

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)24-2287-04

姜黄素对人肺腺癌 A549/DDP 细胞增殖活性的影响

陈旭昕 张 艰 赵 峰 宋立强 李 艳 王 洋 李焕章 (第四军医大学西京医院呼吸内科 陕西 西安 710033)

Effect of curcumin on proliferation of human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP

CHEN Xu-Xin, ZHANG Jian, ZHAO Feng, SONG Li-Qiang, Li Yan, WANG Yang, Li Huan-Zhang

Department of Respiratory Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】AIM: To explore the effect of curcumin on proliferation of human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP.

METHODS: Cell counting was used to plot the cell growth curves of A549 cells and A549/DDP cells. The resistance index of A549/DDP cells to cisplatin and inhibition rate of A549/DDP cells in different concentrations of curcumin were measured by MTT assay. After the cells were treated with curcumin, cellular morphology was observed under fluorescence microscope. Cell cycle analysis and apoptosis rate were detected by flow cytometry.

RESULTS: The cell growth curve of A549 cells was similar to that of A549/DDP cells. The doubling generation time of A549 cells and A549/DDP cells were (33.24 ± 0.24) h and (32.88 ± 0.11) h, respectively (P > 0.05). After 72 h of treatment with cisplatin, IC₅₀ of cisplatin to A549 cells and A549/DDP cells were 13.57 μmol/L and 146.79 μmol/L, respectively, with the resistance index being 10.82. The inhibitory effect of curcumin on A549/DDP cells was shown in the dose-dependent and time-dependent manners (P < 0.05). Under fluorescence microscope, cells treated with curcumin showed shrunk or distorted nucleus with fluorescence conglomerated. The apoptosis rate of A549/DDP cells induced by curcumin was remarkably higher than that of the control cells, and cell cycle analysis showed G2 phase arrest. **CONCLUSION:** Curcumin exerts inhibitory effects on proliferation of A549/DDP cells in dose-dependent and time-dependent manners possibly through inducing cell cycle arrest and cell apoptosis.

【Keywords】 curcumin; lung neoplasms; A549/DDP cell; apoptosis; cell cycle

【摘要】目的:探讨姜黄素对人肺腺癌 A549/DDP 细胞增殖活性的影响。**方法:**采用细胞计数法绘制亲代 A549 和 A549/DDP 细胞生长曲线,MTT 法测定 A549/DDP 对顺铂的耐药指数以及姜黄素对 A549/DDP 细胞抑制率。将不同浓度姜黄素作用于 A549/DDP 细胞 24 h 后, Hoechst33258 染色荧光显微镜下观察细胞核形态,流式细胞仪检测细胞凋亡率。以 20 μmol/L 的姜黄素作用细胞 24 h 后,流式细胞仪分析细胞周期。**结果:**亲代 A549 细胞和 A549/DDP 细胞的生长曲线相似,倍增时间分别为(33.24 ± 0.24)h 和(32.88 ± 0.11)h (P > 0.05)。顺铂处理 A549 和 A549/DDP 细胞 72 h 后,半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 13.57 μmol/L 和 146.79 μmol/L, A549/DDP 细胞对顺铂的耐药指数为 10.82。姜黄素对 A549/DDP 细胞增殖有抑制作用,并且呈时间浓度依赖性(P < 0.05)。姜黄素作用后, Hoechst 染色显示 A549/DDP 细胞核缩小变形,致密浓染荧光成团块分布。流式细胞仪分析结果显示细胞凋亡率呈明显剂量依赖关系(P < 0.05)。20 μmol/L 的姜黄素作用细胞 24 h,引发 G2 期阻滞。**结论:**姜黄素对人肺腺癌 A549/DDP 细胞增殖具有抑制作用,并呈时间、浓度依赖,其作用可能是通过阻滞细胞周期进程和诱导细胞凋亡来实现的。

