论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1782-04

姜黄素对卵巢癌微血管内皮细胞生长及乙酰肝素酶表达的影响

杨 鹰,谢荣凯,阎 萍,韩 静 (第三军医大学新桥医院妇产科,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨姜黄素对卵巢癌微血管内皮细胞体外生长及乙酰肝素酶表达的影响。**方法** 体外培养卵巢癌微血管内皮细胞,分为正常对照组和姜黄素组(浓度分别为2、10、50、250 μg/ml),观察时间为加入姜黄素共孵育后24、48、72 h。MTT法检测细胞增殖抑制率,流式细胞仪检测细胞周期变化,免疫荧光法和RT-PCR法检测内皮细胞乙酰肝素酶表达,生化法检测细胞上清液丙二醛(MDA)含量及乳酸脱氢酶(LDH)活力。**结果** 姜黄素组细胞生长抑制率增加,有显著的剂量依赖效应($P<0.01$)。姜黄素组增殖指数显著下降($P<0.01$),乙酰肝素酶mRNA水平和蛋白水平显著下降($P<0.01$),细胞培养上清液MDA水平及LDH活力显著升高($P<0.01$)。**结论** 姜黄素(2~250 μg/ml)能显著抑制人卵巢癌微血管内皮细胞增殖活性,降低乙酰肝素酶mRNA转录和蛋白表达。

关键词: 姜黄素;卵巢癌;血管内皮细胞;乙酰肝素酶
中图法分类号: R282.71;R730.23;R737.31 **文献标识码:** A

Effect of curcumine on proliferation and heparanase expression in cultured blood vessel endothelium cells from ovarian cancer

YANG Ying, XIE Rong-kai, YAN Ping, HAN Jing (Department of Gynecology and Obstetrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effect of curcumine on the proliferation and heparanase expression in blood vessel endothelium cells isolated from ovarian cancer tissues. **Methods** Blood vessel endothelium cells were obtained from pathologically identified ovarian cancer tissues by primary culture. The control group was the normal blood vessel endothelium cells. The experimental groups was treated with curcumine at 2, 10, 50 and 250 μg/ml for 24, 48 h and 72 h respectively. The cytostasis rate and cell cycle changes of the primarily cultured cells were detected by MTT assay and flow cytometry respectively. The transcriptional and translation levels of heparanase were detected by RT-PCR and immunofluorescent staining. The MDA content and LDH activity in the supernatant were detected too. **Results** In the curcumine groups, the cell proliferation was inhibited in a dose-dependent and time-dependent manner ($P<0.01$). Cell proliferation index was decreased significantly in the same manner ($P<0.01$). According to the immunofluorescence assay and RT-PCR, the heparanase expression in the curcumine groups was decreased significantly ($P<0.01$). The MDA content and LDH activity in the cell culture supernatant was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** Curcumine at the dose of 2 to 250 μg/ml significant inhibits the proliferation and heparanase expression in the blood vessel endothelium cells from ovarian cancer in a dose-dependent and time-dependent manner.

Key words: curcumine; ovarian cancer; blood vessel endothelium cell; heparanase

卵巢癌转移早、恶性程度高、隐匿性强,是威胁女性生命的恶性肿瘤之一[1]。乙酰肝素酶是一种β-D-葡萄糖醛酸内切酶,与肿瘤侵袭和转移密切相关,通过在特定部位裂解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparin sulphate proteoglycan,HSPG)促进恶性肿瘤的侵袭和转移[2,3]。中药抗肿瘤作用日益引起人们的重视。本研究就姜黄素对卵巢癌微血管内皮细胞生长及乙酰肝素酶表达的影响进行实验研究,以探讨姜黄素抗肿瘤作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

姜黄素(Sigma公司),乙酰肝素酶兔抗人抗体、TRITC标记

作者简介:杨 鹰,男,四川省南充市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事妇科肿瘤方面的研究。电话:(023)68755612,E-mail:yy630917@126.com

收稿日期:2009-02-16;修回日期:2009-03-29

羊抗兔 IgG(Santa Cruz 公司),DMEM(Gibco 公司),四甲基偶氮噻唑蓝(MTT,Amresco 公司);CO_2孵箱(德国 Heraeus 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司)。

