doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.016

DADS 对人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞系增殖抑制的研究 *

刘德勇[1] 张庆丽[1] 王海伦[1] 彭和人[1] 谢海龙[2△]

（1 湖南环境职业技术学院 病理教研室 湖南 衡阳 421005；2 南华大学 肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001）

摘要 目的：研究二烯丙基二硫（diallyl disulfide，DADS）对人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞增殖的抑制作用，并探讨其作用机制。**方法：**体外培养 NCI-H446 细胞，采用 MTT、细胞计数实验方法检测 DADS 抑制 NCI-H446 细胞增殖；通过 HE 染色和 AO-EB 荧光染色方法，观察 DADS 处理后 NCI-H446 细胞的形态学改变。**结果：**MTT 结果显示：DADS 作用于 NCI-H446 细胞 48 h 后，代谢 MTT 的能力明显降低，显示出较强的细胞毒性反应，IC_{50} 值介于 20～40 μg/ml 之间。细胞计数结果表明：DADS 作用于 NCI-H446 细胞后，随 DADS 浓度增加 NCI-H446 细胞倍增时间延长。HE 染色显示：NCI-H446 细胞经 DADS 处理 24 h 后，与对照组相比，细胞体积变小，胞浆丰富，细胞核变小，染色变淡。AO-EB 荧光染色显示：NCI-H446 细胞经 DADS 处理 24 h 后，与对照组相比，细胞皱缩、呈圆形，胞质黄色或橘红色，细胞核或细胞质内可见致密浓染的黄绿色或橘红色荧光，并可见橘红色碎片且随 DADS 浓度增加，随 DADS 浓度增加细胞密度逐渐减少。**结论：**DADS 能抑制体外培养的 NCI-H446 细胞增殖，作用效果与药物浓度及作用时间相关。

关键词：二烯丙基二硫；小细胞肺癌；MTT

中图分类号：R734.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2014)08-1460-04

Proliferation Inhibited in NCI-H440 Cells with DADS*

LIU De-yong[1], ZHANG Qing-li[1], WANG Hai-lun[1], PENG He-ren[1], XIE Hai-long[2△]

(1 Institute of Pathology, hunan polytechnic of environment and biology, Hengyang, Hunan, 421005, China;

2 Institute of Cancer Research, University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and the mechanism of DADS on the growth of human small cell lung cancer NCI-H446 cells *in vitro*. **Methods:** NCI-H446 cell lines were cultured *in vitro*. Cell proliferation inhibition was measured by MTT assay and cell count experiments. Cell morphologic change was observed by HE staining and AO-EB fluorescence staining. **Result:** MTT assay showed that the ability of the metabolic MTT reduced significantly and it had a strong cytotoxic response after cultured 48 hours by DADS. IC_{50} values located between 20 ~ 40 μg/ml. Cell count experiments showed that NCI-H446 cells average doubling time extended after exposure to different concentration DADS. HE staining showed that cell volumes and nucleus become smaller while cytoplasm became abundant and stain hard 24 hours after H446 cellular exposure to DADS. AO-EB fluorescence staining showed that the cells morphoous and colour had huge changed that dealed with DADS. **Conclusion:** DADS could markedly inhibit the proliferation of NCI-H446 and the effect depended on the concentration and the time of DADS.

