

光敏化姜黄素诱导胃癌细胞凋亡

陈瑞川^{1*}, 苏金华¹, 马胜平¹, 蒋雪玄¹, 霍霞²

1. 厦门大学抗癌研究中心, 生物系, 福建 厦门 361005

2. 汕头大学医学院中心实验室, 广东 汕头 515031

【摘要】目的:研究在光照下姜黄素诱导胃癌细胞凋亡的效应,探讨其作为光动力学治疗肿瘤新型光敏剂的可能性。方法:体外培养的胃癌 MGC80-3 细胞加入姜黄素后光照处理;以台盼蓝拒染法计数细胞存活率, Gem-sa 染色观察形态变化并计数及统计凋亡指数, DNA 琼脂糖电泳观察 DNA 片段化, 流式细胞术检测细胞周期变化。结果:光敏化姜黄素处理后, 细胞存活率随药物浓度及处理时间依赖性下降, 并呈现典型的凋亡细胞形态; 5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素光照处理细胞 24 小时, 即呈现典型凋亡梯形条带; 经 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 及 5 $\mu\text{mol/L}$ 光敏化姜黄素处理, 细胞周期主要阻滞于 G_2/M 期, 提示细胞的 G_2/M 期阻滞与光敏化姜黄素诱导 MGC 80-3 细胞凋亡有关。结论:光敏化姜黄素具有显著诱导 MGC 80-3 细胞凋亡的作用, 可望进一步开发成光动力学治疗肿瘤的新型光敏剂。

关键词:姜黄素; 光敏化; 胃癌; MGC 80-3; 凋亡

中图分类号:Q2.24 文献标识码:A 文章编号:1000-467X(2000)04-0321-04

Induction of human gastric cancer MGC 80-3 cell apoptosis by photoactivated curcumin

CHEN Rui-chuan, SU Jiu-hua, MA Sheng-ping, et al.

Cancer Research Center of Xiamen University, Xiamen 361005, P. R. China

【Abstract】Objective: To investigate the effects of photoactivated curcumin on induction of apoptosis in human gastric cancer cell line MGC 80-3. **Methods:** MGC 80-3 cell was treated with curcumin plus fluorescence. Experiments of dye exclusion counting and Gem-sa staining were conducted to determine the cell survival, morphology, and apoptotic index. The analysis of DNA fragmentation and cell cycles were performed by DNA electrophoresis and flow cytometer respectively. **Results:** Cell viability dropped down dependent on the curcumin concentration and treatment time. Contrarily, the apoptotic index increased dependent on the curcumin concentration and the typical apoptotic morphology "ladder bands" could be seen on DNA electrophoresis in 5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin plus light treated cells. By analysis with flow cytometry, cell cycles showed G_2/M arrest after treatment with 2.5 and 5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin plus light, suggesting an association between G_2/M arrest and MGC 80-3 cell apoptosis induced by photoactivated curcumin. **Conclusion:** Photoactivated curcumin has the effect of inducing cell apoptosis in MGC 80-3 cells, suggests a potential application of photodynamic therapy for tumor.

Key words: Curcumin; Photoactivated; Gastric carcinoma; MGC 80-3; Apoptosis

近年,光动力学治疗肿瘤的技术已逐渐完善,但配合治疗所需的光敏剂的开发研究却进展不大,临

床使用的光敏剂仍以血卟啉衍生物为主。姜黄素(curcumin)是从中药姜黄中提取的酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、防癌、抑癌及近年发现的诱导癌细胞凋亡的作用^[1]。我们在以人胃腺癌细胞 MGC 80-3 为对象,研究姜黄素诱导胃癌细胞凋亡的过程中,发现姜黄素在光照条件下(光敏化姜黄素)诱导细胞凋亡的作用较无光照条件下(非光敏化姜黄素)更显著,提示姜黄素具有光化学反应特性并能显著

