

## · 基础研究 ·

## 大蒜素对 5-氟尿嘧啶治疗肝癌的增效作用及机制

杨丹 颜琼 罗德兰 邓明明

**摘要 目的** 研究大蒜素增强肝癌细胞 SMMC-7721 对 5-氟尿嘧啶(5-FU)敏感性作用及机制。方法用不同浓度的大蒜素和亚叶酸钙(CF)同时联合 5-FU 处理肝癌细胞株 SMMC-7721。将对数生长的 SMMC-7721 细胞株随机分为空白对照组、5-FU(100 mg/L)组、低浓度大蒜素(25 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、中浓度大蒜素(50 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、高浓度大蒜素(100 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、低浓度 CF(5 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、中浓度 CF(10 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、高浓度 CF(20 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组。采用 CCK-8 检测细胞增殖抑制率,选择同类药物中抑制率最高的组完成后续实验。采用流式细胞术检测细胞周期。用 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡。采用 Western Blot 法检测与耐药相关的 P 糖蛋白(Pgp)和多药耐药相关蛋白-1(MRP-1)表达。**结果** 与 5-FU 组比较,低、中、高浓度大蒜素均可协同 5-FU 抑制 SMMC-7721 生长,而高浓度大蒜素 + 5-FU 组的增殖抑制作用最明显( $P < 0.05$ );选择效果较好的高浓度大蒜素 + 5-FU 组和中浓度 CF + 5-FU 组继续完成后续实验。各给药组均能将细胞阻断在 S 期,高浓度大蒜素 + 5-FU 组的 S 期阻滞作用较其他组更为明显,并且还具有明显的 G2/M 期细胞阻滞作用( $P < 0.05$ )。高浓度大蒜素 + 5-FU 组能更明显地诱导肝癌细胞凋亡,降低 Pgp 和 MRP-1 蛋白表达水平( $P < 0.05$ )。**结论** 大蒜素能够增强 5-FU 的抗肿瘤效果。其机制可能与大蒜素降低肝癌细胞内 Pgp 和 MRP-1 的表达,逆转耐药有关。大蒜素具有 G2/M 期细胞阻滞作用,可能与 5-FU 发生协同作用。

**关键词** 大蒜素; 5-氟尿嘧啶; 亚叶酸钙; 肝癌; 耐药

The Synergistic Effects of Allicin on 5-Fluorouracil Against Hepatocellular Carcinoma and Its Mechanism YANG Dan, YAN Qiong, LUO De-lan, and DENG Ming-ming *Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan(646000)*

**ABSTRACT Objective** To investigate the effect of allicin on enhancing the sensitivity of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 to 5-FU and its possible mechanism. **Methods** Allicin and Calcium folinate (CF) at different concentration were used as chemotherapeutic sensitizers of 5-FU to intervene human HCC SMMC-7721 cells. Human HCC SMMC-7721 cells at the logarithmic phase were randomly divided into the blank control group, 5-FU(100 mg/L) group, low concentration allicin (25 mg/L) + 5-FU(100 mg/L) group, middle concentration allicin (50 mg/L) + 5-FU(100 mg/L) group, high concentration allicin (100 mg/L) + 5-FU(100 mg/L) group, low concentration CF(5 mg/L) + 5-FU(100 mg/L) group, middle concentration CF (10 mg/L) + 5-FU (100 mg/L) group, and high concentration CF (20 mg/L) + 5-FU (100 mg/L) group. CCK-8 was used to invest the cell proliferation ability of each group, and the inhibitory rates were calculated. According to the results of CCK-8, we chose the best concentration to complete the study. Flow cytometry (FCM) was used to detect the cell cycle in each group, and to observe the cell cycle arrest effect. Hoechst 33258 staining was conducted to testify the cell apoptosis, and the apoptosis rates were concluded by cell counting. The expression of proteins which were closely related to the inducement of multidrug resistance like P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance-associated protein-1 (MRP-1) were determined by Western Blot. **Results** Compared with 5-FU group, the allicin in low, medium and high concentration all had the synergistic effect in inhibiting the growth of SMMC-7721, while the

作者单位: 西南医科大学附属医院消化内科(四川 646000)

通讯作者: 邓明明, Tel: 18989131797, E-mail: dengmming@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180616. 025

high concentration of allicin combined with 5-FU group had the most obvious inhibitory effect on the cell growth ( $P < 0.05$ ). We chose high concentration allicin + 5-FU group and middle concentration CF + 5-FU group to complete study. All the groups could block the cells in S phase, but the high concentration allicin + 5-FU group was most obvious, and also showed the obvious G2/M phase cell block effect ( $P < 0.05$ ). The high concentration allicin + 5-FU group showed the more obvious effect on inducing the cell apoptosis, and could reduce the expression level of Pgp and MRP-1 ( $P < 0.05$ ). Conclusions Allicin can enhance the sensitivity of hepatoma cell SMMC-7721 to 5-FU. The mechanism may be related to allicin lowering the expression of Pgp and MRP-1 of SMMC-7721 and reversing drug resistance. Allicin has G2/M phase blocking effect and may play a synergistic role with 5-FU.

