

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.005

· 基础研究 ·

## 姜黄素对人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞外源性凋亡通路的影响

曲佳, 陈玲珍, 詹昱, 冯可欣, 杨郁青, 巫进明, 余卫(广州市第十二人民医院 血液科, 广东 广州 510282)

**[摘要]** 目的:探讨姜黄素(curcumin, Cur)对人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞外源性凋亡通路的影响。方法:ARH-77 细胞经 6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  Cur 处理 12、24、48 h, MTT 法检测 Cur 对 ARH-77 细胞增殖的抑制作用, Hoechst 33258 染色法观察 Cur 处理 24 h 后 ARH-77 细胞凋亡的形态学改变, 流式细胞术检测 ARH-77 细胞周期和 Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R 的表达, 分光光度法检测 ARH-77 细胞 caspase-8 的活性。结果:Cur 对 ARH-77 细胞的增殖有时间和剂量依赖的抑制作用。25  $\mu\text{mol/L}$  Cur 处理 ARH-77 细胞可观察到凋亡小体, Cur 阻滞细胞周期于  $G_0/G_1$  期, 并且有凋亡峰。其促凋亡作用呈浓度依赖性, 6.25、12.5、25  $\mu\text{mol/L}$  Cur 作用 24 h 后, ARH-77 细胞凋亡率均显著高于对照组[(10.35  $\pm$  0.35)%、(14.35  $\pm$  1.34)%、(36.65  $\pm$  1.06)% vs (3.83  $\pm$  0.32)%],  $F = 500.432$ ,  $P = 0.000$ ]; 实验组细胞内 caspase 8 的活化程度均显著高于对照组[(0.223  $\pm$  0.018)、(0.263  $\pm$  0.019)、(0.240  $\pm$  0.035) vs (0.154  $\pm$  0.007)],  $F = 9.059$ ,  $P = 20.03$ 。12.5  $\mu\text{mol/L}$  Cur 作用 24 h 后, ARH-77 细胞表面 Fas[(99.05  $\pm$  0.49)% vs (92.10  $\pm$  0.70)%],  $t = 15.404$ ,  $P = 0.000$ ], FasL[(9.05  $\pm$  0.78)% vs (1.73  $\pm$  1.19)%],  $t = 9.487$ ,  $P = 0.008$ ], TRAIL[(1.35  $\pm$  0.07)% vs (0.55  $\pm$  0.07)%],  $t = -11.317$ ,  $P = 0.008$ ], DR4、DcR1 和 DcR2 的表达均显著升高, DR5 表达显著降低[(0.95  $\pm$  0.07)% vs (7.70  $\pm$  0.29)%],  $t = 32.742$ ,  $P = 0.001$ ]; 进一步提升 Cur 浓度至 25  $\mu\text{mol/L}$ , 却降低了 DcR1[(4.35  $\pm$  1.20)% vs (14.25  $\pm$  0.21)%],  $t = 5.692$ ,  $P = 0.008$ ]及 DcR2[(0.75  $\pm$  0.21)% vs (1.65  $\pm$  0.71)%],  $t = 11.470$ ,  $P = 0.03$ ]的表达。结论:Cur 能明显抑制人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞的增殖, 其机制可能与激活外源性凋亡通路从而诱导细胞凋亡有关。

