维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0296－03

姜黄素对人宫颈癌细胞株 Hela 细胞抑制及凋亡的影响

赵 敬，赵 涌

(重庆医科大学基础医学院病理教研室，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨姜黄素(curcumin)对人宫颈癌细胞株 Hela 细胞体外增殖及凋亡的调控作用。方法：选用人宫颈癌 Hela 细胞进行体外培养，以 5～50μmol/L 的姜黄素分别处理 Hela 细胞 24～72h 后，MTT 法检测细胞增殖，流式细胞仪(FCM)检测凋亡，透射电镜进行形态学观察。SABC 免疫组化法检测细胞内 Bcl－2、BcI－XL、Caspase－3 蛋白表达水平。结果：curcumin 对 Hela 细胞增殖有抑制作用。并呈剂量依赖性。DNA 直方图上可见亚"G_1"峰；透射电镜观察见部分细胞发生凋亡形态学改变。Bcl－2、Bcl－XL 表达均下调，Caspase－3 表达增强。结论：姜黄素对人宫颈癌 Hela 细胞的增殖具有明显抑制作用。上调 Caspase－3，下调 Bcl－2、Bcl－XL 蛋白的表达，诱导细胞凋亡可能是其作用机制之一。

【关键词】姜黄素；子宫颈肿瘤；凋亡

【中国图书分类法分类号】R737.33，R73－76 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－26

The effects of curcumin on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma Hela cells in vitro

ZHAO Jing, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the regulatory effect of curcumin on proliferation and apoptosis in human cervical carcinoma cell line Hela in vitro. *Methods*: Human cervical carcinoma cell line Hela was cultured in vitro. Hela cells were treated with 5－50 μmol/L curcumin for 24－72h and the growth inhibition rates of Hela cells were measured with MTT method. Cell apoptosis was inspected by electron microscopy. In addition, the expression of bcl－2, bcl－xl and caspase－3 protein in Hela cell were observed by SABC immunohistochemistry. *Results*: Curcumin inhibited the proliferation of Hela cells on a dose－depending manner. With the peak of sub G_1 appeared on DNA histogram in FCM. Partial cells presented the characteristic morphological changes of apoptosis under the electron microscope. The Bcl－2, Bcl－xl expression were decreased while Caspase－3 expression was increased. *Conclusion*: Curcumin could significantly inhibit the growth of Hela cells; inducing apoptosis through up－regulating Caspase－3 and down－regulating expression of Bcl－2, Bcl－xl is probably one of its molecular mechanisms.

【Key words】Curcumin; Cervix neoplasm; Apoptosis

姜黄素(curcumin)是从姜科姜黄属植物姜黄(curcuma longa)根茎中提取的一种酚性色素，由于其色泽稳定且毒性低，目前已广泛应用于食物添加剂和染料中。已有研究表明其具有抗炎、抗氧化、抗凝、抗病毒的作用，尤其是它的抗肿瘤作用备受关注，成为研究的热点[1]。体外实验显示姜黄素能够诱导多种细胞株的凋亡，如小鼠肉瘤 S180、人大肠癌细胞 HT－29、人肾癌细胞 293、人肝癌细胞 $HepG_2$ 等[2]。但对宫颈癌细胞的作用则报道较少。本文观察了姜黄素对人宫颈癌细胞株 Hela 体外增殖及凋亡的影响。

作者介绍：赵 敬(1974－)，女，硕士，主要研究方向：妇产科肿瘤。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌细胞株

由重庆医科大学病理生理教研室提供。姜黄素为美国 Sigma 公司产品，稀释成 5×10^3μmol/L，置于－20℃保存，临用前解冻。SABC 试剂盒、鼠抗人 Bcl－2、Bcl－XL、Caspase－3 均购自福州迈新公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 将细胞接种在 50ml 培养瓶中，用含 10%小牛血清的 RPIM1640 培养液，37℃，5%二氧化碳培养

维普资讯 http://www.cqvip.com

箱内培养。细胞贴壁 80%时传代,1 周大约 2 次。

1.2.2 细胞增殖的测定(MTT 法) 用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液配成细胞悬液(1×10^5 个/ml)加入 96 孔板,200μl/孔。实验组加入不同浓度的姜黄素,其终浓度为 5、10、25、50μmol/L。分别培养 24、48、72h 在额定的时间吸去培养基,换上无血清的 RPMI1640,并加入 MTT(四甲基偶氮唑盐,购自 Sigma 公司)20μl,继续培养 4h。弃去培养基,每孔加二甲基亚砜 200μl,上机测 570nm 下的吸光值(A)。癌细胞生长抑制率=(1-实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 用 10、25、50μmol/L 的姜黄素处理的 Hela 细胞用 70%乙醇固定 48h,PBS 缓冲液洗去固定液。用缓冲液 37℃孵育 60min,抽取小分子 DNA,然后加入碘化丙啶 PI(购自 CLONTECH 公司)染色液,4℃避光染色 20min 后上机检测。FCM 变异系数纠正于 3%以下,检测对照组及各浓度姜黄素作用 48h 后 Hela 细胞的"亚 G_1"凋亡峰。

