论著

文章编号:1000-5404(2005)11-1068-03

姜黄色素活性单体成分抗血管生成的实验研究

杨和平,李剑明,唐春兰,宫 亮,王海晶 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨中药姜黄的活性单体成分姜黄素(姜黄素Ⅰ)、脱甲氧基姜黄素(姜黄素Ⅱ)和双脱甲氧基姜黄素(姜黄素Ⅲ)对血管生成的抑制作用。**方法** ①以体外培养的人脐静脉内皮细胞和人肺微血管内皮细胞为对象,研究3种单体对内皮细胞增殖的抑制作用和诱导内皮细胞凋亡的效果;②建立裸鼠人肺腺癌细胞A549移植瘤模型,腹腔注射双脱甲氧基姜黄素,研究其对荷癌裸鼠肿瘤血管生成的影响。**结果** ①MTT检测3种姜黄色素作用72 h后对内皮细胞增殖抑制作用的IC_{50}值分别为0.525、0.399、0.125 μg/ml,在浓度为4 μg/ml时,3种姜黄色素作用48 h后均导致内皮细胞出现明显的增殖抑制($P<0.05$),作用72 h时达最高值;②流式细胞仪分析浓度为4 μg/ml时姜黄素Ⅲ可将内皮细胞阻止于S期($P<0.05$),浓度增至8 μg/ml以上时不但可引起S期细胞比例增加($P<0.01$),同时又有明确的诱导凋亡作用;③免疫组化显示姜黄素Ⅲ实验组裸鼠瘤组织内新生血管的数量明显减少,与阴性对照组相比相差非常显著($P<0.01$);姜黄素Ⅲ组肿瘤组织中VEGF表达水平,VEGF受体Flt-1、KDR水平与阴性对照组相比均相差非常显著($P<0.01$)。**结论** 3种姜黄色素单体均具有确切的抗人内皮细胞和肺腺癌裸鼠移植瘤血管生成作用,其中姜黄素Ⅲ最强,机制可能与其抑制VEGF及其受体的表达有关。

关键词: 姜黄色素;血管生成;VEGF
中图法分类号: R285.5; R364.3; R392.1 **文献标识码**: A

Role of active components of curcumin in anti-angiogenesis *in vitro*

YANG He-ping, LI Jian-ming, TANG Chun-lan, GONG Liang, WANG Hai-jing (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the anti-angiogenesis effects of active components (curcumin-1, curcumin-2 and curcumin-3) of *Curcuma Longa*. **Methods** ①Human umbilical vein endothelial cell lines (HUVEC) and human pulmonary microvascular endothelial cell lines(HPMEC) were employed to analyze and compare the inhibitory effects on cell proliferation and apoptosis of the active components. ②Nude mice bearing with human lung adenocarcinoma cell line A549 were injected intraperitoneally with purified curcumin-3 to observe the inhibitory effects on angiogenesis. **Results** ①The IC_{50} values of inhibitory effect of curcumin-1, curcumin-2 and curcumin-3 on HUVEC growth were 0.525 μg/ml, 0.399 μg/ml and 0.125 μg/ml, respectively. At the concentration of 4 μg/ml, curcumin-1, curcumin-2 and curcumin-3 were able to inhibit effectively the proliferation of endothelial cell at 48 h post-treatment ($P<0.05$), and reached the peak at 72 h post-treatment. ②At the concentration of 4 μg/ml, curcumin-3 could effectively retard the endothelial cell at S phase at 24 h post-treatment ($P<0.05$). But when the concentration was 8 μg/ml or more, curcumin-3 could also induce obvious apoptosis of endothelial cell. ③MVD (micro vein density) in curcumin-3 group was lower than that in control group, respectively ($P<0.01$). Curcumin-3 markedly suppressed the expression of vascular endothelium growth factor (VEGF) and its receptors, Flt-1 and KDR in xenografted tumor tissues, as compared with the control group ($P<0.01$). **Conclusion** Curcumin-1, curcumin-2 and curcumin-3 can significantly inhibit angiogenesis in cultured human endothelial cells and tumor tissues in nude mice bearing with human lung adenocarcinoma cell line A549. The bioactivity of curcumin-3 is significantly higher than that of curcumin-1 and curcumin-2, respectively. The possible mechanisms involved in the suppression of angiogenesis may be related to down-regulation of VEGF, Flt-1and KDR in tumor cells and endothelial cells.

