

姜黄素诱导人卵巢癌细胞株 A2780 凋亡及其分子机制的研究

郑丽端^{1*}, 童强松², 吴翠环³

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院病理科, 湖北 武汉 430022;

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院小儿外科, 湖北 武汉 430022;

3. 华中科技大学同济医学院病理教研室, 湖北 武汉 430030)

【摘要】背景与目的:姜黄素(curcumin)是传统中药姜黄的主要有效成分,其选择性抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡作用日益成为研究的焦点,但其中所涉及的机制仍然不十分明确。本研究旨在探讨姜黄素对人卵巢癌细胞株 A2780 的诱导凋亡效应及其分子机制。方法:10~50 μmol/L 姜黄素分别处理 A2780 细胞 6~24 h 后,MTT 法检测癌细胞的生长活性;流式细胞仪(FCM)和吖啶橙-溴化乙锭荧光染色法检测细胞凋亡;SP 免疫组化法检测细胞内 NF-κB 蛋白(P65) caspase-3 蛋白表达水平。结果:各浓度姜黄素对癌细胞生长抑制率为 62.05%~89.24%,DNA 直方图上可见亚“G₁”峰;荧光显微镜下部分细胞发生凋亡形态学改变,凋亡率为 21.5%~33.5%。NF-κB(P65)表达减弱、caspase-3 表达增强,并呈时间依赖性。结论:姜黄素能显著抑制卵巢癌细胞的体外生长;上调 caspase-3、下调 NF-κB 蛋白表达,诱导细胞凋亡可能是其作用机制之一。

关键词:姜黄素;卵巢癌;NF-κB 基因;caspase-3 基因;凋亡

中图分类号:R737.31;R73-36

文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2002)12-1296-05

Inhibitory Effects of Curcumin on Apoptosis of Human Ovary Cancer Cell Line A2780 and Its Molecular Mechanism

ZHENG Li-duan^{1*}, TONG Qiang-song², WU Cui-huan³

1. Department of Pathology, Union Hospital of Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, P. R. China

2. Department of Pediatric Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, P. R. China

3. Department of Pathology, Tongji Medical Collage, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, P. R. China

【Abstract】 **Background & Objective:** Curcumin is the major effective component of curcuma, which is a kind of traditional Chinese medicine. It has been paid more attention to curcumin recently for its specific proliferation inhibition and apoptosis inducing effects on tumor cells; however, the involved mechanisms were not clear. This study was designed to explore the apoptosis inducing effects of curcumin on human ovary A2780 cell line and its related molecular mechanisms.

Methods: A2780 cancer cells were treated with 10~50 μmol/L curcumin for 6~24 h and the growth inhibition rates of A2780 cancer cells were measured by MTT method. Cell apoptosis was inspected by flow cytometry (FCM) and acridine orange-ethidium bromide fluorescent staining method. The protein levels of NF-κB(P65) and Caspase-3 in cancer cells were

observed by SP immunohistochemistry. **Results:** The growth inhibition rates of the cancer cells reached 62.05%~89.24%, with the peak of sub G₁ appeared on DNA histogram in FCM. Partial cells presented the characteristic morphological changes of

收稿日期 2002-07-21; 修回日期 2002-08-28

* 通讯作者: Tel 86-27-85726129

E-mail: ld_zheng@hotmail.com

apoptosis under the fluorescent microscope; the apoptosis rates were 21.5% ~ 33.5%. The NF- κ B (p65) expression was decreased while Caspase-3 expression was increased, which depended on the action time. **Conclusions:** Curcumin could significantly inhibit the growth of ovary cancer cells; inducing apoptosis through up-regulating Caspase-3 and down-regulating expression of NF- κ B was probably one of its molecular mechanisms.

