

文章编号:1005-6947(2007)09-0852-03

· 基础研究 ·

苯乙酸对人结直肠癌细胞 HCT-8 的 G₁ 细胞周期阻滞及增殖抑制作用

任辉¹, 房学东¹, 张研¹, 田宇²

(1. 吉林大学普通外科疾病诊治中心、吉林大学第二医院 基本外科, 吉林 长春 130041; 2. 吉林大学中日联谊医院 神经外科, 吉林 长春 130033)

摘要:目的 探讨诱导分化剂苯乙酸(PA)对人结直肠癌细胞系 HCT-8 细胞周期及增殖的影响。方法 应用 MTT 比色法,以 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mmol/L 的 PA 作用于体外培养的 HCT-8 细胞,分别于 24, 48, 72h 后对细胞增殖进行检测;流式细胞术分析细胞周期。结果 随着 PA 浓度的增加(1~5 mmol/L)或药物作用时间的延长(24~72h),肿瘤细胞生长抑制率明显增加。PA 1~5 mmol/L 作用 24h 细胞生长抑制率为 5.1%~24.3%, 48h 为 16.7%~72.3%, 72h 为 30.2%~93.4%。PA 作用细胞 72h 后, G₀/G₁ 期比例显著下降, S 期比例相对升高, 组间差异显著 ($P < 0.05$)。结论 PA 在诱导分化结直肠癌 HCT-8 细胞过程中, 可诱导 G₁ 细胞周期阻滞, 抑制细胞增殖。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(9): 852-854]

关键词: 结直肠肿瘤; 苯乙酸; 细胞周期; 增殖抑制

中图分类号: R 735.3

文献标识码: A

Phenylacetate inhibits cell proliferation via G₁ cell cycle arrest in the HCT-8 colorectal carcinoma cell line

REN Hui¹, FANG Xue-dong¹, ZHANG Yan¹, TIAN Yu²

(1. Department of General Surgery, the Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China; 2. Department of Neurosurgery, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of phenylacetate (PA), a differentiation induce agent, on cell cycle and proliferation in colorectal carcinoma HCT-8 cell line. **Methods** HCT-8 cells were grown in the presence of PA (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0 mmol/L) for 24h, 48h and 72h, respectively. The cellular proliferation inhibitory ratio was evaluated by MTT assay. The different phases of the cell cycle were analyzed using flow cytometer. **Results** HCT-8 cells were treated by 1.0-5.0 mmol/L PA for 24-72 h. With the increase of concentration of PA or the prolongation of the treatment time, the proliferation inhibitory ratio of the tumour cells increased notably by 5.1%~24.3% when treated for 24h, 16.7%~72.3% when treated for 48 h, and 30.2%~93.4% when treated for 72 h, respectively. When HCT-8 cells were treated with 5.0 mmol/L PA for 72h, cell cycle analysis with flow cytometry showed that the percentage of HCT-8 cells in G₀/G₁ phase reduced significantly and S phase was relatively increased ($P < 0.05$). **Conclusions** PA can arrest G₁ cell cycle and inhibit cell proliferation.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(9): 852-854]

Key words: Colorectal Carcinoma; Phenylacetate; Cell Cycle; Proliferation Inhibition

CLC number: R 735.3

Document code: A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900152);吉林省自然科学基金资助项目(20030417-02)

收稿日期:2007-01-05; **修订日期:**2007-07-04。

作者简介:任辉,男,黑龙江齐齐哈尔人,吉林大学第二医院主治医师,博士(现为中南大学卫生部肝胆肠中心博士后),主要从事胃肠肿瘤外科方面的研究。

通讯作者:房学东 E-mail:hjrxxy@tom.com

结直肠癌是癌症导致死亡的第2位主要原因^[1]。诱导分化研究已成为抗恶性肿瘤研究的热点之一。Neish^[2]首先推测苯乙酸(Phenylacetate, PA)为潜在的抗癌药物。笔者应用流式细胞术在分子水平上研究PA对HCT-8细胞的增殖抑制作用,以期进一步明确PA的作用方式和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人结直肠癌细胞株 HCT-8 由吉林大学中日联谊医院中心实验室细胞室提供,从美国 ATCC 公司购回冻存。

1.1.2 主要试剂及仪器 PA(分子式 C₈H₈O₂)购自美国 Fluka 化学试剂公司,三重蒸馏水溶解稀释,NaOH 调节 pH 至 7.0, -20℃ 分装保存待用。IMDM 培养基和新生牛血清购自 Gibco 公司;MTT(四甲基氮唑蓝)美国 Sigma 公司产品,用 0.01 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成 5 mg/mL;CO₂ 恒温培养箱购自日本东京池木株式会社;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将冻存的 HCT-8 细胞置于 37℃,体积分数为 5% 的 CO₂ 恒湿培养箱中。培养基使用含有 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中(含 NaHCO₃ 2g/L,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL),放入 CO₂ 培养箱内;HCT-8 传代。