**[关键词]** 姜黄素; 多发性骨髓瘤; 凋亡通路; Fas; TRAIL

**[中图分类号]** R733.3; R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)01-0025-06

## Effect of curcumin on extrinsic apoptosis pathway in human multiple myeloma cell ARH-77

Qu Jia, Chen Lingzhen, Zhan Yu, Feng Kexin, Yang Yuqing, Wu Jinming, Yu Wei (Haematology Department, The Twelfth Guangzhou People's Hospital, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of curcumin (Cur) on the extrinsic apoptosis pathway of human multiple myeloma cell line ARH-77. **Methods:** ARH-77 cells were treated with Cur at 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{mol/L}$ . At 12, 24 and 48 h after treatment, cell viability was analyzed by MTT assay and growth inhibition was accordingly calculated. At 24 h after treatment, changes in the cell morphology were assessed by Hoechst 33258 staining, cell cycle progression and levels of Fas/FasL and TRAIL/TRAIL-R were analyzed by flow cytometry, and the activity of caspase 8 was determined by colorimetry. **Results:** Cur significantly inhibited the growth of ARH-77 cells in a time- and dose-dependent manner. At 24 h after treatment, Cur induced apoptosis in ARH-77 cells in a dose-dependent manner; the percentage of apoptotic cells was (10.35  $\pm$  0.35)% at 6.25  $\mu\text{mol/L}$ , (14.35  $\pm$  1.34)% at 12.5  $\mu\text{mol/L}$  and (36.65  $\pm$  1.06)% at 25  $\mu\text{mol/L}$ , significantly higher than that in untreated control cells ([3.83  $\pm$  0.32]%,  $P < 0.01$ ). Apoptotic bodies and cell cycle arrest at the  $G_0/G_1$  phase were seen in ARH-77 cells treated with 25  $\mu\text{mol/L}$  Cur. Caspase 8 activity was significantly higher in ARH-77 cells

**[基金项目]** 广州市医药卫生科技项目(No. 20121A011102)。Project supported by the Medical Science and Technology Project of Guangzhou (No. 20121A011102)

**[作者简介]** 曲佳(1980-),女,山西省太原市人,博士,主要从事血液肿瘤的基础及临床研究。E-mail: qujia2000@126.com

**[通信作者]** 曲佳(Qu Jia, corresponding author), E-mail: qujia2000@126.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140218.1106.005.html>

treated with Cur at 6.26  $\mu\text{mol/L}$  ( $0.223 \pm 0.018$ ), 12.5  $\mu\text{mol/L}$  ( $0.263 \pm 0.019$ ), or 25.0  $\mu\text{mol/L}$  ( $0.240 \pm 0.035$ ) than in untreated control cells ( $0.154 \pm 0.007$ ) ( $P < 0.05$ ). Compared with the non-treatment control, 24 h Cur treatment at 6.25  $\mu\text{mol/L}$  significantly increased the protein levels of Fas ( $[99.05 \pm 0.49]\%$  vs  $[92.10 \pm 0.7]\%$ ,  $P = 0.000$ ), FasL ( $[9.05 \pm 0.78]\%$  vs  $[1.73 \pm 1.19]\%$ ,  $P = 0.008$ ), TRAIL ( $[1.35 \pm 0.07]\%$  vs  $[0.55 \pm 0.07]\%$ ,  $P = 0.008$ ), DR4, DcR1 and DcR2 but significantly decreased DR5 ( $[0.95 \pm 0.07]\%$  vs  $[7.70 \pm 0.29]\%$ ,  $P = 0.001$ ). The effect of Cur on DcR1 ( $[4.35 \pm 1.20]\%$  vs  $[14.25 \pm 0.21]\%$ ,  $P = 0.008$ ) and DcR2 ( $[0.75 \pm 0.21]\%$  vs  $[1.65 \pm 0.71]\%$ ,  $P = 0.03$ ) were more pronounced at 25.0  $\mu\text{mol/L}$  than at 12.5  $\mu\text{mol/L}$ . **Conclusion:** Cur is able to inhibit the growth of ARH-77 cells through activating the extrinsic apoptosis pathway and thereby may offer a potential therapeutic agent for multiple myeloma.

[ **Key words** ] curcumin; multiple myeloma; apoptosis pathway; Fas; TRAIL

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 25-30 ]

多发性骨髓瘤是来源于浆细胞的恶性肿瘤,近年来发病率有上升趋势。化学治疗、造血干细胞移植和分子靶向药物的出现在一定程度上提高了患者的中位生存期,但高龄、肿瘤耐药、化疗药物对机体的毒性反应均极大地影响了疾病的预后。因此,需要寻找一种不良反应小、能辅助治疗血液肿瘤的药物,以提高患者生存率,改善患者生活质量。姜黄素(curcumin, Cur)是从植物姜黄中提取的多酚类物质,研究<sup>[1-3]</sup>发现, Cur 能够通过调节核因子  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ )、STAT3 信号通路和 Bcl-2、Bax、survivin 等信号分子诱导人多发性骨髓瘤细胞凋亡,提示 Cur 对肿瘤细胞的作用是多靶点多通路的,但有关 Cur 对骨髓瘤细胞外源性凋亡通路影响的研究尚未见报道。本研究通过观察 Cur 作用后人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞形态、增殖、外源性凋亡相关分子的变化情况,探讨其对 ARH-77 细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与细胞株

