

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.06.003

多烯紫杉醇和姜黄素联用对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响

李玲¹, 陈福春², 陈洪雷¹, 潘琦², 刁路明¹

Effect of Combination of Docetaxel with Curcumin on Proliferation and Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cell

LI Ling¹, CHEN Fu-chun², CHEN Hong-lei¹, PAN Qi², DIAO Lu-ming¹

1. Department of Pathology, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Department of Thoracosurgery, Traditional Chinese Medical Hospital of Wenling

Corresponding Author: CHEN Hong-lei, E-mail: chenhongleiw@126.com

Abstract: Objective To study the effect of docetaxel and curcumin on proliferation and apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line A549, and to investigate whether the combination of docetaxel with curcumin can strengthen antitumour effect and decrease toxic side effect or not. **Methods** The lung adenocarcinoma cell line A549 was cultured *in vitro*. The growth inhibition ratio, morphologic changes and apoptosis index were measured by MTT test, Giemsa staining and flow cytometry, respectively. **Results** MTT results suggested that curcumin effectively inhibited the proliferation of A549 cells. Further more the inhibitory ratio of the combination of curcumin with docetaxel group

was statistically higher than the curcumin group ($P < 0.01$). The apoptosis body could also be found by Giemsa staining. It was confirmed by FACS that docetaxel and curcumin can both induce cell apoptosis. When the two drugs were com-

收稿日期: 2008-12-14; 修回日期: 2009-08-25

基金项目: 浙江省中医药普通课题研究计划(2008CB077)

作者单位: 1. 430071 武汉大学基础医学院病理教研室;

2. 浙江省温岭市中医院胸外科

通信作者: 陈洪雷, E-mail: chenhongleiw@126.com

作者简介: 李玲(1983-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事肺癌的基础研究

本项研究结果表明: 口服蒿甲醚对 SD 大鼠脑部原位接种 C₆ 脑胶质瘤有明显的抑制作用, 且随着剂量的增加抑瘤作用增强。病理切片 HE 染色结果也证实了蒿甲醚的抑瘤作用呈剂量依赖性。有研究表明, 青蒿素及其衍生物主要以其初级代谢产物青蒿醇(DHA) 的形式透过血脑屏障发挥抗癌的作用^[2], 而引起肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤血管生成是青蒿素及其衍生物主要的抗癌机制^[10-11]。

综上所述, 在一定的剂量范围内, 口服蒿甲醚对 SD 大鼠脑部原位接种 C₆ 脑胶质瘤有明显的抑制作用。

参考文献:

- [1] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, et al. The anti-malarial artesunate is also active against cancer [J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(4): 767-773.
- [2] Davis TM, Binh TQ, Ilett KF, et al. Penetration of Dihydroartemisinin into cerebrospinal fluid after administration of intravenous artesunate in severe falciparum malaria [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2003, 47(1): 368-370.
- [3] 杨小平, 潘启超, 梁永钜, 等. 青蒿酯钠的抗肿瘤作用 [J]. *癌症*, 1997, 16(3): 186-187.

- [4] 冯军, 赵洪洋, 胡雪芝, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤模型的建立 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2006, 11(10): 613-615.
- [5] Lai H, Sasaki T, Singh NP. Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin tagged iron-carrying compounds [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9(5): 995-1007.
- [6] Lai H, Singh NP. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat [J]. *Cancer Lett*, 2006, 231(1): 43-48.
- [7] Singh NP, Lai H. Synergistic cytotoxicity of artemisinin and sodium butyrate on human cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 4325-4331.
- [8] 赵小波, 刘明学, 吴凯南, 等. 青蒿琥酯抑制 MCF-7 细胞的机制探讨 [J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(10): 745-747.
- [9] Sadava D, Phillips T, Lin C, et al. Transferrin overcomes drug resistance to artemisinin in human small-cell lung carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 179(2): 151-156.
- [10] 王燕燕, 宋幸福, 崔向军, 等. 青蒿琥酯对人肺腺癌 A549 细胞中 caspase-9 及 caspase-3 活性的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(9): 651-653.
- [11] Chen HH, Zhou HJ, Wu GD, et al. Inhibitory effects of artesunate on angiogenesis and on expressions of vascular endothelial growth factor and VEGF receptor KDR/flk-1 [J]. *Pharmacology*, 2004, 71(1): 1-9.