Key words: DADS; Small cell lung cancer; MTT

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1460-04

前言

肺癌是严重威胁人类健康的常见恶性肿瘤之一。目前，肺癌主要的治疗方法是化疗和放疗，但是传统的治疗方法，副作用大且五年生存率低。因此，寻找新的治疗药物，对治疗肺癌极其重要。生活中，大蒜能产生许多对人体有利的反应，实验证实这些反应都与烯丙基硫化物有关。二烯丙基二硫 (diallyl disulfide，DADS)是大蒜主要的活性成分，属于脂溶性有机硫物质。大量研究发现，大蒜的主要成份 DADS，对多种肿瘤的生长增殖都能具有抑制作用，例如胃癌[1]、肝癌[2]、结肠癌[3]、食管癌、肺癌[4,5]、乳腺癌[6]、前列腺癌[7]、鼻咽癌[8]、皮肤癌[9,10]、白血病[11]等，其机制与抑制肿瘤细胞增殖、调控细胞周期、促进肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化及等有关[12-16]。本研究旨在通过 DADS 体外抑制人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞的增殖，并以顺铂作为阳性对照，证实 DADS 在肺癌中的治疗作用，为 DADS 作为新型抗癌药物，未来能够应用于肺癌的临床治疗，提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞

DADS 购于 Fluka 公司，Tween 80 购于华美生物工程公司，二甲基亚砜（DMSO）、四甲基偶氮唑盐（MTT）、碘化丙啶（PI）、吖啶橙（AO）购于 Sigma 公司，DDP 购于山东齐鲁制药有

* 基金项目：湖南省教育厅优秀青年基金项目（04B057）

作者简介：刘德勇（1978-），男，硕士研究生，讲师，主要研究方向：从事于肿瘤的机理研究，E-mail：117ldy@163.com

△通讯作者：谢海龙，E-mail：Xhl0078@sina.com.cn

（收稿日期：2013-07-22 接受日期：2013-08-19）

限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购于 Pierce 公司,胰蛋白酶购于 Amresco 公司,ECL 发光检测试剂盒、PCNA 单抗及二抗购于 Santa Cruz 公司。

1.2 NCI-H446 细胞培养

人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株购于上海中科院,于含有 10 %新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37 ℃ 、5 % CO_2 培养箱中常规培养。

1.3 MTT 检测 DADS 对 NCI-H446 细胞增殖的抑制率

取对数生长期细胞,按每孔 2× 10^3 个接种于 96 孔培养皿中,4-6 h 后加入处理因素。包括空白对照、溶媒对照、0 对照、处理组(终浓度分别为 4、8、16、20、40、60 μg/ml)和阳性对照,每组 6 个复孔,继续培养 24 h、48 h、72 h。然后每孔加入 20 μl 的 5 g·L^{-1} 的 MTT/PBS 溶液,继续培养 4 h,吸去上清液。每孔加入 200 μL 的 DMSO,振荡摇匀,直至结晶全部溶解。酶联免疫仪检测各孔吸光值,波长 570 nm,利用下面公式计算抑制率:

抑制率(IR %)=(1- 处理组平均吸光度值 / 对照组平均吸光度值)× 100 %

1.4 细胞计数实验检测 DADS 对 NCI-H446 细胞倍增时间的影响

取对数生长期 NCI-H446 细胞,1.0× 10^8 /L 接种于培养瓶中,培养 6 h,加入 DADS(浓度分别为 4、8、16、20、40、60 μg/ml),以培养液作阴性对照。每 24 h 取 7 瓶细胞计数,计数 4 次,计算每瓶细胞的平均值,持续 96 h。每次所得的细胞数标记于坐标纸上,并连接成线,得出生长曲线。按照下面公式计细胞倍增时间:

TD(细胞群体倍增时间)=t× lg2/lg(N_t/N_0)

其中:N_t 为 t 时间的细胞数,N_0 为处理前细胞数

1.5 HE 染色显微镜观察

将处于对数生长期的 NCI-H446 细胞,接种于放入盖玻片的培养皿中,培养 6 h,设立空白对照、溶媒对照和 DADS 处理组。继续培养 24 h 后取出盖玻片,PBS 洗 3 遍,用 95 %乙醇固定,经 HE 染色后,利用显微镜观察细胞形态的改变。

