

文章编号:1005-6947(2007)04-0341-05

· 基础研究 ·

# 紫杉醇联合大蒜素对胃癌细胞的增殖抑制及促凋亡作用

张钧书<sup>1</sup>, 崔健<sup>1</sup>, 丁丽君<sup>1</sup>, 朱彪<sup>2</sup>

(1. 浙江省临安市人民医院 外科, 浙江 临安 311300; 2. 浙江大学医学院传染病研究所, 浙江 杭州 310003)

**摘要:**目的 探讨紫杉醇联合大蒜素对胃癌细胞 MGC-803 的增殖抑制和促凋亡作用及其分子机制。方法 分别及联合应用两药后以 MTT 法测定 MGC-803 细胞的增殖, 用流式细胞仪检测细胞凋亡, 用 RT-PCR 法观察基因 bax 和 bcl-2 mRNA 的表达, 用 Western blot 观察其蛋白表达。结果 15~60 μg/mL 大蒜素和 4~32 μg/mL 紫杉醇单用 24h 对 MGC-803 细胞均有明显抑制作用, 呈剂量依赖性。低剂量大蒜素(9 μg/mL)联合紫杉醇(1~16 μg/mL)比单用紫杉醇作用更强 ( $P < 0.05$ )。15 μg/mL 大蒜素, 12 μg/mL 紫杉醇和两药联用 24h 凋亡率分别为 10.7%, 30.4% 和 84.7% ( $P < 0.01$ )。单用大蒜素和紫杉醇对胃癌细胞 bax 和 bcl-2 表达无明显影响, 两药联用 bax 基因 mRNA 和蛋白表达增加, 而 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达减少。结论 大蒜素可增强紫杉醇对胃癌细胞的增殖抑制作用, 两药联用可减少紫杉醇的剂量; 其机制可能是通过增强 MGC-803 细胞的凋亡, 后者与 bax 和 bcl-2 基因表达有关。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(4): 341-345]

**关键词:** 胃肿瘤/病理学; 大蒜素; 紫杉醇; 凋亡; bax; bcl-2

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** A

## The inhibiting effect of combination of allicin with paclitaxel on proliferation of gastric cancer cells and promotion of apoptosis

ZHANG Jun-shu<sup>1</sup>, CUI Jian<sup>1</sup>, DING Li-jun<sup>1</sup>, ZHU Biao<sup>2</sup>

(1. Department of Surgery, The Peoples Hospital of Linan City, Linan, Zhejiang 311300, China;  
2. Institute of Infectious Diseases, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the inhibitory effect of combined treatment of allicin with paclitaxel on gastric cancer cell lines and promotion of apoptosis and its possible mechanism. **Methods** After treatment with allicin or paclitaxel alone or in combination, the MGC-803 gastric cancer cells growth was determined by MTT assay. Flow cytometry was used to determine apoptosis of gastric cells. The expression of mRNA of bcl-2 and bax genes was detected by RT-PCR, and the expressions of protein bcl-2 and bax were detected by Western blotting. **Results** Both allicin and paclitaxel alone could inhibit the growth of MGC-803 gastric cancer cells in a dose dependent manner. Combined treatment of allicin 9 μg/mL with paclitaxel (1-16 μg/mL) resulted in a synergistic effect of inhibiting cell growth. After incubation with allicin 15 μg/mL, paclitaxel 12 μg/mL alone and in combination, the apoptosis rate was 10.7%, 30.4%, 84.7%, respectively ( $P < 0.01$ ). Treatment with combination of the two drugs enhanced expression of pro-apoptotic gene bax and reduced expression of the anti-apoptotic gene bcl-2, but there was no effect when the drugs were used singly. **Conclusions** The combined treatment of allicin with paclitaxel has a synergistic inhibiting effect on growth of gastric cancer cell lines, and induction of apoptosis by enhancing bax expression and decreasing bcl-2 expression may be the related mechanism.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(4): 341-345]

