

姜黄素对肺癌细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用

郑伟¹, 吴丽娜¹, 杨向红²

(中国医科大学 附属盛京医院 1. 肿瘤科; 2. 病理科, 沈阳 110004)

摘要:目的 研究姜黄素对人肺腺癌细胞 A2 的生长抑制及诱导凋亡作用, 探讨其分子机制。方法 通过溴化二甲噻唑二苯四氮唑(MTT)比色法检测姜黄素对肺癌 A2 细胞体外增殖的影响, 通过 Annexin V-PI 染色法的流式细胞术和琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡变化, Western blot 法检测凋亡相关蛋白的变化。结果 姜黄素能明显抑制肺癌 A2 细胞的体外生长, 且呈时间与剂量依赖性, 将量效关系进行直线回归, 得到体外增殖的半数抑制浓度(IC₅₀)为 40 μmol/L。流式细胞分析仪结果显示随姜黄素作用时间的延长肺癌 A2 细胞凋亡率由 1.64% 增至 21.05%; 琼脂糖凝胶电泳检测姜黄素作用 48 h 后 DNA 降解成规则的大片段出现凋亡特有的“梯状”条带即典型的 DNA ladder。Western blot 结果显示随姜黄素作用时间的延长 Survivin 蛋白表达水平明显下降, 具有统计学意义(P < 0.01)。结论 姜黄素能抑制肺癌细胞的生长并诱导其凋亡, 此作用是通过下调 Survivin 蛋白表达实现的, 这可能是姜黄素诱导凋亡的又一机制。

关键词: 姜黄素; 肺腺癌细胞 A2; 凋亡; 细胞增殖

中图分类号: R734.2

文献标志码: A

文章编号: 0258-4646(2008)05-0607-04

Effects of Curcumin in Inhibiting Proliferation and Inducing Apoptosis in Human Lung Cancer Cells

ZHENG Wei¹, WU Li-na¹, YANG Xiang-hong²

(1. Department of Oncology; 2. Department of Pathology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of curcumin in inhibiting proliferation and inducing apoptosis and the mechanism in human lung adenocarcinoma cell line A2. **Methods** The proliferation of A2 cells were detected by MTT colorimetry after treated with curcumin (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 and 160 μmol/L) for 48 hours. Annexin V-PI staining and agarose gel electrophoresis were performed to determine the apoptosis of A2 cells, and the changes in apoptosis-related protein were detected by Western blot. **Results** Curcumin inhibited the proliferation of A2 cells in vitro in a dose- and time-dependant manner, and the IC₅₀ of curcumin was 40 μmol/L. The apoptotic rate of A2 cells increased from 1.64% to 21.05%. DNA ladder was found after A2 cells were treated with curcumin for 48 hours. The expression of Survivin protein significantly decreased. **Conclusion** Curcumin could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of lung cancer cells by down-regulating the expression of Survivin.

Key words: curcumin; lung adenocarcinoma A2 cell; proliferation; apoptosis

姜黄素(curcumin)是从姜科植物姜黄的根茎中提取的有效成分之一, 有广泛的药用价值, 抗癌是其主要的的作用之一, 最近美国国立癌症研究所(NCI)已将其列为第三代抗癌药进行临床研究。姜黄素能诱发多种不死性细胞系及肿瘤细胞的凋亡, 包括 NIH3T3、S180 细胞、HR-29、人肾癌 293、人肝细胞癌 HepG2、HL-60 细胞和 COLO-250 结、直肠癌细胞等^[1]。但对肺癌细胞的研究并不多见, 本实验旨在探讨姜黄素对人肺癌细胞生长抑制和诱导其凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养条件

人肺腺癌细胞株 A2: 中国医科大学肿瘤研究所提供, 细胞来自美国国立细胞库(ATCC), 用含 10% (vol/vol) 56℃灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞呈单层贴壁生长, 实验均取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 0.5~1×10⁶/ml。接种细胞 24 h 进入对数生长期后开始加药。