Key words: curcumin; angiogenesis; vascular endothelium growth factor

姜黄是我国的传统中药,来源于姜黄属植物的根茎,现代医学研究证实,姜黄中的主要活性成分是其中的姜黄色素和挥发油,具有抗炎、抗氧化、降血脂和抗肿瘤等多种作用。近年来,姜黄活性成分的抗肿瘤作用引起了国内外的关注。姜黄色素主要含有3种主要成分:姜黄素Ⅰ(Cur-Ⅰ 77%);姜黄素Ⅱ,即脱甲氧基

作者简介:杨和平(1955-),男,河南省汝州市人,博士,主任医师,教授,主要从事肺癌和COPD的诊治方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754121

收稿日期:2005-03-18;修回日期:2005-04-28

姜黄素(Cur-Ⅱ 17%)；姜黄素Ⅲ，即双脱甲氧基姜黄素(Cur-Ⅲ 3%)[1,2]。目前关于各种姜黄色素单体与血管生成之间的关系仍不清楚。本实验以体外培养的人脐静脉内皮细胞和人肺微血管内皮细胞为对象，研究 3 种单体对内皮细胞增殖的抑制作用和诱导内皮细胞凋亡的效果，并在建立裸鼠人肺腺癌细胞 A549 移植瘤模型的基础上，研究了腹腔注射姜黄素Ⅲ对荷癌裸鼠肿瘤血管生成的影响。

1　材料与方法

1.1　原料、仪器和试剂

中药姜黄购自重庆桐君阁大药房，胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)和噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司。新生牛血清购自 HYCLON 公司。RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司。MTT 实验采用美国 BIORAD 公司制造的自动酶联免疫分析仪。流式细胞检测(FCM)采用美国 FACSCallibur 型流式细胞仪。鼠抗人 CD34 单克隆抗体购自福州迈新公司，免疫组化染色试剂盒购自北京中山公司，DAB 显色试剂盒和 VEGF ELISA 检测试剂盒购自晶美公司。

1.2　细胞培养

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cell, HPMEC)和人肺腺癌 A549 细胞由本实验室李剑明博士提供。培养基为含 10%新生小牛血清的 RPMI1640 培养基，细胞置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中在饱和湿度下培养。

1.3　药物配制

3 种姜黄色素单体由传统中药姜黄的醇提物中分离获得，并经中科院成都分院质谱室鉴定，其分子量分别为 368、338 和 308，与其理论值完全相符。药物采用 ^{60}Co 照射消毒，溶于100 μl 二甲基亚砜(DMSO)中，1 周内使用。

1.4　实验分组

1.4.1　MTT 实验　取指数生长期的 HUVEC 接种于 96 孔板，分别加入配制好的 Cur Ⅰ，Cur Ⅱ 和 Cur Ⅲ，使药物终浓度最高为 10 μg/ml，以 50%的变量依次递减形成梯度变化的系列药物浓度。培养 3 d 后每孔加入浓度为 5 mg/ml 的无菌 MTT 20 μl，继续培养 4 h 后在自动酶联免疫分析仪上测定 D(490)吸光度值，并计算 IC_{50} 值和生长抑制率(inhibition rates)。取指数生长期 HPMEC 细胞悬液接种于 96 孔板置孵箱培养，24 h 后加入 Cur Ⅲ，使终浓度均为 4 μg/ml，同时设阳性对照药(TNP-470 组)。加药作用 24 h 后，开始每隔 24 h 取出 1 块培养板测定其吸光度值并观察药物作用时间对 HPMEC 细胞增殖的影响。

1.4.2　FCM 实验　取指数生长期的 HPMEC 细胞接种于容积为 50 ml 的玻璃培养瓶中培养，24 h 后取出其中的 3 瓶分别加入终浓度为 4、8、12 μl/ml 的姜黄素Ⅲ，另一瓶加入等体积的阴性对照药。继续培养 24 h 后取出，以1 000 r/min 离心 10 min 后流式细胞仪检测。

1.4.3　荷瘤裸鼠实验　裸小鼠皮下接种人肺腺癌 A549 细胞。试验设阴性对照组、阳性对照组(TNP-470)和 Cur Ⅲ 组。TNP-470 按 30 mg/kg 腹腔注射，隔日 1 次，共 8 次，配制好的 Cur Ⅲ按 100 mg/kg 腹腔注射，隔日 1 次，共 8 次。

