

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.010

## 姜黄素抑制结肠癌 SW480 细胞的增殖及其机制

陈健, 林秀秀, 林豪仁, 兰艳艳, 叶坤, 林婷婷, 仇容(浙江医学高等专科学校 基础医学部, 浙江 杭州 310053)

**[摘要]** **目的:** 研究姜黄素对人结肠癌 SW480 细胞增殖以及 survivin、caspase-3 和 p-Akt 表达的影响。**方法:** 用不同浓度姜黄素(5~40  $\mu\text{mol/L}$ )作用 SW480 细胞 24、48 和 72 h, MTT 法检测姜黄素对 SW480 细胞生长的抑制作用, Western blotting 法检测 SW480 细胞中 survivin、caspase-3 和 p-Akt 蛋白的表达。**结果:** 姜黄素以剂量(5~40  $\mu\text{mol/L}$ )和时间(24~72 h)依赖的方式抑制 SW480 细胞的增殖( $P < 0.01$ ), 40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 72 h 对 SW480 细胞生长的抑制率可达(75.86  $\pm$  3.93)%。姜黄素抑制 SW480 细胞中 p-Akt、survivin 蛋白的表达、促进 caspase-3 蛋白的表达, 均呈时间和剂量依赖性; 40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 SW480 细胞 48 h 后 p-Akt 和 survivin 蛋白表达显著减少[(0.204  $\pm$  0.025) vs (0.367  $\pm$  0.035)],  $P < 0.01$ ; (0.208  $\pm$  0.014) vs (0.385  $\pm$  0.034),  $P < 0.01$ ], caspase-3 蛋白表达显著增加[(0.371  $\pm$  0.028) vs (0.127  $\pm$  0.023)],  $P < 0.01$ 。**结论:** 姜黄素抑制 SW480 细胞增殖, 其机制可能与抑制 Akt 磷酸化、下调 survivin 和上调 caspase-3 蛋白的表达有关。

**[关键词]** 姜黄素; 结肠癌; 增殖; survivin; caspase-3; p-Akt

**[中图分类号]** R735.3; R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)03-0280-04

## Inhibitory effect of curcumin on proliferation of colon cancer SW480 cells and its mechanism

CHEN Jian, LIN Xiu-xiu, LIN Hao-ren, LAN Yan-yan, YE Kun, LIN Ting-ting, QIU Rong (Department of Basic Medicine, Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, Zhejiang, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of curcumin on proliferation and expression of survivin, caspase-3 and p-Akt in colon cancer SW480 cells. **Methods:** SW480 cells were treated with different concentrations of curcumin (5-40  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24, 48 and 72 h. The inhibitory effect of curcumin on SW480 cells was detected by MTT. The expressions of survivin, caspase-3 and p-Akt protein were analyzed by Western blotting. **Results:** Curcumin decreased the proliferation of SW480 cells in a dose- and time-dependent manner ( $P < 0.01$ ), with an inhibitory rate of (75.86  $\pm$  3.93)% after 40  $\mu\text{mol/L}$  curcumin treatment for 72 h. Curcumin decreased the expressions of p-Akt and survivin, and increased the expression of caspase-3 protein in a dose- and time-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Treated with curcumin (40  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h, the expressions of p-Akt and survivin protein were decreased significantly ([0.204  $\pm$  0.025] vs [0.367  $\pm$  0.035],  $P < 0.01$ ; [0.208  $\pm$  0.014] vs [0.385  $\pm$  0.034],  $P < 0.01$ ), and the expression of caspase-3 protein was increased significantly ([0.371  $\pm$  0.028] vs [0.127  $\pm$  0.023],  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Curcumin inhibits the proliferation of SW480 cells, which may be related to a decrease in phosphorylation of Akt, down-regulation of survivin protein expression and up-regulation of caspase-3 protein expression.

