论著

文章编号:1000-5404(2006)18-1870-03

姜黄素对人乳腺癌MCF-7细胞抗增殖作用的研究

吴晓健,吴凯南 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 研究姜黄素对人乳腺癌MCF-7细胞增殖、细胞周期分布及基因表达情况的影响。**方法** MTT法测定姜黄素生物活性及姜黄素抗增殖效应、FCM分析细胞周期分布,RT-PCR技术测定bcl-2、bax、PCNA mRNA表达。**结果** 姜黄素对MCF-7细胞的IC_{50}值为18.5 μmol/L。各实验组的姜黄素对MCF-7细胞的生长均有抑制作用,这种抑制作用呈时间-剂量依赖方式。FCM检测结果:姜黄素20 μmol/L及40 μmol/L作用于MCF-7细胞24 h,可阻滞细胞周期于G_0/G_1期,并诱导部分细胞凋亡。RT-PCR测定结果:姜黄素0~80 μmol/L作用MCF-7细胞24 h,bcl-2、PCNA mRNA表达水平降低、bax mRNA表达水平增加。**结论** 姜黄素可抑制MCF-7细胞生长、阻滞细胞周期于G_0/G_1期,对MCF-7细胞有抗增殖作用,并能诱导部分细胞凋亡,其机制可能与姜黄素抑制bcl-2、PCNA mRNA表达,促进bax mRNA表达有关。

关键词: 姜黄素;抗增殖;细胞周期;细胞凋亡;MCF-7细胞

中图法分类号: R285.5;R73-36;R737.31 **文献标识码:** A

Antiproliferative effect of curcumin on human breast cancer of MCF-7 cells

WU Xiao-jian, WU Kai-nan (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of curcumin on the proliferation, cell cycle distribution and gene expression of human breast cancer MCF-7 cells. **Methods** MCF-7 cells were treated with 10, 20, 40, 80 μmol/L curcumin for 24, 48 or 72 h. MTT was used to assay the biologic activities of curcumin and its antiproliferative effect. FCM was used to detect cell cycle distribution and apoptosis. The expression levels of bcl-2, bax, PCNA mRNA were analyzed by RT-PCR. **Results** The curcumin IC_{50} value for MCF-7 cells was 18.5 μmol/L. The inhibitory effect of curcumin on cell growth was in a time-and dose-dependent manner. MCF-7 cells treated with 20 μmol/L or 40 μmol/L curcumin for 24 h were arrested in G_0/G_1 phase and induced apoptosis. The expression levels of bcl-2, PCNA mRNA were decreased in MCF-7 cells by 10, 20 and 40 μmol/L curcumin treatment for 24 h, and bax mRNA was increased. **Conclusion** Curcumin is of inhibitory effect on MCF-7 cell growth, and it can arrest MCF-7 cells in G_0/G_1 phase, inhibit the proliferation and induce apoptosis. Curcumin down-regulates bcl-2, PCNA mRNA expression in MCF-7 cells, but upregulates bax mRNA expression.

Key words: curcumin; antiproliferation; cell cycle; apoptosis; MCF-7

使用化疗药物是治疗肿瘤的主要手段之一,而现行化疗药物均有这样或那样的缺点,寻求毒副作用小、疗效确切的新型抗肿瘤药物有重要的现实意义。姜黄素是从姜黄根茎中提取的一种酚类色素,已被广泛应用于食品添加剂中,并具有抗增殖[1]及诱导肿瘤细胞凋亡的作用[2]。本实验研究姜黄素诱导体外人乳腺癌MCF-7细胞抗增殖的条件与机制,为姜黄素治疗乳腺癌提供理论依据。

作者简介:吴晓健(1966-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事乳腺癌方面的研究。电话:(023)68707802

通讯作者:吴凯南,电话:(023)89011192

收稿日期:2005-09-16;修回日期:2006-07-05

1 材料与方法

1.1 主要材料

MCF-7细胞购自上海生物制品研究所。姜黄素购自Sigma公司。RNA分离试剂盒产自Bochringer Biochemicala Mannheim公司、RT-PCR试剂盒产自Promega公司、PCR引物由上海生工公司合成。bax:上游5′-GATGCGTCCACCAAGAAGC-3′,下游5′-TGAGCACTCCCGCCACAA-3′;bcl-2:上游5′-GGCGCACGCTGGGAGAAC-3′,下游5′-TAGCGGCGGGAGAAGTCGTC-3′;PCNA:上游5′-TGCGGCCGGGTTCAGGAGTCA-3′,下游5′-CAGGCAGGCGGGAAGGAGGAAAGT-3′。