1.6 AO-EB 荧光染色观察细胞形态的改变

对数生长期 NCI-H446 细胞接种于 6 孔培养皿中,培养 6 h。设立空白对照、溶媒对照和 DADS 处理组,培养 24 h。取出盖玻片,PBS 洗 3 遍。95 %乙醇固定,吖啶橙 - 溴化乙啶染色,通过荧光显微镜,观察细胞形态学改变。

2 结果

2.1 DADS 对 NCI-H446 细胞的增殖抑制作用

MTT 结果显示:经 4、8、16、20、40、60 μg/ml DADS 处理 NCI-H446 细胞 48 h 后,细胞的生存率为 98.8%、94.8%、79.2%、52.2%、27.6%、22.6%,随 DADS 浓度增加 NCI-H446 细胞存活率降低。方差分析结果显示:16、20、40、60 μg /ml DADS 及 2.5 μg /ml DDP 组与对照组相比,NCI-H446 细胞存活率差异有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。IC_{50} 值位于 20～40 μg /ml 之间。

表 1 DADS 处理 48h 后的 NCI-H446 细胞生长抑制率(,n=6)

Table 1 The different rate of inhibitory proliferation in NCI-H446 cells induced by DADS

N=6	Control	Tween80	DADS(μg/ml)						DDP(μg/ml)
			4	8	16	20	40	60	2.5
$\bar{X}$	0.724	0.719	0.716	0.687	0.574	0.378	0.200	0.164	0.182
S	0.105	0.093	0.100	0.114	0.057	0.048	0.020	0.017	0.007
IR(%)		0.7	1.2	5.2	20.8*	47.8*	72.4*	77.4*	74.9*

2.2 DADS 对 NCI-H446 细胞倍增时间的影响

常规培养的 NCI-H446 细胞倍增时间为 25.40 h,DADS 的浓度从 4 μg/ml 增加到 60 μg/ml 后,细胞倍增时间从 26.33 h 延长到了 145.64 h,$P<0.05$。对照组 Tween80 处理后,NCI-H446 细胞倍增时间没有显著变化($P>0.05$)。表明经 DADS 处理后,NCI-H446 细胞倍增时间明显延长,增殖速度显著减慢。根据细胞计数结果绘制生长曲线。

表 2 不同 DADS 浓度对细胞倍增时间的影响(x± s,n=3)

Table 2 The effect of proliferation on NCI-H446 cells induced by different concentrations of DADS

	初种细胞数(× 10^4) Initial number	初种细胞数(× 10^4) cultured number	倍增时间(h) doubling time
Control	10.0	19.25± 0.20	25.40
Tween80	10.0	18.99± 0.25	25.92
4 μg/ml	10.0	18.81± 0.25	26.33
8 μg/ml	10.0	17.24± 0.30	30.54
16 μg/ml	10.0	15.69± 0.20	36.93
20 μg/ml	10.0	14.36± 0.30	45.97
40 μg/ml	10.0	12.55± 0.25	73.24
60 μg/ml	10.0	11.21± 0.15	145.64*

2.3 DADS 处理后 NCI-H446 细胞的生长曲线

通过细胞计数结果，绘制 NCI-H446 细胞经 DADS 处理后的时间 - 效应关系曲线。与空白对照组相比，4 μg/mL 和 8 μg/mL DADS 组无显著差异 (P>0.05)，表明 DADS 浓度在 4 μg/mL 和 8 μg /mL 之间时对 NCI-H446 细胞增殖没有明显地抑制作用。DADS 浓度为 16 μg /mL、20 μg /mL、40 μg /mL、60 μg /mL 时，NCI-H446 细胞增殖明显受到抑制，且差异具有显著性(P<0.05)(图 1)。