**KEYWORDS** allicin; 5-fluorouracil; calcium folinate; hepatocellular carcinoma; drug resistance

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)联合增效剂亚叶酸钙(calcium folinate, CF)是肝癌化疗的经典方案,该方案耐药率高,限制了其临床应用<sup>[1]</sup>。大蒜素(allicin)是天然有机硫化物复合物。研究发现大蒜素具有抗肿瘤潜力<sup>[2]</sup>。大蒜素能否作为增效剂提高5-FU对肝癌细胞的杀伤作用,同时避免发生耐药引起了关注<sup>[3]</sup>。本实验希望能为肝癌的联合化疗提供新方案及理论依据。

## 材料与方法

1 细胞 人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自西南医科大学附属医院分子医学实验中心(批号:14176250)。细胞使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养,培养条件为温度 37 ℃,湿度 100%, 5% CO<sub>2</sub>。

2 药物、试剂及仪器 5-FU(250 mg: 10 mL, 西安海欣制药有限公司,批号:1802021), CF(100 mg: 10 mL, 江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:1972534)过滤除菌,封口后 4 ℃ 保存,现配现用。大蒜素(20 mg/粒,纯度≥98%,新疆新北制药有限责任公司,批号:657836)完全溶解于吐温-20,后用生理盐水稀释,过滤除菌,封口后 -20 ℃ 避光保存,现配现用。RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司)。CCK-8 试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、Hoechst 33258 购自上海碧云天生物技术有限公司。人 Pgp、MRP-1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。流式细胞仪,美国 BD 公司,型号: FACSCanto。多功能酶标仪,奥地利帝肯公司,型号: Infinite F50。

3 分组及干预方法 将 SMMC-7721 细胞分为:空白对照组、5-FU(100 mg/L)组、低浓度大蒜素(25 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、中浓度大蒜素(50 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、高浓度大蒜素(100 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、低浓度 CF

(5 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、中浓度 CF(10 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组、高浓度 CF(20 mg/L) + 5-FU(100 mg/L)组。各组细胞培养至对数期时进行后续检测。

4 检测指标及方法 采用 CCK-8 法检测各组细胞的增殖情况,测定各小孔的吸光度(OD 值),计算增殖抑制率。利用公式:增殖抑制率(%) = (试验组 OD 值 - 无细胞含药对照组 OD 值) / (正常对照组 OD 值 - 无细胞不含药对照组 OD 值) × 100%。选择抑制作用最明显的浓度继续实验。用流式细胞术检测细胞周期,了解各组细胞周期阻滞情况。用 Hoechst 33258 染色检测凋亡,计算凋亡率,凋亡率(%) = 凋亡细胞数 / 总细胞数 × 100%。用 Western Blot 技术检测 Pgp 和 MRP-1 的表达情况,采用 Quantity one 2.0 软件分析各组样本中目的蛋白的相对含量(相对含量 = 目的蛋白的 IDV / 内参蛋白的 IDV)。

5 统计学方法 实验数据均用 SPSS 17.0 软件进行分析,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

1 各组各时间点 SMMC-7721 细胞抑制率比较(表 1) 与 5-FU 组比较,各给药组均能够抑制肝癌细胞增殖,且其增殖抑制作用与浓度正相关( $P < 0.05$ ),高

