



二烯丙基三硫通过线粒体依赖性途径 诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡*

肖志科^{2)**} 张蒙夏^{1)**} 姜浩²⁾ 伍尤华²⁾ 艾小红²⁾

罗红梅¹⁾ 汪煜华¹⁾ 雷小勇¹⁾ 唐圣松^{1, 2)***}

(¹⁾南华大学药物药理研究所, 药物蛋白质组学湖南省高等学校重点实验室, 衡阳 421001;

²⁾南华大学附属第一医院肿瘤内科, 衡阳 421001)

摘要 二烯丙基三硫(diallyl trisulfide, DATS)对多种肿瘤有抗癌作用, 但机制尚不完全清楚。为探讨 DATS 对人肝癌细胞系 HepG2 细胞凋亡的影响, 用丫啶橙 / 溴化乙锭(AO/EB)法观察细胞凋亡情况, 在显微镜下计数凋亡细胞数。JC-1 荧光染色观察线粒体膜电势变化。Western blot 法检测细胞色素 c 蛋白分布, ELISA 法检测 caspase-3 活性。结果显示, DATS 诱导 HepG2 细胞凋亡, 用 50 $\mu\text{mol/L}$ 与 100 $\mu\text{mol/L}$ DATS 处理 48 h, 细胞凋亡率分别达到 60.33%和 93.67%, 并引起 HepG2 细胞线粒体膜电势降低。Western blot 显示, DATS 能诱导胞浆细胞色素 c 增加, 与此同时, 线粒体细胞色素 c 减少, 诱导 HepG2 细胞 caspase-3 活化。提示: DATS 可通过降低线粒体膜电势, 促进细胞色素 c 由线粒体膜释放到胞浆中, 激活 caspase-3 途径诱导人肝癌细胞系 HepG2 细胞凋亡。

关键词 HepG2 细胞系, 线粒体, 二烯丙基三硫, 细胞凋亡
学科分类号 Q2, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00149

二烯丙基三硫(diallyl trisulfide, DATS)是包括大蒜在内的葱类蔬菜(allium vegetables)中提取的单体有机硫化物, 能诱导细胞凋亡或增殖阻滞、抑制培养细胞生长的主要成分是大蒜中分离提取的单体有机硫化物。研究表明, DATS 及其他丙烯基硫化物(如 DAS、DADS 等)通过下调 Ca^{2+} -ATP 酶、Cdc1 激酶、Bcl-2、Bcl-xL 等蛋白质的表达, 活化 Chk1 激酶, 上调 Bax、ERK 的表达以及 Cdc1、ERK、JNK 的磷酸化水平和组蛋白 H3、H4 的乙酰化等机制, 诱导乳腺癌、皮肤癌、肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、结肠癌和白血病等肿瘤细胞凋亡和 / 或生长阻滞^[1~4]。

肝癌我国的恶性肿瘤发病率中高居第二位, 其进展快, 致死率高, 临床上尚缺乏高效的抗癌药物, 严重威胁人类的健康。研究显示: 葱类蔬菜烯丙基硫化物对肝癌细胞有抑制作用, 其中二烯丙基三硫(DATS)的抑制作用最强^[5]。DATS 抑制肝癌细胞生长, 诱导其凋亡可能涉及 caspase-3、caspase-8、caspase-9 及 Fas/FasL 系统的激活^[6], 但烯丙基硫化物抑制肝癌细胞增殖和诱导其凋亡的机制尚存在争

议, 有待于进一步阐明。

线粒体是细胞维持生命活动的重要细胞器, 在细胞存活及凋亡过程中发挥重要的作用, 业已表明: 线粒体参与 Bid、Bad 等凋亡蛋白质的激活, 线粒体膜通透性改变可导致细胞色素 c 的释放, 进而激活 caspase-3, 参与细胞凋亡。本实验在前期工作的基础上, 观察了 DATS 对 HepG2 细胞线粒体的影响, 旨在探讨 DATS 对线粒体功能的影响及其诱导 HepG2 细胞凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

