

## 姜黄素抑制晶状体上皮细胞增殖的信号转导机制

胡艳红<sup>1</sup>, 祁明信<sup>2</sup>, 黄秀榕<sup>1</sup>, 马 兰<sup>3</sup>, 严 京<sup>1</sup>, 吴正正<sup>1</sup>

(1. 福建中医学院病理生理研究中心, 福建 福州 350003; 2. 福建省第二人民医院眼科, 福建 福州 350003; 3. 海南医学院病理生理学教研室, 海南 海口 571101)

**[摘要]** 目的: 探讨姜黄素 (curcumin, Cur) 抑制重组人表皮生长因子 (recombinant human epidermal growth factor, rhEGF) 诱导的牛晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LEC) 增殖的信号转导机制。方法: 采用荧光分光光度法检测 Cur 作用后 LEC 内游离  $Ca^{2+}$  浓度; 应用放射免疫分析法检测 Cur 作用后 LEC 内 cAMP 和 cGMP 含量的变化。结果: 经  $50 \mu\text{g/L}$  rhEGF 作用后, LEC 内游离  $Ca^{2+}$  浓度明显升高, Cur 可使 LEC 内游离  $Ca^{2+}$  浓度进一步升高。经  $50 \mu\text{g/L}$  rhEGF 作用后, LEC 内 cAMP 浓度明显下降, cGMP 浓度明显升高; 而 Cur 则可使 rhEGF 作用后的 LEC 内 cAMP 浓度明显升高, cGMP 浓度明显降低。结论: Cur 可抑制 rhEGF 诱导的 LEC 增殖, 其抑制细胞增殖的作用可能是通过多条信号转导途径来实现的。

**[关键词]** 姜黄素; 晶状体上皮细胞; 细胞增殖; 白内障; 信号转导

**[中图分类号]** R287.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2006)01-0039-04

## Signal transduction mechanism of curcumin in inhibiting the proliferation of bovine lens epithelial cell induced by recombinant human epidermal growth factor

Yan-Hong HU<sup>1</sup>, Ming-Xin QI<sup>2</sup>, Xiu-Rong HUANG<sup>1</sup>, Lan MA<sup>3</sup>, Jing YAN<sup>1</sup>, Zheng-Zheng WU<sup>1</sup>

(1. Research Center of Pathophysiology, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian Province 350003, China; 2. Department of Ophthalmology, Second People's Hospital of Fujian Province, Fuzhou, Fujian Province 350003, China; 3. Department of Pathophysiology, Hainan Medical College, Haikou, Hainan Province 571101, China)

**ABSTRACT** Objective: To investigate the signal transduction mechanism of curcumin in inhibiting the proliferation of bovine lens epithelial cell (LEC) induced by recombinant human epidermal growth factor (rhEGF). Methods: There were three groups in this experiment, which were normal control group, untreated group and curcumin-treated group. Proliferation of LEC was induced by rhEGF ( $50 \mu\text{g/L}$ ). The concentration of intracellular  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in LEC was measured with Fura-2/AM by spectrofluorimetry. The contents of intracellular cAMP and cGMP were assayed by radioimmunoassay. Results: The  $[Ca^{2+}]_i$  in LEC was obviously increased in the untreated group as compared with that in the normal control group ( $P < 0.01$ ), and the  $[Ca^{2+}]_i$  in LEC in the curcumin-treated group was highest among three groups ( $P < 0.01$ ). The content of intracellular cAMP in LEC was decreased while the content of intracellular cGMP was obviously increased in the untreated group as compared with those in the normal control group ( $P < 0.01$ ). The content of intracellular cAMP in LEC was higher in the curcumin-treated group than that in the untreated group, while the content of intracellular cGMP was lower than that in the untreated group ( $P < 0.01$ ). Conclusion: The antiproliferation effects of curcumin on LEC may relate to the regulations of multiple processes of signal transduction.

