

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.03.004

# 姜黄素对人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞增殖及凋亡的影响

范德生<sup>1</sup>,甄 蕾<sup>2</sup>,孙 宁<sup>3</sup>

## Effect of Curcumin on Proliferation and Apoptosis of Human Nasopharyngeal Carcinoma CNE-2Z Cells

FAN De-sheng<sup>1</sup>, ZHEN Lei<sup>2</sup>, SUN Ning<sup>3</sup>

1. Department of Pathology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China; 2. College of Medicine, Tongji University; 3. Department of Pathology, Guangdong Medical College

**Abstract: Objective** To study the effects of Curcumin on proliferation and apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell CNE-2Z and its possible mechanism. **Methods** After treatment with Curcumin at various concentrations, the proliferative inhibition of CNE-2Z was observed by MTT assay. The cell cycle influence and cell apoptosis rate were detected by flow cytometry. The expression of Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. **Results** Curcumin could inhibit the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells CNE-2Z at a time and dose dependent pattern. The cells were blocked at G<sub>2</sub>/M and S phases. When treated with Curcumin for 24h, the percentage of cell apoptosis was increased. Bcl-2 was down-regulated whereas Bax was up-regulated. **Conclusion** Curcumin could inhibit the proliferation of CNE-2Z and induce cell apoptosis.

**Key words:** Curcumin; Nasopharyngeal carcinoma; Proliferation; Apoptosis; Bcl-2; Bax

**摘要:目的** 探讨姜黄素对人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞增殖及凋亡的影响及其相关的分子机制。**方法** 体外培养的 CNE-2Z 细胞经不同剂量姜黄素处理后,用 MTT 法观察对细胞增殖的影响,流式细胞术检测细胞周期和凋亡率的改变,Western blot 检测姜黄素处理后相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达水平的变化。**结果** 姜黄素对 CNE-2Z 细胞的生长和增殖都具有一定程度的抑制作用,阻断细胞于 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期。姜黄素处理后 CNE-2Z 细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 蛋白表达减少,同时促凋亡基因 Bax 蛋白表达增加。**结论** 姜黄素可抑制 CNE-2Z 细胞增殖并促进其凋亡。

**关键词:**姜黄素;鼻咽癌;增殖;凋亡;Bcl-2;Bax

中图分类号:R793.63 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)03-0254-03

### 0 引言

姜黄素(Curcumin)是从姜科姜黄属(Curcuma L1)植物的根茎中提取的一种天然有效成分,具有很强的抗炎<sup>[1]</sup>、抗氧化<sup>[2]</sup>、损伤修复<sup>[3]</sup>等作用。目前,越来越多实验证实姜黄素不仅具有防癌作用,而且其抗癌谱较广,不良反应小,是一种有开发前景的天然抗肿瘤新药<sup>[4-6]</sup>。有关姜黄素在肿瘤预防和治疗方面的作用已引起了国内外学者的广泛关注,成为研究的热点。本实验通过观察姜黄素对人鼻咽癌

CNE-2Z 细胞增殖与凋亡的影响,探讨其诱导凋亡作用的可能机制,为姜黄素在鼻咽癌治疗中的临床应用提供实验和理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

人低分化鼻咽癌细胞系 CNE-2Z 细胞,广东医学院病理学教研室分离并保存。姜黄素(绿天公司,杭州),RPMI1640 培养液(Gibco,美国),新生小牛血清(四季青生物材料工程公司,杭州),四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma,美国),碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)(Sigma),Annexin v-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(晶美试剂公司,深圳),鼠抗人 Bcl-2, Bax 单克隆抗体(Santa Cruz,美国),兔抗人 β-actin 多克隆抗体,HRP 标记羊抗鼠 IgG (H + L)(中杉生物技术有限公司,北京)。

收稿日期:2010-02-15;修回日期:2010-09-01

基金项目:广东省教育厅自然科学基金资助项目(GK0404)

作者单位:1. 200021 上海,上海中医药大学附属曙光医院病理科;2. 同济大学医学院;3. 广东医学院病理学教研室

作者简介:范德生(1973-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤病理研究

## 1.2 方法

1.2.1 姜黄素对 CNE-2Z 细胞的抑制作用 取对数生长期细胞,调整到所需细胞浓度,接种于 96 孔培养板(每孔 150  $\mu$ l),24 h 后将培养液换成空白对照液和不同浓度的姜黄素溶液,分别培养 24、48h。加入 MTT,每孔 50  $\mu$ l(浓度为 5 mg/ml),37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 4 h 后终止。全自动酶标仪上以 490 nm 测各孔吸光度 A 值并计算不同浓度的姜黄素对肿瘤细胞增殖的抑制。

1.2.2 姜黄素对细胞周期的影响 收集不同浓度姜黄素作用 24 h 的细胞,PBS 洗两遍,70%乙醇固定 1 h, RNA 酶作用 30 min, PI 避光染色 30 min,流式细胞仪检测。

