

·基础研究·

二烯丙三硫抑制人前列腺癌细胞生长

郝建伟¹, 丘少鹏¹, 毛晓鹏^{1,2*}, 陈羽¹, 郭胜杰¹, 黄斌¹
(中山大学附属第一医院 1. 泌尿外科, 2. 东区外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究二烯丙三硫(DATS)对人前列腺癌 PC-3 细胞的生长抑制作用及相关机制。【方法】MTT 法测定 DATS 对 PC-3 细胞生长的影响;细胞形态学,流式细胞仪(FCM)等检测细胞凋亡;western blot、比色法分别检测凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 和 Bcl-xL/Bcl-xS 的表达以及 Caspase-3 活性变化。【结果】DATS 明显抑制 PC-3 细胞的生长,呈浓度和时间依赖性;DATS 作用 72 h 的 IC₅₀ 为 14 μmol/L;14 μmol/L DATS 作用 PC-3 细胞不同时间后,细胞凋亡率增高;western blot 显示凋亡抑制蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 表达减少,比色法表明 Caspase-3 活性增高。【结论】DATS 诱导细胞凋亡是其抑制前列腺癌 PC-3 细胞生长的重要机制,该机制可能与 Bcl-2、Bcl-xL 和 Caspase-3 表达及活性变化有关。

关键词: 二烯丙三硫; 凋亡; 前列腺癌

中图分类号: R737.25 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)02-0186-04

Mechanism of Growth of Human Prostate Cancer Cells Inhibited by DATS

HAO Jian-wei¹, QIU Shao-peng¹, MAO Xiao-peng^{1,2*}, CHEN Yu¹, GUO Sheng-jie¹, HUANG Bin¹

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Surgery, Dongshan Hospital, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】This study was designed to determine growth inhibition of diallyl trisulfide (DATS) in human prostate cancer cells by inducing apoptosis and further to investigate the mechanism underlying such effect. 【Methods】Growth inhibition by DATS was estimated by the tetrazolium (MTT) assay. Apoptosis induction in DATS-treated cells was assessed by fluorescence microscopy analysis of cells with condensed and segmented nuclei following staining with DAPI and flow cytometric analysis of cells with sub-G1 DNA content following staining with propidium iodide. Protein levels of apoptosis regulating proteins were determined using western blot. The activity of caspase-3 was measured using a colorimetric assay. 【Result】DATS showed tumor growth inhibition in a time- and dose-dependent manner, IC₅₀ of DATS was 14 μmol/L at 72 h. DATS evoked apoptosis as confirmed by cell morphology and by the analysis of flow cytometry. The expression of Bcl-2 and Bcl-xL, the apoptosis-suppressing proteins, was more down-regulated. The activity of caspase-3 was enhanced by DATS. 【Conclusion】DATS inhibits growth of prostate cancer cells by inducing apoptosis in association with down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL and activation of caspase-3.

Key words: diallyl trisulfide; apoptosis; prostate neoplasm

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2): 186-189; 194]

近年来研究表明,大蒜素具有抑制肿瘤细胞生长的生物学特性,并可导致细胞凋亡^[1-2]。二烯丙三硫(diallyl trisulfide, DATS)是大蒜素中主要的烯丙基有机硫化物。本文将从细胞凋亡的角度,探讨 DATS 抑制前列腺癌细胞株 PC-3 细胞生长的效果和机制。

1 材料和方法

1.1 材料

前列腺癌细胞株 PC-3 由本实验室保存;MTT 购于 Roche 公司;大蒜素(DATS 纯度 > 97.98%)购

收稿日期: 2009-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(30872584);教育部博士点基金(20050558065);广东省自然科学基金博士启动项目(9451008901002062);广东省自然科学基金重点项目(8251008901000018)

作者简介: 郝建伟, 博士生, 研究方向: 泌尿系肿瘤, E-mail: exwhao@126.com; * 通信作者: 毛晓鹏, 泌尿外科学博士, 主治医师, 课题负责人, E-mail: mxpzc1979@yahoo.com.cn

