



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.010
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(10):1396-1400.

· 基础研究 ·

DADS 胃癌细胞中 NADPH 氧化酶的作用及其调控机制

刘锋^{1,2}, 谢黎明², 张志伟², 邬力祥¹

(1. 中南大学公共卫生学院, 湖南长沙 410078; 2. 南华大学肿瘤研究所, 湖南衡阳 421001)

摘要

目的: 探讨二烯丙基二硫 (DADS) 对胃癌细胞 NADPH 氧化酶活性的影响及其机制。

方法: 用 DADS 作用于胃癌 AGS 细胞后, 检测细胞 NADPH 氧化酶活性与 miR-34a 的表达, 以及 Src-Gab1-Shp2 通路的活性, 期间采用不同的干预, 分析 NADPH 氧化酶、miR-34a、Src-Gab1-Shp2 通路之间的关系。

结果: DADS 作用后, AGS 细胞 NADPH 氧化酶活性以及 miR-34a 表达均明显升高 (均 $P < 0.05$), 而 DADS 升高 NADPH 氧化酶活性的作用被添加 Src 激酶抑制剂 PP2 所取消; DADS 或 miR-34a 作用后, AGS 细胞 Src、Gab1、Shp2 mRNA 的表达均明显降低 (均 $P < 0.05$), 且 DADS 作用后, AGS 细胞中磷酸化 Src、Gab1、Shp2 蛋白水平明显降低 (均 $P < 0.05$)。

结论: DADS 能升高 NADPH 氧化酶活性, 该作用可能与其上调 miR-34a 表达, 从而抑制 Src-Gab1-Shp2 通路活性有关。

关键词

胃肿瘤; 氨基酸类, 硫; 微 RNAs

中图分类号: R735.2

Effect of Diallyl disulfide on NADPH oxidase activity in gastric cancer cells and its regulatory mechanism

LIU Feng^{1,2}, XIE Liming², ZHANG Zhiwei², WU Lixiang¹

(1. School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China; 2. Institute of Cancer research, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract

Objective: To investigate the effect of diallyl disulfide (DADS) on NADPH oxidase activity in gastric cancer cells and the mechanism.

Methods: In gastric cancer AGS cells after exposure to DADS, the NADPH oxidase activity and miR-34a expression as well as the status of Src-Gab1-Shp2 pathway in the cells were detected. Meanwhile, several interventions were made to investigate the relationship among NADPH oxidase, miR-34a, and Src-Gab1-Shp2 pathway.

Results: The NADPH oxidase activity and miR-34a in AGS cells were significantly increased after DADS treatment (both $P < 0.05$), and the NADPH oxidase activity increasing effect of DADS was abolished by Src inhibitor PP2 addition. The mRNA expressions of Src, Gab1 and Shp2 were all significantly decreased after DADS

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31100935)。

收稿日期: 2015-04-15; 修订日期: 2015-09-12。

作者简介: 刘锋, 中南大学公共卫生学院讲师, 主要从事胃癌发病机制与防治方面的研究。

通信作者: 邬力祥, Email: ywlx@csu.edu.cn

or miR-34a mimics treatment, moreover, the expression levels of phosphorylated Src, Gab1 and Shp2 proteins were all significantly down-regulated after DADS treatment (all $P < 0.05$).

Conclusion: DADS can increase NADPH oxidase activity in gastric cancer cells, and this effect may probably be associated with its increasing miR-34a expression and thereby, inhibiting the activity of Src-Gab1-Shp2 pathway.

Key words Stomach Neoplasms; Amino Acids, Sulfur; MicroRNAs

CLC number: R735.2

二烯丙基二硫 (diallyl disulfide, DADS) 是大蒜中的一种脂溶性的有效成分, 对多种恶性肿瘤具有明显的抑制作用, 如白血病、肺癌、结肠癌、前列腺癌等肿瘤, 是一种很有开发潜力的抗肿瘤药物^[1-4]。研究^[5-6]证实, DADS能体内外明显抑制人胃癌MGC-803细胞增殖、侵袭、转移, 并诱导胃癌细胞发生凋亡, 呈剂量-效应依赖关系。尽管目前诸多研究对DADS在体内外抑制人胃癌细胞的生长和增殖提供了强有力的实验依据, 但是, 其作用的靶点尚未完全阐明。近年来, miRNA成为诸多研究者的研究焦点, 人类miRNA通过调控其相关靶基因的表达, 发挥类似于癌基因或抑癌基因样作用, 从而参与肿瘤的发生、发展以及转归过程。本课题组前期研究^[5]通过miRNA芯片证实DADS可上调胃癌细胞中miR-34a的表达。研究^[7]表明miR-34a在多种恶性肿瘤表达下调并且能抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭。为进一步阐明DADS抑制胃癌的分子机制, 从miRNA这一全新层面揭示DADS的抑瘤作用和分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养

