文章编号:2095 - 1116(2013)04 - 0347 - 03 ·基础医学·

二烯丙基二硫抑制 HL-60 细胞增殖及对 c-myc 基因表达调控

曾勇智[1],汪煜华[2],赵战芝[1]
(1. 南华大学医学院机能实验中心,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学药学系)

摘 要: **目的** 研究二烯丙基二硫(DADS)对人髓系白血病细胞株 HL-60 细胞增殖及对 c-myc 基因表达的影响。 **方法** 采用 MTT 和细胞记数法分析 DADS 对细胞生长的影响、蛋白印迹法检测细胞内 c-myc 蛋白表达水平。 **结果** DADS 能抑制 HL-60 细胞增殖,并呈剂量和时间依赖性($P<0.05$),DADS(20 μmol/L)作用 12 h 后能下调 c-myc 蛋白的表达水平。 **结论** DADS 抑制 HL-60 细胞增殖,其机制可能与下调 c-myc 表达水平密切相关。

关键词: 二烯丙基二硫; c-myc; HL-60 细胞
中图分类号:R730 **文献标识码:**A

Proliferation Inhibition and c-myc Expression Down-Regulated by Diallyl Disulfide in HL-60 Cells

ZENG Yongzhi, WANG Yuhua, ZHAO Zhanzhi
(*Functional Laboratory Center*, *University of South China*, *Hengyang*, *Hunan* 421001, *China*)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of DADS on proliferation inhibition and on c-myc protein expression in human myeloid leukemia cell line HL-60 cells. **Methods** HL-60 cells were exposed to DADS at different dosages. Growth inhibition was detected by MTT assay and cell growth. The expression of c-myc was measured by Western blotting. **Results** After treatment with DADS, the growth of HL-60 cells were suppressed in a concentration-dependent and time-dependent manner($P<0.05$). Incubation of HL-60 cells with DADS(20 μmol/L) for 12 h could decrease the expression of c-myc. **Conclusion** DADS could inhibit HL-60 cells proliferation, its mechanism may be closely related with adjusting expression level of the c-myc.

Key words: Diallyl disulfide; c-myc; HL-60 cells

大量的研究阐明:大蒜及其烯丙基硫化物能抑制多种化学致癌物诱发的癌症[1]。二烯丙基二硫(DADS)是一种大蒜中非水溶性单体硫化物,能明显抑制皮肤癌、肝癌、胃癌、食管癌、结肠癌细胞等多种肿瘤细胞的生长[2-3]。前期的研究表明:DADS 能抑制 HL-60 细胞增殖,但机制尚不完全清楚[4]。本文以人髓系白血病细胞株 HL-60 细胞作为实验研究对象,观察 DADS 对 HL-60 细胞生长增殖抑制作用以及对 c-myc 蛋白表达水平的影响,进一步探讨 DADS 的抗肿瘤机制。

收稿日期:2013 - 03 - 07
基金项目:湖南省卫生厅课题(B2010-041).
作者简介:曾勇智,硕士,讲师,研究方向:白血病的发病机制,E-mail:zyzkhh@163.com.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

RPMI1640 培养基购于 Gibco 公司,辣根过氧化物酶标记二抗购于武汉博士得生物工程有限公司,小鼠抗人 c-myc 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司的产品,Western-blot 荧光检测试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒为 Hyclone-Pierce 公司的产品,全反式维甲酸(ATRA)、四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司的产品,DADS 购于 Fluka 公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制,DMSO 终浓度 <0.05%。

1.2 细胞系及培养条件

人髓系白血病细胞株 HL-60 细胞系由中南大学提供。细胞生长于含 1×10^5 U/mL 青霉素和 10

mg/mL 链霉素、10% 灭活新生小牛血清的 RPMI1640 培养基中，置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养。细胞经传代和收集后，取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT 法

