

大蒜素对胰腺癌细胞上皮间质化的影响

贺川, 马笛, 巩平*, 黄伟

(石河子大学医学院第一附属医院, 新疆石河子 832000)

[摘要] **目的:**探讨大蒜素对胰腺癌细胞上皮间质转化(EMT)的影响。**方法:**常规培养胰腺癌细胞株 PANC-1 细胞,分别以 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 大蒜素, $5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 大蒜素处理 PANC-1 细胞,另设空白组,镜下观察细胞形态学改变。细胞划痕实验检测大蒜素是否能降低胰腺癌细胞的迁移能力;免疫荧光细胞化学法及免疫印迹法(Western blot)检测各组钙黏附蛋白-E(E-cadherin),波形蛋白(Vimentin)的表达变化。**结果:**TGF- β_1 能够刺激 PANC-1 细胞发生典型的 EMT 形态变化,并伴有 E-cadherin 表达的上调及 Vimentin 的下调。划痕实验表明大蒜素能降低胰腺癌 PANC-1 细胞的迁移能力。免疫荧光细胞化学法及 Western blot 结果显示,与空白组及 TGF- β_1 组比较,大蒜素组的 E-cadherin 表达明显上调($P < 0.05$),Vimentin 明显下调($P < 0.05$),这表明大蒜素具有抑制 PANC-1 细胞产生 EMT 的效应。**结论:**大蒜素可抑制胰腺癌细胞发生 EMT,进而可能在抑制肿瘤浸润与转移过程中发挥重要作用。

[关键词] 大蒜素; 胰腺癌; 上皮间质转化; E-钙黏蛋白; 波形蛋白; 迁移能力

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0130-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140130

Allicin Inhibits Epithelial-mesenchymal Transition of Human Pancreatic Cancer PANC-1 Cells

HE Chuan, MA Di, GONG Ping*, HUANG Wei

(The First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of allicin on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of pancreatic cancer cells. **Method:** The PANC-1 cells were cultured and treated with $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ allicin, $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ allicin, respectively. Untreated cells were used for the normal control. Morphological changes were observed under inverted microscope. Wound scratch assay were performed to further identify if allicin could reduce the migration ability of PANC-1 cells. The expressions of E-cadherin and Vimentin in pancreatic cancer cells were detected by immunocytochemistry and Western blot. **Result:** The TGF- β_1 can make PANC-1 cells show typical EMT morphological changes, which were accompanied by up-regulation of E-cadherin expression and down-regulation of Vimentin. Wound scratch assay indicated that allicin could reduce the migration ability of PANC-1 cells. According to the results of immunocytochemistry and Western blot, compared with the control group and the TGF- β_1 group, the protein expression of E-cadherin was up-regulated in the allicin group ($P < 0.05$), and that of aimentin was down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Allicin can inhibit the EMT of human pancreatic cancer PANC-1 cells, and may play an important role in the inhibition of tumor invasion and metastasis.

[Key words] allicin; pancreatic cancer; epithelial-mesenchymal transition; E-cadherin; Vimentin; migration ability

[收稿日期] 20151116(017)

[基金项目] 上海市重点实验室开放课题项目(PC-2013-02)

[第一作者] 贺川, 硕士, 从事肿瘤综合治疗的临床研究, Tel: 13040546762, E-mail: hechuan1988111213@126.com

[通讯作者] * 巩平, 教授, 主任, 博士生导师, 从事肿瘤综合治疗的临床研究, Tel: 18999536479, E-mail: 18999536479@163.com

