

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.01.015

· 基础研究 ·

## 苯丁酸钠对甲状腺滤泡癌细胞侵袭能力及 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响

孙珂, 刘纯\* (重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016)

**[摘要]** 目的: 探讨苯丁酸钠(sodium phenylbutyrate, NaPB)对甲状腺滤泡癌细胞 CGTHW-1 的侵袭能力及基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和金属蛋白酶组织抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1)表达的影响。方法: 培养 CGTHW-1 细胞, 通过 Transwell 侵袭实验观察苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞侵袭能力的影响, 采用免疫细胞化学 SP 法及 RT-PCR 观察苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞中 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白及 mRNA 表达的影响。结果: 4 mmol/L 苯丁酸钠作 72 h, CGTHW-1 细胞的侵袭细胞数显著减少[(29.8 ± 1.77) vs (11.00 ± 2.59), ( $P < 0.01$ )]。免疫细胞化学和 RT-PCR 检测结果 4、6 mmol/L 苯丁酸钠显著抑制 CGTHW-1 细胞中 MMP-9、TIMP-1 蛋白及 mRNA 的表达( $P < 0.05$ )。结论: 苯丁酸钠可通过下调 MMP-9 和 TIMP-1 的表达进而降低甲状腺滤泡癌细胞 CGTHW-1 细胞的侵袭能力。

**[关键词]** 苯丁酸钠; 甲状腺滤泡癌; 侵袭; 基质金属蛋白酶-9; 金属蛋白酶组织抑制剂-1

**[中图分类号]** R736.1; R730.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2009)01-067-04

## Effects of sodium phenylbutyrate on invasive ability of human thyroid follicular carcinoma cell line and expression of MMP-9 and TIMP-1

SUN Ke, LIU Chun\* (Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of sodium phenylbutyrate (NaPB) on the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) expression and invasive ability of human thyroid follicular carcinoma cell line CGTHW-1. **Methods:** CGTHW-1 cells were treated with different concentrations of NaPB, then the invasive ability of CGTHW-1 cells was assessed using Transwell assay. The expression of MMP-9 and TIMP-1 was examined by immunocytochemistry staining and RT-PCR in CGTHW-1 cells. **Results:** After treatment with NaPB (4 mmol/L) for 72 h, CGTHW-1 cells passing the Transwell were significantly reduced[(29.8 ± 1.77) vs (11.00 ± 2.59),  $P < 0.05$ ]. Immunocytochemistry staining and RT-PCR demonstrated that protein and mRNA expression of MMP-9 and TIMP-1 were significantly down-regulated in CGTHW-1 cells after NaPB treatment (4, 6 mmol/L) (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** NaPB can inhibit CGTHW-1 cell invasion by down-regulating MMP-9 and TIMP-1 expression.

**[Key words]** sodium phenylbutyrate; thyroid follicular carcinoma; invasion; matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 67-70]

苯丁酸钠(sodium phenylbutyrate, NaPB)是相对无毒的抗肿瘤药物, 目前的研究多集中在其作为一种组蛋白去乙酰化(histone deacetyltransferase, HDAC)抑制剂诱导癌细胞凋亡、抑制癌细胞增殖等方面<sup>[1]</sup>, 尚未见 NaPB 对癌细胞侵袭能力产生影响的报道。

虽然不同病理类型的甲状腺癌的生物特性不尽相同, 预后也有差别, 但其共同的恶性生物学行为均浸润细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜, 从而发生淋巴结转移。ECM 在肿瘤的侵袭和转移中起着关键性的作用, 基质金属蛋白酶(matrix

metalloproteinase, MMPs)具有降解 ECM 的作用<sup>[2]</sup>, 而基质金属蛋白酶的抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)可抑制 MMPs 的活性<sup>[3]</sup>。本研究应用免疫组化和 RT-PCR 方法, 检测 MMP-9 和 TIMP-1 基因在甲状腺滤泡癌细胞 CGTHW-1 中的表达, 观察苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞侵袭能力的影响及其作用机制, 为开发甲状腺癌新的治疗药