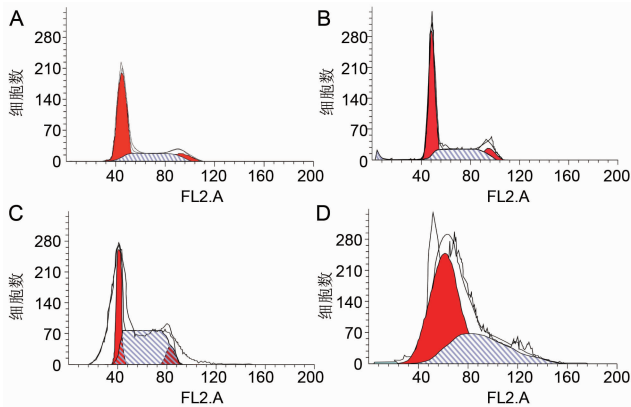
表 1 各组各时间点 SMMC-7721 细胞抑制率比较(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	24 h 抑制率	48 h 抑制率	72 h 抑制率
5-FU	6	9.5 ± 2.3	12.5 ± 2.6	19.4 ± 3.7
低浓度大蒜素 + 5-FU	6	16.6 ± 3.2 *▲	23.6 ± 4.9 *▲	39.3 ± 5.0 *▲
中浓度大蒜素 + 5-FU	6	27.1 ± 3.9 *▲	36.1 ± 4.4 *▲	49.2 ± 2.3 *▲
高浓度大蒜素 + 5-FU	6	31.1 ± 1.4 *	58.1 ± 2.1 *	64.1 ± 5.4 *
低浓度 CF + 5-FU	6	20.7 ± 2.9 *△	28.7 ± 2.6 *△	37.1 ± 4.3 *△
中浓度 CF + 5-FU	6	30.5 ± 1.4 *	37.9 ± 2.0 *▲	46.3 ± 2.6 *▲

注:与 5-FU 组比较,\* $P < 0.05$ ;与中浓度 CF + 5-FU 组比较,△ $P < 0.05$ ;与高浓度大蒜素 + 5-FU 组比较,▲ $P < 0.05$

浓度 CF 联合 5-FU 组因细胞不能耐受而大面积死亡, 无法继续实验。随着作用时间延长, 抑制作用越明显, 72 h 抑制率最高 ( $P < 0.05$ )。选择效果较好的高浓度大蒜素 + 5-FU 组和中浓度 CF + 5-FU 组继续完成后续实验。

2 各组 SMMC-7721 细胞周期比较(图 1, 表 2) 各给药组均能将 SMMC-7721 细胞阻滞在 S 期。与空白对照组比较, 5-FU 组 G0/1 期、S 期比例升高 ( $P < 0.05$ ), G2/M 期比例降低, ( $P < 0.05$ )。与 5-FU 组比较, 高浓度大蒜素 + 5-FU 组 G0/1 期比例降低, 且低于中浓度 CF + 5-FU 组 ( $P < 0.05$ ), G2/M 期及 S 期比例升高, 且高于中浓度 CF + 5-FU 组 ( $P < 0.05$ ); 中浓度 CF + 5-FU 组 G0/1 期、G2/M 期比例降低 ( $P < 0.05$ ), S 期比例升高 ( $P < 0.05$ )。



注: A 为空白对照组; B 为 5-FU 组; C 为高浓度大蒜素 + 5-FU 组; D 为中浓度 CF + 5-FU 组

图 1 各组 SMMC-7721 细胞流式细胞术结果

表 2 各组 SMMC-7721 细胞周期比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	G0/1 期	G2/M 期	S 期
空白对照	6	56.9 ± 3.6	16.6 ± 2.3	26.4 ± 1.9
5-FU	6	61.1 ± 1.8*	7.0 ± 1.7*	31.9 ± 1.0*
高浓度大蒜素 + 5-FU	6	25.1 ± 2.0 $\Delta$	19.3 ± 2.4 $\Delta$	55.6 ± 2.2 $\Delta$
中浓度 CF + 5-FU	6	49.7 ± 2.4 $\Delta\Delta$	5.5 ± 1.8 $\Delta$	44.8 ± 2.6 $\Delta\Delta$

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 5-FU 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与高浓度大蒜素 + 5-FU 组比较,  $\Delta\Delta P < 0.05$

3 各组 SMMC-7721 细胞凋亡率比较(图 2, 表 3)

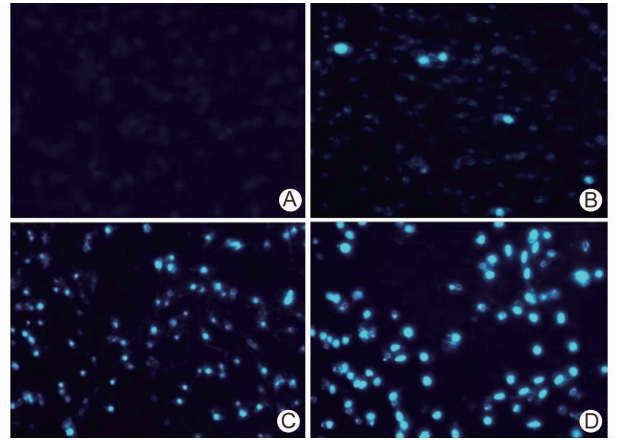
各给药组均有凋亡细胞。与 5-FU 组比较, 高浓

表 3 各组 SMMC-7721 细胞凋亡率比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	凋亡率
5-FU	6	6.3 ± 1.6
高浓度大蒜素 + 5-FU	6	56.1 ± 4.4*
中浓度 CF + 5-FU	6	40.9 ± 3.7* $\Delta$

