

大蒜素抑制人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞生长的实验研究

贾 丽

摘 要 **目的** 研究大蒜素抑制人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞生长的作用,并探讨其可能的作用机制。**方法** 以不同浓度大蒜素(12.5、25、50 $\mu\text{g/ml}$)和顺铂(40 $\mu\text{g/ml}$)分别干预对数生长期 Ishikawa 细胞,采用 MTT 法检测 Ishikawa 细胞增殖抑制;通过流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡状况,采用 Western blot 法检测 Ishikawa 细胞中 caspase-3 蛋白表达,RT-PCR 法检测 Ishikawa 细胞中 Bax mRNA、bcl-2 mRNA 表达并计算 Bax/bcl-2 表达比值。**结果** 大蒜素能够显著提高子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖抑制率、阻滞 Ishikawa 细胞周期于 G_2/M 期,提高细胞凋亡率、上调 caspase-3 蛋白和 Bax mRNA 表达、下调 bcl-2 mRNA 表达、提高 Bax/bcl-2 表达比值,且上述作用均具有一定的剂量依赖性。**结论** 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖具有抑制作用以及促其凋亡的作用,从而表现出其抑制 Ishikawa 细胞生长的作用;作用机制可能与大蒜素能够改变 Ishikawa 细胞周期以及调节凋亡相关基因、蛋白表达有关。

关键词 大蒜素 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞 增殖 凋亡

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.033

Experimental Study of Allitridi Inhibiting the Growth of Endometrial Lshikawa Cancer Cell. Jia Li. Handan Central Hospital, Hebei 056001, China

Abstract **Objective** To investigate the inhibiting effects of Allitridi on the growth of endometrial Ishikawa cancer cell. **Methods** The endometrial Ishikawa cancer cells in logarithmic period were treated with different concentration of Allitridi(12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$) and Cisplatin(40 $\mu\text{g/ml}$). The cellular growth inhibition rate was calculated by MTT, cell cycle and apoptosis rate were analyzed by flow cytometry. The expression of caspase-3 protein expression was detected by Western blotting, the expression of Bax mRNA and bcl-2 mRNA were detected by RT-PCR, and the ratio of Bax/bcl-2 was calculated. **Results** Allitridi had the effects of increasing the cellular growth inhibition rate, arresting the cell cycle at G_2/M phase, increasing the apoptosis rate, up-regulating the expression of caspase-3 protein and Bax mRNA, down regulating the expression of bcl-2 mRNA, increasing the ratio of Bax/bcl-2, which were dose-dependent. **Conclusions** Allitridi had inhibitive effects on the proliferation and apoptosis of endometrial Ishikawa cancer cell, which perhaps related to its effects of changing the Ishikawa cell cycle and regulating the expression of apoptosis-related genes and protein expression.

Key words Allitridi; Endometrial cancer; Ishikawa cell; Proliferation; Apoptosis

子宫内膜癌占女性恶性肿瘤的 7% 左右,仅次于乳腺癌、肺癌和大肠癌,占女性生殖系统恶性肿瘤的 30% 左右^[1]。大蒜素是一种具有多种生物学活性的二烯丙基三硫化物,由百合科植物大蒜球茎中分离所得。近年来,多项研究表明大蒜素对卵巢癌、宫颈癌、胃癌、肺癌等均具有一定的抑制作用,但大蒜素是否对子宫内膜癌具有治疗作用尚未见文献报道^[2~5]。本实验通过体外培养人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞并给予大蒜素进行干预,以顺铂为阳性对照药物,研究大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细

胞增殖和凋亡的影响。

材料与方法

1. 实验细胞:子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株购自上海拜力生物科技有限公司。

2. 实验药物与试剂:大蒜素注射液(上海禾丰制药有限公司产品,规格:5ml:60mg);注射用顺铂(山东齐鲁制药有限公司);DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);MTT、DMSO(美国 Sigma 公司);Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物发展有限公司);bcl-2、Bax 引物(上海博亚生物公司);caspase-3 单抗(碧云天生物技术有限公司)。