1.2.2 MTT 法检测 HCT-8 增殖活性 采用 MTT 比色分析。对数生长期细胞接种于 96 孔培养板,每孔接种 2.5 × 10³ 个细胞。细胞置于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养,24 h 后换用无血清的 IMDM 培养基,实验组加入不同浓度的 PA,终浓度设定为 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mmol/L。每组药物浓度设 6 个复孔,对照组不加药。继续培养 24,48 h 和 72 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μL,孵育 4 h 后吸弃培养液;每孔加入二甲基亚砜 100 μL,振荡溶解 10 min。酶联免疫检测仪

490 nm 波长测吸光度值(A)。细胞增殖抑制率计算公式:抑制率(%) = 1 - (实验组 A 均数)/(对照组 A 均数) × 100%。绘制生长曲线。

1.2.3 流式细胞术分析细胞周期 HCT-8 细胞接种于 25 cm × 25 cm 培养瓶中,1 × 10⁵ 细胞/培养瓶。24 h 后更换培养液,分别加入 PA 0,2.0 mmol/L,此日被视为第 0 天。在第 3 天用 0.25% 的胰酶消化细胞。经流式细胞仪的荧光激发分类器分析细胞周期比率。

HCT-8 细胞荧光染色操作如下:PBS 清洗离心 2 次;RNA 酶处理,37℃ 水浴 30 min;PBS 清洗离心一次;碘化丙啶(PI)染色,置于 4℃ 冰箱 30 min;装样本待测。

1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 Student's *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 MTT 比色法检测 PA 对结直肠癌 HCT-8 细胞的增殖抑制作用

随着 PA 浓度和作用时间的增加,细胞增殖抑制率明显增加。PA 1 ~ 5 mmol/L 作用 24 h 细胞增殖抑制率为 5.1% ~ 24.3%,48 h 为 16.7% ~ 72.3%,72 h 为 30.2% ~ 93.4%。其中,5.0 mmol/L 浓度的 PA 作用 48 h 和 72 h 出现大量细胞坏死;显示 PA 在此浓度有细胞毒性作用。

同一 PA 浓度作用的不同时间点细胞增殖抑制率比较,差异亦均有统计学意义(*P* < 0.05);同一时间点的不同 PA 浓度细胞增殖抑制率比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)(图 1)。

2.2 PA 对 HCT-8 细胞周期的影响

1.0 mmol/L PA 组,作用 24 h 细胞周期各时相均无明显改变,72 h HCT-8 细胞的 G₀/G₁ 期、G₂ + M 期比例下降,S 期比例升高;2.0 mmol/L PA 组,用药 24 h 细胞周期各时相均无明显改变,72 h HCT-8 细胞的 G₀/G₁ 期比例显著下降,S 期比例显著升高(图 2A-B)。

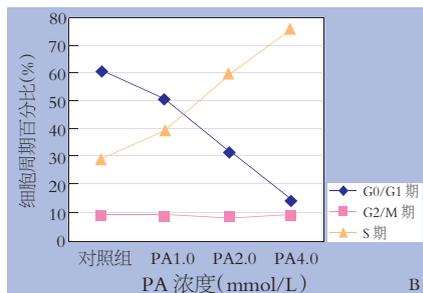
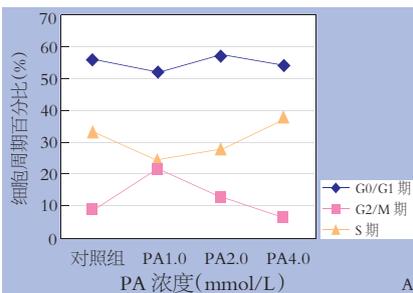
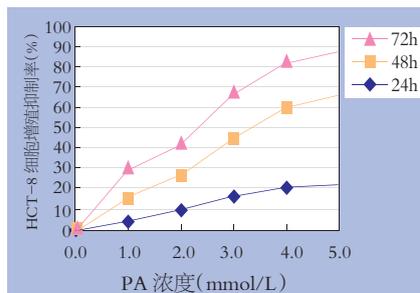


图 1 PA 对 HCT-8 细胞增殖活性的影响

图 2 PA 不同作用时间对 HCT-8 细胞周期比例的影响 A:PA 作用 24h; B: PA 作用 72h

3 讨论

恶性肿瘤是细胞增殖和分化异常的结果。由于肿瘤细胞没有丧失调控正常生长和分化基因表达的能力,故在某些因素影响下,肿瘤细胞可发生变化,向正常细胞方向改变^[2]。诱导分化剂维甲酸等,在治疗白血病的研究和临床应用中,被证实有很好的疗效^[3]。

