

# 大蒜素联合阿霉素诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡作用

张希锐, 邵淑丽\*, 李凤英, 张伟伟

齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006

**摘要:**研究大蒜素联合阿霉素诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的作用。台盼蓝拒染法检测细胞增殖活性, 通过光镜、荧光显微镜、透射电镜、DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术检测不同浓度的大蒜素和阿霉素单独及联合作用对 SGC-7901 细胞增殖的影响。结果表明, 大蒜素与阿霉素联合作用可增强诱导细胞凋亡。

**关键词:**大蒜素;阿霉素;SGC-7901;细胞增殖

中图分类号:Q291

文献标识码:A

## Combination of Allicin and Adriamycin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Gastric SGC-7901 cell

ZHANG Xi-rui, SHAO Shu-li\*, LI Feng-ying, ZHANG Wei-wei

*Animal Laboratory of genetics, School of science and engineering of Qiqihar University, Qiqihar 161006, China*

**Abstract:** To evaluate the anti-tumor effect of Allicin combining with ADM on the human gastric cancer cells line SGC-7901. The apoptosis of SGC-7901 cells induced by different concentrations of allicin and ADM was applied alone or together, to gastric cancer cells SGC-7901 was analyzed by visible light, fluorescence and transmission electron microscope (TEM), agarose gel electrophoresis of DNA; Distribution of cell apoptosis was analyzed using flow cytometry. The result show that Compared with the control, allicin and ADM and significantly inhibited the proliferation of SGC-7901 cells. The combination of allicin and ADM was found to be more effective in inhibiting growth.

**Key words:** Allicin; Adriamycin; SGC-7901; cell proliferation

胃癌在我国发病率较高, 临床上侧重点是放疗和化疗, 这些手段不但能够杀死肿瘤细胞而且对宿主免疫系统也造成了损伤, 治疗效果不甚理想[1]。目前急需研发毒性小的抗癌药物, 已是患者与临床工作者共同的期许。本实验采用台盼蓝拒染法, 琼脂糖凝胶电泳和流式细胞术分析大蒜素及联合阿霉素对 SGC-7901 细胞的作用, 探讨其对胃癌细胞凋亡的影响。

## 1 材料

### 1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

### 1.2 药品和试剂

大蒜素注射液(上海禾丰制药有限公司);阿霉

素(adriamycin, ADM);浙江海正药业股份有限公司;RPMI-1640 培养基干粉(HyClone);优级胎牛血清(上海生工生物工程技术有限公司);Hepes(上海生工生物工程技术有限公司);吡啶橙(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);PI(碧云天生物技术公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

SGC-7901 细胞用含有 10% 优级胎牛血清, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素和 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素的 RPMI-1640 培养液, 与 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养。

### 2.2 细胞生长抑制曲线和半数抑制浓度的测定

取对数生长期 SGC-7901 细胞进行药物处理, 大蒜素加药浓度分别为 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200  $\text{mg}/\text{L}$ 。阿霉素加药浓度分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8  $\text{mg}/\text{L}$ 。联合用药时, 大蒜素和阿霉素加药浓度分别为 5 + 0.5, 10 + 1, 15 + 1.5, 20 + 2, 25 + 2.5, 30 + 3, 35 + 3.5, 40 + 4  $\text{mg}/\text{L}$ 。细胞培养 48 h

收稿日期:2014-03-14 接受日期:2014-05-13

基金项目:黑龙江省自然科学基金(C200624;C201241);黑龙江省教育厅科学技术项目(11511447;12511611);黑龙江省高校农产品加工重点实验室开放项目

\* 通讯作者 E-mail:shsh132@163.com

后,在光学显微镜下数出拒染的活细胞个数,并按公式计算出细胞增殖抑制率,如下:细胞的增殖抑制率 =  $1 - (\text{试验组的平均活细胞数} / \text{对照组的平均活细胞数}) \times 100\%$ ,用 Origin 绘制出细胞增殖抑制曲线,测出  $IC_{50}$  值,并计算合用指数(CI) =  $(\text{联合用药时大蒜素的 } IC_{50} / \text{单独用药时大蒜素的 } IC_{50}) + (\text{联合用药时阿霉素的 } IC_{50} / \text{单独用药时阿霉素的 } IC_{50})$ , $CI < 0.95$  为协同效应, $0.96 < CI < 1.94$  为相加效应, $CI > 1.95$  为拮抗效应。

