恶性肿瘤的分子诊断 文章编号：0253-3626（2011）06-0650-04

固体脂质纳米姜黄素联合顺铂对卵巢癌 SKOV3 的增殖及 Bax/Bcl-2 蛋白表达的实验研究

邓舒婷[1]，甘 霖[2]，周 琦[1]，徐建业[2]，李少林[1]

（1. 重庆医科大学基础医学院放射医学教研室，重庆 400016；2. 重庆市肿瘤研究所妇瘤科，重庆 400030）

【摘 要】目的：研究固体脂质纳米姜黄素（Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles，SLN-Cur）与顺铂（Cisplatin，DDP）联用对人卵巢癌 SKOV3 细胞株生长的影响及促凋亡作用。方法：姜黄素（Curcumin，Cur）制备成 SLN-Cur 新型给药系统，分别检测 DDP、Cur、SLN-Cur、DDP+Cur、DDP+SLN-Cur 对人卵巢癌 SKOV3 细胞株凋亡形态学变化及超微结构变化，细胞凋亡率及凋亡相关基因蛋白的表达。结果：SLN-Cur 可抑制 SKOV3 细胞生长，抑制率与药物浓度及作用时间成依赖关系，24 h IC_{50}=40.14 μmol/L，DDP 与 SLN-Cur 联合诱导细胞凋亡作用增强，具有显著协同作用；Bcl-2 表达减弱，Bax 表达增强。结论：SLN-Cur 合用 DDP 对 SKOV3 细胞株具有较好的抑制增殖及促凋亡作用，通过下调 Bcl-2 表达及上调 Bax 表达而诱导细胞凋亡。

【关键词】固体脂质纳米粒；姜黄素；顺铂；人卵巢癌 SKOV3 细胞株；细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-28

Effect of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles and DDP on proliferation and expression of Bax/Bcl-2 protein in human ovarian cell line SKOV3

DENG Shu-ting[1], GAN Lin[2], ZHOU Qi[1], XU Jian-ye[2], Li Shao-lin[1]

(1. Department of Radiation Medicine, College of Basic Medcine, Chongqing Medical University;

2. Department of Gynecology, Chongqing Tumor Institue)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles (SLN-Cur) in combination with cisplatin (DDP) on growth of human ovarian cancer cell line SKOV3 and its apoptosis induction. ***Methods***: SLN-Cur was prepared in an aque ous system using curcumin as a model drug. SKOV3 cells were treated with curcumin, DDP, SLN-Cur, curcumin combined with DDP and SLN-Cur combined with DDP respectively. Cell morphology variation and cell ultrastructure were observed; the apoptosis rate of SKOV3 cell and the expression of apoptosis-associated gene proteins were detected. ***Results***: Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles (SLN-Cur) could effectively inhibit SKOV3 in a dose-and-time-dependent manner. The IC_{50} of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles (SLN-Cur) to SKOV3 was 40.14 μmol/L in 24 hours. Simultaneous administration of SLN-Cur and DDP resulted in synergistic cytotoxicity and apoptosis for SKOV3 cells; the expression of Bcl-2 was down-regulated while the expression of Bax was up-regulated. ***Conclusion***: The rate of cell proliferation inhibition and the rate of the SKOV3 cell line apoptosis by SLN-Cur combined with DDP are significantly higher. The apoptosis is related to the down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax.

【Key words】solid lipid nanoparticles; curcumin; Cisplatin (DDP); human ovarian cancer cell line SKOV3; cell apoptosis

卵巢癌病死率居妇科恶性肿瘤首位，其 5 年生存率仅为 30%左右[1]。提高卵巢癌整体生存率的根本在于早期发现，彻底手术加上以顺铂（Cisplatin，DDP）为基础的联合化疗。但是，DDP 等药物化疗毒副作用大，且长期使用会产生耐药性，导致肿瘤进展或复发。因此，寻找能增强疗效且减轻毒副作用的药物和化疗组合，是提高患者生存率的关键。