1.2 药物与试剂及仪器

姜黄素, MTT, AnnexinV-FITC 购自 Sigma 公司; 硫酸鱼精蛋白注射液购自上海第一生化药业公司。RPMI-1640 培养基, 胎牛血清胰酶均为美国 Gibco 公司产品, DMSO(Sigma 公司)。纯化超净工作

基金项目 辽宁省自然科学基金资助项目(20032071)

作者简介 郑伟(1967-)女, 副主任医师, 博士。

通讯作者 杨向红, E-mail: yangxh@cmu2h.com

收稿日期 2008-07-17

台、二氧化碳培养箱、倒置相差显微镜、自动酶标仪为美国制造。电泳凝胶自动成像系统为美国 Cr, FACSCalibur 流式细胞仪(美国 B-D 公司)羊 survivin 多克隆抗体, HRP-马抗羊 IgG(二抗)(Santa Cruz 公司)。

1.3 MTT 法检测姜黄素对 A2 细胞增殖的影响

用 0.25% 的胰蛋白酶消化对数期生长的细胞, 悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, $1 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后, 分别加入含不同浓度姜黄素的 RPMI1640 培养液 100 μl , 使姜黄素的终浓度为 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 和 160 $\mu\text{mol/L}$ 。同时设阴性对照组、空白对照组, 阴性对照组不加姜黄素只加培养液, 空白对照组不加细胞只加培养液, 每组设 3 个复孔, 培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl , 继续培养 4 h 后, 吸去上清液, 加入 150 μl DMSO 液, 震荡培养板 10 min, 用酶标仪检测 OD 值, 检测波长为 490 nm。细胞增殖抑制率(%)=[1-(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值-空白对照组 OD 值)] $\times 100$ 。

1.4 Annexin-FITC 标记法定量检测细胞凋亡

细胞用胰蛋白酶(0.25%)消化, 吹起后收集, 在 PBS 中清洗 1 次, 离心、1 000 r/min、10 min。离心后弃上清, 加入结合 buffer, 重悬细胞, 调整细胞数为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。取 195 μl 细胞重悬液, 加 5 μl Annexin-FITC, 室温下混合, 孵育 10 min。加入 200 μl 结合 buffer, 清洗细胞, 离心、1 000 r/min、10 min。离心后弃上清, 加入 190 μl 结合 buffer, 重悬细胞。加入 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 Propidium Iodide 10 μl 。用 FACScan 检测细胞膜外表面磷脂酰丝氨酸结合蛋白的表达及死亡细胞 DNA 含量。

1.5 琼脂糖凝胶电泳检测姜黄素对细胞 DNA 降解的影响

收集细胞 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$, 离心去上清, 细胞用 1~10 ml 冰冷的 PBS 重悬, 500-1 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 重复 1 次, 加入细胞裂解液 500 μl 重悬细胞, 50°C 水浴 3~5 h 震荡。13 000 r/min 离心, 吸取水相于另一离心管中, 加入 1/10 体积 3 mmol/L NaCl 和两倍体积乙醇混匀, 上下颠倒几次。12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀 DNA, 去上清, 70% 乙醇漂洗 1~2 次, 风扇吹干残存液体, 加入 50 μl 含 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A 的 TE 缓冲液, 65°C 30 min; 取 8 μl 加上样缓冲液上样, 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 采用 1~5 V/cm 电压降, 用凝胶成像系统观察和扫描成像。

1.6 Western blot 检测凋亡相关蛋白的变化和 A2

细胞凋亡相关蛋白

收集对照组与姜黄素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 处理 6, 12, 24, 48 h 的 A2 细胞, 经冰浴预冷的裂解液匀浆后, 于 4°C, 12 000 g 离心 10 min, 取少量上清测蛋白浓度, 定蛋白, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印, TBS 封闭, 转到 Survivin 一抗 4°C 过夜, 转到马抗羊 IgG (1:5 000) 的二抗中, 孵育 2 h。PBS 洗后的膜放在混合液中蛋白面向上, 室温下 1 min。用 ECL 化学发光检测, X 线片感光。

