

大蒜油联合 5-FU 诱导腺样囊性癌细胞株 ACC-M 凋亡的研究*

吴发印¹ 周鹤峰² 樊治英¹ 朱雅文¹ 李永辉³ 姚裕坤³ 冉丹³

[摘要] 目的:探讨大蒜油联合 5-FU 诱导腺样囊性癌细胞株 ACC-M 凋亡的效应。方法:人涎腺腺样囊性癌细胞株 ACC-M 细胞培养,分为实验组(5-FU 组、大蒜油组、大蒜油+5-FU 组)和对照组,采用 MTT 法观察肿瘤细胞的体外生长活性;采用流式细胞术分析肿瘤细胞周期和凋亡率的变化。结果:MTT 实验结果显示不同浓度的 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 对 ACC-M 细胞均有抑制作用,随着浓度和作用时间的增加而呈上升趋势;流式细胞术分析显示细胞周期发生明显变化,随着浓度增加、作用时间延长 G₀/G₁ 期的细胞比率上升,S 期无明显变化,而 G₂/M 期的细胞下降,凋亡率显示大蒜油联合 5-FU 诱导 ACC-M 细胞凋亡明显强于单独组。结论:大蒜油能有效诱导腺样囊性癌细胞株 ACC-M 凋亡,大蒜油联合 5-FU 应用对 ACC-M 细胞的作用明显强于大蒜油,5-FU 可单独应用。

[关键词] 大蒜油;5-FU;癌,腺样囊性;凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.03.009

[中图分类号] R730.261 **[文献标志码]** A

Study on garlic oil combined with 5-FU induced apoptosis of adenoid cystic carcinoma cell line ACC-M

WU Fayin¹ ZHOU Hefeng² FAN Zhiying¹ ZHU Yawen¹ LI Yongye³
YAO Yukun³ RAN Dan³

(¹Department of Stomatology, the Fifth Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zhuhai, 519100, China;²Department of Biotechnology, Zunyi Medical College Zhuhai Campus;³Department of Stomatology, Zunyi Medical College Zhuhai Campus)

Corresponding author: WU Fayin, E-mail: wfy660505@sina.com

Abstract Objective: To observe the effect of garlic oil combined with 5-FU induced apoptosis of adenoid cystic carcinoma cell line ACC-M. **Method:** Human salivary adenoid cystic carcinoma cell line ACC-M was cultured, divided into the experimental group(5-FU group, garlic oil group, garlic oil+5-FU group) and the control group, to observe the growth activity of tumor cells by MTT methods; to analyse the changes of cell cycle and apoptosis rate by flow cytometry. **Result:** MTT experiments showed that 5-FU, garlic oil, garlic oil and +5-FU on ACC-M cells have inhibition in different concentration, with the increase of concentration and action time of the rise; Cell cycle analysis showed significant changes in flow cytometry. With the increase of concentration and the acting time, the G₀/G₁ phase of the cell ratio increased, S had no significant change, but G₂/M phase cells decreased. Apoptosis rate display showed garlic oil combined with 5-FU induced apoptosis of ACC-M cells was significantly stronger than single group. **Conclusion:** Garlic oil can effectively induce the apoptosis of adenoid cystic carcinoma cell line ACC-M. The effect of garlic oil combined with 5-FU on ACC-M cells was stronger than the garlic oil, 5-FU used alone.

Key words garlic oil;5-FU;carcinoma,adenoid cystic;apoptosis

腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma, ACC)

* 基金项目:贵州省科学技术基金项目[No:黔科合]字 LKZ(2010)07 号];遵义医学院大学生创新性实验计划项目(No:D-12-11)

¹遵义医学院第五附属(珠海)医院口腔科(广东珠海, 519100)

