

• 实验研究 •

流式细胞术分析大蒜油对癌细胞 DNA 合成
及细胞周期的影响

中国中医研究院基础理论研究所(北京 100700)

谢锦玉 高玉民 沈联慈 刘铭福 王玉萍

内容提要 我们在证明大蒜油具有明显提高小鼠生命率和抑瘤率等一系列实验研究的同时,应用流式细胞术(FCM)测量腹水 S180 癌细胞的脱氧核糖核酸(DNA)相对含量,以观察各时相细胞增殖周期的移行变化,发现大蒜油使 DNA 合成期(S)细胞明显减少,百分率下降,而 DNA 合成前期(G_1)细胞显著增加,说明大蒜油可阻滞癌细胞 G_1 期向 S 期的进程,造成了 G_1 期细胞堆积,阻断 DNA 合成和复制,起到抑制癌细胞的增殖周期的作用。

关键词 大蒜油 流式细胞术(FCM) 去氧核糖核酸(DNA) 细胞周期

大蒜是我国人民常用的食品,有很强的杀菌作用。民间作为药用已有几千年的历史,近年来又发现大蒜还有良好的防癌抗癌作用^(1~4,8~10),但具体作用机制尚不完全清楚,还需要深入研究^(1,2)。我们制备了大蒜油乳剂,并进行了一系列抗癌作用的实验研究,本文仅报道应用 FCM 分析大蒜油对癌细胞 DNA 合成、细胞周期的影响。

材料与方 法

药物配制:取大蒜油 1 g,吐温 80 2 g 和蒸馏水 100 ml,制成 1%大蒜油乳剂。4℃冰箱保存。动物给药剂量为 0.2 ml/只,相当 100 mg/kg 体重,对照组用消毒生理盐水和 2%吐温 80 溶液。RNA 酶和碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)均为 Sigma 产品。

分组和方法:雄性昆明种小鼠,体重 20~22 g,购于中国中医研究院动物中心, S180 瘤株由本院中药所提供,60 只小鼠分别腹腔接种 10^7 细胞/只,于接种后第 3 天随机分为 4 组,即 1 次注生理盐水组,1 次注大蒜油组,3 次注大蒜油组(每天 1 次),3 次注 2%吐温 80 组(每天 1 次)。每组 15 只,均为腹腔注射。对 1 次注射组停注后 2, 6, 12, 24, 48 h 分别取材。3 次注射组停注后 1, 2, 5, 7, 10 天分别取材,每个时间重复 3 只动物,每只分析细胞数至少 10000。

以上各组分别于不同时间断头处死,取腹水按照 FCM 技术的特殊要求制作标本,经 RNA 酶消化,用 PI 染色^(5~7),应用 FACS420 荧光激活细胞分选仪(Becton-Dickson 公司产品),以每秒 1000 个细胞的测量速度测单个细胞的 PI 荧光强度,每只至少测

10000 个细胞。激光光源用 2 W 氩离子激光器,波长为 488 nm; PI 荧光通过 585 nm 阻断滤片,由光电倍增管检测,多道脉冲分析器分析,显示细胞 DNA 的散点图(有三维图)和组方图,所得数据输入计算机,按 FACS420 软件多正态拟合程序进行曲线拟合分析,计算出 DNA 含量,得出细胞周期(G_1 、S、 G_2 +M)的百分比和 G_1 的 CV%(变异系数)。

结 果

染色原理是利用嵌入型荧光染料 PI 与被测物质 DNA 特异性结合,在一定的浓度范围内呈化学计量学关系,而得到细胞频率对于 DNA 相对含量的组方图^(6,7)、散点图和三维立方图。后二者在本文省略。由图 1 生理盐水对照的组方图所显示的三个峰:第一个峰(左小),是腹水瘤内淋巴细胞的细胞群,为二倍体(2C) DNA 含量,可作为对照内参的标准。第二个峰(高),是 DNA 合成前期的癌细胞群峰(G_1 期细胞),为癌细胞二倍体 DNA 含量细胞群。第三个峰(右),为 G_2 +M 期(DNA 合成后期+分裂期)为 4 倍体(4C) DNA 含量的细胞群。第二与第三峰之间为 S 期(DNA 合成期),为 2C~4C DNA 含量。第三峰右侧散在细胞群为多倍体细胞, DNA 含量越往右越高。不计算在细胞周期百分率之内。