1.2 方法

1.2.1 姜黄素溶液的配制 以少量二甲亚砜(DMSO)溶解

姜黄素粉剂，配成 1 mmol/L 溶液（储备液）、置 0 ℃冰箱保存，临时稀释至所需浓度（DMSO 终浓度 <0.1%）。

1.2.2　细胞培养　　MCF-7 细胞生长于含 10% FBS、100 μg/ml青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中，于 37 ℃、5% CO_2、100% 湿度的 CO_2 孵育箱中培养，24 h 即进入对数生长期，接种后约 72 h 细胞长满瓶底时，用 0.25% 胰酶及 0.02% EDTA 将贴壁生长的细胞用直接吹打法传代。

1.2.3　姜黄素对 MCF-7 细胞 IC_{50} 值测定　　取对数生长期 MCF-7 细胞，以含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液稀释成 1×10^5/ml，置 96 孔培养板每孔 200 μl，用 MTT 法分别测定 10、20、40、80 μmol/L 姜黄素作用 24、48、72 h 的光吸收值（OD）。实验结果按以下公式计算：

$$细胞存活率=\frac{实验组光吸收值}{对照组光吸收值}\times100\%$$

$$药物抑制率=(1-\frac{实验组光吸收值}{对照组光吸收值})\times100\%$$

用细胞存活率对药物剂量对数作图求出 IC_{50} 值。

1.2.4　流式细胞仪测定 MCF-7 细胞周期分布　　以 1×10^5 个/ml MCF-7 细胞置培养瓶，每瓶 2.7 ml，37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h。实验组加姜黄素，其终浓度分别为 20、40 μmol/L，对照组加生理盐水（1 式 3 份）。继续培养 24 h。用 0.25% 胰酶及 0.02% EDTA 消化贴壁细胞、吸取细胞悬液，离心洗涤，然后用预冷的 70% 乙醇固定 24 h。弃去固定液，PBS 液垂悬 5 min 后，用流式细胞仪检测。

1.2.5　RT-PCR 技术测定 MCF-7 细胞 bcl-2、bax、PCNA mRNA 表达量变化　　提取经 20、40 μmol/L 姜黄素处理的 MCF-7 细胞及对照细胞的 RNA，经逆转录，PCR 扩增，PCR 产物电泳，凝胶图像分析系统记录、分析各类细胞 bcl-2、bax PCNA mRNA 表达量。

1.3　统计学处理

采用 SAS 统计软件对计量资料进行方差分析。用 SNK 法（student-Newman-Keuls）进行两两比较。

2　结果

2.1　MTT 比色法检测的结果

实验组和对照组分别培养 24、48、72 h 后测得 OD 值，见表 1。

表 1　不同浓度姜黄素作用 24、48、72 h 后 MCF-7 细胞的 OD 值（$\bar{x}\pm s$）

组别	时间（t/h）		
	24	48	72
对照组			
细胞组	0.946 ±0.123	1.422 ±0.036	1.640 ±0.026
生理盐水	0.941 ±0.112	1.404 ±0.187	1.636 ±0.097
实验组（μmol/L）			
10	0.928 ±0.033	0.743 ±0.028[a]	0.888 ±0.131[a]
20	0.881 ±0.019[a]	0.660 ±0.074[ae]	0.842 ±0.107[abf]
40	0.562 ±0.034[ab]	0.501 ±0.072[abce]	0.463 ±0.021[abcf]
80	0.402 ±0.068[abc]	0.361 ±0.019[abcde]	0.310 ±0.008[abcdf]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 10 μmol/L 比较；c：$P<0.05$，与 20 μmol/L 比较；d：$P<0.05$，与 40 μmol/L 比较；e：$P<0.05$，与实验组与 24 h 比较；f：$P<0.05$，与实验组 24 h 及 48 h 比较

表 1 的结果显示：对照组细胞随时间延长增殖明显，而生理盐水对这种生长无影响（$P>0.05$）。培养 24 h，20、40、80 μmol/L 组 OD 值与对照组有差异（$P<0.05$），表示抑制了 MCF-7 细胞的生长。培养 48 h，各实验组的姜黄素对 MCF-7 细胞的生长均有抑制作用，培养 72 h，这种抑制作用比 48 h 更为明显（$P<0.05$）。在不同时段，随姜黄素浓度的增加，各实验组 OD 值逐渐减小（$P<0.05$）显示有剂量依赖性的趋势。

