

姜黄素诱导人结肠癌细胞株 SW480 凋亡及其 bcl-2 表达相关性研究

田慧军¹, 王笛乐²

Effect of Expression of bcl-2 and Apoptosis Induction by Curcumin in Colon Cancer Cell SW480

TIAN Hui-jun¹, WANG Di-le²

1. Department one of Geriatrics, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China; 2. Department of Surgery, Wuhan Central Hospital

Abstract: **Objective** To study the effect of curcumin on apoptosis and bcl-2 expression in SW480 human colon cancer cells. **Methods** The inhibitive effect of curcumin on SW480 was measured with MTT. Cell cycle phase was analysed by flow cytometry. Apoptosis of SW480 was studied by TUNEL. The expression of bcl-2 gene was determined by immunohistochemical analysis. **Results** MTT test showed that curcumin was cytotoxic to cells, the number of the apoptosis cell line increased. FCM showed that the proportion of G₀/G₁ phase increased while the S and G₂/M phase decreased in the cell cycle. In curcumin treated cell line, bcl-2 expression was down regulated at protein level. **Conclusions** Curcumin inhibited the proliferation of SW480 by inducing apoptosis in the study. The prevented cells from entering the next cell cycle and down regulation of bcl-2 protein may be the mechanism.

Key words: Curcumin; Colorectal carcinoma; Cell cycle; bcl-2 gene

摘要: **目的** 探讨姜黄素对人结肠癌细胞株 SW480 诱导凋亡的影响及其作用机制。 **方法** 5~50 μM 姜黄素分别处理 SW480 细胞 6~48 h 后, MTT 法检测细胞的生长活性, 流式细胞仪检测细胞周期, TUNEL 法检测细胞凋亡, 免疫组化法检测细胞内 bcl-2 蛋白表达水平。 **结果** MTT 显示姜黄素对 SW480 细胞具有细胞毒作用, 呈时间-浓度依赖性。 FCM 结果显示细胞周期中 G₀/G₁ 期细胞比例增加, S 期、G₂/M 期比例下降。 TUNEL 法显示凋亡细胞数增加, 免疫组化结果显示 bcl-2 基因表达明显减弱。 **结论** 姜黄素能抑制结肠癌 SW480 细胞的增殖并诱导细胞凋亡。 其机制可能与干扰细胞周期及下调 bcl-2 基因表达有关。

关键词: 姜黄素; 结肠肿瘤; 细胞周期; bcl-2 基因

中图分类号: R735.3⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)03-0185-03

0 引言

姜黄素 (curcumin) 是从姜黄中提取的酚性色素, 属于天然酚类抗氧化剂, 其主要药理作用有抗炎、抗动脉粥样硬化、抗脂质过氧化、抗病毒、抗肿瘤等作用。研究表明, 姜黄素能选择性地抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡^[1,2], 但其中所涉及的机制仍然不十分明确。本研究探讨了姜黄素诱导结肠癌细胞株 SW480 凋亡效应及其对 bcl-2 基因表达的影响, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期: 2005-03-07; 修回日期: 2005-07-07

作者单位: 1. 430070 广州军区武汉总医院老年病一科;

2. 武汉中心医院普通外科

作者简介: 田慧军 (1977), 男, 硕士, 主要从事消化道肿瘤的防治研究

1.1.1 药物及细胞株 姜黄素为英国 DAH 公司产品。SW480 人结肠癌细胞株由武汉大学典藏中心提供。

1.1.2 主要试剂 MTT (噻唑蓝) 为美国 Sigma 公司产品。小牛血清、RPMI1640 为美国 GIBCO 公司产品。细胞凋亡原位检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。bcl-2 免疫组化试剂盒为武汉博士德公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SW480 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱中常规传代培养。设对照组和实验组, 并根据实验要求加入不同浓度的试剂。

1.2.2 噻唑蓝还原法 (MTT 法) 检测细胞生长抑制率 取对数生长期细胞 5 × 10⁴ 个/ml, 每孔 0.2 ml, 接种于 96 孔组织培养板中, 设 PBS 对照组

和不同浓度(5~50 $\mu\text{mol/L}$)的实验组,各设3个复孔。置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,分别作用6h、12h、24h、48h,实验终止前4h每孔加MTT(5mg/ml)工作液20 μl ,上机前除去培养液,每孔加200 μl 二甲基亚砜,在酶标仪(570nm波长)上测量各孔吸光度值(OD 值),按下列公式计算细胞生长抑制率。