**[Key words]** curcumin; colon cancer; proliferation; survivin; caspase-3; p-Akt

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(3): 280-283]

姜黄素是从中药姜黄中提取的酚性色素, 其主要药理作用有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗纤维化、抗动脉粥样硬化等, 尤其在抗肿瘤方面具有很好的发展前景<sup>[1]</sup>, 美国国立肿瘤研究所已将其列为第 3 代肿瘤化学预防药物<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明, 姜黄素能诱导多种肿瘤细胞的凋亡。结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤, 近年来在我国的发病率

**[基金项目]** 2009 年浙江省大学生科技创新活动计划项目。Project supported by Science and Technology Innovation Activities for Undergraduates in Zhejiang Province in 2009

**[作者简介]** 陈健(1978-), 男, 浙江杭州人, 硕士, 讲师, 主要从事病理学教学及肿瘤分子病理学研究。E-mail: wopu1998@hotmail.com

**[通信作者]** 仇容(QIU Rong, corresponding author), E-mail: wopu1998@hotmail.com

与死亡率有上升趋势。研究<sup>[4-5]</sup>显示,姜黄素对多种结肠癌细胞株有明显的抑制作用,但是否通过调节 PI3K/Akt 信号通路影响 survivin 来发挥抑制作用,目前尚未报道。本实验观察姜黄素对人结肠癌 SW480 细胞增殖的影响,以及 survivin、caspase-3 和 p-Akt 蛋白表达变化,探讨姜黄素抑制结肠癌细胞增殖的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物和试剂

姜黄素购自碧云天生物技术研究所,DMEM 高糖培养液购自杭州吉诺生物医药技术有限公司,胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司。MTT、DMSO 均为美国 MBI 公司产品,BCA 定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,p-Akt、survivin 和 caspase-3 抗体购自美国 CST 公司, $\beta$ -actin 购自美国 Santa Cruz 公司,相应二抗购自美国 Pierce 公司。

人结肠癌 SW480 细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司。细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱培养,培养液为含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,每 2 ~ 3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

### 1.2 MTT 法检测姜黄素对 SW480 细胞生长的抑制

将 SW480 细胞以  $2.0 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔培养板中,培养 24 h,贴壁后弃去旧培养液,实验设药物处理组和对照组。药物处理组分别加入 5、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素,对照组每孔加入培养液。继续培养 24、48、72 h。采用 MTT 法检测,弃去培养液,加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20  $\mu\text{l}$ /孔,继续培养 4 h,然后吸弃上清液,加 150  $\mu\text{l}$ /孔 DMSO,振荡 10 min 后用酶标仪检测每孔  $D_{490}$  值,计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%) =  $[1 - (\text{药物处理组 } D_{490} / \text{细胞对照组 } D_{490})] \times 100\%$ 。实验重复 3 次,取平均值。

### 1.3 Western blotting 法检测 SW480 细胞中 survivin、caspase-3、p-Akt 蛋白的表达

分别用 20、40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理 SW480 细胞 48 h,及 40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理 SW480 细胞 48、72 h,并设对照组,收集各组 SW480 细胞。用 T-PER 提取总蛋白,再用 BCA 定量试剂盒进行总蛋白定量,然后上样,电泳,转膜,封闭,加一抗杂交(survivin、caspase-3、p-Akt、 $\beta$ -actin)及相应二抗,按说明书操作使用 ECL,暗盒中曝光后进行显影和定影。应用凝胶扫描仪对胶片进行光密

度扫描,并以  $\beta$ -actin 校正作相对量分析。实验重复 3 次,取平均值。

### 1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS16.0 统计软件,同一处理因素多组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 姜黄素抑制 SW480 细胞的增殖

MTT 结果(图 1)显示,5 ~ 40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 SW480 细胞 24、48、72 h 后,均能够抑制 SW480 细胞的增殖,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。该抑制作用在一定范围内存在着剂量-时间依赖关系,40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 72 h 对 SW480 细胞生长的抑制率可高达(75.86  $\pm$  3.93)%。

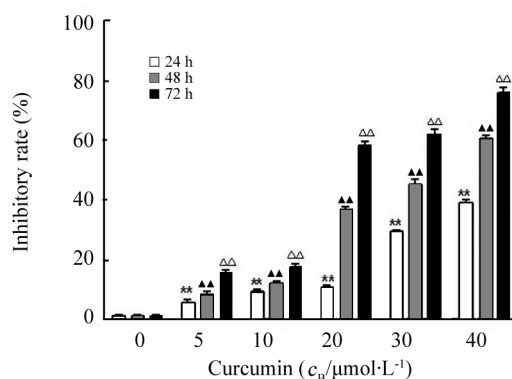


图 1 不同浓度姜黄素作用不同时间对 SW480 细胞生长的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effects of different concentrations of curcumin on growth of SW480 cells at different periods of time