[编辑: 贺文; 校对: 黄国玲]

bined, the inductive effect on cell apoptosis became more obvious and was in concentration-dependent patterns. **Conclusion**

Curcumin can synergistically inhibit the proliferation of A549 cell with the combination of docetaxel. The combination of curcumin and docetaxel enhanced the effect and decrease the attenuation in chemotherapy.

Key words: Curcumin; Docetaxel; A549; Inhibition ratio; Apoptosis

摘要:目的 研究姜黄素和多烯紫杉醇对肺腺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响,并探讨两种药物的合用是否可增强抗癌作用及降低不良反应。方法 体外培养肺腺癌细胞系 A549 细胞,采用 MTT 法计算细胞抑制率;Giemsa 染色法观察细胞形态学变化;流式细胞仪分析细胞的凋亡率。结果 经 MTT 法检测显示,姜黄素能明显抑制 A549 细胞的生长,多烯紫杉醇 50 $\mu\text{g/ml}$ 与姜黄素 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 联用对 A549 细胞的抑制作用明显大于两药单用时的抑制作用($P < 0.01$);Giemsa 染色显示多烯紫杉醇与姜黄素联用后诱导细胞凋亡的作用增强,可见典型的凋亡小体;流式细胞仪结果表明姜黄素能增加多烯紫杉醇的细胞凋亡率,其作用呈剂量依赖性。结论 姜黄素与多烯紫杉醇可协同抑制人肺腺癌 A549 细胞的增殖;二者联合化疗有增效减毒作用。

关键词:姜黄素;多烯紫杉醇;A549 细胞;抑制率;细胞凋亡

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A

文章编号:1000-8578(2010)06-0617-04

0 引言

姜黄素是从姜黄、郁金、莪术、菖蒲等中药的根茎中提取的一种酚性化合物,具有降血压、抗心肌缺血、抗凝、降血脂和抗肿瘤等多种作用^[1]。近年来体外实验表明姜黄素能够抑制包括乳腺癌、结肠癌、肺癌等多种肿瘤细胞增殖,并能诱导肿瘤细胞的凋亡^[2-4]。多烯紫杉醇被认为是迄今疗效最显著的抗癌药物之一,具有广谱的抗白血病和抗实体瘤活性,1996 年经美国 FDA 批准用于肺癌、乳腺癌、结肠癌等的治疗。姜黄素与多烯紫杉醇联用是否会影响到多烯紫杉醇的疗效,是肺癌治疗中是否应用姜黄素的关键问题。目前多烯紫杉醇与姜黄素联用对肺腺癌细胞增殖影响的研究报道较少,本研究拟在观察姜黄素与多烯紫杉醇联合对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响,探讨两者之间的相互作用关系,以期为临床联合用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌 A549 细胞由武汉大学典藏中心提供;噻唑蓝(MTT)和 Giemsa 染液购于武汉凌飞科技有限公司;RPMI 1640 培养液购于 GIBCO 公司;小牛血清购于武汉三利公司;多烯紫杉醇为法国安万特公司;姜黄素

购于美国 Sigma 公司,用 DMSO 溶解,-20℃ 保存,临用前解冻,用 RPMI 1640 培养液稀释到所需浓度,使 DMSO 的终浓度为 $< 0.1\%$;ANNEXIN V-FITC 凋亡检测试剂盒购于北京宝赛生物技术有限公司;流式细胞仪(Beekman coulter ELIPE, USA);全自动酶标仪(ELISA Reader, Japan)。

1.2 细胞培养及药物浓度设计

人肺腺癌 A549 细胞在含有 10% 的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养,并置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养备用。细胞按 5×10^5 接种于培养瓶中培养。姜黄素以二甲基亚砜(DMSO)稀释为 1 mmol/L 置 4℃ 冰箱保存,用时稀释成工作浓度,使 DMSO 终浓度为 $< 0.1\%$ 。工作浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 。将多烯紫杉醇首先用无水酒精稀释至 10 mg/ml 置 4℃ 冰箱保存,使用时用 2% 培养液稀释至 50 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.3 MTT 法检测 A549 细胞的增殖能力