²遵义医学院珠海校区生物系

³遵义医学院珠海校区口腔系

通信作者:吴发印, E-mail: wfy660505@sina.com

好发于口腔颌面部的唾液腺组织,易沿神经扩散,远处转移率高,是唾液腺疾病引起死亡的重要原因。大蒜油及其分解物具有广泛抗癌、防癌作用,近年已成为人们关注的热点。本研究通过细胞培养及 MTT 实验、流式细胞术检测方法分析大蒜油诱导 ACC 细胞株 ACC-M 凋亡的效应。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人涎腺 ACC-M 细胞由第四军医大学口腔医学院提供;大蒜油由广州菲博生物科技有限公司提供;5-FU 由上海旭东海普药业有限公司生产;流式细胞仪型号:FACS-can(B, D USA)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 人涎腺 ACC 细胞株 ACC-M 在含有 10% 小牛血清、青霉素 1×10^5 U/L 及链霉素 100 mg/L 的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 条件下传代培养。

1.2.2 实验分组 根据作用的药物不同分为实验组(5-FU 组、大蒜油组、大蒜油+5-FU 组)和对照组即 DMSO 液组。

1.2.3 细胞体外生长活性检测 MTT 比色分析法检测 2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L 的 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 分别作用于 ACC 细胞株 ACC-M 细胞 12、24、48、72 h 后的吸光度(A)值。换算成癌细胞生长抑制率=(1-实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%。

1.2.4 细胞周期变化检测 4.0、8.0、16.0 mg/L 的 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 作用 4、8 h 后收集人 ACC-M 细胞,800 r/min 离心 5 min,用冷 PBS 清洗 2 遍,离心弃上清 500 μl 冷 PBS 重悬,加入 5 ml 预冷的 70%乙醇固定 24 h,离心沉淀后再用冷 PBS 洗 2 遍,400 μl 冷 PBS 重悬,加入适当浓度的 RNA 酶和 PI 染液,冰浴避光染色 30 min,过 400 目尼龙膜于流式细胞管中,上机检测,自带软件进行细胞周期分析并绘制 DNA 分布图,分析肿瘤细胞 G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期的比率。

1.2.5 细胞凋亡率检测 4.0、8.0、16.0 mg/L 的 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 作用 24 h 后收集人

ACC-M 细胞,800 r/min 离心 5 min,冷 PBS 洗涤 2 遍,离心弃去上清后 250 μl 结合缓冲液重悬细胞,调整细胞数至 1×10^9 个/L,取细胞悬液 100 μl 于 5 ml 流式管中,加入 5 μl AnnexinV-FITC 和 10 μl PI,混匀后室温避光孵育 15 min,加入 400 μl PBS 液,流式细胞仪分析并计算凋亡比率。

2 结 果

2.1 细胞体外生长活性检测结果

浓度 2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L 的 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 及作用时间 12、24、48、72 h 对 ACC-M 细胞的 MTT 实验结果,5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 对 ACC-M 细胞均有明显的抑制作用。药物的连续作用对 ACC-M 细胞的抑制作用,随着浓度和作用时间的增加而呈上升趋势,高浓度 32.0 mg/L 时抑制作用明显增强,大蒜油+5-FU 组作用明显强于大蒜油组和 5-FU 组。见表 1。

2.2 细胞周期变化检测结果

ACC-M 细胞在浓度为 4.0、8.0、16.0 mg/L 的 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 诱导后分别于 4、8 h 收集,流式细胞仪检测 G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期的变化。结合表 2、3 结果显示:细胞周期发生明显变化,随浓度增加、作用时间延长 G₀/G₁ 期的细胞比率上升,S 期无明显变化,而处于 G₂/M 期的细胞比率下降。

2.3 细胞凋亡率检测结果

ACC-M 细胞在浓度为 4.0、8.0、16.0 mg/L 的 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 诱导 24 h 后,流式细胞仪检测细胞的凋亡率见表 4。结果表明 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 均能诱导 ACC-M 细胞凋亡,5-FU 和大蒜油无明显差异,而大蒜油联合 5-FU 诱导作用明显增强。

表 1 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 对 ACC-M 细胞抑制率(n=6)

