

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.10.004

· 基础研究 (专题) ·

丙戊酸通过上皮钙黏蛋白的核移位诱导结肠癌细胞 EMT 的作用

金武男^a, 吉美瑛^b (延边大学附属医院 a. 放疗科; b. 中心实验室, 吉林 延吉 133000)

[摘要] **目的:**探讨组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂丙戊酸(valproic acid, VPA)对结肠癌细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的作用。**方法:**以结肠癌细胞系 DLD-1、HCT116、SW480 和 HT29 为研究对象,用 MTT 法检测不同浓度(0.5、5 mmol/L) VPA 对结肠癌细胞增殖的影响,用 Western blotting 检测细胞 EMT 相关蛋白上皮钙黏蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(vimentin)的表达水平,免疫荧光染色法检测上皮钙黏蛋白和波形蛋白表型的变化,划痕愈合与 Transwell 侵袭实验检测结肠癌细胞的迁移与侵袭能力。**结果:**不同浓度 VPA 作用 4 种结肠癌细胞 48 h,低浓度 VPA(0.5 mmol/L)对 4 种结肠癌细胞增殖几乎无影响,取 0.5 mmol/L 为实验浓度。0.5 mmol/L VPA 作用后,结肠癌细胞上皮钙黏蛋白表达水平显著下降($P<0.05$)但波形蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);0.5 mmol/L VPA 处理组细胞的上皮钙黏蛋白出现膜衰减和核移位,以及波形蛋白含量显著增加,上述反应在 6 h 后开始且可维持 24 h;0.05 mmol/L 的 VPA 处理可增强结肠癌细胞的迁移和侵袭能力。**结论:**低浓度 VPA 可通过上皮钙黏蛋白的核移位诱导结肠癌细胞 EMT 的发生且明显增强细胞的迁移侵袭能力,因此在结肠癌中选择 HDAC 抑制剂作为一个新型抗癌药物之前应谨慎。

[关键词] 结肠癌;丙戊酸;上皮-间质转化;上皮钙黏蛋白;波形蛋白**[中图分类号]** R735.3⁵; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)10-0994-05

VPA promotes EMT in colon carcinoma cells via nuclear translocation of E-cadherin

JIN Wunan^a, JI Meiyong^b (a. Department of Radiotherapy; b. Department of Research Center, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid (VPA) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colon cancer. **Methods:** With four colon carcinoma cell lines (DLD-1, HCT116, SW480 and HT29) as study subjects, the effect of different concentrations of VPA (0.5, 5 mmol/L) on cell proliferation was detected by MTT assay. The expression level of EMT-related proteins (E-cadherin and vimentin) was detected by Western blotting; Phenotypic changes of E-cadherin and vimentin were detected by immunofluorescence staining; Cell migration and invasion ability was detected by wound healing and Transwell invasion assay, respectively. **Results:** After treated with different concentrations of VPA for 48 h, low concentration of VPA merely exerted any effect on the cell proliferation rate of four colon cancer cell lines, and thus was chosen as the experiment concentration; The results of Western blotting showed that the expression of E-cadherin was reduced ($P<0.05$) and vimentin was increased ($P<0.05$) in colon carcinoma cells by VPA treatment (0.5 mmol/L); Immunofluorescence staining revealed membranous attenuation or nuclear translocation of E-cadherin and enhanced expression of vimentin after VPA treatment (0.5 mmol/L), and these responses occurred after 6 h and sustained until 24 h; Wound healing and Transwell invasion assay showed increased migration and invasion ability following VPA treatment (0.5 mmol/L). **Conclusion:** Low concentration VPA could induce the development of EMT in colon cancer cells by nuclear translocation of E-cadherin, and obviously enhance the migration and invasion ability of colon cancer cells; Thus, HDAC inhibitors, as a new type anti-cancer option, shall be carefully considered before their application in colon cancer.

