

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.013

· 基础研究 ·

姜黄素抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及其相关的氧化应激机制

霍红梅¹, 张利元², 江家贵², 朱 旬^{3*} (苏州大学附属第二医院 1. 实验中心; 2. 放疗科; 3. 乳腺中心 江苏 苏州 215004)

[摘要] 目的: 探讨姜黄素抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及其相关的氧化应激机制。方法: 用不同浓度(5~40 $\mu\text{mol/L}$)的姜黄素作用于乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞, 以 MTT 法检测在 6、12、24、48 h 的细胞增殖率, 流式细胞术检测细胞凋亡率, DCFH-DA 染色流式检测细胞内活性氧(reactive oxygen species ROS)生成变化, 黄嘌呤氧化酶法检测氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), 可见光分光光度计法检测过氧化氢酶(catalase, CAT)活性。结果: 低浓度(5、10 $\mu\text{mol/L}$)姜黄素作用后 MCF-7 细胞增殖受抑制($P < 0.01$), 但无凋亡发生; 伴随细胞内 ROS 短暂升高后随时间逐步下降, SOD、CAT 先下降后逐步提高。高浓度(20、40 $\mu\text{mol/L}$)姜黄素作用后细胞增殖抑制率明显增加($P < 0.01$), 细胞出现大量凋亡; 伴随细胞内 ROS 即刻明显升高, 随时间延长无明显下降; SOD、CAT 明显下降($P < 0.01$)。结论: 姜黄素具有剂量依赖的抗氧化与促氧化双重作用, 不同浓度的姜黄素通过对乳腺癌细胞内氧化还原状态的调节参与了其抗肿瘤细胞增殖作用的机制。

[关键词] 乳腺癌; 姜黄素; 活性氧; 氧化应激

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0490-04

Curcumin inhibits proliferation of breast cancer MCF-7 cells and the related oxidative stress mechanism

HUO Hong-mei¹, ZHANG Li-yuan², JIANG Jia-gui², ZHU Xun^{3*} (1. Experimental Center; 2. Department of Radiotherapy; 3. Breast Center, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of curcumin on the proliferation of breast cancer MCF-7 cells and the related oxidative stress mechanism. **Methods:** Human breast cancer MCF-7 cells were treated with different concentrations of curcumin (5-40 $\mu\text{mol/L}$), then the proliferation of MCF-7 cells was examined by MTT assay after 6, 12, 24 and 48 h; the apoptosis rate of MCF-7 cells was detected by flow cytometry (FCM); the levels of reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 cells were detected by DCFH-DA staining; and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in MCF-7 cells were detected by xanthine oxidase assay and visible spectrophotometer, respectively. **Results:** Low level curcumin (5, 10 $\mu\text{mol/L}$) inhibited the proliferation of MCF-7 cells ($P < 0.01$) without inducing apoptosis; ROS levels in MCF-7 cells were firstly increased and then declined gradually; meanwhile, SOD and CAT activities decreased initially and then gradually increased. High level curcumin (20, 40 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the proliferation of MCF-7 cells and induced evident apoptosis ($P < 0.01$), and ROS levels in MCF-7 cells were elevated instantly and maintained for a long time after treatment; at the same time, SOD and CAT activities were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Curcumin has a double role of antioxidant and oxidation, and it functions in a dose-dependent manner. Different concentrations of curcumin can inhibit the proliferation of tumor cells through regulating oxidative statuses in cells.