人胃癌AGS细胞购自中国科学院上海细胞库。培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640中, 37 °C, 5%CO₂。

1.2 实验分组

将胃癌细胞AGS分为DADS处理组、miR-34a模拟物组、miR-34a抑制剂组、阴性对照组; 采用100 μmol/L DADS分别处理AGS细胞0、30、60、120、240 min; 分别将miR-34a模拟物、miR-34a抑制物、阴性对照序列转染于AGS细胞。miR-34a模拟物、miR-34a抑制物、阴性对照序列均由广州锐博生物科技有限公司设计合成。

1.3 NBT 还原实验

将每孔 4×10^4 个细胞接种到96孔板中, 加入100 μmol/L DADS, 设3个复孔, 培养0、30、60、120、240 min后, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 每孔加入0.1% NBT 200 μL, 于细胞培养箱中培养1 h, 离心后, 每孔加入DMSO 200 μL, 室温震荡20 min, 测570 nm吸光度值。

1.4 real-time PCR

用TRIzol (Invitrogen公司) 提取细胞总RNA。取总RNA 2 μg, 逆转录试剂盒 (Promega公司) 逆转录成cDNA。PCR扩增: SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL, Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, 灭菌蒸馏水7.2 μL, cDNA模板0.4 μL。置于Real-time PCR仪95.0 °C 30 s; 95.0 °C 5 s, 55.0 °C 30 s, 72 °C 10 s, 40个循环; 72 °C 5 min; 溶解曲线分析从62.0 °C开始至95.0 °C停止。引物: Src上游5'-CGT GCG AGA AAG TGA GAC C-3'、下游5'-TGA GGT TTG TGC GGC TAC-3'; Gab1上游5'-GCC CTT CCT TAG AGT C-3'、下游5'-TTA CAC TGA ACC CTT TA-3'; Shp上游5'-GAA GCA CAG TAC CGA TTT-3'、下游5'-ATG AGG TTG CGG TGG-3'。miRNA逆转录及real-time PCR根据试剂盒操作 (上海吉玛)。

1.5 Western blot

预冷的PBS洗3次; 加入适量的蛋白裂解液, 置冰上30 min; 刮下裂解的细胞, 转移到1.5 mL离心管中; 冰上超声10~15 s; 4 °C, 12 000 r/min, 离心10 min, 吸上清至另一干净管中, BCA法测定蛋白浓度, 分装于备用。细胞总蛋白加入SDS loading buffer后, 沸水煮5 min, 8%SDS-PAGE电泳, 将蛋白转移至PVDF膜上, 室温用5%TBST脱脂牛奶封闭1 h, 加入5%TBST脱脂牛奶稀释的Src、Gab1和Shp2磷酸化抗体 (Santa Cruz产品), 4 °C孵育过夜, TBST洗3次, 相应二抗 (武汉博士德公司) 孵育37 °C 1 h, TBST洗3次, ECL

发光，凝胶成像发光仪成像。

1.6 统计学处理

SPSS 13.0统计软件分析，采用单因素方差分析比较各组间均数差异， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DADS对AGS细胞中NADPH氧化酶活性的影响

100 $\mu\text{mol/L}$ DADS处理AGS细胞0、30、60、120、240 min后，NBT还原实验检测NADPH氧化酶活性。结果显示，随着DADS作用时间增加，AGS细胞NBT还原反应阳性率增加，表明DADS呈时间作用梯度增加AGS细胞中NADPH氧化酶活性，与对照组比，差异具有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）；而将100 $\mu\text{mol/L}$ DADS与Src激酶抑制剂PP2共同处理AGS细胞0、30、60、120、240 min，NBT还原反应阳性率与对照组相比无明显变化（均 $P > 0.05$ ）（图1）。