**KEY WORDS** curcumin; lens epithelial cell; cell proliferation; cataract; signal transduction

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao / J Chin Integr Med, 2006, 4(1):39-42 www.jcimjournal.com

姜黄素(curcumin, Cur)是姜科植物姜黄提取物中的主要成分,常用作调料及食品染色剂。近年来的研究发现, Cur 可以抑制肝癌细胞、白血病细胞、胃癌细胞、T 淋巴细胞<sup>[1~4]</sup>等多种细胞增殖,但关于其抑制细胞增殖信号转导机制方面的研究尚未见报道。我们的研究发现, Cur 能有效抑制表皮生长因子诱导的晶状体上皮细胞增殖,且呈明显的时间-效应和剂量-效应关系,可望成为防治后发性白内障的理想药物。本实验进一步观察 Cur 抑制细胞增殖时对细胞内游离  $Ca^{2+}$ 、cAMP 和 cGMP 浓度的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF),美国 Pepro Tech EC 公司产品;Cur,美国 Sigma 公司产品;Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM),美国 Gibco 公司产品;胰蛋白酶(trypsin),美国 Amresco 公司产品;乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),杭州四季青生物工程材料有限公司产品;Fura-2/AM,美国 Sigma 公司产品;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),美国 Amresco 公司产品;乙二醇四乙酸[ethylene glycol-bis(beta-amino ethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA],美国 Amresco 公司产品; $I^{125}$ cAMP 放射免疫试剂盒、 $I^{125}$ cGMP 放射免疫试剂盒,上海中医药大学同位素室提供。

1.1.2 实验仪器 RF-5000 荧光分光光度计,日本岛津制作所产品;FJ2003PS 全自动  $\beta$ -放射免疫计数器,西安核仪器厂产品;2111 型二氧化碳培养箱,美国 Forma 公司产品;IMT-413 倒置相差显微镜,日本 Olympus 公司产品。

### 1.2 实验方法

1.2.1 晶状体上皮细胞培养 无菌条件下,取健康新鲜小牛眼晶状体前囊膜,用含 0.01% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶的混合消化液消化后,收集细胞,放入 37℃、5%  $CO_2$  培养箱中培养。待细胞长满后进行传代培养。取第 3 代细胞进行实验。

1.2.2 实验分组 共分 3 组:空白对照组、模型组、Cur 组。

1.2.3 药物处理 消化并收集培养的小牛晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC),模型组加入 50  $\mu$ g/L rhEGF, Cur 组加入终浓度为 10 mg/L 的

Cur 和 50  $\mu$ g/L rhEGF,空白对照组加入等体积的磷酸盐缓冲液。每组设 6 个样本,继续培养 24 h,消化后收集细胞待检。

### 1.3 观察指标及方法

1.3.1 小牛 LEC 内游离  $Ca^{2+}$  浓度的检测 将 Fura-2/AM 加入消化后收集的细胞,避光负载 35 min,洗涤后用荧光分光光度计检测,发射波长为 510 nm,激发波长为 340 nm 和 380 nm,两波长下最大荧光由加入终浓度为 0.5% Triton 测得,最小荧光由加入终浓度为 8 mmol/L EGTA(pH > 8.5)获得。计算细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度:  $[Ca^{2+}]_i = Kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F) \times R$ 。其中, Kd 为 Fura-2 与  $Ca^{2+}$  反应的解离常数,常温下其值为 224 nmol/L; F 为实验观察到的荧光比值;  $F_{max}$  是当 Fura-2 全部被  $Ca^{2+}$  饱和时的荧光比值;  $F_{min}$  是通过加入过量的钙螯合剂所获得的荧光比值; R 为 380 nm 处无  $Ca^{2+}$  与  $Ca^{2+}$  饱和时荧光强度的比值。

### 1.3.2 小牛 LEC 内 cAMP、cGMP 浓度的检测

将消化后收集的细胞用 1 ml 醋酸缓冲液制成悬液。反复冻融后,按  $I^{125}$ cAMP 和  $I^{125}$ cGMP 放射免疫试剂盒说明书进行操作,用全自动  $\beta$ -放射免疫计数器检测 LEC 内 cAMP、cGMP 的浓度。

1.4 统计学方法 实验数据采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析,计量资料均数用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结 果

2.1 Cur 对 rhEGF 诱导的小牛 LEC 增殖细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的影响 经 50  $\mu$ g/L rhEGF 作用后,小牛 LEC 内游离  $Ca^{2+}$  浓度明显升高,与空白对照组比较有统计学差异( $P < 0.01$ );经 Cur 作用后,LEC 内游离  $Ca^{2+}$  浓度明显升高,与模型组比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.2 Cur 对 rhEGF 诱导的小牛 LEC 增殖细胞内 cAMP 浓度的影响 经 50  $\mu$ g/L rhEGF 作用后,小牛 LEC 内 cAMP 浓度明显下降,与空白对照组比较有统计学差异( $P < 0.01$ );经 Cur 作用后,LEC 内 cAMP 浓度明显升高,与模型组比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.3 Cur 对 rhEGF 诱导的小牛 LEC 增殖细胞内 cGMP 浓度的影响 经 50  $\mu$ g/L rhEGF 作用后,小牛 LEC 内 cAMP 浓度明显升高,与空白对照组比较有统计学差异( $P < 0.01$ );经 Cur 作用后,LEC 内 cGMP 浓度明显下降,与模型组比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 Cur 对 rhEGF 诱导的小牛 LEC 增殖细胞内 Ca<sup>2+</sup>、cAMP 和 cGMP 浓度的影响