人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞由本实验室保存。Cur 由药品生物制品检定所提供,纯度  $> 98\%$ ,用二甲基亚砜(dimethylsulphoxide, DMSO)溶解,0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,母液浓度为 0.5 mol/L,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  避光保存。RPMI 1640 培养液购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司。噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、DMSO 均购自美国 Sigma 公司。PE 标记的鼠抗人 TRAIL、TRAIL-R(DR-4/5、DcR1/2)、Fas、FasL 和 IgG 同型对照抗体均购自美国 BioLegend 公司, Caspase 8 凋亡试剂盒、Hoechst 33258 染色试剂盒均购自南京凯基生物公司。

### 1.2 MTT 法检测 Cur 对 ARH-77 细胞生长的抑制作用

取对数生长期的 ARH-77 细胞接种于 96 孔板中(每孔约  $1 \times 10^4$  个),培养 12 h,每孔分别加入终浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  的 Cur 作为实验组,设空白调零孔,每组设 3 个复孔,每孔 100  $\mu\text{l}$ 。于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中分别培养 12、24 和 48 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{l}$  MTT 溶液,培养 4 h,  $2\ 000 \times g$  离心 10 min,弃上清,加入 150  $\mu\text{l}$  DMSO 溶解,酶标仪检测 492 nm 处光密度( $D$ )值,计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率( $\%$ ) =  $(1 - D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}) \times 100\%$

### 1.3 Hoechst 33258 染色检测 Cur 对 ARH-77 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 ARH-77 细胞,接种于 6 孔板中(每孔约  $1 \times 10^6$  个),加入终浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$  的 Cur,于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养 24 h。收集  $1 \times 10^6$  个细胞, PBS 洗涤 2 次,加入 1 ml 4% 甲醛溶液,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  固定细胞 10 min。离心去除固定液, PBS 洗涤 2 次,用 50  $\mu\text{l}$  PBS 重悬细胞制备细胞涂片,自然晾干。滴加 100  $\mu\text{l}$  Hoechst 33258 工作液,室温下染色 10 min,自来水冲洗晾干。以紫外光 340 nm 波长激发,荧光显微镜下观察细胞形态。

### 1.4 流式细胞术检测 Cur 对 ARH-77 细胞周期和凋亡的影响

取对数生长期的 ARH-77 细胞(约  $5 \times 10^6$  个),经不同终浓度(6.25、12.5、25  $\mu\text{mol/L}$ ) Cur 作用 24 h 后,收集约  $1 \times 10^6$  个细胞,并设未经处理的 ARH-77 细胞为对照组, PBS 洗涤 2 次, 70% 冰乙醇重悬细胞,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  固定过夜。PBS 洗涤 1 次,弃上清后加入 300  $\mu\text{l}$  DNA 染液(内含碘化丙啶 100  $\mu\text{g/ml}$  和 RNA 酶 20 U/ml),室温避光染色约 30 min, PBS 洗

涂 2 次,流式细胞仪检测 Cur 对 ARH-77 细胞周期和凋亡的影响(激发光波长 488 nm,发射光波长 610 nm)。

### 1.5 流式细胞术检测 Cur 对 ARH-77 细胞表面 Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R 表达的影响

取对数生长期的 ARH-77 细胞(约  $5 \times 10^6$  个),经不同终浓度(6.25、12.5、25  $\mu\text{mol/L}$ ) Cur 作用 24 h 后,收集约  $1 \times 10^6$  个细胞,以未经处理的 ARH-77 细胞为对照组,PBS 洗涤 2 次。取 100  $\mu\text{l}$  PBS 重悬细胞,分别加入相应 PE 标记抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  下避光孵育 20 min。PBS 洗涤 2 次,用 300  $\mu\text{l}$  PBS 重悬细胞,以同型 IgG 作为阴性对照。流式细胞仪检测 Cur 对 ARH-77 细胞表面 Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R 表达的影响(激发波长 488 nm,发射波长 575 nm)。