\*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h; ▲▲  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  for 48 h; ▲▲▲  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  for 72 h

### 2.2 姜黄素对 SW480 细胞 survivin、caspase-3、p-Akt 蛋白表达的影响

20、40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 SW480 细胞 48 h 后的结果(图 2,表 1)显示,p-Akt 蛋白表达较对照组显著减少( $P < 0.01$ );caspase-3 蛋白表达均较对照组显著增加( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性( $P < 0.01$ );survivin 蛋白表达只在 40  $\mu\text{mol/L}$  时较对照组显著减少( $P < 0.01$ )。40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 SW480 细胞 48、72 h 后,p-Akt、survivin 蛋白表达均较对照组显著减少( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),caspase-3 蛋白表达较对照组显著增加(图 2,表 2, $P < 0.01$ )。

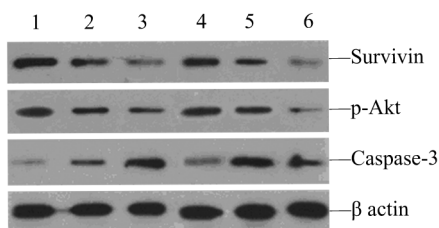


图2 姜黄素作用 SW480 细胞后 survivin、caspase-3、p-Akt 蛋白的表达

Fig. 2 Expressions of survivin, caspase-3 and p-Akt protein in SW480 cells after curcumin treatment

1,4: Control; 2: 20 μmol/L (48 h);  
3,5: 40 μmol/L (48 h); 6: 40 μmol/L (72 h)

表1 20、40 μmol/L 姜黄素作用于 SW480 细胞 48 h 后的 survivin、caspase-3、p-Akt 蛋白的表达 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Expressions of survivin, caspase-3 and p-Akt protein in SW480 cells after curcumin (20, 40 μmol/L) treatment for 48 h (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Curcumin (c <sub>B</sub> /μmol·L <sup>-1</sup> )	Survivin	Caspase-3	p-Akt
0	0.385 ± 0.034	0.127 ± 0.023	0.367 ± 0.035
20	0.353 ± 0.031 **	0.221 ± 0.025 **	0.208 ± 0.014 **
40	0.371 ± 0.028 ** $\Delta\Delta$	0.255 ± 0.024 **	0.204 ± 0.025 ** $\Delta\Delta$

\*\* P < 0.01 vs 0 μmol/L group;  $\Delta\Delta$  P < 0.01 vs 20 μmol/L group

表2 40 μmol/L 姜黄素作用于 SW480 细胞 48、72 h 后的 survivin、caspase-3、p-Akt 蛋白表达 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Expressions of survivin, caspase-3 and p-Akt protein in SW480 cells after treatment with 40 μmol/L curcumin for 48 and 72 h (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Time (t/h)	Survivin	Caspase-3	p-Akt
0	0.382 ± 0.030	0.227 ± 0.023	0.378 ± 0.014
48	0.251 ± 0.024 **	0.385 ± 0.025 **	0.305 ± 0.023 *
72	0.154 ± 0.023 ** $\Delta\Delta$	0.351 ± 0.034 **	0.140 ± 0.022 ** $\Delta\Delta$

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs 0 h group;  $\Delta\Delta$  P < 0.01 vs 48 h group

### 3 讨论

姜黄素由 Vogel 和 Pelletier 在 1815 年首次分离得到<sup>[6]</sup>。1985 年印度学者 Kuttan 等<sup>[7]</sup>报道姜黄素可以抑制肿瘤细胞的生长,但直到 1995 年其抗肿瘤的活性才得到广泛关注,并逐渐成为一个研究热

