DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.009
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
770 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)09-0770-04

姜黄素对人实体瘤细胞和白血病细胞作用的比较

厉红元,车 艺,汤为学 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨姜黄素对人急性髓系白血病HL-60细胞及肝癌细胞(QGY)增殖、细胞周期的调控及细胞凋亡的影响,并比较它对HL-60、QGY的作用效果。方法 采用MTT法测定姜黄素在不同浓度、不同时间对HL-60、QGY的抑制作用,流式细胞仪分析细胞周期分布,透射电镜观察细胞的超微结构变化。结果 姜黄素可抑制HL-60、QGY细胞的生长,其抑瘤率与药物浓度和作用时间呈依赖关系,72 h的中效浓度(IC_{50})分别为24.8 μmol/L、49.5 μmol/L;流式细胞仪分析证实姜黄素能使HL-60细胞聚积在S期、G_2/M期,凋亡峰为8.65%,使QGY细胞聚积在S期,凋亡峰为10.84%;电镜观察发现姜黄素可导致HL-60细胞胞浆内有明显脂肪变性,导致QGY细胞变性、坏死,诱导细胞凋亡。结论 姜黄素对HL-60的抑瘤效果更明显,它主要通过抗增殖作用,抑制HL-60细胞的生长;对QGY细胞,主要通过诱导肿瘤细胞凋亡,达到抑瘤作用。

关键词:姜黄素;HL-60;QGY;细胞周期;抗增殖;细胞凋亡
中图法分类号:R-332;R282.71;R73-354 文献标识码:A

Effects of curcumin on solid tumor and acute myeloid leukemic cells

LI Hong-yuan, CHE Yi, TANG Wei-xue (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of curcumin on the proliferation, cell cycle distribution, and apoptosis of the acute myeloid leukemic cell line HL-60 and the hepatocarcinoma cell line QGY. Methods MTT method was used to detect the biological activities of curcumin at different concentrations and at different time. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry, and changes of the cellular ultrastructure were observed by electronic microscopy. Results Curcumin could inhabit the growth of HL-60 and QGY in dose- and time-dependent manners. IC50 values of curcumin at 72 h to HL-60 and QGY were 24.8 μmol/L and 49.5 μmol/L, respectively. The cell growth of HL-60 was arrested at S and G_2/M stages (apoptosis peak: 8.65%), and that of QGY was arrested at S stage (apoptosis peak: 10.84%). Curcumin could lead to fat degeneration in HL-60 cells and cell degeneration and necrosis of QGY cells, resulting in apoptosis of QGY cells. Conclusion Curcumin has inhibitory effect on the growth of HL-60 cells through its anti-proliferation and on QGY cells through the induction of apoptosis of QGY cells.

Key words: Curcumin; HL-60; QGY; Cell cycle; Antiproliferation; Apoptosis

姜黄素(curcumin)是从姜黄根茎中提取、分离出的一种酚类色素成份,曾在印度被用于炎症的治疗[1]。近来,人们发现它还具有抗增生,抗突变,抗肿瘤的特性[2],并发现它还具有诱导凋亡的作用[3]。本研究通过姜黄素对人急性白血病细胞株HL-60及肝癌细胞株QGY的作用,探讨其作用及机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

HL-60、QGY由重庆医科大学病理生理学教研室提供,细胞培养在10%小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)RPMI 1640(美国GIBCO)培养液中(内含100 U/ml青、链霉素),置于37 ℃、5% CO_2孵育箱内备用。

1.2 药物

姜黄素购自上海试剂二厂重庆站(分析纯)。姜黄素溶液是以少量二甲亚砜(DMSO)溶解姜黄素粉剂,配成1 mmol/L溶液(储备液)、置于0 ℃冰箱保存。

1.3 MTT法[4]检测药物作用效应

分别将HL-60、QGY制成5×10^4个细胞/ml悬液,种植于96孔培养板内,每孔200 μl(1×10^4个细胞/孔)。实验设试剂对照组,肿瘤细胞阴性对照组及5个实验组(浓度分别为7.46、14.92、29.84、59.68和119.36 μmol/L),每组平行孔为8孔,每孔加药20 μl,置于37 ℃,5% CO_2孵育箱内分别培养24、48、72 h后吸去上清液,每孔加无血清培养液200 μl及5 mg/ml MTT 20 μl,继续培养4 h后,吸去上清液,每孔加DMSO 200 μl,在自动酶标