### 2.3 光镜和荧光显微镜观察药物对细胞形态的影响

药物处理 48 h 后,光学显微镜下观察对照组和加药组细胞;荧光显微镜下观察吖啶橙染色后的细胞形态。

### 2.4 透射电镜观察药物对细胞超微结构的影响

收集对照,大蒜素,阿霉素,联合用药处理 48 h 的 SGC-7901 细胞,采用常规制作透射电镜标本,观察并拍照。

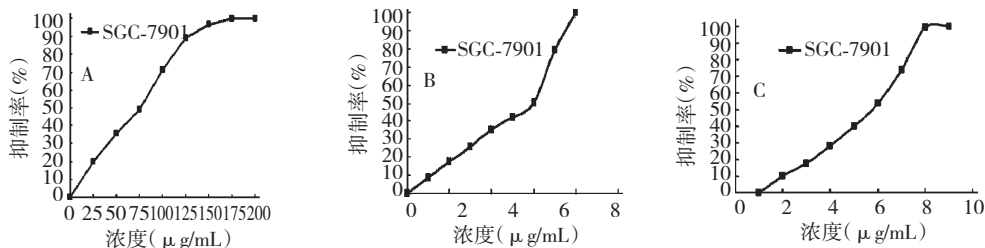


图 1 A:大蒜素作用于 SGC-7901 (48 h) 的生长抑制曲线;B:阿霉素作用于 SGC-7901 (48 h) 的生长抑制曲线;C:大蒜素和阿霉素联合作用 SGC-7901 (48 h) 的生长抑制曲线

Fig. 1 A: The control curve of the SGC-7901 cells treated with allicin (48 h); B: The control curve of the SGC-7901 cells treated with ADM (48 h); C: The control curve of the SGC-7901 cells treated with allicin and ADM (48 h)

表 1 曲线拟合成结果

Table 1 The results of curve fitting

组别 Group	抑制曲线 Regression equation	$IC_{50}$ 值 $IC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$R^2$ 值 $R^2$	F 值 F	P P
大蒜素 Allicin	$Y = 14.304 + 43.901 \log X$	78	0.924	72.958	$< 0.01$
阿霉素 ADM	$Y = -6.024 + 38.437 \log X$	5.7	0.927	76.605	$< 0.01$

### 3.2 细胞形态学观察

#### 3.2.1 大蒜素和阿霉素单独及联合作用对 SGC-7901 细胞形态的影响

在光镜和荧光显微镜下,加药 48 h 后观察到细

### 2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡

收集对照及所有用药处理 48 h 的 SGC-7901 细胞,并提取其 DNA,1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

### 2.6 PI 单染法检测细胞凋亡率

分别收集培养 48 小时的 SGC-7901 细胞,PI 染色,流式细胞仪检测。

### 2.7 统计学处理

所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用多因素方差分析,用 SPSS17.0 统计软件进行统计, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 台盼蓝拒染法检测药物联合应用的效果

大蒜素和阿霉素作用 SGC-7901 细胞的  $IC_{50}$  值分别为  $78 \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $5.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,联合用药为  $26 \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $2.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ , $CI = 0.789 < 0.95$ ,显示大蒜素和阿霉素联合作用 SGC-7901 细胞为协同效应,见图 1,表 1。

胞形态明显的变化。与正常细胞相比凋亡细胞表面有数个凸起小泡或小球状的结构,由图 2,3 可知联合用药的凋亡情况更加的显著。

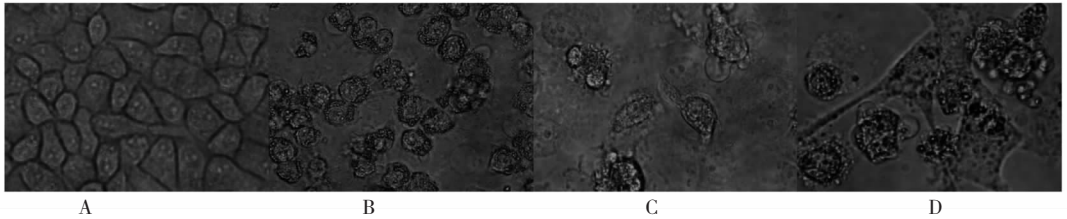


图 2 A: 未经药物处理的人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞(×400); B: 80 μg/mL 大蒜素作用 48 h 的人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞(×400); C: 6 μg/mL 阿霉素作用 48 h 的 SGC-7901 细胞(×400); D: 25 μg/mL 大蒜素和 2.5 μg/mL 阿霉素作用 SGC-7901 细胞 48 h(×400)