一、从生理盐水组(图 1)和 2%吐温 80 对照组(图 2)均可见荷瘤小鼠腹水瘤细胞处于增殖状态, DNA 合成期细胞数(S%)平均为 50% 以上,说明癌细胞处于积极的增殖状态。生理盐和吐温 80 对癌细胞 DNA 含量和细胞周期没有影响(表 1, 2)。

二、注射1次大蒜油组,注射后2h、6h,S期细胞数明显下降,用药后2h,S期为40%;6h为14%,细胞数减少了近4倍。其G₁期细胞数却增多,对照组G₁2、6h为28%、30%,用药组G₁为54%、78%,这说明G₁期此时细胞增加约2~3倍。但仅用1次药后的24~48h(图略)可见S期细胞数又有回升趋向,与对照组相似(表1)。

三、连续3次给药组注射后1、2、5、7、10天取材,可见停药7天内(图2)S期细胞数持续减少,

S期细胞数平均为29.2%,而与其相应时间吐温80对照组,S期细胞平均为51.1%,两者相比,相差近1倍。G₁期细胞7天内仍保持高峰,平均为66%,吐温80对照组,G₁为29.7%,相差1倍多。这说明G₁期细胞堆积是由于大蒜油阻滞G₁向S期进行的结果,但是到第10天见到S期细胞数又回升接近于对照组的细胞的增殖状态,二者的S和G₁期细胞数相似(DNA含量相似),这说明随停药时间延长药效减弱或消失(表2)。每组每个时间重复3只结果均一致。

表1 大蒜油用1次后癌细胞G₁期及S期百分率的变化

组别	DNA合成前期(G ₁)%					DNA合成后期(S)%				
	2h	6h	12h	24h	48h	2h	6h	12h	24h	48h
盐水对照	28	30	28	31	27	55	54	52	54	49
大蒜油	54	78	39	31	26	40	14	34	45	48

表2 大蒜油用3次后癌细胞G₁期及S期百分率的变化

组别	DNA合成前期(G ₁)%					DNA合成期(S)%				
	1天	2天	5天	7天	10天	1天	2天	5天	7天	10天
吐温对照	30	31	29	29	34	61	58	51	35	49
大蒜油	78	74	60	52	37	18	24	30	38	48