**[作者简介]** 孙珂(1982-), 男, 汉族, 山东省淄博市人, 硕士研究生, 主要研究方向为甲状腺疾病的治疗

\* 通讯作者( Corresponding author ). E-mail: liuchun200157@sina.com

物提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

甲状腺滤泡癌 CGTHW-1 细胞株(具有转移性能)由重庆医科大学病理生理实验室提供, 3T3 细胞由重庆医科大学附属第一医院实验室提供。抗 MMP-9、TIMP-1 一抗和辣根过氧化物酶结合的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Tap 酶、RNAiso Reagent、PrimeScript RT reagent kit 购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 甲状腺细胞培养

CGTHW-1 细胞以含 10% 小牛血清的 1640 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 待细胞基本长满培养瓶底壁时, 胰酶消化、离心, 接种于 2 个或多个培养瓶中, 继续孵育, 传代。

### 1.3 Transwell 小室实验观察苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞侵袭能力的影响

分对照组与实验组两组, 对照组不加任何干预因素, 实验组癌细胞用终浓度为 4 mmol/L 的苯丁酸钠处理, 37 °C 条件下培养 72 h。

在 transwell 小室上铺盖基质胶( matrigel 1, 主要成分是 IV 型胶原), 在上面小室放置  $2 \times 10^5/0.4$  ml CGTHW-1 细胞, 下面小室加入 0.6 ml 3T3 细胞上清液(作为诱导剂, 使上室的癌细胞浸润通过 Matrigel, 穿过 transwell 上聚碳酸酯膜的小孔到达膜下室)。37 °C 条件下培养 24 h, 当下室 24 孔板底部出现穿过 transwell 上小孔的癌细胞时, 用棉签把上室细胞完全擦掉, 对膜下室癌细胞进行 H-E 染色。光镜下计数从上室移到下室的肿瘤细胞数, 将 5 个视野的平均细胞数定义为肿瘤细胞的侵袭力。

### 1.4 免疫细胞化学检测苯丁酸钠作用后癌细胞 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白的表达

将人甲状腺滤泡癌 CGTHW-1 细胞用不同浓度的苯丁酸钠处理, 细胞分组如下: 对照组、4 mmol/L NaPB 组、6 mol/L NaPB 组。培养于 37 °C, 含有 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中 72 h。95% 酒精固定, 0.3% 甲醇双氧水消除内源性过氧化物酶影响, 依次加封闭血清、抗 MMP-9 和 TIMP-1 一抗、辣根过氧化物酶结合的二抗, DAB 显色。

免疫细胞化学染色结果判定: MMP-9 与 TIMP-1 蛋白免疫细胞化学染色阳性信号均在细胞质, 呈棕黄色颗粒。在每组标本中选取 5 个视野, 用 Image-Pro Plus 5.0 软件测定光密度值。

### 1.5 RT-PCR 分析苯丁酸钠作用后癌细胞 MMP-9

### 与 TLMP-1 mRNA 的表达

选用 5 份标本, 每份标本同时培养 2 瓶, 分对照组与实验组, 对照组不加任何干预因素, 实验组癌细胞用最终浓度为 4 mmol/L 的苯丁酸钠处理。37 °C 条件下培养 72 h。提取总 RNA, 500 ng RNA 样本在 20 μl 反应体系中进行逆转录反应, 反应条件为 37 °C、15 min 及 85 °C、5 s 取 cDNA 2 ng, 上、下游引物各 1 μl, TaKaRa Tap 0.25 μl, 在 50 μl 反应体系中进行 PCR 扩增。扩增条件为: 变性 94 °C、30 s, 退火 61.3 °C、30 s, 延伸 72 °C、40 s, 共进行 34 个循环, 72 °C 延伸 10 min。取 5 μl 扩增产物琼脂糖凝胶电泳, 图像分析系统测定条带灰度值。

