

姜黄素对 Raji 细胞体外抗癌作用的实验研究

孙春艳 刘新月 陈燕 刘芳 王妍

摘要 目的 研究姜黄素对 Raji 细胞体外抗癌作用及其机制,对比研究其对 Raji 细胞和人单个核细胞的细胞毒性。方法 用 MTT 法检测姜黄素对 Raji 细胞及人单个核细胞增殖的影响,Annexin-V/PI 双标流式术、缺口末端标记法检测姜黄素对 Raji 细胞及人单个核细胞凋亡的影响,PI 单标流式细胞术测定姜黄素对 Raji 细胞 DNA 含量分布的影响。**结果** (1)姜黄素对 Raji 细胞具有明显的增殖抑制作用。(2)姜黄素可以时间和剂量依赖性方式诱导 Raji 细胞凋亡。(3)姜黄素组 Raji 细胞周期发生变化,细胞周期被阻滞于 G₀/G₁ 和 G₂/M 期,S 期比例减少。(4)姜黄素对人单个核细胞无明显抑制增殖和诱导凋亡作用。**结论** 姜黄素能够调控 Raji 细胞的细胞周期并诱导其凋亡,从而抑制 Raji 细胞增殖;姜黄素对人单个核细胞无明显细胞毒作用,而选择性作用于肿瘤细胞。

关键词 姜黄素;Raji 细胞;细胞凋亡;细胞周期

Experimental Study on Anticancer Effect of Curcumin on Raji Cells *in vitro* SUN Chun-yan, LIU Xin-yue, CHEN Yan, et al *Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430022)*

Objective To study the anticancer effect and mechanism of curcumin on Raji cells *in vitro* and compared the cytotoxicities of curcumin on Raji cells and normal human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). **Methods** The effects of curcumin on proliferation of Raji cells and human PBMC were tested by MTT assay, its effects on apoptosis of them were determined by Annexin-V/PI double-labeled cytometry and TUNEL, and its effects on DNA distribution in Raji cells was studied by PI single labeled cytometry. **Results** Curcumin showed marked inhibition on proliferation of Raji cell, could induce Raji cell apoptosis in time- and dose-dependent manner. After curcumin treatment, the cell cycle of Raji cells was blocked in G₀/G₁ and G₂/M phase and those in the S phase decreased proportionally. But curcumin showed no significant effect on inhibiting proliferation or inducing apoptosis on human PBMC. **Conclusion** Curcumin could regulate the cell cycle of Raji cells and induce its apoptosis, so as to inhibit its proliferation, but with no significant cytotoxicity on human PBMC. It selectively affects the tumor cell.

Key words curcumin; Raji cell; cell apoptosis; cell cycle

姜黄素(curcumin, diferuloylmethane)具有广泛的药用价值,包括抗炎、抗氧化、抗凝、抗人类免疫缺陷病毒、抗肿瘤、抗突变等。近年来对姜黄素抗肿瘤作用进行了大量研究,发现姜黄素对多种肿瘤具有明显的抑制作用^[1],但有关其对 B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤细胞及对人单个核细胞的作用尚未见报道。本实验采用 Raji 细胞探讨姜黄素对 B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤细胞生长和细胞周期的作用,并对比研究姜黄素对 Raji 细

胞和人单个核细胞的细胞毒性。

材料与方

1 细胞 人 B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤细胞系 Raji 细胞由本校免疫教研室提供。用含 10% 胎牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100 μ g/ml 的 RPMI-1640 常规 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,1~2 天传代 1 次,生长曲线测试倍增时间为(24 \pm 1)h。实验前 24h 半量换液,台盼蓝拒染法鉴定细胞活性在 98% 以上。单个核细胞来自正常人外周静脉血,肝素抗凝,经 Ficoll-Hypaque 梯度离心获得。

2 药物及试剂 姜黄素(分子式为 C₂₁H₂₀O₆,分子量为 368.4,纯度 99%),购自 Sigma 公司,溶解于二甲亚砜(DMSO)中,配成 8mmol/L 溶液,等量分装,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30271672)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所
(武汉 430022)

通讯作者:孙春艳;Tel:027-62766183;E-mail:ayan0618@163.com

com

置于 -20°C 保存, 临用前解冻。

3 细胞增殖测定 采用 MTT 法检测。将人单个核细胞(细胞终浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$)和处于对数生长期的 Raji 细胞($2 \times 10^5/\text{ml}$)接种于 96 孔板, 每孔 $200\mu\text{l}$, 经不同浓度姜黄素处理 24~72h 后, 加入 $5\text{mg}/\text{ml}$ MTT $20\mu\text{l}$, 继续孵育 4h, 弃去孔内培养液, 加入 $150\mu\text{l}$ DMSO, 振荡使结晶溶解后于 490nm 波长酶标仪测定各孔光密度(OD)值。增殖抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 OD 值} \div \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。

