

姜黄素对人宫颈癌Hela细胞增殖的抑制作用

陈昌明*, 刘慧芳, 曹雪姣, 李新莉, 辛毅, 张翠丽*(大连医科大学生物技术系, 辽宁大连 116044)

中图分类号 R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-1006-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.16

摘要 目的:研究姜黄素对人宫颈癌Hela细胞生长的抑制作用。方法:姜黄经75%乙醇提取、纯化得姜黄素。MTT法检测姜黄素对体外培养Hela细胞增殖的抑制作用;倒置显微镜观察Hela细胞形态学变化;Western blot法检测抑癌基因p53蛋白的表达;流式细胞仪检测Hela细胞凋亡和周期分布。结果:姜黄素对Hela细胞生长24 h的最佳抑制质量浓度为116.68 μg/ml,抑制率为63.20%;11.67、35.00、58.34 μg/ml姜黄素培养24 h,人宫颈癌Hela细胞数目明显减少,细胞变圆、缩小、老化,核质发散,并与质量浓度呈正相关。29.17、145.85 μg/ml姜黄素可增强p53蛋白的表达;11.67、35.00、58.34 μg/ml姜黄素可促进人宫颈癌Hela细胞凋亡,并与质量浓度呈正相关,G₀/G₁期细胞和S期细胞逐渐减少,G₂/M期细胞逐渐增多。**结论:姜黄素对人宫颈癌Hela细胞增殖有明显抑制作用,并能促进其凋亡和p53的表达,阻滞Hela细胞的G₂/M期。**

关键词 姜黄素;人宫颈癌Hela细胞;蛋白质印迹法;凋亡

Inhibitory Effects of Curcumin on the Growth of Human Cervical Carcinoma Hela Cells

CHEN Chang-ming, LIU Hui-fang, CAO Xue-jiao, LI Xin-li, XIN Yi, ZHANG Cui-li (Dept. of Biotechnology, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect of curcumin on the growth of human cervical carcinoma Hela cells. METHODS: Curcumin was extracted and purified by 75% ethanol. Hela cells were cultured in vitro, and inhibitory effects of curcumin on the growth of Hela cells were measured with MTT method to explore optimal inhibitory concentrations; the morphologic change of human cervical carcinoma Hela cells was observed by inverted microscope; the expression of p53 protein in Hela cell was observed by Western blot method. In addition, cell apoptosis and cell cycle were inspected by flow cytometry. RESULTS: The optimal inhibitory concentration of curcumin to Hela cells in 24 h was 116.68 μg/ml, with inhibitory ratio of 63.20%. After treated with 11.67, 35.00, 58.34 μg/ml curcumin for 24 h, the number of human cervical carcinoma Hela cells decreased significantly, cell rounding, shrinking and aging was in concentration-dependant manner. The p53 protein expression was increased after treated with 29.17, 145.85 μg/ml curcumin; 11.67, 35.00, 58.34 μg/ml curcumin could promote the apoptosis of human cervical carcinoma Hela cells, in concentration-dependant manner. With the increase of curcumin concentration, the number of cells in G₀/G₁ phase and S phase were decreased while the number of cells in G₂/M phase was increased. CONCLUSIONS: Curcumin has obvious inhibitory effect on human cervical carcinoma Hela cells, promote the apoptosis of Hela cells and the expression of p53 protein. It also prevents the cells in G₂/M phase.

KEYWORDS Curcumin; Human cervical carcinoma Hela cells; Western blot method; Apoptosis

姜黄素(Curcumin)是从姜科姜黄属植物姜黄(*Curcuma longa*)根茎中提取的一种酚性色素,具有抗炎、抗氧化、降脂、抗病毒、清除自由基的作用^[1-2],同时还可抑制小鼠肉瘤S180、人大肠癌细胞HT29、肾癌细胞293、肝癌细胞HepG2细胞生长^[3-5]。有文献报道,姜黄素可抑制酪氨酸蛋白激酶(PTK)活性,从而抑制肿瘤细胞增殖,并通过阻断细胞信号传导途径促发细胞凋亡^[6]。本研究通过姜黄素对人宫颈癌Hela细胞的增殖抑制、促凋亡和细胞周期各时相的变化以及抑癌基因p53蛋白的表达影响的研究,为姜黄素的抗癌研究和应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