收稿日期:2006-11-25; 修订日期:2007-04-02。

作者简介:张钧书,男,浙江临安人,浙江省临安市人民医院副主任医师,主要从事胃肠肿瘤治疗方面的研究。

通讯作者:张钧书 E-mail:zhjunshu@163.com

**Key words:** Stomach Neoplasms/pathol; Allcin; Paclitaxel; Apoptosis; bax; bcl-2

**CLC number:** R735.2

**Document code:** A

在肿瘤化疗过程中,抗癌药物在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常增殖细胞也有杀伤作用。联合用药是使药物对肿瘤细胞发挥最大限度的杀伤而对正常细胞的毒性减少到最低的有效途径。紫杉醇是近年来出现的一种新型抗癌药,已广泛应用于临床。研究证明大蒜的主要成分大蒜素具有防癌抗癌作用。笔者研究了在体外紫杉醇联合大蒜素对胃癌细胞 MGC-803 的增殖抑制及促凋亡作用,报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人胃癌细胞株 MGC-803 来自美国标准生物物品收藏中心(ATCC),由浙江大学传染病研究所传代保存提供,大蒜素注射液购自珍宝岛制药有限公司(15 μg/mL),噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司,流式细胞仪为美国 COULTER 公司生产的三色流式细胞仪,Annexin V/PI 双染试剂购自美国 COULTER 公司。

### 1.2 实 验 方 法

1.2.1 细胞培养 含 10% 小牛血清(杭州四季青公司)和 RPMI1640 培养基(GBICO 公司)置于 5% CO<sub>2</sub> 孵箱 37℃ 培养,取对数生长细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖抑制率 将细胞密度调整为  $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$ ,接种于 96 孔板,200 μL/孔。培养的细胞用不同浓度的大蒜素、紫杉醇(四川太极制药公司)和两药联合处理,并设定不加任何处理的对照组,每孔设 3 个复孔。各孔加 MTT 20 μL [5 mg/mL,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解过滤]孵育 4h 后,弃上清液,加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μL 终止反应。微振后于酶标仪波长 570 nm 处测定吸光度 OD 值,计算抑制率。抑制率(%) = (1 - 实验组 OD 值)/对照组 OD 值 × 100%。实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞实验 细胞各  $1 \times 10^6$ ,用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司产品)提取总 RNA。5 × Buffer 4 μL,焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水 10 μL,以上模板 RNA 1 μL, DNase 1 U (美国 Worthington 公司产品) 37℃ 消化 1h, 95℃ 3 min 灭活 DNase;在上述消化后的系统中加入 dNTP

(10 mM) 2 μL, Oligo (dT) 0.2 μL (0.2 μg/μL); DEPC 水 1 μL,逆转录酶(RTase) 1 U 42℃ 1.5h 逆转录(RT)合成 cDNA。利用 Primer 3.0 软件设计引物。bax 上游引物为 5' GGCTGAGACAGGAGGATCAC3',下游引物为 5' AGGCTGGTCTTGAACCTCTG3',扩增片段长度 213 bp; bcl-2 上游引物为 5' GGAGGGTGTGTCATATCA3',下游引物为 5' TC-CAGCCCTACAAGCAGATT3',扩增片段长度 230 bp。β-actin 为内对照,上游引物为 5' - TGCG-CAGAAAACAAGATGAG -3',下游引物为 5' - CAC-GAAGGCTCATCATTCAA -3',扩增片段长度为 411 bp。多聚酶链反应(PCR)体系:10 倍缓冲液(10 × buffer) 5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μL, Taq 酶 0.3 μL (1.5 U);上述 RT 产物 1 μL, dNTP (10 mM) 1 μL,引物各 1 μL (20 μmol/L),加双蒸水至终体积为 25 μL。扩增程序:94℃ 10 min 预变性,94℃ 45 s, 57℃ 45 s, 72℃ 1 min; 35 个循环,72℃ 延伸 10 min。产物 10 μL 在含溴化乙锭(EB)的 2% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯观察结果,拍照进行条带亮度比较。

1.2.4 免疫印迹(Western blot) 取对数生长细胞各  $5 \times 10^6$  个,抽提细胞总蛋白。各组取蛋白样品 40 ~ 60 μg 加样于 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)分离胶上电泳,尔后电转印至硝酸纤维上,封闭液封闭后加入一抗 4℃ 作用过夜后洗膜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温作用 1h 后洗膜。将膜平铺于加工作液的发光反应板上,暗室用 X 光胶片显影 X 光胶片,用数字成像设备扫描胶片,进行条带亮度比较。