于上海禾丰制药有限公司;Cytobuster™ 蛋白抽提试剂购于 Novagen 公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI) 购于 Sigma 公司;Caspase-3 比色分析试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品;Bcl-2、Bax 和 Bcl-xL/Bcl-xS 鼠源单抗为 Zymed 公司产品;ECL 发光试剂盒为 PIERCE 公司产品。细胞于 RPMI-1640 培养液(Gibco)含 100 mL/L 的胎牛血清(Hyclone) 37 °C、体积分数 5%CO₂ 条件下常规培养。

1.2 测定 DATS 的体外杀伤作用

PC-3 细胞以 3.0×10^3 /孔接种 96 孔板,细胞过夜贴壁后换含 0、5、10、15、20、25、30、60 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 培养液。每个浓度 6 个复孔。MTT 法测定加药后 24、48、72 h 的 $D(570 \text{ nm})$,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=用药组活细胞 D 值/对照组活细胞 D 值 $\times 100\%$ 。以细胞数减少 50%的药物浓度确定 DATS 的 IC_{50} 。

1.3 细胞形态学观察

14 $\mu\text{mol/L}$ (72 h 的 IC_{50}) DATS 作用后的细胞在倒置显微镜下观察形态学变化,并拍照。

1.4 细胞凋亡检测

1.4.1 细胞凋亡率的检测 14 $\mu\text{mol/L}$ DATS 作用 24、48、72 h,混合贴壁和悬浮的细胞,PBS 冲洗,离心,用 700 mL/L 乙醇固定,进一步离心后,用 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 RNase A 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的碘化丙啶处理,流式细胞仪(FCM)检测分析 DNA 内容。未处理细胞作为阴性对照。

1.4.2 DAPI 染色 14 $\mu\text{mol/L}$ DATS 作用后,用 40 g/L 多聚甲醛固定药物处理的细胞,PBS 冲洗,用 10 $\mu\text{g/mL}$ DAPI 染色细胞,在放大 200 倍的荧光显微镜检测凋亡细胞,DAPI 染色后细胞核浓缩和破裂的细胞为阳性细胞。未处理细胞作为阴性对照。

1.5 Western blot 检测 Bcl-2、Bax 和 Bcl-x 表达

14 $\mu\text{mol/L}$ DATS 作用 24、48、72 h,用预冷的 Cytobuster™ 蛋白抽提试剂裂解细胞并分离上清。用 BCA 法分析测定蛋白浓度。取等量总蛋白行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印于 PVDF 膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭,用 Bcl-2、Bax 和 Bcl-xL/Bcl-xS 的鼠源性单抗孵育 PVDF 膜 4 °C 过夜,辣根过氧化物酶结合的羊抗鼠二抗处理 PVDF 膜,ECL 发光液显影,曝光。Western blot 检测内参 α -tubulin 的蛋白表达。条带密度用 Image-ProPlus

6.0 软件定量。重复 3 次。

1.6 比色分析法测定 Caspase-3 活性

14 $\mu\text{mol/L}$ DATS 作用 PC-3 细胞 24、48、72 h 后,消化离心,预冷的裂解缓冲液冰上裂解细胞 20 min,4 °C $20\,000 \times g$ 离心 3 min,收集上清与 Caspase-3 底物 DEVD-p-NA 以及反应缓冲液、DTT、DMSO 的混合液,37 °C 孵育 4 h,用 96 孔板在酶标仪 405 nm 比色。PBS 作为阴性对照组。重复 3 次。样品 $D(405 \text{ nm})$ 值与对照样品 $D(405 \text{ nm})$ 值的比值为 Caspase-3 活性的百分率。

1.7 统计分析

计量资料描述采用均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$),组间的比较采用多因素方差分析。

2 结 果

2.1 DATS 的体外杀伤作用

MTT 结果显示 DATS 能明显杀伤 PC-3 细胞,0 ~ 60 $\mu\text{mol/L}$ DATS 作用 72 h 后细胞存活率分别为 0, $(72 \pm 4)\%$, $(63 \pm 5)\%$, $(55.9 \pm 0.6)\%$, $(40.8 \pm 1.9)\%$, $(33.9 \pm 1.1)\%$, $(26 \pm 4)\%$, $(16.2 \pm 1.2)\%$;不同浓度的 DATS 作用不同时间后细胞存活率见图 1A。DATS 的细胞毒性呈明显的时间和剂量依赖性。DATS 作用 72 h 的 IC_{50} 为 14 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 细胞形态学变化