Keywords: Curcumin; Ovary cancer; NF- κ B gene; Caspase-3 gene; Apoptosis

姜黄 (curcuma) 是一种传统中药,广泛用于食品上色和调味。姜黄素 (curcumin) 是从姜黄中提取的酚性色素,是姜黄的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化、抗凝、降血脂及抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等作用,尤其作为一种具有良好发展前景的抗癌药物,日益引起人们的关注,成为研究的热点^[1]。最近研究表明,姜黄素能选择性地抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡,但其中所涉及的机制仍然不十分明确^[2]。本研究探讨姜黄素诱导卵巢癌细胞株 A2780 凋亡效应及其对 NF- κ B(核转录因子- κ B)、caspase-3(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶)蛋白表达的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人卵巢癌细胞株 A2780 由中国医学科学院肿瘤医院研究所提供。在含有 10% 小牛血清、青霉素 100 u/ml 及链霉素 100 μ g/ml 的 RPMI-1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。

1.2 细胞体外生长活性检测

采用 MTT(四甲基偶氮唑盐, 购自 Clontech 公司) 比色分析法检测 10 ~ 50 μ mol/L 姜黄素(购自 Sigma 公司) 分别作用于 A2780 细胞 6、12、18、24h 后的吸光度(A)值。癌细胞生长抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) \times 100%。

1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

姜黄素处理的 A2780 细胞用 70% 乙醇 - 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h, PBS 缓冲液洗去固定液, 用缓冲液 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 抽取小分子 DNA, 然后加入碘化丙啶(购自 Clontech 公司) 染色液, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 20 min 后上机检测, 流式细胞仪变异系数纠正于 3% 以下; 检测对照组及各浓度姜黄素作用 12 h 后 A2780 细胞“亚 G₁”凋亡峰。

1.4 吖啶橙 - 溴化乙啶荧光染色法检测细胞凋亡率

参照文献^[3]进行。荧光显微镜下观察并计数对照组及各浓度姜黄素处理 12h 后活细胞(VN)、早期凋亡细胞(VA)、非凋亡的死细胞(NVN)、晚期凋亡细胞(NVA) 数目。细胞凋亡率 = (VA + NVA) / (VN + NVN + VA + NVA) \times 100%。

1.5 NF- κ B、caspase-3 蛋白水平的检测

采用免疫组化 SP 法。按照试剂盒说明书操作: 经各浓度姜黄素处理不同时间段的癌细胞制成细胞爬片, 丙酮固定, 正常血清封闭后分别加入鼠抗人 NF- κ B (P65) 和 caspase-3 单克隆抗体(均购自北京中山生物技术有限公司), 随后加入生物素化山羊抗小鼠抗体及 SABC 液, 经 DAB 显色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判断: 光学显微镜下, NF- κ B 和 caspase-3 表达阳性细胞的胞浆内呈现特异性棕褐色。阳性表达率 = (500 个细胞内阳性细胞数 / 500) \times 100%。

1.6 统计学方法

采用 *t* 检验和方差分析。

2 结果

2.1 姜黄素对 A2780 细胞的抑制作用

对照组 A2780 细胞体外生长活跃, 经 10、20、30、40、50 μ mol/L 的姜黄素处理 6 ~ 24 h 后, A2780 细胞生长均不同程度地减慢, 并呈时间、浓度依赖性。与对照组相比, 各浓度姜黄素作用 24 h 后 A2780 细胞生长抑制率在 62.05% ~ 89.24% 之间, 不同浓度姜黄素与不同时间组之间均有显著性差异 ($P < 0.01$), 见图 1。

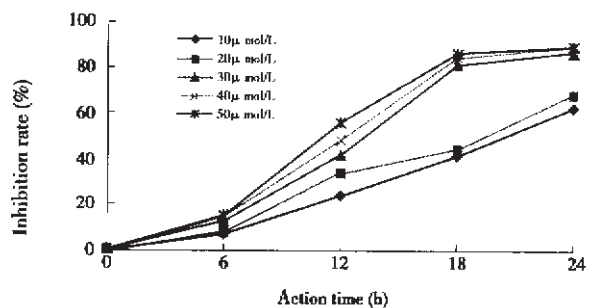


图 1 不同浓度姜黄素对 A2780 细胞生长的抑制作用

Fig. 1 The growth inhibition effects of various concentration of curcumin on A2780 cells

2.2 姜黄素诱导 A2780 细胞凋亡的动态变化

A2780 细胞经 10 ~ 50 μ mol/L 姜黄素分别作用 12 h 后, 在 DNA 直方图上可见明显的“亚 G₁”期凋亡峰, 峰值大小随药物浓度增加而递增, 见图 2。

