DOI:10.16016/j.1000-5404.201408109

论著

新型姜黄素纳米粒对Lewis肺癌细胞增殖、凋亡的影响

李松霖,谭群友,王如文,方春抒,于 杰,祁 迪 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科,全军胸外科研究所)

[摘要] **目的** 探讨一种新型的姜黄素纳米粒(curcumin nanoparticles,Cur-NPs)对Lewis肺癌细胞LLC增殖与凋亡的影响。**方法** 游离姜黄素(curcumin,Cur)和Cur-NPs分别作用于LLC细胞24 h,MTT检测其对LLC细胞的增殖抑制作用。20 μmol/L的药物作用于细胞24 h后,流式细胞术检测Cur-NPs对细胞周期、细胞凋亡、细胞内活性氧、细胞内钙离子浓度、细胞线粒体膜电位的影响,并与Cur进行对照。**结果** Cur-NPs可以明显增强Cur对LLC细胞的增殖抑制,IC_{50}从34.91 μmol/L降为10.65 μmol/L ($P<0.05$)。Cur-NPs明显提高了Cur诱导LLC细胞凋亡($P<0.05$)、抑制细胞周期于S期($P<0.05$)、升高细胞内钙离子浓度($P<0.05$)、升高细胞活性氧浓度($P<0.05$)、降低细胞线粒体膜电位($P<0.05$)的能力。**结论** 新型姜黄素纳米粒可明显提高游离姜黄素对LLC细胞的体外增殖抑制作用,可能与其促进细胞凋亡有关。

[关键词] 姜黄素;纳米粒;Lewis肺癌;细胞增殖;凋亡
[中图法分类号] R285.5;R730.23;R734.2 [文献标志码] A

Effect of novel curcumin nanoparticles on proliferation and apoptosis of Lewis lung cancer cells *in vitro*

Li Songlin, Tan Qunyou, Wang Ruwen, Fang Chunshu, Yu Jie, Qi Di (Department of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of novel curcumin nanoparticles (Cur-NPs) on the proliferation and apoptosis of Lewis lung cancer (LLC) cells *in vitro*. **Methods** LLC cells were cultured with different concentrations of Cur-NPs and free curcumin (Cur) for 24 h, and the cell proliferation was evaluated by MTT assay. After 20 mol/L of Cur-NPs and Cur treatment on LLC cells for 24 h, the cell apoptosis, cell cycle arrest, reactive oxygen accumulation, intracellular Ca^{2+} accumulation and mitochondrial membrane potential were analyzed by flow cytometry. **Results** Cur-NPs remarkably enhanced Cur-induced proliferation inhibition of LLC cells *in vitro*, and IC_{50} decreased from 34.91 to 10.65 mol/L ($P<0.05$). Cur-NPs significantly improved Cur-induced apoptosis ($P<0.05$), arrested cell cycle at S phase ($P<0.05$), increased reactive oxygen accumulation ($P<0.05$) and intracellular Ca^{2+} accumulation ($P<0.05$), and decreased mitochondrial membrane potential ($P<0.05$). **Conclusion** Cur-NPs can enhance Cur-induced proliferation inhibition in LLC cells, which may be related to promotion of cell apoptosis.

[**Key words**] curcumin; nanoparticles; Lewis lung carcinoma; proliferation; apoptosis

Corresponding author: Tan Qunyou, Tel: 86-23-68757986, E-mail: tanqy001@163.com

肺癌的发病率和病死率均居恶性肿瘤的首位[1],腺癌是肺癌的主要病理类型之一,近年来发病率呈上升趋势[2]。研究表明,从传统中药姜黄中提取的姜黄素,对乳腺癌、肺癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌等恶性肿瘤有较好的疗效,且没有明显的毒副作用,但由于口服给药生物利用度低,限制了其临床应用[3-4]。姜黄素纳米粒可以增加姜黄素的水溶性,增加其稳定性,进而提高其生物利用度[5-6]。本研究采用我们新近研制成功、稳定性好的一种新型姜黄素纳米粒(curcumin