引物由成都天泰生命科有限公司设计合成。MMP-9: 上游引物 5'-GGGCTTAGATCATTCCCTCAGTG-3', 下游引物 5'-GCACAGTAGTGGCCGTAGAAG-3', 扩增片段为 302 bp; TIMP-1: 上游引物 5'-CTGTTGTTGCTGTGGCTGATAG-3', 下游引物 5'-GTTGTGGGACCTGTGGAAGTAT-3', 扩增片段为 270 bp; β-actin: 上游引物 5'-CACCACACCTTCTACAATGAGC-3', 下游引物 5'-GTGATCTCTTCTGCATCCTGT-3', 扩增片段为 695 bp。

### 1.6 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞侵袭能力的影响

Transwell 小室实验结果显示, 苯丁酸钠作用下穿透 matrigel 胶和聚碳酸酯膜的细胞数 [ $(11.00 \pm 2.59)$  个] 明显低于对照组 [ $(29.8 \pm 1.77)$  个,  $P < 0.05$ ], 提示 CGTHW-1 细胞在苯丁酸钠作用下侵袭能力明显降低(图 1)。

### 2.2 苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞中 MMP-9、TIMP-1 蛋白表达的影响

免疫细胞化学染色结果显示, MMP-9 与 TIMP-1 蛋白阳性染色定位均在细胞质, 呈棕黄色颗粒(图 2)。在苯丁酸钠作用下, CGTHW-1 细胞中的 MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达明显下降( $P < 0.05$ , 表 1)。

### 2.3 苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞中 MMP-9、TIMP-1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, 对照组中 MMP-9 和 TIMP-1 的 RT-PCR 产物灰度值分别为  $0.8372 \pm 0.0687$ 、 $0.5162 \pm 0.0917$ , 实验组中 MMP-9 与 TIMP-1 RT-PCR 产物的灰度值分别为  $0.2994 \pm 0.0393$ 、 $0.1942 \pm 0.0292$ 。说明在苯丁酸钠作用下,

MMP-9、TIMP-1 mRNA 的表达明显降低(图 3,  $P < 0.05$ )。

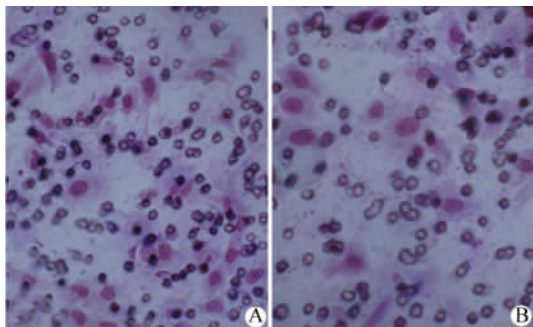


图 1 苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞侵袭能力的影响( H-E,  $\times 100$  )

Fig.1 Effect of NaPB on invasive ability of CGTHW-1 cells ( H-E,  $\times 100$  )

A: Control group; B: Sodium phenylbutyrate group

### 3 讨论

MMPs 是一组金属离子依赖的蛋白酶,它能降解细胞外基质中的各种蛋白成分,从而促进癌细胞

的浸润和转移,为近年来肿瘤侵袭和转移的研究重点。MMPs 抑制剂为基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)。正常情况下,MMP 和 TIMP 相互作用,处于动态平衡中。有研究表明<sup>[4-7]</sup>,MMP-9 蛋白的表达与甲状腺肿瘤大小、浸润程度、淋巴结转移和临床分期有关。而作为 MMP-9 的特异性抑制剂 TIMP-1,具有抑制 ECM 降解的作用,通过减少 ECM 的降解来抑制肿瘤的生长、浸润和转移<sup>[8]</sup>。

表 1 苯丁酸钠作用后 CGTHW-1 细胞中 MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达

Tab.1 Effects of different concentrations of NaPB on expression of MMP-9 and TIMP-1 in CGTHW-1 cells