点<sup>[8-10]</sup>。田慧军等<sup>[4]</sup>应用人结肠癌 SW480 细胞,采用流式细胞法检测发现,姜黄素处理后 SW480 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例明显增多,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例明显减少,细胞生长被阻滞。范钰等<sup>[5]</sup>应用人结肠癌 SW620 细胞,采用琼脂糖凝胶电泳和 TUNEL 法发现,姜黄素可有效促进结肠癌细胞失巢凋亡。Lan 等<sup>[11]</sup>体内外研究均表明,姜黄素可增强奥沙利铂抑制结肠癌细胞增殖和诱导细胞凋亡的效果,降低奥沙利铂的毒性作用。本实验用 MTT 法再次证实,姜黄素能够抑制结肠癌 SW480 细胞的增殖,并呈剂量和时间依赖性,40 μmol/L 姜黄素作用 72 h 对 SW480 细胞生长的抑制率高达 (75.86 ± 3.93)%。

目前,姜黄素的抗肿瘤可能涉及的机制主要包括诱发肿瘤细胞凋亡、阻断肿瘤细胞生长信号转导通路、抗氧化和抑制肿瘤血管生成等方面<sup>[12]</sup>。经典的凋亡途径有 caspase-8 激活外源性的死亡受体途径和 caspase-9 激活内源性的线粒体途径,最后都激活执行因子 caspase-3 和 caspase-7 导致细胞凋亡的发生<sup>[13]</sup>。Survivin 是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis, IAP) 家族的一个新成员,广泛表达于人类大多数恶性肿瘤组织中,survivin 的高表达可抑制 Fas、Bax、caspase 以及抗肿瘤药物等多种因素所诱导的细胞凋亡。目前研究<sup>[14]</sup>证实,survivin 可直接抑制 caspase-3、caspase-7 的活性,从而抑制细胞凋亡的发生,也可间接抑制起始分子 caspase-9,抑制细胞凋亡。本实验采用 Western blotting 法检测相关蛋白的表达,发现姜黄素作用 SW480 细胞 48 h 后,caspase-3 蛋白表达均较对照组显著增加 (P < 0.01),且呈剂量依赖性 (P < 0.01); 40 μmol/L 姜黄素作用 SW480 细胞 48、72 h 后,survivin 蛋白表达显著减少 (P < 0.01),且呈时间依赖性 (P < 0.01)。说明姜黄素抑制 SW480 细胞生长可能与下调 survivin 蛋白、上调 caspase-3 蛋白的表达有关。

有研究<sup>[15]</sup>发现,姜黄素可以通过 PI3K/Akt 信号通路途径抑制乳腺癌细胞 HBL100 增殖。Akt 是一种相对分子质量约为 60 000 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶<sup>[16]</sup>,它处在多条信号通路的重要交叉点,在细胞的存活和介导肿瘤的发生中有重要作用,并且已经成为肿瘤治疗的新靶点之一<sup>[17]</sup>。Akt 可通过 Thr308 及 Ser473 位点的磷酸化而被激活<sup>[18]</sup>。磷酸化的 Akt 在大部分肿瘤中高表达,通过多种信号途径影响下游一系列效应分子的活化状态,在细胞内发挥着抑制凋亡、促进增殖等生物学效应。Survivin、caspase 是 Akt 的下游分子<sup>[19]</sup>。Peng 等<sup>[20]</sup>研究表明,p-Akt 通过上调 HIF-1 $\alpha$  表达,survivin 表达

增加。另外也有研究<sup>[21]</sup>发现, p-Akt 可使 caspase-9 和 caspase-3 磷酸化失活, 抑制 caspase 导致的细胞凋亡。

本实验检测 p-Akt 蛋白的表达情况, 结果显示, 在姜黄素作用后, p-Akt 蛋白的表达较对照组下降 ( $P < 0.01$ ), 且呈时间依赖性 ( $P < 0.01$ )。说明了姜黄素可能通过抑制 Akt 信号通路的活化, 抑制 SW480 细胞的增殖。而且, p-Akt 表达情况与前述的 survivin 表达呈正相关, 与 caspase-3 表达呈负相关, 这与 Woo 等<sup>[22]</sup>证明的姜黄素通过 Akt 去磷酸化以及 caspase-3 活化诱导人肾癌 caki 细胞凋亡相符。