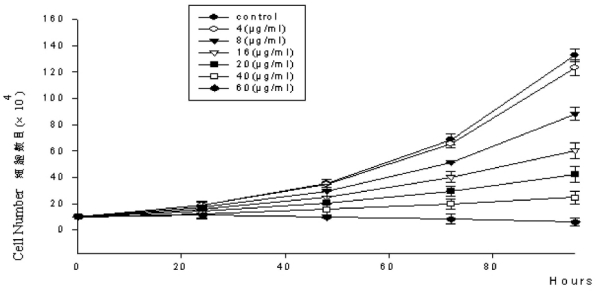


图 1 不同浓度 DADS 作用下 NCI-H446 细胞生长曲线

Fig.1 The curve of growth in H446 cells induced by concentrations of DADS

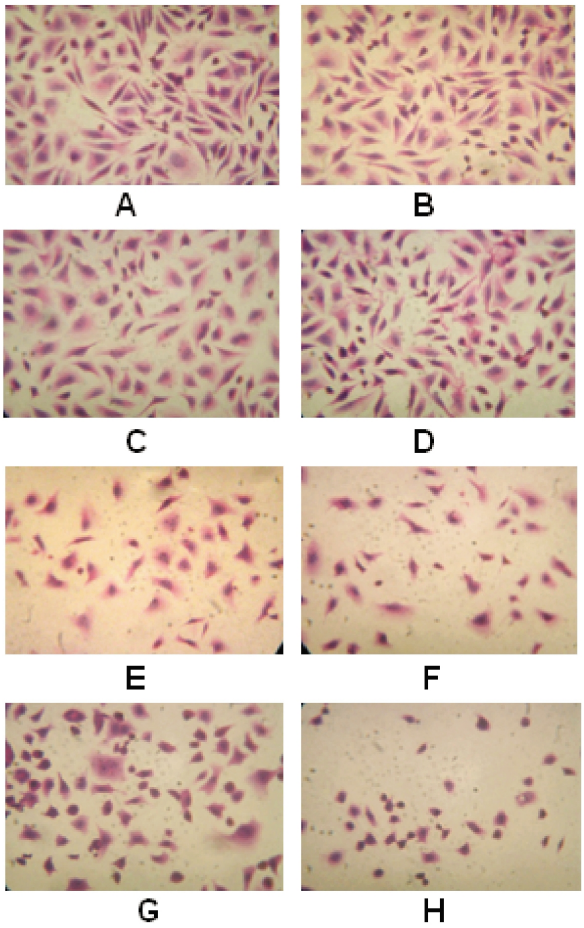


图 2 DADS 处理 NCI-H446 细胞后的形态变化 HE× 200

Fig. 2 Different morphology of NCI-H446 cells induced by concentrations of DADS: A: The control group(对照组); B: Tween80 group(Tween80 对照组); C: 4 μg/ml DADS; D: 8 μg/ml DADS; E: 16 μg/ml DADS; F: 20 μg/ml DADS; G: 40 μg/ml DADS; H: 60 μg/ml DADS

2.4 普通光学显微镜观察细胞形态学改变

对照组 NCI-H446 细胞形态：细胞体积明显增大，胞浆减少，细胞核增大，染色加深，核仁清晰，多个细胞处于分裂状态(图 2 A)；DADS 处理后的 NCI-H446 细胞，体积显著变小，胞浆丰富，细胞核变小，染色较淡，分裂期细胞减少(图 2)。

2.5 荧光显微镜观察

AO-EB 荧光染色后，荧光显微镜观察：对照组 NCI-H446 细胞形态饱满，胞浆呈绿色，细胞核亮绿色，细胞核呈圆形或椭圆形。DADS 处理 24 h 后，细胞皱缩、圆形，细胞质呈橘红色或黄色，随 DADS 浓度增加，细胞密度逐渐减少，细胞核和细胞质内可见致密浓染的黄绿色或橘红色荧光(图 3)。