细胞传代并接种于 96 孔培养板中，分别给予不同浓度 DADS（5、10、20、40 和 80 μmol/L），然后加入 10% MTT，继续培养 4 ~ 6h，离心，弃去培养基，加入 250 μL DMSO，室温振摇 10 min，用 Elx-800 酶联免疫检测仪测定 A_{570} nm 值，以 A_{570} nm 值代表细胞活力。细胞生长抑制率（IR）按公式计算：IR（%）=（1 - 实验组 OD_{570} 值/对照组 OD_{570} 值）×100%。

1.4 生长曲线绘制

取对数生长期细胞，常规胰酶消化后传代，接种于 24 孔塑料培养板培养 6 h，加用培养液稀释的不同浓度的 DADS 液，阴性对照组为常规培养液，每 24 h 取 3 瓶细胞记数，每瓶记数 3 次，求出 3 瓶细胞的均值。将每次所得的细胞数标记于坐标纸上，然后将各点连接成线绘制成生长曲线。

1.5 蛋白免疫印迹

悬浮缓冲液裂解细胞，离心吸出上清液后，酶联免疫检测仪进行蛋白质定量，分别取 50 μg 电泳、转膜与封闭，加入一抗孵育，TBST 洗涤，室温下孵育二抗 1 h，TBST 洗涤，用化学发光法检测 c-myc 蛋白表达的水平。

1.6 统计学方法

采用 SPSS10 统计学软件进行结果分析，实验所得数据均采用均数 ± 标准差，实验组与对照组用 t 检验，实验组比较使用单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结　　果

2.1 DADS 对 HL-60 细胞增殖的影响

为了解 DADS 对 HL-60 细胞增殖的影响，采用 MTT 法检测细胞的吸光度 OD_{570} 值，细胞生长抑制率（IR%）按公式计算：细胞生长抑制率 =（1 - 实验组 OD_{570} 值/对照组 OD_{570} 值）×100%。如图 1 所示：用不同浓度 DADS（5、10、20、40、80 μmol/L）处理 HL-60 细胞 72 h 后，其生长抑制率分别为 6.804%、20.656%、30.255%、37.546%、45.808%，与对照组（0 μmol/L）比较差异均有显著性意义（$P < 0.05$）。方差分析显示，各浓度组之间均有显著性差异，呈明显的浓度依赖关系（$P < 0.05$）。

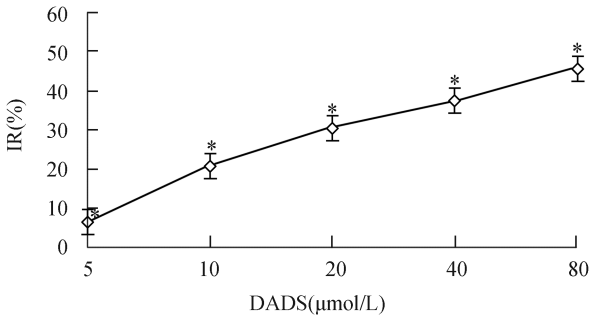

图 1　不同浓度 DADS 对 HL-60 细胞增殖的影响（$n = 3$）　与对照组比较，*：$P < 0.05$

2.2 DADS 抑制 HL-60 细胞增殖的时间 - 效应曲线

采用细胞记数（图 2A）或 MTT（图 2B）法测定不同浓度 DADS 对 HL-60 细胞生长抑制作用的时效关系。结果显示：随着 DADS 浓度增加以及培养时间延长，HL-60 细胞的生长抑制率随之增加，呈现明显的剂量和时间 - 效应依赖关系（$P < 0.05$），从图 2B 可以看出，20 μmol/L DADS 作用 24 h 后，随培养时间的延长，生长抑制稍有增加而近成直线，表明 20 μmol/L DADS 对 HL-60 细胞生长抑制效应稳定，故取 20 μmol/L DADS 用于后续实验。