### 1.3 统 计 学 处 理

应用 SAS 软件包,大蒜素对胃癌细胞的平均抑制率与药物浓度关系采用回归分析;组间平均值比较采用 *t* 检验;率的比较采用卡方检验。

## 2 结 果

### 2.1 大蒜素对胃癌细胞的抑制作用

3 ~ 60 μg/mL 大蒜素作用胃癌细胞 24h 有明显抑制作用,且呈浓度依赖性(表 1,图 1)。利用 SAS 软件求得回归曲线, MGC-803 细胞平均抑制率(*Y*)与药物浓度(*X*)之间存在着极显著的 S 型(Logistic)曲线回归( $P < 0.0001$ )。

表1 MTT 法检测不同浓度大蒜素对 MGC-803 细胞增殖的抑制率(%, $\bar{x} \pm S$ )

不同浓度的大蒜素( $\mu\text{g/mL}$ )	0	3	6	9	12	15	20	40	60
MGC-803 抑制率(%)	0	11.3 $\pm$ 8.9	7.0 $\pm$ 4.3	10.5 $\pm$ 6.6	14.5 $\pm$ 4.6	44.9 $\pm$ 11.7	76.6 $\pm$ 3.5	89.4 $\pm$ 2.5	74.1 $\pm$ 4.7

2.2 大蒜素联合紫杉醇对胃癌细胞的抑制作用

9  $\mu\text{g/mL}$  大蒜素能增强紫杉醇对胃癌细胞的

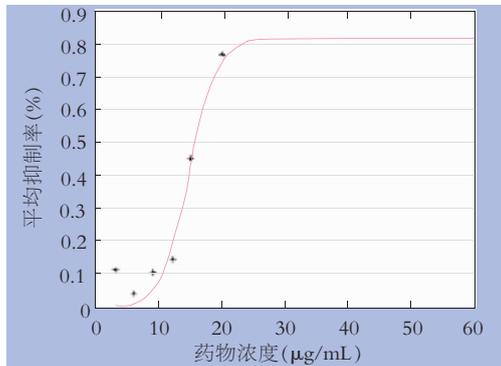


图1 大蒜素对 MGC-803 细胞的抑制作用(24h)

抑制作用( $P < 0.05$ ) (图2)。

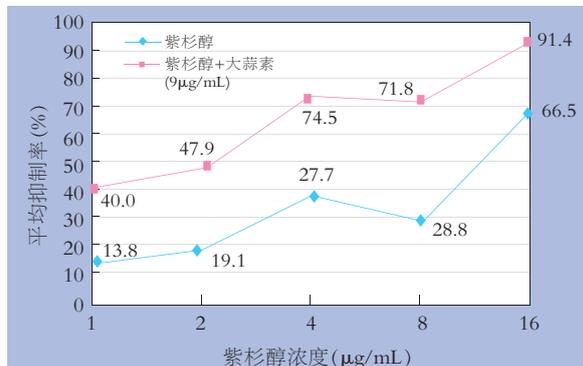


图2 大蒜素联合紫杉醇对 MGC -803 细胞的抑制作用(24h)

2.3 单药及联合用药诱导胃癌细胞的凋亡

单用 15  $\mu\text{g/mL}$  大蒜素及单用 12  $\mu\text{g/mL}$  紫杉醇作用于胃癌细胞 24h 凋亡率为 10.7% 和 30.4%