[Key words] colon carcinoma; valproic acid (VPA); epithelial-mesenchymal transition (EMT); E-cadherin; vimentin

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(10): 994-998. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.10.004]

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率占胃肠道肿瘤的第3位^[1]。近年来发病率和病死率呈加速上升趋势,且手术难度大、易转移^[2]。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)是一类可以调控基因表达的蛋白酶^[3-4]。组蛋白修饰已被证明在上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)控制过程中发挥关键作用。许多研究^[5-6]表明,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 413010173)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 413010173)

[作者简介] 金武男(1962-),男,博士,教授,主要从事肿瘤学研究, E-mail: jinwunan96@hotmail.com

[通信作者] 吉美瑛(JI Meiyong, corresponding author),博士,助理研究员,主要从事肿瘤分子靶向治疗研究, E-mail: meeyeng0823@hotmail.com

各种 HDAC 抑制剂通过上调上皮钙黏蛋白(E-cadherin)在不同实体肿瘤中逆转或减轻 EMT。然而,最近的研究^[7-9]认为 HDAC 抑制剂诱导前列腺癌、头颈部鳞状细胞癌和鼻咽癌的 EMT,可增强肿瘤细胞的转移和侵袭能力。目前,HDAC 抑制剂在结肠癌 EMT 中的作用机制尚未明了。丙戊酸(valproic acid, VPA)是一种含有 8 个碳原子的短链脂肪酸,在临床上是被用作抗惊厥和稳定情绪的药物。研究^[10]发现, VPA 在抗癫痫有效治疗浓度时表现出抑制 HDAC 的活性。本研究通过用 HDAC 抑制剂 VPA 处理结肠癌细胞,观察对结肠癌细胞 EMT 相关上皮钙黏蛋白和波形蛋白(vimentin)及基因的表达,以及细胞增殖、迁移和侵袭的影响,旨在探讨 VPA 诱导结肠癌细胞 EMT 的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

结肠癌细胞系 DLD-1、HT29、HCT116 和 SW480 购自韩国细胞株银行。VPA、波形蛋白抗体购自美国 Sigma 公司,上皮钙黏蛋白、Alexa-488 anti-rabbit IgG (H+L)、Alexa-568 goat anti-mouse IgG (H+L) 抗体购自美国 Invitrogen 公司,DAPI 购自无锡碧云天生物技术有限公司, β -actin 抗体购自美国 GeneTex 公司,MTT 购自美国 Amresco 公司。

1.2 细胞培养

将 4 种结肠癌细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化,每 3~4 d 传代。

1.3 MTT 法检测 VPA 对结肠癌细胞增殖的影响

将对数生长期的结肠癌细胞接种于 96 孔细胞培养板中,调整细胞密度为 5×10^3 个/孔,次日给药,将细胞分成对照组、不同浓度 VPA 组(终浓度依次为 0.5 和 5.0 mmol/L),48 h 后每孔加入 5.0 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l,继续孵育 4 h,终止培养。吸弃上清液加入 150 μ l DMSO,震荡 10 min,于酶标仪上检测波长 490 nm 处的光密度(D)值,绘制细胞增殖曲线。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.4 Western blotting 检测 VPA 对结肠癌细胞上皮钙黏蛋白和波形蛋白表达的影响

VPA 给药处理后收集对数生长期的细胞,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液裂解,提取蛋白并定量。取 15~20 μ l 对照组和 VPA 组的蛋白制作样本,经电泳、转膜、封闭,室温下静置 30~60 min。一抗(稀释比例 1:1 000)处理 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗(稀释比例 1:3 000)室温孵育 1h。显色液显色后,利用凝胶成像系

统进行拍照和结果分析。实验重复 3 次。

1.5 免疫荧光法检测 VPA 对结肠癌细胞上皮钙黏蛋白和波形蛋白表型的影响

将细胞接种于铺有盖玻片的 6 孔板中,次日 VPA (0.5 mmol/L)给药 48 h 之后进行免疫荧光染色。用 4% 多聚甲醛固定 20 min,0.1% Triton X-100 渗透,5% BSA 封闭,一抗(稀释比例 1:1 000)4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗(稀释比例 1:1 000)避光室温 1 h,DAPI 反应 10 min。清洗 10 min,重复 3 次,滴抗荧光淬灭封片液,封片。在激光共聚焦显微镜下观察、拍照并分析。

1.6 细胞迁移及侵袭实验检测 VPA 对结肠癌细胞迁移和侵袭的影响

将对数生长期的结肠癌细胞接种于 6 孔细胞培养板中,常规培养,直至形成单层细胞,在用无血清培养基中培养 4 h 后,用 200 μ l 枪头沿着培养板底部呈“一”字形划痕,PBS 冲洗 3 次,分别加入含 1% 血清的处理组和对照组的结肠癌细胞,培养 48 h 后取样、拍照。