收稿日期:1999-09-09;修回日期:1999-12-01

基金项目:本课题受福建省自然科学基金(C97108)资助

* 通讯作者:Tel:86-592-2186390

E-mail: jydeng@jingxian.xmu.edu.cn

诱导细胞凋亡。本文着重研究光敏化姜黄素诱导胃癌细胞凋亡的效应,探讨其作为光动力学治疗肿瘤新型光敏剂的开发前景。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI 1640 购自美国 GIBCO BRL 公司。小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品。姜黄素、台盼蓝、Giemsa、蛋白酶 K 和 SDS 等购自 Sigma 公司。Tris、琼脂糖、RNase A 及 pBR322/ Hae III DNA 分子量标准为 Promega 公司产品。其余均为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养及药物处理

人胃腺癌 MGC 80-3 细胞系由本单位细胞生物学研究室提供,于含 10% 小牛血清、100 u/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液,5% CO₂、37 培养传代。细胞按 $(1 \sim 2) \times 10^5$ /ml 接种,37 培养 24 小时后按实验要求加入不同浓度姜黄素,于 15 W 日光灯下(光距 20 cm)、37 继续培养 24 小时后即收集细胞。

1.3 细胞计数及光镜观察

常规台盼蓝拒染-血球计数板计数活细胞。培养于盖玻片上的细胞常规 Giemsa 染色后显微镜观察、拍照。

1.4 DNA 抽提及电泳分析

每样品取 2×10^6 个细胞,参考 Ioannou 等报道的方法^[2],细胞以 0.2% EDTA/PBS 消化、收集,以 2.5% PEG 8000 分级沉淀法提取断裂部分的 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外观察仪观察、拍照。

1.5 流式细胞仪分析

按文献方法^[3],每样品取 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 个细胞。流式细胞仪为 FACScot FCM (美国 BD 公司),结果

分析软件为 CellFIT Cell-Cycle Analysis Version 2.01.2。

2 结果

2.1 光敏化姜黄素对 MGC 80-3 细胞存活率的影响

以 1、2.5 和 5 μ mol/L 姜黄素光照下连续处理 MGC 80-3 细胞 72 小时,并于不同时间取样计数活细胞,结果见图 1。3 种浓度光敏化姜黄素对 MGC 80-3 细胞的存活率均有抑制作用,并随药物浓度及处理时间依赖性下降。

2.2 光敏化姜黄素对 MGC 80-3 细胞形态的影响

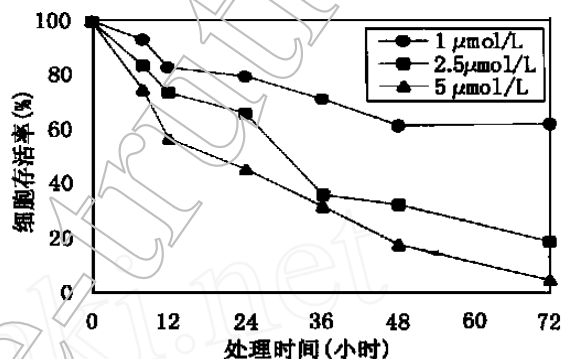


图 1 光敏化姜黄素对 MGC 80-3 细胞存活率的影响

经 5 μ mol/L 姜黄素光照处理 MGC 80-3 细胞 24 小时,常规 Giemsa 染色,光镜观察可见凋亡细胞胞膜完整或起泡,并有染色致密的凋亡小体形成,胞核染色质凝集,或附于核膜,或形成边缘清晰的致密块状(见图 2);按此标准随机计数 500 个细胞中的凋亡细胞并计算凋亡指数,结果见图 3。

2.3 光敏化姜黄素诱导 MGC 80-3 细胞 DNA 片断化

MGC 80-3 细胞经 0、2.5、5、7.5、10 μ mol/L 姜黄素光照处理 24 小时后的 DNA 电泳显示:5 μ mol/L 以上终浓度姜黄素光照处理组均有典型的 DNA 梯形图像;另以 0、5、10、20、30 μ mol/L