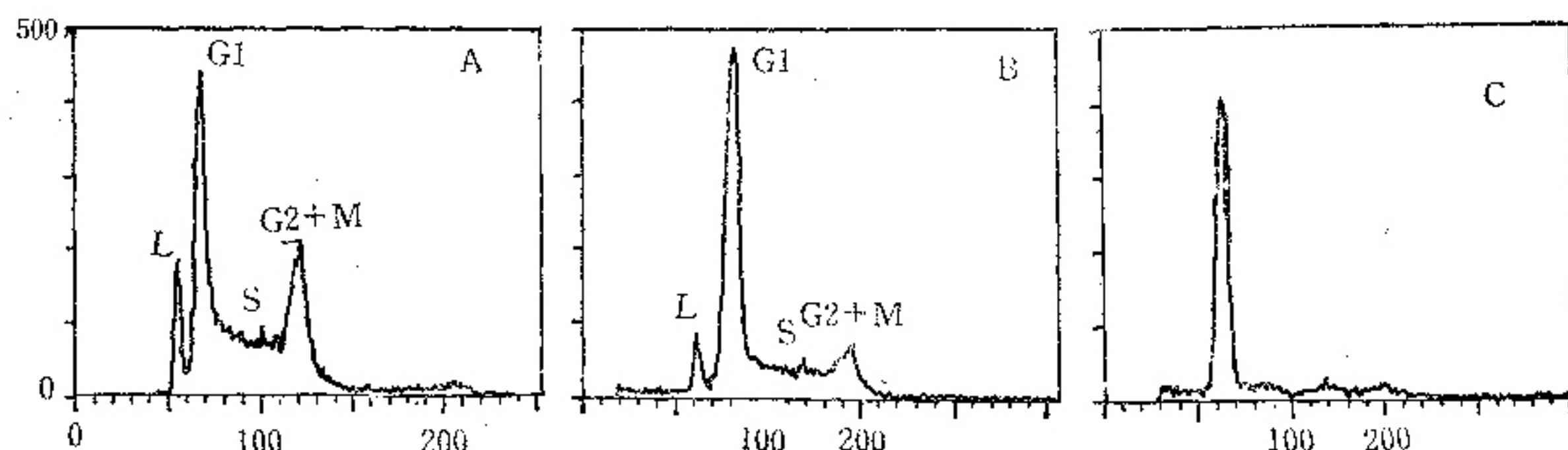


图1 癌细胞DNA组方图分布(流式细胞分析术) A,生理盐水对照组;B,1次注射大蒜油组2h;C,1次注射大蒜油组6h,可见癌细胞G₁峰增高。图内纵坐标为细胞数(%),横坐标为DNA相对含量(荧光强度100~200),下同

讨 论

DNA是细胞繁殖遗传的物质基础,起着遗传信息贮存,能自我复制和控制蛋白质的合成。RNA是转录信息和合成蛋白质的主要物质。细胞内这两种化学物质被抑制和破坏势必直接影响癌细胞的生存和增殖。癌细胞增殖能力是很强的,在G₁期即DNA合成前期,此期合成RNA、蛋白质和所需前体物质,进入S期即DNA合成期是细胞周期的关键,此期进行DNA遗传物质复制,合成组蛋白等重要物质⁽¹⁵⁾,DNA复制含

量增加1倍,继而进入G₂期即DNA合成后期,它为M分裂期作准备,到分裂末期,分成为二个子细胞。FCM是现代国际较新的技术,它能快速、准确、简便⁽¹⁰⁾分析细胞周期各时相的分布,已成为肿瘤的早期诊断、临床治疗设计方案、监测肿瘤预后,探索抗癌药物作用的某些机理等最重要的一项技术^(5,10,11,12)。一些学者已应用此技术,分析一些抗癌中药对癌细胞增殖周期所发生的不同作用^(6,7),但迄今还未见到对大蒜油的细胞生物学机理的研究。我们在证明此药有较高的延长小鼠生命率和抑瘤率以及荧光显微镜电镜观察等一