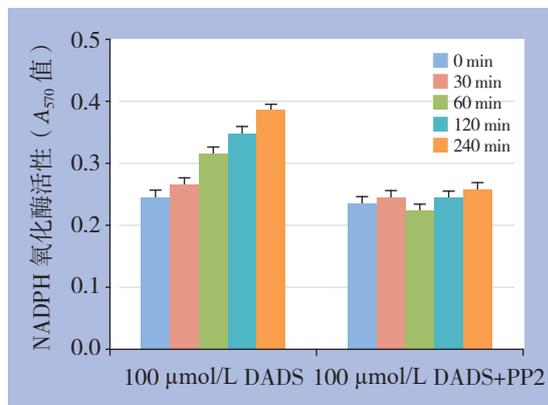


图1 NBT还原反应检测NADPH氧化酶活性

Figure 1 Determination of NADPH oxidase activity by NBT reduction assay

2.2 DADS对AGS细胞中miR-34a表达的影响

real-time PCR检测100 $\mu\text{mol/L}$ DADS处理0、30、60、60、240 min后AGS细胞中miR-34a水平。结果显示，miR-34a在30、60、120及240 min的表达分别为0 min时的（ 1.22 ± 0.14 ）、（ 1.42 ± 0.15 ）、（ 1.66 ± 0.17 ）和（ 1.94 ± 0.18 ）倍，统计分析表明，DADS呈时间

依赖性增高miR-34a的表达（ $P < 0.05$ ）（图2）。

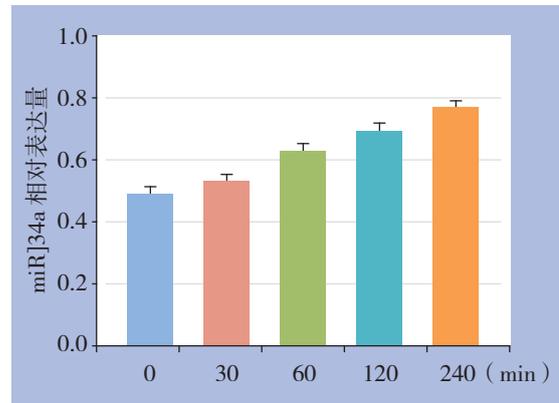


图2 miR-34a表达水平的检测

Figure 2 Measurement of miR-34a expression levels

2.3 miR-34a对AGS细胞中Src、Gab1和Shp2 mRNA水平的影响

real-time PCR检测miR-34a模拟物和miR-34a抑制剂处理AGS细胞240 min后Src、Gab1和Shp2 mRNA水平。结果显示，miR-34a模拟物组Src、Gab1和Shp2的表达分别为对照组的（ 0.46 ± 0.06 ）、（ 0.86 ± 0.09 ）、（ 0.76 ± 0.06 ）倍，miR-34a抑制剂组Src、Gab1和Shp2的表达分别为对照组的（ 1.77 ± 0.16 ）、（ 1.69 ± 0.16 ）、（ 1.56 ± 0.13 ）倍。统计分析表明，miR-34a模拟物能抑制AGS细胞中Src、Gab1和Shp2的表达，而抑制miR-34a能促进Src、Gab1和Shp2的表达，差异有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）（图3）。

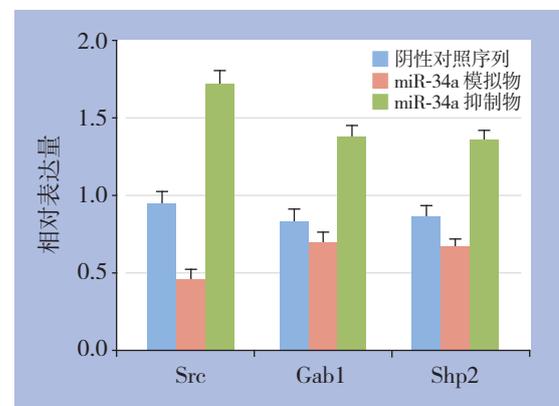


图3 miR-34a对Src、Gab1和Shp2 mRNA表达的影响
Figure 3 Influence of miR-34a on mRNA expressions of Src, Gab1 and Shp2

2.4 DADS对Src、Gab1和Shp2 mRNA水平的影响

real-time PCR检测100 $\mu\text{mol/L}$ DADS处理0、30、60、120、240 min后AGS细胞中Src、Gab1和Shp2 mRNA水平。结果显示,经DADS处理120 min后,Src和Gab1 mRNA水平下降,Shp2 mRNA水平在处理240 min后下降(图4)。

2.5 DADS对AGS细胞中Src、Gab1和Shp2蛋白磷酸化水平的影响

用Western blot检测100 $\mu\text{mol/L}$ DADS在处理AGS细胞240 min时Src、Gab1和Shp2蛋白磷酸化水平的变化。结果显示,DADS能在作用240 min时抑制AGS细胞中磷酸化的Src、Gab1和Shp2蛋白水平(均 $P < 0.05$)(图5)。