1.7 统计学分析

数据均计算成 $\bar{x} \pm s$, 采用单因素方差分析, 由 SPSS 10.0 分析软件进行统计分析。

2 结果

2.1 姜黄素处理 A2 细胞后 MTT 法检测结果

不同浓度姜黄素作用 A2 细胞 48 h 后, 各实验组姜黄素对 A2 细胞均有抑制作用, 与对照组相比均有显著性差别 ($P < 0.01$), 并随药物浓度的增加抑制率显著提高, IC_{50} 为 38.5 $\mu\text{mol/L}$ (以下实验均选用与 IC_{50} 接近的 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作为实验浓度)。结果见表 1 及图 1。

表 1 不同浓度姜黄素作用 A2 细胞 48 h 后 MTT 结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 MTT results after A2 cells were treated with different concentrations of curcumin for 48 hours($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	抑制率(%)
对照组	0.852 \pm 0.02	-
姜黄素组		
5 $\mu\text{mol/L}$	0.794 \pm 0.03	6.8 \pm 0.03
10 $\mu\text{mol/L}$	0.697 \pm 0.01 ¹⁾	18.1 \pm 0.01
20 $\mu\text{mol/L}$	0.539 \pm 0.02 ²⁾	36.7 \pm 0.02
40 $\mu\text{mol/L}$	0.356 \pm 0.02 ²⁾	58.1 \pm 0.02
80 $\mu\text{mol/L}$	0.159 \pm 0.01 ²⁾	81.3 \pm 0.01
160 $\mu\text{mol/L}$	0.016 \pm 0.01 ²⁾	98.1 \pm 0.01

注: 与对照组相比 1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$

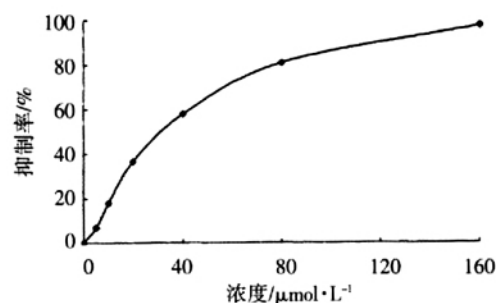


图 1 姜黄素对 A2 细胞增殖抑制作用的量效关系曲线
Fig.1 Dose-effect relationship between curcumin and proliferation of A2 cells

2.2 姜黄素处理 A2 细胞后的凋亡相关指标变化

当 40 μmol/L 姜黄素作用 24、48、72 h 时, 发生凋亡的细胞含量分别为 9.45%、16.89%和 21.05%。说明凋亡细胞数目随姜黄素作用时间的延长而增加, 与对照组 1.64%相比 P < 0.01, 见图 2~图 5。