3. 实验方法:(1)细胞培养、分组与给药:子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株经解冻复苏后常规培养于

DMEM 培养液中(含 10% 胎牛血清、双抗各 100 μ g/L),取对数生长期细胞并给予不同浓度大蒜素(12.5、25、50 μ g/ml)和顺铂(40 μ g/ml)进行干预处理,48h 后进行相关指标检测。(2)MTT 法检测细胞增殖抑制率:将各组细胞调整浓度为 5×10^4 /ml,接种于 96 孔板($n = 10$),每孔滴加 20 μ l MTT 溶液(5mg/ml),作用 4h 后去上清、滴加 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO),10min 后通过酶标仪测定各孔细胞于波长 570nm 处的吸光度值(A),细胞增殖抑制率($\%$) = $[1 - (\text{实验组 } A - \text{空白组 } A) / (\text{对照组 } A - \text{空白组 } A)] \times 100\%$ 。(3)通过流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡状况:各组细胞经胰酶消化和 PBS 溶液洗涤后,以 $1 \times \text{Binding Buffer } 500\mu\text{l}$ 混悬制作浓度约 1×10^5 的单细胞混悬液,经 Annexin V/PI 染色后通过流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡状况。(4)Western blot 法检测细胞中 caspase-3 蛋白表达:弃培养液取细胞并经 PBS 溶液洗涤后行超声碎裂,离心取上清液,通过 BCA 法测定蛋白浓度,采用 Western blot 法检测细胞中 caspase-3 蛋白表达,孵育完成后经 ECL 显色,实验结果应用 Quantity One 软件进行分析。(5)RT-PCR 法检测细胞中 bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达:通过基因文库查询并设计 bcl-2、Bax、 β -actin 基因上下游引物;弃上清取细胞并经胰酶消化处理后,加入适量 TRIzol 试剂提取总 RNA 并测定总 RNA 浓度,反转录为 cDNA 后进行 PCR 反应,扩增完毕后取 PCR 产物于琼脂糖凝胶电泳,最后通过凝胶成像仪观察并照相;以 β -actin 为内参,半定量分析 bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达并计算 Bax/bcl-2 表达比值。

4. 统计学方法:运用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)方式表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖抑制

率的影响:大蒜素各组 and 顺铂组 Ishikawa 细胞增殖抑制率较正常对照组均显著升高($P < 0.01$),大蒜素高剂量组细胞增殖抑制率显著高于顺铂组($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	增殖抑制率($\%$)
正常对照组	10	0.0 ± 0.0
大蒜素低剂量组	10	$25.1 \pm 5.4^*$
大蒜素中剂量组	10	$46.7 \pm 8.0^*$
大蒜素高剂量组	10	$63.9 \pm 10.5^{**}$
顺铂组	10	$42.8 \pm 6.3^*$

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与顺铂组比较, # $P < 0.05$

2. 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞周期的影响:大蒜素中、高剂量组和顺铂组 G_2/M 期 Ishikawa 细胞数量显著增多($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明大蒜素能够将 Ishikawa 细胞阻滞于 G_2/M 期而起到抑制其增殖的作用,详见表 2。

表 2 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞周期		
		G_0/G_1 期($\%$)	S 期($\%$)	G_2/M 期($\%$)
正常对照组	10	56.9 ± 1.5	28.6 ± 1.7	14.5 ± 0.8
大蒜素低剂量组	10	58.0 ± 2.4	24.2 ± 1.5	$17.8 \pm 0.9^*$
大蒜素中剂量组	10	58.7 ± 2.1	$22.2 \pm 1.9^*$	$19.1 \pm 1.1^{**}$
大蒜素高剂量组	10	$61.3 \pm 2.6^*$	$18.2 \pm 1.2^{**}$	$20.5 \pm 0.8^{**}$
顺铂组	10	$59.2 \pm 1.8^*$	$22.4 \pm 1.6^*$	$18.4 \pm 1.0^*$