作者简介:厉红元(1964-),男,重庆市人,副主任医师,主要从事肿瘤治疗方面的研究。电话:(023)68858419
通信作者:汤为学,电话:(023)68685478
收稿日期:2003-07-10;修回日期:2004-03-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

仪上检测各孔光密度值(D 值), 波长为 600 nm。计算各种药物浓度的抑瘤率(fa)及中效浓度(IC_{50})[5]:

$$抑瘤率_{(fa)} = 1 - \frac{实验组平均\ D\ 值}{肿瘤细胞阴性对照组平均\ D\ 值} \times 100\%。$$

$$fa/fu = (D/Dm)^2$$

fa 为抑瘤率, fu(存活率)= 1-fa, D 为药物浓度, Dm 为中效浓度(IC50), 即抑瘤率为 0.5 时, 所需药物浓度, m 为斜率。

实验重复 3 次, 取平均值。

1.4　流式细胞仪(FCM)分析药物作用后细胞周期分布

取 1×10^6 个细胞接种 100 ml 培养瓶内, 实验设对照组及实验组, 实验组最终药物浓度为 IC_{50} 24.8 μmol/L, 培养 3 d 收集细胞, 用 PBS 液洗 2 次, 缓慢加入 -20 ℃预冷的 70% 乙醇 1 ml, 固定 1 h。后用 PBS 液洗 2 次将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合, 4 ℃放置 30 min, 将样本放入 FCM 的样品室, 以激发波长 488 nm 测定, 并用 Modfit LT2.0 软件分析细胞周期分布。

1.5　透射电镜观察药物作用后细胞形态改变

取 2.5×10^6 个细胞接种于 200 ml 培养瓶内, 实验设对照组及实验组, 实验组最终药物浓度为 IC_{50} 24.8 μmol/L。培养 3 d, 收集细胞, PBS 液洗 2 次, 用 2.5% 戊二醛固定, 继续用 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。

1.6　统计学处理

实验数据计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件包进行单因素 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　MTT 法检测比较姜黄素对 HL-60、QGY 的作用效应

从表 1 可发现随姜黄素浓度增加、作用时间延长, 其对 HL-60、QGY 抑瘤率均增加。72 h 的抑瘤效果最好, HL-60 的 72 h 的中效浓度(IC_{50})为 24.8 μmol/L, QGY 的 72 h 的中效浓度(IC_{50})为 49.5 μmol/L。说明 HL-60 细胞对姜黄素的作用更敏感。

表 1　**MTT 法检测各种浓度姜黄素在不同时间对 HL-60、QGY 细胞的作用效应**

Tab 1　Effects of different concentrations of curcumin on HL-60 cells and QGY cells at different time by MTT method

Time (h)		Inhibition rate of different dose (%, $\bar{x}\pm s$)				
		7.46 μmol/L	14.92 μmol/L	29.84 μmol/L	59.68 μmol/L	119.36 μmol/L
24	HL-60	7.63±0.14	20.51±1.43	25.32±1.37	35.54±1.46	52.57±1.47
	QGY	1.90±0.11	4.82±0.20	11.45±1.89	27.73±1.71	40.72±1.74
48	HL-60	11.67±1.16	23.48±1.19	30.77±1.20	46.65±1.33	66.37±1.26
	QGY	6.72±0.85	16.37±1.60	21.72±1.68	30.66±1.86	56.74±1.77
72	HL-60	28.60±1.31	42.05±1.98	52.67±1.23	67.80±1.18	86.67±1.21
	QGY	17.96±1.76	25.69±1.12	34.56±1.33	53.74±1.73	78.88±1.45