近年研究证实，姜黄素（Curcumin，Cur）可抑制多种肿瘤细胞生长[2,3]。将 Cur 制备成固体脂质纳米姜黄素（Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles，SLN-Cur）这种新型给药系统，可提高其生物利用度，延长药物在血液中的半衰期。本实验旨在探讨 DDP 与 SLN-Cur 联用对人卵巢癌细胞增殖抑制及促进凋亡的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 SKOV3（人卵巢癌浆液性乳头状囊腺癌细胞株）由重庆医科大学肿瘤学教研室提供，细胞培养在含 10%

作者介绍：邓舒婷（1984-），女，硕士，研究方向：妇科肿瘤。

通信作者：周 琦，女，教授，Email：qizhou9128@163.com。

基金项目：重庆市卫生局科研资助项目（编号：2007-2-68）。

小牛血清(兰州民海生物工程有限公司)RPIM1640(PAA,Austria)培养液中(内含 100 U/ml 青霉素及链霉素),37℃,5% CO_2 孵箱中生长,0.25%胰酶消化,传代。

1.1.2 试剂和药物 Cur、四甲基偶氮唑蓝(MTT)及二甲基亚砜(DMSO)购于美国 Sigma 公司,Bcl-2 及 Bax 购于北京中杉金桥生物技术有限公司,DDP 购于山东罗欣药业股份有限公司。0.25%不含 EDTA 胰蛋白酶 (Hyclone 公司),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于凯基生物公司。

1.2 *方法*

1.2.1 SLN-Cur 制备 溶液扩散法制备 SLN-Cur。将处方量 Cur 及硬脂酸溶于无水乙醇加热,滴入聚乙烯醇溶液中搅拌。所得混悬液离心,用 dH_2O 洗 2 次,加入适量 dH_2O,超声 10 min,即得。

1.2.2 MTT 法测定药物增殖抑制作用 将 SKOV3 制成 5×10^6 个细胞/ml 悬液,接种于 96 孔培养板内,每孔 200 μl(1×10^6 个细胞/孔)。实验设肿瘤细胞空白对照组、DDP 组、Cur 组、SLN-Cur 组、DDP+Cur 组及 DDP+SLN-Cur 组(DDP 终浓度均为 2.5 μmol/L,Cur 及 SLN-Cur 浓度均为 10 μmol/L)。每种药物另设置 4 种不同浓度,以确定其对 SKOV3 的 IC_{50} 值。每组设 4 复孔,培养 24 h 去上清,每孔加无血清培养液 200 μl 及 MTT 20 μl(5 mg/ml)继续培养,4 h 后去上清,每孔加 DMSO 200 μl,震荡 10 min,在酶标比色仪上(540 nm 波长)检测各孔吸光度值(A 值),重复 3 次取平均值。

抑制率 $fu=(A_{实验药物组}/A_{空白对照组})\times100\%$

存活率 $fa=(1-A_{实验药物组}/A_{空白对照组})\times100\%$

fa/fu=(D/Dm)m(D 表示药物浓度,Dm= IC_{50} 表示中效浓度)

药物合用效果公式用金氏公式推测[4]:q=E(AB)/[EA+(1-EA)×EB],其中 E(AB)为两药合用抑制率,EA 和 EB 为各药单用时的抑制率,q=0.85~1.15,两药作用相加;q 大于1.15,两药作用协同;q 小于 0.85,两药作用拮抗。

1.2.3 倒置显微镜观察细胞形态学 试验分为空白对照组、DDP 组、SLN-Cur 组及 DDP+SLN-Cur 组,每组设 4 复孔,DDP 浓度均为 2.5 μmol/L,SLN-Cur 浓度均为 10 μmol/L,培养 24 h 后瑞氏染色,倒置显微镜观察并拍照。