乙酰肝素酶 PCR 所需引物由 TaKaRa 公司合成,上游:5′-TTCGATCCCAAGAAGGAATCAAC-3′,下游:5′-GTAGTGATGC-CATGTAACTGAAT-3′,产物大小为 585 bp,退火温度为 59 ℃。GAPDH 上游:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游:5′-TC-CACCACCCTGTTGCTGTA-3′,产物大小为 452 bp,退火温度 61.5 ℃。

1.2　实验分组及观察时间

参照文献[4]方法获取人卵巢癌微血管内皮细胞,置 37 ℃、5% CO_2细胞培养箱内培养,每 3 天更换培养液,细胞长满时,以 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)消化传代。姜黄素组中姜黄素浓度为 2、10、50、250 μg/ml,观察时间为加入姜黄素孵育后 24、48、72 h。正常对照组不加姜黄素。

1.3　实验方法及检测指标

1.3.1　细胞形态学观察　　取对数生长期血管内皮细胞,消化后将血管内皮细胞悬液平均接种于 6 孔培养板中,24 h 后姜黄素组分别加入除菌后含姜黄素的 10% 小牛血清 DMEM 培养基,对照组加入同量的含 10% 小牛血清 DMEM 培养基,倒置显微镜下观察血管内皮细胞形态改变。

1.3.2　MTT 法检测细胞增殖抑制率　　将对数生长期血管内皮细胞接种于 96 孔培养板中,调整细胞数为 5×10^5/ml,每孔 180 μl,24 h 后分别加入姜黄素,每孔总体积 200 μl,设 6 复孔,阴性对照孔只加 DMEM 培养基,继续培养 24、48、72 h。每孔中加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h,小心吸去上清液,加入 DMSO 200 μl,振荡培养板 10 min,使每孔中沉淀完全溶解。将 96 孔板放置在酶标仪上,以 490 nm 为检测波长,测定各孔的光密度值[D(490)],计算抑制率。

抑制率(%) = [1 − 姜黄素组 D(490)值/对照组 D(490)值] ×100%

1.3.3　流式细胞仪检测细胞周期变化　　取对数生长期血管内皮细胞,消化后将细胞悬液分别接种于 25 ml 的玻璃培养瓶中(5×10^4/ml),24 h 后分别加入姜黄素,继续培养 24、48、72 h 后弃培养基,消化获取血管内皮细胞移入 10 ml 离心管中离心 5 min(4 ℃,1 000 r/min),0.1 mol/L PBS 反复漂洗,离心后加入 70% 冷乙醇 4 ℃固定细胞,碘化丙啶(PI)染色 30 min。流式细胞仪上测定细胞增殖指数,重复 6 次计算均数。

1.3.4　免疫荧光染色法检测内皮细胞乙酰肝素酶表达　　常规免疫荧光染色法检测内皮细胞乙酰肝素酶表达,一抗工作液(乙酰肝素酶抗体,1∶200)4 ℃过夜,二抗工作液(TRITC 标记的羊抗兔 IgG)孵育 30 min,荧光显微镜下观察照相,分析结果。

1.3.5　RT-PCR 法检测内皮细胞乙酰肝素酶转录水平　Trizol 法获得总 RNA,紫外分光光度计测定 D(260)/D(280)衡量纯度(比值在 1.6 ~ 2.0 之间),计算浓度。逆转录反应(RT)合成模板 cDNA,PCR 反应条件为:94 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 30 s,引物相应退火温度 30 s,72 ℃延伸 30 s,72 ℃终末延伸 10 min,31 个循环,4 ℃保温。2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,凝胶成像仪记录,结果以光密度比值(目的片段/GAPDH)表示。

1.3.6　细胞培养上清液丙二醛(MDA)含量及乳酸脱氢酶(LDH)活力检测　　取培养液上清,测定 MDA 含量及 LDH 活力,具体操作按试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所)。

1.4　统计学处理

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 14.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　细胞形态观察结果