( $P < 0.01$ ); 两药联合作用细胞凋亡率为 84.71%, 明显高于单一药物(均  $P < 0.01$ ) (图3)。

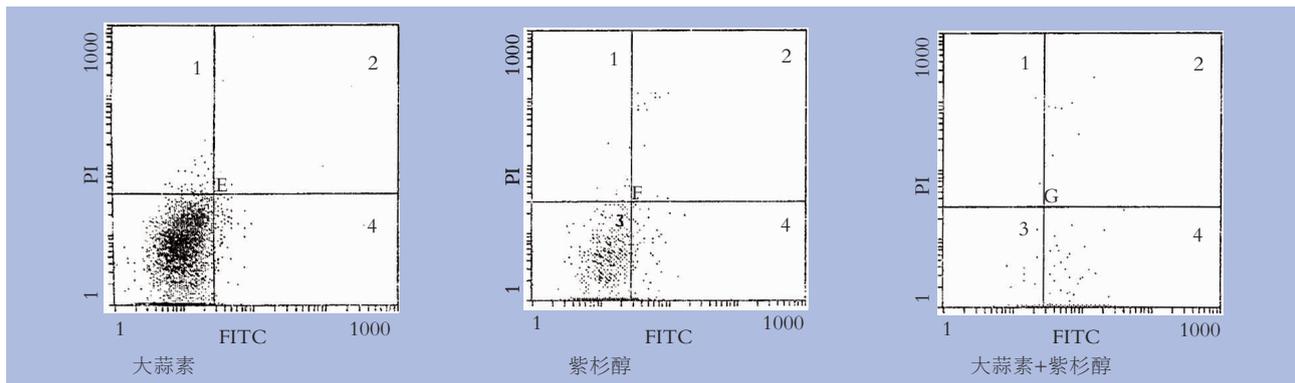
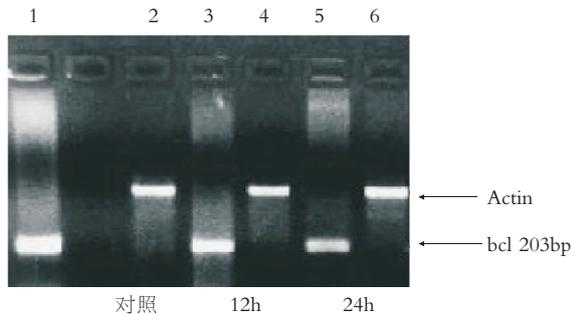
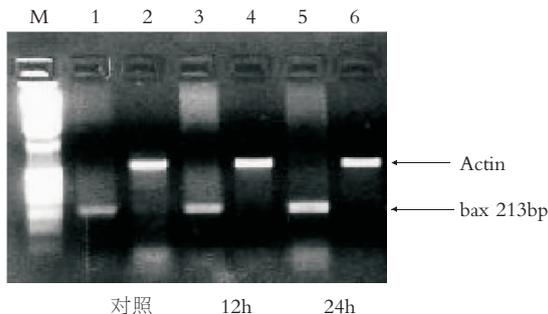


图3 药物对胃癌细胞 MGC-803 凋亡的影响

2.4 RT-PCR 检测

单用大蒜素和紫杉醇作用组其 bax 及 bcl-2

基因转录均未发生明显改变, 两药联合作用后 bax 基因表达增强, bcl-2 基因表达减弱(图4)。



M:100bp 的分子量标准 1:对照组 bax 2:对照组 actin 3:两药联合作用 12h bax 4:两药联合作用 12h actin 5:两药联合作用 24h bax 6:两药联合作用 24h actin

1:对照组 bcl-2 2:对照组 actin 3:两药联合作用 12h bcl-2 4:两药联合作用 12h actin 5:两药联合作用 24h bcl-2 6:两药联合作用 24h actin

图4 大蒜素和紫杉醇联合作用对胃癌细胞 bax(左) 和 bcl-2(右) 基因表达的影响

## 2.5 Western-blot 检测结果

单一药物作用后其 bax bcl-2 蛋白表达无明显改变,两药联合可增加 bax 蛋白表达,减弱 bcl-2 蛋白表达(图 5)。

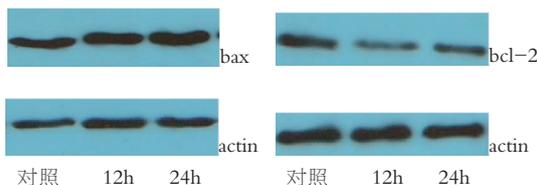


图 5 大蒜素和紫杉醇联合作用对胃癌细胞 bax 和 bcl-2 蛋白表达的影响

## 3 讨论

由于化疗药物的毒副反应及肿瘤细胞的耐药等原因,目前临床都选择几种药物联合应用的方案,以降低毒副反应并提高化疗效果。但至今胃癌的化疗效果仍不能令人满意,选择新的药物和联合用药方案以提高胃癌的化疗效果具有重要的现实意义。近年来植物抗肿瘤药发展迅速,国外对紫杉醇应用于胃癌的多中心研究,显示其单药有效率为 20% ~ 24%<sup>[1]</sup>,尤其对耐常规药物的肿瘤也取得较好疗效,然而紫杉醇也存在毒副反应和耐药性等问题因而影响其化疗效果。最近研究显示<sup>[2]</sup>,低剂量大蒜素与周期特异性药物联合使用能明显增强对胃癌细胞的毒性,同时也可减少抗癌药物剂量以减轻毒性反应。本研究观察联用大蒜和紫杉醇对胃癌细胞的杀伤作用,旨是为临床化疗药物的选择提供新的思路。