收集对数生长期细胞,经胰酶消化后加入培养液制成单细胞悬液(细胞密度为 2×10^5 /ml)加入 24 孔细胞培养板上室孔中,等细胞稳定贴壁之后把上室培养液换成含 1% 血清的 VPA (0.5 mmol/L)处理液,下室加入含 10% 血清的 DMEM 培养液,培养 48 h,细胞培养板下室中的迁移细胞用苏木精-曙红染色、计数并分析。

1.7 统计学处理

用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析;计数资料以绝对值表示,采用 χ^2 检验进行分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低浓度 VPA (0.5 mmol/L) 对结肠癌细胞增殖无影响

MTT 法检测结果显示,5.0 mmol/L VPA 处理 48 h 后,DLD-1、HCT116、SW480 和 HT29 细胞增殖显著下降[(1.55 \pm 0.17) vs (3.05 \pm 0.08)、(1.22 \pm 0.24) vs (2.93 \pm 0.13)、(0.83 \pm 0.07) vs (2.66 \pm 0.04)、(2.89 \pm 0.17) vs (3.42 \pm 0.12),均 $P < 0.01$];0.5 mmol/L VPA 处理 48 h 后,除对 SW480 细胞增殖有轻微的抑制作用[(2.11 \pm 0.15) vs (2.66 \pm 0.04), $P < 0.05$]外,对 DLD-1、HCT116 和 HT29 细胞增殖均无明显抑制作用[(3.05 \pm 0.08) vs (3.07 \pm 0.37)、(2.93 \pm 0.13) vs (3.23 \pm 0.32)、(3.42 \pm 0.12) vs (3.46 \pm 0.13),均 $P > 0.05$],所以后续实验选用 0.5 mmol/L VPA 处理组的结肠癌细胞。

2.2 低浓度 VPA 下调结肠癌细胞上皮钙黏蛋白和上

调波形蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图1)显示,0.5 mmol/L VPA 处理后,DLD-1、HCT116、SW480 和 HT29 细胞中上皮钙黏蛋白水平下降 $[(0.88\pm 0.13) \text{ vs } (1.07\pm 0.12)$ 、 $(0.39\pm 0.16) \text{ vs } (1.04\pm 0.14)$ 、 $(0.87\pm 0.13) \text{ vs } (1.23\pm 0.25)$ 、 $(0.72\pm 0.10) \text{ vs } (1.05\pm 0.12)$],均 $P<0.05$],而间质标志物波形蛋白的表达水平升高 $[(1.11\pm 0.19) \text{ vs } (0.92\pm 0.12)$ 、 $(1.40\pm 0.17) \text{ vs } (1.22\pm 0.23)$ 、 $(1.07\pm 0.12) \text{ vs } (0.85\pm 0.09)$ 、 $(1.27\pm 0.08) \text{ vs } (1.05\pm 0.13)$],均 $P<0.05$]

2.3 低浓度 VPA 改变结肠癌细胞上皮钙黏蛋白和波形蛋白的表型

0.5 mmol/L 的 VPA 处理 4 种结肠癌细胞后,免疫组化染色、共聚焦显微镜观察结果(图2)显示:上皮钙黏蛋白的膜衰减和核转移,波形蛋白增加;HT29 细胞钙黏蛋白的核转移从 6 h 后开始且可维持 24 h(图3)。

2.4 低浓度 VPA 增强结肠癌细胞的迁移及侵袭能力

划痕实验结果(图4A)显示,VPA(0.5 mmol/L)处

理 48 h 后,DLD-1 和 SW480 细胞划痕愈合率明显强于对照组细胞 $[(63.8\pm 3.2)\% \text{ vs } (33.6\pm 2.4)\%$ 、 $(57.23\pm 0.90)\% \text{ vs } (31.7\pm 2.2)\%$, $P<0.05$]。侵袭实验结果(图4B)显示,VPA 处理后 DLD-1 和 SW480 细胞的侵袭数目显著高于对照组 $[(8\ 361\pm 321.5) \text{ vs } (4\ 933\pm 305.5)$ 、 $(2\ 033\pm 152.8) \text{ vs } (1\ 533\pm 152.8)$, $P<0.05$]。结果表明,0.05 mmol/L VPA 可诱导结肠癌细胞 EMT 的发生。