DATS 作用 72 h,见 PC-3 细胞由贴壁脱落,悬浮于培养液中,折光性差,残存的贴壁细胞体积缩小,胞浆浓缩,形态不规则,状态差,出现细胞碎片。对照组细胞贴壁生长,几乎无脱落,胞浆饱满,生长状态良好(图 1B,C)。

2.3 细胞凋亡的检测

流式细胞分析仪检测 14 $\mu\text{mol/L}$ DATS 处理 PC-3 细胞 24、48、72 h 后,sub-G1 期细胞百分率分别为 $(10 \pm 4)\%$, $(21.9 \pm 2.9)\%$, $(33 \pm 4)\%$;与对照组相比,sub-G1 期细胞显著增多,差异有统计学意义(图 2A,B)。

14 $\mu\text{mol/L}$ DATS 作用 72 h 后,在 DAPI 染色分析中,与未处理组细胞相比,DATS 组能观察到核浓缩和破碎的细胞明显增多(图 3A,B)。

2.4 凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 Bcl-xL 和 Bcl-xS 的检测

14 $\mu\text{mol/L}$ DATS 作用 24、48、72 h 后,Bcl-2

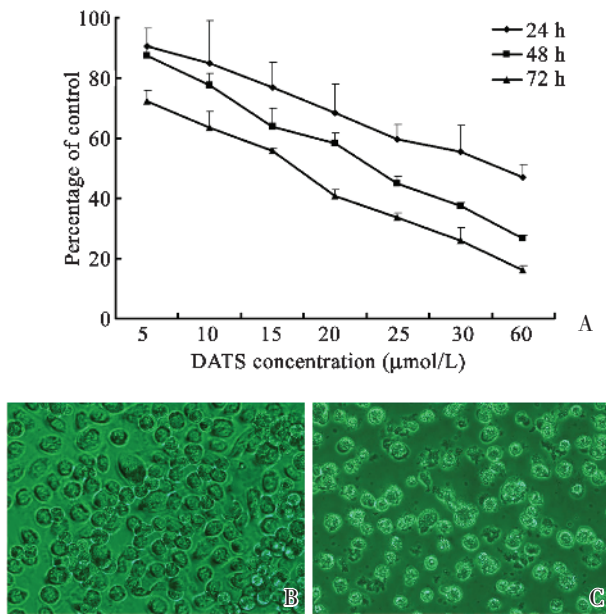


图 1 DATS 的体外杀伤作用

Fig.1 Growth inhibition of DATS

A: MTT assay. Cells were treated with various concentration of DATS and at various time (24, 48 and 72 h); B: Negative control group; C: DATS group; × 200

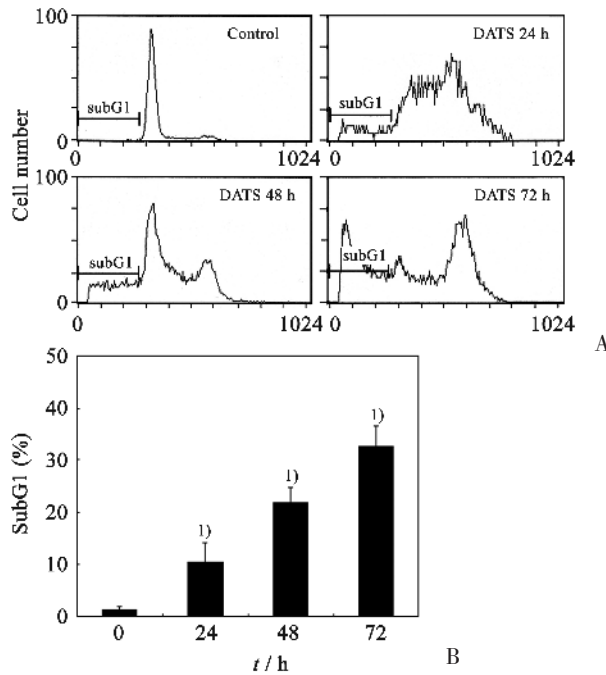


图 2 DATS 引起的 sub-G1 变化

Fig.2 Effect of DATS on sub-G1 populations

A: Flow cytometric assay. The sub-G1 populations appeared in cells exposed to 14 μmol/L DATS at various time (24, 48, 72 h); B: The percentage of sub-G1 were indicated in cells exposed to DATS at various time (24, 48, 72 h); 1) represents $P < 0.05$ compared with control group.