本文结果显示大蒜素对胃癌细胞有增殖抑制作用且呈剂量依赖性,低剂量时(9 μg/mL)对胃癌细胞增殖的抑制和诱导凋亡影响不明显,但当其与紫杉醇联用时对胃癌细胞具有协同抑制细胞增殖和诱导凋亡的作用,与单用相比差异有显著性。联用大蒜素可明显加强紫杉醇对胃癌细胞的抑制作用。其机制可能与大蒜素多靶点作用于胃癌细胞影响细胞周期分布等生物特性有关。大蒜素作用胃癌细胞能改变细胞周期的分布,增加 G<sub>2</sub> ~ M 期细胞比例,呈剂量依赖性诱导凋亡,并揭示可与能端粒酶活性下降有关<sup>[3-4]</sup>。Knowles<sup>[5]</sup>研究大蒜素影响细胞周期作用机制与蛋白激酶 C (PKC)、钙依赖蛋白激酶 II (CAMK II) 和细胞外信号调节激酶 (EPK) 的相关性,认为大

蒜素磷酸化 EPK 是将细胞阻滞于 G<sub>2</sub> ~ M 期的机制之一。王菊岩<sup>[6]</sup>报道大蒜素作用胃癌 MKN45 细胞能增强 Caspase-3 mRNA 的表达,诱导细胞凋亡。而紫杉醇是一种新型广谱抗癌药,作用机制独特<sup>[7]</sup>,主要通过结合到微管蛋白上,促进微管蛋白聚合,并阻滞其解聚成亚单位,从而冻结有丝分裂的纺垂体,并促进细胞凋亡。庞清荣<sup>[8]</sup>研究认为,紫杉醇能有效抑制肿瘤细胞生长,其机制可能与降低端粒酶活性及细胞活性有关。有研究<sup>[9]</sup>指出,在化疗药物的联合应用上,周期特异性药物具有重要意义,其能延缓肿瘤细胞的进程,阻止细胞从某一时相进入下一时相,导致细胞暂时性蓄积,此时如给予对这一时相具有杀伤作用的药物将能明显增效。

细胞凋亡由多种因素诱导产生,还受凋亡基因的调控。其中 bcl-2 基因家族与凋亡关系密切,bcl-2 是已发现的最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因,其同源基因 bax 可拮抗 bcl-2 的保护作用而使细胞趋于凋亡。研究<sup>[10]</sup>发现,增加 bax 基因表达可促进紫杉醇诱导的肿瘤细胞凋亡。本研究应用 RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示,在两药物联合作用 24h 后,bax 基因及蛋白水平的表达均明显升高,bcl-2 表达下降。提示药物可能通过上调 bax 和下调 bcl-2 基因及蛋白的表达而发挥促肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长的作用。

大蒜系一种来源广泛、安全的食物。大蒜素为大蒜去皮粉碎后加水蒸馏而得到的挥发油,主要成分为二烯丙基三硫,其抑制肿瘤的作用环节和途径是多方面的。大蒜素具有多种抗癌生物活性<sup>[11]</sup>,如抗氧化,清除氧自由基。因为 DNA 分子的氧化损伤是突变和癌的始发原因。此外在蒜素还有抑制致癌物的活化、诱导解毒酶、加快致癌物排泄等作用。总之,大蒜素与其他抗癌药物相比具有经济、毒副作用小的优点。作为一种化疗联合用药或辅助用药,大蒜素具有值得开发应用的价值。

## 参考文献:

- [1] Yamada Y, Shirao K, Ohtsu A, *et al.* Phase II trial of paclitaxel by three-hour infusion for advanced gastric cancer with