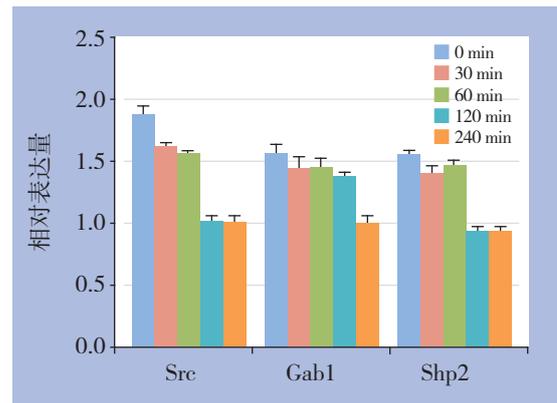


图4 DADS对Src、Gab1和Shp2 mRNA表达的影响
Figure 4 Influence of DADS on mRNA expressions of Src, Gab1 and Shp2

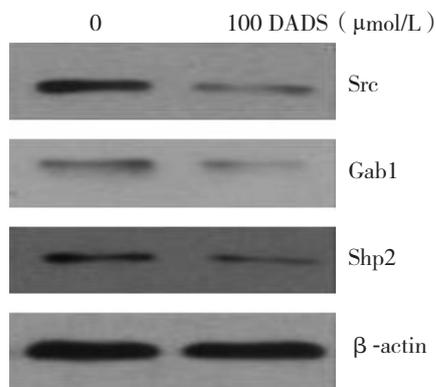
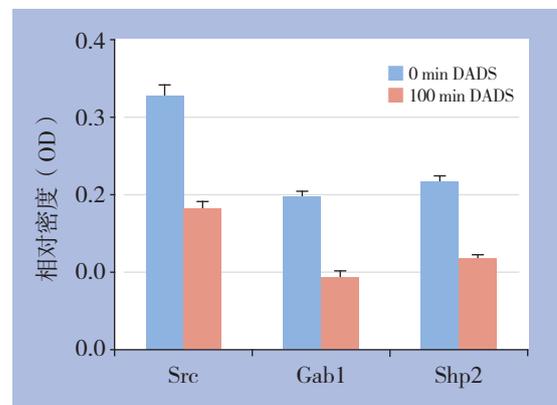


图5 DADS对磷酸化Src、Gab1和Shp2蛋白表达的影响
Figure 5 Influence of DADS on phosphorylated protein expressions of Src, Gab1 and Shp2



3 讨论

目前研究者已在多种细胞类型中对NADPH氧化酶进行了广泛研究^[8-9],其能产生活性氧ROS,通过产生细胞毒性和诱发突变,从而诱导细胞死亡与凋亡^[10-11]。ROS是各种类型细胞有氧呼吸代谢出的有毒的副产品,体内ROS能调节各种细胞的功能,如细胞迁移运动,核扩散以及吞噬作用。最近的研究^[12]表明,ROS涉及人类多种疾病的发生发展包括癌症,但ROS在癌症发生发展中的具体调节机制尚未完全明确。最近的研究^[13]表明,肿瘤细胞可以产生较高水平的活性氧,并且其产生来源与NADPH氧化酶密切相关。有研究^[14]报道DADS通过上调HL-60细胞中miR-34a表达,参与介导Src-Gab1-Shp2途径调控NADPH的氧化酶活性,从而抑制白血病细胞的增殖。

研究^[7]表明miR-34a在多种肿瘤中表达下调,

如肺癌、结直肠癌、胶质瘤、前列腺癌以及肝癌等,然而外源高表达miR-34a能显著抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭。本次研究通过real-time PCR证实DADS能促进胃癌细胞株AGS细胞中miR-34a的表达。Muppala等^[15]研究证实,Src是miR-34a的直接调控靶基因,在肿瘤细胞中外源高表达miR-34a能抑制Src激酶的表达。本次研究以胃癌细胞株AGS细胞为模型,探讨miR-34a-Src激酶信号通路在DADS诱导胃癌细胞NADPH氧化酶活化过程的作用。研究^[16-17]表明Src激酶在多种恶性肿瘤组织中活化,如乳腺癌、宫颈癌、肺癌等,并通过影响多条信号转导通路,如MAPK、PI3K/Akt信号通路参与多种生物学行为,如细胞的增殖,黏附和侵袭能等。因此本研究进一步通过研究证实了在AGS细胞中外源高表达miR-34a能抑制Src信号通路中Src、Shp2及Gab1的表达。因此,DADS可能通过上调miR-34a的表达水平,从而调节Src信号通路活性。