*本科生。研究方向:天然产物及中药研发。E-mail: 394474278@qq.com

通信作者:高级实验师。研究方向:天然产物及中药研发。电话:0411-86110296。E-mail: biot_zhangcl@sina.com

E100型倒置相差显微镜[尼康仪器(上海)有限公司];CO₂孵箱、MK3型酶标仪(美国Thermo公司);FC500型流式细胞仪(美国Beckman公司)。

1.2 药材

姜黄于2012年4月购于大连中药店,经大连医科大学生物技术系李新莉讲师鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

姜黄素对照品(天津一方科技有限公司,批号:20121259,纯度:≥98%);MTT(美国Amresco公司);抗体β-actin、p53、HRP辣根过氧化物酶(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.4 细胞

人宫颈癌Hela细胞株由大连医科大学生物技术系实验室提供。

2 方法

2.1 姜黄素的提取

姜黄置50℃恒温干燥箱过夜,粉碎过200目筛网。姜黄

粉末按1:10(m/V)加入70%乙醇浸提48 h,抽滤浸提液,旋蒸,等分提取物分别以酸碱法和萃取法提纯,计算得率^[7]。姜黄提取液置-20℃贮藏,备用。

2.2 姜黄提取液质量浓度的测定

准确称取20 mg姜黄素对照品,加入200 μl 甲醇溶解得姜黄素对照品溶液(100 mg/ml)。定量移取姜黄素对照品溶液(100 mg/ml)适量,甲醇逐级10倍稀释至0.1 mg/ml;分别取0.1 mg/ml的姜黄素对照品溶液10、20、30、40、50、60 μl与姜黄提取液30 μl(甲醇溶解,质量浓度为0.1 mg/ml),均设3复孔,以甲醇定容至200 μl量瓶中,检测420 nm波长处的光密度(OD)^[8]。分别以姜黄素浓度(c)为横坐标,OD为纵坐标,进行线性回归,计算姜黄提取液的质量浓度。

2.3 细胞增殖抑制实验^[6]

取 $1.0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 的对数生长期Hela细胞,接种于96孔板(200 μl/孔)。至细胞贴壁,每孔加入200 μl姜黄提取液(以0.05 mg/ml为单位添加,自0.05 mg/ml至0.50 mg/ml计10个质量浓度,各质量浓度设3个平行孔);以同体积1640培养液为空白对照;以只加姜黄提取液的甲醇溶液为阴性对照(200 μl/孔,3复孔)。酶标仪检测589 nm波长处的OD,计算细胞增殖抑制率。抑制率=(空白对照组OD-用组OD)/空白对照组OD×100%。

2.4 形态学观察

取对数生长期的Hela细胞,加入终质量浓度为0.02、0.06、0.10 mg/ml的姜黄提取液3 ml,培养24 h,以倒置显微镜观察Hela细胞形态学变化。

2.5 Hela细胞总蛋白含量的测定^[7-8]

取分别加入0.05、0.25 mg/ml的姜黄提取液(药物组)以及常规1640培养液(空白对照)培养24 h的Hela细胞,以0.25%胰蛋白酶消化,4℃下,以离心半径为8 cm、4 000 r/min离心6 min,加1 ml PBS(pH7.2)沉淀,移入1.5 ml离心管中,再次离心弃上清。向离心管中加入200 μl细胞裂解液[苯甲基磺酰氟(PMSF)10 μl/ml],冰上反复吹吸10 min,4℃下,以离心半径为8 cm、12 000 r/min离心10 min,取上清,以小牛血清白蛋白(BSA)为标准品检测蛋白质含量,-20℃贮藏,备用。