DATS 为江苏正大天晴药业股份有限公司产

* 湖南省自然科学基金项目(08JJ5004, 09JJ3060), 湖南省科技计划重点项目(06FJ3203)和湖南省教育厅科技计划重点项目(07A059)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0734-8382753, E-mail: tangss111@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-03-14, 接受日期: 2009-05-27

品; DMSO 和溴化乙锭(EB)购自 Sigma 公司; 丫啶橙(AO)购自美国 Amersco 公司; RPMI 1640 培养基购于 Gibco 公司; 化学发光剂(A, B 液)、鼠抗人 Cyt-c 一抗、鼠抗人 β -actin 一抗和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗均购自 Santa Cruz 公司; 聚偏二氟乙烯印迹膜(PVDF 膜)购自 Millipore 公司; BCA 蛋白质含量测定试剂购于美国 Hyclone-Pierce 公司; 细胞线粒体膜电势检测试剂盒、线粒体分离试剂盒和 caspase 3 活性检测试剂盒购自上海碧云天生物公司。

1.2 细胞培养

HepG2 细胞系由中南大学肿瘤研究所提供。HepG2 细胞用含 10% 灭活新生牛血清的 RPMI1640 培养基, 在 5% CO₂, 37℃ 恒温培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。DATS 用无血清培养基稀释到所需浓度。

1.3 丫啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 法染色检测细胞凋亡

将细胞种于 6 孔板中, 加药处理。然后取浓度为 100 mg/L 的 AO、EB 各 1 ml 等量混合, 每孔加 200 μ l, 3 min 内荧光显微镜下观察拍照, 同时在光学显微镜下计数 500 个细胞, 然后计算细胞的凋亡率。

1.4 细胞线粒体膜电势检测

参照文献[7]进行, 具体步骤是: 将细胞种于 6 孔板中, 加药处理。吸去培养液, 用 PBS 溶液洗涤细胞 1 次, 分别加入 1 ml 细胞培养液和 1 ml JC-1 染色工作液, 充分混匀。细胞培养箱中 37℃ 孵育 20 min。孵育结束后, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液(1 $\times$)洗涤 2 次。加入 2 ml 细胞培养液, 荧光显微镜下观察。JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)的理想荧光探针, 可以检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。在线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体的基质(matrix)中, 形成聚合物(J-aggregates), 产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, JC-1 不能聚集在线粒体的基质中, 此时 JC-1 为单体(monomer), 产生绿色荧光。通过荧光颜色的转变检测线粒体膜电位的变化。

1.5 线粒体的分离

参照文献[8]进行, 具体步骤是: 收集处理或未经处理的细胞, 用冷 PBS 重悬细胞沉淀, 取少量细胞用于计数, 剩余细胞以 600 g、4℃ 离心

5 min 沉淀细胞, 弃上清。取细胞 2×10^7 个, 加入 1 ml 线粒体分离试剂(临用前加 PMSF), 轻轻悬浮细胞, 冰浴 15 min。把细胞悬液转移到玻璃匀浆器中, 匀浆 40 次。然后把细胞匀浆在 600 g、4℃ 离心 10 min。小心把上清液转移到另一离心管中, 在 11 000 g、4℃ 离心 10 min, 上清液即为去线粒体的细胞质, 沉淀即为分离得到的细胞线粒体。用于线粒体的蛋白质分析, 样品中加入 150 μ l 线粒体裂解液裂解线粒体(临用前加 PMSF)。

1.6 Western blot

收集细胞, 以冷 PBS 洗 3 次, 加入适量的去污裂解缓冲液, 于 4℃ 裂解 30 min, 12 000 g 离心 10 min, 吸出上清液, 即为细胞总蛋白, 用 BCA 法进行蛋白质定量。调节每份样品浓度, 以每孔同等的蛋白质量加样, 样品加入等体积 1 $\times$ SDS 加样缓冲液, 沸水煮沸 5 min, 经 SDS-PAGE 后转膜, 膜用 TBSA 封闭后, 加入相应的一抗、二抗孵育, 用 ECL 发光法检测不同蛋白质表达状况, 薄层扫描仪测定印迹区带的 A 值。

