大蒜素对前列腺癌 DU145 细胞增殖和细胞周期的影响*

李 宁¹ 张春芝¹ 崔 文² 王文军^{1△} 李炳辉¹

(¹ 济宁医学院公共卫生学院, ² 济宁医学院医学检验与法医学院, 山东 济宁 272067)

摘要 目的 探索大蒜素对体外培养的前列腺癌 DU145 细胞增殖及细胞周期的影响。**方法** 采用不同浓度的大蒜素分别处理 DU145 细胞 24、48、72h, MTT 比色法检测细胞存活率; 流式细胞仪检测大蒜素处理后细胞周期的变化。**结果** 与对照组相比, 大蒜素处理显著降低 DU145 细胞存活率, 并对细胞周期产生影响, 阻止在 G2/M 期。**结论** 大蒜素可以抑制前列腺癌 DU145 细胞的增殖, 抑制细胞周期。

关键词 大蒜素; 前列腺癌; MTT; 细胞周期

中图分类号: R737.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2015)06-156-03

Effect of allicin on proliferation and cell cycle of prostatic cancer line DU145

LI Ning, ZHANG Chunzhi, CUI Wen, WANG Wenjun, LI Binghui

(School of Public Health, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory and cell cycle effect of allicin on prostatic cancer line DU145. **Methods** Different concentrations allicin were used to treat the cell with 24h, 48h, 72h. The cell survival rate and the effect of cell cycle was analysed by MTT method and Flow cytometry. **Results** The proliferation of DU145 cell was inhibited by allicin. The MTT results show the inhibition was associated with dose and time. The cell cycle was blocked in G2/M phase compared with the control group by flow cytometry results. **Conclusion** The allicin could inhibit the prostatic cancer line DU145 and affect cell cycle.

Keywords: Allicin; Prostatic cancer; MTT; Cell cycle

前列腺癌是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤, 在美国前列腺发病率位居男性恶性肿瘤第一位^[1-4]。我国前列腺癌发病率近年来一直呈现上升趋势, 成为影响男性健康的恶性肿瘤之一^[1]。随着我国老龄化人口的加快, 生活方式的改变, 前列腺癌发病率将进一步上升, 因此, 迫切需要研究预防、治疗前列腺癌的方法^[2-5]。

近年来, 人们越来越多的关注食品 and 食品组分在疾病预防中的作用。从大蒜中提取的大蒜素(含硫有机化合物)是一种具有显著生物活性的植物化学物。流行病学调查及动物、细胞实验表明大蒜素具有抑制肿瘤、抗感染、降低胆固醇等作用^[6-8]。本实验通过 MTT 和流式细胞术, 研究大蒜素对前列腺癌 DU145 细胞的增殖及细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

前列腺癌 DU145 细胞由济宁医学院病理学实验室赠送; DMEM 培养基、小牛血清、0.25% 胰蛋白酶购自 GIBCO 公司; 大蒜素标准品购自上海源叶生物科技有限公司; MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自凯基生物公司; 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术公司; 96 孔细胞培养板、细胞培养瓶购自美国康宁公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将冻存管中的 DU145 细胞于 37℃ 温水中迅速解冻, 离心收集细胞, 采用含有 10% 小牛血清、50U/ml 青霉素、50μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基, 于 37℃、5% CO₂ 的恒温饱和湿度细胞培养箱中进行培养。当细胞 80% 汇合时, 进行传代, 选取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 比色法检测大蒜素对前列腺癌

* [基金项目] 济宁科技发展计划项目(编号: 2013JNWK66); 济宁医学院青年基金项目(编号: JYQ14KJ24)

△ [通信作者] 王文军, E-mail: wwjun1973@163.com

DU145 细胞增殖的影响 用 0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的 DU145 细胞,制备单细胞悬液。血球计数板测定细胞浓度,将细胞悬液稀释至 1.0×10^5 个/ml。96 孔板每孔加入稀释好的细胞悬液 100 μ L,培养 24h。24h 后加入以 DMEM 全培养基稀释的大蒜素溶液,浓度分别为 10.0、20.0、40.0、80.0、160.0 μ g/ml,同时设置只添加 DMEM 全培养基的空白对照,每个浓度设置 3 个重复。分别培养 24h、48h、72h;按照凯基生物 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒说明书中的方法,测定不同药物浓度处理细胞在 490nm 处的吸光度值。细胞存活率=(大蒜素孔 OD/对照孔 OD) $\times 100\%$ ^[9]。

