

姜黄素对胰腺癌细胞体外生长及其细胞周期的影响

张卫民¹, 徐纪平², 黄文²

摘要:目的 探讨姜黄素对人胰腺癌细胞 PANC-1 株体外生长及其细胞周期的影响。方法 MTT 法检测肿瘤细胞活性, 流式细胞仪 (FCM) 进行细胞周期时相分析。结果 MTT 结果表明姜黄素对 PANC-1 细胞具有细胞毒作用。30 μ M、60 μ M 浓度的姜黄素对细胞增殖的抑制率分别为 45.9%、78.1%, 10 μ M 浓度抑制作用较小。姜黄素处理 24h, 分裂相细胞的比例可达 8~10%。FCM 结果显示姜黄素处理 24h 时, 主要使细胞阻滞于 S、G₂/M 期, 使此期的细胞比例增加, 而 G₀/1 期的细胞比例减少。处理 48h 后, G₂/M 期的细胞比例反而降低, 部分可能由于 G₂/M 期细胞并发凋亡所致。结论 姜黄素可抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的生长, 其机制可能与干扰细胞周期有关。

关键词:姜黄素; 胰腺癌; 细胞周期

中图分类号: R735.9

文献标识码: A

文章编号: 1009-9727(2008)12-2115-02

The effects of curcumin on cellular cycle of pancreatic carcinoma cells in vitro. ZHANG Wei-min, XU Ji-ping, HUANG Wen. (Department of Gastroenterology, No.421 Hospital of PLA, Guangzhou 510530, Guangdong, P. R.China)

Abstract: Objective To investigate the effects of curcumin on the growth of human pancreatic carcinoma cell (PANC-1) and the cell cycle change *in vitro*. **Methods** Activity of tumor cell was determined by MTT and cell cycle phase was analysed by flow cytometry. **Results** MTT test showed that curcumin was cytotoxic to cells. The proliferative inhibition rate of 30 μ M and 60 μ M of curcumin were 45.9% and 78.1%, respectively. 10 μ M of curcumin were less effective. Cellular morphology with HE staining showed that the ratio of cells at mitosis phase was increased 24 hours after treatment with curcumin. The rates of mitosis of cells were up to 8-10%. FCM showed that PANC-1 cells treated with curcumin were accumulated at S, G₂/M phase in the cell cycle, the rate of cells at G₀/1 phase was decreased 24 hours after treatment with curcumin. The ratio of cells in G₂/M phase was decreased which might be in part due to apoptosis of cells at G₂/M phase. 48 hours after treatment with curcumin. **Conclusions** Curcumin can inhibit the growth of PANC-1 cells *in vitro* and its mechanisms of action was inferred to arrest the cellular cycle at S and G₂/M phase, which prevented cells from entering the next cell cycle.

Key words: Curcumin; Pancreatic neoplasms; Cellular cycle

姜黄素(curcumin)是一种从姜科植物姜黄中提取出来的酚性色素,具有强烈的抗氧化、抗突变和抗肿瘤特性,但对正常生物体无毒、副作用^[1,2]。研究证明姜黄素具有与甾体类抗炎药(NSAIDs)相似的作用特点^[3]。已有的研究认为 NSAIDs 类药物可干扰肿瘤细胞的细胞周期。近年来,对姜黄素的抗癌作用的实验表明姜黄素可抑制体内、外肿瘤细胞的生长^[4-5]。我们采用胰腺癌细胞 PANC-1 探讨了姜黄素杀伤肿瘤细胞的作用及对细胞周期的影响。

1 材料与方

1.1 药物与试剂 姜黄素系英国 DAH 公司产品,PMI1640、四氮甲唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)系美国 Sigma 公司产品。姜黄素溶液的配制以少量 DMSO 溶解姜黄素粉剂,配成 10mmol/L 的溶液,置于 0℃冰箱保存。临用时,以完全培养液稀释姜黄素到所需浓度。MTT 液配制用 0.01MPBS 配成 5mg/ml 浓度,过滤灭菌制成储备液,避光 4℃保存。人胰腺腺癌细胞株 PANC-1 细胞由长海医院消化科实验室提供,实验观察组按姜黄素浓度 10 μ M、30 μ M、60 μ M 加入 RPMI1640 稀释的 15%