1.7 Caspase-3 活性分析

参照文献[9]进行, 具体步骤是: 收集细胞, 以冷 PBS 洗 3 次, 提取细胞总蛋白, 用 BCA 法进行蛋白质定量, 调节每份样品浓度, 以每孔同等的蛋白质量加样。设置反应体系: 检测缓冲液(90-x) μ l, 待测样品 x μ l, Ac-DEVD-pNA(2 mmol/L)10 μ l, 设空白对照。加入 Ac-DEVD-pNA(2 mmol/L)后混匀, 避免在混匀时产生气泡。37℃ 孵育 60~120 min。发现颜色变化比较明显时即可测定 A₄₀₅。参考 Chemicon 公司的 caspase 3 酶活力单位的定义: 一个酶活力单位定义为当底物饱和时, 在 37℃ 可以剪切 1 nmol Ac-DEVD-pNA 产生 1 nmol/L pNA 的 caspase 3 的酶量。把试剂盒提供的 pNA(10 mmol/L)用标准品稀释液稀释为 0、10、20、50、100 和 200 μ mol/L, 作为标准品。每个浓度取 100 μ l 用酶标仪测定 A₄₀₅。每一个标准品的 A₄₀₅ 减去不含 pNA 的空白对照的 A₄₀₅, 计算出实际的因 pNA 而产生的 A 值, 并制作出 pNA 浓度相当于 A₄₀₅ 的标准曲线。根据标准曲线和 caspase 3 酶活力单位的定义计算样本中的 caspase 3 的活性。

1.8 统计学处理

所有实验重复 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性检验用 one-way ANOVA 和 Student t-test 法进行分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 AO/EB 染色检测细胞凋亡

用 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 分别处理 HepG2 细胞 6 h 即可见少量凋亡细胞(黄色荧光的

细胞), 随着处理时间增长凋亡细胞逐渐增多(图 1), 显微镜下计数凋亡细胞结果显示: 50 $\mu\text{mol/L}$ 与 100 $\mu\text{mol/L}$ DATS 处理 48 h, 细胞凋亡率分别达到 60.33%和 93.67%(表 1), 100 $\mu\text{mol/L}$ DATS 处理细胞 72 h, 细胞已基本全部死亡.

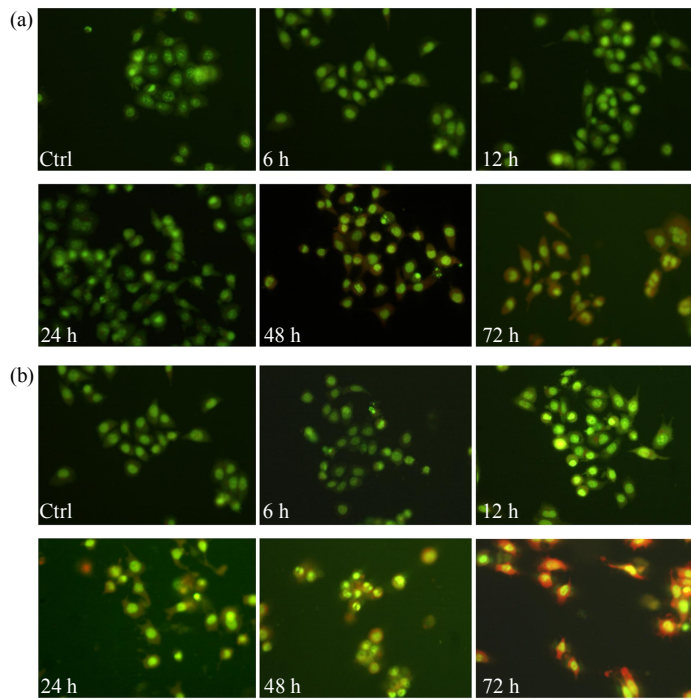


Fig. 1 DATS induces HepG2 cell apoptosis by AO/EB staining
(a) Cells were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$. (b) Cells were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$. $\times 200$.

