



姜黄素诱导人黑色素瘤A375细胞凋亡以及对c-myc、caspase-3表达的影响

黑色素瘤恶性度高,转移早,对常规放疗和化疗不敏感,因此目前紧迫的研究工作是寻找有效的治疗药物。自1983年姜黄素首次在人肿瘤活组织中进行体外软琼脂克隆分析以来,其抗肿瘤活性得到了广泛的研究及肯定[1][2][3]。中药姜黄素是从草本植物姜黄的根茎中提取出来的一种酚类色素,是姜黄的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤等作用,它在不同的细胞中诱导凋亡的能力显示出发展姜黄素作为癌症预防剂的可能性。国内尚未见姜黄素对恶性黑色素瘤的作用研究报道,本文观察了姜黄素抑制人黑色素瘤细胞株A375的增殖和诱导其凋亡以及对c-myc和Caspase-3表达水平的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人黑色素瘤细胞株A375由第四军医大学动物实验中心提供,培养于含10%小牛血清的RPMI 1640中,内含 1×10^5 U/L的青霉素及100 mg/L的链霉素,置37 °C、5%CO₂培养箱中孵育,0.25%胰酶和0.02% EDTA消化传代。姜黄素购自Sigma公司,MTT、碘化丙啶(PI)均购自Sigma公司,RPMI 1640购自Gibco公司,c-myc、Caspase-3单克隆抗体均购自北京中山生物技术有限公司,原位杂交检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞毒性试验(MTT法) 1×10^8 /L细胞悬液接种于96孔板,每孔200 μ l,待细胞贴壁6 h后加入10、20、30、40、50 μ mol/L姜黄素,对照组加等量培养液,每个浓度设3个复孔。分别孵育24,48,72和96 h,实验结束前4 h加入20 μ l的MTT,继续培养4 h,终止培养弃培养液,每孔加入150 μ l的DMSO,振荡15 min,酶标仪于波长490 nm处测吸光度A值。以上实验重复3次,绘制细胞增殖曲线。

1.2.2 细胞凋亡的形态学观察 取对数生长期细胞以 2×10^5 /ml浓度接种于6孔培养板,每孔接种2 ml,待细胞贴壁后加入不同浓度姜黄素,对照组加等量培养液。孵育48 h,弃掉培养液,PBS清洗后置倒置显微镜下活体观察。收集细胞于离心管中,以800~1 000 r/min的转速离心10 min,PBS清洗后立即置于25 g/L戊二醛中固定,4 °C过夜,10 g/L四氧化锇固定2 h,梯度乙醇脱水,Epon812环氧树脂浸透、包埋,半超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染,于日立H-600型透射电镜下观察、摄片。

1.2.3 Annexin V FITC/PI双标记法检测早期凋亡细胞 将对数生长期的A375细胞以 4×10^4 /ml浓度接种于24孔培养板,每孔1 ml,加入不同浓度的姜黄素,对照组加等量培养液。每个浓度设3个复孔。共孵育48 h后,离心收集细胞,用2.5 ml PBS洗涤2次,加稀释Binding缓冲液调细胞浓度为 $10^5 \sim 10^6$ /ml,加入FITC标记的Annexin V 10 μ l和PI 5 μ l,轻轻混匀,4 °C避光孵育30 min,立即在流式细胞仪(美国BD公司)上检测,采用CELL Quest软件分析细胞凋亡率。

1.2.4 DNA 片段化分析 收集48 h孵育的细胞,经PBS缓冲液漂洗1次,离心弃上清。加入800 μ l

DNAzol 轻轻吹散细胞, 4 °C下10 000 r/min 离心 15 min, 将离心后所得到的上清液转移至另一干净试管, 加入400 μ l 无水乙醇, 充分混合, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 75% 乙醇洗2次, 加入20 μ l TE溶液溶解沉淀, 再加5 μ l (1 g/L) RNase A消化30 min, -20 °C放置过夜。1.8%琼脂糖凝胶电泳分离样本DNA, 5 V/cm条件下电泳1.5 h, 1%溴化乙锭染色, 紫外灯下观察并摄影。

1.2.5 免疫组化检测c-myc、Caspase-3蛋白表达 免疫组化采用SABC法。经各浓度姜黄素处理48 h的细胞爬片用0.1 mol/L PBS液清洗, 立即放入无水乙醇30 min, 中性树脂胶将玻片固定、凉干, 3% H₂O₂室温孵育5 min, 蒸馏水冲洗, 正常兔血清工作液室温下封闭30 min。加入c-myc、Caspase-3单克隆抗体和生物素标记的羊抗小鼠抗体及ABC复合物, DAB显色, 镜下观察。PBS替代一抗作空白对照。结果判定以细胞质或胞核内出现棕黄色颗粒定为阳性, 结果采用多媒体彩色病理图像分析仪进行图像分析, 系统在显微镜下随机观察5个区域进行积分吸光度测定。