One-way ANOVA showed that the effects of different dose and different time had significance ($P<0.01$)

2.2　流式细胞仪(FCM)分析姜黄素对 HL-60、QGY 细胞作用 72 h 后, 细胞周期的变化

由表 2 可见, HL-60+ 姜黄素组细胞聚积在 S 期、G_2/M 期, G_0/G_1 期降低, 凋亡峰为 8.65%; 而 QGY+ 姜黄素组细胞聚积在 S 期, 凋亡峰为 10.84%　$P<0.01$; 其结果表明: 姜黄素可能对 HL-60 的细胞周期影响更大。

表 2　姜黄素作用下 **HL-60, QGY** 细胞的周期分布的变化(%)

Tab 2　Changes of cell cycle distribution of HL-60 and QGY cells treated with curcumin (%)

Group		Cell cycle (%)			Apoptosis
		G_0/G_1	S	G_2/M	
Control	HL-60	49.12	45.82	5.06	—
	QGY	61.70	28.08	10.22	—
Curcumin (24.8 μmol/L)	HL-60	34.86	52.28 *	12.85 *	8.65 *
Curcumin (49.5 μmol/L)	QGY	57.80	33.33 *	8.86	10.84 *

*: $P<0.01$, *vs* control

2.3　透射电镜观察姜黄素作用 72 h 后 QGY 及 HL-60 细胞形态的改变

透射电镜下见对照组 HL-60、QGY 细胞形态较幼稚, 可见核大, 胞质内游离核蛋白体较多, 线粒体散在分布(图 1, 2), 即细胞生长活跃的特征。姜黄素作用后, 两者表现有所不同, HL-60 组细胞核未见明显改变, 但胞质内见数量较多、大小不一的脂滴(图 3)。QGY 组可见细胞呈明显坏死, 胞浆内也有大量脂滴(图 4), 并可见细胞凋亡小体(图 5)。

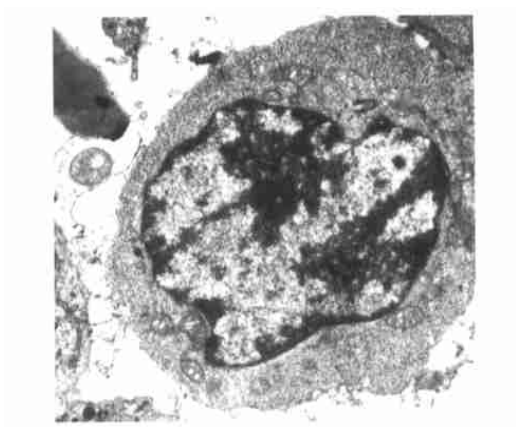


图 1　对照组 **HL-60** 细胞电镜观察　(**TEM**× 12 000)

Fig 1　HL-60 cells in the control group　(TEM× 12 000)

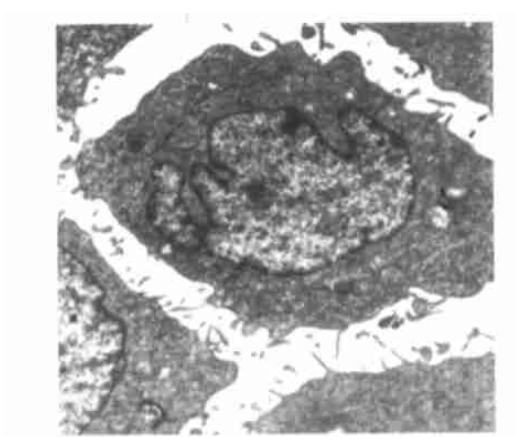


图 2　对照组 **QGY** 细胞电镜观察　(**TEM**× 10 000)

Fig 2　QGY cells in the control group　(TEM× 10 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