4 细胞凋亡测定 采用 Annexin-V/碘化丙啶(PI)双标流式凋亡检测, 试剂盒购自深圳晶美公司, 参照说明书进行操作。同步用 TDT 酶介导的缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡, 采用原位细胞凋亡检测, 试剂盒(购自武汉博士德公司)。细胞涂片经固定后, 依次加入封闭液、TUNEL 反应液、透化液、POD 转换液和 DAB 底物液, 光镜下观察, 计数并计算阳性率。

5 细胞周期分析 采用 DNA 倍体分析法检测。受姜黄素处理的细胞用 70% 冷乙醇固定 24h, PBS 缓冲液洗去固定液, $1\text{mg}/\text{ml}$ RNase 37°C 水浴 30min, 然后加入 PI 染色液, 4°C 避光 30min 后上机检测, 用 cell modifit 软件分析细胞周期, 流式细胞仪(BD 公司)CV 值纠正于 3% 以下。

6 统计学方法 数据用 SPSS 8.0 软件包进行 t 检验。

结 果

1 姜黄素对细胞增殖的影响 姜黄素对 Raji 细胞增殖抑制作用呈时效和量效关系, 作用 24h 时 IC_{50} 为 $(20.40 \pm 1.82)\mu\text{mol}/\text{L}$ (见图 1)。姜黄素对人单个核细胞无明显增殖抑制作用, 姜黄素作用 24h 对人单个核细胞的 IC_{50} 为 $(127.80 \pm 8.41)\mu\text{mol}/\text{L}$, 比对 Raji 的 IC_{50} 高 6.26 倍, 两者之间的差异有显著性($P < 0.01$, 见图 2)。

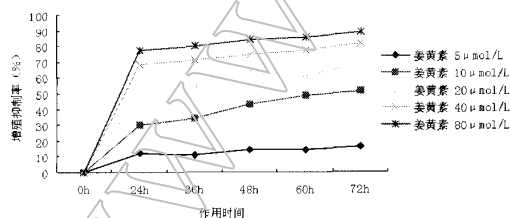


图 1 姜黄素对 Raji 细胞增殖抑制作用

2 姜黄素对细胞凋亡的影响 Annexin-V/PI 双标流式术检测姜黄素对细胞凋亡的作用(见表 1), 随着姜黄素浓度的增加, Raji 细胞凋亡率递增; 同步 TUNEL 实验也显示了相同的趋势。姜黄素对人单个

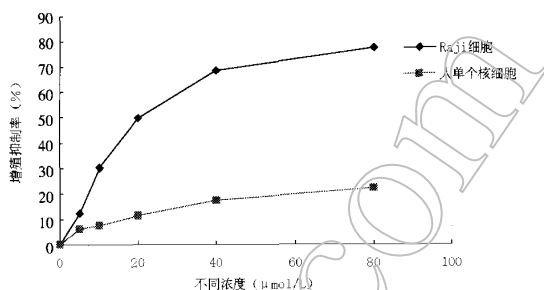


图 2 姜黄素对 Raji 和人单个核细胞抑制增殖作用的比较 核细胞的诱导凋亡率明显低于 Raji 细胞($P < 0.05$)。其中 $20\mu\text{mol}/\text{L}$ 姜黄素作用不同时间结果显示(见图 3), 姜黄素以时间依赖性方式诱导 Raji 细胞凋亡, 而作用时间短于 24h 时, 姜黄素对人单个核细胞无明显的诱导凋亡作用, 作用 24h 之后, 姜黄素对人单个核细胞的诱导凋亡率明显增高, 但仍明显低于 Raji 细胞对照组($P < 0.05$)。用末端 TDT 酶标技术测得的 TUNEL 阳性率与流式细胞术检测的细胞凋亡率呈现相似的变化趋势(结果具体数据略)。