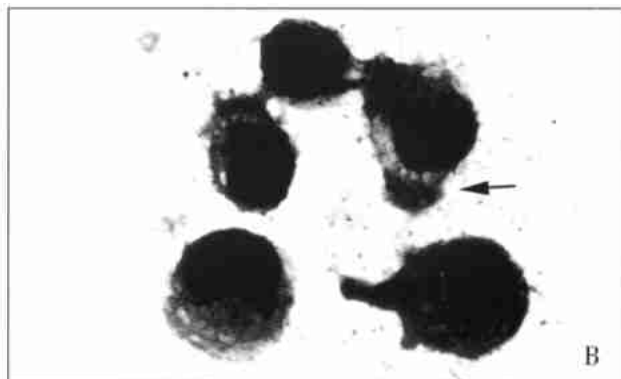
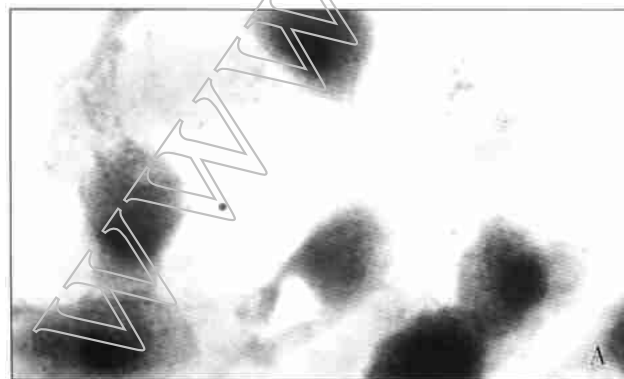


图 2 光敏化姜黄素对 MGC 80-3 细胞形态的影响(Giemsa 染色, $\times 1000$)

A: 对照组; B: 5 μ mol/L 处理组(箭头示凋亡小体)

终浓度姜黄素避光(非光敏化姜黄素)处理 MGC 80-3 细胞 24 小时后,同样提取 DNA 进行电泳

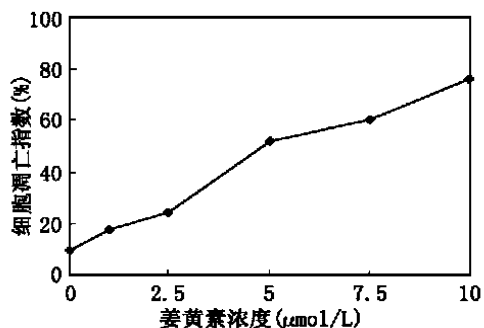


图 3 光敏化姜黄素对 MGC 80-3 细胞凋亡指数的影响分析,显示 20 $\mu\text{mol/L}$ 以上终浓度姜黄素可诱导细胞凋亡,而 10 $\mu\text{mol/L}$ 终浓度姜黄素则无此作用(图 4)。

2.3 细胞周期分布分析

以 2.5 及 5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素光照处理细胞 24 小时,取样作流式细胞术分析细胞周期分布,显示 G_1 、S 期细胞随姜黄素浓度提高而下降,而亚 G_1 期及 G_2/M 期细胞百分比随药物浓度提高而增加(见图 5 及表 1)。