1.2.4 透射电镜观察姜黄素对细胞超微结构的影响 25μmol/L 的姜黄素作用 Hela 细胞 48h,将细胞刮下,离心,用 2.5%戊二醛固定细胞团,用 H-600 型透射电镜观察细胞超微结构。

1.2.5 Bcl-2、Bcl-XL、Caspase-3 蛋白水平的检测。

25μmol/L 的姜黄素加入对数生长期的 Hela 细胞,孵育 48h 后,冷丙酮固定,采用免疫组化 SABC 法(按试剂盒说明书操作),最后经 DAB 显色,以 PBS 代替一抗作阴性对照。结果判断:光镜下,Bcl-2、BcI-XL 和 Caspase-3 表达阳性细胞的胞浆内呈现特异性棕褐色。阳性表达率=(阳性细胞数/500 个瘤细胞)×100%。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件包作数据处理,分别采用方差分析,t 检验。以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 姜黄素对 Hela 细胞的抑制作用

对照组 Hela 体外生长活跃。经 5、10、25、50μmol/L 的姜黄素处理 24、48、72h,Hela 细胞生长均不同程度地减慢,并呈时间、浓度依赖性,与对照组相比,各浓度姜黄素作用 72h 后,Hela 细胞生长抑制率在 11%~45.8%之间。统计学结果显示不同时间之间差异均有显著性($P<0.01$),而与对照组相比,从 10μmol/L 开始,差异有显著性($P<0.05$),当浓度达到 25μmol/L 时,则 $P<0.01$。见图 1、表 1。

2.2 姜黄素诱导 Hela 细胞凋亡的动态变化

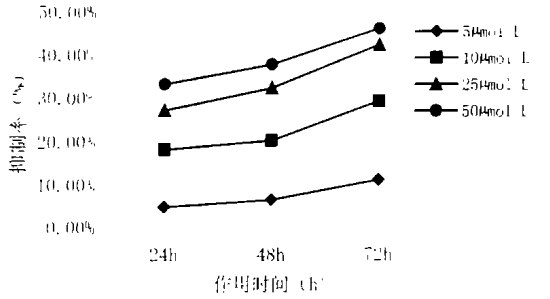


图 1 不同浓度姜黄素作用不同时间对 Hela 细胞生长的抑制作用



图 2 25μmol/L 姜黄素处理 Hela 细胞 48h:细胞膜完整,细胞表面微绒毛消失,异染色质边集,胞浆裂解成凋亡小体(TEN×15000)

表 1 不同浓度姜黄素作用 Hela 细胞不同时间的吸光度(A)值

组别	时间(h)		
	24	48	72
对照组	0.627	0.934	1.214
5μmol/L	0.598	0.875	1.080
10μmol/L	0.514	0.747	0.862
25μmol/L	0.458	0.635	0.704
50μmol/L	0.420	0.584	0.658

表 2 不同浓度姜黄素对 Hela 细胞的细胞周期的影响及细胞凋亡率

组别	细胞周期分布(%)			细胞凋亡率(%)
	G_0/G_1	S	G_2/M	
对照组	58.55	31.64	9.81	5.54
实验组(μmol/L)				
10	58.09	33.99	7.92	11.96
25	48.21	41.19	10.67	12.06
50	49.94	42.47	7.58	22.4

姜黄素对 Hela 细胞周期分布和细胞凋亡率作用结果显示,对照组凋亡率峰很低,而浓度为 10、25、50μmol/L 的姜黄素作用 48h,凋亡率分别为 11.96%、

维普资讯 http://www.cqvip.com

12.06%、22.4%。且可以观察到 S 期细胞也随着浓度增加而明显增加。见表 2。

2.3 姜黄素对 Hela 细胞超微结构的影响

对照组极少见到凋亡细胞和凋亡小体。经 25μmol/L 的姜黄素作用 48h 可见较多凋亡细胞,表现为细胞体积变小,细胞浆密度增大、颜色变深,染色质致密固缩聚集于细胞核,核膜呈境界分明的块状或新月形小体,细胞核裂解。凋亡小体内有完整的细胞器。见图 2。