Table 1 The effect of DATS on HepG2 cell apoptosis

$c(\text{DATS})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Apoptosis rate (%) of indicated incubation time				
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Control	1.33 ± 0.44	1.33 ± 0.17	2.50 ± 0.29	7.67 ± 1.30	13.17 ± 2.46
50	2.67 ± 0.67	$7.00\pm 1.89^*$	$22.00\pm 3.12^*$	$60.33\pm 5.02^*$	$95.67\pm 2.05^*$
100	$5.83\pm 1.09^*$	$15.50\pm 1.73^*$	$39.17\pm 4.48^*$	93.67 ± 1.36	

Compared with control, $*P<0.05$. $n=3$.

2.2 细胞线粒体膜电势检测

用 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 分别处理 HepG2 细胞 6 h 可见少量细胞线粒体膜电势降低(绿色荧光细胞), 线粒体膜电势降低的细胞数随 DATS 处理时间增长而逐渐增多, 48 h 后细胞线粒体膜电势降低明显, 72 h 大部分细胞线粒体膜电势降低, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 降低细胞线粒体膜电势效应比 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 强(图 2).

2.3 细胞色素 c 检测

用 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 分别处理 HepG2 细胞, 细胞总细胞色素 c 变化不明显. 在 DATS 处理 12 h 时, 胞浆(去线粒体)出现细胞色素 c, 此时, 线粒体细胞色素 c 减少. 随处理时间增长, 胞质(去线粒体)细胞色素 c 逐渐增加, 与此同时线粒体细胞色素 c 逐渐减少, 48 h 时, 胞质(去线粒体)细胞色素 c 几乎相当于细胞总细胞色素 c (图 3).

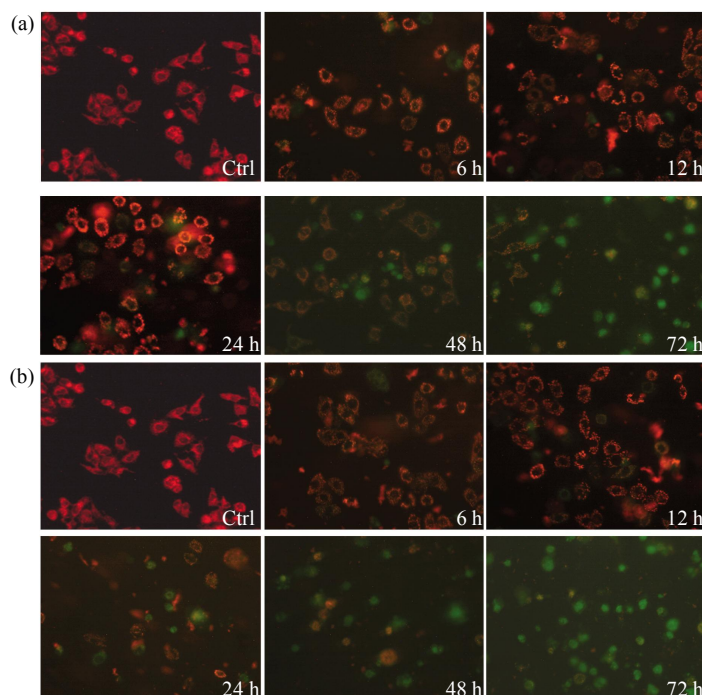


Fig. 2 DATS degrades mitochondrial membrane potential in HepG2 cells

(a) Cells were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$. (b) Cells were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$. $\times 200$.