浓度/ (mg · L ⁻¹)	12 h			24 h		
	5-FU	大蒜油	大蒜油 + 5-FU	5-FU	大蒜油	大蒜油 + 5-FU
2.0	2.7±1.5	1.5±0.5	9.4±2.2	7.5±1.9	2.0±0.8	14.2±2.8
4.0	3.0±0.6	3.6±0.9	18.4±3.6	9.6±2.2	8.8±1.7	21.6±6.2
8.0	5.3±0.8	6.9±1.3	19.3±2.0	11.2±2.9	10.7±2.0	27.8±4.8
16.0	10.0±1.2	9.2±2.5	42.2±5.5	16.0±3.7	12.6±2.7	30.7±4.3
32.0	10.7±2.6	45.8±5.5	53.3±4.5	17.0±2.5	45.8±6.7	55.7±8.3
浓度/ (mg · L ⁻¹)	48 h			72 h		
	5-FU	大蒜油	大蒜油 + 5-FU	5-FU	大蒜油	大蒜油 + 5-FU
2.0	27.0±4.7	4.4±1.5	29.9±7.4	28.5±8.5	13.4±3.4	35.0±5.4
4.0	27.5±4.1	9.0±3.0	31.1±6.3	33.8±4.5	25.2±3.2	38.6±7.8
8.0	31.0±3.8	16.3±4.5	35.1±4.1	39.9±5.6	37.0±4.1	44.2±5.7
16.0	39.6±7.1	19.4±4.0	45.1±5.9	42.9±6.1	39.7±6.2	54.8±8.3
32.0	51.8±6.1	50.3±7.0	57.0±8.9	52.0±9.1	51.0±8.2	69.6±9.9

%

表 2 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 对 ACC-M 细胞周期 4 h 影响 (n=6)

浓度/ (mg · L ⁻¹)	5-FU			大蒜油			大蒜油+5-FU			%
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
4.0	35.7±3.8	50.3±4.0	14.2±2.4	24.6±4.9	51.3±3.7	24.1±3.2	21.6±2.9	51.3±3.4	27.1±2.5	
8.0	37.7±4.6	52.0±4.8	10.3±3.3	38.4±4.5	51.1±3.9	10.5±3.2	29.5±3.3	56.3±5.8	14.2±2.1	
16.0	40.8±4.7	52.9±2.3	6.3±1.8	42.0±3.0	54.9±2.7	3.2±0.8	36.1±4.5	53.9±4.9	9.9±1.8	

表 3 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 对 ACC-M 细胞周期 8h 影响 (n=6)

浓度/ (mg · L ⁻¹)	5-FU			大蒜油			大蒜油+5-FU			%
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
4.0	38.4±3.6	53.2±4.8	8.2±1.9	40.1±3.9	52.1±4.0	7.8±1.0	43.9±5.4	52.8±4.4	3.3±0.7	
8.0	44.4±4.0	50.3±5.9	5.2±1.3	46.8±5.8	50.7±4.9	2.5±0.7	44.0±4.8	53.0±5.2	3.0±0.9	
16.0	45.0±4.8	52.0±5.0	3.0±0.5	42.4±4.1	54.2±5.8	3.4±0.3	46.3±2.8	51.2±4.5	2.5±0.4	

表 4 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 诱导 ACC-M 细胞的凋亡率 (n=6)

浓度/ (mg · L ⁻¹)	5-FU	大蒜油	大蒜油+5-FU	%
4.0	16.8±2.8	17.9±3.5	30.6±3.0	
8.0	20.4±3.4	19.6±4.3	36.7±4.8	
16.0	24.8±2.7	26.6±3.8	41.6±5.7	

3 讨论

口腔颌面部恶性肿瘤以癌最为常见。ACC 好发于口腔颌面部的唾液腺组织,是最常见的唾液腺恶性肿瘤之一。肿瘤易沿神经扩散,常出现神经症状,如局部疼痛、面瘫、舌麻木或舌下神经麻痹。肿瘤浸润性极强,与周围组织无界限。肿瘤易侵入血管,血道转移率高达 40%,转移部位以肺部为最多见,颈淋巴结转移率低。ACC 是涎腺疾病引起死亡的重要原因^[1-2]。唾液腺 ACC 的治疗以综合治疗为主即手术治疗辅以术前术后放化疗。铂类、5-FU 和蒽环类是用于治疗 ACC 的常用化疗药物,但疗效往往不佳,主要原因是应答率低及严重的不良反应和肿瘤对化疗药物产生的耐药反应^[3]。