小牛血清培养液在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养;空白对照组培养液则为含 15%小牛血清的 PMI1640 培养液。主要仪器包括 DG-3022 型酶联免疫测定仪, FACS-420 型流式细胞仪。

1.2 方法 肿瘤细胞活性采用噻唑蓝还原法(MTT)^[7];肿瘤细胞周期时相分析采用流式细胞仪检测,所得数据经 Multicycle 软件(Phoenix Flow Systems, CA)作细胞周期分析。

1.3 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,两均数间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 姜黄素对 PANC-1 细胞生长的抑制作用 姜黄素处理 48h, PANC-1 细胞的生长受到明显抑制, 10 μ M、30 μ M 和 60 μ M 浓度的姜黄素抑制率分别为 20.0%、45.9%、78.1%。姜黄素对 PANC-1 细胞的 IC₅₀ 为 35.8 μ M。

2.2 形态学观察 发现经姜黄素 30 μ M 和 60 μ M 处理 24h 后,部分细胞体积缩小,染色质致密成斑块状浓集于核膜下,胞浆嗜红染增加,可见凋亡小体。当姜黄素处理 24h,尚还可见较多的分裂相细胞,有丝分裂相指数(MI)为 8%~10%,处理 48h 分裂细

* 作者单位:1. 解放军第 421 医院消化内科,广东 广州 510530; 2. 第二军医大学长海医院消化科,上海 200433

作者简介:张卫民(1964~),男,副主任医师、医学博士,主要从事消化系统肿瘤基础与临床研究

胞则少见。而对照组细胞无变化。

2.3 姜黄素对 PANC-1 细胞周期的影响 空白对照组 DNA 流式细胞术显示为典型肿瘤细胞的 G₀/1、S、G₂/M 峰型。经姜黄素 30 μ M、60 μ M 处理 24h 后,与对照组相比,G₀/1 期比例降低,S、G₂/M 期比例均增高。然而处理 48h 后,G₀/1 期仍降低,S 期进一步增高,G₂/M 期比例反而明显降低,见表 1。

表 1 姜黄素对胰腺癌 PANC-1 细胞周期的影响

组别	时间 (h)	细胞周期分布 (%)		
		G ₀ /1	S	G ₂ /M
空白对照	24	62.0 ± 11.3	32.4 ± 17.7	8.5 ± 5.2
	48	64.2 ± 13.7	29.8 ± 16.0	7.0 ± 4.4
10 μ M	24	55.5 ± 12.1	31.4 ± 10.5	15.1 ± 4.4
	48	54.1 ± 13.6	30.0 ± 16.4	11.9 ± 3.8
30 μ M	24	43.6 ± 15.2*	42.2 ± 14.6*	14.2 ± 7.0*
	48	52.7 ± 10.5*	43.2 ± 15.2*	4.1 ± 1.8#
60 μ M	24	46.9 ± 14.0*	42.8 ± 15.3*	10.3 ± 1.3*
	48	48.0 ± 17.2*	47.0 ± 9.3*	5.0 ± 2.6#

与同期对照组比较:* $P < 0.01$;与同浓度 24h 比较:# $P < 0.01$

3 讨论

胰腺癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤之一,近年来在我国发病率呈上升趋势。由于胰腺解剖学和胰腺癌生物学特征等因素的影响,胰腺癌易侵犯周围组织器官和发生远处转移,早期诊断十分困难,大多数患者确诊时已失去手术治疗的机会,即使临床可切除肿瘤,预后仍然较差,5 年生存率低于 5%^[6]。目前临床上缺乏有效的治疗手段,探索敏感的化学预防手段是降低胰腺癌发病率及死亡率的可行方法。