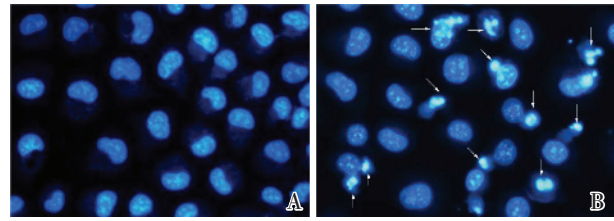


图 3 DATS 诱导的细胞凋亡作用

Fig.3 Apoptosis induced by DATS

Positive cells of apoptosis is indicated by arrow. A: Negative control group; B: DATS group; × 200

蛋白和 Bcl-xL 蛋白表达降低,与未处理细胞相比,差异有统计学意义。而 Bax 或 bcl-xS 蛋白水平无变化(图 4A-C)。

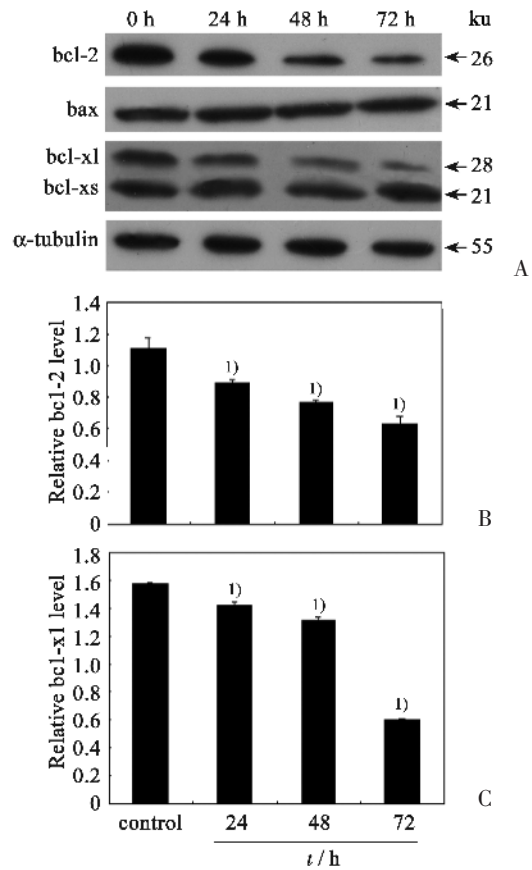


图 4 DATS 作用后凋亡相关蛋白的变化

Fig.4 Changes of apoptosis relative proteins after DATS treatment

A: Bcl-2, Bax, Bcl-xl, Bcl-xS protein expression. 0 h: control group; B: DATS down-regulated Bcl-2 protein expression; C: DATS down-regulated Bcl-xL protein expression; 1) represents $P < 0.05$ compared with control group

2.5 Caspase-3 活性测定

14 μmol/L DATS 作用 16、24、36、48 h 后,

Caspase-3 活性分别为 1.11 ± 0.15 , 1.49 ± 0.17 , 2.02 ± 0.24 , 2.66 ± 0.14 ; 24、36、48 h 组与对照组相比, 差异有统计学意义(图 5)。