2.6 Western blot检测p53蛋白

常规SDS-PAGE凝胶电泳(5%的浓缩胶,10%的分离胶,蛋白质上样量60 μg,30 mA恒流,待溴酚蓝至胶底端1 cm时停止电泳);依据蛋白Marker切取凝胶(含目的蛋白)及等尺寸的滤纸、硝酸纤维素薄膜(NC膜),半干式电转膜45~55 min;取NC膜,以TBST清洗2~3次,5 min/次,5%脱脂奶粉封闭2 h,TBST清洗NC膜10 min/次(2~3次)后,转入1:500稀释的一抗(β-actin、p53)中,4℃过夜;TBST清洗NC膜3次(10 min/次),HRP辣根过氧化物酶(二抗,稀释倍数1:5 000,V/V)室温孵育1 h,TBST洗涤(10 min/次,2~3次),加入ECL发光试剂,全自动凝胶成像仪成像(每5 s成像1次,成像300 s),Quantity One分析软件分析^[9]。

2.7 流式细胞仪测定Hela细胞的凋亡

0.02、0.06、0.10 mg/ml的姜黄提取液作用于Hela细胞24 h,消化、收集细胞,PBS清洗,用于凋亡和周期(70%冷乙醇

固定,过200目网,调整细胞数为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$)各时相变化的检测^[10]。

3 结果

3.1 姜黄素提取率计算结果

40 g姜黄粗提物,经酸碱法纯化得姜黄素0.369 6 g,萃取法得0.666 4 g。提取率依次为0.924%和1.666%,萃取法提纯是酸碱法的1.8倍,因此选择萃取法提取。

3.2 姜黄素含量计算结果

回归方程为 $A=423.71c-0.0566$ ($r^2=0.9907$),姜黄提取液中姜黄素含量为58.34%。

3.3 姜黄素对Hela细胞增殖的抑制作用

姜黄提取液质量浓度为0.2 mg/ml(含姜黄素116.68 μg/ml)时其抑制率达到峰值63.20%,半数抑制质量浓度(IC₅₀)为0.33 mg/ml(含姜黄素192.52 μg/ml),且抑制率在0.05~0.2 mg/ml质量浓度范围内随质量浓度增高而增大($P<0.01$)。姜黄素对Hela细胞增殖的抑制作用见表1。

表1 姜黄素对Hela细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Inhibitory effects of different concentrations of curcumin on the growth of Hela cells in 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

姜黄素提取液质量浓度,mg/ml	姜黄素质量浓度,μg/ml	OD	抑制率,%
0.05	29.17	0.437±0.031	15.34
0.10	58.34	0.314±0.031	37.31
0.15	87.51	0.205±0.013	56.90
0.20	116.68	0.170±0.008	63.20
0.25	145.85	0.210±0.008	56.00
0.30	175.02	0.256±0.021	47.79
0.35	204.19	0.257±0.018	47.73
0.40	233.36	0.268±0.013	45.64
0.45	262.53	0.277±0.014	44.02
0.50	291.7	0.286±0.086	42.46

3.4 姜黄素对Hela细胞形态学的影响

加入0.02 mg/ml(含姜黄素11.67 μg/ml)、0.06 mg/ml(含姜黄素35.00 μg/ml)、0.10 mg/ml(含姜黄素58.34 μg/ml)姜黄提取液培养24 h的Hela细胞,其细胞数目明显少于空白对照,且细胞变圆、缩小、老化,核质发散,并随浓度的升高,凋亡明显。Hela细胞的形态学见图1。

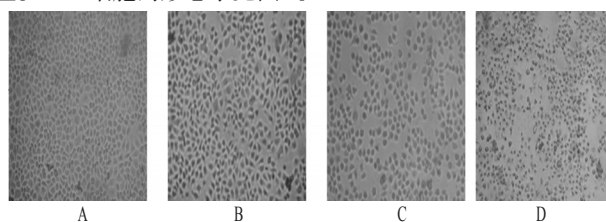


图1 Hela细胞的形态学

A.空白对照组;B.0.02 mg/ml姜黄提取液组;C.0.06 mg/ml姜黄提取液组;D.0.10 mg/ml姜黄提取液组

Fig 1 Morphology of Hela cells

A.blank control group;B.0.02 mg/ml *C. longa* extract;C.0.06 mg/ml *C. longa* extract;D.0.10 mg/ml *C. longa* extract