胰腺癌是世界范围内具有高发病率及高死亡率的致死性肿瘤之一,美国癌症协会公布 2015 年约有 48 960 例新发病例及 40 560 例死亡病例出现^[1]。目前尽管广泛进行手术切除治疗,但胰腺癌的存活率并没有得到明显的改善,同时由于胰腺癌的高侵袭性及转移能力,胰腺癌的预后极差^[2],寻找能够抑制肿瘤浸润转移的药物对于提高临床疗效及患者的生存期十分重要。研究表明上皮间质转化(EMT)有助于肿瘤的侵袭和转移,而转化生长因子- β (TGF- β)是调节 EMT 过程的重要细胞因子,在晚期肿瘤组织中 TGF- β 通常呈现过表达,TGF- β 可通过调节促进 EMT 的发生,致使肿瘤细胞更具侵袭和转移倾向^[3]。大蒜素从粉碎的新鲜大蒜中提取而来,烯丙基有机硫化物是存在于大蒜中的主要作用成分,大蒜素具有抗多种肿瘤的作用^[4],有研究证实大蒜素能够抑制胰腺癌细胞增殖^[5],本课题组前期研究也证实大蒜素能在一定程度上抑制胃癌 HGC-27 细胞发生 EMT^[6]。因此,本课题组分别用大蒜素与 TGF- β 处理胰腺癌细胞,通过检测其上皮及间质特异性蛋白的表达情况分析大蒜素对 TGF- β_1 诱导的胰腺癌细胞 EMT 的影响,同时通过划痕实验推断大蒜素对胰腺癌细胞体外浸润转移能力的影响。

1 材料

1.1 细胞株 胰腺癌细胞株 PANC-1,购自中国科学院细胞生物研究所。

1.2 药物与试剂 大蒜素注射液(徐州莱恩药业有限公司,国药准字 H20055246,2 mL/支,含大蒜素 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,使用前用培养液稀释至所需浓度),重组人 TGF- β_1 (美国 Peprotech 公司,批号 0614209),BCA 蛋白测定试剂盒(北京索莱宝公司,批号 PC0020),兔抗人 E-钙黏蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab40772,ab92547);FITC 标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,肌动蛋白(β -actin)兔抗人单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 112888,140411,107724);DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司,批号 8115051),胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号 140502)。

1.3 仪器 Galaxy170S 型 CO_2 培养箱(英国 New Brunswick 公司),AxioVert. A1 型荧光倒置显微镜(德国 Zeiss 公司),LSM710 型激光共聚焦扫描显微镜(德国 Zeiss 公司),GelDocXR+型凝胶成像仪(美

国 Bio-Rad)公司。

2 方法

2.1 细胞培养 人胰腺癌细胞株 PANC-1 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养,每 24 h 换 1 次培养液,3~4 d 传代 1 次。

2.2 分组及给药 将人胰腺癌 PANC-1 细胞先用无血清培养基饥饿培养 12 h,再分别以 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_1 , $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_1 + $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大蒜素, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大蒜素处理 PANC-1 细胞,另设空白组,培养 72 h 后镜下观察 4 组细胞形态学变化。大蒜素剂量根据预实验确定。

2.3 划痕实验 分组同 2.2 项,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板,第 2 天用枪头对细胞进行一字形划痕,洗去划下细胞,加药同 2.2 项,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 0,8,24 h,取样,在倒置显微镜下拍照,每组至少重复 3 次。

2.4 免疫荧光细胞化学法检测 E-cadherin, Vimentin 表达 分组及给药同 2.2 项,取培养 72 h 后 6 孔板已爬好片的 4 组细胞,洗涤,4% 的多聚甲醛固定,洗涤,检测 Vimentin 的细胞用 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min(E-cadherin 仅为膜表达,不予破膜处理),洗涤,10% 山羊血清封闭 30 min, E-cadherin 兔抗人一抗(1:500),Vimentin 兔抗人一抗(1:250)4 $^\circ\text{C}$ 过夜,复温,洗涤,ITC 标记山羊抗兔 IgG(1:200)室温避光孵育 1 h,避光洗涤后用 50% 甘油封片,荧光显微镜下观察并照相,经 Zeiss LSM Data Serve 软件测定各组细胞表达蛋白的荧光强度。

2.5 免疫印迹法(Western blot)检测 E-cadherin, Vimentin 蛋白表达 分组及给药同 2.2 项,取培养 72 h 后 4 组细胞提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,上样,电泳,转膜后,分别与 β -actin 一抗(1:1 000),E-cadherin 兔抗人一抗(1:1 000),Vimentin 兔抗人一抗(1:5 000)4 $^\circ\text{C}$ 过夜,加入二抗(1:2 万)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:2 万)作用 1 h,洗膜,ECL 化学发光,经凝胶成像仪显影,测定灰度值。以目的蛋白条带/ β -actin 条带表示蛋白含量相对表达。