【关键词】 姜黄素; 肺肿瘤; A549/DDP 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

【中图分类号】 R969.4

【文献标识码】 A

0 引言

非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)早期多无症状,就诊时患者疾病已属晚期,因此治疗上多采取以化疗为主的综合治疗。顺铂(cisplatin, DDP)具有广泛的抗癌谱,是 NSCLC 化疗方案中的一线药物。但随着晚期肺癌患者化疗的开展,DDP 的获得性耐药问题日益严重,制约了其疗效的发挥。姜黄素(Curcumin, C₁₂H₃₆O₅, FW 346.5)是一种植物多酚,来源于姜黄、郁金、莪术、菖蒲等中药的根茎,具有抗肿瘤等广泛的药理作用。近年来,体外实验表明姜黄素能抑制包括结肠癌^[1]、前列腺癌^[2]、肺癌^[3]等在内的多种肿瘤细胞增殖,并诱导肿瘤细胞凋亡。但是关于姜黄素对耐 DDP 人肺腺癌细胞 A549/DDP 的作用尚少见报道。本研究以人肺腺癌 A549/DDP 细胞株为研究对象,观察姜黄素对其增殖抑制作用,旨在进一步阐明姜黄素的抗肿瘤机制,为其应用于肿瘤临床治疗提供实验依据。

收稿日期 2007-08-31; 接受日期 2007-10-29

基金项目 国家自然科学基金(30572359)

通讯作者 张 艰. Tel (029)84775237 Email: zhangjian197011@yahoo.com

作者简介:陈旭昕. 硕士生(导师李焕章). Tel (029)84775237

Email: chenxux@fmmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料 肺腺癌细胞株 A549 由本室保存,其 DDP 耐药细胞株 A549/DDP 由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤生物学检测中心提供。姜黄素纯品,四甲基偶氮唑蓝 (MTT),二甲基亚砜 (DMSO),胰酶均为美国 Sigma 公司产品;DDP 为山东齐鲁医药有限公司产品;Hoechst33258 染色试剂盒为碧云天公司产品;PI 和 Annexin V-FITC 均为 BD 公司产品;RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品,胎牛血清为杭州四季清公司产品,其余试剂均为国产分析纯。姜黄素用 DMSO 溶解配制成终浓度为 40 mmol/L 的母液,过滤除菌,避光存储于 -20°C 备用,每次实验前用培养液稀释至所需浓度 (DMSO 终浓度 $<1/1000$)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 在 37°C , 50 mL/L CO_2 饱和湿度条件下,将 A549 细胞培养在 RPMI1640 培养液中 (含 100 mL/L 胎牛血清,青霉素和链霉素各 100 U/mL) 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代。为保持 A549/DDP 的耐药性,该细胞需培养在含 DDP $6\ \mu\text{mol/L}$ 的上述培养液中,于实验的前 2 d 更换为无 DDP 的上述 RPMI1640 培养液。实验用细胞均处于对数生长期。

1.2.2 A549 和 A549/DDP 细胞生长曲线的测定 采用细胞计数法绘出两细胞株生长曲线,并按公式: $[TD = t \log 2 / (\log N_t - \log N_0)]$ 计算其细胞群体倍增时间。公式中 t 代表培养时间, N_0 及 N_t 代表接种后及培养 t 小时后的细胞数。

1.2.3 DDP 对亲代 A549 细胞和 A549/DDP 细胞的剂量效应 将两株细胞接种于 96 孔培养板中,每孔细胞数 2×10^3 , 培养 12 h 后,分别加入终浓度为 10, 20, 40, 80, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 DDP, 终体积为 200 μL 。培养 72 h 后,每孔中加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL , 37°C 继续孵育 4 h 后终止培养,小心吸弃孔内上清液,每孔中加入 150 μL DMSO 振荡 10 min 后比色,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔 A 值。空白对照组加入 RPMI1640, 阴性对照组加入无 DDP 的 RPMI1640, 每浓度组设 5 个复孔。抑制率 (%) = $[1 - (\text{实验组 A 值} - \text{空白对照组 A 值}) / (\text{阴性对照组 A 值} - \text{空白对照组 A 值})] \times 100\%$ 。采用直线回归法计算 DDP 的半数抑制浓度 IC_{50} 值。耐药倍数计算公式: 耐药倍数 = 耐药株 IC_{50} 值 / 敏感株 IC_{50} 值。

1.2.4 姜黄素对 A549/DDP 细胞增殖抑制作用 将 A549/DDP 细胞分别加入到 96 孔细胞培养板中,每孔细胞数为 2×10^3 个,培养 12 h 后,加入含终浓度为 5, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的培养液,总体积为 200 μL 。同时设阴性对照组 (接种同浓度的细胞,加入无姜

黄素的 RPMI1640) 和空白对照组 (仅加入 RPMI1640)。每浓度组设 4 个复孔,培养 6, 12, 24, 48 h 观察细胞形态, 然后进行 MTT 法检验 (同上)。