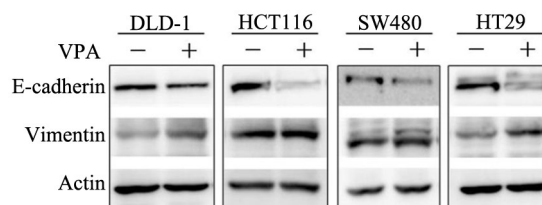


图1 VPA 对结肠癌细胞上皮钙黏蛋白和波形蛋白表达的影响
Fig.1 Effects of VPA on the expression of E-cadherin and vimentin in colon carcinoma cells

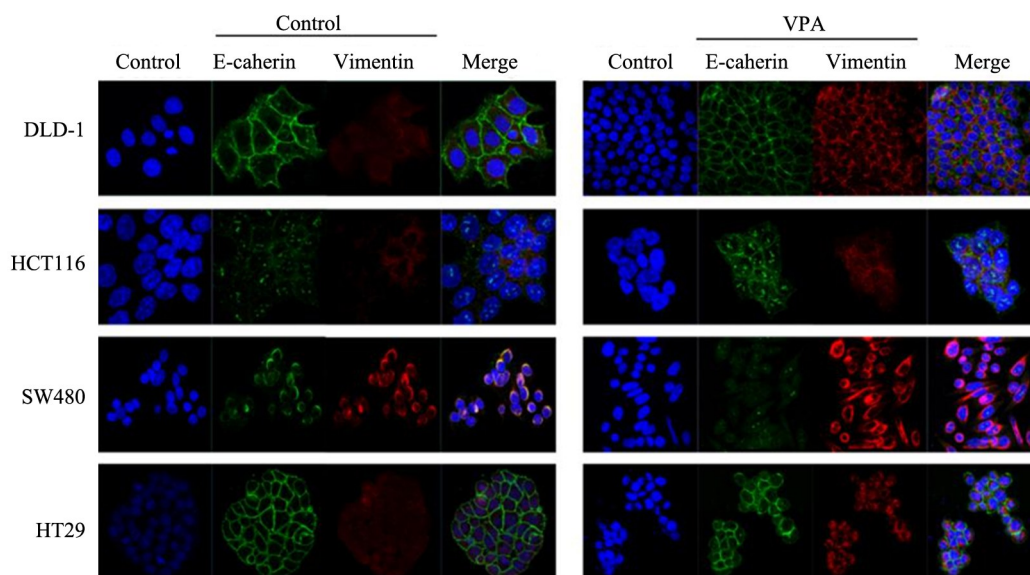


图2 0.5 mmol/L VPA 处理组结肠癌细胞中上皮钙黏蛋白的定位及波形蛋白的增加($\times 630$)
Fig.2 Confocal microscopy revealed the nuclear localization of E-cadherin and increased expression of vimentin in the colon carcinoma cells treated with 0.5 mmol/L VPA ($\times 630$)

3 讨论

EMT 是一基本的病理生理现象,与肿瘤细胞的转移密切相关^[11]。发生 EMT 的上皮细胞经过短暂的结构改变,与周围细胞和基底层接触减少,细胞的迁移和运动能力增强。EMT 的特征是上皮表型相关的蛋白丢失(如上皮钙黏蛋白、ZO-1 等),以及间质表型蛋白的获得。HDAC 抑制剂通过上调上皮钙黏蛋白

在不同实体肿瘤中逆转或减轻 EMT 的发生,HDAC 抑制剂可能是通过抑制 EMT 途径在实体瘤和纤维化疾病中发挥治疗作用。

最近一些研究报道 HDAC 抑制剂能诱导 EMT 的相反结果。WANG 等^[12]研究发现,HDAC 抑制剂伏立诺他(vorinostat)激活转录因子 Slug 诱导肺癌细胞 EMT 的发生。JIANG 等^[9]研究表明,用 HDAC 抑制剂丁酸钠(NaB)或 SAHA 治疗鼻咽癌细胞时细胞呈现

出成纤维细胞样形态,并下调上皮钙黏蛋白、上调波形蛋白的表达。WU等^[13]研究报道HDAC抑制剂VPA通过激活NF- κ B和AKT/GSK-3 β ,从而上调转录因子Snail来促进肝癌细胞的EMT。本研究Western blotting结果显示,HDAC抑制剂VPA通过上调波形蛋白、下调上皮钙黏蛋白的表达,诱导结肠癌细胞EMT的发生,与上述研究报道相一致。