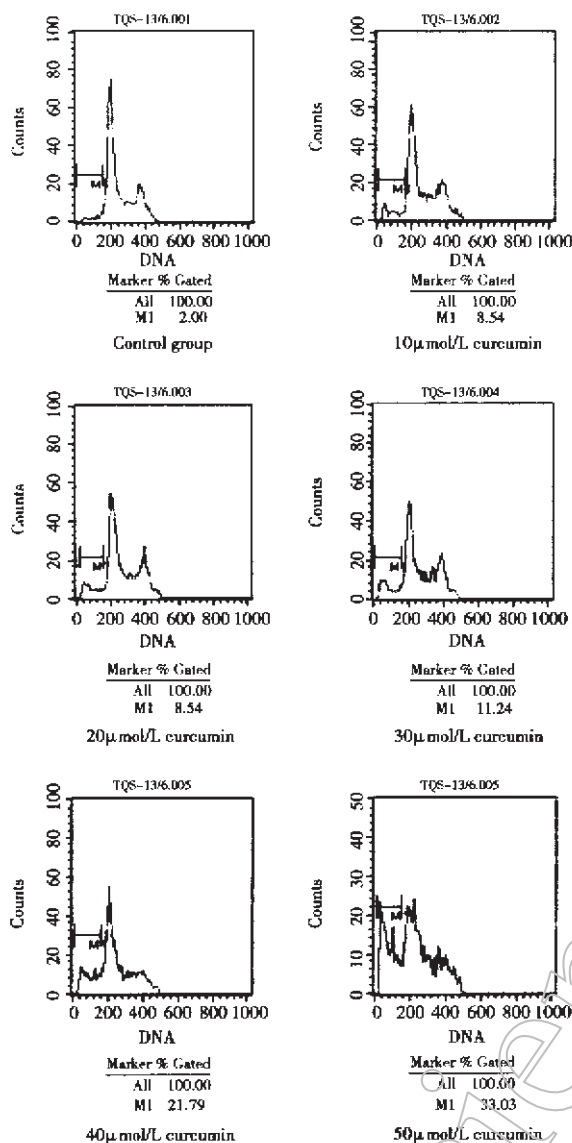


图2 流式细胞仪检测不同浓度姜黄素对 A2780 细胞的诱导凋亡作用

Fig. 2 The inducing apoptosis effects of various concentrations of curcumin on A2780 cells detected by flow cytometry

2.3 细胞凋亡率与药物浓度的关系

在荧光显微镜下, 早期凋亡细胞 (VA) 胞核呈固缩状的绿色荧光, 晚期凋亡细胞 (NVA) 胞核呈固缩状的桔红色荧光, 活细胞 (VN) 胞核结构正常、着绿色荧光, 非凋亡的死细胞 (NVN) 胞核着桔红色并呈正常结构, 见图 3。依据上述判断标准, 镜下计数并计算对照组及各浓度姜黄素处理组细胞凋亡率分别为 6.5%、21.5%、25.5%、28.5%、31.0%、33.5%, 见表 1。统计学分析表明, 各浓度姜黄素处理组细胞凋亡率与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.4 姜黄素对 NF- κ B、caspase-3 蛋白表达的影响

姜黄素作用 12 h 后, 细胞爬片上卵巢癌细胞中

NF- κ B 蛋白 (P65) 表达下调, caspase-3 上调, 并呈时间和浓度依赖性。各处理组 NF- κ B (P65)、caspase-3 表达率与对照组比较均有显著差异 ($P < 0.05$), 见图 4A ~ D 和表 2。

表 1 各浓度姜黄素作用 12h 后 A2780 细胞凋亡检测

Tab.1 Apoptosis of A2780 Cells Detected by Acridine Orange-Ethidium Bromide Fluorescent Staining after Treated with Various Concentration of Curcumin for 12h

Group	Cell number				Summation	Apoptosis rate (%)
	VA	NVA	NV	NVN		
Control group	8	5	179	8	200	6.5
10 μ mol/L curcumin	12	31	140	17	200	21.5*
20 μ mol/L curcumin	17	34	138	11	200	25.5*
30 μ mol/L curcumin	19	38	129	14	200	28.5*
40 μ mol/L curcumin	21	41	126	12	200	31.0*
50 μ mol/L curcumin	24	43	122	11	200	33.5*