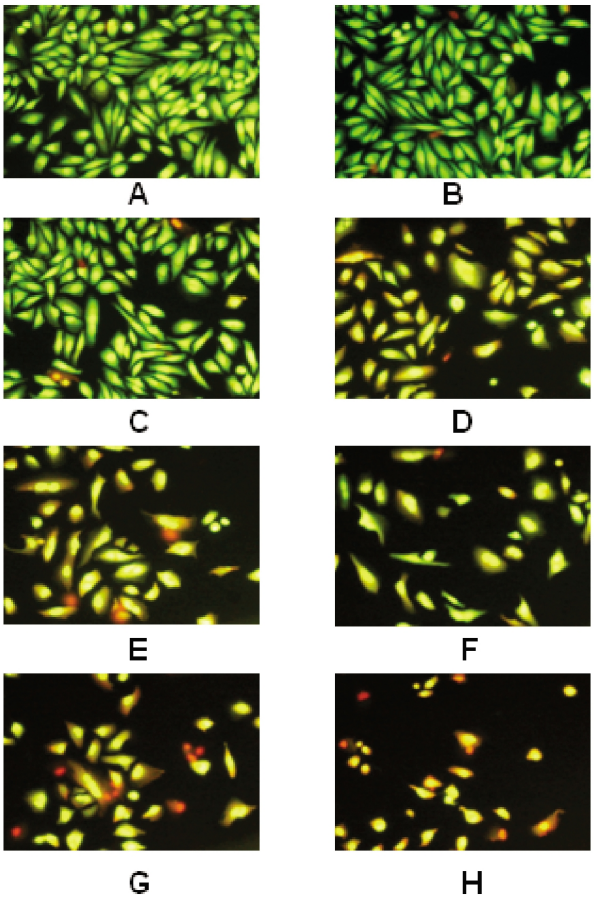


图 3 荧光显微镜观察 DADS 处理 NCI-H446 细胞后的形态学改变 × 200

Fig.3 Different morphology of NCI-H446 cells induced by concentrations of DADS with AO-EB Stain: A: The control group(对照组); B: Tween80 group(Tween80 对照组); C: DADS 4 μg/ml; D: DADS 8 μg/ml; E: DADS 16 μg/ml; F: DADS 20 μg/ml; G: DADS 40 μg/ml; H: DADS 60 μg/ml

3 讨论

据世界卫生组织统计，全球每年恶性肿瘤中，肺癌的死亡率居首位。肺癌与吸烟、职业因素、自身内在因素及环境污染等有关。人小细胞肺癌，主要治疗方法是化疗，5 年生存率低于 2%。目前主要以预防为主，尚无特效治疗方法[17-19]。DADS 是大蒜的主要有效成分，在多种肿瘤的实验研究中都具有良好的治疗效果，且来源广泛，价格低廉。人体内的细胞，均有恶变可能，故肿瘤组织的来源亦是多种多样，不同来源的肿瘤细胞其分化

指标也不相同,包括细胞的增殖、代谢、形态、结构、功能等方面的改变[20,21]。细胞是否分化成熟,是肿瘤细胞治疗后,是否有效的重要标志。

本研究 MTT 实验结果显示:经 DADS 处理后,NCI-H446 细胞代谢 MTT 的能力降低,表现出一定的细胞毒性反应。细胞计数实验表明:DADS 作用于 NCI-H446 细胞后,NCI-H446 细胞倍增时间延长。HE 染色和 AO-EB 荧光染色显示:DADA 能使 NCI-H446 细胞的形态发生明显的改变,且细胞异型性降低。

综上所述,DADS 对人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞的增殖具有抑制作用,并且使得细胞的形态发生了明显的改变,异型性降低,为 DADS 的后续研究及肺癌应用于临床治疗提供了重要依据。

参 考 文 献(References)

[1] Park HS, Kim GY, Choi IW, et al. Inhibition of matrix metallopro teinase activities and tightening of tight junctions by diallyl disulfide in AGS human gastric carcinoma cells [J]. J Food Sci, 2011, 76(4): 105-111

[2] Long B, Hu T, Zhang Y. Inhibitory effect of DADS on transplantation tumor from hepatic carcinoma HePG2 cells in nude mice [J]. Journal of Central South University(Medical Sciences), 2010, 35(7): 711-717