有研究^[18]显示, Src可能参与NADPH氧化酶的激活。本研究采用NBT还原试验证实胃癌细胞株AGS细胞中DADS能上调NADPH氧化酶的活性, 并且还发现Src激酶抑制剂PP2能对抗DADS上调NADPH氧化酶的活性。因此, 笔者推测DADS可能通过影响Src激酶活性, 从而调控AGS细胞中NADPH氧化酶的激活。Gab1蛋白是分布最广、含量最多的Gab蛋白家族成员, 与肿瘤的发生发展密切相关, 并且能被Src激酶激活发挥功能^[19]。Shp2是一种酪氨酸蛋白磷酸酶, 在肺癌和前列腺癌细胞中过表达Shp2基因可上调c-myc的表达, 从而引起细胞增殖, 其过程与Src激酶的激活有关^[20]。本研究分别检测了DADS对AGS细胞中Src、Gab1、Shp2 mRNA水平和Src、Gab1、Shp2蛋白磷酸化水平的影响, 结果均呈抑制状态。

综上所述, DADS可通过上调miR-34a表达, 抑制Src信号通路, 从而诱导胃癌细胞中NADPH氧化酶的活化, 为DADS诱导胃癌细胞活性氧的产生以及其抗癌机制研究提供了进一步依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Gayathri R, Gunadharini DN, Arunkumar A, et al. Effects of diallyl disulfide (DADS) on expression of apoptosis associated proteins in androgen independent human prostate cancer cells (PC-3)[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 320(1/2):197-203.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Tang H, Kong Y, Guo J, et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signaling pathway by up-regulation of miR-200b and miR-22[J]. Cancer Lett, 2013, 340(1):72-81.
- [6] Ling H, Lu LF, He J, et al. Diallyl disulfide selectively causes checkpoint kinase-1 mediated G2/M arrest in human MGC803 gastric cancer cell line[J]. Oncol Rep, 2014, 32(5):2274-2282.
- [7] Hu Y, Pu Q, Cui B, et al. MicroRNA-34a inhibits tumor invasion and metastasis in gastric cancer by targeting Tgif2[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8):8921-8928.
- [8] Fu XJ, Peng YB, Hu YP, et al. NADPH oxidase 1 and its derived reactive oxygen species mediated tissue injury and repair[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014:282854. doi: 10.1155/2014/282854.
- [9] Lambeth JD, Neish AS. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited[J]. Annu Rev Pathol, 2014, 9:119-145. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104651.
- [10] Ritsick DR, Edens WA, McCoy JW, et al. The use of model systems to study biological functions of Nox/Duox enzymes[J]. Biochem Soc Symp. 2004, (71):85-96.
- [11] Arbiser JL, Petros J, Klatner R, et al. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(2):715-720.
- [12] Garrido-Urbani S, Jemelin S, Deffert C, et al. Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPAR α mediated mechanism[J]. PLoS One. 2011, 7;6(2):e14665. doi: 10.1371/journal.pone.0014665.
- [13] Coso S, Harrison I, Harrison CB, et al. NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts[J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 16(11):1229-1247.
- [14] 刘乐江, 盘霄. 二烯丙基三硫通过miR-34a调控人白血病细胞中NADPH氧化酶的机制研究[J]. 肿瘤. 2014, 34(5):437-442.
- [15] Muppala S, Mudduluru G, Leupold JH, et al. CD24 induces expression of the oncomir miR-21 via Src, and CD24 and Src are both post-transcriptionally downregulated by the tumor suppressor miR-34a[J]. PLoS One, 2013, 8(3):e59563. doi: 10.1371/journal.pone.0059563.
- [16] O'Leary DP, Bhatt L, Woolley JF, et al. TLR-4 signalling accelerates colon cancer cell adhesion via NF- κ B mediated transcriptional up-regulation of Nox-1[J]. PLoS One, 2012, 7:e44176. doi: 10.1371/journal.pone.0044176.
- [17] Zhang B, Liu Z, Hu X. Inhibiting cancer metastasis via targeting NADPH oxidase 4[J]. Biochem Pharmacol. 2013, 86(2):253-266.
- [18] 王林, 张振东, 解海, 等. Src激酶抑制剂PP2在乳腺癌MCF-7细胞转移中的作用和机制[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(5):243-246.
- [19] 姚旭, 刘源, 王勇, 等. Gab1与MMP-9在胆管癌中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(1):118-121.
- [20] Ren Y, Chen Z, Chen L, et al. Critical role of SHP-2 in tumor growth involving regulation of c-Myc[J]. Genes Cancer, 2010, 1(10):994-1007.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 刘锋, 谢黎明, 张志伟, 等. DADS胃癌细胞中NADPH氧化酶的作用及其调控机制[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(10):1396-1400. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.010
Cite this article as: LIU F, XIE LM, ZHANG ZW, et al. Effect of Diallyl disulfide on NADPH oxidase activity in gastric cancer cells and its regulatory mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(10):1396-1400. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.010