### 1.6 分光光度法检测 Cur 对 ARH-77 细胞 caspase 8 活化程度的影响

收集实验组(经 6.25、12.5、25  $\mu\text{mol/L}$  Cur 处理 24 h 的 ARH-77 细胞)和对照组细胞各  $4 \times 10^6$  个,PBS 洗涤 2 次。向沉淀的细胞中加入 50  $\mu\text{l}$  冰冷的裂解缓冲液,置冰上裂解 60 min,其间涡旋振荡 4 次,每次 10 s。4  $^{\circ}\text{C}$ 、20 000  $\times g$  离心 1 min,小心吸取上清液至新管中,置冰上待用。测定上清中蛋白浓度,吸取约含 200  $\mu\text{g}$  蛋白的细胞裂解上清至 96 孔板,每孔加入 50  $\mu\text{l}$  2  $\times$  反应缓冲液和 50  $\mu\text{l}$  caspase 8 底物,以裂解缓冲液和反应缓冲液作为空白对照,37  $^{\circ}\text{C}$  避光处理 4 h。酶标仪测定 405 nm 处光密度( $D$ )值。

### 1.7 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS16.0 统计软件,各时间点和各浓度之间的比较,以及不同药物浓度作用下 ARH-77 细胞的周期、凋亡率、Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R 和 caspase 8 的比较采用单向方差分析(One-way ANOVA),方差齐时组间多重比较采用 SNK 法,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Cur 对 ARH-77 细胞增殖的抑制作用

MTT 检测结果(图 1)显示,相同作用时间下,随 Cur 浓度的升高,ARH-77 细胞的增殖率逐步降低;在相同浓度药物作用下,随着时间的延长,Cur 对 ARH-77 细胞的生长抑制作用逐步增强( $F = 4.063$ ,  $P = 0.024$ )。结果表明,Cur 对 ARH-77 细胞的生长抑制作用呈时间和剂量依赖性。12、24、48 h Cur 抑制 ARH-77 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 74.09、43.48 和

18.27  $\mu\text{mol/L}$ 。根据  $\text{IC}_{50}$  值以及不同浓度药物的抑制率,选择 24 h 下 6.25、12.5 和 25  $\mu\text{mol/L}$  作为实验浓度。

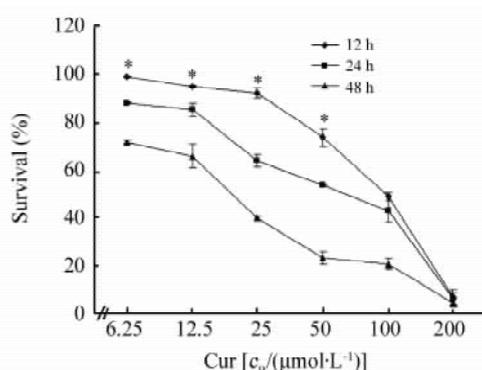


图 1 Cur 对 ARH-77 细胞生长的抑制

Fig. 1 Inhibitory effect of Cur on growth of ARH-77 cells

\*  $P < 0.05$  vs 24 h or 48 h

### 2.2 Cur 促进 ARH-77 细胞的凋亡

荧光显微镜下可见,与对照组相比,25  $\mu\text{mol/L}$  Cur 处理组细胞中有部分胞体变小,出现细胞核浓缩,可见凋亡小体(图 2)。

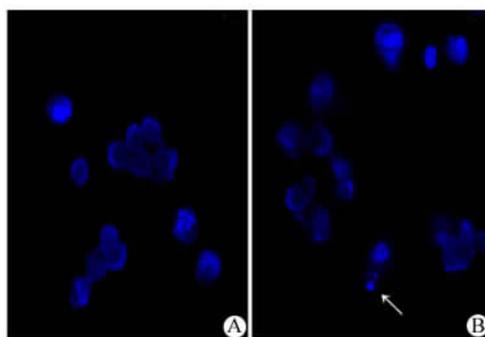


图 2 Cur 作用后 ARH-77 细胞的形态学改变 (Hoechst 33258 染色,  $\times 1\ 000$ )

Fig. 2 Morphological change of cells treat with Cur (Hoechst 33258 staining,  $\times 1\ 000$ )

A: ARH-77 cells; B: Cur-treated ARH-77 cells (Arrow stands for apoptotic cells)