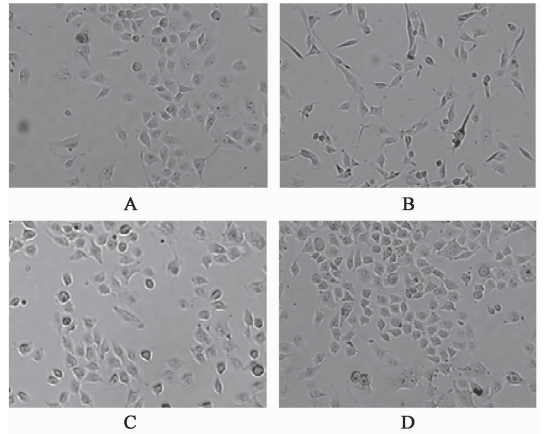
2.6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 法(方差齐)或 Dunnett's 法(方差不齐), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PANC-1 细胞形态学改变 空白组中 PANC-1 细胞生长状态良好, 细胞间连接多, 呈典型上皮样细胞特性; 加入 TGF- β_1 组中 PANC-1 细胞由卵圆形变为长梭形, 细胞极性丧失, 细胞多呈分散孤立状态, 表现为间质细胞特性; TGF- β_1 + 大蒜素组中 PANC-1 细胞的形态较 TGF- β_1 组有明显的向上皮细胞转化的趋势。大蒜素组与空白组无明显差异。见图 1。

3.2 大蒜素对胰腺癌细胞迁移能力的影响 培养 8, 24 h 后, 与空白组比较, 大蒜素组胰腺癌细胞迁移率明显下降 ($P < 0.05$), 与 TGF- β_1 组比较, TGF- β_1 + 大蒜素组的癌细胞迁移率明显下降 ($P < 0.05$)。见图 2。

3.3 大蒜素对胰腺癌细胞 E-cadherin, Vimentin 蛋白表达的影响 与空白组比较, TGF- β_1 组的 E-cadherin 表达明显下调, Vimentin 表达明显上调, 大蒜素组的 E-cadherin 明显上调, Vimentin 明显下调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 TGF- β_1 组比

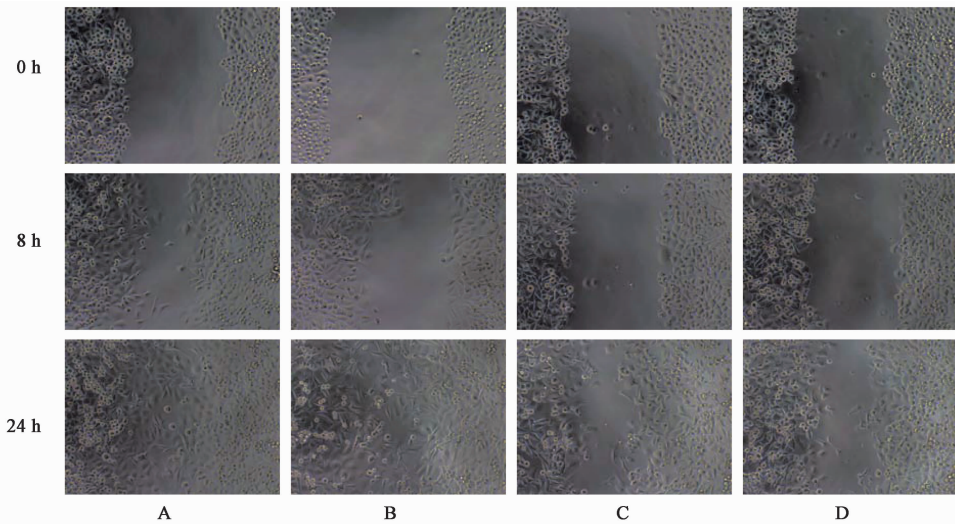


A. 空白组; B. TGF- β_1 组; C. TGF- β_1 + 大蒜素组; D. 大蒜素组 (图 2 ~ 4 同)

图 1 大蒜素处理 72 h 后各组细胞形态比较 (倒置显微镜, $\times 200$)
Fig. 1 Comparison of four groups in cells after being treated for 72 h (inverted microscope, $\times 200$)