抑制率(%)=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) $\times 100\%$

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 消化收集各实验组及对照组分别培养24h的细胞,调整细胞悬液浓度为 $1\times 10^6/\text{ml}$,上流式细胞仪分析。用multicycle DNA 分析软件进行细胞周期的测定。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 操作步骤按试剂盒说明进行。结果判定:细胞核染为棕黄色的细胞被判定为凋亡细胞。随机选取5个高倍视野(400倍),分别计数凋亡细胞数和细胞总数,计算凋亡指数(apoptosis index, AI)。

$AI=(\text{凋亡细胞数}/\text{细胞总数})\times 100\%$

1.2.5 免疫组化法检测 bcl-2 的表达 按照SABC试剂盒使用说明书操作。显色后用图像分析仪进行图像分析。随机测定100个细胞,测出阳性反应细胞的总面积($Area$)和积分光密度(IOD),然后求出平均光密度(D)值。

1.2.6 统计学分析 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行方差分析。

2 结果

2.1 姜黄素对 SW480 细胞的生长抑制 对照组 SW480 细胞体外生长活跃,经5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理6~48h后,SW480 细胞生长均不同程度地受到抑制,呈时间-浓度依赖性,见表1。

表1 姜黄素对 SW480 细胞的生长抑制作用

剂量($\mu\text{mol/L}$)	6h	12h	24h	48h
5	5.21	21.07	33.54	45.30
10	6.68	28.67	39.36	50.24
20	10.34	41.21	49.87	68.16
50	18.76	56.32	75.33	85.24

2.2 姜黄素对 SW480 细胞周期的影响 正常状态下,癌细胞大多处于 G_1 期, S 期次之, G_2/M 期最少。对照组DNA组方图为典型肿瘤细胞的 G_0/G_1 、 S 、 G_2/M 峰型。从表2可以看出,细胞周期发生明显变化。 G_0/G_1 期比例降低, S 期、 G_2/M 期比例均增高,呈剂量依赖关系。提示姜黄素可阻断癌细胞从 G_0/G_1 期到 S 期的发展。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 结果显示,光镜下阳性细胞及凋亡细胞核染成棕黄色,细胞由梭形变

成圆形,细胞皱缩,细胞核固缩,核碎裂等。由表3可以看出,姜黄素可诱导癌细胞凋亡,且呈剂量依赖关系,且各浓度组间差异具有显著性($P<0.05$),见图1。

表2 姜黄素对 SW480 细胞周期的影响

姜黄素 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞周期分布(%)		
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
0	67.32	23.38	9.28
5	63.54	26.22	11.19
10	57.30	29.36	13.31
20	48.28	34.23	17.48
50	38.40	42.49	19.10

表3 不同浓度姜黄素处理后细胞凋亡的检测结果($\bar{x}\pm s$)

分组	剂量($\mu\text{mol/L}$)				
	0	5	10	20	50
24h	2.31 ± 0.58	6.13 $\pm 0.62^a$	11.21 $\pm 2.31^b$	35.67 $\pm 4.51^b$	61.26 $\pm 1.95^b$
48h	2.55 ± 0.33	10.25 $\pm 1.14^b$	28.54 $\pm 3.12^b$	56.32 $\pm 3.53^b$	83.29 $\pm 2.13^b$

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$ vs control

2.4 bcl-2 表达的免疫组化检测结果 bcl-2 主要分布在细胞质中,其阳性表现为细胞质呈棕褐色。结果显示经姜黄素处理后 bcl-2 表达明显减弱,统计学分析有显著差异($P<0.05$)。随着姜黄素浓度的增加,bcl-2 表达阳性的细胞百分率逐渐降低,具有显著性差异($P<0.05$),见表4,图2。

表4 SW480 细胞 bcl-2 表达平均光密度的检查结果($\bar{x}\pm s$)

分组	剂量($\mu\text{mol/L}$)				
	0	5	10	20	50
24h	0.514 ± 0.018	0.465 $\pm 0.023^a$	0.418 $\pm 0.031^b$	0.348 $\pm 0.051^b$	0.278 $\pm 0.015^b$
48h	0.475 ± 0.033	0.452 ± 0.014	0.384 $\pm 0.012^b$	0.325 $\pm 0.025^b$	0.254 $\pm 0.013^b$

