键因子<sup>[14,15]</sup>。因此, NaB可能是通过抑制HIF-1 $\alpha$ 进而抑制SW480的EMT。

总之, SW480与正常结肠上皮细胞相比发生了显著的EMT。NaB可增强HCoEpiC的上皮表型。NaB可抑制SW480细胞的迁移和侵袭能力, 可能是通过抑制HIF-1 $\alpha$ , 进而实现抑制人结肠癌细胞SW480的EMT。

## 4 参考文献

- 1 王宁, 杨兴华, 陈洋, 姜奕. SELENBP1在结直肠癌中的表达及其与肿瘤分化的关系. 中国普通外科杂志 2013; 22: 1291-1296
- 2 Wang N, Chen Y, Yang X, Jiang Y. Selenium-binding protein 1 is associated with the degree of colorectal cancer differentiation and is regulated by histone modification. *Oncol Rep* 2014; 31: 2506-2514 [PMID: 24737289]
- 3 Zhu QC, Gao RY, Wu W, Qin HL. Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 2689-2698 [PMID: 23803016]
- 4 朱庆超, 秦环龙. 上皮细胞间质转化在大肠癌发生发展中的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1949-1956
- 5 徐春盛, 施海, 张健, 杨侠, 初大可, 刘新平, 王为忠. 丁酸钠诱导结肠癌细胞分化过程中NDRG2的表达及意义. 第四军医大学学报 2009; 3: 14-16
- 6 Ruan W, Zhu S, Wang H, Xu F, Deng H, Ma Y, Lai M. IGFBP-rP1, a potential molecule associated with colon cancer differentiation. *Mol Cancer* 2010; 9: 281 [PMID: 20977730]
- 7 孙素霞, 李文军, 陈思强, 张贺, 余少珍, 张敏红, 邹飞. 丁酸钠对人结肠癌细胞株HCT116细胞凋亡及基质相互作用分子和Orai1蛋白活性的影响. 南方医科大学学报 2012; 32: 189-192
- 8 Harten SK, Shukla D, Barod R, Hergovich A, Balda MS, Matter K, Esteban MA, Maxwell PH. Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 1089-1101 [PMID: 19073886]
- 9 Wang HG, Huang XD, Shen P, Li LR, Xue HT, Ji GZ. Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Int J Mol Med* 2013; 31: 967-974 [PMID: 23440283]
- 10 Gonçalves P, Martel F. Butyrate and colorectal cancer: the role of butyrate transport. *Curr Drug Metab* 2013; 14: 994-1008 [PMID: 24160296]
- 11 Saldanha SN, Kala R, Tollefsbol TO. Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate. *Exp Cell Res* 2014; 324: 40-53 [PMID: 24518414]
- 12 左海波, 陈小伍, 朱达坚. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 在上皮-间充质转化过程中作用的研究进展. 广东医学 2012; 33: 1501-1503
- 13 高超, 冯向营. 低氧诱导因子-1及转化生长因子- $\beta$ 与肿瘤. 国际肿瘤学杂志 2013; 40: 652-655
- 14 吴腾云, 张威, 曹冬梅. TGF- $\beta$ 诱导上皮间充质转化的信号通路研究. 国际病理科学与临床杂志 2011; 31: 81-86
- 15 刘忠涛, 熊力. TGF- $\beta$ 介导的上皮间质转化. 中国普通外科杂志 2013; 22: 211-217

编辑 郭鹏 电编 闫晋利