[Key words] breast cancer; curcumin; reactive oxygen species; oxidative stress

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 490-493]

近年来研究表明,细胞信号转导与肿瘤的发生发展和复发转移密切相关,活性氧簇作为信号转导途径之一,不仅参与肿瘤的发生,而且参与调控肿瘤的生长、分化、迁移和凋亡^[1-2]。一些具有抗氧化特征天然植物成分如茶多酚、白藜芦醇等同时都表现出一定的防癌、抗癌作用^[3-4]。

[基金项目] 江苏省卫生厅科研课题资助项目(No. H200817)。Supported by the Scientific Research Project of Jiangsu Health Ministry(No. H200817)

[作者简介] 霍红梅(1972-),女,山东省东营市人,主管技师,主要从事肿瘤生物学治疗方面的研究

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: taohuo@163.com

实验已经证实姜黄素具有较广谱的抗肿瘤活性,是一种非常有潜力的天然抗癌药物,但对其抗肿瘤的作用机制尚未完全清楚。既往研究^[5]比较多地集中在细胞凋亡、细胞周期、DNA 复制等方面,从自由基、氧化损伤角度的研究还较少。而抗炎和抗氧化是姜黄素一个重要的药理作用,在预防由自由基介导的肿瘤的发生中发挥着重要作用^[6-7]。本研究观察不同时间、不同浓度的姜黄素作用后人乳腺癌 MCF-7 细胞的氧化应激状态及其与细胞生长、凋亡的关系,以探讨其抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞株来源于苏州大学细胞生物系研究室。姜黄素购自 Sigma 公司,分子式 C₂₁H₂₀O₆,分子质量 368.38,以二甲基亚砜(DMSO)溶解,加入到含 10% 小牛血清的 1640 液中,稀释到所需浓度,稀释后的 DMSO 终质量分数 < 5%,置于 -20 °C 避光保存。MTT 购自 Sigma 公司,SOD 酶试剂盒购自南京建成生物技术公司,过氧化氢酶试剂盒和 BCA 蛋白测定试剂盒、活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术公司。

1.2 细胞培养

将 MCF-7 细胞接种于 75 ml 细胞培养瓶中,加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养,3 d 传代 1 次。

1.3 MTT 法检测姜黄素对细胞生长的抑制率

取对数生长期细胞消化,以 4.0×10^4 /孔的密度接种于 96 板中,培养 24 h 后,分别加入含姜黄素的培养液 100 μ l 继续培养 24、48 h。按姜黄素浓度 5、10、20、40 μ mol/L 分为 4 组,每组设 6 个复孔。对照组以培养液代替,也设 6 个复孔。在各时间段结束前 4 h,每孔加 MTT 20 μ l,培养结束后,吸弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ l,振荡 10 min,用酶标仪 570 nm 处测定每孔 *D* 值。计算药物对细胞增殖的抑制率(%) = $(1 - \text{实验孔 } D \text{ 值} / \text{对照孔 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术分析细胞凋亡率

Annexin-FITC/PI 法流式细胞仪分析检测细胞的早期凋亡。不同浓度姜黄素处理的各组细胞,于 12、24、48 h 离心收集,调整细胞密度 1.0×10^6 /ml,用 PBS 洗涤、重悬 2 次,加入 10 μ l Annexin-FITC 和 5 μ l PI 混匀,避光室温反应 15 min,加入 400 μ l binding buffer,在 1 h 内上机检测。

1.5 黄嘌呤氧化酶法检测细胞中 SOD 酶活性

取各时间点对数生长期 MCF-7 细胞,胰酶消化

后 $200 \times g$ 离心 5 min, PBS 冲洗、离心 3 次,收集细胞。加生理盐水制备成 1×10^7 /ml 细胞悬液,置冰浴中,用玻璃匀浆器手动匀浆 5~10 min,显微镜下观察细胞破碎情况, $800 \times g$ 离心 5 min,收集上清液冻存于 -70 °C 冰箱内待测。按照说明书方法和操作要求,BCA 法检测上清液蛋白浓度,黄嘌呤氧化酶法检测细胞上清中 SOD 活性,可见光分光光度计法检测过氧化氢酶(catalase, CAT)活性。

1.6 荧光探针 DCFH-DA 检测姜黄素处理后细胞内活性氧水平

用荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。1:2 000 无血清 1640 培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μ mol/L。姜黄素处理的各组细胞收集后悬浮于 1 ml 稀释好的 DCFH-DA 液中,37 °C 培养箱避光孵育 30 min,每 5 min 颠倒混匀 1 次。用 1640 培养液洗涤 3 次,上流式细胞仪 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长检测荧光强度(FI)。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 8.0 统计学软件,组间比较采用单因素方差分析及配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素处理后 MCF-7 细胞的增殖抑制率