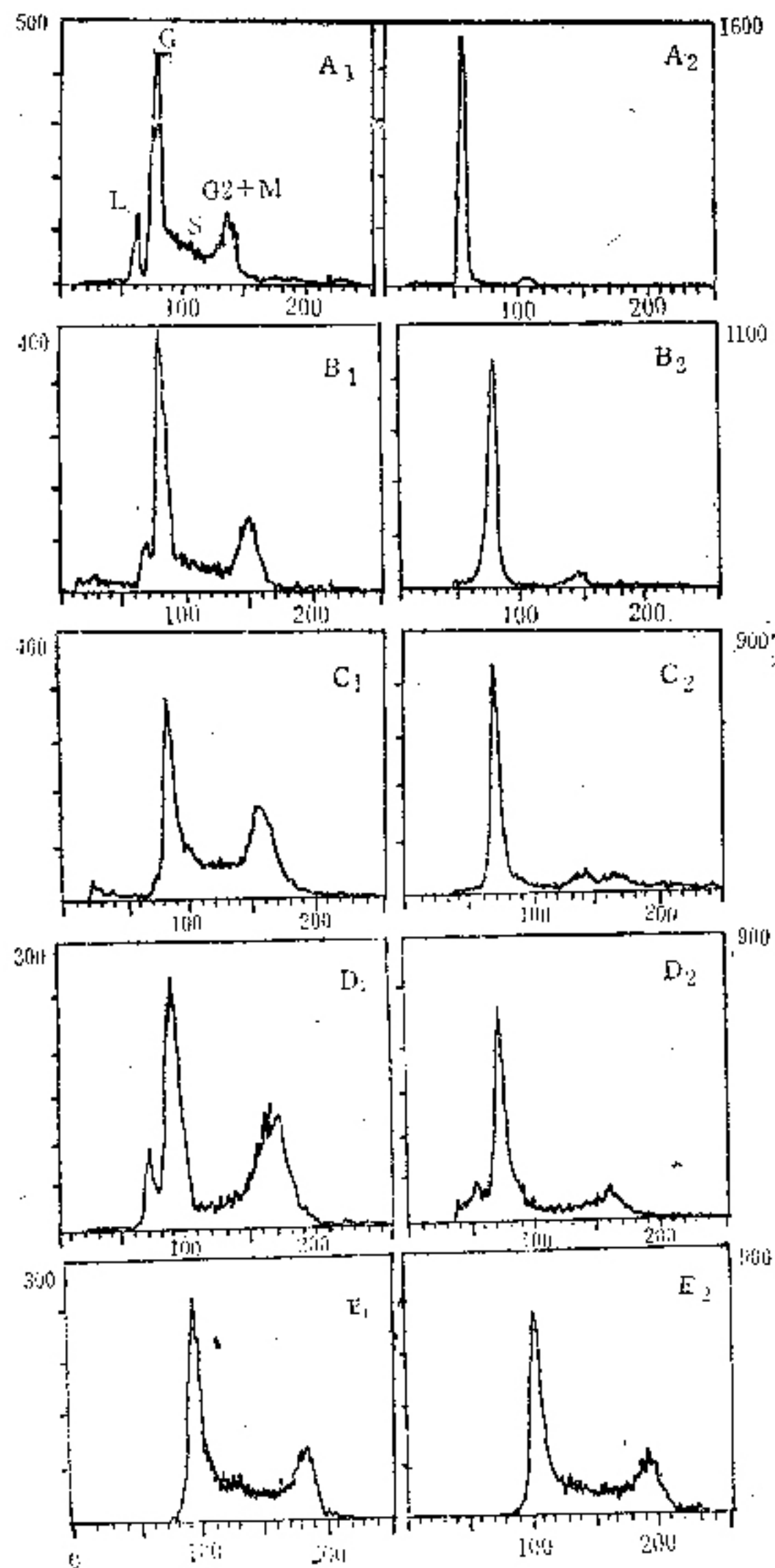


图2 大蒜油3次注射引起对照组的细胞DNA含量分布(流式细胞术分析) 左列A₁、B₁、C₁、D₁、E₁分别为吐温80停用后1、2、5、7、10天;右列A₂、B₂、C₂、D₂、E₂分别为大蒜油停用后1、2、5、7、10天。由图可见A₂、B₂、C₂的G₁期峰增高,其它峰降低,D₂ S期水平增高,E₂ S期又回到对照组水平

系列研究的同时,应用FCM分析了大蒜油作用的机理,从实验结果发现,其关键在对药物的敏感时相是对S期细胞有杀伤作用,荧光显微镜观察也能证明(另报),此外大蒜油还阻止G₁向S期进程癌细胞DNA合成受到抑制和阻断,造成G₁期细胞的堆积,使细胞周期无法进行。已有学者论述,如G₁期被阻断,更能有效地控制肿瘤的增殖⁽¹³⁾。同时我们对纯系C57BL小

鼠,U14宫颈癌和DBA小鼠L1210、腹水型均进行了相同的研究,证明都有同样的结果。我们还研究了本药对癌细胞RNA影响的FCM分析,发现RNA含量比对照组明显减低⁽¹⁴⁾,也符合一些研究者证明用RNA合成的抑制剂,可阻止细胞从G₁期向S期前进⁽¹⁵⁾,这更进一步说明大蒜油对癌细胞作用的某些机理。关于应用本药量的有效持续时间和间隔周期,我们正在更进一步研究为今后临床应用提供一定的理论依据。