NaBP ( $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	MMP-9	TIMP-1
0	$0.1175 \pm 0.0050$	$0.1098 \pm 0.0051$
4	$0.1035 \pm 0.0028$	$0.0804 \pm 0.0047^*$
6	$0.0830 \pm 0.0070^*$	$0.0782 \pm 0.0088^*$

\*  $P < 0.05$  vs 0 mmol/L NaPB

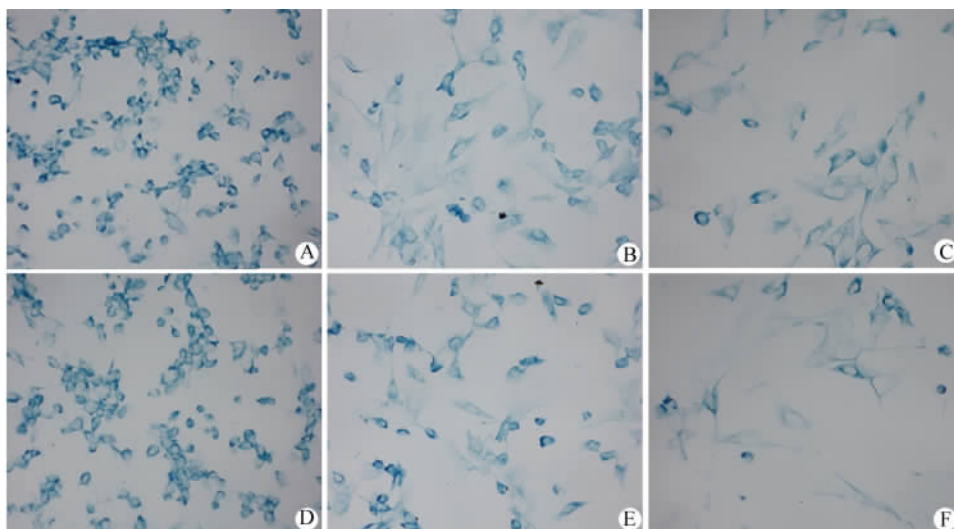


图 2 苯丁酸钠对 CGTHW-1 细胞中 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达的影响(  $\times 200$  )

Fig.2 Effect of NaPB on expression of MMP-9 and TIMP-1 protein in CGTHW-1 cells (  $\times 200$  )

A: MMP-9 expression in control group; B: MMP-9 expression in 4 mmol/L NaPB group; C: MMP-9 expression in 6 mmol/L NaPB group; D: TIMP-1 expression in control group; E: TIMP-1 expression in 4 mmol/L NaPB group; F: TIMP-1 expression in 6 mmol/L NaPB group

本研究通过体外培养 CGTHW-1 细胞,经苯丁酸钠处理,CGTHW-1 细胞侵袭能力明显降低,同时,

随苯丁酸钠作用浓度的增高,CGTHW-1 细胞中的 MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达下降,由此推测,苯丁酸

钠具有调节 MMPs 的基因表达和蛋白质分泌的功能。由于 MMP-9 和 TIMP-1 是决定细胞侵袭能力的一对重要蛋白, 因此表明, CGTHW-1 细胞的侵袭能力的降低与 MMP-9、TIMP-1 的变化有关, 而苯丁酸钠则是导致这种变化的原因。

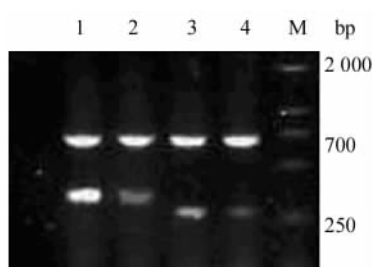


图3 苯丁酸钠处理下 CGTHW-1 细胞 MMP-9 与 TIMP-1 mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of MMP-9 and TIMP-1 mRNA in CGTHW-1 cells treated with NaPB

M: Marker; 1-2: MMP-9 and  $\beta$ -actin RT-PCR Products;  
3-4: TIMP-1 and  $\beta$ -actin RT-PCR Products; 1 and 3:  
Control group; 2 and 4: Experimental group