Tab 1 Effects of Cur on concentration of intracellular Ca<sup>2+</sup>, cAMP and cGMP in bovine LEC undergoing proliferation induced by rhEGF ( $\bar{x} \pm s$ , nmol/L)

Group	n	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> in bovine LEC	cAMP concentration	cGMP concentration
Normal control	6	151.99 ± 5.79	5.73 ± 1.16	0.13 ± 0.02
Untreated	6	305.98 ± 53.75**	3.28 ± 1.26**	0.20 ± 0.05**
Cur-treated	6	398.02 ± 13.85**	5.49 ± 2.07	0.14 ± 0.02

\*\* P < 0.01, vs normal control group; P < 0.01, vs untreated group.

### 3 讨论

细胞增殖过程受到来自细胞内外诸多信号的调控,而细胞内第二信使如细胞内游离 Ca<sup>2+</sup>、cAMP 和 cGMP 在细胞增殖过程中扮演着重要角色<sup>[5]</sup>。Ca<sup>2+</sup> 是以上各条信号转导途径的枢纽。静息状态下的 Ca<sup>2+</sup> 主要存在于细胞外,细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的含量甚微,当细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高时,可以直接或通过钙调素间接激活相应的蛋白激酶,发挥其对细胞增殖活动的调节作用。细胞内 cAMP 和 cGMP 的含量随细胞周期而呈周期性的变化,M 期 cAMP 的含量最低,进入 G<sub>1</sub> 期后,cAMP 的含量迅速增加至最大值。cAMP 对细胞增殖起负调控作用,cGMP 则对细胞增殖起正调控作用。两者相互拮抗、相互协调,共同调节细胞的增殖。

我们以往的研究结果表明,经 rhEGF 作用后 LEC 发生了明显的增殖,而同时加入 30、20、10 mg/L Cur 作用 24 h 后,LEC 增殖抑制率则分别为 66.65%、22.43% 和 8.72%,呈明显的剂量-效应关系;20 mg/L Cur 作用于 LEC 6、12、24、48、72 h 后,其增殖抑制率分别为 9.97%、19.81%、22.43%、41.67% 和 81.59%,呈明显的时间-效应关系。此外,我们还通过流式细胞术检测药物作用后 LEC 内增殖细胞核抗原的表达情况。结果表明,加入 rhEGF 后,LEC 内增殖细胞核抗原蛋白表达明显增加,Cur 对 LEC 内增殖细胞核抗原蛋白表达有明显的下调作用,亦呈明显的时间-效应关系和剂量-效应关系。结合文献报道,我们认为:rhEGF 是一种有效的细胞增殖诱导剂,而 Cur 能有效抑制 rhEGF 诱导的 LEC 增殖,且呈明显的时间-效应和剂量-效应关系,可望成为防治后发性白内障的理想药物。

本实验结果表明,加入 50 μg/L rhEGF 后,LEC 内游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度较空白对照组明显升高,提示 rhEGF 提高体外培养 LEC 的增殖活性很可能是由于 rhEGF 提高了 LEC 内 Ca<sup>2+</sup> 的浓度,Ca<sup>2+</sup> 与钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合,激活 Ca<sup>2+</sup>/CaM 依赖性蛋白激酶,磷酸化多种靶蛋白,从而促进 LEC 的增殖;Ca<sup>2+</sup> 还可促进蛋白激酶 C 的活化,通过转录因子激活

蛋白 1(activator protein 1, AP-1)和核转录因子 B 等,促进 LEC 增殖。经 10 mg/L Cur 作用后,LEC 内 Ca<sup>2+</sup> 浓度较模型组明显升高。对于多数细胞而言,细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度持续升高,可激活 Ca<sup>2+</sup> 依赖性的核酸内切酶,使 DNA 降解,诱导细胞凋亡,从而抑制细胞增殖<sup>[6]</sup>。Cur 可能通过诱导 LEC 内游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高,从而诱导 LEC 凋亡及抑制 LEC 增殖。黄冬生等<sup>[7]</sup>报道,Cur 可诱导人肺癌细胞凋亡,其机制可能与细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高有关。