有研究表明,肿瘤细胞的增殖能力与其分化程度密切相关,即分化程度差的细胞往往比分化程度好的细胞增殖活跃。有关细胞周期的研究发现,肿瘤细胞并不比正常细胞的增殖周期循环速度快,而是靠细胞数量的增长而使肿瘤迅速增长^[4]。因此,抑制肿瘤中参与增殖周期的细胞数、阻抑或延搁肿瘤细胞增殖周期,诱导分化差的细胞向成熟细胞方向转化,是抑制恶性肿瘤生长的一种有效途径。PA及其同源物是一类新型的肿瘤生长调节剂,通过在转录和转录后水平影响基因表达,以改变肿瘤细胞的生物活性^[5]。

本实验证实,PA在细胞水平对结直肠癌细胞HCT-8增殖有极强的抑制作用。PA对结直肠癌HCT-8细胞的增殖抑制呈时间和剂量依赖性。说明HCT-8细胞增殖抑制率与PA浓度及作用时间呈正相关($r = 0.869$ 、 $P < 0.05$),本实验与Li等^[6]应用PA诱导分化髓母细胞瘤细胞系DAOY和D283-MED所得结论相符。

本实验应用流式细胞技术反复检测,证实PA显著降低HCT-8细胞中 G_0/G_1 期和($G_2 + M$)期的比例,显著地提高S期比例。表明PA抑制HCT-8细胞增殖的作用点即为 G_1 期,可能直接抑制结直肠癌细胞中RNA的合成。

近年来,国内外越来越重视从细胞周期角度来探讨诱导分化剂的作用机制。已有研究^[7]表明,诱导分化剂并不能改变细胞周期的长短,其作用形式为减少进入细胞周期的细胞数,并使进入细胞周期的细胞阻滞于细胞周期的某一时相,使大量细胞在特定时相堆积,不能完成整个细胞周期的循环,因而不能完成全部的DNA复制。细胞周期中,处于 G_0 期细胞为暂时游离于细胞周期以外的休眠细胞,是肿瘤复发的根源; G_1 期为mRNA, rRNA, tRNA和核蛋白体的合成期。 G_1 期末期是转录过程的开始,是细胞周期运行的关键时刻。RNA的合成导致结构蛋白和酶蛋白的形成,这些酶用于形成新的细胞成分,为DNA复制作准备。但流式细胞仪对于受到致死性损伤的细胞

在未崩解前,难与正常细胞相区别。所以,本实验发现在PA的作用下,进入S期的细胞增多。大多数细胞虽进入S期初始阶段,但因DNA合成所必需成分减少而不能完成全部的DNA复制,大量细胞停滞于S期末期。本实验中,HCT-8细胞在 $1.0 \sim 4.0$ mmol/L PA作用72h G_0/G_1 期比例明显下降,说明PA对结直肠癌细胞的作用点是针对 G_1 期;也表明在S期完成全部DNA复制的细胞明显减少。本实验结果与Adam等^[8]联合应用PA和Tamoxifen,体外实验证实显著诱导乳腺癌细胞系MCF-7细胞分化,同时伴有 G_0/G_1 期阻滞,所报道的作用方式相一致。

许多化疗药物是作用在增殖活跃的S期;只有肿瘤细胞处在S期,化疗剂才能杀死肿瘤细胞。常用的细胞毒性化疗药物常出现肿瘤细胞耐药现象,是临床上肿瘤治疗的主要难题。PA使肿瘤细胞对化疗药物更加敏感,故PA对结直肠癌化疗与分化诱导协同治疗具有重要意义。

参考文献:

- [1] Jemal A, Murray T, Ward E, *et al.* Cancer statistics [J]. *Cancer J Clin*, 2005, 55(1): 10-30.
- [2] Neish WJ. Phenylacetic acid as a potential therapeutic agent for the treatment of human cancer [J]. *Experientia*, 1971, 27(7): 860-861.
- [3] Qi H, Ratnam M. Synergistic induction of folate receptor beta by all-trans retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in acute myelogenous leukemia cells: mechanism and utility in enhancing selective growth inhibition by antifolates [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(11): 5875-5882.
- [4] Kim SJ, Tumer S, Killion S, *et al.* In vivo measurement of DNA synthesis rates of colon epithelial cells in carcinogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(1): 203-209.
- [5] 任辉,张研,房学东,等. 苯乙酸对结直肠癌HCT-8细胞增殖抑制及同源盒基因表达的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(11): 1350-1352.
- [6] Li XN, Parikh S, Shu Q, *et al.* Phenylbutyrate and phenylacetate induce differentiation and inhibit proliferation of human medulloblastoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(3): 1150-1159.
- [7] Shibahara T, Onishi T, Franco OE, *et al.* Down-regulation of Skp2 is correlated with p27-associated cell cycle arrest induced by phenylacetate in human prostate cancer cells [J]. *Anti cancer Res*, 2005, 25(3): 1881-1888.
- [8] Adam L, Crepin M, Israel L. Tumor growth inhibition, apoptosis, and Bcl-2 down-regulation of MCF-7 ras tumors by sodium phenylacetate and tamoxifen combination [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(6): 1023-1029.