[通信作者] 谭群友,电话:(023)68757986,E-mail:tanqy001@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140922.1549.002.html(2014-09-22)

nanoparticles,Cur-NPs),体外考察其对 Lewis 肺癌细胞 LLC 增殖、凋亡的影响,并与游离姜黄素(curcumin,Cur)进行对比,旨在考察 Cur-NPs 是否能增强 Cur 对 Lewis 肺癌细胞增殖的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

姜黄素购自美国 Sigma 公司,新型姜黄素纳米粒按我们前期研究的方法自制[6];DMEM、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;MTT、propidium iodide(PI)、RNase A、细胞凋亡试剂盒 Annexin V FITC-PI、钙离子检测探针 Fluo-3、活性氧检测探针 DCFH、线粒体膜电位检测探针 Rhodamine123(Rho123)购自碧云天生物技术研究所。流式细胞术采用美国 BD FACSVantage 型流式细胞仪。Lewis 肺癌细胞 LLC 细胞系由第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所馈赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LLC 细胞用含有 10% 新生胎牛血清(FBS)及 0.5% 青链霉素的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱培养,取处于生长对数期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测姜黄素纳米粒对 LLC 细胞增殖的影响 取对数期细胞,接种于 96 孔板中,每孔接种 5 000 个/100 μL,培养 12 h 细胞贴壁后,再加入等体积含不同浓度药物的完全培养基。设阴性对照组(Ct 组)、游离姜黄素组(Cur 组)、新型姜黄素纳米粒组(Cur-NPs 组)和纳米粒空白载体组(NPs 组),每组设 3 个复孔。药物终浓度设置为 2.5、5.0、10.0、20.0 μmol/L 和 40.0 μmol/L。培养 24 h,每孔加入 MTT 20 μL,继续培养 4 h,彻底弃去上清液后,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡器充分振荡后,用酶标仪测定各孔在 490 nm 处的光密度 $D(490)$ 值,按以下公式计算细胞抑制率:细胞抑制率 = [1 − 药物组 $D(490)$/阴性对照组 $D(490)$] × 100%。实验重复 3 次。

1.2.3 细胞周期检测 将对数期细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁后,用 20 μmol/L 的游离姜黄素、新型姜黄素纳米粒和纳米粒空白载体处理细胞。作用 24 h 后,胰酶消化并取细胞悬液移入离心管中离心,吸去上清液,洗涤 2 ~ 3 次,加入 70% 冷乙醇 4 ℃ 固定细胞 24 h,加入碘化丙啶(PI)、RNase,37 ℃ 孵育 30 min 后在流式细胞仪上测定细胞周期。

1.2.4 细胞凋亡检测 将对数期细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁后,用 20 μmol/L 的游离姜黄素、新型姜黄素纳米粒和纳米粒空白载体处理细胞。作用 24 h 后,胰酶消化并取细胞悬液移入离心管中离心,吸去上清液,洗涤 2 ~ 3 次,加入 Annexin V-FITC、PI 染液,染色 5 min 后上机检测凋亡率。

1.2.5 细胞活性氧检测 将对数期细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁后,用 20 μmol/L 的游离姜黄素、新型姜黄素纳米粒和纳米粒空白载体处理细胞。作用 24 h 后,去除细胞培养液,加入 DCFH-DA 染液,37 ℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,在流式细胞仪上检测荧光强度变化。

1.2.6 细胞内钙离子浓度检测 将对数期细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁后,用 20 μmol/L 的游离姜黄素、新型姜黄素纳米粒和纳米粒空白载体处理细胞。作用 24 h 后,胰酶消化并取细胞悬液移入离心管中离心,吸去上清液,洗涤 2 ~ 3 次,加入 Fluo-3 荧光探针,染色 30 min 后在流式细胞仪上检测荧光强度变化。

1.2.7 细胞线粒体膜电位检测 将对数期细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁后,用 20 μmol/L 的游离姜黄素、新型姜黄素纳米粒和纳米粒空白载体处理细胞。作用 24 h 后,胰酶消化并取细胞悬液移入离心管中离心,吸去上清液,洗涤 2 ~ 3 次,加入 Rhodamine123 荧光探针,染色 30 min 后在流式细胞仪上检测荧光强度变化。