各浓度姜黄素在不同时段对 MCF-7 细胞的抑制率见表 2。抑制率随浓度的增大而呈现增长的趋势，随培养时间的延长亦呈增长的趋势（$P<0.05$）。

表 2　不同浓度不同时段姜黄素对 MCF-7 细胞抑制率（%）

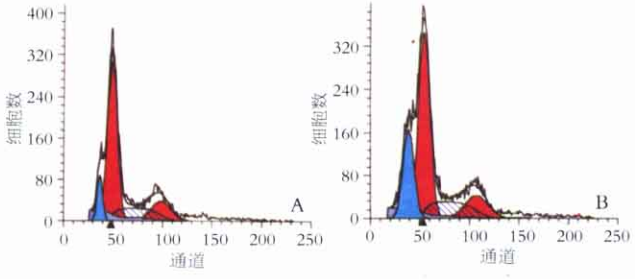
组别	24 h	48 h	72 h
10 μmol/L	—	38.00[a]	40.00[ab]
20 μmol/L	30.00	41.00[a]	44.00[ab]
40 μmol/L	33.00	65.00[a]	73.00[ab]
80 μmol/L	36.00	85.00[a]	92.00[ab]

a：$P<0.05$，与 24 h 比较；b：$P<0.05$，与 48 h 比较

MTT 比色法测定姜黄素生物活性：不同浓度姜黄素作用于 MCF-7 细胞 72 h 后，用细胞存活率对剂量对数作图求出 IC_{50} 为 18.5 μmol/L。

2.2　流式细胞仪的检测结果

MCF-7 细胞培养 24 h，20 μmol/L 组及 40 μmol/L 组的细胞周期分布和凋亡率的检测结果图 1 及表 3。



A：20 μmol/L 姜黄素；B：40 μmol/L 姜黄素

图 1　不同浓度姜黄素处理 MCF-7 细胞 FCM 分析结果

表 3　不同浓度姜黄素对 MCF-7 细胞周期和凋亡率的影响

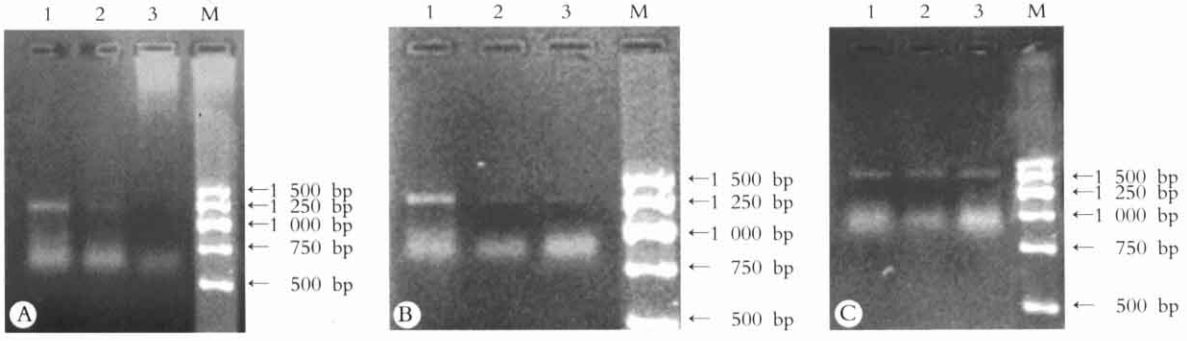
组别	G_0/G_1	G_2/G_1	G_2/M	S	凋亡率（%）
0 μmol/L	35.06	1.91	24.85	40.09	—
20 μmol/L	63.59	1.93	15.82	20.59	9.30
40 μmol/L	63.47	1.94	15.56	20.98	22.86[a]

a：$P<0.05$，与 20 μmol/L 组比较

表 3 的结果显示：20 μmol/L 和 40 μmol/L 姜黄素作用 24 h 后，可分别使更多细胞阻滞于 G_0/G_1 期，并诱导部分细胞凋亡（9.30%，22.86%）。对照组有较多细胞处于 DNA 合成期（S 期）。

2.3　RT-PCR 测定

姜黄素 0～40 μmol/L 作用于 MCF-7 细胞 24 h，bcl-2、bax、PCNA mRNA 表达结果见图 2。



A：bcl-2；B：PCNA；C：bax 1：对照；2：20 μmol/L 姜黄素处理；3：40 μmol/L 姜黄素处理；M：标准

图2 bcl-2、PCNA、bax 电泳结果

结果表明：姜黄素 20 μmol/L 及 40 μmol/L 作用于 MCF-7 细胞，与对照组（0 μmol/L）比较，bcl-2 mRNA 水平明显降低，PCNA mRNA 水平明显降低，而 bax mRNA 水平明显增加。