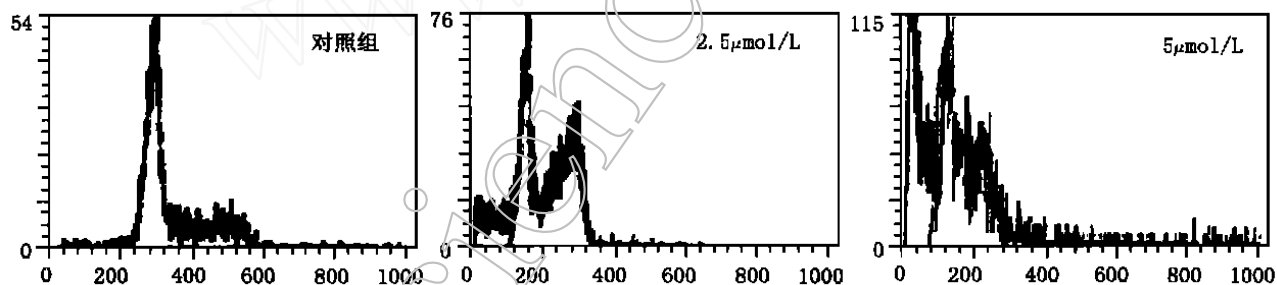


图 5 光敏化姜黄素对 MGC 80-3 细胞亚 G_1 期的诱导作用

3 讨论

在研究过程中,我们发现姜黄素在光照下可显著诱导 MGC80-3 细胞死亡,使其存活率下降,进一步研究表明 MGC80-3 细胞存活率的下降与细胞凋亡有关。细胞凋亡是细胞主动参与的自主性死亡过程,可被多种药物及理化因素诱发^[4]。目前,细胞形态观察和 DNA 琼脂糖电泳检查仍被作为判别细胞凋亡和细胞坏死的主要标志。本文以 5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素光照处理 MGC80-3 细胞 24 小时,在倒置显微镜下观察,即可见培养的细胞由原来的梭状或多角状变为缩水状的圆形细胞,并大量从培养瓶壁脱落(结果未显示);经 Gemsa 染色后观察,可见典型的凋亡细胞形态特征(见图 2);DNA 琼脂糖电泳也

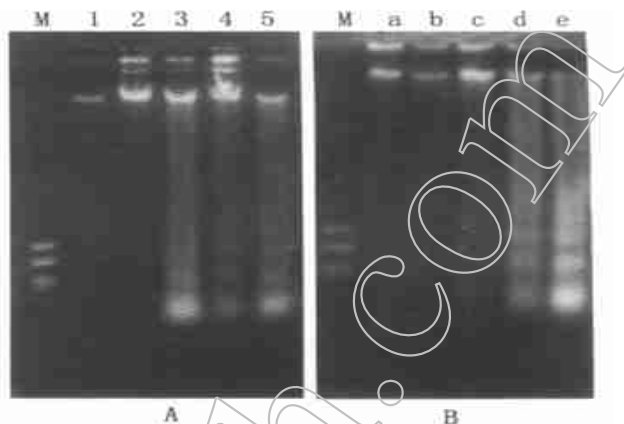


图 4 DNA 琼脂糖电泳结果

A: 光敏化姜黄素处理; B: 非光敏化姜黄素处理 M/ $\mu\text{BR}322/\text{HaeIII}$ Marker

1-5: 0, 2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素
a-e: 0, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素

表 1 姜黄素对 MGC 80-3 细胞周期的影响

组别	G_1 期细胞 (%)	S 期细胞 (%)	G_2/M 期细胞 (%)
对照组	56.4	35.0	8.6
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	61.8	21.8	16.4
5 $\mu\text{mol/L}$ 组	59.4	15.9	24.7

显示 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以上的姜黄素光照处理组均能观察到“梯形条带”,与形态观察的结果相符。

近年的文献报道显示^[1]:非光敏化姜黄素诱导各种癌细胞凋亡的浓度基本相近,约在 20 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ 左右,我们的研究显示 5 $\mu\text{mol/L}$ 光敏化姜黄素处理 24 小时后的凋亡指数为 52%,与流式细胞仪检测结果相符,并与 20 $\mu\text{mol/L}$ 非光敏化姜黄素诱导 MGC 80-3 细胞凋亡的效果相当(见图 4),表明光敏化姜黄素具有更显著的诱导 MGC 80-3 细胞凋亡作用。

目前,有关姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡作用的研究均采用非光敏化姜黄素处理细胞,其诱导凋亡机制尚不清楚,有人认为与姜黄素触发细胞内活性氧

自由基代谢有关^[1]。另有报道显示姜黄素在光照下可发生光化学反应并具有细胞毒作用^[5,6],我们推测光敏化姜黄素诱导细胞凋亡作用可能与姜黄素在光照下产生更多活性氧自由基有关。另外本文结果也提示凋亡可能与姜黄素光照处理 MGC 80-3 细胞后发生 G₂/M 期阻滞有关。总之,光敏化姜黄素诱导细胞凋亡的作用尚属首次报道,有关光敏化姜黄素诱导细胞凋亡的机制尚待进一步研究,其作为光敏剂应用于光动力治疗肿瘤的前景也有待于动物实验的验证。

致谢:本文在完成过程中,曾获徐洵教授、李祺福副教授等的热心指导和帮助,在此致以衷心的感谢。

[参 考 文 献]