较, TGF- β_1 + 大蒜素组和大蒜素组 E-cadherin 表达依次上调, Vimentin 依次下调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

3.4 大蒜素对胰腺癌 PANC-1 细胞 EMT 相关蛋白



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 TGF- β_1 组比较²⁾ $P < 0.05$ (图 3, 4 同)。

图 2 大蒜素对胰腺癌细胞划痕迁移率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3, \times 200$)

Fig. 2 Comparison of four groups in cells migration rate ($\bar{x} \pm s, n = 3, \times 200$)

表达的影响 与空白组和大蒜素组比较, TGF- β_1 组和 TGF- β_1 + 大蒜素组 E-cadherin 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 大蒜素组 E-cadherin 蛋

白表达明显上调 ($P < 0.05$), Vimentin 表达明显下调 ($P < 0.05$)。而与 TGF- β_1 组比较, TGF- β_1 + 大蒜素组 Vimentin 表达明显下调 ($P < 0.05$)。见图 4。

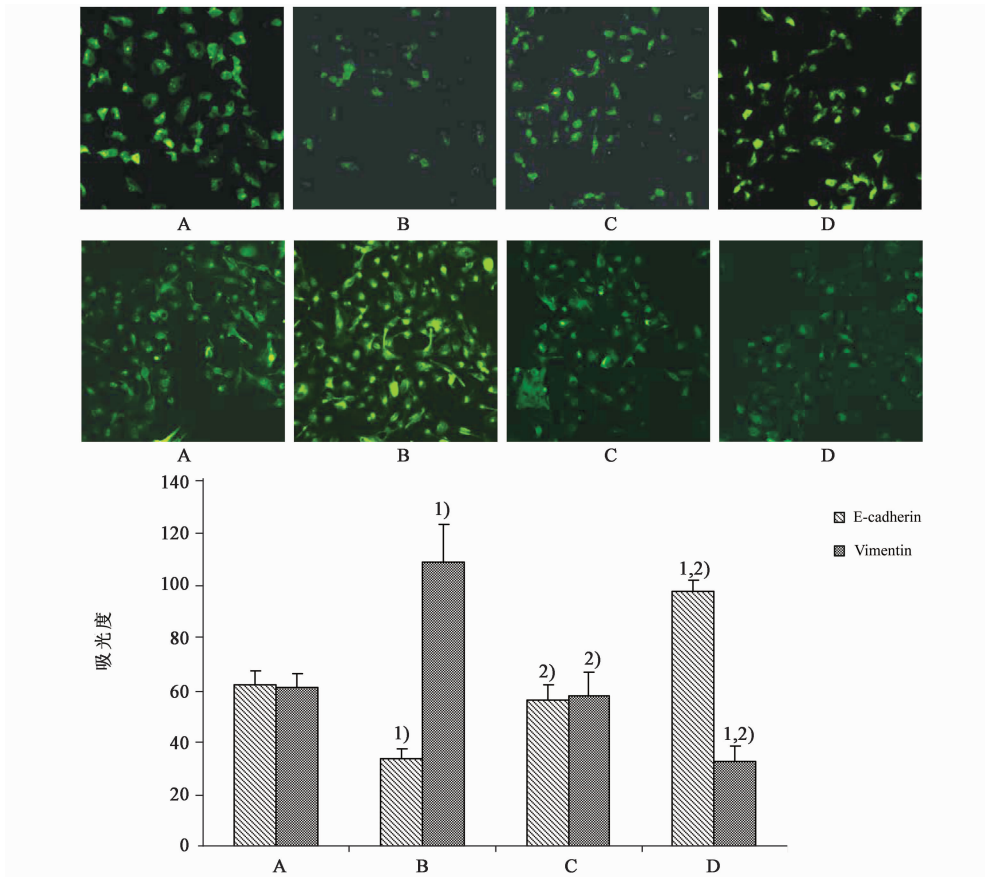


图 3 大蒜素对各组细胞 E-cadherin, Vimentin 蛋白荧光强度的影响 (免疫荧光, $n = 3$, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of allicin on E-cadherin and Vimentin protein fluorescence intensities of cells in different groups (Immunofluorescence, $n = 3$, $\times 200$)