3.5 姜黄素对Hela细胞p53蛋白表达的影响

质量浓度为0.05 mg/ml(含姜黄素29.17 μg/ml)、0.25 mg/ml(含姜黄素145.85 μg/ml)时姜黄提取液作用Hela细胞24 h,p53蛋白的表达与空白对照比较明显增强。Hela细胞p53蛋白的表达见图2(图中0 mg/ml为空白对照)。

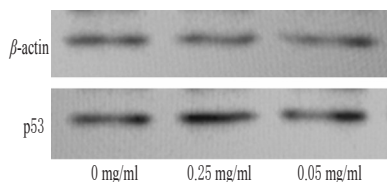


图2 HeLa细胞p53蛋白的表达

Fig 2 The expression of p53 protein in HeLa cells

3.6 姜黄素对HeLa细胞凋亡的影响

姜黄提取液处理24 h后,早期凋亡细胞所占的百分比由0.74%增加到1.43%,晚期凋亡细胞由2.45%增加到96.50%,即姜黄素诱导HeLa细胞的死亡性质为凋亡,且其作用具有明显剂量依赖性。HeLa细胞凋亡见图3。

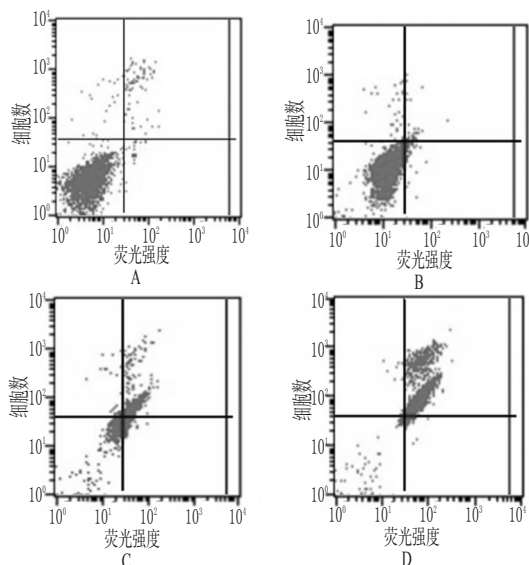


图3 HeLa细胞凋亡

A.空白对照组;B.0.02 mg/ml姜黄提取液组;C.0.06 mg/ml姜黄提取液组;D.0.10 mg/ml姜黄提取液组

Fig 3 The apoptosis of HeLa cells

A. blank control group; B. 0.02 mg/ml *C. longa* extract; C. 0.06 mg/ml *C. longa* extract; D. 0.10 mg/ml *C. longa* extract

3.7 姜黄素对HeLa细胞周期的影响

不同质量浓度姜黄提取液(姜黄素质量浓度同“3.4”项下)处理24 h后, G₂/M期细胞比例由5.02%增至16.96%,同时G₀/G₁期与S期细胞比例减少,提示姜黄素使HeLa细胞周期阻滞在G₂/M期,从而抑制细胞增殖。HeLa细胞周期分布见表2(表中0 mg/ml为空白对照)。

表2 HeLa细胞周期分布

Tab 2 The cycle distribution of HeLa cells

细胞系	溶液质量浓度, mg/ml	细胞分布, %			
		Sub/G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
HeLa	0	0.9	57.92	37.06	5.02
	0.02	0	55.78	35.72	8.5
	0.06	0	53.56	38.14	8.31
	0.10	0	52.18	30.87	16.96

