

· 论 著 ·

姜黄素单体影响肝癌 BEL-7402 细胞凋亡及其周期蛋白 D 表达的研究

宛传丹¹, 温占朝², 顾勇劲²

(1. 江苏省常熟市医学检验所 215500; 2. 江苏省常熟市第二人民医院 215500)

摘要:目的 采用细胞学实验观察 3 种姜黄素单体对肝癌细胞株 BEL-7402 的抑制增殖及诱导细胞凋亡的作用强度和机制。方法 以四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Annexin V-FITC 双标记及流式细胞术(FCM)实验观察 3 种姜黄素对肝癌细胞株 BEL-7402 增殖的抑制作用与细胞周期变化,采用 Western blot 实验分析 3 种姜黄素对肝癌细胞株 BEL-7402 细胞周期蛋白 D 表达的影响。结果 (1)3 种姜黄素均可通过诱导肝癌细胞凋亡而有效抑制肝癌细胞生长增殖,存在时间与剂量效应,以姜黄素Ⅲ抑制效果最强。(2)3 种姜黄素通过影响细胞周期生长的调控信号、降低细胞周期蛋白 D 表达量致使肝癌细胞停滞于 G₁/S 期。结论 3 种姜黄素均可通过抑制肝癌细胞周期蛋白 D 表达而诱导细胞凋亡,有效地抑制肝癌细胞生长增殖,具有很高的临床治疗价值。

关键词:姜黄素;肝肿瘤;细胞凋亡;细胞周期蛋白 D

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.23.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)23-2300-03

Effects of curcumins on cyclin D expression and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cellsWan Chuandan¹, Wen Zhanchao², Gu Yongjin²

(1. Changshu Medical Testing Center, Changshu, Jiangsu 215500, China; 2. Changshu No. 2 People's Hospital, Changshu, Jiangsu 215500, China)

Abstract: Objective To study the effects of three kinds of curcumins on proliferation inhibition and apoptosis induction of the cell line of human hepatoma BEL-7402 and to elucidate their possible molecular mechanism. **Methods** The inhibiting ratio of 3 curcumins in different concentrations were determined by MTT assay at different times. Apoptosis was evaluated by agarose gel electrophoresis and Annexin V-FITC double pigmentation method. The cell cycle was detected by FCM. Western blot method were used to analysis the expression of cyclin D protein. **Results** (1) Three curcumins could obviously suppress BEL-7402 cell proliferation in time- and dose-dependent manner, and curcumin III was the best. (2) Three curcumins induced BEL-7402 cancer cell to apoptosis by decreasing cyclin D expression and stopping the cancer cells in G₁/S period. **Conclusion** Curcumins suppress the cancer cell BEL-7402 proliferation and induce its apoptosis through changing cyclin D expression, showing great values in human hepatoma therapy.

Key words: curcumin; liver neoplasms; apoptosis; cyclin D

姜黄素主要来源于姜黄、郁金、莪术、菖蒲等中药材的根茎,是一类多酚性色素,主要含有 3 种成分:姜黄素 I (77%);姜黄素 II,即脱甲氧基姜黄素(17%);姜黄素 III,即双脱甲氧基姜黄素(3%)。其中姜黄素 III 含量较少,不易分离及提纯。目前对姜黄素的研究绝大多数是以姜黄素的混合物或其中的姜黄素 I 为对象^[1]。

自从 1995 年印度的 Menon 等^[2]首次提出姜黄素抗肿瘤的可能性,随后的研究陆续证实了姜黄素的抗癌作用。众多研究显示姜黄素具有广泛的药理作用:如抗氧化、抗凝、抗人类免疫缺陷病毒、抗菌、解痉、抗肿瘤、抗突变、抗动脉粥样硬化、降血脂等作用,且具有安全、无明显不良反应的特点^[3-7]。有研究表明姜黄素对多种肿瘤化疗药物有明显的增强效果^[8]。本组采用体外细胞培养实验分别观察姜黄素的 3 种单体成分对肝癌细胞增殖抑制及诱导细胞凋亡的作用,旨在探讨姜黄素 3 种单体成分抗癌作用机制与强度,为进一步开发利用姜黄素的临床应用提供依据。