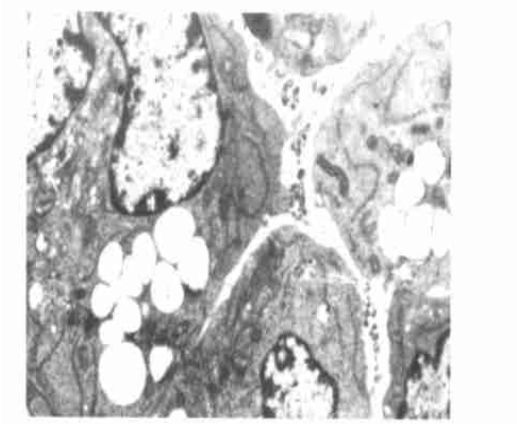


图 3 姜黄素(24.8 μmol/L)作用 72 h 后 HL-60 细胞电镜观察胞浆内可见大量脂滴 (TEM× 8 000)

Fig 3 HL-60 cells with many lipid droplets in the cytoplasm at 72 h after treatment with 24.8 μmol/L curcumin (TEM× 8 000)

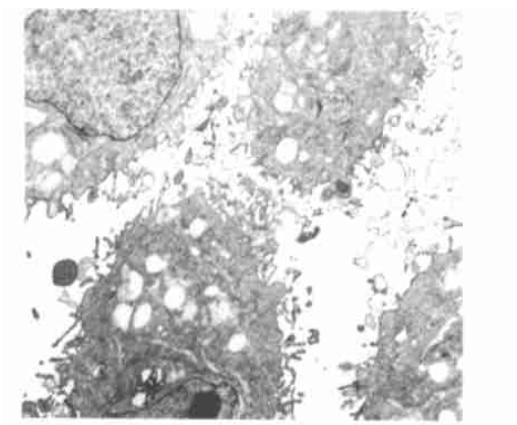


图 4 姜黄素(49.5 μmol/L)作用 72 h 后 QGY 细胞胞浆内可见较多脂滴 (TEM× 6 000)

Fig 4 QGY cells with many lipid droplets in the cytoplasm at 72 h after treatment with 49.5 μmol/L curcumin (TEM× 6 000)

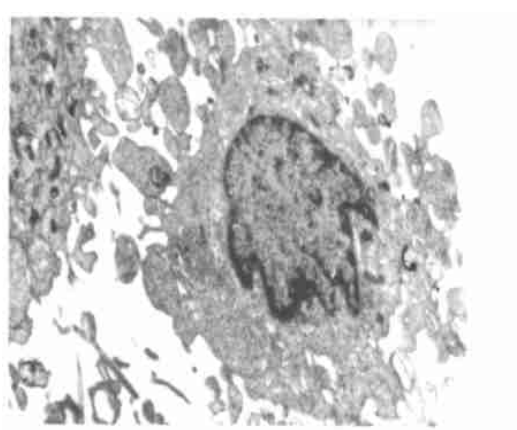


图 5 姜黄素(49.5 μmol/L)作用 72 h 后 QGY 细胞凋亡细胞并有凋亡小体 (TEM× 8 000)

Fig 5 QGY cells with apoptotic cells and apoptotic bodies at 72 h after treatment with 49.5 μmol/L curcumin (TEM× 8 000)

3 讨论

姜黄素具有多种功效,如抗炎症,抗氧化,抗突变等作用。近年发现,它对多种肿瘤细胞具有抑制作用。不同浓度的姜黄素作用后,肿瘤细胞的抑制率与浓度,时间呈依赖关系[6]。我们通过用 5 种不同浓度的姜黄素(表 1),作用于实体瘤肝癌细胞及白血病细胞,分别观察 24、48、72 h,其结果与文献报道一致。实验显示,72 h 的抑瘤效果:HL-60 细胞的中效浓度(IC_{50})为 24.8 μmol/L,而 QGY 细胞的中效浓度(IC_{50})为 49.5 μmol/L,后者所需浓度为前者的 1 倍,比较姜黄素对两种肿瘤细胞的作用效果,我们认为 HL-60 对姜黄素的作用更敏感。