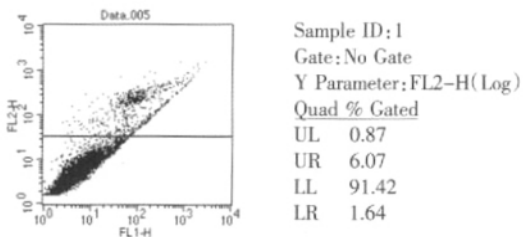


图 2 对照

Fig.2 Number of apoptotic cell in control group

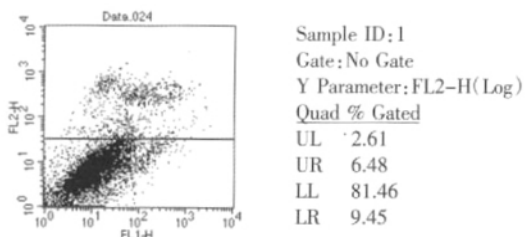


图 3 姜黄素作用 24h 凋亡细胞数

Fig.3 Number of apoptotic cell 24 hours after the administration of curcumin

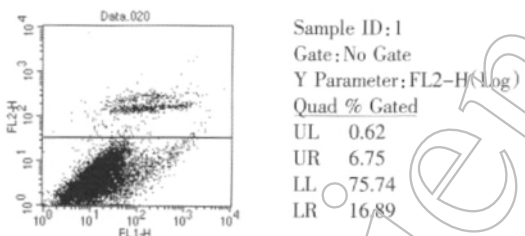


图 4 姜黄素作用 48h 凋亡细胞数

Fig.4 Number of apoptotic cell 48 hours after the administration of curcumin

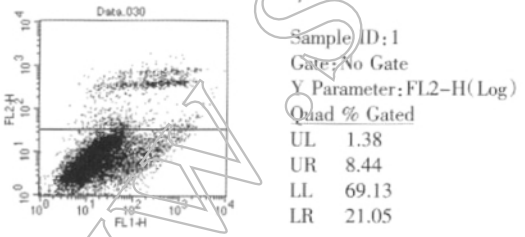


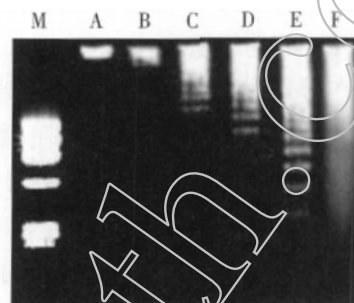
图 5 姜黄素作用 72h 凋亡细胞数

Fig.5 Number of apoptotic cell 72 hours after the administration of curcumin

2.3 DNA 琼脂糖电泳

分别收集姜黄素 40 μmol/L 作用 24、48、72 h 及正常对照组的细胞进行 DNA 琼脂糖电泳。48 h 凋亡细胞的 DNA 由于 DNA 降解成规则的大片段出现

凋亡特有的“梯状”条带, 72 h 细胞大多已经坏死, 坏死细胞由于其 DNA 的不规则降解显现一条连续的膜状条带。而正常活细胞 DNA 基因组条带由于分子量大、迁移距离短, 所以停留在加样孔附近, 见图 6。



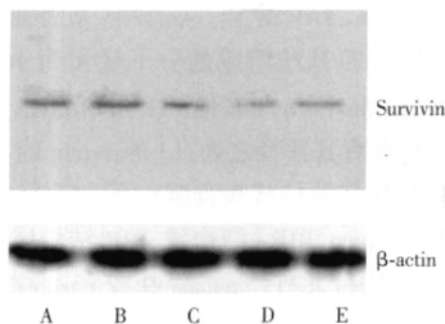
M:对照; A:正常细胞; B、C、D、E:凋亡细胞; F:坏死细胞

图 6 DNA 琼脂糖电泳

Fig.6 Agarose gel electrophoresis results

2.4 凋亡相关蛋白的检测

分别收集姜黄素 40 μmol/L 作用 6、12、24、48 h 及正常对照组的细胞, 提取总蛋白, 检测凋亡相关蛋白 Survivin 的表达。发现随时间的延长 Survivin 蛋白表达水平逐渐降低, 见图 7。蛋白含量由 6 h 的 (68±2.0) μg 降到 48 h 的 (29±3.0) μg, 与对照组 (126±2.0) μg 相比 P < 0.01, 见图 7。



A:对照; B-E:姜黄素作用 6、12、24、48 h

图 7 Western blot 检测 40 μmol/L 姜黄素作用肺癌 A2 细胞不同时间, 凋亡相关蛋白 Survivin 的检测

Fig.7 Expression of Survivin protein detected by Western blot after A2 cells were treated with 40 μmol/L curcumin

3 讨论

凋亡与坏死不同, 是生命自行结束的方式, 在机体中凋亡细胞最后可被吞噬细胞或临近细胞吞噬, 不会引起炎症反应。因此诱导肿瘤细胞凋亡而不大面积杀伤周围正常细胞, 对于化疗药物有着重要意义。近年来研究发现, 姜黄素在体内外均具有抑制肿瘤细胞增殖的作用。吴丽贤等^[2]发现姜黄素可特

异性地减少编码融合蛋白 P210bcr/abl 的含量,从而下调其激活的 Ras 信号途径,最终抑制 K562 细胞的增殖。吴勇等^[3]研究姜黄素对人类 Burkitt 淋巴瘤抗癌作用时发现,姜黄素能下调 B 细胞淋巴瘤患者腹水细胞 CA46 的 c-myc, bcl-2, 突变型 p53 蛋白和 mRNA 表达水平,上调 Fas 蛋白和 mRNA 的表达水平,从而抑制 CA46 的增殖。