据 MacDougall 和 Kato 等<sup>[9-10]</sup>报道, 在恶性肿瘤组织中 MMP-9 的表达上调, 而且其含量随癌细胞转移率的增高而增加。在乳腺癌和结肠癌的研究中发现<sup>[11-12]</sup>, TIMP-1 在恶性肿瘤患者的血清浓度和蛋白表达明显高于健康对照。研究表明<sup>[13]</sup>, 肝癌组织中的 MMP-9 表达量及活性均高于正常组织, 其特异性抑制剂 TIMP-1 也较正常组织升高, 但升高程度不及 MMP-9。由此可推断, 在肿瘤发生、发展过程中, MMP-9 的表达增加, 破坏了原有的 MMP-9 与 TIMP-1 的平衡, 导致 MMP-9 的酶活性失控, 降解细胞外基质的能力增强。而随着癌细胞合成、分泌 MMP-9 的增多, 为了维持 MMPs-TIMPs 平衡, TIMP-1 的合成也相应增多, 以抑制 MMP-9 的活化及对基质的降解。本实验表明, CGTHW-1 细胞在苯丁酸钠作用下, 侵袭能力明显降低, 同时伴随着 MMP-9 与 TIMP-1 的表达减少, 在一定程度上从相反的角度支持了上述推测。

以往人们着眼于苯丁酸钠的 HDAC 抑制作用, 重视其对肿瘤细胞的增殖抑制和凋亡诱导。本实验证实了苯丁酸钠可通过下调 MMP-9 和 TIMP-1 的表达, 进而显著抑制甲状腺滤泡癌 CGTHW-1 细胞的侵袭能力, 该结果为拓宽苯丁酸钠抗肿瘤的应用思路提供了重要依据。

## [参考文献]

- [1] Meng M, Jiang JM, Liu H, *et al.* Effects of sodium phenylbutyrate on differentiation and induction of the P21WAF1/CIP1 anti-oncogene in human liver carcinoma cell lines [J]. *Chin J Dig Dis*, 2005, 6(4):189-192.
- [2] Yang Y, Lu N, Zhou J, *et al.* Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2008, 47(9):1299-1310.
- [3] Verstappen J, von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. [J]. *J Dent Res*, 2006, 85(12):1074-1084.
- [4] Cho Mar K, Eimoto T, Tateyama H, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases in benign and malignant follicular thyroid lesions [J]. *Histopathology*, 2006, 48(3):286-294.
- [5] Baldini E, Totter M, Graziano FM, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and their specific inhibitors in normal and different human thyroid tumor cell lines [J]. *Thyroid*, 2004, 14(11):881-888.
- [6] 陈燕昌, 陈大良. 乳头状甲状腺癌基质金属蛋白酶-9 的表达意义 [J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(1):11-12.
- [7] 刘现军, 金东岭, 濮孟辉, 等. CD44V3 在甲状腺癌中的表达及临床意义研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2001, 28(2):100-101.
- [8] Patel A, Straight AM, Mann H, *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP) expression by differentiated thyroid carcinoma of children and adolescents [J]. *J Endocrinol Invest*, 2002, 25(5):403-408.
- [9] MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, *et al.* The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells; suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(18):4174-4181.
- [10] Kato Y, Nakayama Y, Umeda M, *et al.* Induction of 103-kDa gelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(16):11424-11430.
- [11] Schroll AS, Mueller V, Christensen J, *et al.* A comparative study of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in plasma and tumour tissue from patients with primary breast cancer and in plasma from patients with metastatic breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2008, 29(3):181-187.
- [12] Kahlert C, Bandapalli OR, Schirmacher P, *et al.* Invasion front-specific overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in liver metastases from colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(3A):1459-1465.
- [13] Chung TW, Moon SK, Lee YC, *et al.* Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 by hepatitis B virus infection in liver cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 408(2):147-154.

[收稿日期] 2008-11-03

[修回日期] 2009-01-10

[本文编辑] 韩丹