用 0.25% 的胰蛋白酶消化对数生长期的 A549 细胞,制成 1×10^4 细胞悬液,以每孔 200 μl 接种于 96 孔板,37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 24 h 后,弃掉培养液,分别设对照组(2% 培养液)、姜黄素组(5、10、20 $\mu\text{mol/l}$)、多烯紫杉醇组(50 $\mu\text{g/ml}$)、联合组(联合上述三个浓度的姜黄素和多烯紫杉醇)。每组设 6 个平行孔,每孔加 200 μl ,孵育 24 h 后,倾去药液及培养液,每孔加入 MTT(5 g/L)20 μl ,继续孵育 4 h 倾去上清液,每孔加入 DMSO 200 μl ,充分溶解 10 min,全自动酶标仪测定 429 nm 波长的吸光度值,计算细胞存活率和抑制率。药物合用效果按下式测算: $q = E(AB) / [EA + (1-EA) \times EB]$,其中 E(AB) 为两药合用的抑制率,EA 和 EB 为单用的抑制率, $q = 0.85 \sim 1.15$ 表明两药作用相加, $q > 1.15$ 表明两药作用协同, $q < 0.85$ 表明两药相互拮抗。

1.4 Giemsa 染色观察细胞形态学改变

严格清洁、浸酸、消毒的洁净盖玻片放置于 6 孔培养板中,加入 5×10^4 /ml 浓度的 A549 细胞悬液,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 24 h, A549 细胞爬于盖玻片后,加入多烯紫杉醇 50 $\mu\text{g/ml}$ 联合姜黄素 5、10、20 $\mu\text{mol/l}$,继续培养 24 h,并于 48 h 捞出盖玻片,PBS 漂洗,无水甲醇固定,Giemsa 染色。

1.5 流式细胞术测定细胞凋亡率

选择多烯紫杉醇 50 $\mu\text{g/ml}$ 联合姜黄素 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 联合作用 24 h 的 A549 细胞进行 Annexin V-FITC 和 PI 染色,实验方法按照试剂盒说明书进行。避光室温反应 15 min,加入 300 μl Binding Buffer,在 1 h 内上机检测。

1.6 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组样本均数间的比较。 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 多烯紫杉醇与不同浓度姜黄素联用对 A549 细胞增殖的影响以及两药之间的增效作用

多烯紫杉醇与不同浓度的姜黄素联用均可明显抑制细胞的增殖能力 ($P < 0.05$),多烯紫杉醇单用的细胞抑制率大于姜黄素单用时的细胞抑制率。两药联用时的抑制效果明显高于两药单用时的抑制效果,且两药联用时随着姜黄素浓度增加,细胞抑制率也增大,见表 1。

2.2 多烯紫杉醇联合姜黄素对细胞形态学的影响

Giemsa 染色可见细胞明显皱缩,核变小,染色质呈紫红色,分割成块状,浓缩、靠近核膜,呈边集现象,并有典型的凋亡小体形成,见图 1。

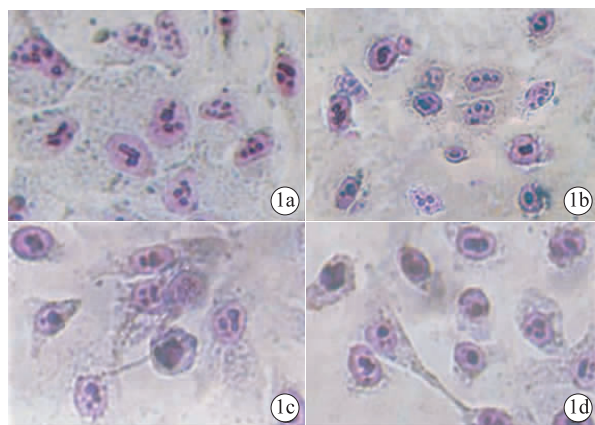
2.3 流式细胞术测定细胞凋亡率 获得由四个象限组成的细胞直方图,每个象限的细胞数目就是在检测细胞总数所在点的组分。左下象限代表正常细胞 (An-PI-),右下象限代表早期凋亡细胞 (An+PI-),右上象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞 (An+PI+),左上象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞 (An-PI+)。

表 1 不同浓度姜黄素与多烯紫杉醇联用对 A549 细胞增殖的影响 (24 h, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of the combination of different concentrations of curcumin and docetaxel on A549 cell proliferation (24h, $\bar{x} \pm s$)

Groups	OD	Inhibition ratio (%)	q
Negative control	1.187 ± 0.093	0	
Curcumin (μmol/L)			
20	0.783 ± 0.031	34.0	
10	0.903 ± 0.052	23.9	
5	1.093 ± 0.106	7.9	
Docetaxel (50 μg/ml)	0.643 ± 0.041	45.8	
Docetaxel(50 μg/ml) + Curcumin (μmol/L)			
20	0.250 ± 0.026	78.9	1.23
10	0.448 ± 0.041	62.3	1.07
5	0.545 ± 0.048	54.0	1.08

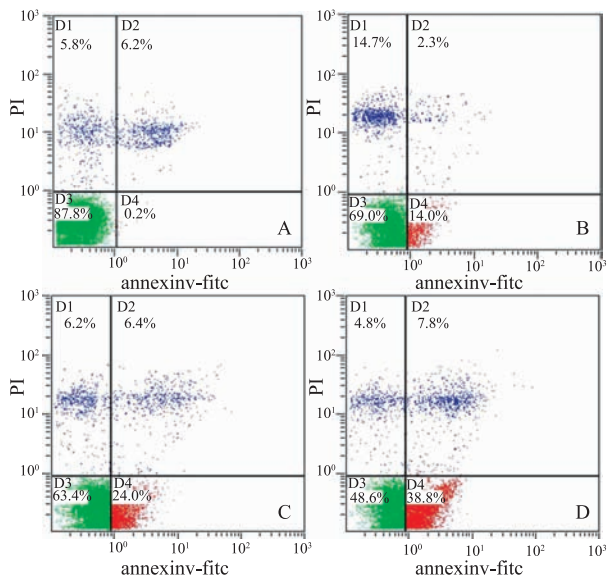
不同浓度姜黄素与多烯紫杉醇联用作用于 A549 细胞 24 h 后,凋亡率随姜黄素浓度增加逐渐升高,各浓度组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。相同浓度姜黄素与多烯紫杉醇联用作用于 A549 细胞不同时间后,凋亡率随两药作用时间延长而逐渐上升,各实验组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。当两药作用时间达 72 h,处于凋亡状态的细胞比例明显减少,死亡细胞数量逐渐增多。姜黄素与多烯紫杉醇联用对 A549 细胞的凋亡率在一定时间内呈时间浓度性依赖关系。



1a: negative control group; 1b: 50 μg/ml Docetaxel + 5 μmol/L Curcumin; 1c: 50 μg/ml Docetaxel + 10 μmol/L Curcumin; 1d: 50 μg/ml Docetaxel + 20 μmol/L Curcumin

图 1 肺癌 A549 细胞的 Giemsa 染色 (×400)

Figure 1 Giemsa staining of lung cancer A549 cell (×400)



A: negative control group; B: 50 μg/ml Docetaxel + 5 μmol/L Curcumin; C: 50 μg/ml Docetaxel + 10 μmol/L Curcumin; D: 50 μg/ml Docetaxel + 20 μmol/L Curcumin

图 2 姜黄素与多烯紫杉醇联用诱导 A549 细胞凋亡的二维散点图 (48 h)

Figure 2 2-Dimensional scatterplot of A549 cell apoptosis induced by the combination of curcumin and docetaxel (48 h)

3 讨论

多烯紫杉醇是一种来源于植物的天然抗肿瘤药物,对多种癌细胞具有显著的抑制作用。目前,多烯紫杉醇与铂类抗癌药的联合应用已成为肺癌的标准化疗方案,使晚期患者的中位生存期进一步延长。尽管此联合化疗较其他的联合化疗方案的不良反应有所减轻,但依然存在着较严重的骨髓抑制、肾脏毒性、神经毒性、胃肠道反应和过敏反应及偶发的低血压和心动过缓等不良反应。因此,寻找一种更好的与多烯紫杉醇联合应用的药物具有重要的意义。姜黄素是姜科植物姜黄的主要成分,其药理作用广泛,主要特征为抗致突变剂,也是抗促癌剂。美国国立肿瘤研究所已将其列为第三代癌化学预防药。研究表明,姜黄素可明显抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞、腹水瘤 Ehrlich 细胞、人口腔鳞状细胞癌 SCC-25 细胞、人胃癌 BGC-823 细胞^[5]和人结肠癌 SW480 细胞^[6]等多种肿瘤细胞的增殖。姜黄素除有抗癌作用外,还有很强的抗氧化和清除自由基作用,对保护机体器官是有利的。