本实验发现,50 μg/L rhEGF 可使 LEC 内 cAMP 含量下降,cGMP 浓度升高。同时加入 Cur 后,LEC 内 cAMP 浓度较模型组明显增加,且与空白对照组比较无统计学差异;cGMP 浓度则较模型组明显下降,与空白对照组比较无统计学差异。细胞内 cAMP 浓度升高可激活 cAMP-依赖性蛋白激酶 A,使其靶蛋白上某些丝氨酸和苏氨酸残基发生磷酸化,从而参与细胞的分裂增殖,抑制细胞周期的进程;而细胞内 cGMP 浓度降低,会干预 cGMP-依赖性蛋白激酶 G 的信号转导途径,进而干预细胞周期,抑制 DNA 的复制,从而达到抑制 LEC 增殖的作用。

综上所述,Cur 抑制 LEC 增殖的机制可能是升高 LEC 内游离 Ca<sup>2+</sup> 和 cAMP 浓度,降低 cGMP 浓度,从而通过 Ca<sup>2+</sup>-蛋白激酶 C、Ca<sup>2+</sup>-CaM、cAMP-依赖性蛋白激酶 A、cGMP-依赖性蛋白激酶 G 等信号转导途径抑制 LEC 增殖。提示,介导细胞增殖的细胞内信号转导并不是专一的,而是呈现多样性和复杂性,信号转导途径是彼此影响、相互依赖、共同作用的。Cur 是否会影响细胞内其他信号转导途径,究竟哪种信号转导途径起最主要作用,尚有待进一步的研究。

#### [参考文献]

- 1 Chauhan DP. Chemotherapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Curr Pharm Des*, 2002, 8(19): 1695-1706.
- 2 Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through

- p53-dependent Bax induction . FEBS Lett, 2002, 512(1-3): 334-340 .
- 3 Khar A, Ali AM, Pardhasaradhi BV, *et al* . Induction of stress response renders human tumor cell lines resistant to curcumin-mediated apoptosis: role of reactive oxygen intermediates . Cell Stress Chaperones, 2001, 6(4): 368-376 .
- 4 Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, *et al* . Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl . Carcinogenesis, 2002, 23(1): 143-150 .
- 5 卢建, 余应年, 徐仁宝 . 受体信号转导系统与疾病 . 济南: 山东科学技术出版社, 1999 . 3-12 .
- 6 刘景生 . 细胞信息与调控 . 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999 . 334 .
- 7 黄冬生, 陈金和, 吴基良 . 姜黄素诱导人肺癌细胞凋亡的实验研究 . 咸宁医学院学报, 2002, 16(4): 252-255 .
- [收稿日期] 2005-01-24

## “ 中医药国家重点学科简介 ” 栏目征稿启事

2004 年《中西医结合学报》开设了“ 中西医结合国家重点学科简介 ” 栏目, 逐一介绍了全国 6 家中西医结合国家重点学科的学科特色、科研成果、研究方向和研究生培养情况, 深受广大读者特别是在校研究生的欢迎, 产生了良好的社会效益。

应广大读者的要求,《中西医结合学报》自 2005 年第 1 期起开设了“ 中医药国家重点学科简介 ” 栏目, 留出每期杂志封三彩色版面 1 页, 逐一介绍全国的中医药国家重点学科。2006 年继续开设此栏目, 杂志社现向全国各中医药国家重点学科征集来稿, 希望得到各重点学科的大力支持。

具体征稿事宜如下:

- 1 . 提供学科简介的文字材料, 内容包括学科的历史沿革、学科特色、科研成果、研究方向和研究生培养情况等, 字数 1 500 字左右。
- 2 . 提供 2 ~ 4 幅反映学科带头人和学科团队工作情况的彩色照片。
- 3 . 为配合彩色版面的学科介绍, 杂志社邀请该学科的学科带头人撰写一篇与学科研究方向相关的述评性文章, 刊登在同期杂志的“ 院士笔谈 ” 或“ 述评 ” 栏目。
- 4 . 学科的专家可以就该学科某一研究专题的相关知识和最新进展进行系统的介绍, 文章可刊登在该期杂志“ 学术讲座 ” 栏目。
- 5 . 可以提供论著或其他论文在同期杂志发表, 篇数不限。

以上材料及文稿应在拟刊出一期杂志出版日(单月 15 日)之前 2 个月提供给杂志社, 以便杂志社安排同行专家审稿及进行编辑加工。杂志出版后, 杂志社可根据学科的需求, 向其免费赠送一定数量的该期杂志。