注: 与 5-FU 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与高浓度大蒜素 + 5-FU 组比较,  $\Delta P < 0.05$

度大蒜素 + 5-FU 组及中浓度 CF + 5-FU 组凋亡率升高 ( $P < 0.05$ ), 高浓度大蒜素 + 5-FU 组高于中浓度 CF + 5-FU 组 ( $P < 0.05$ )。

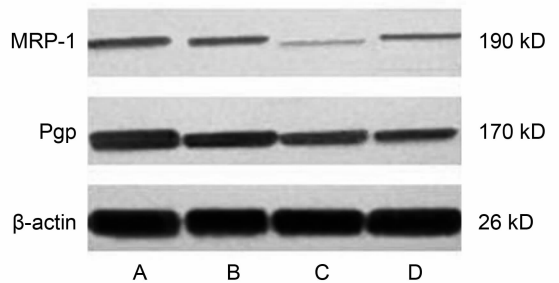


注: A 为空白对照组; B 为 5-FU 组; C 为高浓度大蒜素 + 5-FU 组; D 为中浓度 CF + 5-FU 组; 凋亡细胞内含蓝色荧光颗粒

图 2 各组 SMMC-7721 细胞凋亡情况 (Hoechst 33258,  $\times 100$ )

4 各组 Pgp 及 MRP-1 蛋白表达比较(图 3, 表 4)

肝癌细胞经过药物处理以后, 其耐药蛋白的表达水平较空白对照组均有不同程度的下降。与空白对照组比较, 5-FU 组 Pgp 及 MRP-1 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。与 5-FU 组比较, 高浓度大蒜素 + 5-FU 组及中浓度 CF + 5-FU 组 Pgp 及 MRP-1 蛋白表达均降低 ( $P < 0.05$ ), 高浓度大蒜素 + 5-FU 组低于中浓度 CF + 5-FU 组 ( $P < 0.05$ )。



注: A 为空白对照组; B 为 5-FU 组; C 为高浓度大蒜素 + 5-FU 组; D 为中浓度 CF + 5-FU 组

图 3 各组 Pgp 及 MRP-1 蛋白 Western Blot 结果

表 4 各组 Pgp 及 MRP-1 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Pgp/ $\beta$ -actin	MRP-1/ $\beta$ -actin
空白对照	6	0.735 ± 0.037	0.561 ± 0.064
5-FU	6	0.601 ± 0.046*	0.495 ± 0.019*
高浓度大蒜素 + 5-FU	6	0.242 ± 0.044 $\Delta$	0.280 ± 0.023 $\Delta$
中浓度 CF + 5-FU	6	0.431 ± 0.026 $\Delta\Delta$	0.363 ± 0.047 $\Delta\Delta$

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 5-FU 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与高浓度大蒜素 + 5-FU 组比较,  $\Delta\Delta P < 0.05$



## 讨 论

5-FU 是当前使用广泛的抗代谢类细胞周期特异性化疗药物之一<sup>[4]</sup>。5-FU 的抗肿瘤机制是: 干扰 DNA 正常合成, 将肿瘤细胞的细胞周期阻断在 S 期; 影响 mRNA 的翻译, 阻碍蛋白质的正常合成<sup>[5]</sup>。但是 5-FU 的治疗剂量和中毒剂量极为接近, 安全性差。故 5-FU 多与增效剂联合使用, 以减少药物剂量。但 5-FU 联合 CF 这一经典组合耐药发生率高, 限制了其在临床中的应用。因此进一步探索、改良肝癌的化疗方案, 寻找新的化疗增效剂就显得非常紧迫和必要。

既往研究发现大蒜素对肿瘤细胞具有细胞周期特异性, 有成为 5-FU 增效剂的潜能。Chen F 等<sup>[6]</sup>发现大蒜素作用于食管癌 Eca-109 和 EC9706 细胞后, 能够显著减少 G0/G1 期和 S 期的细胞, 将细胞周期阻滞在 G2/M 期; 并且导致线粒体损伤, 使得 Cyt c 释放至细胞浆, 显著增加 p53、p21、CHK1、Bax、caspase-3 和 caspase-9 等表达。HAN GZ 等<sup>[7]</sup>发现大蒜素可以调节脾脏的免疫活性, 刺激免疫活性因子的产生及释放, 将小鼠脾细胞的细胞周期阻滞在 G2/M 期和 S 期。