1.5　统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件对计量资料进行 t 检验。

2　结果

2.1　MTT 实验结果

2.1.1　药物浓度对人脐静脉内皮细胞增殖的影响　3 种姜黄色素均有明显的抑制内皮细胞增殖的作用，且有剂量依赖性。Cur Ⅰ、Cur Ⅱ 和 Cur Ⅲ 的 IC_{50} 值分别为 0.525、0.399、0.125 μl/ml。3 种色素的生物活性相差显著：Cur Ⅲ > Cur Ⅱ > Cur Ⅰ ($P < 0.05$)。

2.1.2　Cur Ⅲ作用时间对人肺微血管内皮细胞增殖的影响　浓度为 4 μl/ml 时姜黄素Ⅲ对内皮细胞增殖的抑制作用具有时间依赖性，作用 48 h 以后开始出现明显的抑制作用，72 h 时抑制作用达高峰，与阴性对照组比较相差显著($P < 0.05$)。

2.2　FCM 实验结果

结果表明，浓度为 4 μl/ml 时姜黄素Ⅲ作用 24 h 可将人肺微血管内皮细胞阻止于 S 期($P < 0.05$)，浓度增至 8 μl/ml 以上时不但引起 S 期细胞积聚显著增加($P < 0.01$)，同时又出现明确的诱导凋亡作用。

2.3　裸鼠体内成瘤及瘤组织形态学观察

药物干预前，移植瘤大小约 5 mm × 5 mm，各组裸小鼠体质量及移植瘤大小无显著差异，26 只裸小鼠共 25 只成瘤，成瘤率达 96.2%。进行移植瘤组织病理学检查，见图 1。阳性对照组 TNP-470 和试验组姜黄素Ⅲ腹腔注射后，瘤体积及瘤质量均见明显减小。

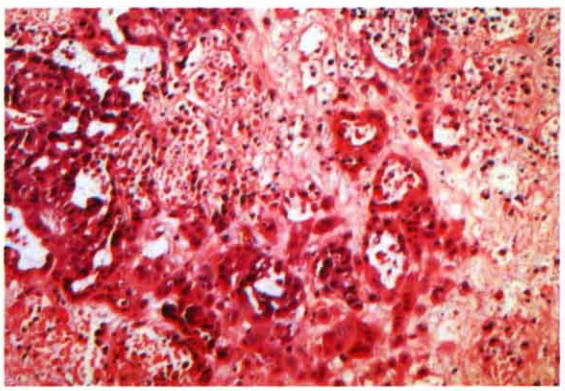


图 1　裸鼠移植瘤组织　(HE × 100)

Fig 1　Xenografted tumor tissues in nude mice　(HE × 100)

2.4　药物作用后各组移植瘤 Flt-1(VEGFR1)、KDR(VEGFR2)表达的比较

Flt-1、KDR 定位于肿瘤细胞及内皮细胞胞质内。阴性对照组移植瘤 Flt-1、KDR 阳性组织相对灰度值(RGV)均显著高于 TNP-470 组与姜黄素Ⅲ组($P < 0.01$)，TNP-470 组与姜黄素Ⅲ组的 RGV 相比无显著差异($P > 0.05$)(表 1)。

表1 肿瘤组织中 flt-1 和 KDR 的表达比较（RGV，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 flt-1 and KDR expression of the tumor tissues in each groups (RGV, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

	Flt-1	KDR
Control	1.78±0.12	2.27±0.18
TNP-470	1.42±0.10△	1.37±0.12△
Cur Ⅲ	1.47±0.12△	1.48±0.15△

△：$P<0.01$，*vs* control

3 讨论

研究证明肿瘤血管生成与肿瘤生长及转移密切相关，若无肿瘤血管生成，肿瘤病灶只能长至直径 2～3 mm，然后就会长期处于“休眠(dormancy)”状态[3]。新生血管为肿瘤组织提供充足的养分，同时发育不完善的微血管也为肿瘤细胞进入循环转移扩散提供便利。抑制肿瘤血管的新生，切断肿瘤生长和转移所依赖的“命脉”已成为当前抗肿瘤尤其是耐药肿瘤治疗的重要策略。