1.2.5 Hoechst33258 染色法观察细胞形态 将 A549/DDP 细胞分别加入到含盖玻片的 6 孔细胞培养板中,每孔细胞数为 1×10^4 个,培养 12 h 后,去培养液,加入含终浓度为 0, 5, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的培养液继续培养 24 h, 取出细胞铺片,按照 Hoechst33258 染色试剂盒说明书进行染色。

1.2.6 姜黄素对 A549/DDP 细胞凋亡的影响 将 A549/DDP 细胞接种于直径 6 cm 培养皿 (接种密度 $10^5/\text{mL}$) 中,过夜培养,次日加入含终浓度为 0, 5, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的培养液,继续培养 24 h 后收获各组细胞 5×10^5 个细胞转移至离心管,用 50 μL 结合缓冲液重悬细胞,每组分别加入 PI 及 Annexin V-FITC, 室温避光 30 min 上样,立即用流式细胞仪 (FCM) 分析凋亡率。

1.2.7 姜黄素对 A549/DDP 细胞周期的影响 将 A549/DDP 细胞接种于直径 6 cm 培养皿 (接种密度 $10^5/\text{mL}$) 中,过夜培养,次日加入含终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的培养液,同时设阴性对照组 (同上)。继续培养 24 h 后,以磷酸盐缓冲液洗涤,收集细胞,加入预冷的 700 mL/L 乙醇,于 4°C 固定 12 h,离心洗涤后,悬浮于 PI 染液中,室温下避光染色 15 min,最后以 300 目筛网过滤,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ FCM 分析细胞周期。

统计学处理:用 SPSS11.0 统计软件包处理,统计学方法采用 t 检验, Pearson 相关分析, χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 亲代 A549 细胞和 A549/DDP 细胞生长特性比较 亲代 A549 细胞和 A549/DDP 细胞生长曲线相似 (图 1)。亲代 A549 细胞群体倍增时间 $T_d = (33.24 \pm 0.24)$ h, A549/DDP 细胞群体倍增时间 $T_d = (32.88 \pm 0.11)$ h, 两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

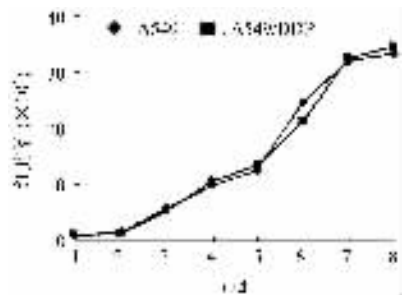


图 1 亲代 A549 细胞和 A549/DDP 细胞生长曲线

2.2 A549/DDP 细胞耐药性的鉴定 MTT 结果显示, DDP 对 A549 和 A549/DDP 细胞的增殖均有抑制作用. DDP 对 A549 和 A549/DDP 细胞的 IC₅₀ 值分别为 13.57 μmol/L 和 146.79 μmol/L, 耐药倍数为 10.82(表 1).

表 1 不同浓度 DDP 处理 72 h 对 A549 和 A549/DDP 细胞的抑制率 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

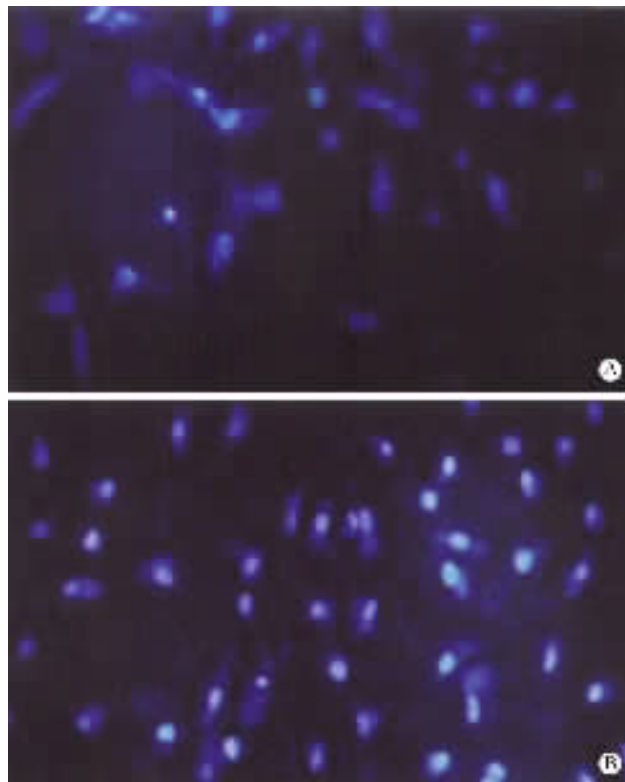
DDP (μmol/L)	抑制率(%)	
	A549	A549/DDP
0	0	0
10	48.4 ± 4.4	1.5 ± 0.4
20	56.7 ± 6.3	2.7 ± 0.5
40	86.3 ± 0.7	10.3 ± 0.8
80	96.5 ± 0.3	22.4 ± 4.4
100	98.6 ± 0.6	37.1 ± 8.1
200	99.6 ± 0.3	65.9 ± 0.5