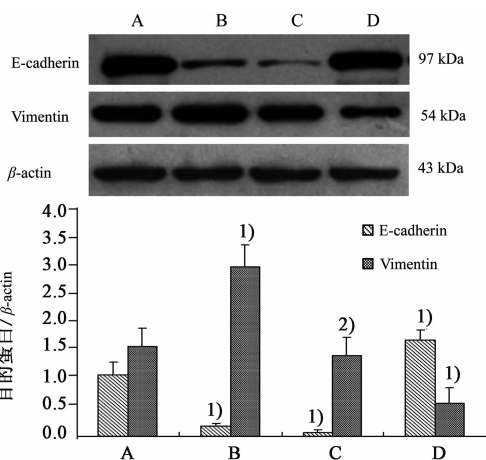


图 4 大蒜素对各组细胞 E-cadherin, Vimentin 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of allicin on expressions of E-cadherin and Vimentin of cells in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

胰腺癌的早期诊断困难, 85% 的患者初诊时已

失去手术机会, 中位生存期 (MST) 仅为 6 ~ 9 个月^[7-8]。手术治疗及积极的化学治疗、靶向治疗能够在一定程度上延长患者生存期, 改善预后, 提高生活质量, 但总体效果差强人意, 对胰腺癌的侵袭转移不能进行有效的控制。近年来, 使用中药抗肿瘤成为了新的研究热点。大蒜素由于具有明显的抗肿瘤活性且几乎无毒副作用的特点, 受到了国内外学者的大力支持, 体外研究发现大蒜素能够对人脑胶质瘤^[9]、人口腔鳞癌^[10]及胃癌细胞^[6]等多种肿瘤细胞的侵袭及转移产生明显的抑制作用。本研究以胰腺癌 PANC-1 细胞为研究对象, 加入大蒜素注射液进行处理, 发现大蒜素能明显降低胰腺癌 PANC-1 细胞的迁移率, 说明大蒜素对胰腺癌 PANC-1 细胞的侵袭及转移存在抑制作用。

EMT 过程是肿瘤进展、转移的一个关键过程。在 EMT 过程激活后, 肿瘤细胞会失去上皮特征, 包括细胞黏附作用缺失、极性丧失、细胞骨架重组等,

并获得间质形态和迁移能力,且 EMT 通常伴随着上皮细胞特异性蛋白如 E-cadherin 表达水平的下调,以及间质细胞特异性蛋白如 Vimentin 的上调^[11]。Tang 等^[10]发现大蒜素可以通过上调口腔癌 CAL-27 细胞中的 E-cadherin 表达而发挥抑制口腔鳞癌的转移和侵袭的作用,在基因和蛋白水平都可以使 E-cadherin 的表达增加;Pai 等^[12]发现大蒜素可以通过抑制小鼠口腔癌细胞中 Vimentin 和核转录因子(NF)- κ B p65 基因而抑制小鼠模型肿瘤的生长和进展,这些研究均提示大蒜素可能通过影响癌细胞的 EMT 过程而抑制其侵袭及转移,但大蒜素在胰腺癌中是否有类似作用,作用机制尚不明确。本研究选择间质表型显著且潜在侵袭转移能力强的胰腺癌 PANC-1 细胞^[13],分别采取免疫荧光细胞化学法及 Western blot 法从蛋白水平来做验证,2 种方法结果一致,与空白组比较,大蒜素组的 E-cadherin 表达上调, Vimentin 表达下调,提示大蒜素的干预能够抑制胰腺癌 PANC-1 细胞发生上皮间质转化。