Fig. 2 A: The normal SGC-7901 cell without any drugs added to them(×400); B: The SGC-7901 cell treated with 80 μg/ml alliin for 48 h(×400); C: The SGC-7901 cell treated with 6 μg/mL ADM for 48 h(×400); D: The SGC-7901 cell treated with 25 μg/mL alliin and 2.5 μg/mL ADM for 48 h(×400).

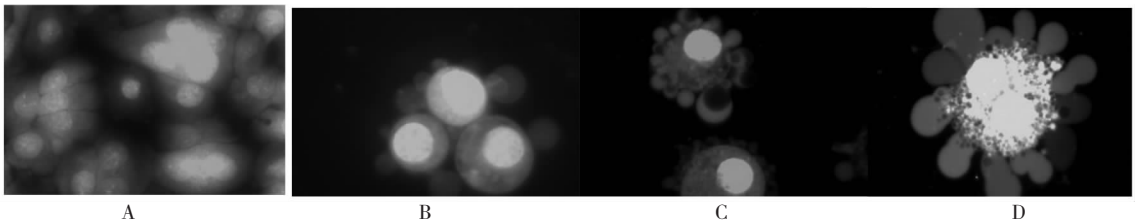


图 3 A: 未经药物处理的人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞(×400); B: 80 μg/mL 大蒜素作用 48 h 的人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞(×400); C: 6 μg/mL 阿霉素作用 48 h 的 SGC-7901 细胞(×400); D: 25 μg/mL 大蒜素和 2.5 μg/mL 阿霉素作用 SGC-7901 细胞 48 h(×400)

Fig. 3 Cell morphology of SGC-7901 cells in fluorescence microscopy(×400). A: control; B: the cells were treated with 80 mg/L alliin for 48 h; C: the cells were treated with 6 mg/L adriamycin for 48 h; D: the cell were treated with 25 mg/L alliin and 2.5 mg/L adriamycin for 48 h.

### 3.2.2 大蒜素和阿霉素单独及联合作用对 SGC-7901 细胞超微结构的影响

由图 4 可知,大蒜素和阿霉素作用 SGC-7901 细胞 48 h 后,细胞微绒毛脱落,膜性结构清晰,核膜完整,线粒体絮状变性,游离核蛋白体丰富,可见大量脂滴;部分细胞核固缩,核膜完整,异染色质边集在

核膜下,呈早期凋亡状态。联合用药细胞核固缩,核膜表面可见核切迹及核内包涵物,双层核膜清晰;大量线粒体空泡变性,游离核蛋白体减少;部分细胞表面伸出大的质膜叶片脱落,胞质内大量脂滴堆积。联合用药细胞凋亡程度更加明显,见图 4。

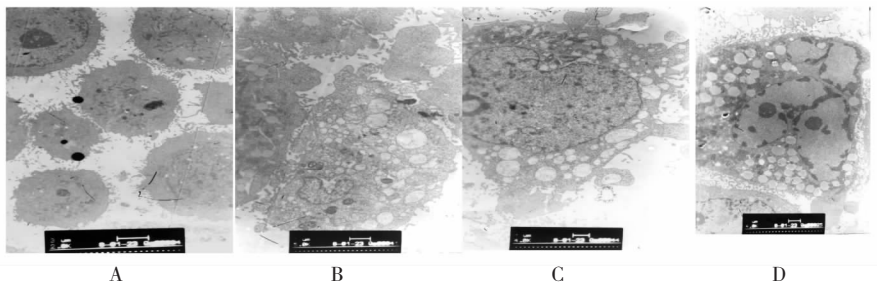


图 4 A: 对照(×2500); B: 80 μg/mL 大蒜素作用 48 h 的人胃癌 SGC-7901 细胞(×2500); C: 6 μg/mL 阿霉素作用 48 h 人胃癌 SGC-7901 细胞(×2500); D: 25 μg/mL 大蒜素和 2.5 μg/mL 阿霉素作用人胃癌 SGC-7901 细胞 48 h(×2500)