* $P < 0.05$ compared with control group

表 2 免疫组化检测各浓度姜黄素对 NF- κ B、caspase-3 表达率 [$\bar{x} \pm s$] (%) 的影响

Tab.2 Effects of Curcumin in Various Concentration to NF- κ B, Caspase-3 Expression [$\bar{x} \pm s$] (%) Detected by SP Immunohistochemistry

Group	Number of tests	NF- κ B	Caspase-3
Control group	5	75.0 \pm 2.45	5.9 \pm 0.79
10 μ mol/L curcumin	3	55.0 \pm 5.57*	15.6 \pm 1.78*
20 μ mol/L curcumin	3	51.3 \pm 3.53*	18.8 \pm 3.75*
30 μ mol/L curcumin	3	46.0 \pm 3.00*	21.5 \pm 3.97*
40 μ mol/L curcumin	3	44.1 \pm 1.01*	31.3 \pm 3.21*
50 μ mol/L curcumin	3	31.3 \pm 1.53*	37.5 \pm 2.18*

* $P < 0.01$ compared with control group

3 讨论

姜黄类作为一种调味品和色素, 广泛用于咖喱、芥类、马铃薯条及化妆品中, 同时又是一种用于治疗各种炎症 (如肝炎) 的传统中药。姜黄素作为姜黄的主要有效成分, 具有多方面的药理作用, 尤其是作为一种具有良好发展前景的抗癌药物, 具有抗癌谱广、毒副作用小的优点, 最近被肿瘤学家们认为是一种潜在的第三代抗肿瘤药^[4], 但其作用机制仍不确切。有体外研究表明^[5], 姜黄素抑制癌细胞增殖和诱导凋亡是通过多条通路和调节多种肿瘤表面标记因子实现的, 而且其作用靶点可以从 DNA、mRNA 到蛋白水平。本研究探讨了 NF- κ B 和 caspase-3 这两个与细胞凋亡信号转导有关的关键性分子是否参与姜黄素的诱导凋亡作用。

我们的研究显示, 姜黄素能诱导人卵巢癌

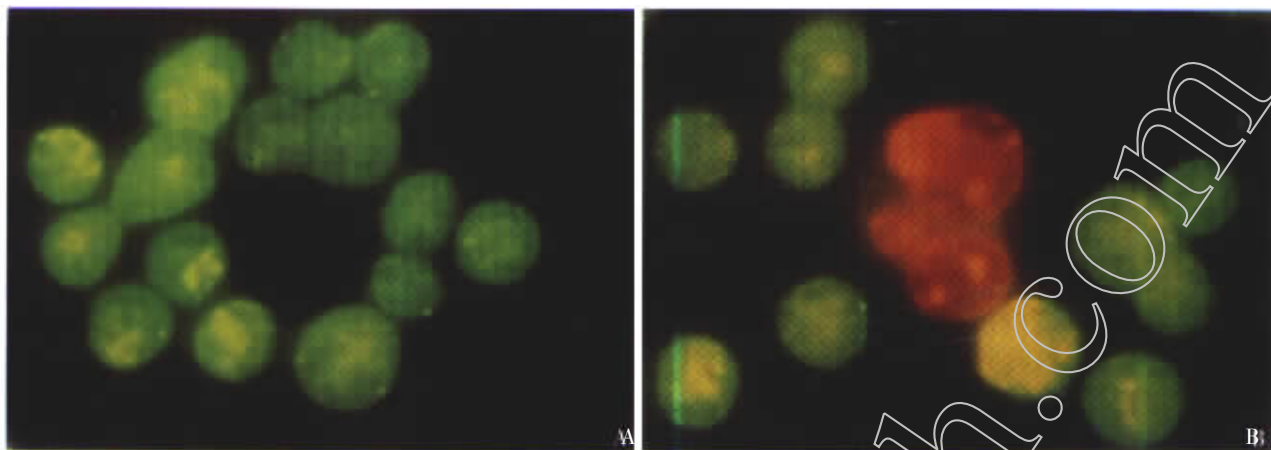


图 3 吖啶橙 - 溴化乙啶荧光染色法检测 A2780 细胞凋亡

Fig. 3 The apoptosis of A2780 cells were observed by acridine orange-ethidium bromide fluorescent staining