2.4 姜黄素对 Bcl-2、Bcl-XL、Caspase-3 表达的影响

25μmol/L 的姜黄素处理 48h 后,发现 Hela 细胞的 Bcl-2,Bcl-XL 表达减弱,Caspase-3 表达增强。处理组与对照组表达率比较有显著差异($P<0.05$)。见表 3 与图 3。

表 3 免疫组化检测姜黄素对 Bcl-2、Bcl-XL、Caspase-3 表达率[($\bar{x}\pm s$%]的影响

组分	Bcl-2	Bcl-XL	Caspase-3
对照组	0.74±1.1	0.75±1.5	0.06±2.1
处理组	0.31±1.2	0.38±1.3	0.27±2.2

与对照组相比,$P<0.05$

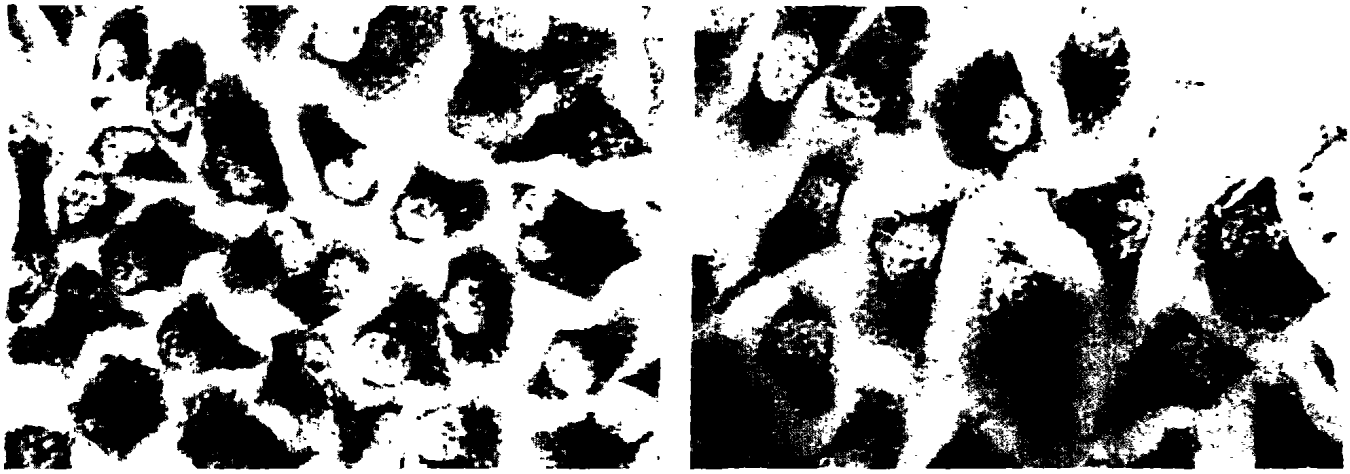


图 3a 对照组 Hela 细胞:Bcl-2 蛋白表达呈强阳性(×400)

图 3b 25μmol/L 的姜黄素处理 48h Hela 细胞:Bcl-2 蛋白表达呈弱阳性(×400)

3 讨 论

姜黄素是中药姜黄根茎中的有效成份。化学名为阿魏酰甲烷(difcruloylmethane)。几世纪以来,它在东南亚地区就被用作食物色素和中药,对许多种肿瘤细胞均有抑制作用。研究表明,在体外姜黄素能通过多条通路和调节多种肿瘤相关因子来抑制癌细胞的增殖和诱导凋亡[3]。本研究选择了人宫颈癌细胞株 Hela 细胞来进行抑制生长和诱导凋亡的作用分析,探讨其可能的机制。

我们通过体外实验证实,姜黄素能够抑制人宫颈癌细胞株 Hela 生长,其抗增殖效应呈现剂量时间依赖性。但我们报道的最大抑制率只有 45.8%。从流式细胞仪的结果可发现,随着姜黄素浓度的增加,S 期的细胞增多,我们认为 S 期细胞增多并不意味着姜黄素具有促进肿瘤细胞 DNA 合成的作用,而是使细胞在 S 期大量堆积,而不能进入下一增殖周期。这一点正好与我们的抑制率不太高的结果相吻合。说明姜黄素的确具有抑制 Hela 细胞生长的作用。

本研究采用 FCM、形态学观察、SABC 法等多种手段,观察了姜黄素在诱导 Hela 细胞凋亡方面的作用。结果发现,姜黄素能诱导 Hela 发生凋亡。且随着浓度升高,细胞凋亡峰明显增高;在透射电镜下可发现大量凋亡小体;同时观察到,姜黄素改变了细胞周期时相分布,使 S 期的细胞增多。