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡状况的影响:大蒜素各浓度组和顺铂组 Ishikawa 细胞凋亡状况较正常对照组呈不同程度加重,以大蒜素高剂量组凋亡状况最为严重(图 1)。计算并比较凋亡率结果见表 3,大蒜素中、高剂量组和顺铂组细胞凋亡率较正常对照组显著升高($P < 0.01$),大蒜素高剂量组细胞凋亡率较顺铂组显著升高($P < 0.01$)。

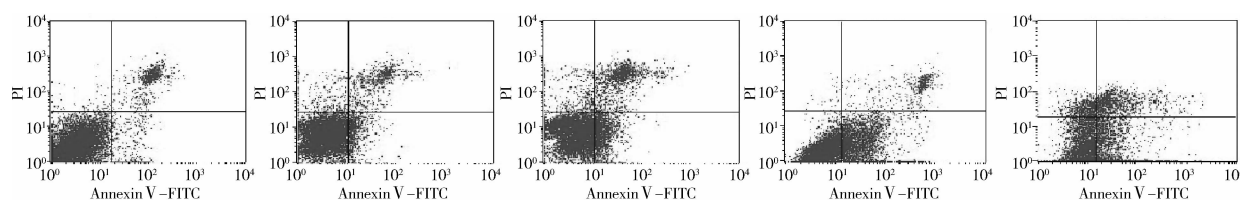


图 1 各组细胞凋亡状况

A. 正常对照组; B. 大蒜素低剂量组; C. 大蒜素中剂量组; D. 大蒜素高剂量组; E. 顺铂 40 μ g/ml 组

4. 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞 caspase - 3 蛋白表达的影响:大蒜素中、高剂量组和顺铂组 Ishikawa 细胞 caspase - 3 蛋白表达较正常对照组显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),大蒜素高剂量组细胞中 caspase - 3 蛋白表达量显著高于顺铂组($P < 0.05$),详见图 2 和表 3。

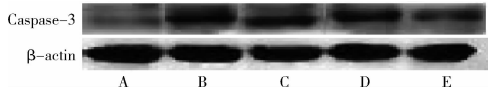


图 2 各组细胞 caspase - 3 蛋白表达

A. 正常对照组;B. 大蒜素低剂量组;C. 大蒜素中剂量组;
D. 大蒜素高剂量组;E. 顺铂 40μg/ml 组

表 3 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡率以及 caspase - 3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率 (%)	Caspase - 3/β - actin
正常对照组	10	4.5 ± 1.7	0.09 ± 0.04
大蒜素低剂量组	10	18.2 ± 4.0 *	0.22 ± 0.08 *
大蒜素中剂量组	10	30.6 ± 5.6 *	0.34 ± 0.15 *
大蒜素高剂量组	10	63.8 ± 7.5 * ##	0.57 ± 0.19 * #
顺铂组	10	33.2 ± 6.4 *	0.18 ± 0.06

与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与顺铂组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

5. 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞 bcl - 2 mRNA、Bax mRNA 表达和 Bax/bcl - 2 表达比值的影响:大蒜素各组 and 顺铂组 bcl - 2 mRNA 表达较正常对照组显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),大蒜素中高剂量组和顺铂组 Bax mRNA 表达显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)、Bax/bcl - 2 比值显著升高($P < 0.01$),大蒜素高剂量组 Bax/bcl - 2 表达比值较顺铂组显著升高($P < 0.05$),结果见表 4。

表 4 大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞 bcl - 2 mRNA、Bax mRNA 表达和 Bax/bcl - 2 表达比值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	bcl - 2 ($\times 10^{-3}$)	Bax ($\times 10^{-3}$)	Bax/bcl - 2
正常对照组	10	47.1 ± 6.9	68.2 ± 23.4	1.6 ± 0.7
大蒜素低剂量组	10	35.8 ± 5.4 *	79.0 ± 28.1	2.4 ± 1.1
大蒜素中剂量组	10	23.9 ± 4.1 **	94.6 ± 32.5 *	4.1 ± 1.8 *
大蒜素高剂量组	10	14.6 ± 3.0 **	131.8 ± 40.3 **	9.0 ± 3.5 ***
顺铂组	10	22.7 ± 4.3 **	109.5 ± 36.2 **	4.9 ± 2.3 **