1.2.6 原位杂交检测c-myc mRNA和Caspase-3 mRNA 针对人c-myc靶基因的mRNA序列为: 5' - CTTCA CCAAC AGGAA CTATG ACCTC GACTA CGACT-3'; Caspase-3 mRNA序列为: 5' -CGT CA GCTCC ACTGT CTGTC TCAAT ACCGC AGTCC。原位杂交检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司, 5' 末端地高辛标记。细胞在多聚赖氨酸处理的盖玻片上进行培养, 待细胞孵育良好后用0.1 mol/L PBS清洗3 \times 2 min, 立即放入4%多聚甲醛-0.1 mol/L PBS(含有0.1% DEPC)中室温固定30 min, 蒸馏水充分洗涤3 \times 2 min, 30%H₂O₂+纯甲醇(1:50)室温处理30 min, 蒸馏水洗涤3次。滴加胃蛋白酶37 °C消化90 s, PBS洗3 \times 5 min, 置1%多聚甲醛/0.1 mol/L PBS中室温固定10 min, 蒸馏水洗涤3次。加预杂交液20 μ l置42 °C恒温箱4 h, 立即加杂交液, 42 °C恒温箱中杂交过夜。37 °C水温的2 \times SSC洗涤2 \times 5 min, 0.5 \times SSC洗涤1 \times 15 min, 0.2 \times SSC洗涤1 \times 15 min。滴加封闭液37 °C 30 min, 滴加生物素化鼠抗地高辛37 °C 60 min, PBS洗涤4 \times 5 min。加SABC 37 °C 20 min, 滴加生物素化过氧化物酶37 °C 20 min, DAB显色, 充分水洗。以不加c-myc和Caspase-3探针的2 \times SSC缓冲液作为阴性对照。结果用德国Leica公司MD20型真彩色图像分析仪进行图像分析, 测定阳性反应细胞的积分光密度。

1.3 统计学方法

采用t检验, 应用SPSS10.0统计软件包进行统计学分析。

2 结果

2.1 姜黄素对A375细胞的抑制作用

对照组A375细胞体外生长活跃, 经 10、20、30、40、50 μ mol/L 的姜黄素处理 24~96 h细胞生长均不同程度地减慢, 并呈时间、浓度依赖性。与对照组相比, 各浓度姜黄素作用 48 h后A375细胞生长抑制率在 62.05~89.24%之间, 不同浓度姜黄素与不同时间组之间均有显著性差异(P<0.01, 图 1)。

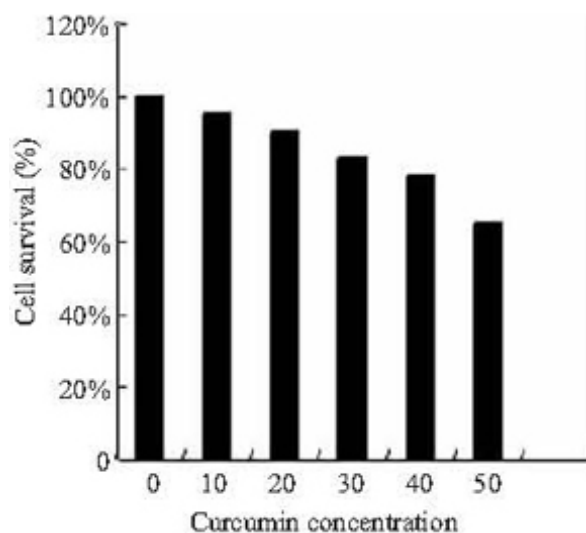


Fig.1 Effect of curcumin treatment at various doses for 48 h on cell survival rate of A375 cells

2.2 形态学观察结果

倒置显微镜观察显示细胞贴壁性降低，细胞间隙增大，梭形细胞变圆，并有大量漂浮细胞，对照组未见明显变化(图2)。姜黄素30 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度处理A375细胞48 h后，即出现细胞体积缩小，胞浆浓缩致密，细胞表面形成大量泡状突起并可见脱落形成有膜包绕的内含细胞器结构及核成分的凋亡小体，染色质浓缩聚集、核溶解碎裂等。随着姜黄素浓度的加大，凋亡细胞的比例增高，凋亡细胞的形态呈多样化。而对照组细胞形态规则、胞膜完整、核染色质分布均匀，未出现凋亡小体(图3)。