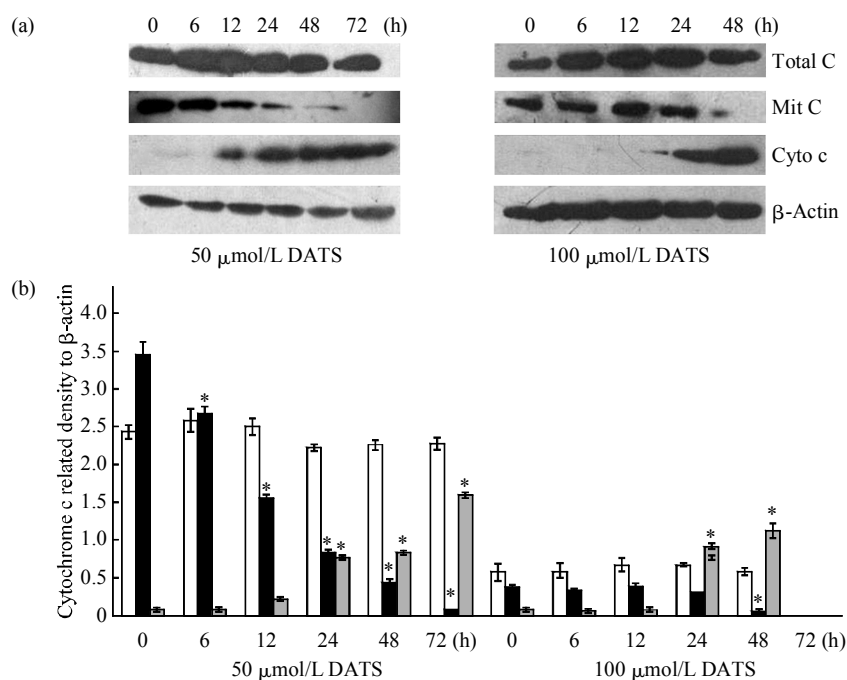


Fig. 3 Effect of DATS on cytochrome c distribution in the mitochondria and cytoplasm of HepG2 cells

(a) Cytochrome c was detected by Western blot. Total C: Total cytochrome c; Mit C: Mitochondrial cytochrome c; Cyto c: Cytochrome c. (b) The relative densities of cytochrome c were analyzed by densitometric analysis. The experiment was done for three time, $*P < 0.05$, *vs* control. $\square$: Total; $\blacksquare$: Mit; $\square$: Cyto c.

2.4 Caspase-3 活性检测

用 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 分别处理 HepG2 细胞 6 h 时, 细胞 caspase-3 活性稍有增强,

但与对照细胞比较, 差异无显著性($P > 0.05$), 在处理 12 h 时, caspase-3 活性达到高峰, 随后, 细胞 caspase-3 活性有所下降(图 4), 处理 12、24 和 48 h

的细胞 caspase-3 活性与对照细胞比较, 差异有显著性($P < 0.05$). 不同浓度的 DATS 对 caspase-3 活性的影响基本一致.

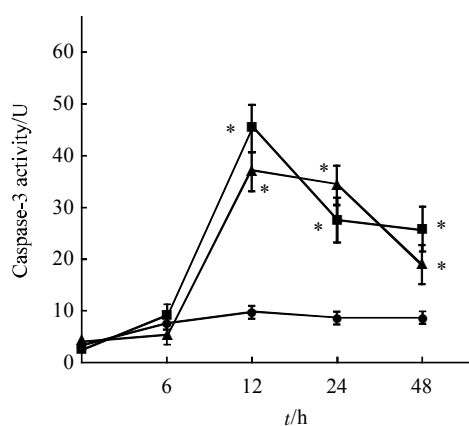


Fig. 4 DATS induced caspase-3 activation in HepG2 cells
 $n=3$, $*P < 0.05$, vs control. ●—●: Control; ■—■: 50 $\mu\text{mol/L}$ DATS; ▲—▲: 100 $\mu\text{mol/L}$ DATS.

3 讨 论

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 肝癌常见于中年男性, 因其恶性度高、病情进展快, 病人早期一般没有什么不适, 一旦出现症状就诊, 往往已属中晚期, 失去了手术切除的机会, 故治疗难度大、疗效差, 一般发病后生存时间仅为 6 个月, 预后不良. 因此, 临床上内科药物治疗在肝癌的治疗中仍具有非常重要的作用. 临床上广泛应用的一般化疗药物在杀死肿瘤细胞的同时会无选择地损伤正常组织和细胞, 毒副作用大, 往往对患者的身体造成严重的不可逆性的损伤, 严重影响患者的生存质量. 天然植物提取物因毒副作用小, 其防癌、抗癌作用近年来越来越受到重视.