大蒜油是大蒜经水蒸气蒸馏制得的挥发油,室温下即会发生分解成为多种含硫化合物,主要包括二烯丙基硫醚、二烯丙基二硫、二烯丙基三硫(俗称大蒜素)等^[4]。预防流行病学和现代药学研究证明:大蒜油中所特有的有机含硫化合物对许多革兰阴性菌和革兰阳性菌以及真菌等具有很强的杀菌作用,已广泛应用于抗真菌、抗细菌、抗病毒、降血脂和血压、防治动脉粥样硬化等心血管疾病,而且还有良好的抗癌、防癌作用^[5-6]。Zhang 等^[7]在大蒜素诱导胃癌细胞凋亡机制的研究中发现大蒜素可以通过内外途径减少线粒体细胞色素 C 的释放和增加 caspase-3、caspase-8、caspase-9 激活来调控

胃癌细胞凋亡。Bat-Chen 等^[8]在新鲜大蒜提取物大蒜素对结肠癌细胞作用及其机制的研究中发现大蒜素对结肠癌细胞有抑制作用,可能是通过 Nrf2 诱导肿瘤细胞凋亡。Tsubura 等^[9]研究大蒜及大蒜提取物对乳腺癌的作用及其机制时,发现来自大蒜的水不溶性化合物抑制乳腺癌生长较水溶性化合物更有效,富硒大蒜或有机硒化合物抑制大鼠乳腺肿瘤的生长和抑制体外培养乳腺癌细胞的作用比天然大蒜或单独含硫类似物更强;二烯丙基二硫能增强乳腺癌抑制剂二十碳五烯酸的效果,并拮抗乳腺癌增强剂亚油酸作用;此外,大蒜提取物还能降低抗癌药物所造成的不良反应。Padilla-Camberos 等^[10]在探讨大蒜素对小鼠淋巴瘤 L5178Y 作用时发现大蒜素能抑制淋巴瘤细胞增殖并促进其凋亡,其作用机制可能与上调 caspase-3 有关。吴发印等^[11]报道大蒜素可以抑制黏液表皮样癌的生长。

大蒜素的防癌和抗癌作用已成为人们关注的热点。本实验通过 ACC-M 细胞进行细胞培养。按 2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L 浓度梯度分别加入 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU,在 12、24、48、72 h 四个时间点终止,测定各孔 A_{490 nm} 值,换算成抑制率。研究发现 5-FU、大蒜素、大蒜素+5-FU 对 ACC-M 细胞均有明显的抑制作用,药物的连续作用对 ACC-M 细胞的抑制作用随着浓度和作用时间的增加而呈上升趋势,高浓度 32.0 mg/L 的抑制作用明显增强,大蒜油+5-FU 组作用明显强于大蒜油组和 5-FU 组。ACC-M 细胞在浓度为 4.0、8.0、16.0mg/L 的 5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 诱导后分别于 4、8 h 收集,流式细胞仪检测,结果显示细胞周期发生明显变化,随浓度增加、作用时间延长 G₀/G₁ 期的细胞比率上升,S 期无明显变化,

(下转第 181 页)

基酸序列的特点,由于 α -螺旋一面是亲水残基,一面是疏水残基,所以此类结构使得含 PTD 的蛋白易于穿越细胞的膜组织。利用该 PTD 将与之结合的化合物、肽、反义肽核酸或与之融合表达的全长蛋白质通过非受体依赖方式运送至细胞内的一种技术称为蛋白转导技术^[8],最终进一步提高自杀基因 CD/UPRT 的表达强度,达到杀伤肿瘤细胞的目的。

本研究选择通过稳定转染建立携带 E6. BARF1p. CD/UPRT. UL49 自杀基因体系的 CNE-2 细胞株,为进行鼻咽癌的基因-放射治疗体外和体内实验奠定基础。