表 1 两种方法对不同浓度的姜黄素诱导 Raji 细胞和人单个核细胞的凋亡情况(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Raji 细胞		人单个核细胞	
		流式术	TUNEL	流式术	TUNEL
对照	8	4.59 ± 0.28	3.80 ± 0.56	4.62 ± 0.32	3.25 ± 0.45
姜黄素 $5\mu\text{mol}/\text{L}$	5	8.44 ± 0.62	7.20 ± 0.81	5.43 ± 0.48	4.35 ± 0.52
$10\mu\text{mol}/\text{L}$	5	$18.03 \pm 1.02^*$	$16.57 \pm 2.34^*$	$5.89 \pm 0.51^{\Delta}$	$5.89 \pm 0.51^{\Delta}$
$15\mu\text{mol}/\text{L}$	5	$21.09 \pm 1.47^*$	$19.82 \pm 2.10^*$	$8.63 \pm 0.46^{\Delta}$	$7.98 \pm 0.89^{\Delta}$
$20\mu\text{mol}/\text{L}$	5	$37.04 \pm 2.98^{**}$	$34.10 \pm 3.21^{**}$	$11.85 \pm 1.82^{\Delta}$	$10.68 \pm 1.56^{\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Raji 细胞相同方法、相同剂量比较, $\Delta P < 0.05$

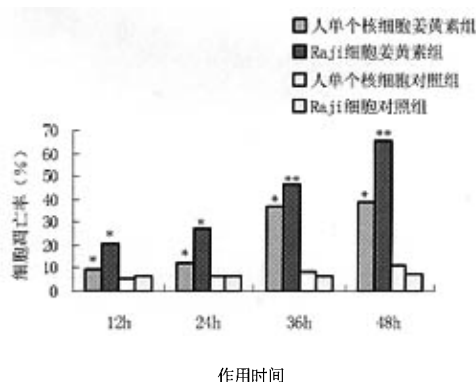


图 3 $20\mu\text{mol}/\text{L}$ 姜黄素对人单个核细胞和 Raji 细胞诱导凋亡作用的比较

注: 与相应的对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 姜黄素对细胞周期分布的影响 流式细胞仪分析不同条件下 Raji 细胞周期改变, 低浓度姜黄素($5, 10, 15, 20\mu\text{mol}/\text{L}$)主要使细胞积聚于 G_2/M 期, 同时 S 期细胞数减少; 而高浓度姜黄素($25\mu\text{mol}/\text{L}$)则主

要使细胞周期受抑于 G_1/G_0 期(见图 4)。同一浓度姜黄素作用不同时间段后,其细胞周期改变亦呈现此种趋势。姜黄素作用 12h 时表现为 G_2/M 期阻滞,24h 阻滞更为明显;随处理时间延长, G_2/M 期细胞数开始下降,而 G_1/G_0 期细胞数显著增加(见图 5)。

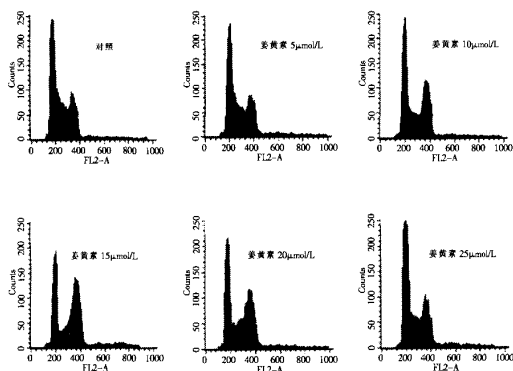


图 4 不同浓度姜黄素对 Raji 细胞周期的影响(每个实验均重复 5 次)

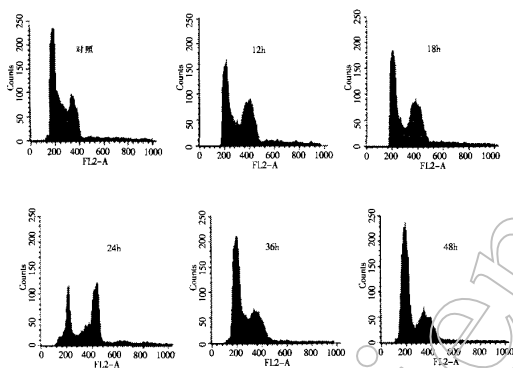


图 5 姜黄素(15 $\mu\text{mol/L}$)作用不同时间对 Raji 细胞周期的影响(每个实验均重复 5 次)