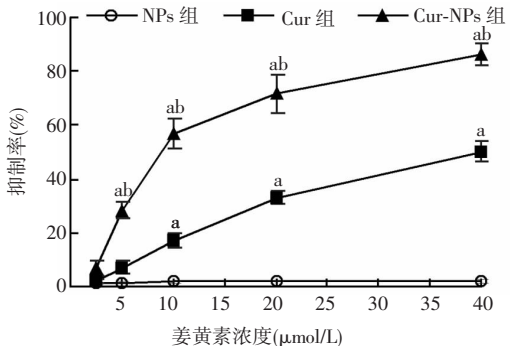
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料行 student's t 检验。

2 结果

2.1 姜黄素纳米粒对 LLC 细胞增殖的影响

随着姜黄素浓度增加,细胞生长抑制率增加,在相同浓度下,姜黄素纳米粒提高了姜黄素对 LLC 细胞增殖的抑制率,空白载体对 LLC 细胞的增殖无明显影响。姜黄素对 LLC 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 34.91 μmol/L,姜黄素纳米粒对 LLC 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 10.65 μmol/L,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。



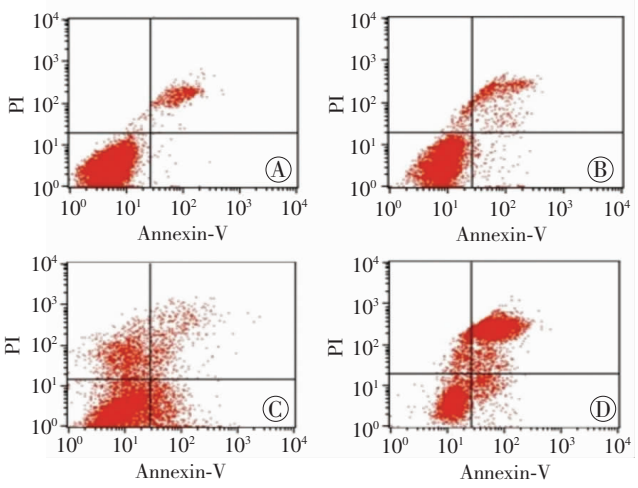
a:$P < 0.05$,与 NPs 组比较;b:$P < 0.05$,与 Cur 组比较

图 1 MTT 检测不同浓度姜黄素及其纳米粒对 LLC 细胞的抑制作用

2.2 姜黄素纳米粒对 LLC 细胞凋亡的影响

与对照组比较,姜黄素可以诱导 LLC 细胞凋亡,姜

黄素纳米粒可以提高其诱导凋亡的能力。20 μmol/L 的药物作用 LLC 细胞 24 h 后,各组凋亡率分别为 Ct 组(4.94 ±0.81)%、NPs 组(3.32 ±0.52)%、Cur 组(7.43 ± 1.13)%和 Cur-NPs 组(67.69 ±9.86)%。Cur-NPs 组与 Cur 组比较,差异有统计学意义(P <0.05,图 2)。