A: control group; B: treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin for 12 h

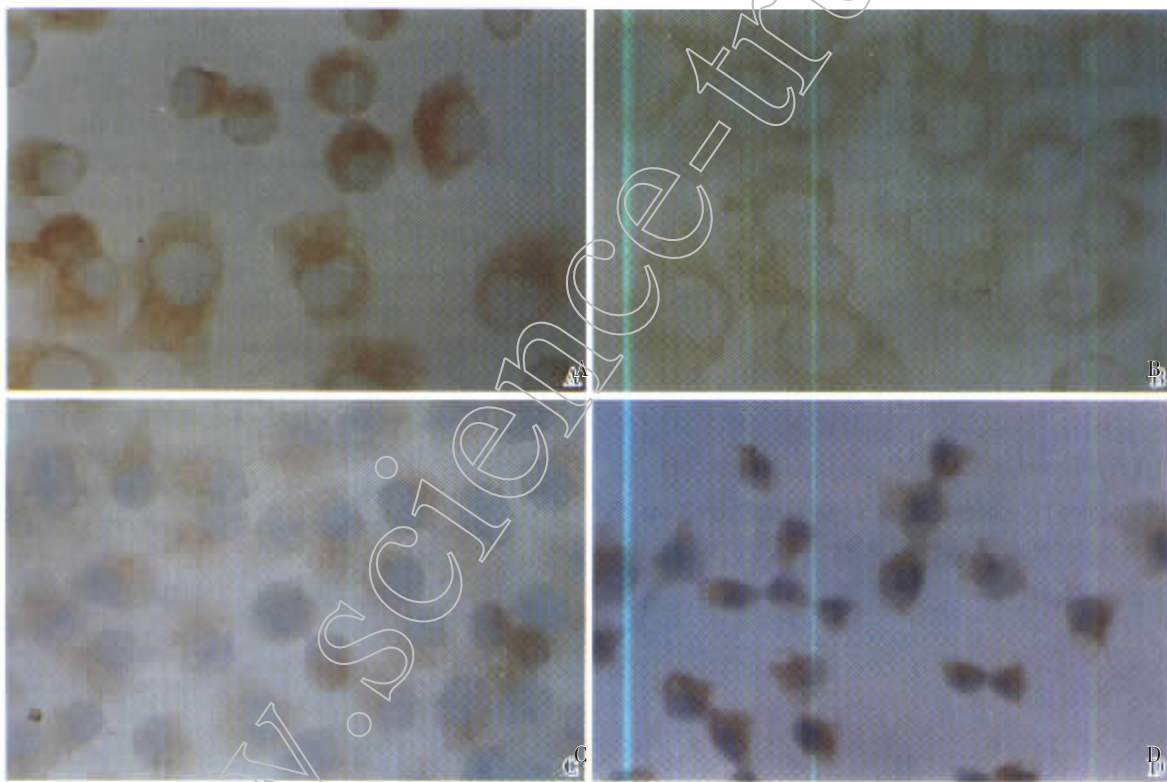


图 4 免疫组化 SP 法检测卵巢癌 A2780 细胞中 NF- κ B 和 caspase-3 蛋白表达 ($\times 400$)

Fig. 4 NF- κ B protein expression and caspase-3 protein expression in human ovary cancer cells A2780 detected by SP immunohistochemistry ($\times 400$)

A: In control group, a number of brown granules in cytoplasm demonstrated strong NF- κ B expression

B: After treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ curcumin for 12h, much less brown granules in cytoplasm demonstrated weak NF- κ B expressoin

C: In control group, caspase-3 expression in cytoplasm was weak

D: After treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ curcumin for 12h, caspase-3 expressoin was much stronger in cytoplasm

A2780 细胞凋亡: (1) MTT 和吖啶橙 - 溴化乙啶荧光染色法检测结果证实了姜黄素抑制 A2780 细胞生长和诱导凋亡效应, 姜黄素处理后卵巢癌细胞凋亡增多, 细胞凋亡率随时间延长而增加。 (2) 姜黄素作用