1 材料与方

1.1 细胞株与试剂耗材 肝癌细胞株系 BEL-7402 来自南京师范大学生命科学院细胞生物学实验室。细胞培养液 DME、新生小牛血清、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购自 Sigma 公司。3 种姜黄素购于天津第一制药厂,纯度在 95%以上,以二甲基亚砜助溶保存于 -20℃。Annexin V-

FITC 试剂盒、碘化丙啶(propidium iodide, PI)购于南京晶美生物技术公司。细胞周期蛋白 D 单克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。细胞培养器材均购于上海生工生物公司。所有试剂耗材均经过无菌处理。所用水均为三蒸水。主要仪器为:流式细胞仪(FACSAria, 美国 BD 公司)、酶标仪(MB-IV, 无锡上佳生物公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 取 -70℃ 冻存的细胞,在 37℃ 水浴箱中快速解冻。将其加入 5 mL 含高浓度小牛血清(25%)的 DME 培养液中,放置于 5% CO₂ 培养箱中,37℃ 培养 3 d 至贴壁生长。3 d 传代一次,至稳定生长。

1.2.2 MTT 实验 收集对数生长期细胞,以低血清培养液调整细胞悬液浓度,96 孔板每孔加入 100 μL 细胞悬液,铺板使待测细胞密度为 6 000~7 000 个/孔。5% CO₂, 37℃ 孵育,至细胞单层铺满 96 孔板底,加入浓度梯度的药物。终浓度梯度设为 0、5、10、25、50、75、100 μmol/L。横向设 5 个复孔,纵向设 7 个梯度,每孔 100 μL。分别孵育 16、24、32、48、72 h 后每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL MTT 溶液,继续培养 4 h。终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μL 二甲亚砜,置摇台上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪测量 490 nm 处各孔的吸光值(optical density, OD)。设置调零孔(培养基、MTT、DMSO)、对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、DMSO)。抑制率计算公式为:生长抑

制率(%)=(OD 对照-OD 处理)/OD 对照×100。

1.2.3 单细胞 DNA 电泳实验 将药物作用过的细胞(5×10^5 个)移入无菌的 1.5 mL 离心管中,4 °C,离心半径 10 cm,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入 20 μ L 溶解缓冲液[20 mmol/L EDTA,100 mmol/L Tris,pH8.0,0.8% (w/v) SDS]以移液管吸头混匀细胞沉淀。加 10 μ L RNA 酶 A,轻弹管尖混匀,37 °C 孵育 120 min。加 10 μ L 蛋白酶 K,50 °C 孵育 90 min,加 5 μ L 6×DNA 加样缓冲液(30% 甘油,0.25% 溴酚蓝),在含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭 TAE 的 1%~1.5% 琼脂糖凝胶孔中加 DNA 样品。35 V 低电压电泳 6 h^[9]。凝胶成像系统记录结果。

1.2.4 Annexin V-FITC 和 PI 双染色流式细胞术(flow cytometry,FCM)实验 (1)分 4 瓶传代培养细胞进入对数生长期。第 1 瓶为正常对照,不加药物处理。第 2~4 瓶为处理组。培养 12 h 左右,分别加入 3 种姜黄素,终浓度设定为最佳浓度。继续培养 48 h。适时观察,收集细胞,以不含 EDTA 的 0.25% 的胰酶进行消化。冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗细胞 2 次。将细胞转移至 1.5 mL 的离心管中。将对照组的细胞分为 4 管,每管中细胞浓度约 1×10^6 个/mL。每管以 400 μ L 1×结合缓冲液悬浮。其中,一管为空白对照、一管为 Annexin V 单染、一管为 PI 单染、一管为 Annexin V 和 PI 双染。染色法为加 5 μ L Annexin V-FITC,轻轻振荡混匀,4 °C 避光染色 15 min^[10]。加 10 μ L PI 染液,混匀,4 °C 避光染色 5 min。其他 3 瓶处理过的细胞,以 400 μ L 1×结合缓冲液悬浮,细胞浓度亦为 1×10^6 /mL 进行双染,上流式细胞仪进行检测。(2)收集细胞约 5×10^6 个,离心半径 10 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液,3 mL PBS 洗一次,离心去 PBS,加入冰预冷的 70% 的乙醇固定,4 °C、1 h。离心弃去固定液,3 mL PBS 重悬 5 min。离心半径 10 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS。用 1 mL PI 染液,4 °C 避光染色 30 min^[11]。流式细胞仪检测。