参考文献

- [1] SPANO J P, BUSSON P, ATLAN D, et al. Nasopharyngeal carcinomas: an update[J]. *Eur J Cancer*, 2003,39:2121-2135.
- [2] PAK M W, TO K F, LO Y M, et al. Nasopharyngeal carcinoma in situ (NPCIS)-pathologic and clinical perspectives[J]. *Head Neck*,2002,24:989-995.
- [3] SANCHEZ-PEREZ L, KOTTKE T, DANIELS G A, et al. Killing of normal melanocytes, combined with heat shock protein 70 and CD40L expression, cures large established melanomas[J]. *J Immunol*, 2006,177:4168-4177.
- [4] BOSENBERG M, MUTHUSAMY V, CURLEY D P, et al. Characterization of melanocyte-specific inducible Cre recombinase transgenic mice[J]. *Genesis*, 2006,44:262-267.
- [5] 卿菁,赵素萍,蒋卫红,等. BARF1 基因的启动子活性及其在鼻咽癌细胞中肿瘤特异性分析研究[J]. *现代实用医学*,2013, 25(5):492-494.
- [6] 唐瑶云,肖健云,赵素萍. 靶向性质粒表达载体 pcDNA3.1(-)CMV Egr-1. CDglyTK 的构建及转染研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2003, 9(1): 34-37.
- [7] BOENICKE L, CHU K, PAULS R, et al. Efficient dose-dependent and time-dependent protein transduction of pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo using purified VP22-EGFP fusion protein[J]. *J Mol Med(Berl)*,2003,81:205-213.
- [8] XIONG F, XIAO S, YU M, et al. Enhanced effect of microdystrophin gene transfection by HSV-VP22 mediated intercellular protein transport[J]. *BMC Neurosci*,2007,8:50-50.

(收稿日期:2013-03-26)

(上接第 177 页)

而处于 G₂/M 期的细胞下降。细胞凋亡率检测结果显示:5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 均能诱导 ACC-M 细胞凋亡,5-FU 和大蒜油无明显差异,而大蒜油联合 5-FU 诱导作用明显增强,说明大蒜油+5-FU 可有效诱导 ACC-M 细胞的凋亡。

参考文献

- [1] 张志愿. 口腔颌面外科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2012:369-370.
- [2] 谭向荣,葛明华. 头颈部腺样囊性癌的治疗进展[J]. *中国肿瘤*,2011,20(11):847-849.
- [3] 王学辰. 腮腺腺样囊性癌的治疗进展[J]. *中国癌症杂志*,2008,18(8):710-713.
- [4] 张翠丽,曾涛,赵秀兰,等. 大蒜油与顺铂对人卵巢癌 SKOV₃ 细胞生长抑制的联合作用[J]. *毒理学杂志*, 2010,24(2):116-119.
- [5] RAJPUT S, MANDAL M. Antitumor promoting potential of selected phytochemicals derived from spices: a review[J]. *Eur J Cancer Prev*,2012,21:205-215.
- [6] ICIEK M, KWIECIEN I, WLODEK L. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds [J]. *Environ Mol Mutagen*,2009,50:247-265.
- [7] ZHANG W, HA M, GONG Y, et al. Allicin induces apoptosis in gastric cancer cells through activation of both extrinsic and intrinsic pathways[J]. *Oncol Rep*, 2010,24:1585-1592.
- [8] BAT-CHEN W, GOLAN T, PERI I, et al. Allicin purified from fresh garlic cloves induces apoptosis in colon cancer cells via Nrf2 [J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62: 947-957.
- [9] TSUBURA A, LAI Y C, KUWATA M, et al. Anti-cancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control[J]. *Anticancer Agents Med Chem*,2011,11:249-253.
- [10] PADILLA-CAMBEROS E, ZAITSEVA G, PADILLA C, et al. Antitumoral activity of allicin in murine lymphoma L5178Y [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11: 1241-1244.
- [11] 吴发印,陈琼,周鹤峰,等. 大蒜素对黏液表皮样癌细胞株抑制作用的研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2010,24(21):987-989.

(收稿日期:2013-03-20)