姜黄素组细胞出现皱缩,折光性减低,随姜黄素浓度增加可见细胞脱落、脱壁漂浮甚至破碎现象,72 h 可见细胞成大片脱落(图 1)。

2.2　细胞生长抑制率检测结果

姜黄素对卵巢癌血管内皮细胞生长抑制作用明显。姜黄素 10 μg/ml 剂量开始出现生长抑制效应;随姜黄素浓度升高,抑制效应愈加显著,250 μg/ml 姜黄素组 72 h 时抑制率显著高于 2、10、50 μg/ml 姜黄素组($P<0.01$)。见表 1。

表 1　不同浓度姜黄素对卵巢癌血管内皮细胞增殖抑制率的影响
(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
2 μg/ml 姜黄素组	3.6 ± 0.5	6.3 ± 1.2	9.7 ± 1.5
10 μg/ml 姜黄素组	10.8 ± 1.9[a]	18.3 ± 2.4[a]	23.7 ± 2.6[a]
50 μg/ml 姜黄素组	25.4 ± 2.6[a]	46.3 ± 5.5[ab]	62.7 ± 5.4[ab]
250 μg/ml 姜黄素组	50.3 ± 4.8[abc]	84.2 ± 4.4[abc]	95.3 ± 1.2[abc]

a: $P<0.01$,与 2 μg/ml 姜黄素组比较;b: $P<0.01$,与 10 μg/ml 姜黄素组比较;c: $P<0.01$,与 50 μg/ml 姜黄素组比较

2.3　姜黄素对血管内皮细胞增殖指数的影响

姜黄素组细胞增殖指数与对照组比较显著下降,有显著的剂量依赖抑制效应和时间效应($P<0.01$),同时观察到 G_0/G_1 期前出现明显亚二倍体峰,即凋亡峰(表 2)。

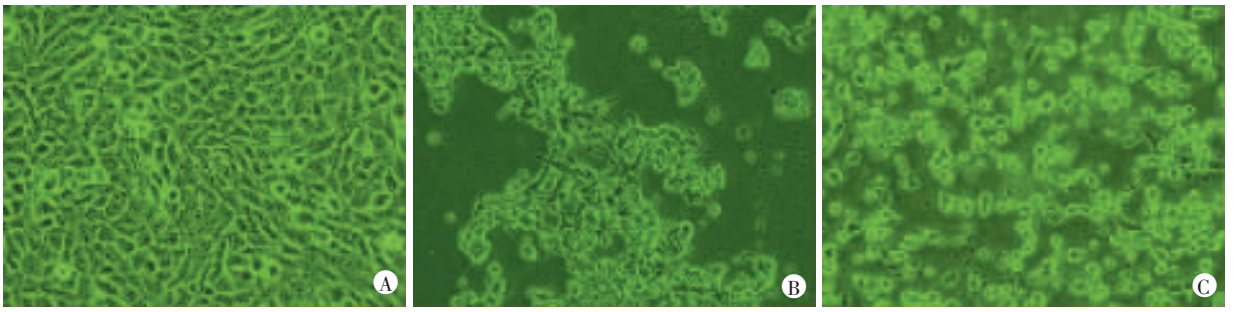
表 2　不同浓度姜黄素对卵巢癌血管内皮细胞增殖指数的影响
(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	34.4 ± 3.0	33.5 ± 3.4	32.8 ± 3.2
姜黄素组			
2 μg/ml	30.2 ± 2.9[a]	27.4 ± 2.6[a]	22.1 ± 2.7[a]
10 μg/ml	20.4 ± 2.6[ab]	18.4 ± 1.6[ab]	16.0 ± 1.8[ab]
50 μg/ml	12.4 ± 1.5[abc]	10.2 ± 0.9[abc]	8.1 ± 0.9[abc]
250 μg/ml	8.4 ± 1.2[abcd]	6.1 ± 0.9[abcd]	4.6 ± 0.8[abcd]

a: $P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.01$,与姜黄素组 2 μg/ml 比较;c: $P<0.01$,与姜黄素组 10 μg/ml 比较;d: $P<0.01$,与姜黄素组 50 μg/ml 比较