12 h 后, A2780 细胞在 DNA 直方图上出现明显的凋亡峰。

用不同浓度的姜黄素作用于 A2780 细胞爬片 12 h 后, NF- κ B 蛋白(P65)表达均有下调, 而姜黄素

对 caspase-3 蛋白表达则有上调作用, 并呈浓度依赖性。结合文献, 这一结果提示: ① caspase 家族是 Fas/Apo-1 介导的凋亡信号转导途径的关键效应分子^[6], 通过靠近天冬氨酸残基位置的切割效应, 使得 caspases 家族成员以类似于酶原激活的方式相互激活, 并形成级联放大效应。而 caspase-3 是在级联下游操作底物酶切的重要效应性 caspase, 是目前已知与凋亡关系最密切的 caspases 家族成员之一。Caspase-3 通过激活 DNase、酶切 PARP 片段化、降解细胞骨架蛋白及一些癌蛋白等机制^[7], 使细胞赖以生存的关键物质不可逆性破坏, 最终导致细胞凋亡。姜黄素能激活凋亡效应分子 caspase-3 的表达升高, 具有诱导人卵巢癌细胞株 A2780 凋亡的作用。

② NF- κ B 参与许多因子(细胞因子, 粘附因子, 生长因子等)和基因的转录调控, 与免疫反应、炎症、肿瘤形成等都有着密切的关系, 而这些因子(TNF- α , GM-CSF, ICAM-1, PDGF 等)在许多疾病中表达水平明显增高。姜黄素抑制 NF- κ B 的表达可导致体内许多细胞增殖关键性基因转录降低, 考虑是其诱导卵巢癌细胞凋亡的分子机制之一。③此外, 研究显示^[8, 9], NF- κ B 与凋亡信号转导通路中 caspase-8、caspase-3 等蛋白分子间关系密切: 它位于凋亡信号转导的最早期, 首先作用于 caspase-8 分子, 抑制其活性, 从而阻断 caspase-3 等一系列下游 caspase 激活的级联反应。本研究中, 姜黄素抑制了 NF- κ B 蛋白(P65)的表达, 可能因此对 caspase 早期凋亡通路起了负调控作用。④另外, 有研究表明^[10]抑制 NF- κ B 的活性将增强肿瘤细胞对放射线和化疗药物的敏感性, 可增强 TNF 等化学制剂诱导的细胞凋亡效应。那么, 姜黄素与 TNF 联用是否有协同作用, 进一步的观察研究正在进行中。

随着研究的深入, 我们相信姜黄素作为一种传统中药, 必将展现其广阔的应用新前景。

[参 考 文 献]

- [1] Lin JK, Pan MH, Lin-Shiau SY. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin [J]. *Biofactors*. 2000, 13(1-4): 153-158.
- [2] Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice [J]. *J Cell Biochem Suppl*, 1997, 27: 26-34.
- [3] Duke RC, Cohen JJ. Morphological and biological assays of apoptosis [J]. *Curr Prot Immunol*, 1992, 1: 3-17.
- [4] Lin JK, Jin-shiau SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin [J]. *Proc Natl Sci Counc ROC(B)*, 2001, 25(2): 59-66.
- [5] Lin JK, Lin-shiau SY. Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Curcumin [J]. *Proc Natl Sci Counc ROC(B)*, 2001, 25(2): 59-66.
- [6] 熊世勤, 朱锡华. Caspases 家族与 Fas/Apo-1 介导凋亡的信号传导 [J]. *免疫学杂志*, 1999, 15(3): 212-216.
- [7] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD [J]. *Nature*, 1998, 391: 43-50.
- [8] Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, et al. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation [J]. *Science*, 1998, 281(5383): 1680-1683.
- [9] 刘冰熔. 核转录因子 NF- κ B- 肿瘤基因治疗的新焦点 [J]. *国外医学免疫学分册*, 2001, 24(3): 129-132.
- [10] Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death [J]. *Science*, 1996, 274: 782-784.

[编辑 张 菊 校对 钟均行]