MTT 比色法是用以观察细胞增殖能力的可靠方法之一。本实验结果显示多烯紫杉醇与不同浓度的姜黄素联用均可明显抑制细胞的增殖能力($P < 0.05$),多烯紫杉醇单用的细胞抑制率大于姜黄素单用时的细胞抑制率。两药联用时的抑制效果明显高于两药单用时的抑制效果,且两药联用时随着姜黄素浓度增加,细胞抑制率也增大。以上表明姜黄素在一定剂量范围内对 A549 细胞具有明显生长抑制作用,并呈剂量依赖性。并且多烯紫杉醇 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 5、10、20 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 的姜黄素联合应用具有明显的相加或协同效应。本实验还采用 Giemsa 染色显示被多烯紫杉醇和姜黄素联合作用的 A549 细胞呈现典型的凋亡样改变。而且以荧光素 FITC 标记的膜联蛋白 V (Annexin-v) 作为荧光探针,在流式细胞仪上可检测细胞凋亡的发生。本实验显示浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的多烯紫杉醇联合(5、10、20 $\mu\text{mol}/\text{l}$)的姜黄素作用 A549 细胞 24 小时内,导致其一部分细胞进入凋亡状态,导致少量细胞死亡。随着姜黄素药物浓度的增大,进入凋亡状态的细胞比例越多。相同浓度的两药联合作用 A549 细胞 48 小时内,其相当部分(14.0%)细胞进入凋亡状态,导致少量细胞

死去。随着姜黄素药物浓度的增大,进入凋亡状态的细胞比例越多(38.8%)。但随着时间延长,达到 72 小时,处于凋亡状态的细胞比例明显减少(12.9%),死亡细胞数量逐渐增多。

以上结果从细胞水平进一步证实,姜黄素可增加多烯紫杉醇对 A549 细胞的凋亡诱导作用,并呈剂量依赖性。其主要机制可能与姜黄素可激活 caspase-8、caspase-9、caspase-3,通过细胞凋亡的 2 条不同通路(线粒体非依赖性和依赖性),诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡^[1,7]有关。姜黄素作为一种中药成分不良反应小,同时具有抑制细胞增殖的作用,与同一浓度的多烯紫杉醇联合应用可以明显增加其凋亡率,并随着姜黄素浓度的增加,凋亡率也明显增加,可以充分说明二者联合应用具有明显的增效作用。鉴于其为中药成分的特点,毒性较小,故比较其他的多烯紫杉醇联合化疗方案毒性减小;姜黄素除有抗癌作用外,还有很强的抗氧化和清除自由基作用,可以在一定程度上降低多烯紫杉醇的不良反应。

参考文献:

- [1] Radhakrishna Pillai G, Srivastava AS, Hassanein TI, et al. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin [J]. *Cancer Lett*, 2004, 208(2):163-170.
- [2] Ramachandran C, Rodriguez S, Ramachandran R. Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(5): 3293-3302.
- [3] Milacic V, Banerjee S, Landis-Piwowar KR, et al. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(18):7283-7292.
- [4] Sen S, Sharma H, Singh N. Curcumin enhances Vinorelbine mediated apoptosis in NSCLC cells by the mitochondrial pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4):1245-1252.
- [5] 闵智慧,李文惠. 姜黄素抑制人胃腺癌细胞增殖及对细胞周期影响的研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2004, 31(4):211-213.
- [6] 田慧军,王笛乐. 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 [J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(3): 185-188.
- [7] Reuter S, Eifes S, Dicato M, et al. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11):1340-1351.

[编辑:安 凤;校对:黄国玲]