2.3 姜黄素对 A549/DDP 细胞的细胞毒作用 不同浓度姜黄素作用 A549/DDP 细胞后, 倒置显微镜下观察. 可见对照组细胞呈梭形或多边形, 细胞贴壁生长, 细胞透亮折光性好, 状态佳. 而在 5, 10, 20 μmol/L 剂量组, 细胞数减少, 形态欠规则, 呈梭形或少许圆形贴壁生长, 细胞形态变化随着药物浓度增加和作用时间延长而愈加明显. 30, 40 μmol/L 剂量组细胞折光性差, 明显增大, 轮廓模糊, 胞内空泡增多, 部分细胞已坏死, 漂浮于培养液. MTT 结果显示其抑制作用随药物浓度增加和作用时间延长而增强, 呈剂量时间依赖性(表 2). Pearson 相关分析结果显示抑制率与浓度和时间均呈正相关, 前者 r_{6h}, r_{12h}, r_{24h}, r_{48h} 分别为 0.998, 0.967, 0.963 和 0.981; 后者 r₅, r₁₀, r₂₀, r₃₀, r₄₀ μmol/L 分别为 0.981, 0.980, 0.996, 0.967, 0.988(P 均 < 0.05). 40 μmol/L 的姜黄素作用 48 h, 抑制率为 78.48%. 作用 48 h, 半数抑制浓度 IC₅₀ 值为 18.06 μmol/L.

表 2 不同浓度姜黄素作用不同时间对人 A549/DDP 细胞增殖的抑制率 (n=4, %, $\bar{x} \pm s$)

作用时间(h)	姜黄素浓度(μmol/L)				
	5	10	20	30	40
6	3.6 ± 1.4	6.7 ± 3.3	10.9 ± 1.7	15.6 ± 3.8	19.6 ± 2.6
12	5.4 ± 2.4	14.2 ± 5.4	15.2 ± 4.6	22.0 ± 3.0	30.3 ± 2.1
24	8.6 ± 3.9	20.1 ± 5.3	24.3 ± 0.8	50.9 ± 4.7	53.4 ± 3.1
48	11.7 ± 0.6	30.5 ± 6.2	50.3 ± 4.1	69.1 ± 1.7	78.5 ± 0.4

2.4 姜黄素对 A549/DDP 细胞凋亡的影响 荧光显微镜下观察, 姜黄素组部分细胞的细胞核均有破裂, 大小不等, 被荧光染料着色成致密浓缩发白发亮的细胞核, 此为典型的细胞凋亡形态. 其中以 40 μmol/L 姜黄素组最多, 对照组细胞核完整, 未见凋亡形态细胞(图 2).



A: 阴性对照组; B: 40 μmol/L 姜黄素组.

图 2 荧光显微镜下 A549/DDP 细胞形态 ×400

FCM 分析显示 0, 5, 10, 20, 30, 40 μmol/L 的姜黄素作用于 A549/DDP 细胞 24 h 后, 凋亡早期细胞所占的百分比分别为 2.93%, 3.68%, 7.71%, 20.23%, 23.0%, 32.15%, 显示出明显的剂量依赖关系(P < 0.05).

2.5 姜黄素对细胞周期的阻滞 20 μmol/L 的姜黄素作用于 A549/DDP 细胞 24 h 后, 实验组 G₂/M 期细胞比例(35.2%)显著高于对照组(10.8%); S 期细胞比例(13.16%)显著低于对照组(31.05%). G₀/G₁ 期细胞比例分别为 51.65% 和 58.15%, 两组差异无统计学意义(P > 0.05).