1.2.4 流式细胞仪分析细胞凋亡 取 1×10^6 个细胞/20 ml 接种于 200 ml 培养瓶内,实验分组及药物浓度同前,培养 24 h 后胰酶消化收集细胞,PBS 液洗 2 次,缓慢加入 4℃预冷的 70%乙醇 1 ml,固定 1 h 后用 PBS 液洗 2 次,将等体积细胞悬液与 PI 染液混合,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.5 透射电镜观察药物作用后细胞超微结构改变 细胞处理同前,PBS 液洗 2 次,2.5%戊二醛及 2%四氧化锇固定,脱水、包埋、切片和染色均按常规处理,透射电镜观察,拍照。

1.2.6 免疫细胞化学法检测 Bax/Bcl-2 蛋白的表达 细胞处理及实验分组同前,培养 24 h,PBS 洗 5 min ×3 次,95%酒精固定 20 min,用 PBS 代替一抗做阴性对照,以胞浆中有明显 DAB 棕黄色染色者判断为阳性(抗体阳性部位均在胞浆)。采用 image pro plus6.0 生物医学图像分析软件系统进行图像分析,测定其累计光密度值(IOD)及区域面积(Area),计算平均光密度值 MOD=IOD/area。

1.3 *统计学处理*

所有资料均用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,所测数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,MTT 实验数据分析采用 2×2×2 析因设计的方差分析,流式技术和免疫组化数据分析采用 2×2 析因设计的方差分析,两两比较采用 S-N-K 法,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 *DDP+SLN-Cur 对 SKOV3 细胞抑制增殖作用*

空白固体脂质纳米粒对 SKOV3 细胞几乎无毒性作用(细胞抑制率小于 4%),可忽略其对细胞的毒性作用,用于本实验中是安全合格的(由预实验得出)。

DDP、Cur、SLN-Cur、DDP+Cur 及 DDP+SLN-Cur 对 SKOV3 的体外抑制 24 h 实验结果见表 1,由表可知:SLN-Cur 的 IC_{50} 较游离 Cur 低,药物效价更高,对 SKOV3 细胞增殖抑制作用明显强于 Cur($P<0.01$);DDP+SLN-Cur 组的抑制率较DDP 组及 DDP+Cur 组均明显增加($P<0.01$);DDP+SLN-Cur IC_{50} 值约为 DDP 的 2/5,约为 SLN-Cur 的 1/10,药物效价显著提高;由金氏公式得出 DDP 与 SLN-Cur 二药合用 q 值为1.41,大于 1.15,具有明显的协同作用。

表 1 各种药物对 SKOV3 细胞株的增殖抑制作用的影响及 IC_{50}

药物	抑制率	IC_{50}(μmol/L)
Cur组	0.023 5 ± 0.002 1	54.62
SLN-Cur组	0.161 5 ± 0.003 9 *	40.14
DDP组	0.131 8 ± 0.003 3	10.70
DDP+ Cur 组	0.180 2 ± 0.003 7	8.78
DDP+SLN-Cur 组	0.384 1 ± 0.008 1**	4.37

注:与 Cur 组相比,*,$P<0.01$;与 DDP 组及 DDP+Cur 组相比,**,$P<0.01$

2.2 *DDP+SLN-Cur 对细胞形态学的影响*

通过光学显微镜下观察发现,空白对照组细胞呈多边梭形,轮廓清楚,胞膜完整,核大,核仁色深(图 1);DDP 组及 SLN-Cur 组活细胞数量减少,少部分细胞体积明显变小,细胞核固缩;DDP+SLN-Cur 组,活细胞数目大量减少,形状变圆,体积明显缩小,细胞膜边缘不光滑,胞浆内较多空泡生成,可见细胞核碎裂及核固缩,细胞周围可见凋亡小体(图 2)。

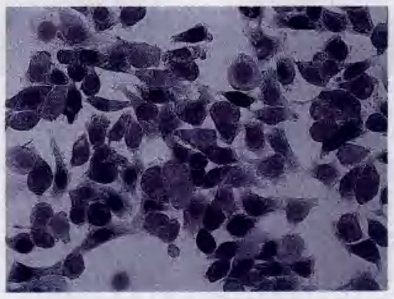


图 1 肿瘤细胞空白对照组细胞凋亡形态学观察
(瑞氏染色,×200 倍)