4 讨论

宫颈癌现已成为危害女性健康的第二杀手。我国每年新发病例14万,占妇女生殖道恶性肿瘤的第1位^[11-12]。细胞凋亡始终是肿瘤的分子生物学研究热点^[13]。p53蛋白表达与宫颈癌的发生有关^[14-15],且在细胞周期调控、细胞凋亡诱导等过程

中发挥重要作用。本文以HeLa细胞为研究对象,探讨姜黄素对HeLa细胞生长、凋亡及p53蛋白表达的影响。结果表明,姜黄素对HeLa细胞有较明显的抑制作用,在116.68 μg/ml附近出现抑制率峰值,在一定质量浓度范围内,姜黄素作用HeLa细胞24 h, p53蛋白表达随质量浓度增加而增强;细胞流式仪检测细胞凋亡数目相对增多;姜黄素对HeLa细胞G₂期有阻滞,从而使G₁期和S期细胞相对减少, G₂/M期细胞相对增多,即对HeLa细胞G₂/M期有明显的阻滞作用,使细胞凋亡率增高。

肿瘤的发生发展与细胞凋亡有关,诱导细胞凋亡已成为肿瘤治疗的热点,亦成为评估抗癌药物作用能力的重要指标。由于姜黄素对肿瘤细胞的作用并非针对单一靶点,具有广泛的生物学作用,因此对姜黄素诱导HeLa细胞凋亡机制的进一步研究以及阻滞细胞传导通路、信使的相关研究,将对其临床应用具有良好的指导意义。

参考文献

- [1] 任嫦娥,郭惠萍.姜黄素对肝癌HepG2和Bel-7404细胞增殖的抑制作用[J].中国生化药物杂志,2012,33(3):251.
- [2] 刘素标.姜黄素的作用研究进展[J].中医临床研究,2013,5(4):117.
- [3] Iyer P, Zekri AR, Hung CW, et al. Concordance of DNA methylation pattern in plasma and tumor DNA of Egyptian hepatocellular carcinoma patients[J]. *Exp Mol Pathol*, 2010,88(1):107.
- [4] 覃勇,傅仲学,卢伟东,等.姜黄素逆转人结肠癌细胞株HCT-8/VCR多药耐药的研究[J].中国生化药物杂志,2011,32(3):173.
- [5] 李亚梅,廖端芳.姜黄素及其衍生物药理作用研究进展[J].实用中医内科杂志,2012,26(12):99.
- [6] 余俚瑶,张庆华.姜黄素抑制宫颈鳞癌HeLa细胞增殖的机制[J].肿瘤防治研究,2011,38(8):899.
- [7] 高苏亚,范涛等.姜黄中姜黄素的提取与分离工艺研究[J].应用化工,2011,40(2):203.
- [8] 韩光,张义春,于士勇.姜黄中姜黄素含量测定方法的比较[J].西北药学杂志,2005,20(1):15.
- [9] 黄谟婉,马英.姜黄素对HeLa细胞增殖和凋亡的影响[J].中国生物制品学杂志,2008,21(12):1094.
- [10] ZHAO Jing, ZHAO Yong, ZHANG Yan, et al. Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma HeLa cells in vitro and in vivo[J]. *Chinese Journal of Cancer Reserach*, 2007, 19(1):32.
- [11] 赵春兰,王建,张会辰.宫颈癌及癌前病变筛查的现状和研究进展[J].河北医药,2012,34(2):259.
- [12] 陈黎萍,张燕.宫颈癌的危险因素分析及预防保健[J].肿瘤基础与临床,2011,24(2):183.
- [13] 刘培,周立军,苏艳芳,等.金龙胆草总皂苷诱导HeLa细胞和SPC-A1细胞凋亡的研究[J].中国药房,2011,22(35):3288.
- [14] 白蒙,胡新荣.p53与宫颈癌的关系探讨[J].中国医药导报,2010,7(2):11.
- [15] 陈黎萍,张燕.宫颈癌的危险因素分析及预防保健[J].肿瘤基础与临床,2011,24(2):183.

(收稿日期:2013-06-26 修回日期:2013-08-07)