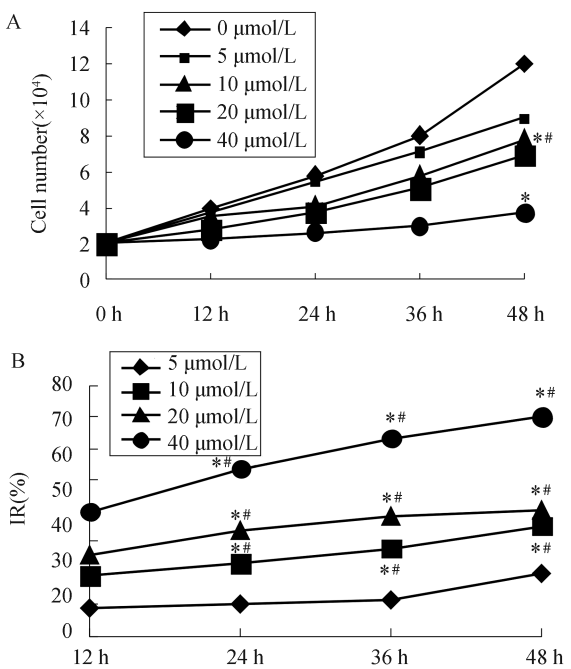

图 2　不同浓度 DADS 处理 HL-60 细胞生长抑制剂量和时间 - 效应曲线　A：细胞计数（×10^4 细胞数/mL）；B：细胞生长抑制率 IR（%）（$n = 3$）.　与 5 μmol/L 组比较，*：$P < 0.05$，与 12 h 比较，#：$P < 0.05$

2.3 DADS 对 HL-60 细胞 c-myc 蛋白表达的影响

采用蛋白免疫印迹法检测 c-myc 蛋白的表达水平。20 μmol/L DADS 分别处理 HL-60 细胞 6 h、12 h、18 h 和 24 h。结果显示:随着 DADS 处理时间的延长,c-myc 在 HL-60 细胞的表达水平逐渐下降,至 12 h,c-myc 表达水平下降到最低水平(图 3),与对照组比较差异具有显著性($P<0.05$)。

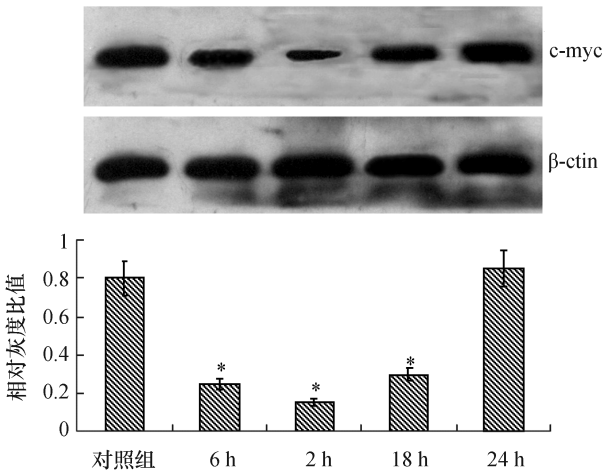

图 3 DADS(20 μmol/L)处理细胞后 c-myc 表达的时效关系 ($n=3$)与对照组比较,*:$P<0.05$

3 讨 论

近年来大量的实验研究表明,大蒜及其提取物具有抗微生物感染、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化以及提高免疫力等多种药理作用,引起有关研究人员的极大关注[1]。目前已经从大蒜中提取分离出许多种具有药理作用的单体化合物,其中以 DADS 在防癌、抗癌方面的作用尤为显著[2]。

DADS 作为大蒜中一种有效的单体化合物,对多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用[3]。前期研究与本实验显示,DADS 能明显抑制人髓系白血病 HL-60 细胞的增殖,其 20 μmol/L 浓度抑制增殖效应与 ATRA(10 nmol/L)的效应相当[4]。本研究结果表明:不同浓度 DADS 能明显抑制 HL-60 细胞的生长,并呈浓度依赖性。HL-60 细胞生长曲线与时间-效应曲线的研究显示,随着 DADS 浓度增加及培养时间的延长,HL-60 细胞生长抑制率随之增加,呈现时间—效应依赖关系($P<0.05$),20 μmol/L DADS 对 HL-60 细胞生长抑制效应稳定。