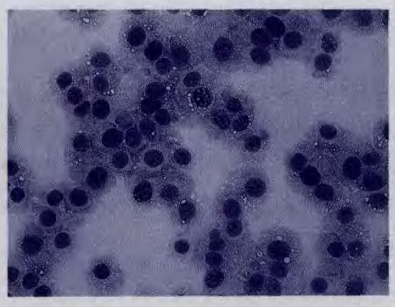


图 2　DDP+SLN-Cur 组细胞凋亡形态学观察（瑞氏染色，×200 倍）

2.3　DDP+SLN-Cur 促细胞凋亡的作用

DDP、SLN-Cur 及 DDP+SLN-Cur 分别作用于 SKOV3 细胞株的凋亡率分别为：(4.60±1.01)%、(8.69±3.18)%、(17.94±3.23)%。DDP+SLN-Cur 组的细胞凋亡率是空白对照组的 6.5 倍，分别是 DDP 组及 SLN-Cur 组的 3.9 倍及 2.1倍，DDP 联合 SLN-Cur 用药时促细胞凋亡作用均明显优于 DDP 或 SLN-Cur 单独用药（P 均<0.05）（见表 2）。

表 2　DDP、SLN-Cur 及 DDP+SLN-Cur 对 SKOV3 细胞株凋亡率的影响

组别	凋亡率（%）
空白对照组	2.75 ± 0.26
DDP组	4.60 ± 1.01
SLN-Cur组	8.69 ± 3.18
DDP+SLN-Cur组	17.94 ± 3.23

注：与空白对照组相比，其余各组均 P<0.05，与 DDP 组、SLN-Cur 组相比，DDP+SLN-Cur 组均 P<0.05

2.4　DDP+SLN-Cur 对细胞超微结构的影响

透射电镜下可见，空白对照组 SKOV3 细胞形态较幼稚，表面有较多较小微绒毛，核大，核仁发达，甚至多个，线粒体散在分布（图 3）；DDP 组及 SLN-Cur 组均可见细胞表面微绒毛减少，细胞内出现脂滴；DDP+SLN-Cur 组细胞内有大量脂滴，出现细胞核固缩，并可见凋亡小体（图 4）。



图 3　肿瘤细胞空白对照组透射电镜细胞凋亡超微结构观察（×7 000）

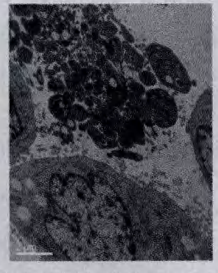


图 4　DDP+SLN-Cur 组透射电镜细胞凋亡超微结构观察（×8 000）

2.5　DDP+SLN-Cur 对细胞 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

免疫细胞化学法显示：DDP 组、SLN-Cur 组及 DDP+SLN-Cur 组的 Bcl-2 表达较空白对照组均减弱（P<0.05），DDP+SLN-Cur 组更显著（图 5、6）；Bax 的表达均增强（P<0.05），且 DDP+SLN-Cur 组增强更显著（图 7、8）。图像分析及统计学结果表明，4 组细胞表达 Bcl-2 及 Bax 的 MOD 值见表 3。