姜黄素可通过对肿瘤细胞周期的影响达到抗增殖的作用。Hanif 等[2]用姜黄素作用于 HT-25、HT-29 人结肠癌细胞株发现姜黄素使两种细胞株增殖受抑制,并使细胞聚集于细胞周期的 G_2/M 期。Khafif 等[7]以姜黄素作用于人口腔鳞癌细胞株发现姜黄素使癌细胞阻断于 S/G_2M 期。我们的研究表明,QGY+姜黄素组细胞聚集在 S 期,G_0/G_1,G_2/M 期下降;而 HL-60+姜黄素组细胞聚集在 S 期、G_2/M 期,G_0/G_1 期降低,更延长了细胞生长周期。表明:姜黄素对 HL-60 细胞周期影响更大,抗增殖的作用更明显。文献[3, 6, 8]报道姜黄素能诱导多种肿瘤细胞凋亡,观察到在姜黄素作用后出现 DNA 梯带染色体集聚、断裂,及特异性凋亡标志 28S、18S、RNA 碎片。QGY+姜黄素组细胞的凋亡峰为 10.84%,电镜下见 QGY 组细胞呈明显坏死,胞浆内有较多脂滴(图 2),并可见细胞凋亡小体(图 3),电镜及 FCM 均支持有凋亡发生。HL-60+姜黄素组,虽然 FCM 分析有凋亡峰(8.65%),但电镜下仅见胞浆内有数量较多、大小不一的脂滴(图 2),未见凋亡小体。

姜黄素抗癌的机制还未完全清楚,目前已发现,它通过延长细胞周期,使细胞在 S 期和/或 G_2/M 期集聚,达到抗增殖的作用,在本实验中已得到证实。另一方面,它还具有诱导细胞凋亡的作用,本实验在 QGY 和 HL-60 细胞的 FCM 及电镜中已得到证实。姜黄素还可能通过降低环氧化酶、脂过氧化酶的活性;并清除花生四烯酸代谢生成的活性氧自由基(氧自由基能激活蛋白激酶 C);它还可直接抑制蛋白激酶 C(PKC)的活性[9],PKC 被认为在细胞增生的调节及信号传道中起重要作用;并可通过降低或抑制抗凋亡因子 NF-κB、Bcl-2 及 Bcl-xl 达到促进凋亡的作用[10]。

比较姜黄素对两种不同类型肿瘤的作用发现,HL-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

60+姜黄素组细胞:抑制细胞增殖作用更明显,也有诱导细胞凋亡的作用;姜黄素对 QGY 细胞:诱导细胞凋亡作用更明显,也有抗细胞增殖作用;姜黄素对 HL-60 细胞抑瘤效果比 QGY 细胞更好;在两组肿瘤细胞胞浆内均可见不同程度的脂滴,表明姜黄素能引起细胞脂肪代谢障碍,我们认为姜黄素可能通过引起肿瘤细胞脂肪变性,进而导致肿瘤细胞死亡。

姜黄素作为一个新的抗肿瘤药物,具有无毒、安全、抗癌谱广的特点,具有广泛的应用前景,其作用及机制值得进一步深入研究。

参考文献:

[1] Lodha R, Bagga A. Traditional indian systems of medicine[J]. Ann Acad Med Singapore, 2000, 29(1): 37—41.

[2] Hanif R, Qiao L, Shiff S J, *et al*. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway[J]. J Lab Clin Med, 1997, 130(6): 576—584.

[3] Pan M H, Chang W L, Lin-Shiau S Y, *et al*. Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytocrome C release and activation of Caspases in human leukemia HL-60 cells[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(3): 1464—1474.

[4] 汤为学, 骆云鹏, 王瑞雪. 人实体瘤药物敏感实验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报, 1992, 17(2): 103.

[5] Chou T C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effects relationships: the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors[J]. Adv Enzyme Regul, 1984, 22: 27—55.