Fig. 4 A: The normal SGC-7901 cell without any drugs added to them(×2500); B: The SGC-7901 cell treated with 80 μg/mL alliin for 48 h(×2500); C: The SGC-7901 cell treated with 6 μg/mL ADM(×2500); D: The SGC-7901 cell treated with 25 μg/mL alliin and 2.5 μg/mL ADM(×2500)

### 3.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳技术检测细胞凋亡

大蒜素、阿霉素及联合作用 SGC-7901 细胞 48 h 后与对照组相比出现明显的 DNA 梯状条带,其中,联合用药组 DNA 梯状条带更明显,见图 5。

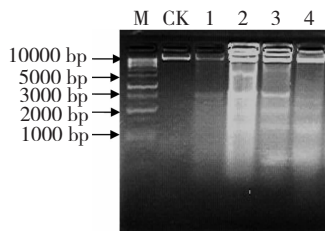


图 5 M:marker;CK:对照;1:30 mg/L 大蒜素;2:80 mg/L 大蒜素;3:25  $\mu$ g/mL 大蒜素和 2.5  $\mu$ g/mL 阿霉素;4:6 mg/L 阿霉素

Fig. 5 The DNA ladder of SGC-7901 treated with allixin or / and adriamycin for 48 h. M:marker;CK:control;1:30 mg/L allixin;2:80 mg/L allixin;3:(25 + 2.5) mg/L (allixin + adriamycin);4:6 mg/L adriamycin

### 3.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

通过流式细胞仪的检测,联合加药与大蒜素和阿霉素单独加药相比,SGC-7901 细胞凋亡率比例最大。见图 6。

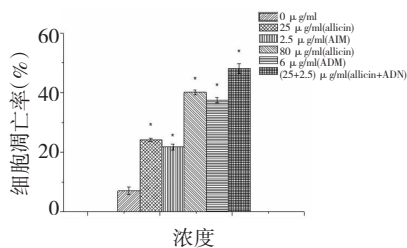


图 6 大蒜素、阿霉素单用及联合作用 SGC-7901 细胞 48 h 的细胞凋亡率

Fig. 6 The comparison of apoptosis of the SGC-7901 cell treated with allixin、ADM and allixin and ADM for 48 h

## 4 讨论

联合用药是化疗的主要手段,近年来随着人们

对肿瘤细胞,细胞凋亡及药物代谢动力学的深入认识和多种新的化疗药物的问世,使得肿瘤化疗有了新的科学依据,并为大量杀灭肿瘤细胞提供了有力武器,它可以使用几种作用机制不同的药物共同诱导细胞凋亡,减少了只用一种较高浓度药物诱导细胞凋亡对机体的损害作用<sup>[2-4]</sup>,联合用药对提高胃癌治疗具有重要意义。杜琴等人应用白藜芦醇联合姜黄素对 SMMC-7721 肝癌细胞的抑制率显著增强<sup>[5]</sup>。本研究结果亦显示大蒜素、阿霉素能够诱导 SGC-7901 细胞的凋亡,凋亡细胞呈特殊性形态学改变,如细胞核碎裂,产生凋亡小体<sup>[6]</sup>,当两药联合作用时诱导 SGC-7901 细胞凋亡效果更加显著,流式细胞术检测结果显示:大蒜素、阿霉素、联合用药能有效诱导 SGC-7901 细胞凋亡,且联合用药组的凋亡率明显高于各自的单独用药组,凋亡幅度升高,揭示大蒜素联合阿霉素具有一定协同抗胃癌作用,两药联合对治疗胃癌可能会取得较好的效果。

### 参考文献

- 1 Su LN(苏丽娜),Chen LL(陈琳琳),*et al.* Study progress on mechanism of inhibition of allixin on gastric cancer. *J Jilin Med Coll*(吉林医药学院学报),2010,31:112-115.
- 2 Kaufmann SH, Earnshaw. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*,2000,256:42-49.
- 3 Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*,1994,78:539-542.
- 4 Hannum YA. Apoptosis and the dilemma of cancer therapy. *Blood*,1997;89:1846-1853.
- 5 Du Q(杜琴),Hu B(胡兵),Shen KP(沈克平),*et al.* Combination of resveratrol and curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *Chin J Experim Trad Med Formulae*(中国实验方剂学杂志),2012,18:262-266.
- 6 Indran I R,Tufo G,Pervaiz S,*et al.* Recent advances in apoptosis mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*,2011,1807:735.