### 2.3 Cur 对 ARH-77 细胞周期和凋亡的影响

流式细胞仪检测结果(表 1)显示,6.25  $\mu\text{mol/L}$  Cur 处理 24 h 后, $G_0/G_1$  期细胞比例显著高于对照组[(68.15  $\pm$  0.21)% vs (60.70  $\pm$  0.99)%], $t = -10.407$ ,  $P = 0.009$ ],S 期细胞比例显著减少[(26.55  $\pm$  0.92)% vs (34.45  $\pm$  0.07)%], $t = 12.118$ ,  $P = 0.009$ ],随药物浓度的加大,变化更为

显著; G<sub>2</sub>/M 期细胞比例没有明显变化, 提示 Cur 使 ARH-77 细胞发生 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞。Cur 处理组细胞出现亚二倍体峰( 图 3 ), 表明细胞凋亡增多。流式细胞术检测结果显示, 6. 25、12. 5、25 μmol/L 浓度

的药物作用 24 h 后的凋亡率均显著高于对照组 [ ( 10. 35 ± 0. 35 )%、( 14. 35 ± 1. 34 )%、( 36. 65 ± 1. 06 )% vs ( 3. 83 ± 0. 32 )%, *F* = 500. 432, *P* = 0. 000 ]。

表 1 不同浓度 Cur 诱导 ARH-77 细胞周期分布的改变( % )

Tab. 1 Change of cell cycle distribution of ARH-77 cells after treatment with different concentrations Cur( % )

Cur[ c <sub>B</sub> /( μmol · L <sup>-1</sup> )]	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	60. 70 ± 0. 99	34. 45 ± 0. 07	4. 85 ± 1. 06
6. 25	68. 15 ± 0. 21 *	26. 55 ± 0. 92 *	5. 30 ± 0. 85
12. 5	69. 10 ± 0. 71 *	26. 55 ± 0. 21 *	4. 35 ± 0. 92
25	75. 45 ± 0. 07 *▲□	21. 75 ± 1. 06 *▲□	2. 45 ± 0. 50
<i>F</i>	190. 911	109. 634	4. 281
<i>P</i>	0. 000	0. 000	0. 097

\* *P* < 0. 05 vs 0 μmol/L; ▲ *P* < 0. 05 vs 6. 25 μmol/L Cur; □ *P* < 0. 05 vs 12. 5 μmol/L Cur

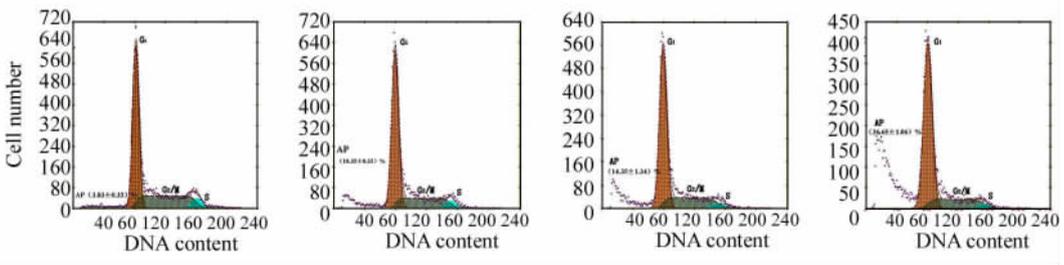


图 3 Cur 作用后 ARH-77 细胞周期和凋亡的变化

Fig. 3 Changes of ARH-77 cell cycle and apoptosis after treatment with Cur

A: ARH-77 cells; B: Treated with Cur 6. 25 μmol/L; C: Treated with Cur 12. 5 μmol/L; D: Treated with Cur 25 μmol/L

2. 4 Cur 处理后 ARH-77 细胞表面 Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R 的变化

对照组 ARH-77 细胞高表达 Fas, 约( 92. 10 ± 0. 70 )%, 而 FasL 表达较低, 仅( 1. 73 ± 1. 19 )%。经 6. 25 μmol/L Cur 作用 24 h 后, ARH-77 细胞表面 Fas 的表达显著升高, 达( 98. 90 ± 0. 71 )% ( *t* = -11. 898, *P* = 0. 000 ); 12. 5 μmol/L Cur 作用 24 h 后, FasL [ ( 9. 05 ± 0. 78 )%, *t* = -9. 487, *P* = 0. 008 ], TRAIL [ ( 1. 35 ± 0. 07 )% vs ( 0. 55 ± 0. 07 )%, *t* = -11. 317, *P* = 0. 008 ] 的表达也较对照组明显升高。进一步提升 Cur 浓度至 25 μmol/L, Fas、FasL 和 TRAIL 表达却都较 12. 5 μmol/L Cur 处理组降低, 提示 Fas/FasL 与 TRAIL 表达的增加并不与药物浓度的提升相一致。