c-myc 是一个重要的细胞原癌基因,与细胞增殖、分化以及凋亡调控密切相关[5]。c-myc 基因主要通过扩增和染色体易位重排激活,在白血病细胞株可发现该基因的扩增。c-myc 基因编码蛋白质位于细胞核内,能在细胞激活数分钟内高效表达,在细胞外信号引发的生物程序激活或抑制下一组基因中都具有十分重要作用。许多生长因子和促癌剂作用细胞后能引起其表达上调,其在生长旺盛的细胞及肿瘤细胞中高表达,而在静止生长的细胞中 c-myc 的表达则明显减少[6]。在大多数情况下,c-myc 的高表达是细胞分裂周期中细胞从 G1 期进入 S 期所必需的[7],而当细胞出现恶性增殖时则常伴有该基因的表达失控。例如,c-myc 基因扩增及其高表达是 HL-60 细胞的重要特征,由于它在白血病细胞中的扩增及高表达,产生磷酸化的蛋白质,促使细胞信号传导以及细胞分化等正常生理功能均发生改变,诱发急性白血病的发生。并且,HL-60 细胞在诱导分化以及生长抑制过程中,c-myc 表达水平明显下降[8]。本实验也表明,c-myc 基因在 HL-60 细胞中高表达,而在 DADS 作用后,c-myc 蛋白表达水平随作用时间的延长逐渐减少,说明 c-myc 基因也参与 DADS 抑制 HL-60 细胞增殖的过程。

本实验仅研究了与细胞增殖相关的部分蛋白在 DADS 抑制 HL-60 细胞生长阻滞中的表达变化,还需进一步研究蛋白与蛋白之间的相互作用,以明确 DADS 抑制细胞生长的具体信号通路,从而找出 DADS 抗肿瘤的靶点。鉴于 DADS 的毒性低,对多种肿瘤细胞有抑制作用,在肿瘤治疗方面有一定的应用前景,深入研究它的抗肿瘤机制对将来 DADS 的临床应用有重要意义。

参考文献:

[1] Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, et al. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(1): 41-47.

[2] Nkrumah-Elie YM, Reuben JS, Hudson AM, et al. The attenuation of early benzo(a)pyrene- induced carcinogenic insults by diallyl disulfide (DADS) in MCF-10A cells [J]. Nutr Cancer, 2012, 64(7): 1112-1121.

(下转第 352 页)

(上接第 349 页)

[3] Lin YT, Yang JS, Lin SY, et al. Diallyl disulfide (DADS) induces apoptosis in human cervical cancer Ca Ski cells via reactive oxygen species and Ca^{2+}-dependent mitochondria- dependent pathway[J]. Anticancer Res, 2008, 28(5A):2791-2799.

[4] 谭力铭,张蒙夏,唐圣松,等. 二烯丙基二硫诱导 HL-60 细胞 G2/M 期生长阻滞的分子机制研究[J]. 中华血液学杂志,2004,25 (5):273-276.

[5] Tomoaki A, Kawabe T, Ohara H, et al. Involvement of the interaction between c-myc and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage[J]. J Bio Chem, 2001, 276(46):42971-42977.

[6] Liu J, Hu JL, Shi BW, et al. Up-regulation of c-myc and TNF-ais mediated in lycorine-induced death of HL-60 cells[J]. Cancer Cell Int, 2010, 10 (25):234-238.

[7] Lee J, Kim J A, Barbier V, et al. DNA damage triggers c-mycWAF1-dependent Emi1 down-regulation that maintains G2 arrest [J]. Mol Biol Cell, 2009, 20 (7): 1891-1902.

[8] Imran M, Park TJ, Lim IK. TIS21/BTG2/PC3 enhances downregulation of c-Myc during differentiation of HL-60cells by activating Erk1/2 and inhibiting Akt in response to all-trans- retinoic acid[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(15):2474-2485.

(此文编辑:秦旭平)