参 考 文 献

1. 刘永久. 大蒜的研究及其制剂开发. 医学情报 1988; 10: 28.
2. 陶文洪. 肿瘤防治中的大蒜研究. 国外医学肿瘤分册1986; 3: 146.
3. 潘希恩, 等. 生大蒜匀浆、二烯丙三硫和三种抗癌药对胃癌细胞株的剂量效应比较. 中华肿瘤杂志 1985; 7(2): 103.
4. 湖南医学院大蒜液抗癌研究协作组. 大蒜提取液抗癌作用体外实验的初步报告. 湖南医学院医学研究资料 1977; 1: 1.
5. 薛绍白. 流式细胞光度术. 细胞生物学杂志 1979; 1(1): 39.
6. 林 晨, 等. 应用流式细胞光度术研究冬凌草甲素对Hela细胞周期的影响. 科学通报 1984; 171: 077.
7. 寿马钢, 等. 用流式细胞光度术测定冬凌草甲素和博兰霉素A5合用对艾氏腹水癌细胞周期移行的影响. 河南医学院学报 1985; 20(2): 91.
8. Belman S. Onion and garlic oils inhibit tumor promotion. Carcinogenesis 1983; 84: 1063.
9. Wargovich MJ. Diallyl sulfide, a flavor component of garlic (*Allium Sativum*), inhibits dimethylhydrazine induced colon cancer Carcinogenesis 1987; 8(3): 487.
10. Wargovich MJ. New dietary anticarcinogens and prevention of gastrointestinal cancer. Diseases of the Colon Rectum 1988; 31: 72.
11. Barlogie B, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res 1983; 43: 3982.
12. Seckinger D, et al. DNA content in human cancer. Arch pathol Lab Med 1989; 113: 619.
13. 杨兼辉. 细胞动力学与肿瘤药物治疗. 见: 朱世能主编. 肿瘤基础理论. 第1版. 上海: 上海科技出版社, 1986: 177.
14. Jinyu Xie, et al. Flow Cytometric analysis of the TCD-G₁ effect on RNA content of S180 cell. Proceedings of the First China-Japan Joint Histochemistry and Cytochemistry seminar 1989: 259.
15. 薛绍白, 等主编. 细胞生物学. 第1版. 北京: 北京师范大学出版社, 1990: 390.

or study and through 3, 6, 12, 24 months follow up study. The results showed that the GI and PDI of the Gu Chi Wan group decreased significantly than the control group ($P < 0.001$). the inflammatory recurrence rate was 33% in the control group and 12% in Gu Chi Wan group and the serial radiographs demonstrated that a higher incidence of bone fill occurred in Gu Chi Wan group than in the control group ($P < 0.01$)

Key Words periodontitis, Gu Chi Wan, spiramycin

(Original article on page 83)

Influence of Application-Impulse Stimulation Treatment on Airway's Reactivity with Asthma

You Yi-zhong (游一中), et al

Changzhou Asthma and Bronchitis Research Institute, Changzhou (213003)

The authors observed the effect of application-impulse stimulation treatment on 184 patients with asthma, using the main index of airway's reactivity, in a randomized, double-blind, placebo-controlled parallel study. The airway's reactivity of the treated group got improved significantly ($P < 0.001$), but that of the control group was not changed sharply ($P > 0.05$). The airway's reactivity and clinical effect between the groups have significant meaning ($P < 0.001$, $P < 0.001$). The result suggests that application-impulse stimulation treatment is a safe and effective method for preventing and treating asthma.

Key Words application-impulse, airway, asthma

(Original article on page 86)

The Stimulative Effect of Electro-Blunt-Tip Needle on the Points of Human Skin and Its Analgesia in Rats

Wang Rui-wen (王瑞文)*, Ku Bao-shan (库宝善), Liang Cui-yin(梁翠茵), et al

Department of Pharmacology, Beijing Medical University, Beijing (100083)

The stimulative effect of electro-blunt-tip needle (a kind of electroacupuncture stimulating on the surface of skin point) on the 120 points of human skin was observed in 12 healthy volunteers. It was shown that the substitute typical electro-blunt-tip needle stimulator and its special pen-like electrode by a general electroacupuncture stimulator and a tape-like adjustable electrode and similar therapeutic effects. It was found in animal experiment that the pain threshold determined with rat tail flick analgesia method was raised by electroacupuncture and electro-blunt-tip needle, the optimal stimulating time being 10~20 minutes for both, the percentages of the maximal changing pain threshold being 206.6% and 175.4%, and the corresponding voltage being 2v and 7v respectively.

Key Words electro-blunt-tip needle, electroacupuncture, pain threshold, rat tail flick analgesia method

* Hubei Shashi Mental Hospital, Shashi(434000)

(Original article on page 90)

A Flow Cytometric Analysis of the Garlic Oil Effect on DNA Content of Cancer Cell Cycle

Xie Jin-yu(谢锦玉), Gao Yu-min(高玉民), Shen Lian-ci(沈联慈), et al

Institute of Basic Theory of TCM, China Academy of TCM, Beijing (100071)

Flow cytometry (FCM) is a new technique developed in the recent decade. This technique may measure DNA content of 5000 cells per second and trace the dynamic changes in cell proliferation cycle and offer a hint for designing clinical treatment protocol, monitor prognosis and elucidate the