另有研究^[14-15]报道,在结肠癌中发现上皮钙黏蛋白从细胞膜转移到细胞质或细胞核现象,这与肿瘤的转移和预后不良有关。ROBERTSON等^[16]研究显示,SAHA可诱导乳腺癌细胞上皮钙黏蛋白从细胞表面转移至细胞质,但上皮钙黏蛋白含量不变。然而,这些关于肿瘤中上皮钙黏蛋白的定位报道只涉及免疫组化的研究,上皮钙黏蛋白核转移的机制尚不明确^[17]。本研究将VPA的浓度固定在0.5 mmol/L进行所有实验,这是人类使用VPA低毒性范围内的极限浓度^[18]。免疫荧光实验结果显示,VPA可诱导上皮钙黏蛋白含量不变或减少,但在4种结肠癌细胞中均发生核转移。因此笔者认为,在EMT过程中重要的是上皮钙黏蛋白的膜衰减和核转移,而不是mRNA或

蛋白量的变化。

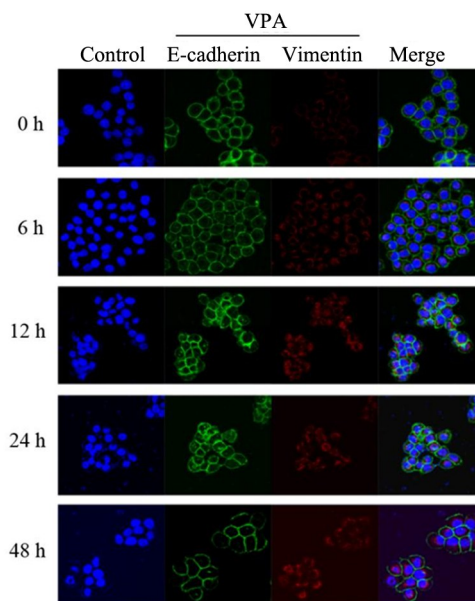
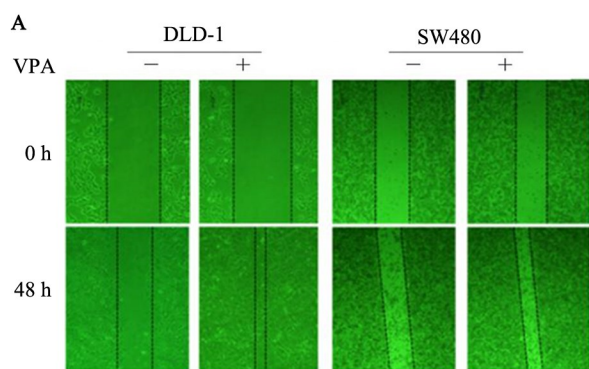


图3 0.5 mmol/L VPA处理的HT29细胞上皮钙黏蛋白出现膜衰减和核移位($\times 630$)

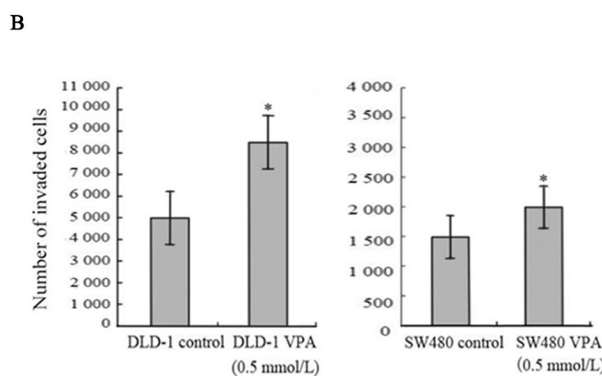
Fig.3 Membranous attenuation or nuclear translocation of E-cadherin in the HT29 cells treated with 0.5 mmol/L VPA($\times 630$)



* $P < 0.05$ vs Control group

图4 0.5 mmol/L VPA处理可增加DLD-1和SW480细胞的迁移(A)及侵袭(B)能力

Fig.4 Migration(A) and invasive(B) abilities increase following VPA (0.5 mmol/L) treatment in the DLD-1 and SW480 cells