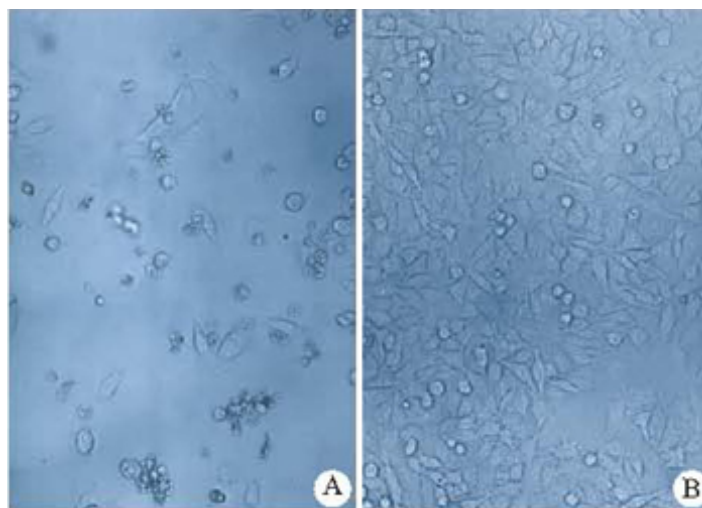


图2 倒置显微镜下观察A375细胞凋亡的形态学变化

Fig.2 Morphological changes of curcumin-treated A375 cells undergoing apoptosis observed by inversed microscopy (Original magnification: $\times 200$)

A: Curcumin group; B: Control group

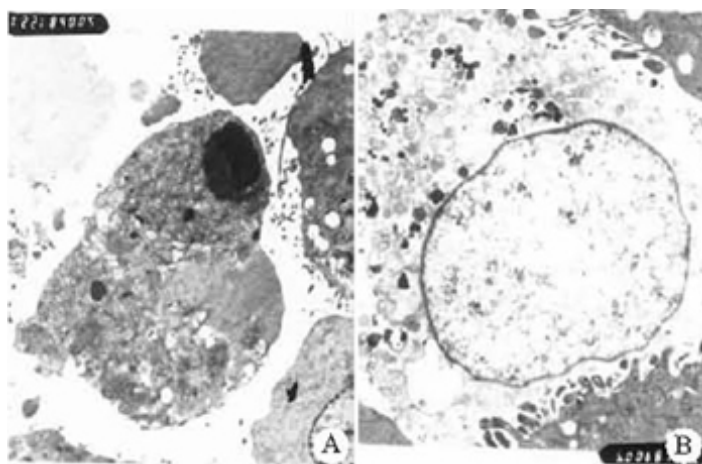


图3 透射电镜下观察A375细胞凋亡

Fig.3 Morphology of curcumin-treated A375 cells showing apoptotic changes under transmission electron microscopy (Original magnification: $\times 8000$)

A: Curcumin group; B: Control group

2.3 AnnexinV/PI 双标记法

姜黄素作用48 h，30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度即出现凋亡细胞，达28.6%，与透射电镜观察结果吻合。与对照组相比，凋亡细胞增加，且呈剂量依赖性($P < 0.001$)。随着药物浓度增高，双阳性细胞增加，提示高浓度姜黄素的

直接毒性可使A375细胞死亡。

2.4 DNA琼脂糖凝胶电泳分析

经姜黄素作用 48 h后, A375细胞的 DNA 在凝胶电泳时均出现凋亡细胞典型的 DNA 梯状条带(DNA ladder), 随着顺铂作用浓度的增加, 梯状条带逐渐变得清晰, 条带越明显, 而对照组细胞的 DNA提取物则未出现DNA 梯状条带(图4)。

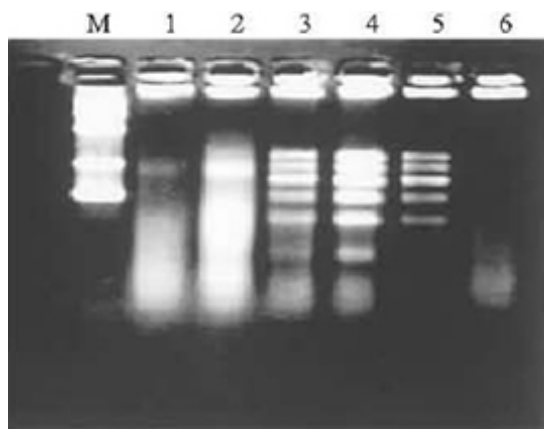


图4 姜黄素诱导A375细胞凋亡的DNA片断化分析

Fig.4 Curcumin-induced DNA fragmentation in A375 cells

M: Marker; 1-6: Curcumin concentration of 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$, respectively