2.4　免疫荧光法检测内皮细胞乙酰肝素酶表达结果

姜黄素组乙酰肝素酶表达与正常对照组比较显著下降($P<0.01$),有显著的剂量依赖和时间效应,250 μg/ml 姜黄素组 72 h 时乙酰肝素酶光密度值为(2.95 ± 0.32) $\times10^3$,显著高于 2、10、50 μg/ml 姜黄素组($P<0.01$)。见图 2、表 3。



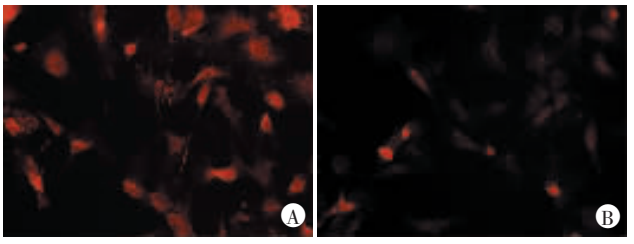
A：正常对照组；B：50 μg/ml 姜黄素组；C：250 μg/ml 姜黄素组

图1　加入不同浓度姜黄素后72 h血管内皮细胞形态学观察（倒置显微镜×200）

表3　不同浓度姜黄素对卵巢癌血管内皮细胞乙酰肝素酶表达的影响（$\times 10^3$，$\bar{x} \pm s$）

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	26.58 ± 2.84	27.48 ± 2.94	26.81 ± 2.49
姜黄素组			
2 μg/ml	20.36 ± 2.52[a]	16.31 ± 1.56[a]	13.14 ± 1.52[a]
10 μg/ml	15.13 ± 1.75[ab]	11.54 ± 1.18[ab]	7.13 ± 0.82[ab]
50 μg/ml	10.67 ± 0.99[abc]	7.55 ± 0.78[abc]	5.14 ± 0.69[abc]
250 μg/ml	6.84 ± 0.81[abcd]	4.24 ± 0.56[abcd]	2.95 ± 0.32[abcd]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与姜黄素组2 μg/ml比较；c：$P<0.01$，与姜黄素组10 μg/ml比较；d：$P<0.01$，与姜黄素组50 μg/ml比较

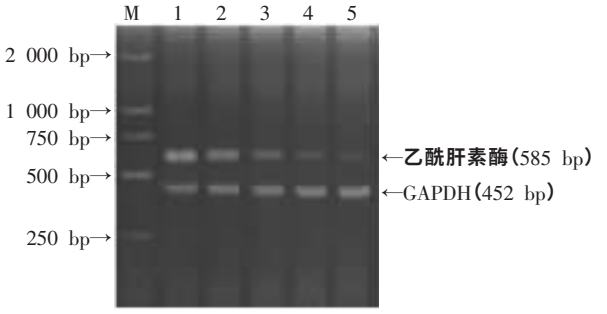


A：对照组；B：50 μg/ml 姜黄素组

图2　免疫荧光染色法检测血管内皮细胞48 h乙酰肝素酶的表达（×400）

2.5　RT-PCR法检测内皮细胞乙酰肝素酶转录水平

RT-PCR结果显示，姜黄素组乙酰肝素酶mRNA水平与对照组比较显著降低（$P<0.01$），有显著的剂量依赖效应和时间效应，250 μg/ml姜黄素组72 h时光密度比值显著高于2、10、50 μg/ml姜黄素组（$P<0.01$）。见图3、表4。



M：DNA标准（DL 2000）；1：对照组；2：姜黄素组2 μg/ml；3：姜黄素组10 μg/ml；4：姜黄素组50 μg/ml；5：姜黄素组250 μg/ml

图3　卵巢癌血管内皮细胞72 h乙酰肝素酶RT-PCR检测结果

表4　不同浓度姜黄素对卵巢癌血管内皮细胞乙酰肝素酶转录水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	1.77 ± 0.18	1.75 ± 0.19	1.73 ± 0.18
姜黄素组			
2 μg/ml	1.31 ± 0.16[a]	0.99 ± 0.11[a]	0.78 ± 0.09[a]
10 μg/ml	1.01 ± 0.15[ab]	0.78 ± 0.08[ab]	0.63 ± 0.06[ab]
50 μg/ml	0.82 ± 0.09[abc]	0.64 ± 0.06[abc]	0.41 ± 0.05[abc]
250 μg/ml	0.42 ± 0.06[abcd]	0.36 ± 0.04[abcd]	0.21 ± 0.03[abcd]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与姜黄素组2 μg/ml比较；c：$P<0.01$，与姜黄素组10 μg/ml比较；d：$P<0.01$，与姜黄素组50 μg/ml比较