大蒜具有天然的食疗功效, 无毒副作用. 其有机硫化物已在临床上被用于抗细菌、病毒及真菌, 疗效良好. 大量研究表明大蒜的单体提取物对白血病、结肠癌、前列腺癌、胃癌、肺癌及肝癌等多种恶性肿瘤细胞有抑制生长及促凋亡作用. 凋亡是一种多因素调节的程序性死亡, 可分为线粒体依赖途径和非线粒体依赖途径^[10~14]. Hassan 等研究发现, 大蒜素促进人白血病 CD34 细胞的凋亡可能通过依赖线粒体的 caspase 蛋白的活化级联反应, 减少凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达以促进线粒体细胞色素 c 释放诱导细胞凋亡^[15]. 本实验结果显示, 50 $\mu\text{mol/L}$ 与 100 $\mu\text{mol/L}$ DATS 处理 48 h, 细胞凋亡率分别

达到 60.33% 和 93.67%, 且高浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)比低浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)DATS 的诱导细胞凋亡效应明显增强, 这些结果提示 DATS 能诱导 HepG2 细胞凋亡, 且这种效应具有浓度依赖性.

线粒体是细胞内重要的细胞器, 参与细胞进行呼吸链、电子传递、三羧酸循环和氧化磷酸化, 在细胞凋亡的发生过程中发挥着重要作用. 研究发现, 在细胞凋亡早期可观察到线粒体膜电位下降、膜通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)开放、线粒体内与凋亡相关的基因产物的释放, 这些变化是诱导凋亡发生的重要事件^[16,17]. 文献报道, 线粒体跨膜电位的耗散早于核酸酶的激活, 早于磷脂酰丝氨酸暴露于细胞表面, 是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件, 且线粒体跨膜电位一旦耗散, 细胞即进入不可逆的凋亡过程^[18]. 本实验发现, DATS 处理 6 h 就可引起线粒体膜电势降低, 此时, 细胞开始出现凋亡, 随 DATS 处理时间增长而线粒体膜电势降低的细胞数逐渐增多, 48 h 后细胞线粒体膜电势降低明显, 细胞凋亡数量显著增多, 72 h 大部分细胞线粒体膜电势降低, 此时, 大部分细胞已经凋亡, 且 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 降低细胞线粒体膜电势效应比 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 DATS 强, DATS 诱导细胞凋亡的效应随着浓度增高而增强, 这些结果提示, DATS 引起的线粒体膜电势降低是 DATS 诱导细胞凋亡的条件之一. 线粒体膜电势的耗散常常伴随线粒体膜通透性转运孔(permeability transition pore, MPTP)开放, 此时, 细胞色素 c、凋亡诱导因子等从线粒体释放进入胞质. 细胞色素 c 一旦释放可引起两种后果, 一是当细胞色素 c 释放入胞质后, 使得线粒体内细胞色素 c 缺乏, 可引起呼吸链电子传递中断, 导致细胞坏死. 二是进入胞质的细胞色素 c 与 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) 结合, 在 ATP/dATP 的介导下, 启动凋亡级联反应, 激活下游因子^[19,20]. 本实验结果显示: 在 DATS 处理 12 h 时, 胞浆(去线粒体)出现细胞色素 c, 此时, 线粒体细胞色素 c 减少, 随处理时间增长, 胞质(去线粒体)细胞色素 c 逐渐增加, 与此同时线粒体细胞色素 c 逐渐减少, 即 DATS 能诱导胞质细胞色素 c 增加, 降低线粒体的细胞色素 c, 提示 DATS 能促进细胞色素 c 从线粒体释放至细胞质. 我们还发现, 当细胞色素 c 从线粒体释放至细胞质时, 即 DATS 处理 12 h, 细胞 caspase-3 活性达到峰值, 因此, caspase-3 的激活与细胞色素 c 的释放密切相关. 已有实验表明, 大

蒜素可通过增强肿瘤细胞 caspase-3, 8, 9 蛋白的表达, 抑制肿瘤细胞生长, 诱导角质细胞凋亡小体的形成和核固缩^[21], 与我们的结果一致.