MTT 检测结果如表 1 所示:低浓度姜黄素即对细胞增殖有抑制作用($P < 0.01$),随姜黄素浓度的增加,细胞增殖抑制率明显增加;姜黄素作用于 MCF-7 细胞 24、48 h 的 IC₅₀ 分别是(18.75 \pm 2.68) μ mol/L、(16.24 \pm 2.75) μ mol/L。

表 1 不同浓度姜黄素对 MCF-7 细胞增殖的抑制率(%)
Tab. 1 Inhibitory rates of MCF-7 cells by different concentrations of curcumin (%)

Curcumin ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Time(<i>t</i> /h)	
	24	48
0	0.32 \pm 3.15	0.78 \pm 6.86
5	10.47 \pm 1.55*	25.38 \pm 3.23**
10	21.52 \pm 2.36**	35.49 \pm 3.83**
20	53.41 \pm 3.58**	60.67 \pm 3.31**
40	68.78 \pm 2.53**	77.24 \pm 5.26**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 μ mol/L

2.2 姜黄素处理后 MCF-7 细胞的凋亡率

Annexin-FITC/PI 法流式细胞术凋亡检测结果 (表 2) 显示: 低浓度 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组比较未见凋亡发生, 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 12 h 即有凋亡出现, 40 $\mu\text{mol/L}$ 作用时凋亡率随时间延长逐渐增加。

表 2 不同浓度姜黄素对 MCF-7 细胞凋亡的影响
Tab. 2 Effects of different concentrations of curcumin on apoptosis of MCF-7 cells

Curcumin ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Time(t/h)		
	12	24	48
0	1.88 ± 0.56	1.95 ± 0.77	2.02 ± 0.39
5	1.86 ± 0.26	2.12 ± 0.28	2.26 ± 0.57
10	2.05 ± 1.33	2.78 ± 1.62	3.06 ± 2.35
20	3.75 ± 0.98*	10.11 ± 1.78**	20.49 ± 4.77**
40	8.55 ± 1.62**	26.52 ± 2.14**	45.52 ± 4.98**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$

2.3 姜黄素处理后细胞内活性氧水平的变化

实验结果显示, ROS 产生量与姜黄素浓度呈依赖性关系。姜黄素处理 MCF-7 细胞 6 h 时, 随浓度增加 ROS 产生量迅速升高, 高浓度 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组比对照约增加 3~6 倍, 在 12 h 时达到峰值, 后开始下降, 但 48 h 时仍维持在较高水平。低浓度 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 组 ROS 在 6 h 短暂升高后, 随时间的延长逐步下降, 分别在 24、48 h 时低于正常未加药组 (图 1)。

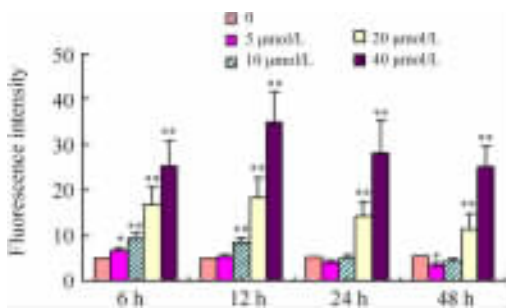


图 1 姜黄素处理后 MCF-7 细胞内 ROS 的变化
Fig. 1 Changes of ROS levels in MCF-7 cells treated with curcumin

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ group

2.4 姜黄素处理后细胞内抗氧化酶活性的变化

实验结果 (表 3) 显示, 加入姜黄素 12 h 后, 随浓度加大抗氧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT 活性逐渐

降低, 高浓度组明显低于对照组水平 ($P < 0.05$), 而 5 $\mu\text{mol/L}$ 组明显高于正常对照组水平 ($P < 0.01$); 同时细胞内活性氧水平的变化, 高浓度组增加幅度最大, 5 $\mu\text{mol/L}$ 组的活性氧接近正常对照组水平。