2.6　细胞培养上清液MDA及LDH活力检测结果

与对照组比较，姜黄素组细胞培养上清液LDH活性显著升高（$P<0.01$），MDA含量显著增加（$P<0.01$），有显著的剂量依赖效应和时间效应（表5）。

表5　不同浓度姜黄素对卵巢癌血管内皮细胞培养液LDH、MDA水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	LDH（U/L）			MDA（nmol/mg）		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	45.6 ± 4.3	50.2 ± 4.8	55.3 ± 5.1	2.12 ± 0.23	2.05 ± 0.19	2.08 ± 0.22
姜黄素组						
2 μg/ml	76.3 ± 6.4[a]	95.3 ± 8.6[a]	112.3 ± 10.2[a]	4.69 ± 0.36[a]	5.97 ± 0.61[a]	6.36 ± 0.55[a]
10 μg/ml	136.4 ± 10.3[ab]	164.8 ± 15.2[ab]	186.7 ± 15.9[ab]	7.94 ± 0.78[ab]	11.69 ± 1.46[ab]	13.47 ± 1.58[ab]
50 μg/ml	203.6 ± 22.3[abc]	245.6 ± 22.9[abc]	280.9 ± 25.4[abc]	13.98 ± 1.97[abc]	16.47 ± 1.62[abc]	19.64 ± 2.14[abc]
250 μg/ml	331.3 ± 30.5[abcd]	381.7 ± 32.7[abcd]	420.5 ± 32.9[abcd]	20.15 ± 2.13[abcd]	24.47 ± 2.21[abcd]	28.77 ± 2.99[abcd]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与姜黄素组2 μg/ml比较；c：$P<0.01$，与姜黄素组10 μg/ml比较；d：$P<0.01$，与姜黄素组50 μg/ml比较

3　讨论

在人类多种恶性肿瘤中均可检测到乙酰肝素酶的表达,并与肿瘤的临床预后不良相关。乙酰肝素酶的表达可引起细胞外基质及基质膜的降解、释放和活化肝素结合型的生长因子如碱性蛋白生长因子(bF-GF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)等,诱导内皮细胞、成纤维细胞及肿瘤细胞的增殖及迁移,释放活化的尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)、组织型纤溶酶原激活物(tPA)及纤溶酶,并激活某些基质金属蛋白酶[5]。本研究选择卵巢癌血管内皮细胞为研究对象,基于卵巢癌血管内皮细胞乙酰肝素酶高表达,并在卵巢癌发生、发展及转移中的显著作用,探讨姜黄素对卵巢癌血管内皮细胞的影响,并通过乙酰肝素酶水平的检测探讨其影响机制。本研究结果表明,在培养的卵巢癌血管内皮细胞中加入姜黄素后,卵巢癌血管内皮细胞出现显著的损伤效应,细胞培养上清液 MDA 生成增多,LDH 水平增加,细胞存活率显著下降。MDA 是脂质过氧化过程中的代谢产物,其生成量间接反应细胞损伤程度,而且 MDA 可在细胞膜内形成交联,使膜成分多聚化,进而导致膜结构和流动性改变,膜通透性上升,细胞质 LDH 外漏,活性降低[6,7]。提示姜黄素是一种具有显著肿瘤抑制特性的药物,而且具有剂量和时间效应。细胞周期检测结果提示姜黄素作用后卵巢癌血管内皮细胞出现了显著的增殖指数下降和细胞凋亡,而且存在剂量依赖性,提示姜黄素对卵巢癌血管内皮细胞的增殖抑制机制之一是影响细胞 DNA 的复制和有丝分裂,使卵巢癌血管内皮细胞阻滞于 G_2/M 期。乙酰肝素酶水平检测表明在姜黄素作用过程中乙酰肝素酶水平发生了显著的变化,免疫组化及 RT-PCR 结果表明,不同浓度的姜黄素作用后,卵巢癌血管内皮细胞乙酰肝素酶 mRNA 转录和蛋白表达受到显著抑制,提示姜黄素抑制卵巢癌血管内皮细胞增殖的机制之一极有可能是影响乙酰肝素酶 mRNA 水平及蛋白合成途径。

