

姜黄素诱导人胃腺癌MGC80-3细胞凋亡研究

陈瑞川¹, 马胜平², 苏金华¹, 蒋雪璇²

(1. 厦门大学抗癌研究中心, 2. 厦门大学生物学系; 福建 厦门 361005)

摘要: 以 5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理 MGC80-3 72 h, 细胞存活率随药物浓度及处理时间依赖性下降, 并呈现典型的凋亡细胞形态; 以 0、10、20 及 30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理细胞 24 h 后, 20 $\mu\text{mol/L}$ 以上的处理组 DNA 琼脂糖电泳显示均有典型的凋亡梯形条带, 同样条件处理后分别对断裂及未断裂 DNA 作定量测定, 计算细胞凋亡率分别为 7.3%、39.2%、50.5% 和 64.3%, 表明姜黄素具有诱导 MGC80-3 细胞凋亡的显著作用。流式细胞术检测显示经 10 及 30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理的 MGC80-3 细胞周期主要阻滞于 G₂/M 期, 提示细胞的 G₂/M 期阻滞与姜黄素诱导 MGC80-3 细胞凋亡有关。

关键词: 姜黄素; 胃癌 MGC80-3; 凋亡

中图分类号: Q 2 24

文献标识码: A

姜黄素(curcumin)是从中药姜黄中提取的酚类化合物, 广泛用于食品添加剂^[1]。80年代以来已陆续发现姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗凝和降血脂作用, 并发现姜黄素还具有显著的防癌和抑癌作用^[1]。近年有实验证据表明姜黄素能诱导多种癌细胞如人早幼粒白血病 HL-60、大肠癌 HT-29、肝癌 Hep G2 及 BEL-7402 等细胞凋亡^[2,3]。但姜黄素作为一种可食用的食品添加剂, 对胃癌细胞是否有诱导凋亡作用报道不多。本文以人胃腺癌细胞 MGC80-3 为对象, 较系统地研究了姜黄素诱导胃癌细胞凋亡的效应。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI 1640 购自美国 GIBCO BRL 公司。小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品。姜黄素、台盼蓝、Giemsa、Hoechst 33258、蛋白酶 K 和 SDS 等购自 Sigma 公司。Tris、琼脂糖、RNase A 及 pBR322/Hae III DNA 分子量标准为 Promega 公司产品。其余均为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养及药物处理

人胃腺癌 MGC80-3 细胞系由本单位细胞生物学研究室提供, 于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养液、5% CO₂、37 °C 培养传代。细胞按 1 ~ 2 × 10⁵/mL 接种, 37 °C 培养 24 h 后按实验要求加入不同浓度姜黄素, 对照组加同量的溶

收稿日期: 1999-06-18

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C97108)

作者简介: 陈瑞川(1963-), 男, 副研究员

剂,继续培养 24 h 后即收集细胞

1.3 细胞计数及光镜观察

常规台盼蓝拒染-血球计数板计数活细胞 培养于盖玻片上的细胞常规 Giem sa 染色后显微镜观察、拍照

1.4 DNA 抽提及电泳分析

细胞以 0.2% EDTA /PBS 消化、收集,每样品取 2×10^6 细胞,按文献报道方法^[4]提取 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外观察仪观察、拍照

1.5 凋亡 DNA 片段定量测定

按上述方法消化、收集经药物处理的细胞,参考 Iannou 等人的报道方法^[5],以 2.5% PEG 8 000 分级沉淀法分别提取断裂和未断裂的 DNA,用含 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 的 TE 溶解 DNA,20 min 后以荧光分光光度计测定断裂及完整的 DNA 的相对含量,并计算凋亡率 [凋亡率= 断裂 DNA 荧光值 ÷ (断裂 DNA 荧光值+ 未断裂 DNA 荧光值) × 100%]

1.6 流式细胞仪分析(FACS)

按文献方法^[5],每样品取 $1 \sim 2 \times 10^6$ 细胞 流式细胞仪为 FACSot FCM (美国 BD 公司),结果分析软件为 CellFIT Cell-Cycle Analysis Version 2.01.2

2 结果

2.1 姜黄素对 MGC 80-3 细胞存活率的影响

以 5、10 和 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 姜黄素连续处理 MGC 80-3 细胞 72 h,并于不同时间取样计数活细胞,结果见图 1.3 种浓度姜黄素对 MGC 80-3 细胞的存活均有抑制作用,并随药物浓度及处理时间呈依赖性下降