3 讨论

肿瘤细胞对现有抗癌药物的耐受是目前肿瘤化疗失败的主要原因. 寻找既能有效克服肿瘤细胞耐药、毒副作用又小的抗癌药物, 是目前临床上急需解

决的问题。自 1985 年印度 Kuttan 等^[4]首次提出姜黄和姜黄素具有抗肿瘤作用的可能性后,国内外众多学者对姜黄素的抗肿瘤作用及其机制做了大量的研究,发现姜黄素对人肝癌细胞,人肾癌细胞和结、直肠癌细胞生长等都具有明显的抑制作用,并可诱导肿瘤细胞凋亡^[5-6]。本研究采用耐药肿瘤细胞模型,经细胞生长曲线和对 DDP 敏感性的测定,发现耐药株细胞与亲代细胞生长特性相似,并同时保持了耐药特性(耐药倍数为 10.82)。在此基础上还观察到姜黄素可诱导耐药株细胞形态改变,影响其增殖活力,抑制其生长,并呈现明显的剂量和时间依赖性。这与张艰等^[7]的报道姜黄素对亲代 A549 细胞的结果相似,表明 A549/DDP 细胞株对姜黄素仍是敏感的。

研究表明,所有肿瘤细胞都存在凋亡抑制现象^[8]。通过诱导细胞凋亡治疗肿瘤已成为肿瘤治疗的新途径。细胞发生凋亡时,染色质会固缩, Hoechst 染色细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染。本研究中,经姜黄素干预 24 h 后的各组细胞,用 Hoechst33258 荧光染料着染后,均能找到胞核致密浓缩发白发亮的细胞,表明姜黄素可以诱导 A549/DDP 细胞凋亡。FCM 分析显示姜黄素以细胞毒性不明显的剂量(20 $\mu\text{mol/L}$)作用于 A549/DDP 细胞 24 h 后,实验组的细胞早期凋亡率即明显高于阴性对照组,进一步证明姜黄素可以诱导 A549/DDP 细胞凋亡。

细胞周期失控是肿瘤发病的重要因素之一,细胞增殖是通过细胞周期的运行来实现的。细胞周期中存在 G1/S 和 G2/M 期等两个重要的调控阻滞点,有着不同的生物学功能。G1 期阻滞防止了损伤的碱基被复制和基因组突变所导致的高频率染色体重排;G2 期阻滞则保证了 DNA 双链断裂在有丝分裂前得到修复。若正常细胞周期阻滞调控功能丧失,则使携带受损基因组的细胞增殖失控,最终形成肿瘤。Simon 等^[9]发现姜黄素作用于人乳腺癌 MCF-7 细胞 72 h 后,细胞周期停滞于 G2 期。本实验通过 PI 染色流式细胞仪分析,显示 20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素作用于 A549/DDP 细胞 24 h,可引发 G2/M 期阻滞。其机制

是否与抑制细胞周期蛋白的激活有关尚需进一步研究^[10]。

综上所述,姜黄素通过阻滞细胞周期进程,诱导细胞凋亡对人肺腺癌 A549/DDP 细胞增殖发挥抑制作用,有望成为针对耐药肺腺癌细胞新的、有效的化疗药物或耐药逆转剂。

【参考文献】

- [1] Chen A, Xu J. Activation of PPAR by curcumin inhibits moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(3): 447-456.
- [2] Deeb D, Jiang H, Gao X, et al. Curcumin sensitizes prostate cancer cell to tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand/Apo21 by inhibiting nuclear factor KappaB through suppression of IkappaB phosphorylation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(7): 803-8012.
- [3] Radhakrishna PG, Srivastava AS, Hassanein TL. Inhibition of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin [J]. *Cancer Lett*, 2004, 208(2): 163-170.
- [4] Kuttan R, Kuttan G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells polyphenolic compounds [J]. *Cancer Lett*, 1985, 29: 197.
- [5] Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: A short review [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(8): 1091.
- [6] Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(1A): 363.
- [7] 张 艰, 戚好文, 吴昌归. 姜黄素对 A549 人肺腺癌细胞增殖抑制作用及其机制的研究 [J]. *中药材*, 2004, 27(12): 923-927.
- [8] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer*, 1994, 73(8): 2013-2026.
- [9] Simon A, Allais DP, Duroux JL, et al. Inhibition effects of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships [J]. *Cancer Lett*, 1998, 129: 111-116.
- [10] Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(2A): 873-878.

编辑 王雪萍