姜黄素对多种肿瘤细胞均具有明显的抑制作用,其作用主要表现在 3 个方面[8-10]:① 诱发肿瘤细胞凋亡:姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡这一现象可见于各种不同的肿瘤研究中,多数都可发生“经典性”凋亡(细胞皱缩、染色质浓缩与断裂)。本研究中同样发生了细胞凋亡,表明姜黄素诱导凋亡同样是其作用于卵巢癌血管内皮细胞的途径。② 阻断肿瘤细胞的生长信号转导通路:细胞的通讯信息通过跨膜信号转导过程可从胞外环境传入细胞或实现胞间通讯,细胞通讯过程中平衡的丧失可以导致致癌性、肿瘤的侵袭和转移。③ 抑制肿瘤血管生成:姜黄素具有抗肿瘤侵袭和抗肿瘤血管新生的特征,它能抑制 H-ras 基因转染的高侵袭表型的人乳腺癌上皮细胞(H-ras MCF10A),下调 MMP-2,从而抑制癌细胞转移。从肿瘤血管生成抑制途径探讨肿瘤防治可能是肿瘤治疗的突破口,本研究就卵巢癌血管内皮细胞为研究对象,证实了姜黄素的抗肿瘤作用的可能机制。

原发肿瘤的生长和转移依赖于血管生成,肿瘤即可通过肿瘤血管从宿主获取营养,又可通过肿瘤血管源源不断地向宿主提供转移细胞,最终导致肿瘤转移[11,12]。抑制血管新生已成为近年来一种治疗肿瘤及其他与病理性血管生成有关的人类疾病的新策略,积极开展姜黄素抗癌作用及机理研究有着十分重要的理论意义和实用价值,相信中药中的某些具体成分将作为抗致突变剂、抗促癌剂及癌的化学预防药从而打开新的领域。

参考文献:

[1] Raspollini M R, Taddei G L. Tumor markers in ovarian carcinoma[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2007, 97(3): 175 - 181.

[2] McKenzie E A. Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation[J]. Br J Pharmacol, 2007, 151(1): 1 - 14.

[3] Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(12): 2018 - 2039.

[4] 蒋雪峰, 白家驷, 卞修武, 等. 血管内皮生长因子诱导的胶质瘤源性微血管内皮细胞体外三维成型特性[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(9): 579 - 582.

[5] Miao H Q, Liu H, Navarro E, *et al*. Development of heparanase inhibitors for anti-cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(18): 2101 - 2111.

[6] Yekkala K, Baudino T A. Inhibition of intestinal polyposis with reduced angiogenesis in ApcMin/ + mice due to decreases in c-Myc expression[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(12): 1296 - 1303.

[7] Xu X, Wang B, Ye C, *et al*. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer[J]. Cancer Lett, 2008, 261(2): 147 - 157.

[8] Esmat A, El-Demerdash E, El-Mesallamy H, *et al*. Toxicity and oxidative stress of acrylonitrile in rat primary glial cells: preventive effects of N-acetylcysteine[J]. Toxicol Lett, 2007, 171(3): 111 - 118.

[9] Sohn J H, Han K L, Choo J H, *et al*. Macelignan protects HepG2 cells against tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage[J]. Biofactors, 2007, 29(1): 1 - 10.

[10] 安继红, 陈　鹏, 辛秀芹. 姜黄素体外抗肿瘤作用的观察[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(2): 24 - 25.

[11] Cheng Y, Kozubek A, Ohlsson L, *et al*. Curcumin decreases acid sphingomyelinase activity in colon cancer Caco-2 cells[J]. Planta Med, 2007, 73(8): 725 - 730.

[12] Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar A P. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells[J]. Anticancer Res, 2001, 21(2A): 873 - 878.

(编辑　吴培红)