我们在实验中发现, DATS 处理 HepG2 细胞可引起线粒体膜电势降低, 随着处理时间增加, 电势逐渐降低到一定程度时, 细胞色素 c 从呼吸链上游离出来, 释放入胞浆, 激活 caspase-3, 进一步启动凋亡相关级联反应, 诱导 HepG2 细胞凋亡. 但细胞色素 c 的释放与线粒体电势改变的关系, 及细胞色素 c 释放后, 如何活化 caspase-3 及进一步诱导凋亡的机制还需要进一步的实验证实.

参 考 文 献

- Herman-Antosiewicz A, Singh S V. Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by Allium vegetable-derived organosulfur compounds. *Mutat Res*, 2004, **555**(1~2): 121~140
- Jo H J, Song J D, Kim K M, *et al.* Diallyl disulfide induces reversible G2/M phase arrest on a p53-independent mechanism in human colon cancer HCT-116 cells. *Oncol Rep*, 2008, **19**(1): 275~280
- Karmakar S, Banik N L, Patel S J, *et al.* Garlic compounds induced calpain and intrinsic caspase cascade for apoptosis in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Apoptosis*, 2007, **12**(4): 671~684
- Ling H, Zhang L Y, Su Q, *et al.* Erk is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803. *Cell Mol Biol Lett*, 2006, **11**(3): 408~423
- Wu C C, Chung J G, Tsai S J, *et al.* Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. *Food Chem Toxicol*, 2004, **42**(12): 1937~1947
- Oommen S, Anto R J, Srinivas G, *et al.* Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 2004, **485** (1~3): 97~103
- Chen J C, Zhang X, Singleton T P, *et al.* Mitochondrial membrane potential change induced by Hoechst 33342 in myelogenous leukemia cell line HL-60. *Ann Clin Lab Sci*, 2004, **34**(4): 458~166
- Tonshin A A, Saprunova V B, Bakeeva L E, *et al.* Functional activity and ultrastructure of mitochondria isolated from myocardial apoptotic tissue. *Biochem J*, 2003, **68**(8): 875~881
- Park H S, Huh S H, Kim Y, *et al.* Selenite negatively regulates caspase-3 through a redox mechanism. *J Biol Chem*, 2000, **275**(12): 8487~8491
- 张志勉, 钟 宁, 高海青, 等. 大蒜素对皮下移植肝癌细胞生长抑制和诱导凋亡的实验研究. *中国老年医学杂志*, 2005, **24**(3): 213~216
- Zhang Z M, Zhong N, Gao H Q, *et al.* *Chin J Geriatrics*, 2005, **24** (3): 213~216
- 肖晓岚, 向姝霖, 苏 琦, 等. 二烯丙基三硫诱导人胃癌细胞凋亡与钙稳态失衡相关. *中国药理学通报*, 2005, **21**(8): 962~966
- Xiao X L, Xiang S L, Su Q, *et al.* *Chin Pharmacol Bull*, 2005, **21**(8): 962~966
- Takashi H, Tomomi F, Jun O, *et al.* Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of β -tubulin. *Biol Chem*, 2005, **280** (15): 41487~41493
- Dong X, Shivendra V. Diallyl trisulfide, a constituent of processed garlic, inactivates Akt to trigger mitochondrial translocation of BAD and caspase-mediated apoptosis in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 2006, **27**(3): 533~540
- Xin J W, Thorsten S, Ying H, *et al.* The production of reactive oxygen species and the mitochondrial membrane potential are modulated during onion oil-induced cell cycle arrest and apoptosis. *J Nutr*, 2006, **136**(3): 608~613
- Zhang Z M, Yang X Y, Deng S H, *et al.* Anti-tumor effects of polybutyl cyanoacrylate nanoparticles of diallyl trisulfide on orthotopic transplantation tumor model of hepatocellular carcinoma in BALB/c nude mice. *Chin Med J*, 2007, **120** (15): 1336~1342
- Hassan H T. Ajoene (natural garlic compound): a new anti-leukaemia agent for AML therapy. *Leuk Res*, 2004, **28**(7): 667~671
- Manjinder K, Chapla A, Rana P. Skin cancer chemopreventive agent, α -santalol, induces apoptotic death of human epidermoid carcinoma A431 cells *via* caspase activation together with dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Carcinogenesis*, 2005, **26**(2): 369~380
- Alison M, Adrian F, Nicola E, *et al.* The antipsoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria. *FASEB J*, 2005, **19**(8): 1012~1014
- Liu J, He H, Zhang Z, *et al.* Mitochondria play a role in the development of non-apoptotic programmed cell death of neutrophils induced by ONO-AE-248. *Cell Mol Immunol*, 2007, **4**(6): 447~453
- Sakamoto T, Kondo K, Kashio A, *et al.* Methimazole-induced cell death in rat olfactory receptor neurons occurs *via* apoptosis triggered through mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *Neurosci Res*, 2007, **85**(3): 548~557
- Teixeira C C, Costas A P, Nemelivsky Y. Apoptosis of growth plate chondrocytes occurs through a mitochondrial pathway. *Angle Orthod*, 2007, **77**(1): 129~134