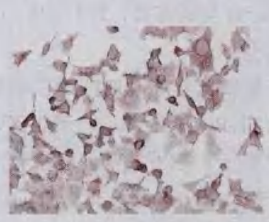


图 5　肿瘤细胞空白对照组免疫细胞化学法 Bcl-2 表达（×200）



图 6　DDP+SLN-Cur 组免疫细胞化学法 Bcl-2 表达（×200）

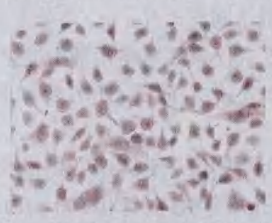


图 7　肿瘤细胞空白对照组免疫细胞化学法 Bax 表达（×200）



图 8　DDP+SLN-Cur 组免疫细胞化学法 Bax 表达（×200）

表 3　各药物组免疫组化 Bax 及 Bcl-2 MOD 值

指标	空白对照组	DDP组	SLN-Cur组	DDP+SLN-Cur 组
Bax	0.098 ± 0.010	0.157 ± 0.021	0.169 ± 0.019	0.248 ± 0.048
Bcl-2	0.269 ± 0.041	0.226 ± 0.024	0.188 ± 0.026	0.129 ± 0.012

3　讨　论

卵巢癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一，死亡率高。卵巢癌发病隐匿，发现时大都已是晚期，彻底手术加上以 DDP 为基础的联合化疗已成为卵巢癌治疗的标准治疗方案。尽管初始化疗约半数以上的患者有良好的反应，但目前临床常用的抗肿瘤化疗药物如 DDP 等毒副作用大，存在较严重的骨髓抑制、肾脏毒性、神经毒性、胃肠道反应及脱发等不良反应，且会产生获得性耐药，导致肿瘤进展或复发。因此，寻找能增强疗效且减轻毒副作用的药物和化疗组合，是提高患者生存率的关键。

Cur 是从姜科植物姜黄中提取的一种酚类色素，主要药理作用包括抗炎、抗氧化、降血脂、抗肿瘤等，且几乎无毒性，通常对正常组织细胞不产生不良影响[5]。其抗肿瘤特性近年来日益受到重视，体内实验证实，Cur 可有效抑制肿瘤侵袭以及转移，体外实验证实 Cur 具有抑制肿瘤细胞增殖，促进凋亡等作用[6]，具有多方面的药理作用。实验研究 Cur 对体外培养的白血病、乳腺癌、大肠癌、肝癌、卵巢癌细胞均有抑制增殖及诱导凋亡作用[7,8]，也有研究表明 Cur 能提高 DDP、卡铂、拓扑替康等体外对卵巢癌细胞增殖的抑制作用[9]，Cur 抗肿瘤作用及机制如下：

（1）直接作用于肿瘤细胞。Cur 可以通过促进激活活性氧类（Reactive oxygen species，ROS）来增加线粒体膜的通透性，增加内质网应激反应，改变微丝结构和功能等途径直接作用于肿瘤细胞，从而促进细胞凋亡，抑制肿瘤细胞的生长和转

移[10]。本实验 MTT 结果显示药物组肿瘤细胞抑制率较空白对照组均不同程度增加，且电镜超微结果显示线粒体膜系统受损并出现明显肿胀，提示此机制可能是诱导 SKOV3 细胞凋亡原因之一。

(2)诱导细胞增殖周期停滞及细胞凋亡。Cur 抑制增殖及诱导凋亡这一现象可见于各种不同的肿瘤研究结果中，多数都可发生“经典性”凋亡-细胞皱缩、染色质浓缩与断裂、凋亡小体、DNA 梯带及特异性 18s、28s rRNA 碎片。本实验通过流式细胞仪分析及形态学观察发现：相较于空白对照组，药物处理组 SKOV3 细胞均呈现不同程度典型细胞凋亡变化，且 DDP+SLN-Cur 组的细胞凋亡形态学及超微结构变化最明显，诱导 SKOV3 细胞凋亡作用更显著。

(3)阻断肿瘤细胞的生长信号传导通路。细胞的通讯信息通过跨膜信号传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。研究表明，蛋白激酶活性、钙自稳及 ras 活化是重要的信号。Cur 能通过 PI3K/AKT/IKK_beta 信号通路抑制 mTOR 和核因子 Kapp-B，阻止肿瘤的侵袭性生长。通过抑制 PfATP6 分子达到抑制肿瘤的作用[11]。本实验免疫细胞化学法显示：与空白对照组相比，药物组 Bcl-2 表达减弱，Bax 表达增强，且 DDP+SLN-Cur 组更显著，机制可能为 Cur 通过抑制蛋白激酶 C 和蛋白酪氨酸激酶活性，进而抑制 Bcl-2 的表达，上调凋亡蛋白 Bax 的表达来促进肿瘤细胞凋亡。