[6] Anto R J, Mukhopadhyay A, Denning K, *et al*. Curcumin(diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, Bid cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(1): 143—150.

[7] Khafif A, Schaantz S P, Chou T C, *et al*. Quantitation of chemopreventive synergism between epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal premalignant and malignant human oral epithelial cells[J]. Carcinogenesis, 1998, 19(3): 419—424.

[8] Pal S, Choudhuri T, Chattopadhyay S, *et al*. Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(3): 658—665.

[9] Liu J Y, Lin S J, Lin J K. Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells[J]. Carcinogenesis, 1993, 14(5): 857—861.

[10] Anto R J, Mukhopadhyay A, Denning K, *et al*. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(1): 143—150.

(编辑　刘洪娥)

(上接 766 页)

完全梗阻等[1]。合并有结节性硬化症的病人常有癫痫、智能低下、皮脂腺癌等。本组 2 例有类似表现,和欧洲报道相似[1]。

2.3　诊断

本组经 IVP 检查 19 例,6 例无阳性征,13 例显示有肾盂、肾盂受压变形,肾影增大及肾脏轴线改变。肾动脉造影检查因 B 超、CT 的广泛应用而明显减少,且与 IVU 一样,血管造影征象为肿瘤的一般表现,往往难与肾癌相鉴别。B 超无疑对本病的诊断起重要作用,AML 表现为密集而均匀的强回声团,边界清楚。但肾癌亦有强回声表现者,故仅靠 B 超来确定诊断尚显不足。CT 检查对确定 AML 的确诊价值是不容怀疑的[2]。本组 CT 检查 17 例,有 13 例肯定了诊断。其特征为圆形,卵圆形,低密度影,边缘清楚,内含脂肪密度,血管丰富者增强扫描时有明显强化。一般肾癌不含脂肪组织,CT 提示含有脂肪组织且不匀一的肿块,诊断基本可以确定。肿瘤内出血时,血肿可掩盖脂肪组织的 CT 特征,可结合 B 超检查作出正确的诊断。磁共振检查 AML 的诊断结果是肯定的,但因价格昂贵,且 CT 可以确诊,应用并不广泛。

2.4　治疗方法

AML 的治疗方法国内外的看法基本一致。因属良性肿瘤,治疗以尽力保留肾功能为原则。依据肿瘤的大小、部位、数目、有无出血、癌变决定行肿瘤剜除、肾部分切除、肾切除或选择性肾动脉栓塞等治疗[3]。肾切除指征:单侧巨大肿瘤、症状重、肾功能严重受损或并发大出血,且对侧无肿瘤或其他病变者。Takehara 等[4] 认为随访观察的原则以 4 cm 为界限,肿瘤直径小于 4 cm 观察,大于 4 cm 行手术治疗。术前不能除外恶变者,应及时手术检查,术中冰冻切片,如果病理证实恶性变者则行肾癌根治术[5]。

关键词:肾血管平滑肌脂肪瘤;治疗
中图法分类号:R732.2　　文献标识码:B

参考文献:

[1] Desai S, Hejmadi R, Krishnamurthy S, *et al*. Renal angiomyolipoma. A clinicopathologic, immunohistochemical, and follow-up study of 46 cases[J]. Am J Surg Pathol, 2001, 25(7): 972—973.

[2] Yamamoto S, Nakamura K, Kawanami S, *et al*. Renal angiomyolipoma: evolutional changes of its internal structure on CT[J]. Abdom Imaging, 2000, 25(6): 651—654.

[3] Khaitan A, Hemal A K, Seth A, *et al*. Management of renal angiomyolipoma in complex clinical situations[J]. Urol Int, 2001, 67(1): 28—33.

[4] Takehara K, Koga S, Nishikido M, *et al*. Clinical evaluation of renal angiomyolipoma[J]. Hinyokika Kiyo, 2001, 47(10): 705—708.

[5] 李晓飞. 肾血管平滑肌脂肪瘤[J]. 中华泌尿外科杂志, 1992, 13(4): 305—306.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net