1.2.5 Western blot 测定周期蛋白 3 种姜黄素单体作用肝癌细胞 BEL-7402 细胞后,PBS 漂洗,加入适量的 RIPA 裂解液冰浴中裂解细胞,提取总蛋白,BCA 法蛋白定量,取等量的总蛋白样品进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳,然后电转移至硝酸纤维素膜上,分别用鼠抗人抗细胞周期蛋白 D 单克隆抗体作一抗,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗鼠 IgG 作二抗,增强化学发光法检测。以 β -actin 作为蛋白定量参照^[12]。

1.3 统计学处理 应用软件 SPSS10.0 进行统计学分析,t 检验,分析各组数据的差异性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

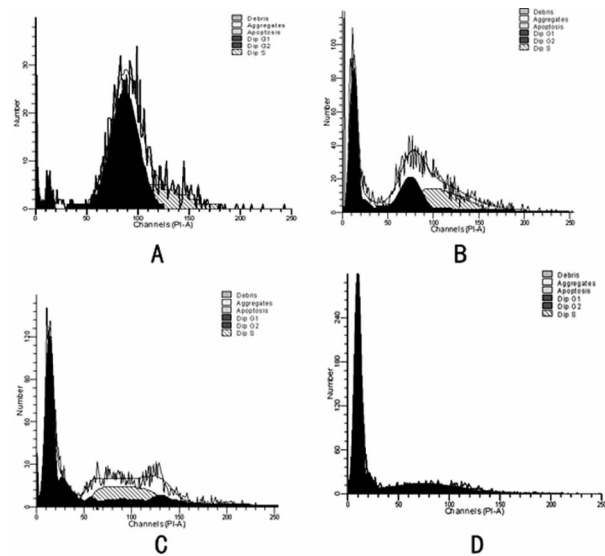
2.1 药物作用时间与剂量效应 以不同的药物浓度处理癌细胞,不同时间测定其细胞增殖抑制率,重复 3 次。结果显示 3 种姜黄素均能有效地抑制 BEL-7402 癌细胞增殖。姜黄素 I 与 II 细胞增殖抑制率的差异无统计学意义,而姜黄素 III 抑制效果最强。不同浓度处理、不同时间检测,结果之间差异有统计学意义, $P < 0.01$,说明姜黄素的抑制癌细胞作用存在时间与剂量上的不同效应,作用最佳时间在 48 h,最佳浓度在 75 μ mol/L,更高的浓度与更长的时间抑制率改变不明显。

2.2 单细胞 DNA 电泳 凋亡的标准特征之一是基因组 DNA 断裂为多条寡核苷酸小片段^[13]。以姜黄素作用肝癌细胞 BEL-7402,并提取其染色体 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳。结果显示,有多条小片段 DNA 出现,这是典型的细胞凋亡特征,说