- short premedication for prophylaxis against paclitaxel associated hypersensitivity reactions [J]. *Ann Oncol*, 2001, 12 (8): 1133 - 1137.
- [2] 哈敏文,董明,王兰,等. 大蒜素协同抗癌药对肿瘤细胞杀伤作用的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31 (4): 193 - 196.
- [3] 马锐,何红梅,袁媛. 大蒜素对人胃癌细胞株 SGC-7901 和 BGC-823 生长的影响[J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12 (4): 268 - 270.
- [4] Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (9): 1930 - 1934.
- [5] Knowles LM, Milner JA. Diallyl disulfide induces EPK phosphorylation and alters gene expression profiles in human colon tumor cells [J]. *Nutr*, 2003, 133 (9): 2901 - 2906.
- [6] 王菊岩,陈立军,刘舒颖,等. 大蒜素对人胃癌 MKN45 细胞株的影响及其作用机制的研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2006, 37 (4): 650 - 652.
- [7] Manfredi JJ, Horwitz SB. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action [J]. *Pharmacol Ther*, 1984, 25 (1): 83.
- [8] 庞请荣,张步振,陈骞,等. 不同抗癌药物对乳癌 MCF-7 细胞增殖及端粒酶活性的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11 (6): 357 - 360.
- [9] 孙燕. 肿瘤内科治疗的回顾和展望[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2000, 27 (1): 5 - 11.
- [10] 彭伟丹,张杰,惠安襄,等. 增加 bax 基因表达促进紫杉醇诱导的食管癌细胞凋亡[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2000, 32 (4): 356 - 358.
- [11] 杨艳梅,高彦辉. 大蒜抗癌作用研究进展[J]. *国外医学中医中药分册*, 2000, 22 (2): 67 - 71.

文章编号:1005-6947(2007)03-0345-01

· 病案报告 ·

## 阑尾“荷包脓肿”1 例

宋伟宁, 刘钦文, 滕成明

(山东省潍坊市第二人民医院 普通外科, 山东 潍坊 261041)

**关键词:** 阑尾切除术/副作用; 阑尾脓肿/继发性; 病例报告

**中图分类号:** R656.8

**文献标识码:** D

**患者** 男, 20 岁。5d 前因阑尾炎在当地镇医院行阑尾切除术。术后一直低热, 第 5 天体温升至 40.1℃, 右侧腹痛剧烈, 急转入我院。体查: 急性痛苦面容, 血压 145/85mmHg, 体温 40.1℃, 心肺(-)。右侧腹肌紧张, 压痛, 反跳痛明显, 未触及包块, 腹水征(-)。白细胞  $19.8 \times 10^9/L$ , 中性 91%, 初步诊断: (1) 局限性腹膜炎; (2) 阑尾切除术后, 阑尾残株炎? 急

诊行剖腹探查术。术中见: 回肠末端系膜淋巴结肿大, 回盲部和原荷包缝合处充血明显, 原荷包腔触及 3cm×3cm 大小肿块, 拆除荷包缝线后, 从荷包腔引流出淡黄色、带臭味的黏稠脓液约 5mL (培养为大肠杆菌生长), 见阑尾残端长约 2cm, 肿胀, 拭净脓液, 在原荷包腔处放置橡胶引流管, 经右下腹引出腹腔, 术后继续抗感染、补液等治疗, 第 2 天体温降至正常。术后第 2 天开始流质饮食, 术后第 5 天拔掉引流管, 术后第 11 天刀口拆线, 治愈出院, 随访 1 个月患者无异常。

**讨论** 阑尾切除术后荷包缝合包埋阑尾残端, 具有使残端重新腹膜化的优点, 但亦是造成荷包死腔并慢性感染而致右下腹疼痛不能消除的原

因, 一旦术后并发死腔急性感染(荷包脓肿), 后果极为严重。本例患者阑尾残端过长, 约 2cm, 荷包缝线穿透盲肠全层, 并且荷包腔过大, 形成死腔, 导致荷包脓肿。为避免这一并发症, 可采取: (1) 阑尾残端不宜过长, 以小于 0.4~0.5cm 为宜, 以免影响消毒残端的彻底性; (2) 用 5% 石炭酸和 75% 酒精消毒腔内, 以彻底破坏腔内阑尾黏膜和杀灭腔内细菌; (3) 荷包腔不宜过大, 以恰能包埋阑尾残端为度; (4) 荷包缝合时, 缝针切勿穿透盲肠壁的全层。阑尾荷包脓肿诊断确立后, 应及时手术拆除荷包缝线, 局部引流并以脂肪垂或阑尾系膜残端覆盖阑尾残端, 以达重新腹膜化的目的。

**收稿日期:** 2007-02-06。

**作者简介:** 宋伟宁, 男, 山东潍坊人, 山东省潍坊市第二人民医院普外科 主治医师, 主要从事普外及肝胆方面的研究。

**通讯作者:** 宋伟宁 E-mail: songweining616@163.com