- [1] 马晓华,沃兴德,梁海曼. 姜黄素抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞凋亡的研究概况[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1999, 26(1): 21 ~ 23.
- [2] Ioannou YA, Chen FW. Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis [J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(5): 992 ~ 993.
- [3] Li X, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Detection of apoptosis and DNA replication by differential labeling of DNA strand breaks with fluorochromes of different color [J]. Exp. Cell. Res., 1996, 222(1): 28 ~ 37.
- [4] 李德玲,王会信,周廷冲. 细胞程序性死亡判定方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23: 322 ~ 325.
- [5] Chignel CF I, Bilski P, Reszka KJ, et al. Spectral and photochemical properties of curcumin [J]. Photochem. & Photobiol., 1994, 59: 295 ~ 302.
- [6] Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, et al. Photocytotoxicity of curcumin [J]. Photochem. & Photobiol., 1994, 59: 290 ~ 294.

[编辑:钟均行;校对:张菊]

期刊情报 ·

我国抗肿瘤药物期刊文献分布初步调查

李 敬^{1*}, 李成建¹, 荆海燕²

1. 中国人民解放军 401 医院, 山东 青岛 266071
2. 青岛市药品检验所, 山东 青岛 266071

关键词: 抗肿瘤药物; 文献计量学; 核心期刊; 情报服务

中图分类号: G255.2 文献标识码: B

文章编号: 1000-467X(2000)04-0324-01

为了使广大医务工作者和图书情报人员及时了解掌握我国抗肿瘤药物方面的信息, 掌握其发展动向, 我们采用文献计量学方法, 对本学科期刊文献分布作了初步调查, 即对中国医学科学院医学信息研究所编辑出版的 1997 ~ 1998 年《中文科技资料目录医药卫生》中有关抗肿瘤药物文献作了统计、整理、归纳, 从中找出重要期刊即核心期刊, 供图书情报部门和广大专业人员参阅。

统计结果表明, 1997 ~ 1998 年共有 216 种期刊登载有关抗肿瘤药物方面的文献, 其中中华医学系列杂志 20 种, 中国医药系列杂志 35 种, 医学院学报 38 种, 中医药杂志 39 种, 省市医药 21 种, 临床(实用)医学 4 种, 军队医药 6 种, 国外医学系列分册 10 种, 生物科学 11 种, 其它 30 种。这 216 种期刊登载有关文献 737 篇, 其中载文量在 7 篇以上的期刊有 29 种, 依次为: 癌症(39); 中国

华血液学杂志(17); 药学报(17); 中华肿瘤杂志(15); 中草药(14); 癌变、畸变、突变(12); 中国药理学杂志(12); ⑪ 中国中药杂志(12); ⑫ 福建医学院学报(10); ⑬ 第二军医大学学报(9); ⑭ 中国药理学与毒理学杂志(9); ⑮ 实用肿瘤学杂志(8); ⑯ 上海医科大学学报(8); ⑰ 中国生化药物杂志(7); ⑱ 中华医学杂志(7); ⑲ 中国微生态学杂志(7); ⑳ 中国药物化学杂志(7); ㉑ 肿瘤(7); ㉒ 肿瘤防治研究(7); ㉓ 国外医药合成药分册(7); ㉔ 北京医科大学学报(7); ㉕ 新消化病学杂志(7); ㉖ 中华预防医学杂志(7); ㉗ 中国医院药理学杂志(7); ㉘ 中成药(7); ㉙ 中华妇产科杂志(7)。

这 29 种期刊合计载文量 333 篇, 占 45.1%, 其中前 17 种期刊合计 249 篇, 占 33.79%, 能提供三分之一的信息量, 是我国抗肿瘤药物主要期刊, 也是核心期刊。

本次调查结果表明, 上述 17 种中文期刊是广大医务工作者获取本学科情报信息的重要来源, 也是从事临床科研教学必不可少的参考工具。因此, 建议广大医务工作者学会掌握利用这方面的信息, 以便更好地开展临床科研工作; 各级图书情报部门也应注意这方面的动态, 增加这些核心期刊的收藏比例, 以满足专业人员的需求。

[编辑:张菊;校对:龙小年]

收稿日期: 1999-12-06; 修回日期: 1999-12-29

* 通讯作者: Tel: 86-532-5824460

药理学通报(22); 中国肿瘤临床(19); 中国药理学报(18); 中