明姜黄素可作用于肝癌细胞的染色体,造成 DNA 断裂,诱导肝癌细胞凋亡而不是坏死。

2.3 Annexin V-FITC 和 PI 双标记流式检测 姜黄素 I 诱导细胞凋亡率为 20.8%,姜黄素 II 诱导细胞凋亡率为 25.3%,姜黄素 III 诱导细胞凋亡率为 27.9%。3 种姜黄素作用力依次增强。姜黄素 II 和 III 与 I 存在显著不同,他们还能引起细胞膜的改变,Q3 区细胞整体上浮,姜黄素 III 表现尤为明显。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期 多数肿瘤细胞之所以失去控制地生长就是因为细胞分裂周期失去控制点。抗肿瘤药物可以通过对肿瘤细胞周期的作用使其走向凋亡^[14]。本组对 3 种姜黄素处理肝癌细胞 BEL-7402 后的细胞周期性进行分析。通过对细胞周期的检测,可揭示 3 种姜黄素作用于细胞分裂哪个时期。由图 1 可见,每组中第一个峰值为细胞凋亡部分,凋亡峰由低到高分别为姜黄素 I、II、III,且 3 种姜黄素作用于肝癌细胞周期同一点均为细胞周期 G₁/S 期。



A: 对照组; B: 姜黄素 I 处理组; C: 姜黄素 II 处理组; D: 姜黄素 III 处理组。

图 1 流式细胞仪检测细胞周期

2.5 细胞周期蛋白表达量分析 姜黄素抑制肝癌细胞 BEL-7402 增殖,破坏其细胞周期性而导致细胞走向凋亡,有可能改变了细胞周期蛋白的调控点。以细胞周期蛋白 D 作为检测靶点,免疫印迹法检测药物处理细胞后的表达量变化,结果显示 3 种姜黄素处理癌细胞 BEL-7402 后,其细胞周期蛋白 D 受到显著抑制。随着姜黄素浓度的增加与作用时间的延长,细胞周期蛋白 D 表达量呈递减趋势(图 2)。

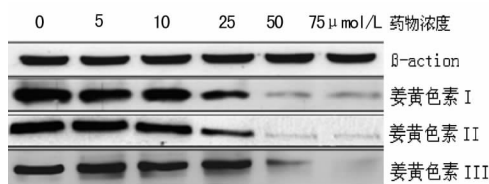


图 2 3 种姜黄素抑制细胞周期蛋白 D 的 Western blot 结果

3 讨论

姜黄素长期用于人们日常生活中,对人体无毒性,而且它能对多种肿瘤起到明显抑制作用,如对前列腺癌、乳腺癌、鼻咽癌、直肠癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌等均有杀伤作用^[15-16]。研究

指出姜黄素主要通过诱导癌细胞凋亡而起作用,对每种癌细胞作用机制存在不同。不同研究者指出姜黄素在癌细胞中调控多种蛋白表达信号,以多种途径诱导癌细胞凋亡^[17]。

3 种姜黄素单体在浓度 5~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内能显著抑制肝癌细胞增殖,呈时间与剂量上的依赖效应。3 种单体均以 75 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作用 48 h 抑制效果最佳。过高的浓度会增加其细胞毒性,致使贴壁生长的细胞漂浮坏死,过长作用时间抑制率无显著提高。3 种单体中以双去甲基姜黄素抑制效果最佳,表明分子结构式上的不同能显著影响作用效果。以 FCM 测细胞凋亡率时发现姜黄素 II 与姜黄素 III 在 Q3 象限里细胞整体上浮,这与细胞膜的改变有很大关系,说明姜黄素 II、姜黄素 III,特别是姜黄素 III 可能作用于细胞膜蛋白,通过膜蛋白传递信号。揭示姜黄素的特殊结构式是改变癌细胞中信号通道导致其凋亡的关键,去除外周甲基有利于提高其抗癌活性。MTT 法所测得的癌细胞生长增殖抑制率与 Annexin V 双标记染色法测得的癌细胞凋亡率存在差异性。排除结果误差,可以推测姜黄素至少改变癌细胞 2 种以上信号途径诱导肝癌细胞凋亡。3 种姜黄素显著影响癌细胞形态,在光学显微镜下可见细胞脱落,呈悬浮圆形,核破裂。对凋亡细胞 DNA 进行电泳发现产生多数长短不一的 DNA 碎片,这些是细胞凋亡的典型特征。有研究指出姜黄素直接作用于细胞染色体 DNA,形成凋亡小体,这在不同细胞中表现不同^[18]。