TGF- β_1 是诱导肿瘤细胞发生 EMT 的关键因子,在肿瘤发生过程中有着双重作用,早期通过诱导凋亡和细胞周期阻滞发挥抑制肿瘤生长的作用,而在晚期则能促进肿瘤的侵袭及转移^[14],有研究显示大蒜素能够在一定程度上抑制 TGF- β_1 的表达,从而抑制上皮表型的细胞向纤维表型转分化^[15],为了进一步证实大蒜素对胰腺癌细胞 EMT 的影响,本研究还设置了 TGF- β_1 组及 TGF- β_1 + 大蒜素组。显微镜下可见,加入 TGF- β_1 诱导的细胞丧失了自身上皮细胞的特征,相反却呈现出梭状、纤维细胞样的细胞形态,与空白组比较,TGF- β_1 组及 TGF- β_1 + 大蒜素组 E-cadherin 下调, Vimentin 上调,即发生了明显的 EMT;而与 TGF- β_1 组比较,双重干预组则细胞间排列紧密,细胞也多呈上皮样细胞形态;TGF- β_1 + 大蒜素组较 TGF- β_1 组细胞的迁移率降低, E-cadherin 表达上调, Vimentin 表达下调。故本研究可认为大蒜素能够抑制由 TGF- β_1 诱导产生的 PANC-1 细胞上皮间质化效应。

综上所述,大蒜素能够上调 E-cadherin, 下调 Vimentin,抑制胰腺癌细胞发生上皮间质化,从而降低胰腺癌侵袭及远处转移的机率,发挥其抗肿瘤的药性;同时大蒜素对 TGF- β_1 诱导的胰腺癌细胞上皮间质化的现象也有明显的抑制作用,从而可能在有 TGF- β_1 过表达的晚期肿瘤组织的侵袭转移过程中也发挥着重要作用。总之,大蒜素对于胰腺癌的治疗有着良好的临床应用前景,值得进一步研究。

[参考文献]

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1):5-29.

[2] Hackert T, Buchler M W. Pancreatic cancer: advances in treatment, results and limitations[J]. Dig Dis, 2013, 31(1):51-56.

[3] Heldin C H, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGF- β in cancer[J]. FEBS Lett, 2012, 586(14):1959-1970.

[4] 丛利家, 张小洁, 范红艳. 大蒜素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2015, 36(3):225-228.

[5] 王保才, 张炳太, 林镇海. 大蒜素对人胰腺癌 Panc-1 细胞株的作用及机制的研究[J]. 中国医药与临床, 2011, 11(7):793-794.

[6] 董益明, 巩平, 林芷伊, 等. 大蒜素对胃癌细胞上皮间质转化的影响[J]. 中国现代医药杂志, 2015, 17(2):18-20.

[7] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.

[8] Witkowski E R, Smith J K, Tseng J F. Outcomes following resection of pancreatic cancer [J]. J Surg Oncol, 2012, 107(1):97-103.

[9] 王科文, 王战营, 王旭东, 等. 大蒜素对人脑胶质瘤 U251 细胞侵袭与迁移的影响及其机制探讨[J]. 山东医药, 2013, 53(42):35-37.

[10] Tang F Y, Chiang E P, Chung J G, et al. S-Allylcysteine modulates the expression of E-cadherin and inhibits the malignant progression of human oral cancer[J]. J Nutr Biochem, 2009, 20(12):1013-1020.

[11] Gurzu S, Turdean S, Kovacs A, et al. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors; an update [J]. World J Clin Cases, 2015, 3(5):393-404.

[12] Pai M H, Kuo Y H, Chiang E P, et al. S-Allylcysteine inhibits tumour progression and the epithelial-mesenchymal transition in a mouse xenograft model of oral cancer [J]. Br J Nutr, 2012, 108(1):28-38.

[13] 庞慧芳, 覃华, 赵秋, 等. 姜黄素对胰腺癌细胞上皮间质转化的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(18):2565-2571.

[14] Heldin C H, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition [J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(2):166-176.

[15] 曾玉兰, 冷凡. 大蒜素对肺纤维化大鼠肺组织 α -SMA 和 TGF- β_1 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(15):1814-1818.

[责任编辑 张丰丰]