表 3 不同浓度姜黄素作用 12 h 后 MCF-7 细胞氧化指标的变化

Tab. 3 Changes of oxidative parameters in MCF-7 cells treated with curcumin for 12 h

Curcumin ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Oxide index		
	SOD($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	CAT($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	ROS(FI)
0	11.14 ± 11.99	6.80 ± 0.12	4.85 ± 0.78
5	25.72 ± 6.82*	8.66 ± 0.48*	5.15 ± 0.62
10	15.68 ± 3.15	5.01 ± 0.36*	8.57 ± 0.91*
20	8.38 ± 6.48*	3.57 ± 0.52**	18.40 ± 0.57**
40	5.11 ± 2.72*	2.18 ± 0.69*	34.96 ± 2.48**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$

3 讨论

生理水平的 ROS, 与细胞分裂增殖密切相关。细胞增殖可通过包含 ROS 在内的信号途径的调控来实现。但当细胞内 ROS 量超过一定阈值, ROS 则表现为细胞周期抑制, 更高浓度的 ROS 则导致 DNA 破坏、细胞老化和凋亡、坏死产生^[8]。肿瘤细胞内普遍存在与正常细胞不同的氧化压力, 通常维持较高的氧化状态, 表现为较高水平的自由基和较低的抗氧化酶活性^[9]。这种较高水平的 ROS, 可激活敏感的转录因子和相关基因如 NF- κ B 和 AP1 等, 从而保障肿瘤细胞的生存、增殖以及迁移。但同时, 肿瘤细胞内较高水平的 ROS 也使其再受到 ROS 攻击时, 比正常细胞更易于死亡^[10]。

有研究^[11]提示姜黄素的抗氧化特性可能在低剂量时发挥作用, 姜黄素具有抗氧化与促氧化的双重作用。本研究显示, 低浓度的姜黄素作用于 MCF-7 细胞时, 对细胞增殖有一定生长抑制作用, 但未见凋亡发生; 同时伴有细胞内 ROS 降低和抗氧化酶 SOD、CAT 水平的升高。细胞内 ROS 的降低可能通过抑制细胞周期、抑制转录因子水平等途径抑制了肿瘤细胞的增殖。姜黄素口服吸收的生物利用度不高, 在体内血药浓度很低^[12]。但体内实验研究^[13]对多种肿瘤仍表现有明显地抑制生长作用, 低浓度姜黄素的抗氧化作用可能是其作用机制之一。随着姜黄素剂量的

加大,细胞内 ROS 迅速升高,但随时间延长而下降,仍然维持在较高水平,而抗氧化酶 SOD、CAT 水平明显下降;同时伴随凋亡的大量产生,细胞生长抑制率明显增加。这些结果与有关研究^[14-15]结果相一致。不同浓度姜黄素通过对细胞内氧化还原状态的调节,可能参与了其抗肿瘤作用机制。

[参 考 文 献]

- [1] Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7 (12): 1875-1884.
- [2] Lau AT, Wang Y, Chiu JF. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(2): 657-667.
- [3] 刘淑红, 李 堃, 王 美, 等. 茶多酚对 Lewis 肺癌的生长抑制、抗氧化及免疫调节作用的研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, (3): 206-209.
- [4] Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials [J]. *Cancer Prev Res*, 2009, 2 (5): 409-418.
- [5] Kim JH, Xu C, Keum YS, *et al.* Inhibition of EGFR signaling in human prostate cancer PC-3 cells by combination treatment with beta-phenylethyl isothiocyanate and curcumin [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(3): 475-482.
- [6] Iqbal M, Okazaki Y, Okada S. Curcumin attenuates oxidative damage in animals treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA): implications for cancer prevention [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 324(1-2): 157-164.
- [7] Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory prop-

erties of curcumin [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 105-125.