[3] Odom RY, Dansby MY, Rollins-Hairston AM, et al. Phytochemical induction of cell cycle arrest by glutathione oxidation and reversal by N-acetylcysteine in human colon carcinoma cells [J]. Nutr Cancer, 2009, 61(3): 332-339

[4] Wu XJ, Hu Y, Lamy E, Mersch-Sundermann V. Apoptosis induction in human lung adenocarcinoma cells by oil-soluble allyl sulfides: triggers, pathways, and modulators [J]. Environ Mol Mutagen, 2009, 50(3): 266-275

[5] Hui C, Jun W, Ya LN, et al. Effect of Allium sativum (garlic) diallyl disulfide (DADS) on human non-small cell lung carcinoma H1299 cells[J]. Trop Biomed, 2008, 25(1): 37-45

[6] Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, et al. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11(3): 249-253

[7] Chen WC, Hsu SS, Chou CT, et al. Effect of diallyl disulfide on Ca^{2+} movement and viability in PC3 human prostate cancer cells [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(3): 636-643

[8] Zhang YW, Wen J, Xiao JB, et al. Induction of apoptosis and transient increase of phosphorylated MAPKs by diallyl disulfide treatment in human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells [J]. Arch Pharm Res, 2006, 29(12): 1125-1131

[9] Pratheeshkumar P, Thejass P, Kutan G. Diallyl disulfide in duces caspase-dependent apoptosis via mitochondria-mediated intrinsic pathway in B16F-10 melanoma cells by up-regulating p53, caspase-3 and down-regulating pro-inflammatory cytokines and nuclear factor-κ β-mediated Bcl-2 activation [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2010, 29(2): 113-125

[10] Wang HC, Yang JH, Hsieh SC, et al. Allyl sulfides inhibit cell growth of skin cancer cells through induction of DNA damage me diated G2/M arrest and apoptosis[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(11):7096-7103

[11] Xiao ZX, Yin XC, Tan YF, et al. Effects of diallyl disulfide on apoptosis of human leukemia K562 cells and expression of Fas, FasL and caspase-8 [J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2011, 13(1): 53-56

[12] Yi L, Ji XX, Tan H, et al. Involvement of Mcl1 in diallyl disulfide-induced G2/M cell cycle arrest in HL-60 cells [J]. Oncol Rep, 2012, 27(6): 1911-1917

[13] Huang J, Plass C, Gerhauser C. Cancer chemoprevention by targeting the epigenome[J]. Curr Drug Targets, 2011, 12(13): 1925-1956

[14] Liao QJ, Su J, He J, et al. Effect of diallyl disulfide on cell cycle arrest of human colon cancer SW480 cells[J]. Cancer, 2009, 28(2):138-141

[15] Nagaraj NS, Anilakumar KR, Singh OV. Diallyl disulfide causes caspase-dependent apoptosis in human cancer cells through a Bax-triggered mitochondrial pathway [J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(5): 405-412

[16] Huang YS, Xie N, Su Q, et al. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes[J]. Mol Med Report, 2011, 4(3): 553-559

[17] Chen YT, Feng B, Chen LB. Update of research on drug resistance in small cell lung cancer chemotherapy [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3577-3581

[18] Salama JK, Vokes EE. New radiotherapy and chemoradiotherapy approaches for non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(8): 1029-1038

[19] Chaubet-Houdu M, Besse B. Brain metastases of non small cell lung cancers: systemic treatments[J]. Bull Cancer, 2013, 100(1): 95-98

[20] Ali Z, Deng Y, Ma C. Progress of research in gastric cancer [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2012, 12(11): 8241-8248

[21] McDonald LT, LaRue AC. Hematopoietic stem cell derived carcinoma-associated fibroblasts: a novel origin [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5(9) :863-873