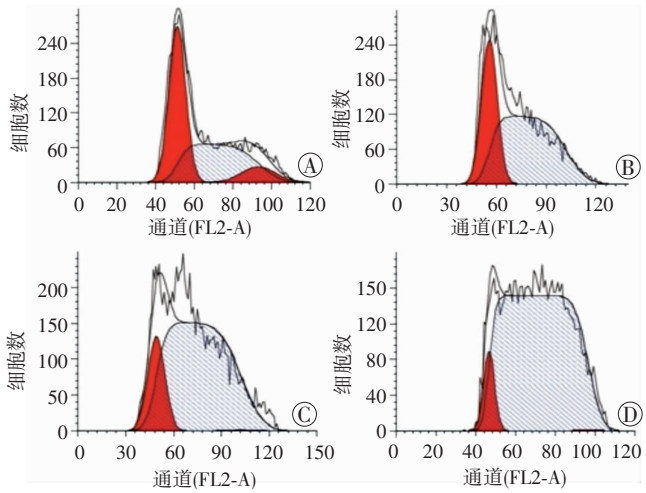


A:Ct 组;B:NPs 组;C:Cur 组;D:Cur-NPs 组

图 2　姜黄素及其纳米粒对 LLC 细胞凋亡的影响

2.3　姜黄素纳米粒对 LLC 细胞周期的影响

与对照组比较,姜黄素可以阻滞 LLC 细胞周期于 S 期,姜黄素纳米粒可以提高其阻滞能力。20 μmol/L 的药物作用 LLC 细胞 24 h 后,各组 S 期比例分别为 Ct 组(43.67 ±8.92)%、NPs 组(64.43 ±10.12)%、Cur 组(81.57 ±9.15)%和 Cur-NPs 组(92.20 ±7.65)%。Cur-NPs 组与 Cur 组比较,有统计学差异(P <0.05,图 3)。

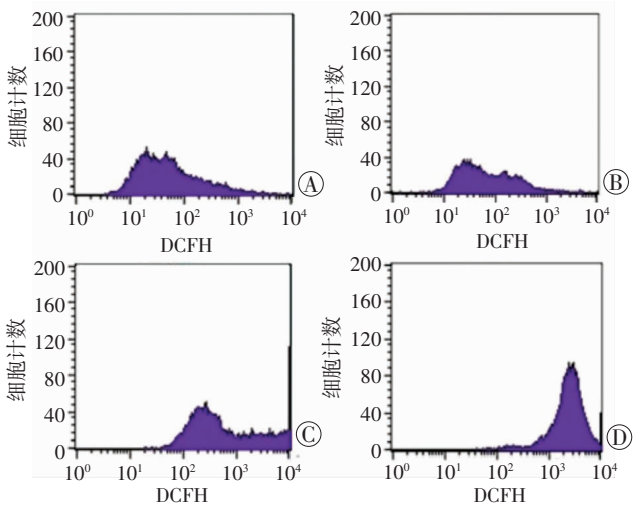


A:Ct 组;B:NPs 组;C:Cur 组;D:Cur-NPs 组

图 3　姜黄素及其纳米粒对 LLC 细胞周期的影响

2.4　姜黄素纳米粒对 LLC 细胞内活性氧的影响

Ct 组及 NPs 组荧光强度较微弱,药物处理 24 h 后胞内活性氧浓度增加,姜黄素纳米粒的荧光强度高于姜黄素原料药的荧光强度。20 μmol/L 的药物作用 LLC 细胞 24 h 后,各组活性氧荧光强度分别为 Ct 组(110.76 ±28.31)、NPs 组(127.34 ±31.25)、Cur 组(2 088.01 ±238.19)和 Cur-NPs 组(2 568.67 ±361.85)。Cur-NPs 组与 Cur 组比较,差异有统计学意义(P < 0.05,图 4)。