1.2.3 姜黄素对细胞凋亡的影响 收集不同浓度姜黄素作用 24 h 的细胞,用冷 PBS 洗两次,加入 250  $\mu$ l 结合缓冲液重新悬浮细胞,取出 100  $\mu$ l 加入 Anxin 5  $\mu$ l, PI 染液 10  $\mu$ l, PBS 400  $\mu$ l,流式细胞仪检测。

1.2.4 Western blot 分析 用预冷的 PBS 洗细胞两次,然后加细胞裂解液冰上放置 20 min,12 000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,收集上清液定量分析。取已定量的总蛋白进行 12%SDS-PAGE 实验,电转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭过夜,加入 1:500 稀释的鼠抗人 Bcl-2, Bax, EGFR 单克隆抗体,室温孵育 3 h, TBS 洗涤后加入稀释度 1:4 000 的 HRP 标记羊抗鼠 IgG (H + L),室温孵育 90 min; TBS 洗涤后经化学发光试剂孵育,暗室 X 线片曝光显示实验结果。

1.2.5 统计学方法 实验结果分别选用 *t* 检验和单因素方差分析,数据资料采用统计学软件 SPSS 12.0 处理。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度姜黄素对 CNE-2Z 细胞增殖的影响

姜黄素可以不同程度的抑制细胞增殖,同一时间点各实验组细胞抑制率比较差异有统计学意义,且抑制率与姜黄素浓度间表现出明显的剂量效应关系,见图 1。

### 2.2 姜黄素对 CNE-2Z 细胞周期的影响

药物作用 24 h 后低浓度(10  $\mu$ mol/L)时 S 期细胞明显增多( $P < 0.01$ ),中间浓度(20  $\mu$ mol/L)表现为  $G_1/G_0$  期细胞减少,而  $G_2/M$  和 S 期相对增多,差异有统计学意义。但随着浓度的增加对细胞周期的影响又逐渐减小,表现为  $G_1$  期又逐渐增多,与空白对照组相比差异仍有统计学意义( $P < 0.01$ ),  $G_2$  和 S 期有逐渐减少的趋势,见表 1。

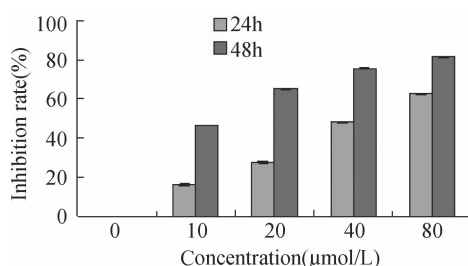


图 1 不同浓度姜黄素对 CNE-2Z 细胞的抑制率

Figure 1 Inhibition rates of Curcumin on CNE-2Z cells

表 1 姜黄素对 CNE-2Z 细胞周期的影响(%,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of Curcumin on the cell cycle of CNE-2Z cells(%,  $\bar{x} \pm s$ )

Concentration ( $\mu$ mol/L)	$G_1/G_0$	$G_2/M$	S
0	66.10 $\pm$ 0.90	18.10 $\pm$ 1.10	15.80 $\pm$ 0.19
10	65.20 $\pm$ 1.45	3.20 $\pm$ 0.30*	31.40 $\pm$ 1.75*
20	39.70 $\pm$ 0.35*	37.60 $\pm$ 1.29*	22.30 $\pm$ 0.95*
40	57.20 $\pm$ 2.00*	23.50 $\pm$ 0.54*	19.60 $\pm$ 1.39*

Note: \* :  $P < 0.01$

### 2.3 姜黄素对 CNE-2Z 细胞凋亡的影响

中低浓度时,随着姜黄素浓度的增加,凋亡率呈上升趋势,40  $\mu$ mol/L 浓度时,细胞直接死亡的比例明显增加,凋亡比例相对减少,不同浓度的姜黄素作用于 CNE-2Z 细胞所产生的凋亡率差异有统计学意义,见表 2。

表 2 姜黄素作用 24 h 时 CNE-2Z 细胞的凋亡率(%,  $\bar{x} \pm s$ )

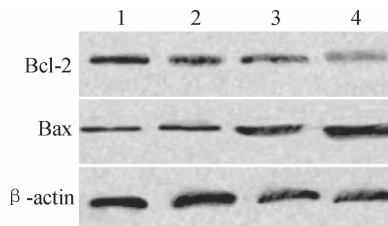
Table 2 The apoptosis rate of CNE-2Z cells after treated with Curcumin for 24 h(%,  $\bar{x} \pm s$ )

Concentration ( $\mu$ mol/L)	n	Apoptosis
0	3	1.793 $\pm$ 0.256
10	3	15.826 $\pm$ 0.310*
20	3	25.256 $\pm$ 0.994*
40	3	22.570 $\pm$ 0.551*

Note: \* :  $P < 0.05$

### 2.4 Western blot 分析结果

分别用 0, 10, 20, 40  $\mu$ mol/L 姜黄素处理细胞 24 h 后,凋亡抑制基因 Bcl-2 表达下调,促凋亡基因 Bax 表达上调,见图 2。