2.5 c-myc和Caspase-3蛋白的表达

免疫组化检测结果显示, 5种不同浓度的姜黄素作用A375细胞 48 h , A375细胞c-myc 蛋白表达水平均较对照组明显降低, 而Caspase-3显著升高, 并呈时间和浓度依赖性。两种蛋白的表达率与对照组比较均有显著差异($P<0.05$, 表1)。

表 1 免疫组化检测各浓度姜黄素对 c-myc、Caspase-3 表达率的影响

Tab.1 Effect of curcumin at various concentrations on c-Myc and caspase-3 expressions detected by immunohistochemistry (*Mean \pm SD*)

Group	c-myc	Caspase-3
Control	0.38 \pm 0.04	0.07 \pm 0.06
10 $\mu\text{mol/L}$	0.33 \pm 0.05*	0.18 \pm 0.03*
20 $\mu\text{mol/L}$	0.31 \pm 0.07*	0.21 \pm 0.07*
30 $\mu\text{mol/L}$	0.26 \pm 0.09*	0.25 \pm 0.06*
40 $\mu\text{mol/L}$	0.24 \pm 0.09*	0.34 \pm 0.08*
50 $\mu\text{mol/L}$	0.21 \pm 0.06*	0.37 \pm 0.09*

* $P<0.05$ compared with control group

2.6 c-myc mRNA和Caspase-3 mRNA的表达

光镜下见棕黄色的标记物分布于A375细胞的细胞浆或细胞核, 经姜黄素处理细胞48 h后, 细胞形态发生变化, 变圆或不规则, 核变小偏于一侧, 胞质浓缩, 阳性表达颗粒减少, c-myc mRNA表达较对照组明显减

弱。相反, 处理组Caspase-3 mRNA 表达较对照组增强, 对照组阳性表达颗粒较弱, 表达的细胞较稀疏。且两者在A375细胞中的表达均呈剂量依赖性。图像分析结果显示, c-myc mRNA 与Caspase-3 mRNA 在二组细胞中的表达显示出显著的统计学差异($P < 0.01$), 结果与免疫组化检测一致。

3 讨论

姜黄素既能直接抑制肿瘤细胞的生长, 又能诱导细胞发生凋亡, 其作用机制主要是调控癌基因和抑癌基因, 下调NF- κ B的活性, 影响EGFR、PKC信号传导通路, 诱导细胞周期停滞和细胞凋亡[4][5]。Odot等[6]对耐阿霉素的B16-R黑色素瘤进行了体内和体外研究, 结果表明姜黄素具有抑制黑色素瘤细胞生长和细胞毒作用。本实验结果表明, 姜黄素在一定剂量范围内对细胞株A375具有明显生长抑制作用, 并呈时间和剂量依赖性。通过不同浓度姜黄素处理细胞, 并观察其在不同时间的作用效果, 我们发现姜黄素确实能够诱导人黑色素瘤细胞A375的凋亡, 从形态学观察和DNA片段化分析均定性地显示出明显的凋亡特征, 即细胞体积缩小, 形态不规则, 染色质高度凝聚, 凋亡小体出现以及DNA的梯度条带。而AnnexinV/PI双染法定量地反映了姜黄素与其诱导的凋亡细胞间一定的量效关系, 进一步证实了姜黄素具有诱导A375细胞发生凋亡的能力。