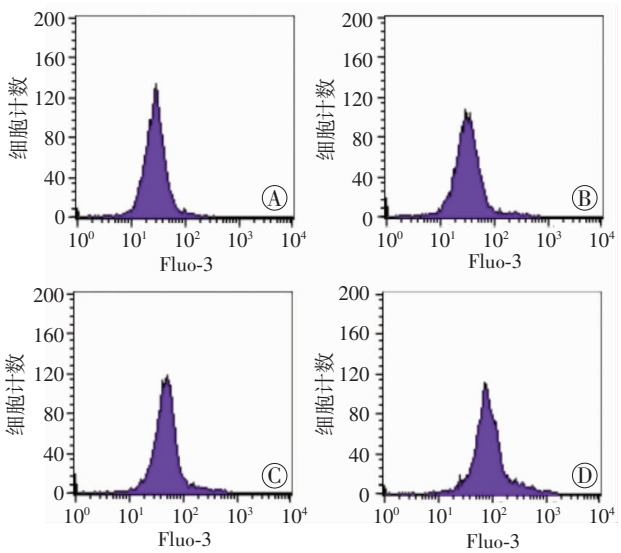


A:Ct 组;B:NPs 组;C:Cur 组;D:Cur-NPs 组

图 4　姜黄素及其纳米粒对 LLC 细胞活性氧的影响

2.5　姜黄素纳米粒对 LLC 细胞内钙离子浓度的影响

Ct 组及 NPs 组荧光强度较微弱,药物处理 LLC 细胞 24 h 后胞内钙离子浓度增加,姜黄素纳米粒的荧光强度高于姜黄素原料药的荧光强度。20 μmol/L 的药物作用 LLC 细胞 24 h 后,各组钙离子荧光强度分别为 Ct 组(28.99 ±3.91)、NPs 组(35.79 ±4.85)、Cur 组(52.11 ±11.28)和 Cur-NPs 组(97.85 ±15.68)。Cur-NPs 组与 Cur 组比较,差异有统计学意义(P < 0.05,图 5)。

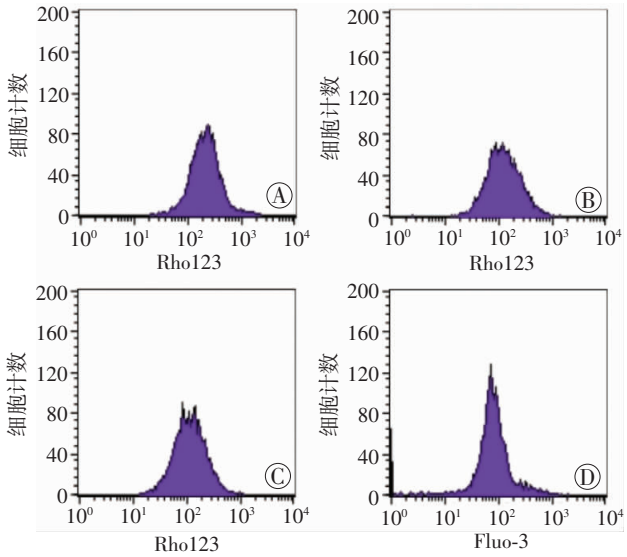


A:Ct 组;B:NPs 组;C:Cur 组;D:Cur-NPs 组

图 5　姜黄素及其纳米粒对 LLC 细胞内钙离子浓度的影响

2.6 姜黄素纳米粒对LLC细胞线粒体膜电位的影响

20 μmol/L的药物作用LLC细胞24 h后,各组线粒体膜电位荧光强度分别为Ct组(228.03±38.64)、NPs组(184.34±26.84)、Cur组(128.97±18.56)和Cur-NPs组(94.00±12.11)。姜黄素作用LLC细胞24 h后细胞线粒体膜电位降低,姜黄素纳米粒的膜电位更低,两者有统计学差异($P<0.05$,图6)。



A: Ct组;B: NPs组;C: Cur组; D: Cur-NPs组

图6 姜黄素及其纳米粒对LLC细胞线粒体膜电位的影响

3 讨论

姜黄素是一种天然提取物,研究发现其有明显的抗癌活性而没有毒副作用,具有广阔的开发前景,美国国立肿瘤所(NCI)已经将其列为第3代防癌药物进行研究[7]。但由于游离姜黄素的不稳定、口服生物利用度低等缺点,研究者们一直试图通过制剂技术来改善其不稳定性,提高其生物利用度[8]。已有学者报道了游离姜黄素对多种肿瘤细胞的抑制作用[9-11],但是姜黄素及其纳米制剂对LLC细胞增殖与凋亡的影响的报道较少。