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$ vs control

3 讨论

实验研究发现姜黄素可抑制胃癌、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌的发生^[2-4]。本实验通过MTT法发现姜黄素对SW480细胞生长有明显的浓度依赖性抑制作用。流式细胞仪检测发现经姜黄素处理后SW480细胞 G_0/G_1 期细胞比例明显增多, S 期和 G_2/M 期细胞比例明显减少,说明细胞生长被阻滞于 S 期和 G_2/M 期,并且此作用同样具有浓度依赖性。Mehta等^[5]报道,以姜黄素处理的数株人乳腺癌细胞均可发生 G_2/M 期停滞,但未观察到细胞周期蛋白(cyclin)B的明显变化。经姜黄素处理的人结肠癌细胞HT29和HCT15也同样发生 G_2/M 期停滞^[6]。而许建华等^[7]的研究表明姜黄素处理的人肝癌细胞BEL7402则发生 S 期停滞。这些结果表明,对于不同组织类型的癌细胞来说,姜黄素对细胞周期的调控可能存在不同的机制。本实验结果表明,姜黄素具有直接杀伤肿瘤细胞的作用,其干扰细

Genistein 对耐药卵巢癌细胞 SKOV-3 增殖、凋亡和顺铂敏感性的影响

袁 鹏,黄艳红,辛晓燕,宋 晖,田 爽,于月成,王德堂

Effects of Genistein on Proliferation, Apoptosis and Cisplatin Sensitivity of Drug-resistant Human Ovarian Carcinoma Cell SKOV-3

YUAN Peng, HUANG Yan-hong, XIN Xiao-yan, SONG Hui, TIAN Shuang, YU Yue-cheng, WANG De-tang

Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding Author: XIN Xiao-yan, E-mail: gynobs@fmmv.edu.cn

Abstract Objective To study the effects of genistein on proliferation, apoptosis and cisplatin sensitivity of drug-resistant ovarian carcinoma cell skov-3. **Methods** MTT assay was used to analyze growth inhibitory effect of genistein alone and with cisplatin on SKOV-3 cell. Cell cycle arrest and apoptosis was measured by flow cytometry (FCM). **Results** Genistein exerted inhibitory effect on SKOV-3 cell in a concentration-dependent way and significantly enhanced its sensitivity to cisplatin ($P < 0.05$). Generally, cisplatin (0.625

收稿日期:2005-07-25;修回日期:2005-10-21
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472226)
通讯作者:辛晓燕,E-mail: gynobs@fmmv.edu.cn
作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院妇产科
作者简介:袁鹏(1979-),男,硕士在读,主要研究方向为妇科肿瘤

胞周期使阻断于 S 期和 G₂/M 期可能是姜黄素抗瘤作用的重要机制。

肿瘤的发生与细胞凋亡的异常有密切关系,肿瘤细胞凋亡是一个多基因参与调控的复杂过程,凋亡可使肿瘤细胞主动性自杀性死亡。其中 bcl-2 家族是最重要的基因之一,其编码的蛋白能抑制细胞凋亡。bcl-2 通过许多刺激因素如神经营养和增长因子的缺乏、Ca⁺⁺ 渗透、热休克、辐射和某些病毒等而阻止细胞死亡,可导致 DNA 受损的细胞持续生存、突变产物聚集,从而促进肿瘤的发生发展。它调节细胞凋亡的作用点可能是影响线粒体释放细胞色素 C^[8]。姜黄素能显著诱导 H-ras 转化的人乳腺上皮细胞 MCF10A 细胞凋亡,并在 mRNA 和蛋白水平下调 bcl-2 基因的表达^[9]。Miyashita 发现 bcl-2 蛋白能抑制抗肿瘤药物诱导的细胞凋亡^[10]。实验结果表明,姜黄素能诱导 SW480 细胞凋亡并降低 bcl-2 蛋白表达,提示该基因的表达与姜黄素诱导 SW480 的细胞凋亡有着密切关系。姜黄素诱导 SW480 细胞凋亡,其机制可能是通过下调 bcl-2 基因的表达来实现的,但其确切机制尚待进一步研究。(本文图见封 3)