细胞、组织功能的正常维持, 依赖于明确的多信号传导通路控制、细胞的增殖和分化、凋亡的诱导等。c-myc参与增殖、分化和转导等多细胞程序过程, 通过上调它的目的基因来诱导凋亡, c-myc的过表达或低表达都会诱导凋亡[7]。c-myc启动细胞凋亡的机制可能包括: (1) c-myc表达推动细胞进入细胞周期, 但在缺乏刺激因子条件下, 细胞周期完成受阻, 从而进入细胞死亡; (2) c-myc通过某些“存活因子”的作用而推动细胞进入细胞周期, 而“存活因子”是某些细胞因子或抑制凋亡的基因产物, 能抑制凋亡或导致凋亡。在原发性及继发性人黑色素瘤中, c-myc被发现是一个独立的预后标志物[8], c-myc在调控黑色素瘤生长及肿瘤对化疗药物敏感性方面, 具有重要性意义[9]。c-myc蛋白几乎在所有正常的增殖细胞中均有表达, 而当细胞终末分化时, 表达下调。本实验原位杂交和免疫组化结果表明, 姜黄素处理A375细胞后, c-myc基因mRNA和蛋白表达水平均降低, 且随着作用时间的延长, 这种变化愈趋明显, 说明c-myc基因表达水平降低与姜黄素诱导A375细胞的凋亡密切相关。Caspase-3是Caspase家族中在细胞凋亡过程中起着核心作用的关键酶, 当凋亡过程被启动后凋亡信号可传导至Caspases酶原, 使其部分肽连发生水解, 形成具有活性的Caspases。其中Caspase-3在级联下游操作底物酶切中发挥重要效应性, 当被激活后可裂解产生17 kU的活性亚单位, 后者可进一步激活DNase、酶切 PARP 片段化、降解细胞骨架蛋白及一些癌蛋白等机制, 最终导致细胞凋亡。Caspase-3既是凋亡信号的接受者, 又是凋亡的执行者, 通过放大细胞内的级联反应, 水解各种成分, 使细胞解体, 凋亡小体形成。作为凋亡过程中的效应分子, Caspase-3既是线粒体途径又是死亡受体途径两条信号途径的共同通道[10], 二者一旦启动, 必然引起的Caspase-3级联反应并使其活化, 引起细胞凋亡。因此, Caspase-3的表达增加标志着细胞内的凋亡机制已经启动。经姜黄素处理A375细胞, 结果显示在凋亡过程中Caspase-3的表达显著升高, 说明Caspase-3参与了姜黄素诱导A375细胞凋亡的发生和发展, 同时再一次佐证了姜黄素具有诱导人黑色素瘤A375细胞凋亡的能力及其对Caspase-3表达的显著作用, 与Bush等[11]研究结果一致。

肿瘤化疗药物及化学抑制剂, 都是通过引发凋亡细胞死亡或细胞周期发生改变而发挥它们的药理特性, 对肿瘤细胞凋亡的诱导已经成为治疗肿瘤反应的一个预测信号[12]。由姜黄素诱导的人黑色素瘤细胞凋亡可能涉及多个途径。Bush等[11]发现姜黄素诱发突变型p53黑色素瘤凋亡, 是通过活化死亡受体Fas触发的FADD/Caspase-8的独立途径, 而不依赖于p53和Bcl-2家族。而我们的研究结果提示c-myc表达的减少和Caspase-3表达的增加可能与姜黄素诱导黑色素瘤A375细胞的凋亡有着密切关系, 同时也说明姜黄素可以作为一个有效的化疗药物, 为对传统化疗药物不敏感的恶性黑色素瘤的治疗提供了新的途径。

(责任编辑: 陈望忠)

参考文献:

- [1]Jiang TL, Salmon SE, Liu RM. Activity of camptothecin, harringtonin, cantharidin and curcuma in the human tumor stem cell assay[J]. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1983, 19(2): 263-70.
- [2]Han R. Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China [J]. *Stem Cells*, 1994, 12(1): 53-63.
- [3]Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(1A): 363-98.
- [4]Duvoix A, Morcau F, Delhalles, et al. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(8): 1475-83.
- [5]Leu TH, Maa MC. The molecular mechanisms for the antitumorogenic effect of curcumin[J]. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2002, 2(3): 357-70.
- [6]Odot J, Albert P, Carlier A, et al. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2004, 111(3): 381-7.
- [7]Biroccio A, Benassi B, Filomeni G, et al. Glutathione influence c-Myc-induced apoptosis in M14 human melanoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 43763-70.
- [8]Grover R, Pacifico MD, Wilson GD, et al. Use of oncogene expression as an independent prognostic marker for primary melanoma[J]. *Ann Plast Surg*, 2003, 50: 183-87.
- [9]Chana JS, Grover R, Tulley P, et al. The c-myc oncogene: use of a biological prognostic marker as a potential target for gene therapy in melanoma[J]. *Br J Plast Surg*, 2002, 55: 623-27.
- [10]Fehlberg S, Trautwein S, Goke A, et al. Bisphenol A diglycidyl ether induces apoptosis in tumor cells independently of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, in caspase-dependent and-independent manners [J]. *Biochem J*, 2002, 362: 573-8.
- [11]Bush JA, Cheung KJ Jr, Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 27(2): 305-14.
- [12]Ko WG, Kang TH, Kim NY, et al. Lavandulylflavonoids: a new class of in vitro apoptogenic agents from *Sophora flavescens*[J]. *Toxicology in Vitro*, 2000, 14: 429-33.