综上所述, 抑制 Akt 的磷酸化可下调 survivin、上调 caspase-3 蛋白的表达, 这可能是姜黄素抑制结肠癌增殖的机制之一, 但具体如何通过 Akt/survivin/caspase 通路参与抗肿瘤作用还有待进一步研究。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 胡静, 李立. 姜黄素药理作用研究现状 [ J ]. 检验医学与临床, 2007, 4( 12 ): 1186-1187.
- [ 2 ] Odot J, Albert P, Carlier A, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor effect of curcumin against melanoma cells [ J ]. Int J Cancer, 2004, 111( 3 ): 381-387.
- [ 3 ] Lee YK, Park SY, Kim YM, et al. Regulatory effect of the AMPK-COX-2 signaling pathway in curcumin-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells [ J ]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171: 489-494.
- [ 4 ] 田慧军, 王迪乐. 姜黄素诱导人结肠癌细胞株 SW480 凋亡及其 bcl-2 表达相关性研究 [ J ]. 肿瘤防治研究, 2006, 33( 3 ): 185-186.
- [ 5 ] 范钰, 张允历, 许则丰. 姜黄素抑制结肠癌 SW620 细胞侵袭的体外实验研究 [ J ]. 江苏大学学报: 医学版, 2006, 16( 4 ): 298-300.
- [ 6 ] Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: All age-old spice with modern targets [ J ]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30( 2 ): 85-94.
- [ 7 ] Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, et al. Potential anticancer activity of turmeric ( curcuma longa ) [ J ]. Cancer Lett, 1985, 29( 2 ): 197-202.
- [ 8 ] 黄赞松. 姜黄素对消化系统肿瘤作用的研究进展 [ J ]. 时珍国医国药, 2009, 20( 2 ): 383-385.
- [ 9 ] 周进, 方丽, 姚文秀, 等. 槲皮素、姜黄素对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡作用的比较 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18( 3 ): 324-326.
- [ 10 ] 霍红梅, 张利元, 江家贵, 等. 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 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16( 5 ): 490-493.
- [ 11 ] Li L, Ahmed B, Mehta K, et al. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: Effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer [ J ]. Mol Cancer Ther, 2007, 6( 4 ): 1276-1282.
- [ 12 ] 黄珈雯. 姜黄素的抗肿瘤作用研究进展 [ J ]. 甘肃中医, 2008, 21( 1 ): 55-56.
- [ 13 ] Reddig P, Juliano R. Clinging to life: Cell to matrix adhesion and cell survival [ J ]. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24( 3 ): 425-439.
- [ 14 ] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas( CD95 ), Bax, caspases, and anticancer drugs [ J ]. Cancer Res, 1998, 58( 23 ): 5315-5320.
- [ 15 ] 张立, 张淑芳, 邹维. 姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡机制研究进展 [ J ]. 吉林医学, 2010, 31( 13 ): 1909-1910.
- [ 16 ] Marteni AM, Faenza I, Bili AM, et al. Intranuclear 3-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: New mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis [ J ]. Cell Signal, 2006, 18( 8 ): 1101-1107.
- [ 17 ] Dahl C, Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma [ J ]. APMIS, 2007, 115( 10 ): 1161-1176.
- [ 18 ] Viniegra JG, Martinez N, Modirassari P, et al. Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM [ J ]. J Biol Chem, 2005, 280( 6 ): 4029-4036.
- [ 19 ] Wang J, Yang L, Yang J, et al. Transforming growth factor beta induces apoptosis through repressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt/survivin pathway in colon cancer cells [ J ]. Cancer Res, 2008, 68( 13 ): 3152-3160.
- [ 20 ] Peng X, Karna P, Cao Z, et al. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1( alpha ) signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression [ J ]. Biol Chem, 2006, 281( 36 ): 25903-25914.
- [ 21 ] 陶惠民, 刘兵, 师钟丽, 等. 塞来昔布协同顺铂 PI3K/Akt 途径诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的实验研究 [ J ]. 中华骨科杂志, 2009, 29( 7 ): 684-689.
- [ 22 ] Woo JH, Kim YH, Choi YJ, et al. Molecular mechanisms of curcumin induced cytotoxicity: Induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt [ J ]. Carcinogenesis, 2003, 24( 7 ): 1199-1208.

[ 收稿日期 ] 2012 - 01 - 25

[ 修回日期 ] 2012 - 03 - 12

[ 本文编辑 ] 韩丹