

姜黄素诱导低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 的凋亡

梁 统, 陈美, 周克元, 唐旭东, 王旭光

Induction of Apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line CNE-2Z by Curcumin

LIANG Tong, CHEN Mei-Jun, ZHOU Ke-Yuan, TANG Xu-Dong, WANG Xu-Guang

广东医学院
生物化学与分子生物学研究所,
广东 湛江 524023

*Institute of Biochemistry and
Molecular Biology,
Guangdong Medical College,
Zhanjiang, Guangdong, 524023,
P. R. China*

通讯作者 梁 统
Correspondence to: LIANG Tong
Tel: 86 - 759 - 2388581 - 1
E-mail: liangt@gdmc.edu.cn

基金项目 广东省重点学科资助课题
(No. GX9907)

Grant: Key Subject Foundation of
Guangdong Province (No. GX9907)

收稿日期 2003-12-11
修回日期 2004-05-10
万方数据

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a common malignant tumor in southern China. Radiotherapy is a major therapy for NPC in early phase, while proper chemotherapy is necessary for NPC in late phase. Some chemotherapeutic drugs have been used to treat tumors by inducing apoptosis of tumor cells. This study was to investigate effects of curcumin on proliferation, and apoptosis of NPC cell line CNE-2Z. METHODS: CNE-2Z cells were treated with different concentrations of curcumin, inhibition rates of cell proliferation, and IC₅₀ of curcumin were detected by MTT method. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry (FCM), agarose gel electrophoresis, and Hoechst33258-PI fluorescence staining. RESULTS: Proliferation of CNE-2Z cells was inhibited obviously by curcumin in dose- and time-dependent manners. IC₅₀ of curcumin to CNE-2Z cells at 24, 48, and 72 h were (24.05 ± 0.47), (19.20 ± 0.17), and (7.35 ± 0.50) μmol/L, respectively. After treated with 5, 10, and 20 μmol/L of curcumin for 24 h, apoptotic rates of CNE-2Z cells were (4.9 ± 3.2)%, (10.7 ± 2.7)%, and (14.7 ± 0.5)%, respectively. After treated with 10, 20 μmol/L of curcumin for 24 h, morphologic changes, such as chromatin shrinkage, nuclear condensation, and chromatin fragmentation, were observed in CNE-2Z cells by fluorescent staining, a fragmented DNA ladder was detected by electrophoresis. CONCLUSION: Curcumin may induce apoptosis, and inhibit proliferation of CNE-2Z cells. KEYWORDS: Curcumin; Nasopharyngeal neoplasms; Cell proliferation; Cell apoptosis

【摘要】 背景与目的 :鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方地区的高发肿瘤,发病早期的治疗主要是以放疗为主,而对晚期 NPC 患者则有必要进行适当的化疗。一些药物可通过诱导肿瘤细胞凋亡来达到治疗肿瘤的目的。本研究拟探讨姜黄素对人鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 体外增殖抑制作用及凋亡的影响。方法 :不同浓度姜黄素处理 CNE-2Z 细胞,用噻唑蓝(MTT)法测定增殖抑制率和 IC₅₀;用流式细胞术、Hoechst33258/碘化丙啶(PI)双染、琼脂糖电泳法观察细胞凋亡。结果 :姜黄素能抑制 CNE-2Z 细胞的生长,其效果与姜黄素的浓度和作用时间有关,作用 24 h、48 h、72 h 的 IC₅₀ 值为(24.05 ± 0.47) (19.20 ± 0.17) (7.35 ± 0.50) μmol/L。5、10、20 μmol/L 姜黄素处理细胞 24 h 后,流式细胞术观察到细胞凋亡率分别为 (4.9 ± 3.2)%、(10.7 ± 2.7)% 和 (14.7 ± 0.5)% ;10、20 μmol/L 姜黄素处理细胞 24 h 后,荧光染色可见细胞缩小,染色质固缩,核染色体碎裂等凋亡形态学改变,琼脂糖凝胶电泳可见 DNA 梯形条带。结论 :姜黄素可诱导 CNE-2Z 细胞凋亡,姜黄素对 CNE-2Z 细胞具有增殖抑制作用。

关键词 :姜黄素;鼻咽肿瘤;细胞增殖;细胞凋亡
中图分类号 :R284.1; R329.25; R739.63 文献标识码 :A
文章编号 :1000 - 467X(2004)12 - 1651 - 04