细胞凋亡受到各种凋亡调控蛋白的调控。我们的研究结果显示姜黄素使 Bcl-2,Bcl-XL 蛋白表达均下调,说明姜黄素对两者表达均有抑制,考虑是其诱导凋亡的机制之一。但对哪一种蛋白作用更强,我们的实验并没有显著性差异。我们的实验结果显示姜黄素能够增强 Caspase-3 的表达,则可以促进 Hela 细胞的凋亡。已有的研究显示 Caspase 的裂解可使 Bcl-2 和 Bcl-XL 失活。而新近发现的一种膜结合型 Caspase-3 的作用还可 (下转第 314 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

段[3]。宋建良等[14]研究了 FNS 对脑梗死患者的疗效及对 OFR 的影响,结果表明 FNS 可升高 SOD 活性及 TAOC,降低 MDA 含量,证实 FNS 能有效降低 OFR 对脑的损害。可以预见,FNS 在心血管疾病领域的开拓性研究,也将为心肌梗死等心肌损伤疾病的防治提供新的途径。

参 考 文 献

[1] 朱景宁,张月萍,王建军.小脑参与内脏活动调节的研究进展[J].中国神经科学杂志,2003;19(4):268-272.

[2] 董为伟,主编.神经保护的基础与临床[M].北京:科学出版社,2002;197-203.

[3] 董为伟.电刺激小脑顶核与中枢神经源性神经保护[J].中国工程科学,2001;3(11):32-38.

[4] 刘元生,陈运贞.慢性心肌梗死大鼠实验模型[J].重庆医科大学学报,2002;27(2):153-155.

[5] Reis DJ, Kobylarz K, Yamamoto S, et al. Brief electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus conditions long-lasting salvage from focal cerebral ischemia: conditioned central neurogenic neuroprotection[J]. Brain Res, 1998; 780(1): 161-165.

[6] Paxinos G, Watson C. The Rat brain in Stereotaxic Cooradinates[M]. Fourth Edition, San Diago: Academic Press, 1998; Fig66.

[7] Glickstein SB, Ilch CP, Reis DJ, et al. Stimulation of the subthalamic vasodilator area and fastigial nucleus independently protects the brain against focal ischemia[J]. Brain Res, 2001; 912(1): 47-49.

[8] Shintaro K, Hiroyuki T, Shunji H, et al. Treatment with dimethythiourea prevent left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress[J]. Circ Res, 2000; 87(5): 392-398.

[9] Mc Cord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury[J]. New Eng J Med, 1985; 312(3): 159-165.

[10] Golanov EV, Zhou P. Neurogenic neuroprotection[J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2003; 23(4/5): 651-663.

[11] Arneric SP, Iadecola C, Underwood MD. Local cholinergic mechanisms participate in the increase in cortical cerebral blood flow elicited by electrical stimulation of the fastigal nuleus in rat[J]. Brain Res, 1987; 411(2): 212-225.

[12] 石正洪,杨永清,董为伟,等.电刺激小脑顶核对脑缺血再灌注氧化损伤作用的实验研究[J].兰州大学学报(自然科学版),2003;39(1):74-76.

[13] 夏一鲁,罗 勇,董为伟,等.电刺激小脑顶核对脑卒中大鼠的治疗作用与机制[J].中风与神经疾病杂志,1999;16(1):3-5.

[14] 宋建良,诸国嘉,孙新芳,等.电刺激小脑顶核对脑血管病的疗效及对自由基的影响[J].中华物理医学与健康杂志,2002;24(8):472-474.

(上接第 298 页)被 Bcl-2 所抑制[4]。故 Bcl-2 家族与 Caspase 不同类型之间的作用,在凋亡发生的机制中也是相当重要。而姜黄素对两家族的作用哪一个占主要地位,其作用的具体机制,还需进一步的观察研究。

参 考 文 献

[1] Inano H, Onada M, Inafuku N, et al. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initation of mammary tumorigenesis in rats[J]. Carcinogenesis, 2000; 21: 1835-1841.

[2] Jiang MC, Yang Yen HF, Yen JJ, et al. Curcumin induced apoptosis in immortalized NIH3T3 and maligant cancer cell lines[J]. Nutr Cancer, 1996; 26: 111-120.

[3] Lin JK, Jin-shian SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin[J]. Proc Natl Sci Counc ROC(B), 2001; 25: 59-66.

[4] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiers of cell survival[J]. Science, 1998; 281: 1322-1326.