本课题组前期通过薄膜超声法制备姜黄素纳米粒,明显增加了姜黄素的溶解性和稳定性,提高了其生物利用度[6]。进而我们采用MTT检测发现游离姜黄素和姜黄素纳米粒均可抑制LLC细胞的增殖,二者对LLC细胞24 h内的IC_{50}分别为34.91、10.65 μmol/L,表明姜黄素纳米粒可显著提高游离姜黄素对LLC细胞的增殖抑制作用。新型姜黄素纳米粒提高了姜黄素的溶解度,相对于游离姜黄素更容易进入细胞膜,通过细胞内吞或者其他转运方式进入细胞后,释放出游离姜黄素,提高了肿瘤细胞对姜黄素的摄取,而且新型姜黄素纳米粒更稳定,不容易氧化,可以更多地进入细胞。我们研究制的这种新型姜黄素纳米粒还有缓释效果,可以延长药效作用。由于上述的原因新型姜黄素纳米粒极明显提高了姜黄素对LLC细胞的抑制增殖能力。

凋亡是抑制细胞增殖的重要原因[12],因此我们采用流仪细胞技术检测了LLC细胞的凋亡情况,结果显示,同一浓度的姜黄素、姜黄素纳米粒作用LLC细胞24 h后,Ct组、Cur组和Cur-NPs组LLC细胞的凋亡率分别为4.94%、7.43%和67.69%,提示姜黄素可以诱导LLC细胞凋亡,姜黄素纳米粒可以显著提高其诱导凋亡的能力。姜黄素可以阻滞LLC细胞周期于S期,或许是姜黄素抑制细胞增殖的重要原因之一[6],而姜黄素纳米粒可以提高其阻滞能力。

活性氧、细胞内钙离子浓度和线粒体膜电位与细胞凋亡息息相关。本研究发现空载体荧光强度较微弱,药物处理24 h后胞内活性氧浓度增加,姜黄素纳米粒的荧光强度高于游离姜黄素。经药物处理24 h后LLC细胞胞内钙离子浓度增加,姜黄素纳米粒的荧光强度高于游离姜黄素。游离姜黄素作用LLC细胞24 h后细胞线粒体膜电位降低,新型姜黄素纳米粒的膜电位更低。

综上所述,姜黄素及其新型姜黄素纳米粒对LLC细胞增殖、生长有显著的抑制作用,而这种姜黄素纳米粒可明显提高游离姜黄素的抗癌效果。游离姜黄素及新型姜黄素纳米粒均可以诱导LLC细胞凋亡和抑制其细胞周期于S期。二者诱导LLC细胞凋亡可能与其增加细胞内钙离子浓度、细胞内活性氧和降低细胞线粒体膜电位相关[13],但其机制尚不清楚,需要今后进一步研究。

参考文献:

[1] Couzin-Frankel J. Clinical trials. Experimental cancer therapies move to the front line [J]. Science, 2012, 335(6066): 282-283.

[2] Namad T, Wang J, Shipley R, *et al*. Thyroid metastasis from nonsmall cell lung cancer[J]. Case Rep Oncol Med, 2013, 2013: 208213.

[3] Park W, Amin A R, Chen Z G, *et al*. New perspectives of curcumin in cancer prevention[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6(5): 387-400.

[4] Wang S, Su R, Nie S, *et al*. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals[J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(4): 363-376.

[5] Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers R M, *et al*. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment [J]. Biomaterials, 2014, 35(10): 3365-3383.

[6] Tan Q, Wu J, Li Y, *et al*. A supermolecular curcumin for enhanced antiproliferative and proapoptotic activities: molecular characteristics, computer modeling and *in vivo* pharmacokinetics [J]. Nanotechnology, 2013, 24(3): 035102.
[7] Wang P, Zhang L, Peng H, *et al*. The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both *in vitro* and *in vivo*[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013, 33(8): 4802 – 4808.
[8] Yang C S, Wang H, Hu B. Combination of chemopreventive agents in nanoparticles for cancer prevention[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6(10): 1011 – 1014.
[9] Kazemi-Lomedasht F, Rami A, Zarghami N. Comparison of inhibitory effect of curcumin nanoparticles and free curcumin in human telomerase reverse transcriptase gene expression in breast cancer [J]. Adv Pharm Bull, 2013, 3(1): 127 – 130.
[10] 毛蜀, 何密斯, 刘桂元, 等. 姜黄素对髓母细胞瘤 P13K/Akt 信号通路的作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(6): 518 – 522.
[11] 吴晓健, 吴凯南. 姜黄素对人乳腺癌 MCF-7 细胞抗增殖作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(18): 1870 – 1872.
[12] Shukla S, Pia-Patric I R, Thinagararjan S, *et al*. A DNA methylation prognostic signature of glioblastoma: identification of NPTX2-PTEN-NF-κB nexus[J]. Cancer Res, 2013, 73(22): 6563 – 2573.
[13] Ju L, Zhang G, Zhang X, *et al*. Proteomic analysis of cellular response induced by multi-walled carbon nanotubes exposure in A549 cells[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84974.