姜黄素(curcumin, Cur, C₁₂H₃₆O₅, FW364.5)是姜科植物根茎提取物的主要成分,是姜黄的主要有效成分,药理作用广泛,主要特性为抗炎和抗氧化。近年来,对姜黄素抗癌作用的实验研究表明,姜黄素能抑制

体内外多种肿瘤细胞的生长,如姜黄素呈时间及浓度依赖性抑制肿瘤细胞 HL-60^[1]、K562^[2]的增殖,姜黄素也可诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡^[3],且毒副作用小。鼻咽癌为我国南方地区常见肿瘤之一,目前主要以放疗为主,对晚期鼻咽癌患者单用放疗复发率高。本研究通过观察姜黄素对低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 的增殖抑制及诱导凋亡的作用,为晚期鼻咽癌的治疗提供有益的探索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

姜黄素购于 Sigma 公司,用二甲基亚砷(DMSO)溶解配制成 200 mmol/L 贮存液,煮沸 30 min 消毒后,分装放于 -20℃ 冰箱冻存备用,处理细胞时,DMSO 的浓度 ≤ 0.1% (V/V)。RPMI-1640 培养基为美国 Gibco 公司产品,新生小牛血清为杭州四季青公司产品,Hoechst33258 为 CNI 公司产品,碘化丙啶(PI)为 Sigma 公司产品,MTT 和 DMSO 为 Amresco 公司产品。流式细胞仪(美国 Coulter 生产,Epics-XL 型),酶标免疫测定仪(Bio-Tek 公司生产,Elx800 型)。

1.2 细胞培养

人低分化鼻咽癌上皮细胞株 CNE-2Z 由广东医学院病理教研室建株。5% CO₂ 37℃ 条件下,用含 10% 小牛血清、1 × 10⁵ u/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液传代培养,实验用细胞均处于对数生长期。

1.3 细胞毒实验

MTT 法参照 Hansen 等^[4]的方法进行。将对数生长期的细胞以 1 × 10⁵/ml 的浓度加入 96 孔板,每孔体积为 100 μl,待细胞贴壁后,用药组分别用终浓度为 5、10、20、40 μmol/L 姜黄素,设 0.1% DMSO 为溶剂对照,每一浓度重复 4 孔,每组至少重复 3 次,终止培养前 4 h,加 MTT 试剂和溶解液 DMSO,待甲臞溶解后,立刻于酶标仪上检测各组细胞 570 nm 和 450 nm 处吸光度(A)值,以 A₅₇₀/A₄₅₀ 比值代表细胞活力,细胞增殖抑制率 = (1 - 处理组的吸光度/对照组吸光度) × 100%,各组按改良 Karber 公式^[5]计算 IC₅₀。

1.4 流式细胞仪检测

分别用 5、10、20 μmol/L 姜黄素处理细胞 24 h 后,收集对照组及给药组细胞,1 000 × g 离心 5 min,用 PBS 洗涤 2 次,迅速注入预冷的 70% 乙醇中 4℃ 固定 24 h 以上,1 000 × g 离心 5 min,去除乙醇,PBS 洗涤 1 次,细胞团悬浮于 0.3 ml PBS 中,加 0.7 ml PI(含 0.05 mg/ml RNase)避光染色 30 min,Coulter

EOTCSXL-31240 流式细胞仪观察亚 G₁ 峰和凋亡率。

1.5 DNA 断裂片段分析

细胞以 2 × 10⁶/ml 接种于 100 ml 培养瓶培养 24 h,分别加入终浓度为 10、20 μmol/L 姜黄素,共孵育 24 h 后,2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,冷 PBS(pH7.2)洗涤细胞两遍,加裂解液(10 mmol/L Tris · HCl, 10 mmol/L EDTA, 0.2% TritonX-100 pH 7.5)600 μl 裂解细胞,用细胞刮刮下细胞,移入 1.5 ml 离心管中,立即置冰浴 15 min,4℃ 14 000 × g 离心 15 min,取上清液依次以等体积的苯酚、氯仿(取上清液 1:1)去蛋白,瞬间离心,取水相加 3 mol/L 醋酸钠溶液使终浓度为 300 mmol/L,再加等体积异丙醇,混匀,置 -20℃ 过夜沉淀 DNA,14 000 × g 离心 15 min,沉淀以 70% 乙醇洗 1 遍,14 000 × g 离心 15 min,洗弃乙醇,真空干燥。用 20 μl TE 缓冲液(10 mmol/L Tris · HCl, 1 mmol/L EDTA, pH7.4)溶解 DNA,电泳前,加入 RNase A 37℃ 消化 30 min,2% 琼脂糖凝胶(含 0.05 mg/L 溴乙锭)上电泳(恒压 100 V 40 min),结果用紫外透射仪观察,拍照。