3 讨论

已知姜黄素具有多种药理作用，如抗炎、抗氧化、抗血管生成、抗增殖及抗肿瘤[3-5]等。众多细胞实验及动物实验证明，姜黄素具有确切的抗肿瘤活性，其抗癌谱较广[6]、毒副作用小[7]，是一种具有广泛应用前景的抗肿瘤新药。文献[8]报道姜黄素具有抗肿瘤活性。致癌剂诱导的肿瘤始发及肿瘤促进这 2 个肿瘤形成的重要阶段能被姜黄素有效地抑制。姜黄素还可对多种乳腺癌细胞株（包括激素依赖性细胞株、激素非依赖性细胞株及多价耐药细胞株）的生长均有抑制作用，而且呈时间-剂量依赖性，并与鸟氨脱羧酶活性有关。说明姜黄素是一种强烈的抗乳腺癌增殖剂。本实验观察到姜黄素对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞具有直接杀伤作用。IC_{50}（半数抑药浓度）值为18.5 μmol/L。表 2 结果表明：姜黄素随浓度的增加对 MCF-7 细胞的抑制率呈现增长的趋势。同时随着培养时间的延长，抑制率也呈现增长的趋势。结果说明：姜黄素对 MCF-7 细胞的增殖具有抑制作用，并呈时间-剂量依赖方式。这与文献[9]报道姜黄素可抑制人乳腺癌细胞增殖的结果是一致的。

细胞周期调控涉及许多因素。姜黄素为 TPK 抑制剂，它具抑制增殖及诱导 G_0/G_1 期细胞累积的作用。本实验经流式细胞仪分析结果显示：姜黄素20 μmol/L 及 40 μmol/L 作用于 MCF-7 细胞 24 h，G_0/G_1 期细胞数量明显增加，G_2/M 期及 S 期细胞数量相对减少，而对照组有较多细胞处于 S 期。说明姜黄素20 μmol/L 及 40 μmol/L 可阻止细胞周期于 G_0/G_1 期，并诱导部分细胞凋亡。

原癌基因 bcl-2 是细胞凋亡调控中最重要的基因，它能抑制多种模型中的细胞凋亡[10]。bcl-2 抑制凋亡必须通过与 bax 形成异二聚体来实现。bcl-2 和 bax 蛋白水平高低与凋亡调控直接相关。bax 增高，促进细胞凋亡；bcl-2 增高，抑制细胞凋亡。PCNA 是出现于增殖细胞中 DNA 多聚酶的辅酶、其表达随着有丝分裂水平的上升而增加，与细胞动力学密切相关，是评价细胞增殖活性的可靠指标。本实验用 RT-PCR 技术分析了 bcl-2、bax、PCNA 基因表达情况。结果显示：bcl-2、PCNA mRNA 水平表达降低，而 bax mRNA 水平表达增加，这可部分解释姜黄素通过抑制 bcl-2、PCNA 促进 bax mRNA 表达诱导 MCF-7 细胞凋亡、阻止细胞周期进程。

参考文献：

[1] KIM K H, PARK H Y, NAM J H, *et al*. The inhibitory effect of curcumin on the growth of human colon cancer cells (HT-29, WiDr) *in vitro*[J]. Korean J Gastroenterol, 2005, 45(4): 277-284.

[2] KARUNAGARAN D, RASHMI R, KUMAR T R. Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5(2): 117-129.

[3] PADMAJA S, RAJU T N. Antioxidant effect of curcumin in selenium induced cataract of Wistar rats[J]. Indian J Exp Biol, 2004, 42(6): 601-603.

[4] 高承贤，丁志山，梁冰冰，等. 姜黄素对血管生成影响的实验研究[J]. 中药材，2003，26(7)：499-502.

[5] FANG J, LU J, HOLMGREN A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity[J]. J Biol Chem, 2005, 280(26): 25284-25290.

[6] RAMSEWAK R S, DEWITT D L, NAIR M G. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from Curcuma longa[J]. Phytomedicine, 2000, 7(4): 303-308.

[7] INANO H, ONODA M, INAFUKU N, *et al*. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(10): 1835-1841.

[8] 许 刚，黄 文，张卫民，等. 姜黄素和儿茶素联用对二甲基肼诱导的大鼠大肠癌变过程中环氧合酶 2 表达的影响[J]. 第一军医大学学报，2005，25(1)：48-52.

[9] DUTTA S, PADHYE S, PRIYADARSINI K I, *et al*. Antioxidant and antiproliferative activity of curcumin semicarbazone[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(11): 2738-2744.

[10] 刘秉文，陈俊杰. 医学分子生物学[M]. 北京：中国协和医科大学出版社，2000：242-250.

（编辑 薛国文）