Diallyl Trisulfide Induces Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Apoptosis by Mitochondria-dependent Pathway*

XIAO Zhi-Ke^{2)**}, ZHANG Meng-Xia^{1)**}, JIANG Hao²⁾, WU You-Hua²⁾, AI Xiao-Hong²⁾,
LUO Hong-Mei¹⁾, WANG Yu-Hua¹⁾, LEI Xiao-Yong¹⁾, TANG Sheng-Song^{1,2,3)***}

⁽¹⁾ Institute of Pharmacy & Pharmacology, Hunan School of Higher Learning Key Laboratory for Pharmacoproteomics,
University of South China, Hengyang 421001, China;

⁽²⁾ Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract Diallyl trisulfide (DATS) is known to have an anticancer effect on human cancer cells. However, the exact mechanisms of this anticancer activity remain unclear. To explore the effect of DATS on human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis. HepG2 cells were either treated with 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ of DATS for 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h, respectively. The mitochondrial membrane potential was visualized by the JC-1 fluorescence staining. The cytochrome c in HepG2 cells was detected by Western blotting. The activity of caspase-3 in HepG2 cells was measured with ELISA. Diallyl trisulfide induces HepG2 cell apoptosis. The apoptosis percentage in HepG2 cells is up to 60.33% and 93.67%, respectively, when the cell was treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ or 100 $\mu\text{mol/L}$ of DATS for 48 h. Diallyl trisulfide degrades the mitochondrial membrane potential and lowers the cytochrome c in mitochondria while increases the cytochrome c in the cytoplasm that mitochondria was deleted. Diallyl trisulfide activates caspase-3 kinase in HepG2 cells. These results indicate that diallyl trisulfide induces apoptosis by decreasing mitochondrial membrane potential, facilitating cytochrome c release from mitochondria into cytoplasm, and activating caspase-3 kinase in human hepatocellular carcinoma HepG2 cell.

Key words human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line, mitochondria, diallyl trisulfide, apoptosis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00149

*This work was supported by grants from Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (08JJ5004, 09JJ3060), The Key Scientific Research Project of Hunan Province (06FJ3203) and The Key Scientific Research Project of Department of Hunan Education (07A059).

** XIAO Zhi-Ke and ZHANG Meng-Xia were contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-734-8282753, E-mail: tangss111@yahoo.com.cn

Received: March 14, 2009 Accepted: May 27, 2009