1.6 荧光染色

参考文献[6]略有改动。分别收集对照组及终浓度为 10、20 μmol/L 姜黄素处理 24 h 的细胞,分别加入终浓度为 10 μg/ml 和 20 μg/ml 的 Hoechst 33258 和 PI 37℃ 避光染色 30 min 后,在荧光显微镜下随机计数 200 个细胞,区分出坏死、凋亡和活细胞(呈弥散均匀的蓝色荧光者为活细胞,细胞核或细胞质内见浓染致密的颗粒状荧光者为凋亡细胞,呈弥散均匀的红色荧光者为坏死细胞),并计算出凋亡率、坏死率。每组均设 3 复管,并重复 3 次。

1.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件行单因素方差分析和显著性差异检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 CNE-2Z 细胞生长的抑制作用

5 ~ 40 μmol/L 姜黄素作用 CNE-2Z 细胞 24、48、72 h 后,可显著抑制细胞的生长,呈浓度、时间依赖关系,见图 1。作用 24、48、72 h 的 IC₅₀ 值为(24.05 ± 0.47)(19.20 ± 0.17)(7.35 ± 0.50) μmol/L。

2.2 流式细胞术分析姜黄素诱导细胞凋亡的作用

从图 2 可见,5、10、20 μmol/L 姜黄素处理细胞后可见明显凋亡峰,其凋亡率分别为(4.9 ± 3.2)%、(10.7 ± 2.7)%、(14.7 ± 0.5)%。其中 10、20 μmol/L

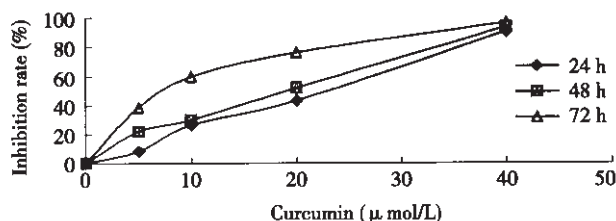


图 1 姜黄素对 CNE-2Z 细胞生长的抑制作用 (n = 3)

Figure 1 Inhibitory effect of curcumin on growth of CNE-2Z cells (n = 3)