姜黄色素具有多种生物学活性，可影响肿瘤发生、发展的各个阶段。近年研究表明，抗血管生成作用也是姜黄色素抗肿瘤机制之一，但既往有关抗肿瘤及抗血管生成活性的研究中，多以姜黄色素混合物为研究对象，目前尚少见姜黄色素单体抗肿瘤血管生成作用的有关报道。本实验表明，3 种姜黄色素单体均可明显抑制人内皮细胞增殖，影响内皮细胞增殖周期和诱导凋亡可能是姜黄素及其类似物抗血管生成作用的机制之一，实验同时显示三者的生物活性有明显差异：姜黄素Ⅲ＞姜黄素Ⅱ＞姜黄素Ⅰ。MVD 能预测肿瘤对抗血管生成药物的反应[4]。我们以往的研究结果显示，姜黄素Ⅲ组瘤组织内新生血管的数量明显减少，说明姜黄素Ⅲ能显著抑制人肺腺癌裸鼠移植瘤的血管生成[5]。

血管新生在体内受到一系列因子调节，其中以血管内皮生长因子(VEGF)最为重要，它是肿瘤扩增和维持血管功能的关键因子[6]。一方面它能诱导内皮细胞增殖、迁徙甚至改变其基因表达；另一方面它能增加微血管的通透性，使血浆蛋白渗出血管外，改变局部的细胞外基质以适应血管生成。肿瘤组织中 VEGF 的表达水平及血清中 VEGF 的含量与肿瘤微血管密度、恶性程度和转移情况呈高度正相关，而与患者的预后则呈显著负相关 。以前的研究结果显示，VEGF 主要在肿瘤细胞中表达，阴性对照组 VEGF 呈强阳性表达；而姜黄素Ⅲ组与血管生成抑制剂 TNP-470 组 VEGF 阳性组织相对灰度值显著降低，说明姜黄素Ⅲ抑制 VEGF 的合成、分泌及表达可能是抑制肿瘤组织内血管生成的机制之一[7]。

目前已知 VEGF 有 3 种受体：Flt-1(VEGF 受体 1)、KDR/Flk-1(受体 2)和 Flk-4(受体 3)，VEGF 通过受体来发挥其生物学作用[8]。这 3 种受体同属酪氨酸激酶受体，其中 Flt-1 和 KDR 与肿瘤血管新生关系密切[9]。早期研究认为，VEGF 通过特异地作用于内皮细胞上的受体而发挥作用，而最近研究表明，VEGF 可通过自分泌途径促进肿瘤的生长[10]。本实验结果显示移植瘤肿瘤细胞及血管内皮细胞同时表达 Flt-1 和 KDR，说明在 A549 肺腺癌细胞中亦存在 VEGF 自分泌机制。VEGF 一方面以旁分泌方式作用于肿瘤血管内皮细胞并诱导肿瘤血管新生，另一方面也可通过自分泌途径与自身表面的受体结合而促进肿瘤细胞增殖和侵袭、抑制细胞凋亡[11]。本实验结果显示，姜黄素Ⅲ能明显抑制 VEGF 受体 Flt-1、KDR 的合成、分泌和表达，进而抑制肿瘤组织内血管生成。

参考文献：

[1] Ramsewak R S, DeWitt D L, Nair M G, *et al*. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins Ⅰ-Ⅲ from Curcuma longa [J]. Phytomedicine, 2000, 7(4): 303-308.

[2] 许 刚，黄 文，张亚历. 姜黄素防治肿瘤的机制研究进展[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册，2003，23(2)：152-154.

[3] Sadick H, Naim R, Gossler U, *et al*. Angiogenesis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: VEGF165 plasma concentration in correlation to the VEGF expression and microvessel density[J]. Int J Mol Med, 2005, 15(1): 15-19.

[4] Emoto M, Ishiguro M, Iwasaki H, *et al*. Effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on the growth, blood flow, and microvessel density in xenografts of human uterine carcinosarcoma in nude mice[J]. Gynecol Oncol, 2003, 89(1): 88-94.

[5] 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.

[6] Bruns C J, Liu W, Davis D W, *et al*. Vascular endothelial growth factor is an *in vivo* survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases[J]. Cancer, 2000, 89(3): 488-499.

[7] **唐春兰，杨和平，李剑明，等. 姜黄素Ⅲ对 A549 裸鼠移植瘤 VEGF 蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(9)：831-833.**

[8] McColl B K, Stacker S A, Achen M G. Molecular regulation of the VEGF family——inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. APMIS, 2004, 112(7-8): 463-480.

[9] Veikkola T, Karkkainen M, Claesson Welsh L, *et al*. Regulation of angiogenesis *via* vascular endothelial growth factor receptors[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 203-212.

[10] Bachelder R E, Crago A, Chung J, *et al*. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(12): 5736-5740.

[11] Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68(6): 1017-1021.

（编辑 栗 嘉）