Cur 对 TRAIL-R 表达的调节较为复杂, 12. 5 μmol/L Cur 处理后 DR4 表达仅轻度增加, 无论何种

浓度下的 Cur 作用反而降低了 DR5 的表达; 6. 25 μmol/L Cur 能增加诱骗受体的表达, 尤其是 DcR1 [ ( 15. 58 ± 2. 05 )% vs ( 1. 40 ± 0. 42 )%, *t* = -9. 759, *P* = 0. 010 ], 但随药物浓度增加却没有进一步提高诱骗受体的表达, 与 12. 5 μmol/L 相比, 25 μmol/L Cur 降低了 DcR1 [ ( 14. 25 ± 0. 21 )% vs ( 4. 35 ± 1. 20 )%, *t* = 11. 470, *P* = 0. 008 ] 及 DcR2 [ ( 1. 65 ± 0. 71 )% vs ( 0. 75 ± 0. 21 )%, *t* = 5. 692, *P* = 0. 03 ] 的表达水平( 表 2 )。

2. 5 Cur 对 ARH-77 细胞 caspase 8 活化的影响

分光光度法检测经 6. 25、12. 5、25 μmol/L Cur 处理 24 h 后 ARH-77 细胞内 caspase 8 的活化程度, 结果显示, 实验组细胞内 caspase 8 的 *D* 值均显著高于对照组 [ ( 0. 223 ± 0. 018 )、( 0. 263 ± 0. 019 )、( 0. 240 ± 0. 035 ) vs ( 0. 154 ± 0. 007 ); *F* = 9. 059, *P* = 0. 03 ]。

### 3 讨论

Cur 具有广泛的生物学活性,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤等,对于实体瘤和白血病等血液系统恶性肿瘤细胞具有明显的诱导凋亡、抑制生长等作用<sup>[4-6]</sup>。本研究发现,Cur 在体外能明显抑制 ARH-77 细胞的生长,呈现时间和剂量依赖性。并且,ARH-77 细胞在 Cur 的作用下发生了 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期周期阻滞。Cur 的处理也使 ARH-77 细胞凋亡率出现了明显的增加,

呈浓度依赖性。G<sub>1</sub>/S 调控点是 DNA 损伤修复的关键点,DNA 或在此时被修复而得以生存,或在无法有效修复时启动细胞凋亡程序<sup>[7-9]</sup>。Cur 阻滞 ARH-77 细胞停滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,表明药物能够通过调节细胞周期诱导凋亡而有效抑制骨髓瘤细胞生长。研究<sup>[10-12]</sup>发现,在不同类型的肿瘤细胞,Cur 对细胞周期的影响亦不尽相同,提示药物对周期的影响可能具有组织特异性。

表 2 Cur 对 ARH-77 细胞 Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R 表达的影响(%)

Tab. 2 Influence of Cur on Fas/FasL and TRAIL/TRAIL-R expressions on surface of ARH-77 cells (%)

Cur [c <sub>0</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )]	Fas	FasL	TRAIL	TRAIL-R			
				DR4	DR5	DcR1	DcR2
0	92.10 ± 0.70	1.73 ± 1.19	0.55 ± 0.07	1.05 ± 0.35	7.70 ± 0.29	1.40 ± 0.42	0.55 ± 0.71
6.25	98.90 ± 0.71*	3.15 ± 0.21	0.50 ± 0.14	0.90 ± 0.29	0.35 ± 0.07**	15.58 ± 2.05**	0.75 ± 0.71*
12.5	99.05 ± 0.49*	9.05 ± 0.78**▲	1.35 ± 0.07**▲	2.30 ± 0.57**▲	0.95 ± 0.07**▲	14.25 ± 0.21	1.65 ± 0.71**▲
25	96.85 ± 0.07▲■	1.50 ± 0.42▲□	0.55 ± 0.21	0.16 ± 0.14	0.50 ± 0.14*	4.35 ± 1.20▲□	0.75 ± 0.21**■
F	79.093	35.847	17.844	8.229	921.273	69.838	32.333
P	0.000	0.001	0.009	0.035	0.000	0.001	0.003