讨 论

姜黄素是从姜科植物的根茎姜黄中提取的一种植物多酚,广泛用作食品天然色素及染料,在印度和一些南亚国家被用作天然抗炎药物。姜黄素具有多种药理学作用,抗癌是其主要活性之一,实验证实其对肿瘤的起始、促进、发展三个阶段均有抑制作用^[1-3]。但是其对 B 细胞非霍奇氏淋巴瘤 Raji 细胞和人单个核细胞的作用至今尚无详细报道。本实验研究结果表明姜黄素能有效抑制 Raji 细胞增殖,其抗增殖作用与时间、剂量呈正相关。而本实验还发现 Raji 细胞比人单个核细胞对姜黄素诱导的增殖抑制作用要敏感得多,这与有关文献报道人类乳腺上皮细胞 MCF-10A 比多耐药乳腺癌细胞 MCF-7/TH 对姜黄素的细胞毒效应敏感性低相似^[4]。

流式细胞仪和 TUNEL 分析显示姜黄素以剂量和时间依赖方式诱导 Raji 细胞凋亡,但在明显诱导 Raji 细胞凋亡的浓度范围内姜黄素对人单个核细胞无明显诱导凋亡作用,与抑制增殖结果相符。另一方面,随着作用时间延长,姜黄素也可诱导人单个核细胞凋亡,但其凋亡率仍显著低于 Raji 组。姜黄素的这种对肿瘤细胞的选择性细胞毒作用对姜黄素的化学预防作用具有重要意义。以往的研究结果表明,姜黄素可诱导其他肿瘤细胞包括乳腺癌细胞和结肠癌细胞凋亡和生长抑制^[5,6]。这些结果显示姜黄素确实可通过诱导肿瘤细胞凋亡而有效抑制细胞增殖。然而,其诱导肿瘤细胞凋亡的机制尚未完全明了。

研究进展表明肿瘤细胞之所以无限制增殖是因为监测细胞内基因缺陷的监测点功能丧失及细胞周期紊乱,细胞周期的失控在肿瘤发病中处于极其重要的环节;细胞的增殖、凋亡、分化、衰老均是细胞周期依赖性的。因此,选择能同时破坏细胞并引起凋亡的药物,以调节细胞周期为策略将是今后抗肿瘤治疗的新途径^[7]。因而我们用 PI 标记流式细胞仪分析对姜黄素作用后的 Raji 细胞进行了 DNA 含量分析,结果发现最早受影响的细胞群为 G_2/M 期细胞,12h 后此期细胞增多,24h 时达峰值,显示姜黄素具有调控 G_2/M 期监测点的能力。姜黄素作用 36h 后, G_0/G_1 期细胞数量增加,S 期细胞减少,表明姜黄素同时具有调节 G_1/S 期监测点的能力。姜黄素使细胞周期阻滞将有利于肿瘤的放、化疗,并已从姜黄素联合化疗药增强对肿瘤细胞抑制作用的研究中得到证实^[8]。

恶性淋巴瘤中 B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤占大多数,传统的化疗其长期存活率不到 50%, α -IFN 为治疗淋巴瘤的新药,其与传统化疗药物联用已取得一定成效,但其长期作用效果尚未明确。姜黄素由于其来源广泛,价格低廉,同时对正常细胞无明显毒性,有望为恶性淋巴瘤的治疗提供新的策略。总之,我们的实验表明,姜黄素可有效抑制 Raji 细胞增殖,其机制可能为调控细胞周期进程而诱导肿瘤细胞凋亡。姜黄素也可抑制人单个核细胞的生长,但其作用明显低于对 Raji 细胞的作用。姜黄素的这种对肿瘤细胞的选择性杀伤作用,提示其可能成为 B 细胞淋巴瘤治疗的一种新型的靶向型的药物。

参 考 文 献

- 1 孙春艳,刘新月,陈燕. 姜黄素抗肿瘤机理研究新进展. 国外医学肿瘤学分册 2003; 30(6):356-358.
Sun CY, Liu XY, Chen Y. Recent advances in anti-tumor

- mechanisms of curcumin. *Fon Med Sci: Cancer Section* 2003; 30(6):356—358.
- 2 Inano H, Onoda M, Inafuku N, et al. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 2000; 21(10):1835—1841.
 - 3 Conney AH, Lysz T, Ferrar T, et al. Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Adv Enzyme Regul* 1991; 31: 385—396.
 - 4 Cheppail R, Wei Y. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 54(3):269—278.
 - 5 Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, et al. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(55):8414—8427.
 - 6 Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett* 2002; 512(1—3):334—340.
 - 7 Blagosklonny MV, Pardee AB. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res* 2001; 61(11):4301—4305.
 - 8 Hour TC, Chen J, Huang CY, et al. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents—NF-kappaB activation. *Prostate* 2002; 51(3):211—218.
- (收稿:2003-12-20 修回:2004-07-20)