- [8] Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, *et al.* Redox regulation of cell survival [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(8): 1343-1345.
- [9] Nicco C, Laurent A, Chereau C, *et al.* Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species [J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59(4): 169-174.
- [10] López-Lázaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(1): 1-8.
- [11] Strasser EM, Wessner B, Manhart N, *et al.* The relationship between the anti-inflammatory effects of curcumin and cellular glutathione content in myelomonocytic cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(4): 552-559.
- [12] 温碧霞, 许建华, 黄秀旺, 等. 姜黄素在小鼠体内各脏器的药代动力学研究 [J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(4): 25-26.
- [13] 李剑明, 杨和平, 白中红, 等. 姜黄素水溶性制剂对小鼠黑色素瘤自发性转移的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, (3): 286 ~ 288.
- [14] Cao J, Jia L, Zhou HM, *et al.* Mitochondrial and Nuclear DNA Damage Induced by Curcumin in Human Hepatoma G2 Cells [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91(2): 476-483.
- [15] Moussavi M, Assi K, Gómez-Muñoz A, *et al.* Curcumin mediates ceramide generation via the de novo pathway in colon cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(8): 1636-1644.

[收稿日期] 2009 - 06 - 12

[修回日期] 2009 - 08 - 27

[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

细胞因子 IL-21 在慢性感染和 T 细胞衰竭中的作用

HBV、HCV 和 HIV 等病毒的慢性感染一直以来困扰着免疫学家,病毒特异性 CTL 细胞衰竭被认为是机体不能有效清除病毒的重要机制——即 CTL 细胞功能耗竭,处于一种不反应的状态,不能增殖和分泌细胞因子(IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等)或杀伤感染细胞。在这过程中,如果缺失了 CD4⁺ T 细胞将导致更加严重的 CTL 细胞衰竭,然而其具体机制还不清楚。论文作者发现,在慢性感染中,CD4⁺ T 细胞分泌的 IL-21 能够作用于 CD8⁺ T 细胞,促进其增殖,从而维持长期有效的抗病毒免疫。

该研究以 LCMV 感染为模型,首先比较了野生型和 IL21R^{-/-} 小鼠在慢性感染过程中 CD8⁺ T 细胞反应的动态变化,结果发现在感染的急性期,两者都能激发有效抗病毒的 CTL 细胞产生;但是在急性期之后,CTL 细胞在野生型小鼠能够持续存在,而在 IL21R^{-/-} 小鼠 CTL 数量却不断减少,同时血清和各脏器中病毒滴度均相应增加。通过构建野生型和 IL21R^{-/-} 嵌合体小鼠,作者进一步证实了 IL21R^{-/-} 的病毒特异性 CD8⁺ T 细胞在感染急性期之后迅速减少,并且利用 BrdU 渗入实验阐明了这种数量减少是由于这些 CTL 细胞不能进一步增殖,而不是因为凋亡增加。PD-1 在 CTL 细胞表面的表达和机体抑制性细胞因子 IL-10 的升高被认为与 CD8⁺ T 细胞的衰竭密切相关,但是在 IL21R^{-/-} 小鼠并没有观察到 PD-1 或者 IL-10 表达的增加,表明 IL-21 是一种能够抑制 T 细胞衰竭和控制慢性感染的新的信号分子。最后,该研究又通过细胞因子染色分析,阐明了分泌 IL-21 的主要是 CD4⁺ T 细胞,并且其分泌量随着感染的进程不断增加,正好与 IL-21 作用于慢性感染的时相吻合。

该论文首次揭示了在慢性感染中 CD4⁺ T 细胞辅助 CD8⁺ T 细胞,从而有效控制感染的具体机制,这将为抗原持续存在的慢性感染和肿瘤等疾病的治疗提供新的靶点。然而,这种分泌 IL-21 的 CD4⁺ T 细胞与 Th17 细胞和 T_H 细胞(follicular helper T cell)之间存在什么样的关系还有待于进一步研究。

[徐 胜 摘译, 韩岩梅 审阅. Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, *et al.* *Science*, 2009, 324(5934): 1576-1580]