细胞分裂每一步均有调控点,完成一调控点才能进入下一分裂时期。以流式细胞仪检测姜黄素作用后的细胞周期显示,姜黄素诱导凋亡的细胞被阻滞于 G_1/S 期。细胞周期蛋白 D 在众多肿瘤细胞中具有高表达量,肿瘤细胞之所以能无限增殖就是因为细胞周期蛋白高表达量导致正常的细胞分裂周期失控而转化。免疫印迹法测定细胞周期蛋白 D 结果显示,3 种姜黄素均显著影响肝癌细胞 BEL-7402 中的细胞周期蛋白 D 的存在量,提示 3 种姜黄素成分都能够抑制细胞周期蛋白 D 的表达或者以某种方式诱导其降解,影响了细胞周期蛋白 D 的表达量。细胞周期蛋白 D 是细胞由 G_1/G_2 期转向 M 期的关键调控蛋白,细胞周期蛋白 D 的缺少使得细胞分裂周期阻断,肝癌细胞无法越过 G_1/S 期而被迫停滞于 G_1/S 期,使细胞凋亡。

实验结果证实,3 种姜黄素在一定浓度范围内显著抑制肝癌细胞 BEL-7402 生长增殖,它们通过影响周期蛋白 D 在肝癌细胞中的存在量,致使癌细胞分裂阻滞于 G_1/S 期。而在姜黄素的 3 种单体中,由于姜黄素 III 对细胞膜的改变作用较姜黄素 I 和姜黄素 II 强,对癌细胞增殖的抑制作用效果最强,说明去除甲基有利于提高姜黄素的抗癌活性。因此,姜黄素尤其是姜黄素 III 的开发利用对临床治疗肝癌具有很高的经济价值和应用前景。

参考文献:

[1] Ramsewak RS, DeWitt DL, Nair MG. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa* [J]. *Phytomedicine*, 2000, 7(4):303-308.

[2] Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds [J]. *Cancer Lett*, 1995, 95(1/2):221-225.

[3] Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, et al. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(4):934-942.

[4] Chan MM, Fong D, Soprano KJ, et al. Inhibition of growth and sensitization to cisplatin-mediated killing of ovarian cancer cells by polyphenolic chemopreventive agents [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194(1):63-70.

[5] 王西阁, 胡姬婷, 栾斌, 等. 姜黄素抑制 K562 细胞生长并诱导凋亡机制的研究[J]. *山东医药*, 2009, 49(49):73-75.

[6] 胡静, 李立. 姜黄素药理作用研究现状[J]. *检验医学与临床*, 2007, 4(12):1186-1187.

[7] Ishiki Y, Ohnishi H, Muto Y, et al. Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and has a potent antihepatitis effect in vivo [J]. *Hepatology*, 1992, 16(5):1227-1235.

[8] 唐春兰, 杨和平, 李剑明, 等. 姜黄素 III 抑制 A549 裸小鼠移植瘤生长及其血管生成的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(21):1950-1953.

[9] D. 斯佩克特. 细胞实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2001:1.

[10] 黄冬生, 陈金和. 姜黄素诱导人肺癌细胞凋亡的作用机制初步研究[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(8):880-882.

[11] Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, et al. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(5A):3675-3680.

[12] Anuchapreeda S, Leechanachai P, Smith MM, et al. Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(4):573-582.

[13] 傅涛, 徐永华. 细胞凋亡的信号转导研究进展[J]. *细胞生物学杂志*, 1996, 18(4):153-157.

[14] Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction [J]. *FEBS Lett*, 2002, 512(1/3):334-340.

[15] 田德增, 朱辉, 梁永杰. 姜黄素对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响及其机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2006, 15(1):8-10.

[16] 李宏武, 单吉贤. HGF/SF 对姜黄素诱导大肠癌细胞凋亡的作用[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2006, 13(1):74-76.

[17] 李一诗, 傅仲学. 姜黄素逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. *重庆医学*, 2010, 39(16):2225-2227.

[18] Aggarwal BB, Banerjee S, Bharadwaj U, et al. Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(7):1024-1032.