（**收稿**:2014-08-15;**修回**:2014-09-15）
（编辑　王　红）

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410150

个案与短篇

鞍区胶样囊肿 1 例

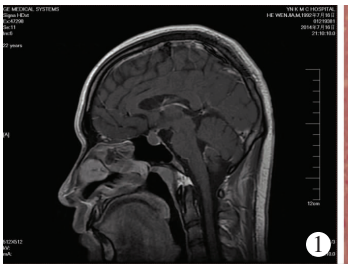
邓　舒[1],鲁学文[1],李经辉[1],余化霖[1],王春艳[2]　（650032 昆明,昆明医科大学第一附属医院:神经外二科[1],病理科[2]）

[**关键词**]　鞍区;胶样囊肿;颅内肿瘤
[**中图法分类号**]　R739.41　[**文献标志码**]　B

胶样囊肿最先由 Wallman 于 1858 年报道,Dandy[1] 在 1921 年成功实施了第 1 例手术。胶样囊肿是颅内良性病变,占脑部肿瘤的 0.5% ~ 1%[2],十分少见。绝大多数位于第三脑室,侧脑室、透明隔、脑外、鞍区的胶样囊肿更为少见[3]。本科于 2014 年 7 月 16 日收治 1 例,手术取得良好效果,现报告如下。

1　临床资料

患者男性,22 岁,因“头痛、头晕 1 年”入院。患者 1 年前出现头痛、头晕,间断性发作,以鼻根及前额部明显。查体:双眼视力 0.12,视野无缺损。甲功、垂体激素均正常。CT 示:垂体窝内见软组织灶,大小约 1.0 cm × 0.9 cm,病灶向鞍上生长边界清楚,密度均匀,增强后强化不明显。MRI 提示:鞍内及鞍上占位病变呈等 T_1、等 T_2 信号,大小约 1.1 cm × 1.6 cm × 0.9 cm,增强后强化不明显,垂体柄向左偏移,与视交叉相临(图 1)。术前诊断:垂体腺瘤可能。在显微镜下行经单鼻孔-蝶窦鞍区病变切除术,切开鞍底硬脑膜,见灰白、半透明、胶冻样组织溢出。病理学诊断:胶样囊肿(图 2)。术后患者头痛症状完全缓解,视力较术前提高。



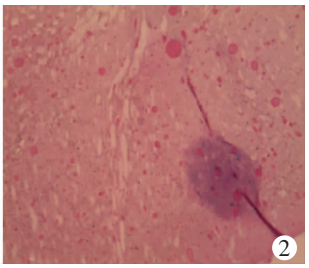


图 1　鞍区胶样囊肿患者 MRI 表现
图 2　鞍区胶样囊肿患者病理学观察　（HE ×200）

2　讨论

胶样囊肿在组织学上通常来源于发育过程中变异的室管膜、脉络丛、神经上皮和异位呼吸道上皮细胞[4]。通常表现为进行性、体位性头痛引起的梗阻性脑积水。然而,少数患者出现严重梗阻性脑积水和突然死亡,可能与较大的肿瘤堵塞室间孔引起急性脑积水有关。通常在 CT 平扫时见到三脑室前部或室间孔附近有类圆形的高密度影,边界清晰增强通常不强化。MRI 扫描时 T_1WI 多呈高信号,T_2WI 多呈低信号,增强

（下转 149 页）

[**通信作者**]　余化霖,E-mail:yuhl308@163.com
[**优先出版**]　http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141210.1649.017.html(2014-12-10)