1: 0  $\mu$ mol/L; 2: 10  $\mu$ mol/L; 3: 20  $\mu$ mol/L; 4: 40  $\mu$ mol/L

图 2 不同浓度姜黄素作用 24 h 后相关蛋白表达

Figure 2 Expression of related proteins treated for 24 h with Curcumin

### 3 讨论

近年来,植物来源的药物越来越受到重视,从天然植物中寻找高效、低毒的抗肿瘤新药,是肿瘤治疗研究领域中的重要课题。体外细胞学实验发现,姜黄素抗癌谱广,不良反应小,可以直接抑制多种肿瘤细胞的生长和增殖,对食管癌、胃癌、结肠癌细胞等具有直接杀伤作用<sup>[7]</sup>。本实验观察到,在 10~80  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内,姜黄素在作用 24 h 和 48 h 后均可抑制 CNE-2Z 细胞的增殖,并随浓度的增加其抑制率呈现增长的趋势,同一时间点各实验组细胞抑制率相比较差异有统计学意义,显示了姜黄素可以呈剂量依赖性地抑制体外培养 CNE-2Z 细胞的增殖。

根据细胞周期各时相的生化变化,可知细胞的增殖状态,并可探讨抗肿瘤药物的作用机制。一般认为,S 期和  $G_2$  期是细胞周期的两个检测点<sup>[8-9]</sup>,本实验中 CNE-2Z 细胞经姜黄素处理后,在同一时间水平,小剂量姜黄素对 S 期敏感,但大剂量则阻滞细胞于  $G_2/M$  期, S 期受阻 DNA 难以复制, $G_2/M$  受阻,细胞不能分裂,两者都可使整个增殖周期延缓或中断,因而使细胞克隆形成减少,同一药物作用于不同时相细胞,说明姜黄素可能属于细胞周期非特异性药物。

细胞凋亡是多细胞有机体在细胞分化发育中及在各种生理、病理条件下起重要作用的一种调节适应过程,这个过程经历信号引发、调控执行和结构变化三个阶段。本实验选择了可以检测细胞早期凋亡的 Annexin V-FITC/PI 双染检测凋亡率,结果显示随着姜黄素浓度的增加,凋亡率呈上升趋势,不同浓度的姜黄素作用于 CNE-2Z 细胞所产生的凋亡率差异有统计学意义。在 40  $\mu\text{mol/L}$  时,凋亡细胞中以坏死居多,可能是药物作用较强导致细胞直接坏死,即细胞“冰冻”现象。

同时,细胞凋亡的启动又是一个复杂的、涉及多基因的过程,如野生型 p53、c-myc、Bcl-2 等都参与对凋亡的调控,而 Bcl-2 是众多凋亡基因里非常重要的一个,它不仅与恶性肿瘤的发生有关,而且能抑制肿瘤细胞的凋亡而使肿瘤耐药<sup>[10-11]</sup>。Bcl-2 基因家族成员分为两类:Bcl-2 类,包括 Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w 等,是凋亡抑制基因;Bax 类,包括 Bax, Bak, Box 等,是凋亡促进基因。Bcl-2/Bax 比值决定了细胞凋亡与否。本

实验结果显示姜黄素可以抑制 Bcl-2 蛋白的表达,同时促进 Bax 蛋白的表达,且成剂量依赖性。

本实验证实,姜黄素能有效抑制人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的增殖并诱导其凋亡,为中草药及其成分应用于临床治疗肿瘤奠定了一定的基础。

### 参考文献

- [1] Satoskar RR, Shah SJ, Shenoy SG. Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1986,24(12):651-654.
- [2] Toda S, Miyase T, Arichi H, et al. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1985,33(4):1725-1728.
- [3] Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, et al. Enhancement of wound healing by curcumin in animals[J]. *Wound Repair Regen*, 1998,6(2):167-177.
- [4] Lin YT, Wang LF, Hsu YC. Curcuminoids Suppress the Growth of Pharynx and Nasopharyngeal Carcinoma Cells through Induced Apoptosis[J]. *J Agric Food Chem*, 2009,57(9):3765-3770.
- [5] Li ZX, Ouyang KQ, Jiang X, et al. Curcumin induces apoptosis and inhibits growth of human Burkitt's lymphoma in xenograft mouse model[J]. *Mol Cells*, 2009,27(3):283-289.
- [6] Mackenzie GG, Queisser N, Wolfson ML, et al. Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT 3 pathways in Hodgkins lymphoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2008,123(1):56-65.
- [7] 霍红梅,张利元,江家贵,等.姜黄素抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及其相关的氧化应激机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009,16(5):490-493.
- [8] Singh S, Khar A. Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006,6(3):259-270.
- [9] Tse AN, Carvajal R, Schwartz GK. Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics[J]. *Clin Cancer Res*, 2007,13(7):1955-1960.
- [10] Rashmi R, Kumar S, Karunakaran D. Ectopic expression of Bcl-XL or Ku70 protects human colon cancer cells (SW480) against curcumin-induced apoptosis while their down-regulation potentiates it[J]. *Carcinogenesis*, 2004,25(10):1867-1877.
- [11] Siu PM, Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signaling in denervated rat skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2005,565(Pt 1):309-323.

[编辑:安 凤;校对:贺 文]