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与顺铂组比较, # $P < 0.05$

结合术后化疗的治疗方案,能够相对延长子宫内膜癌患者生命,但其高复发率仍严重威胁着女性的生命健康,因此迫切需要研发疗效确切的新型抗肿瘤药物。大蒜素是一种具有多种药理学作用的二烯丙基三硫化物,张飞凤等^[2]研究发现,大蒜素能够破坏细胞结构而直接杀伤卵巢癌 SKOV - 3 细胞。刘玲等^[3]研究报道大蒜素具有抑制宫颈癌 Hela 细胞的增殖作用,并且具有时间和剂量依赖性。余玉清等^[4]发现大蒜素能够将胃癌 MKN - 45 细胞周期阻滞于 G₂/M 期而起到抑制其增殖的作用。本实验研究发现,经大蒜素 (25 ~ 50) μg/ml 干预能够将人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞周期显著阻滞于 G₂/M 期,显著提高 Ishikawa 细胞凋亡率和细胞增殖抑制率,其中大蒜素 50μg/ml 组细胞凋亡率和增殖抑制率均显著高于顺铂组,提示大蒜素具有抑制人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖并促进其凋亡的作用。

caspase 基因和 Bcl - 2 基因家族在细胞凋亡过程中起着非常重要的调控作用,其中 caspase - 3 是激活各种凋亡刺激因子 (Apaf - 1) 的关键蛋白酶,参与细胞凋亡的启动及整个凋亡过程的调节。bcl - 2 能够抑制线粒体破裂,可直接与 Apaf - 1 结合而抑制 caspase - 3 激活,抑制促凋亡蛋白 Bax 细胞毒性作用,调节细胞内钙浓度,从而起到抑制细胞凋亡的作用^[6,7]。Bax 属于 Bcl - 2 基因家族成员,具有诱导线粒体渗透性改变而释放细胞色素 C、激活促凋亡蛋白 caspase - 9,而表现出促细胞凋亡作用^[8,9]。此外, Bax 能够与 bcl - 2 聚合成二聚体,从而抑制 bcl - 2 活性而促进细胞凋亡,所以 Bax/bcl - 2 比值更加能够体现 Bcl - 2 基因家族对细胞凋亡的调控作用^[10-12]。本实验研究发现,经大蒜素 25 ~ 50μg/ml 干预能够显著上调人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞 caspase - 3 蛋白表达和 Bax 基因表达,下调 bcl - 2 基因表达、提高 Bax/bcl - 2 表达比值,这可能是大蒜素抑制 Ishikawa 细胞增殖并促进其凋亡作用重要分子机制之一。

综上所述,大蒜素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖具有抑制作用并对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡具有促进作用,从而表现出对 Ishikawa 细胞生长的抑制作用;作用机制可能与大蒜素能够改变 Ishikawa 细胞周期以及调节凋亡相关基因、蛋白表达有关。