在结肠癌细胞中,HDAC抑制剂可提高其响应率,并与常规化疗药物的疗效和耐受细胞毒性潜力有相似作用。许多研究^[19]已经显示,HDAC抑制剂联合放疗或靶向治疗对结肠癌细胞具有协同作用。然而,本研究结果表明HDAC抑制剂VPA诱导结肠癌细胞EMT的发生。因此,在结肠癌中选择HDAC抑制剂作为一个新型抗癌药物单独或联合其他化疗药物时应考虑EMT发生等结果,需要慎用。

[参考文献]

[1] AMOLD M, SIERRA M S, LAVERSANNE M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J].

Gut, 2017, 66(4): 683-691. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
 [2] AGHA K, AKBARI K, ABBAS S H, et al. Acrometastasis following colorectal cancer: a case report and review of literature[J/OL]. Int J Surg Case Rep, 2016, 29: 158-161[2018-04-06]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5118610/. DOI: 10.1016/j.ijscr.2016.10.078.
 [3] VIVANCO I, SAWYERS C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(7):489-501. DOI:10.1038/nrc839.
 [4] PANDURANGAN A K. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(4): 2201-2205. DOI: 10.7314/APJCP.2013.14.4.2201.
 [5] SHAH P, GAU Y, SABNIS G. Histone deacetylase inhibitor entino-

- stat reverses epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by reversing the repression of E-cadherin[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 143(1): 99-111. DOI: 10.1007/s10549-013-2784-7.
- [6] MENG F, SUN G, ZHONG M, et al. Anticancer efficacy of cisplatin and trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine on ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(3): 579-586. DOI: 10.1038/bjc.2013.10.
- [7] KONG D, AHMAD A, BAO B, et al. Histone deacetylase inhibitors induce epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45045[2018-04-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3443231/>. DOI:10.1371/journal.pone.0045045.
- [8] GIUDICE F S, PINTO D S Jr, NOR J E, et al. Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58672[2018-04-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603970/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0058672.
- [9] JIANG G M, WANG H S, ZHANG F, et al. Histone deacetylase inhibitor induction of epithelial-mesenchymal transitions via up-regulation of Snail facilitates cancer progression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(3):663-671. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.002.
- [10] KRAMER O H, ZHU P, OSTENDORFF H P, et al. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC[J]. *EMBO*, 2003, 22(13): 3411-3420. DOI: 10.1093/emboj/cdg315.
- [11] KALLURI R, WEINBERG R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- [12] WANG J, XU MQ, JIANG X L, et al. Histone deacetylase inhibitor SAHA-induced epithelial-mesenchymal transition by upregulating Slug in lung cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2018, 29(1):80-88. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000573.
- [13] WU L, FENG H, HU J, et al. Valproic acid(VPA) promotes the epithelial mesenchymal transition of hepatocarcinoma cells via transcriptional and post-transcriptional up regulation of Snail[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2016,84:1029-1035[2018-04-06]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332216314469>. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.10.023.
- [14] ELZAGHEID A, ALGARS A, BENDARDAF R, et al. E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(27):4304-4309.
- [15] CÉSPEDES M V, LARRIBA M J, PAVÓN M A, et al. Site-dependent E-cadherin cleavage and nuclear translocation in metastatic colorectal cancer model[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(4):2067-2079. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100079.
- [16] ROBERTSON F M, WOODWARD W A, PICKEI R, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid blocks self-renewal and homotypic aggregation of inflammatory breast cancer spheroids[J]. *Cancer*, 2010, 116(11 Suppl): 2760-2767. DOI: 10.1002/cncr.25176.
- [17] SERRA S, SALAHSHOR S, FAGIH M, et al. Nuclear expression of E-cadherin in solid pseudopapillary tumors of the pancreas[J]. *JOP*, 2007, 8(3):296-303.
- [18] MANOQUERRA A S, ERDMAN A R, WOOLF A D, et al. Valproic acid poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management[J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2008, 46(7): 661-676. DOI: 10.1080/15563650802178136.
- [19] MARIADASON J M. HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer [J]. *Epigenetics*, 2008, 3(1):28-37. DOI: 10.4161/epi.3.1.5736.

[收稿日期] 2018-04-08

[修回日期] 2018-07-10

[本文编辑] 党瑞山