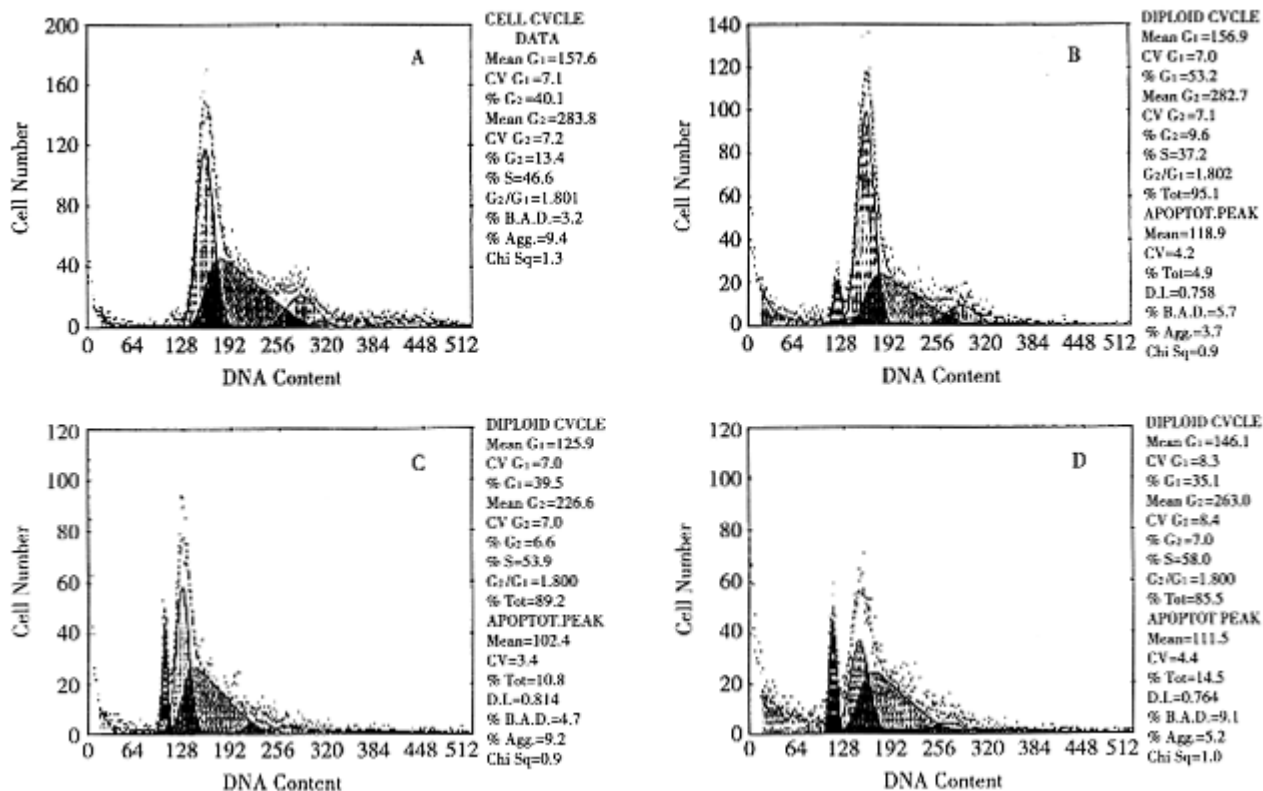


图 2 姜黄素对 CNE-2Z 细胞凋亡的影响(流式细胞仪检测)

Figure 2 Effect of curcumin on apoptosis of CNE-2Z cells

A: control; B, C, D: 5, 10, 20 μmol/L of curcumin, respectively.

表 1 Hoechst33258/PI 荧光双染检测各组 CNE-2Z 细胞凋亡率、坏死率和存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Apoptotic rate, necrotic rate, and survival rate of CNE-2Z cells detected by Hoechst33258/PI fluorescence staining ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Apoptotic rate (%)	Necrotic rate (%)	Survival rate (%)
Control	4.1 ± 1.4	2.3 ± 0.7	93.6 ± 1.2
10 μmol/L of Cur	16.8 ± 2.9 ^b	5.4 ± 1.5 ^a	77.8 ± 3.3 ^b
20 μmol/L of Cur	35.8 ± 2.7 ^b	7.8 ± 1.4 ^b	56.7 ± 3.9 ^b

^a P < 0.05, ^b P < 0.01 vs. control group.

2.4 姜黄素诱导 CNE-2Z 细胞 DNA 梯状条带形成
经 10 μmol/L 和 20 μmol/L 的姜黄素处理的 CNE-2Z 细胞进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳后有典型的 DNA 梯状条带

姜黄素处理组细胞的凋亡率明显高于对照组 (P < 0.05)。

2.3 姜黄素诱导细胞凋亡的形态改变

经 Hoechst33258/PI 双染的 CNE-2Z 细胞,对照组细胞核大小较均一,呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀,紫外灯下呈均一蓝色荧光;而姜黄素处理的 CNE-2Z 则出现典型的凋亡形态学改变:胞体缩小、核染色质浓缩、部分核染色体碎裂。各组细胞凋亡率、坏死率和存活率见表 1。

梯形条带出现(见图 3)。

3 讨论

细胞凋亡是细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身的程序,自己结束其生命的过程,细胞增殖和凋亡的动态平衡是多细胞生物维系其结构稳定、内环境功能平衡以及生长发育所必须的最基本的生物学过程^[7]。已有的研究表明,肿瘤的发生很可能就是由于细胞增殖和凋亡失调而导致肿瘤细胞无限无序增殖所致。所以,肿瘤细胞凋亡及其增殖抑制成为评估抗癌药物作用能力的重要指标。为此,本实验对姜黄素诱导鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 增殖抑制及凋亡

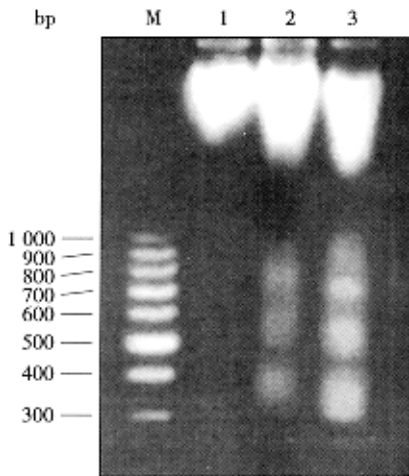


图3 姜黄素对 CNE-2Z 细胞凋亡的影响(DNA 梯形带检测)

Figure 3 Effect of curcumin on apoptosis of CNE-2Z cells
M: 100 bp marker; 1: control; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ of curcumin; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ of curcumin.