参考文献

1 穆颖,张云龙,王俊. 大蒜素抑制非小细胞肺癌 A549 细胞迁移侵

讨 论
目前,临床上对于子宫内膜癌主要采取手术切除

- 袭能力的实验研究[J]. 华南国防医学杂志, 2015, 29(9): 647 - 656
- 2 张飞凤, 谭布珍. 大蒜素诱导卵巢癌耐顺铂细胞株 SKOV-3/DDP 凋亡机制的初步探讨[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 2029 - 2030
- 3 刘玲, 聂丹, 邹倩, 等. 大蒜素对人宫颈癌 HeLa 细胞周期和凋亡的影响[J]. 山东医药, 2015, 55(33): 15 - 17
- 4 余玉清, 陈昱倩, 颜延凤, 等. 不同浓度苦参碱、大蒜素对人胃癌细胞株 MKN-45 杀伤作用的实验研究[J]. 江苏中医药, 2014, 46(11): 82 - 83
- 5 余思云, 黄彩梅, 胡国华. 紫草素通过 PI₃K/Akt 信号通路诱导子宫内腺癌 Ishikawa 细胞凋亡[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(12): 1303 - 1306
- 6 Ogura T, Tanaka Y, Tamaki H, *et al.* Docetaxel induces Bcl-2 - and pro - apoptosis caspase - independent death of human prostate cancer DU145 cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48(6): 2330 - 2338
- 7 Vizetto - Duarte C, Custódio L, Gangadhar KN, *et al.* Isolololide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase - 3 activation, decreased Bcl - 2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage [J]. Phytomedicine, 2016, 23(5): 550 - 557
- 8 Farhadi F, Jahanpour S, Hazem K, *et al.* Garlic (Allium sativum) fresh juice induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma: the involvement of caspase - 3, bax and bcl - 2[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2015, 9(4): 267 - 273
- 9 张彦清, 刘保江, 田首元. 丙泊酚对大鼠离体缺血/再灌注心肌细胞凋亡和 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(1): 55 - 57
- 10 Saeedi Borujeni MJ, Hami J, Haghir H, *et al.* Evaluation of bax and bcl - 2 proteins expression in the rat hippocampus due to childhood febrile seizure[J]. Iran J Child Neurol, 2016, 10(1): 53 - 60
- 11 Renault TT, Dejean LM, Manon S, *et al.* A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl - xL and Bcl - 2[J]. Mech Ageing Dev, 2016, S0047 - 6374(16): 30049 - 30045
- 12 Dolka I, Król M, Sapierzyński R. Evaluation of apoptosis - associated protein (Bcl - 2, Bax, cleaved caspase - 3 and p53) expression in canine mammary tumors: an immunohistochemical and prognostic study [J]. Res Vet Sci, 2016, 105: 124 - 133

(收稿日期: 2016 - 05 - 29)

(修回日期: 2016 - 05 - 31)

孕妇血清抗 AT₁ 受体自身抗体和 sEng 水平对预测子痫前期的临床意义

王 英 任洁宁 安晓娜 王丽菊

摘 要 目的 本研究旨在探索和评估可溶性 Endoglin (soluble Endoglin, sEng) 和抗 AT₁ 受体自身抗体 (angiotensin II type I receptor - activating antibody, AT₁ - AA) 作为新指标预测妊娠中期孕妇子痫前期发生的可能性。**方法** 选择 2014 年 8 月 ~ 2015 年 12 月诊断为子痫前期的剖宫产患者共 50 例, 依据诊断标准分为轻度组和重度组各 25 例并选入 30 例正常孕妇作为正常组。使用全自动生化分析仪检测妊娠中期以及分娩前后 AT₁ - AA 和 sEng 的水平以及 24h 尿蛋白、平均动脉压和谷丙转氨酶 (ALT) 等进行比较。**结果** 3 组孕妇的年龄、孕周以及体质量指数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 ALT、24h 蛋白尿和平均动脉压在轻重度子痫患者血清中的水平均高于对照组, 差异具有统计学意义 ($F = 5.346, 8.567, 7.678, P = 0.012, 0.004, 0.009$); 孕妇妊娠中期、分娩前后血清中的 AT₁ - AA 和 sEng 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 妊娠中期和分娩前, 3 组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在分娩后对照组与轻度子痫组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AT₁ - AA 的敏感度为 84%, 特异性为 92%, 而 sEng 的敏感度和特异性分别为 80% 和 88%, AT₁ - AA 的曲线下面积高于 sEng。**结论** AT₁ - AA 和 sEng 对子痫前期均具有预测价值且 AT₁ - AA 优于 sEng。

关键词 子痫前期 可溶性 Endoglin 抗 AT₁ 受体自身抗体

中图分类号 R271.41

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.034

Clinical Significance of Angiotensin II Type I Receptor - activating Antibody and Soluble Endoglin in Serum Level of Pregnant Women on Predicting Preeclampsia. Wang Ying, Ren Jiening, An Xiaona, *et al.* Department of Obstetrics, Central Hospital of Weinan City, Shaanxi

作者单位: 714399 渭南市中心医院产科

通讯作者: 王英, 电子信箱: yingwanghard@126.com