[1]. 胃肠病学和肝病杂志,2000,9(2):107-109.
[2] 闵智慧,李文惠. 姜黄素抑制人胃癌细胞增殖及对细胞周期的影响的研究[J]. 肿瘤防治研究,2004,31(4):211-213.
[3] Sindhwani P, Hampton JA, Baig MM, et al. Curcumin prevents intravesical tumor implantation of the MB T-2 tumor cell line in C3H mice[J]. J Urol, 2001, 166(4): 1498-1501.
[4] Holy JM. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF7 breast cancer cells[J]. Mutat Res, 2002, 518(1): 71-84.
[5] Mehta K, Pantazis P, McQueen T, et al. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines[J]. Anticancer Drugs, 1997, 8(5): 470-481.
[6] Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, et al. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells[J]. Anticancer Res, 1999, 19(5A): 3675-3680.
[7] 许建华,赵蓉,柯丹如,等. 姜黄素对人肝癌 BEL7402 细胞杀伤动力学及周期时相的影响[J]. 福建医科大学学报, 1998, 32(3): 236-239.
[8] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5303): 1129-1132.
[9] Kim MS, Kang HJ, MOON A. Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF10A human breast epithelial cells[J]. Arch Pharm Res, 2001, 24(4): 349-354.
[10] Miyashita T, Reed JC. bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy induced apoptosis in a human leukemia cell line[J]. Blood, 1993, 81(1): 151-157.

参考文献:

[1] 陈宏,张振书,张亚历,等. 姜黄素对大肠癌细胞周期的影响

[编辑:贺文]

结直肠癌中 PTEN 蛋白的表达

(正文见 183 页)

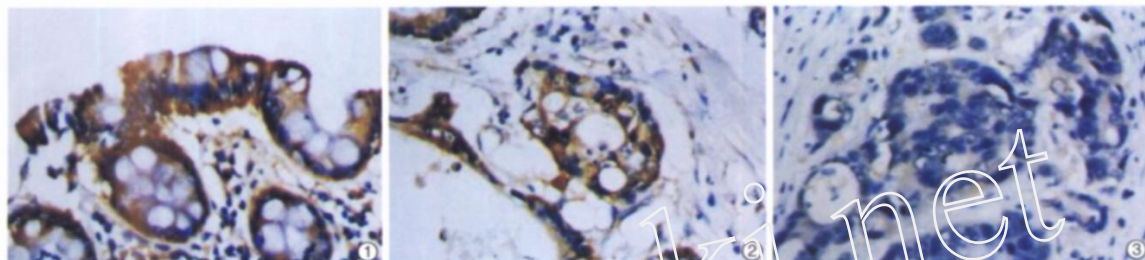


图1 正常大肠粘膜 PTEN 表达 (SP $\times 400$) 图2 结直肠癌 (高分化) PTEN 表达 (SP $\times 400$)
图3 结直肠癌 (低分化) PTEN 表达 (SP $\times 400$)

姜黄素诱导人结肠癌细胞株 SW480 凋亡及其 bcl-2 表达相关性研究

(正文见 185 页)



图1 姜黄素诱导 SW480 细胞凋亡的情况(TUNEL $\times 400$)

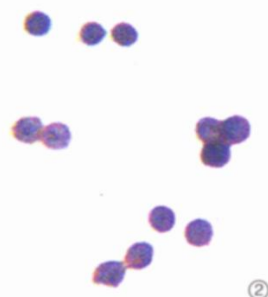


图2 bcl-2 蛋白在 SW480 细胞中的阳性表达(SABC $\times 200$)

TopoII α 、GST- π 、P-gp 在卵巢癌化疗耐药中的作用

(正文见 197 页)

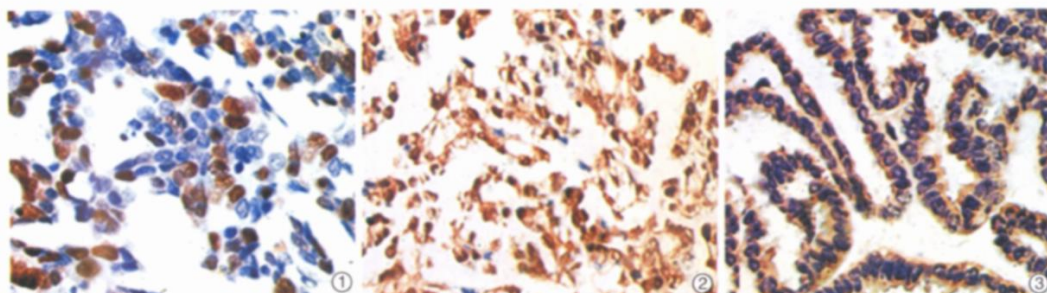


图1 卵巢癌组织 TopoII α 的表达 (++) 图2 卵巢癌组织 GST- π 的表达 (+++)
图3 卵巢癌组织 P-gp 的表达 (+++)