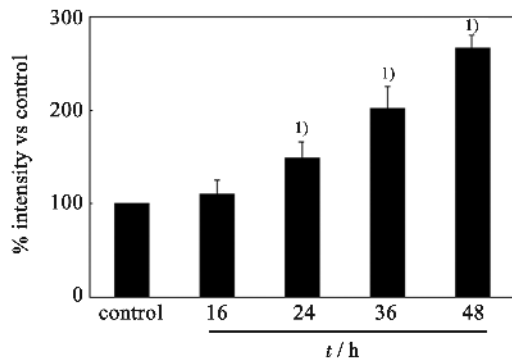


图 5 DATS 作用后 Caspase-3 的活性变化

Fig.5 Change of caspase-3 activity after DATS treatment

1) represents $P < 0.05$ compared with control

3 讨论

前列腺癌是男性泌尿生殖系最常见的恶性肿瘤之一^[3], 目前对晚期前列腺癌病人仍没有有效的治疗方法。流行病学研究发现饮食中摄入大蒜, 可减低不同恶性肿瘤包括前列腺癌的风险。研究表明大蒜中特有的一些有机含硫化物是抑制肿瘤细胞生长的主要物质, 如二烯丙基一硫化物(DAS), 二烯丙基二硫化物(DADS), 二烯丙基三硫化物(DATS)及 S-丙烯丙基硫基半胱氨酸(SAMC)等, 其中 DATS 是大蒜素中主要的有机硫化物。目前有研究表明, 大蒜素能促进肿瘤细胞发生凋亡并抑制肿瘤的生长^[4]。那么 DATS 能否有效抑制前列腺癌细胞的生长并诱导细胞凋亡, 其机制是什么, 是值得我们研究的问题。本实验表明 DATS 能诱导人前列腺癌细胞株 PC-3 细胞凋亡并抑制其生长, 对前列腺癌细胞的杀伤作用与时间和剂量呈依赖性, 凋亡率从 24 h 到 72 h 呈现出时间效应关系。

细胞凋亡是程序性细胞死亡的一个方式, 是被细胞内一系列相关的分子所调控, 并伴随有典型的形态学改变。细胞变小、凋亡小体的形成、细胞核浓缩和破碎以及细胞 sub-G1 部分增多是细胞凋亡的典型特征^[5-6]。本实验中, DATS 处理组细胞均可见典型的凋亡细胞增多, 与阴性对照组有

统计学差异, 表明 DATS 诱导 PC-3 细胞凋亡是其抑制前列腺癌细胞生长的重要机制之一。

由 Bcl-2 家族蛋白调控的凋亡及其复杂。在这些蛋白中, Bcl-2 和 Bcl-xL 具有抑制细胞凋亡的作用, 而 Bax 和 Bcl-xS 能诱导细胞凋亡^[7-9], Bcl-2/Bax 比例降低导致细胞凋亡的发生^[10]。我们研究发现 DATS 处理细胞后, Bcl-2 和 Bcl-xL 蛋白表达水平降低, 而 Bax 和 Bcl-xS 蛋白表达没有改变, Bcl-2/Bax 比例的变化促进 PC-3 细胞凋亡的发生。

Caspase-3 为半胱氨酸蛋白酶家族中的一员, 以酶原的形式存在, 凋亡信号可通过使线粒体释放细胞色素 C 启动凋亡, 最终激活 Caspase-3, 而 Caspase-3 的活化是染色质凝集、DNA 片断化及细胞出泡等凋亡过程所必须的。Caspase-3 的活性只有在细胞凋亡早期才能被检测到, 随着凋亡的进展, 其活性增强, 当时间再延长时, Caspase-3 活性下降^[7]。本研究中, DATS 作用后, Caspase-3 活性表达增强, 与细胞凋亡率的变化相一致。

综上所述, DATS 可以下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达和增加 Caspase-3 表达及其活性, 诱导前列腺癌细胞株 PC-3 细胞凋亡, 这可能是其具有抗癌作用的重要机制之一。DATS 的抗肿瘤效果也为前列腺癌的治疗提供了新思路。

参考文献:

- [1] Das A, Banik NL, Ray SK. Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells [J]. *Cancer*, 2007, 110(5): 1083-1095.
- [2] 曹开源, 毛晓鹏, 丘少鹏, 等. 大蒜素诱导人膀胱癌细胞株 BIU87 细胞凋亡的研究[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(4): 432-434.
- [3] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4): 225-249.
- [4] 曾纪晓, 孙俊杰, 莫家骢, 等. 大蒜素对神经母细胞瘤生长的抑制作用[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(3): 259-263.
- [5] Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology [J]. *Int Rev Exp Pathol*, 1991, 32: 223-254.
- [6] Bryson GJ, Harmon BV, Collins RJ. A flow cytometric study of cell death: failure of some models to correlate with morphological assessment [J]. *Immunol Cell Biol*,

(下转第 194 页 to page 194)