1.2.3 细胞周期检测 取对数生长期的前列腺癌 DU145 细胞,接种于 25ml 细胞培养瓶中,培养 48h,分别加入大蒜素 0、40 μ g/ml,培养 24h,按照碧云天细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书进行细胞固定及染色,用流式细胞仪检测光散射情况及 488nm 激发波长下检测红色荧光。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS 13.0 进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 大蒜素对前列腺癌 DU145 细胞增殖的抑制作用

实验结果表明,10.0、20.0、40.0、80.0、160.0 μ g/ml 浓度的大蒜素对前列腺癌 DU145 细胞增殖均具有抑制作用。DU145 细胞生存率随大蒜素剂量的增加而减小,同一浓度的大蒜素作用下随着时间延长存活率减小,表现出浓度、时间依赖性,细胞生存率与空白对照组有显著差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同浓度、不同作用时间大蒜素对前列腺癌 DU145 细胞存活率(%)

组别	24h	48h	72h
对照组	99.28	99.10	98.69
10 μ g/ml 组	93.23*	82.39*	68.47*
20 μ g/ml 组	87.80*	61.13*	51.68*
40 μ g/ml 组	62.58*	50.70*	42.75*
80 μ g/ml 组	58.19*	43.49*	37.88*
160 μ g/ml 组	54.42*	39.73*	28.50*

注:与同时间对照组比较,* $P < 0.05$

2.2 大蒜素对前列腺癌 DU145 细胞周期影响

流式细胞仪检测结果表明,前列腺癌 DU145 细胞经过大蒜素处理 24h 后,与对照组比较,G0/G1 细胞所占比例显著下降,80 μ g/ml 组下降大于 40 μ g/ml 组;G2/M 期细胞所占比例显著上升,80 μ g/ml 组上升大于 40 μ g/ml 组。见表 2。

表 2 大蒜素对 DU145 细胞周期的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	G0/G1	S	G2/M
对照组	45.69 $\pm$ 1.06	40.65 $\pm$ 0.56	11.32 $\pm$ 1.13
40 μ g/ml 组	31.12 $\pm$ 1.32*	41.98 $\pm$ 1.34*	27.65 $\pm$ 0.96*
80 μ g/ml 组	20.32 $\pm$ 0.68* Δ	42.56 $\pm$ 1.23* Δ	40.89 $\pm$ 1.04* Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 40 μ g/ml 组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

大蒜作为人们日常食用的植物,所含有大蒜素是一种对人体有益的生物活性物质。Kim 等^[10]基于美国 FDA 以证据为基础的审查系统的研究证明大蒜素对胃癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、肺癌和子宫内膜癌具有潜在的抑制作用。研究发现,大蒜素通过对肿瘤细胞增殖的抑制、细胞周期的阻滞、诱导细胞凋亡等方式起到抗肿瘤效果。在人类结肠癌及未分化甲状腺癌细胞研究中,大蒜素通过影响线粒体信号通路将细胞阻滞在 G2/M,并且出现凋亡峰^[11]。

肿瘤的发生是一个复杂的过程,作为一类细胞周期性疾病,通过影响细胞周期抑制肿瘤细胞无限增殖是预防和治疗肿瘤的一种方法。本实验通过不同浓度大蒜素对前列腺癌 DU145 细胞作用不同时间,证明大蒜素对 DU145 细胞增殖具有抑制作用,随着大蒜素使用剂量、作用时间的增加,抑制作用增强。本文流式细胞术检测细胞周期发现,大蒜素对 DU145 细胞的细胞周期具有显著性的影响,随着大蒜素使用剂量的增加,G0/G1 期所占比例下降,G2/M 期所占比例提高,大蒜素将 DU145 细胞阻滞在 G2/M 期。

通过大蒜素抑制前列腺癌 DU145 细胞增殖和细胞周期的研究结果,以及众多流行病学研究结果,大蒜素具有抑制肿瘤的作用,可用于前列腺癌患者的辅助治疗。日常饮食中,经常食用大蒜具有降低癌症发生的风险。

参考文献:

[1] 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国前列腺癌死亡现状及流行

- 趋势分析[J]. 中华泌尿外科杂志, 2012, 33(11): 836-839.
- [2] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(4): 330-334.
- [3] 唐志柳, 白洁, 顾丽娜, 等. 2000~2010年我国前列腺癌和乳腺癌流行状况的系统性疾病[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(4): 260-265.
- [4] 叶定伟, 李长岭. 前列腺癌发病趋势的回顾和展望[J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(3): 177-180.
- [5] 杨士勇, 江晓春. miRNA与恶性肿瘤关系研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2013, 36(6): 438-441.
- [6] Miron T, Wilchek M, Sharp A, et al. Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells[J]. J Natr Biochem, 2008, 19(8): 524-535.
- [7] Takezaki T, Gao C M, Wu J Z, et al. Dietary protective and risk factors for esophageal and stomach cancers in a low-epidemic area for stomach cancer in jiangsu province, China: comparison with those in a high-epidemic area[J]. Cancer Science, 2001, 92(11): 1157-1165.
- [8] 王国芳, 韩海棠, 聂尚丹. 大蒜水提取物对小鼠腹泻治疗作用的实验研究[J]. 济宁医学院学报, 2009, 32(4): 244-245.
- [9] Tao M, Gao L, Pan J, et al. Study on the inhibitory effect of allicin on human gastric cancer cell line SGC-7901 and its mechanism[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2014, 11(1): 176-179.
- [10] Kim J Y, Kwon O. Garlic intake and cancer risk: an analysis using the Food and Drug Administration's evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(1): 257-264.
- [11] Shin H A, Cha Y Y, Park M S, et al. Diallyl sulfide induces growth inhibition and apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells by mitochondrial signaling pathway[J]. Oral Oncol, 2010, 46(4): e15-e18.

(收稿日期 2015-03-22)

(上接第 156 页)

- [16] Wu B, Wei N, Thon V, et al. Facile chemoenzymatic synthesis of biotinylated heparosan hexasaccharide [J]. Org Biomol Chem, 2015, 13(18): 5098-5101.
- [17] Mochizuki H, Yamagishi K, Suzuki K, et al. Heparosan-glucuronate 5-epimerase: molecular cloning and characterization of novel enzyme[J]. Glycobiology, 2015, Epub ahead of print.
- [18] Xiong J, Bhaskar U, Li G, et al. Immobilized enzymes to convert N-sulfo, N-acetyl heparosan to a critical intermediate in the production of bioengineered heparin [J]. J Biotechnol, 2013, 167(3): 241-247.
- [19] Raman K, Kuberan B, Arungundram S. Chemical modification of heparin and heparosan[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1229: 31-36.
- [20] Sheng J, Xu Y, Dulaney S B, et al. Uncovering biphasic catalytic mode of C5-epimerase in heparan sulfate biosynthesis [J]. J Biol Chem, 2012, 287(25): 20996-21002.
- [21] Xu Y, Masuko S, Takeddin M, et al. Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins [J]. Science, 2011, 334(6055): 498-501.
- [22] Bhaskar U, Li G, Fu L, et al. Combinational one-pot chemoenzymatic synthesis of heparin [J]. Carbohydr Polym, 2015, 122: 399-407.
- [23] 陈祥娥, 凌沛学. 大肠杆菌 K5 荚膜多糖硫酸化衍生物的应用 [J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(6): 427-429.
- [24] 陈祥娥. Heparosan 的提取分离及其对肠道菌作用的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [25] Zhao S, Wang Z, Chen J, et al. Preparation of heparan sulfate-like polysaccharide and application in stem cell chondrogenic differentiation[J]. Carbohydr Res, 2015, 401: 32-38.
- [26] Raman K, Mencio C, Desai U R, et al. Sulfation patterns determine cellular internalization of heparin-like polysaccharides [J]. Mol Pharm, 2013, 10(4): 1442-1449.
- [27] DeAngelis P L. HEP tune: a process of conjugating a naturally occurring sugar molecule, heparosan, to a drug for enhanced drug delivery[J]. Drug Dev Deliv, 2013, 13: 34-38.
- [28] Chen J X, Zhang M, Liu W, et al. Construction of serum resistant micelles based on heparosan for targeted cancer therapy[J]. Carbohydr Polym, 2014, 110: 135-141.
- [29] DeAngelis P L. Heparosan, a promising 'naturally good' polymeric conjugating vehicle for delivery of injectable therapeutics[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2015, 12(3): 349-352.
- [30] 段荣帅, 凌沛学, 王凤山, 等. 肝素的抗感染作用[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): II-V.
- [31] Duan R, Chen X, Wang F, et al. Oral administration of heparin or heparosan increases the lactobacillus population in the gut microbiota in mice[J]. Carbohydr Polym, 2013, 94(1): 100-105.
- [32] Munoz E, Xu D, Avci F, et al. Enzymatic synthesis of heparin related polysaccharides on sensor chips: rapid screening of heparin-protein interactions[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(2): 597-602.

(收稿日期 2015-05-26)