PILLAI^[4]等通过对姜黄素诱导的肺癌细胞凋亡的研究中发现姜黄素均可引起 p53 基因缺陷型细胞及 p53 高表达细胞的凋亡,提示除 p53 途径外姜黄素还可通过 bcl-2, bax 信号途径引起肺癌细胞的凋亡,同时姜黄素还可上调 c-myc 基因的表达诱导肺癌细胞的凋亡。

本试验采用 MTT 法检测到各浓度的姜黄素对肺癌细胞的增殖抑制率,最小抑制率为 5 $\mu\text{mol/L}$ 组 [(6.8 \pm 0.03)%],最大抑制率为 160 $\mu\text{mol/L}$ 组 [(98.1 \pm 0.01)%],表明姜黄素可以显著抑制肺癌细胞的增殖,抑制作用呈浓度和时间依赖关系。姜黄素抑制肺癌细胞增殖的机制主要是诱导细胞凋亡,与 KUO 等^[5]的研究相一致。我们的实验首次发现姜黄素能诱导肺癌细胞发生凋亡的作用机制与下调 Survivin 蛋白的表达有关。Survivin 是一种新近发现的凋亡抑制蛋白,属于凋亡抑制蛋白 (inhibition of apoptosis protein, IAP) 家族。survivin 基因编码产生一个由 142 个氨基酸组成的分子量大约 16.2 kDa 的胞浆蛋白。Survivin 与其他 IAP 蛋白相比,它的结构与表达特点有其独特之处 (1)Survivin 的 N 端只有一个较为保守的杆状病毒凋亡蛋白重复区 (baculoviral IAP repeat, BIR) 结构域, BIR 结构域是直接对凋亡程序执行元件 - caspase-9 或 caspase-3、caspase-6 与 caspase-7 起始化事件或催化反应发挥抑制作用的主要基序 (motif) (2)Survivin 的 C 端则缺乏 Ring 锌指,依据 DIAP 分子缺失 Ring 的体外实

验,提示这可能与增强其凋亡抑制功能有关^[6,7]。研究证实 Survivin 的表达与 Bcl-2 密切相关, Survivin 与 Bcl-2 表达呈正相关, survivin 基因与 bcl-2 基因都是由无 TATA 的富含 GC 启动子调节的,转录激活均可增强细胞的增殖。从而推测 bcl-2 基因与 survivin 基因可能有共同的转录激活机制,两者协同发挥抗凋亡效应^[8]。本研究以姜黄素作用于 A2 细胞后,引起 Survivin 蛋白表达水平下降。分析其诱导凋亡机制,可能是抑制凋亡抑制蛋白 Survivin 的表达,进而抑制凋亡通路下游的效应 caspase-3 和 caspase-7 而发挥诱导凋亡的作用。

参考文献:

- [1] 麦镇江. 姜黄素的药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2004, 27(9): 698.
- [2] 吴丽贤, 许建华, 吴国华, 等. 姜黄素对 K562 细胞增殖的影响及其与 P210bcr/abl 激活的 Ras 信号途径的关系 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(1): 33-37.
- [3] 吴勇, 陈元仲, 许建华, 等. 姜黄素对人类 Burkitt 淋巴瘤抗癌作用的研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(4): 348-351.
- [4] GRADHAKRISHNAPILLAI ANANDSSRIVASTAVA TAREKJ HAS-SANEIN *et al.* Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin [J]. Cancer Lett, 2008(204): 163-170.
- [5] KUO ML, HANG TS, LIN JK. Curcumin an antioxidant and antitumor promoter induces apoptosis in human leukemia cells [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1317(2): 95.
- [6] LI F, AMBROSINI G, CHU EY *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving [J]. Nature, 1998, 396(6711): 580-584.
- [7] BUSH JA, CHEUNG KJ, LI GANG *et al.* Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53 [J]. Exp Cell Res, 2001, 271(2): 305-314.
- [8] AMBROSINI G, ADIDA C, SIRUGO G *et al.* Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by surviving gene targeting [J]. J Biol Chem, 1998, 273(18): 11177-11182.

(编辑 王涛)