本实验在利用流式细胞技术对肝癌细胞周期的检测中发现, 当使用大蒜素作为 5-FU 增效剂时, 显著提高了 5-FU 的周期阻滞作用, 将更多的细胞阻滞在 S 期。除此之外还发现, 大蒜素还能够增加 G2/M 期细胞的比例。上述结果说明, 大蒜素对肿瘤细胞的周期阻滞作用是确实存在的, 而且大蒜素可能与 5-FU 发生协同作用增强彼此的抗肿瘤效果。

多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是导致 5-FU 联合 CF 化疗方案失败重要的原因之一。MDR 是指肿瘤细胞在对一种药物耐药的同时, 对药理作用机制和结构完全不同的多种药物也发生交叉耐药的现象<sup>[8]</sup>。导致肿瘤细胞发生 MDR 的机制包括经典机制和非经典机制两大类<sup>[9]</sup>。经典机制主要由细胞膜上的 ABC 转运体介导<sup>[10]</sup>。ABC 转运体是存在于细胞膜上的结构相近的膜蛋白家族, 与细胞内外药物的转运密切相关。这些跨膜蛋白可以利用 ATP 水解后释放出的能量将细胞内的药物逆浓度梯度转运到细胞外, 使细胞内药物浓度降低, 从而导致肿瘤细胞耐药的发生。人体内最常见的 ABC 转运体即 Pgp, MRP-1<sup>[11]</sup>。MDR 基因和 MRP 基因所编码的蛋白质 Pgp 和 MRP-1 可能在肝癌细胞发生耐药的过程中起到了主要作用。Pgp 和 MRP-1 在正常组织细胞中均低表达, 在部分肿瘤细胞中高表达, 其表达水平的高低直接决定了肿瘤细胞耐药性的高低。

本实验利用 Western Blot 法检测肝癌细胞内 Pgp 和 MRP-1 的表达水平后发现, 使用大蒜素后可以显著降低肝癌细胞内耐药蛋白的表达水平。这表示了大蒜素可能逆转了肝癌细胞的耐药程度, 提高了细胞内 5-FU 的实际药物浓度, 增强其抗肿瘤作用。

综上, 大蒜素能够作为 5-FU 的增效剂, 其可能机制是通过逆转肝癌细胞耐药、协调增强其细胞周期阻滞作用实现的。

利益冲突: 无。

## 参 考 文 献

- [1] Scartozzi M, Maccaroni E, Giampieri R, et al. 5-Fluorouracil pharmacogenomics: still rocking after all these years? [J]. *Pharmacogenomics*, 2011, 12(2): 251-265.
- [2] 孔春芳, 丁江华. 大蒜素抗癌作用与信号传导通路[J]. *重庆医学*, 2013, 42(10): 1175-1177.
- [3] 马锐, 何红梅, 袁媛. 大蒜素与细胞周期特异性化疗药联合应用抗肿瘤的实验研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2005, 32(19): 1129-1132.
- [4] Lee S, Lee M, Kim JB, et al. 17 $\beta$ -estradiol exerts anticancer effects in anoikis-resistant hepatocellular carcinoma cell lines by targeting IL-6/STAT3 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1247-1254.
- [5] Gao K, Liang Q, Zhao ZH, et al. Synergistic anticancer properties of docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil through interference with energy metabolism and cell cycle arrest in human gastric cancer cell line AGS cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(10): 2971-2980.
- [6] Chen F, Li H, Wang Y, et al. Inhibition of allicin in Eca109 and EC9706 cells via G2/M phase arrest and mitochondrial apoptosis pathway [J]. *J Funct Foods*, 2016, 25: 523-536.
- [7] Han GZ, Zhang CZ, Sun YB, et al. Effect of allicin on spleen and cell cycle of splenocytes in mice [J]. *China Tropical Med*, 2016, 16(9): 883-885.
- [8] Johnson Z L, Chen J. Structural basis of substrate recognition by the multidrug resistance protein MRP1 [J]. *Cell*, 2017, 168(6): 1075-1085.
- [9] Samarin J, Laketa V, Malz M, et al. PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of oncogenic far-upstream element binding proteins in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2016, 63(3): 813-826.
- [10] Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, et al. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology [J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 26: 1-9.
- [11] Lee JM, Lee MS, Koh D, et al. A new synthetic 2'-hydroxy-2, 4, 6-trimethoxy-5', 6'-naphthochalcone induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis by disrupting the microtubular network of human colon cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 354(2): 348-354.

(收稿: 2017-08-10 在线: 2018-07-10)

责任编辑: 赵芳芳