Cur 虽然具有抗肿瘤药理特性，但由于其水溶性差，在体外易被氧化，因而生物利用度低，为临床应用带来困难，因此研发新型给药系统，对 Cur 的开发应用意义重大。固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles，SLN)是近年来正在发展的一种新型的纳米载药体系，它以天然的或人工合成的固体脂质为载体，将药物吸附或包裹于脂质粒中制成胶体给药体系[12,13]。本文采用溶液扩散法不需特殊设备，制备较简单，粒径也足够小，既适于实验室研制，也比较容易规模化生产。将 Cur 制备成 SLN-Cur 新剂型，此系统没有或很少有副作用，制作简单方便，与 SLN 结合，具有生物相容性好和良好的靶向性优点，同时可避免有机溶剂不能完全去除的缺点。已有相关研究显示[14]SLN-Cur 有较高的载药量及包封率、水溶性及稳定性均有所提高。实验已证实SLN-Cur 药物新剂型其载体 SLN 本身无细胞毒性，对细胞凋亡不产生影响，发挥药效部分仍为 Cur 本身。

本实验中，SLN-Cur 与 DDP 合用诱导细胞凋亡作用较单用两药更显著，具有协同作用。这种增殖抑制及促凋亡作用的增强可能是由于载药纳米粒增加对细胞的粘附性，协同 DDP 更易附着到细胞表面并增加药物对细胞膜的透过性，提高生物利用度，从而能够显著诱导 SKOV3 细胞凋亡，这也为临床的进一步研究提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.

[2] Lei Y, Li J C, Bin M, et al. The effect of curcumin on proliferation and apoptisis in LNCAP prostate cancer cells[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2006, 3(1): 55-60.

[3] Inaro H, Onada M, Inafuku N, et al. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary morigenesis in rats[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(4): 1835-1841.

[4] Shao Z M, Shen Z Z, Liu C H. Curcumin exerts mutiple suppressive effects on human breast carcinoma cells[J]. Int Cancer, 2002, 98(2): 234.

[5] Anand P, Sundaram C, Jhurani S, et al. Curcumin and cancer: an old-age disease with an age-old solution[J]. Cancer letter, 2008, 267(1): 133-164.

[6] Jing Z, Yong Z, Yan Z, et al. Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma HeLa cells in vitro and in vivo[J]. Chinese J Cancer Res (in Chinese), 2007, 19(1): 32-36.

[7] Xu J, Fu Y, Chen A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2003, 285(1): G20-G30.

[8] Chen A, Xu J, Johnson A C. Curcumin inhibitis human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of EGFR through reducing the activity of the transcription factor Egr-1[J]. Oncogene, 2006, 25(9): 278-287.

[9] Chen A, Xu J. Activation of PPARγ by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2005, 288(10): 447-456.

[10] Ligeret H, Barthelemy S, Zini R. Effect of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(7): 919-929.

[11] Sun Z J, Chen G X, Zhang H W. Curcumin prevents tumour growth, angiogenesis, and invasion in adenoid cystic carcinoma by dual inhibition of both mTOR and nuclear factor-kappaB pathway through a PI3K/Akt/IKKbeta signalling axis[J]. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2009, 38(4): 535-537.

[12] Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and application[J]. Adv Drug Del Rev, 2006, 47(3): 165-196.

[13] Limtrakul P. Curcumin as chemosensitizer[J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 595(6): 269-300.

[14] 毛世瑞，王燕芝，纪宏宇，等. 微乳化技术制备固体脂质纳米粒[J]. 药学学报，2003，38(8)：624-626.

（责任编辑：冉明会）