作用进行研究。

本实验首先观察了姜黄素对 CNE-2Z 细胞的增殖抑制作用,结果发现姜黄素在较低的作用浓度(5 $\mu\text{mol/L}$)就可以有效抑制 CNE-2Z 细胞增殖,且在 5~40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对 CNE-2Z 细胞的增殖抑制作用呈浓度和时间依赖性,随着药物浓度和作用时间的增加,姜黄素的抑制作用增强。流式细胞术结果也显示,姜黄素诱导 CNE-2Z 细胞凋亡及少量坏死,其凋亡率在一定范围内也具有随姜黄素浓度增高而增高的趋势,5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理 CNE-2Z 细胞后,凋亡率分别为 $(4.9 \pm 3.2)\%$ 、 $(10.7 \pm 2.7)\%$ 、 $(14.7 \pm 0.5)\%$ 。很可能姜黄素通过某些尚不可知的机制诱导 CNE-2Z 细胞凋亡,从而抑制细胞增殖。荧光染色结果也显示,用药组细胞出现典型的凋亡形态学变化,与流式细胞术的结果是一致的。提取药物处理组细胞 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳后可呈明显的 DNA“梯状条带”。以上的结果均表明,姜黄素可诱导 CNE-2Z 细胞凋亡,这为今后姜黄素可能用于低分化鼻咽癌治疗提供了一定的依

据。近来,许多学者就姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡的机制进行了研究,Han 等^[8]发现姜黄素通过下调 *egr-1*、*c-myc*、*bcl-XL*、*NF- κ B* 的表达而引起 B 淋巴细胞生长停滞。而吴勇等^[3]报道,姜黄素抑制 CA46 细胞增殖,诱导其凋亡,可能是通过下调 *c-myc*、*bcl-2*、突变型 *p53*mRNA 表达及阻断其蛋白产物而起作用。郑丽端等^[9]的研究表明,姜黄素能显著抑制卵巢癌细胞的体外生长,上调 *caspase-3*、下调 *NF- κ B* 蛋白表达,诱导细胞凋亡可能是其作用机制之一。姜黄素是通过何种机制诱导 CNE-2Z 细胞凋亡,值得作进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] 黄俊琼,孙万邦. 姜黄素对白血病耐药细胞 HL60/ADR 的抑制作用[J]. 中国免疫学杂志,2002,18(5):334-337.
- [2] 吴丽贤,许建华,吴国华,等. 姜黄素对 K562 细胞增殖的影响及其与 P210^{bc κ /abl} 激活的 Ras 信号途径的关系 [J]. 中国药理学通报,2003,19(1):33-37.
- [3] 吴 勇,陈元仲,许建华,等. 姜黄素对人类 Burkitt 淋巴瘤抗癌作用的研究[J]. 中华肿瘤杂志,2002,24(4):348-351.
- [4] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precties and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill [J]. J Immunol Methods, 1989, 119(2): 203-210.
- [5] Grub S, Persohn E, Trommer WE, et al. Mechanisms of cyclosporine A-induced apoptosis in rat hepatocyte primary cultures [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 163(3): 209-220.
- [6] 彭黎明,王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床 [M]. 北京:人民卫生出版社,2000:185-186.
- [7] Jacobson MD, Weil M, Raft MC, et al. Programmed cell death in animal development [J]. Cell, 1997, 88(3): 347-354.
- [8] Han SS, Chung, ST, Robertson DA, et al. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma down-regulation of *egr-1*, *c-myc*, *bcl-XL*, *NF- κ B*, and *p73* [J]. Clin Immunol, 1999, 93(2): 152-161.
- [9] 郑丽端,童强松,吴翠环,等. 姜黄素诱导人卵巢癌细胞株 A2780 凋亡及其分子机制的研究 [J]. 癌症,2002,21(12): 1296-1300.

[编辑:刘 玮 校对:杨允贵]