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs 0 μmol/L Cur; ▲P < 0.05 vs 6.25 μmol/L Cur; ■P < 0.05, □P < 0.01 vs 12.5 μmol/L Cur

使用能够促进肿瘤细胞凋亡、抑制其生长的抗癌药物是目前肿瘤治疗的研究热点。本研究观察到,经 Cur 处理的 ARH-77 细胞出现核固缩,胞体变小,形成凋亡小体。有两种途径可以诱导细胞凋亡:由细胞表面的死亡受体所介导的外源性途径和由线粒体介导的内源性途径,两者最终可引起效应 caspases(3、6、7)的活化从而导致细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>。目前的研究大多数集中于 Cur 对内源性凋亡通路中凋亡分子的影响<sup>[15]</sup>。在外源性凋亡途径中,死亡受体结合并活化其相应配体(如 Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R)后,激活酶原形式的 pro-caspase 8,进而活化前述的效应 caspase 3<sup>[16-17]</sup>。本研究观察到,不同浓度 Cur 作用均可活化 ARH-77 细胞的 caspase 8,表明 Cur 能够激活外源性凋亡途径从而引起骨髓瘤细胞凋亡。

细胞表面的死亡受体有 Fas 和 TRAIL-R,两者可分别与相应配体(FasL、TRAIL)结合传递凋亡信号。ARH-77 细胞自身高表达 Fas,表达率达(92.10 ± 0.70)%,但由于自身 FasL 的表达极低,因此无法诱导凋亡;TRAIL 的表达率也很低,故虽然

其死亡受体 DR5 有(7.70 ± 0.29)%的表达率,却依然无法传递凋亡信号。由此可看出,肿瘤细胞能够自我调节介导外源性凋亡信号分子的表达,以达到长期生存的目的。经 Cur 处理后,ARH-77 细胞 Fas 表达进一步提升,FasL 的表达也有增高的趋势,两者结合后能使凋亡信号传递至细胞内。Lu 等<sup>[18]</sup>研究也发现,Cur 能提升鼠视网膜神经节 N18 细胞 Fas、FADD 等分子的表达,诱导 N18 细胞凋亡。但当药物浓度增加至 25 μmol/L 时,Fas/FasL 的表达却均有所降低,提示在药物和 ARH-77 细胞的相互作用中,肿瘤细胞发生自身适应性调节以逃避 Cur 对其诱导凋亡的作用。结合生长抑制实验和凋亡率检测的结果可看出,虽然肿瘤细胞在对其表面凋亡分子的表达进行了一定的自我调整,但由于药物同时可能还激活了肿瘤细胞其他的信号分子和途径,故这样的自我调整并不能有效保护肿瘤细胞不被杀灭。对于 TRAIL-R 的研究进一步证明了这一观点,诱骗受体 DcR1 通过糖基磷酸肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定在细胞膜上,因其没有胞质区死亡结构域(death domain, DD)而不能转导调

亡信号,故能使细胞得以存活<sup>[19-20]</sup>。ARH-77 细胞经 Cur 作用后,不仅传递凋亡信号 DR4/5 的表达没有增加,反而表现为 DeR1 的显著增加。Shankar 等<sup>[21]</sup>的研究发现, Cur 能明显促进前列腺癌细胞 PC-3 表达 DR4/5,对 DeR1/2 无明显影响,而本实验的结果与该研究间存在一定差异,可能与细胞种类不同有关。

Cur 对人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞外源性凋亡通路的影响较为复杂,一方面,药物在体外能够通过调节死亡受体和相应配体间的相互作用而激活外源性凋亡途径,诱导 ARH-77 细胞发生凋亡;另一方面,在 Cur 的存在下,多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞自身能产生对抗凋亡的适应性调整以逃避凋亡,因此需在这两者间寻求平衡。因此, Cur 对多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞其他信号分子及通路的影响仍需进一步深入研究。