· 病例报告 ·

中西医结合治疗巨大肝脓肿 6 例

郭盖章

1998 年 1 月—2004 年 5 月笔者采用中西医结合方法治愈巨大肝脓肿 6 例,取得较好的疗效,现将其中 1 例典型病例介绍如下。

典型病例

患者洪某,男,44 岁,住院号:204379。因右上腹胀痛,伴畏寒、高热、黄疸 7 天,于 2004 年 3 月 16 日拟“肝内胆管结石伴感染”入院。患者既往有肝内胆管结石,先后于 2000 年 8 月和 2002 年 12 月行胆囊切除术和胆总管空肠 Roux-en-Y 吻合术。体格检查:体温 40.2℃,呼吸急促(26 次/min),心率 124 次/min,巩膜及皮肤轻度黄染,右上腹见手术疤痕,右上腹压痛及肝区叩击痛,右下肺呼吸音低及叩之浊音;血常规检查 WBC $20.3 \times 10^9/L$;B 超检查示肝右前叶有一约 10cm × 12cm 液性暗区,估计脓液 500ml,左右肝管汇合部以上有一约 3cm × 3cm 大小中等偏强回声团块,诊断为“肝脓肿、肝内胆管结石”。劝其手术引流,患者因多次手术而拒绝手术治疗,故于当日下午 4 时在 B 超引导下行穿刺抽出稠厚黄色脓液 460ml,给予补液及大量抗生素(凯福隆、瑞特安、替硝唑等)应用,患者一直处于高热,全身消耗严重,又经过前后 13 次在 B 超引导下的脓腔穿刺,虽中毒症状明显减轻,但仍有低热、食欲不振、全身衰竭、尿黄,且 9 日未排大便,此时给予五味消毒饮加二陈汤(鱼腥草、金银花、紫花地丁、蒲公英、天葵子、茯苓、法半夏、陈皮、车前子、牡丹皮、白芍、甘草),重用鱼腥草 30~50g,大黄 20g(后下)以清热解毒、排脓去湿,2 周后病情明显好转,由于经费限制,要求出院后每周来院复查 1 次;根据病情以上药为主加减连服 30 剂,于 2004 年 5 月 18 日复查 B 超示肝脓肿基本消失,一般状

况良好,能从事轻微体力劳动。

讨 论 本病发病急,表现为肝功能的严重损害和全身中毒症状,多出现全身炎性反应综合征(SIRS)。笔者治疗 6 例中 4 例预先有手术史粘连中 2 例行手术引流,增加了再手术的难度和由此而带来的严重并发症。本法在 B 超引导下多次穿刺抽脓和中医辨证论治治疗,损伤轻,减少或避免大剂量抗生素应用。本病由于久病必虚、久热伤阴,津液耗损,中焦湿热导致食欲不振,腹胀,二便不畅;脓液排出引起蛋白质大量的丢失,全身免疫功能及抗感染能力低下,抗生素的长期大量应用又造成肠道细菌的移位而发生菌群失调,依靠周围血管补液静脉营养或完全胃肠道外营养费用高,一般患者难以承受。中医学认为脾胃为后天之本,肝脓肿为毒素入血,采用五味消毒饮(金银花、蒲公英、紫花地丁、天葵子、牡丹皮)和二陈汤(茯苓、陈皮、法半夏、白芍、甘草)以清热解毒、消肿排脓、健脾和胃、化痰等。在上药的基础上,全部病例均以鱼腥草为主加入适量大黄,如对虚中夹实多日未排便的典型病例将大黄用至 20g,使中毒症状明显改善,体温正常,食欲增加。由于肝脓肿之毒素可引起胃肠道黏膜充血水肿,肠蠕动功能减弱以及肠腔内的有毒物质的刺激造成腹胀、纳差、低热、全身不适甚或发生应激性溃疡大出血等。应用清热解毒、化痰排脓之剂加大黄,能够明显促进胃肠蠕动,减轻腹胀,改善心肺功能,清除肠源性内毒素和氧自由基,从而对肠道的机械屏障,免疫屏障和生物屏障起到一定的保护作用。辅助中药治疗肝脓肿可减轻患者痛苦,提高疗效,缩短住院期和降低费用,特别对病情后期,采用攻补兼施,滋阴清热,佐以健脾和胃等中药治疗,不失为促进肝脓肿患者早日康复的有效方法。

作者单位:皖南医学院第二附属医院(安徽省芜湖市 241000)

(收稿:2004-07-05 修回:2004-08-15)

Tel:0553-2871923