姜黄素是我国传统中药姜黄根茎中的有效成份,其化学名为阿魏酰甲烷(diferuloylmethane)。动物实验研究发现姜黄素可抑制化学诱癌物(如 AOM、TPA、PMA 等)诱发的人体膀胱癌、肝癌、宫颈癌、十二指肠癌、乳腺癌的发生^[7-9]。姜黄素对体外肿瘤细胞的作用报道较少。本实验观察到姜黄素对胰腺癌 PANC-1 细胞具有直接杀伤作用,与文献报道姜黄素对淋巴瘤细胞具有细胞毒作用相符^[10]。本实验采用流式细胞仪分析了姜黄素对细胞周期的影响,发现在作用 24h 后,姜黄素主要抑制细胞的 S、G₂/M,使 G₁ 期细胞减少,而 S 期、G₂/M 期的细胞增加;但作用 48h 后,姜黄素仍抑制细胞的 S 期,G₀/1 期细胞比例仍较低,S 期细胞仍较高,而 G₂/M 期细胞比例明显降低。形态学观察发现姜黄素处理 24h 后,可出现较多的分裂相细胞,有丝分裂指数(MI)为 8%~10%,与流式细胞仪发现 G₂/M 期阻滞结果相符合;而作用 48h 后,形态学观察则少见分裂相细胞,与流式细胞仪发现 G₂/M 期细胞比例降低结果相符合。至于 G₂/M 期比例降低的原因,可能与细胞凋亡主要在 G₂+M 期有关。

目前临床常用的化疗药物如表阿霉素、顺铂等,具有抑制肿瘤细胞 S、G₂/M 期的作用,使细胞停止于 DNA 合成期或分裂

末期,以致细胞不能进入下一个周期。姜黄素抑制胰腺癌细胞周期于 S、G₂/M 期的作用与这些药物相同,S 期细胞增多并不意味着姜黄素具有促进肿瘤细胞 DNA 合成的作用,只不过使细胞在 S、G₂/M 期大量堆积,而不能进入下一个细胞增殖周期而已^[11]。

姜黄素具有直接杀伤肿瘤细胞的作用,其重要机制可能是干扰细胞周期,使之阻滞于 S、G₂/M 期。已有研究表明这种杀伤与姜黄素诱导胰腺癌细胞凋亡有关,许多基因参与其中,Bcl 基因家族和 IAP(凋亡抑制蛋白)基因家族是比较具有代表性的两个基因^[12]。姜黄素来源于食品,具有价廉、毒性低、易于获得等特点,因此将其用于胰腺癌的临床防治前景光明。

参考文献:

- [1] 汪海慧,成扬.姜黄素药理作用研究进展[J].上海中医药大学学报,2007,21(6):73-76.
- [2] 陈宏,陈宇英,张振书,等.姜黄素抗大肠癌作用研究[J].肿瘤研究与临床,2006,18(1):4-7.
- [3] Weir NM,Selvendiran K,Kutala VK,et al. Curcumin induces G₂/M arrest apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and P38 MARK [J]. Cancer Biol Ther,2007,6(2):178-184.
- [4] 许刚,黄文,张卫民,等.姜黄素和儿茶素联用对二甲基胍诱导的大鼠大肠癌变过程中环氧合酶 2 表达的影响[J].第一军医大学学报,2005,25(1):48-52.
- [5] 许刚,张亚历,田克力,等.姜黄素和儿茶素联合预防二甲基胍诱导大肠癌的研究[J].中华消化杂志,2005,25(8):499-500.
- [6] 吕楠,张宏艳.胰腺癌流行病学研究[J].中国肿瘤临床,2007,34(23):13689-1372.
- [7] 杨家荣,陈磊,杨慧,等.姜黄素对膀胱癌细胞增殖及凋亡的影响[J].第三军医大学学报,2007,29(24):2350-2353.
- [8] 孙军,王贺玲,李岩.姜黄素对人肝癌细胞中血管内皮生长因子表达的影响[J].中华消化杂志,2006,26(12):843-844.
- [9] 王菁鹏,林青.姜黄素对子宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用[J].现代医药卫生,2006,22(16):2435-2437.
- [10] Tong QS,Zheng LG,Lu P,et al. Apoptosis-inducing effects of curcumin derivatives in human bladder cells [J].Anti Cancer Drugs,2006,17(3):279-287.
- [11] Zhang HN,Yu CX,Zhang PJ,et al.Curcumin downregulates homeobox gene NKX in prostate cancer LNCap [J].Acta Pharmacologica Sin,2007,28(3):423-430.
- [12] 宫爱霞,关凤林,刘敏,等.姜黄素对胰腺癌细胞株生长的抑制作用及可能机制[J].胰腺病学,2004,4(4):218-221.

收稿日期:2008-07-10