## 【参考文献】

- [ 1 ] Bhartia C, Shishodia S, Reuben JM, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B and STAT3 are constitutively active in CD138<sup>+</sup> cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis [ J ]. *Blood*, 2004, 103( 8 ): 3175-3184.
- [ 2 ] 刘波, 白庆成, 陈协群, 等. 姜黄素对人多发性骨髓瘤细胞的抑制作用及其机制 [ J ]. *肿瘤*, 2008, 28( 12 ): 1051-1054.
- [ 3 ] 张小燕, 白庆成, 黄高昇, 等. 姜黄素联合硼替佐米对骨髓瘤 H929 细胞增殖抑制与凋亡诱导作用及其机理 [ J ]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19( 3 ): 684-688.
- [ 4 ] Bai QX, Zhang XY. Curcumin enhances cytotoxic effects of bortezomib in human multiple myeloma H929 cells: Potential roles of NF- $\kappa$ B/JNK [ J ]. 2012, 13( 4 ): 4831-4838.
- [ 5 ] Jia YL, Li J, Qin ZH, et al. Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells [ J ]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11( 11 ): 918-928.
- [ 6 ] Du WZ, Feng Y, Wang XF et al. Curcumin suppresses malignant glioma cells growth and induces apoptosis by inhibition of SHH/GLII signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [ J ]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19( 12 ): 926-936.
- [ 7 ] Marilena C, Rosamaria M, Martina C, et al. p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G<sub>1</sub> arrest following transient inhibition of the mitotic spindle [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276( 22 ): 19205-19213.
- [ 8 ] Lu KH, Wu W, Dave B, et al. Loss of tuberous sclerosis com-

plex-2 function and activation of mammalian target of rapamycin signaling in endometrial carcinoma [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14( 9 ): 2543-2550.

- [ 9 ] Sunkaria A, Wani WY, Sharma DR, et al. Dichlorvos-induced cell cycle arrest and DNA damage repair activation in primary rat microglial cells [ J ]. *J Neurosci Res*, 2013, 91( 3 ): 444-452.
- [ 10 ] Lee DS, Lee MK, Kim JH. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma ( HOS ) cells [ J ]. *Anticancer Res*, 2009, 29( 12 ): 5039-5044.
- [ 11 ] Sahu RP, Batra S, Srivastava SK. Activation of ATM/Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells [ J ]. *Br J Cancer*, 2009, 100( 9 ): 1425-1433.
- [ 12 ] Guo H, Xu YM, Ye ZQ, et al. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis of prostate cancer cells by regulating the expression of I KappaB alpha, c-Jun and androgen receptor [ J ]. *Pharmazie*, 2013, 68( 6 ): 431-434.
- [ 13 ] Takeda K, Stagg J, Yagita H, et al. Targeting death-inducing receptors in cancer therapy [ J ]. *Oncogene*, 2007, 26( 25 ): 3745-3757.
- [ 14 ] Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: Protagonists of cancer cell apoptosis [ J ]. *Exp Oncol*, 2012, 34( 3 ): 165-175.
- [ 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 ] Holloch PA, Griffith TS. TNF-related apoptosis-inducing ligand ( TRAIL ): A new path to anti-cancer therapies [ J ]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625( 1/3 ): 63-72.
- [ 17 ] Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system [ J ]. *Immunity*, 2009, 30( 2 ): 180-192.
- [ 18 ] Lu HF, Lai KC, Hsu SC, et al. Curcumin induces apoptosis through FAS and FADD, in caspase-3-dependent and -independent pathways in the N18 mouse-rat hybrid retina ganglion cells [ J ]. *Oncol Rep*. 2009, 22( 1 ): 97-104.
- [ 19 ] Merino D, Lalaoui N, Morizot A, et al. TRAIL in cancer therapy: Present and future challenges [ J ]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11( 10 ): 1299-1314.
- [ 20 ] Yerbes R, Palacios C, López-Rivas A. The therapeutic potential of TRAIL receptor signalling in cancer cells [ J ]. *Clin Transl Oncol*, 2011, 13( 12 ): 839-847.
- [ 21 ] Shankar S, Chen Q, Sarva K, et al. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: Molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis [ J ]. *J Mol Signal*, 2007, 2( 1 ): 10.

[ 收稿日期 ] 2013 - 10 - 26

[ 修回日期 ] 2013 - 12 - 15

[ 本文编辑 ] 黄静怡

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