2.2 姜黄素对 MGC 80-3 细胞形态的影响

经 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 姜黄素处理 24 h 后的 MGC 80-3 细胞,常规 Giem sa 染色光镜观察可见凋亡细胞膜完整或起泡,并有染色致密的凋亡小体形成,胞核染色质凝聚,或附于核膜,或形成致密、边缘清晰的凝聚块(见图 2);按此标准随机计数 500 个细胞中的凋亡细胞并计算凋亡指数,结果见图 3

2.3 DNA 电泳分析

MGC 80-3 细胞经 10、20 及 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 姜黄素处理 24 h 后的 DNA 电泳显示: 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 以上终浓度姜黄素处理组均有典型的 DNA 梯形图像,图 4 所示为经姜黄素处理 24 h 后的 DNA 电泳图

2.4 DNA 片段化定量分析

以 5、10、20、30 及 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 姜黄素处理 MGC 80-3 细胞 24 h,分别提取断裂及完整的 DNA,定量分析结果见表 1.

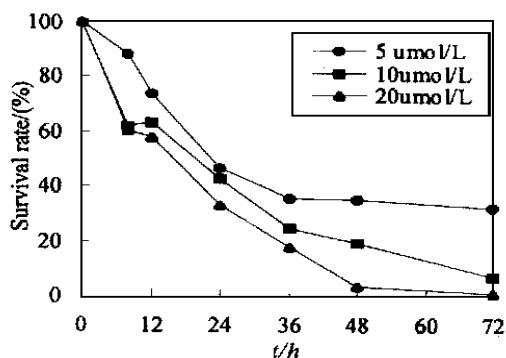


图 1 姜黄素对 MGC 80-3 细胞存活率的影响

Fig 1 Effect of curcumin on cell survival of MGC 80-3 cell

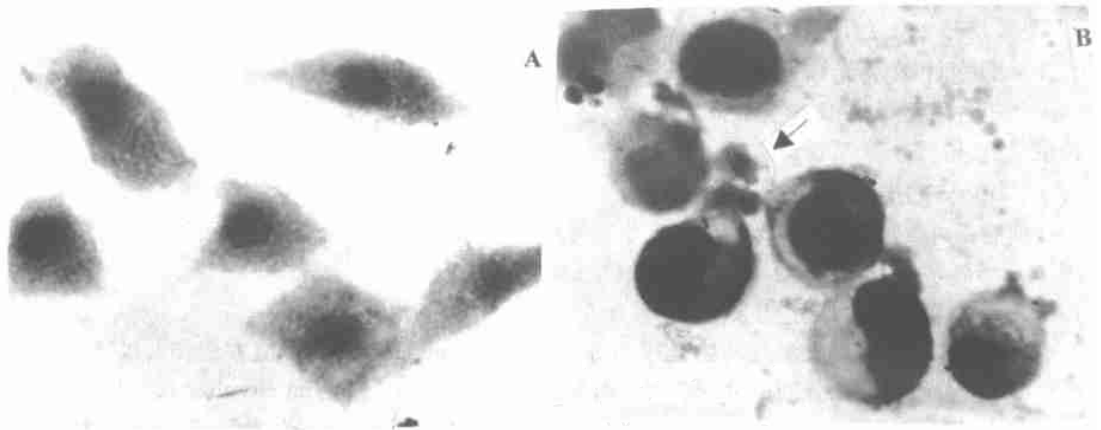


图 2 姜黄素对M GC 80-3 细胞形态的影响(Giem sa 染色, × 1000 倍)

A: 对照组; B: 20 μmol/L 处理组 (箭头示凋亡小体)

Fig. 2 Effect of curcumin on M GC 80-3 cell morphology

表 1 姜黄素对M GC 80-3 细胞DNA 断裂的影响

Tab. 1 Effect of curcumin on DNA fragmentation of M GC 80-3 cells

组别	断裂 DNA 量	未断裂 DNA 量	DNA 片断化率/(%)
对照组 ¹⁾	40	502	7.3
10	194	301	39.2
20	245	240	50.5
30	277	154	64.3
40	365	97	79.0

1) μmol/L

2.5 姜黄素对M GC 80-3 细胞周期的影响

以 10 及 20 μmol/L 姜黄素处理M GC 80-3 细胞 24 h, 取样进行流式细胞仪分析细胞周期分布, 显示 S 期细胞数量随药物浓度提高而下降, G2/M 期细胞百分比则呈上升趋势, 而 G1 期细胞在药物处理组中略增多. 表 2 及图 5 所示为细胞周期分析结果

3 讨论

细胞凋亡是细胞主动参与的自主性死亡过程. 肿瘤细胞凋亡可被多种药物及理化因素诱发, 包括某些抗氧化剂如丹参酮 II^[7]、N-乙酰

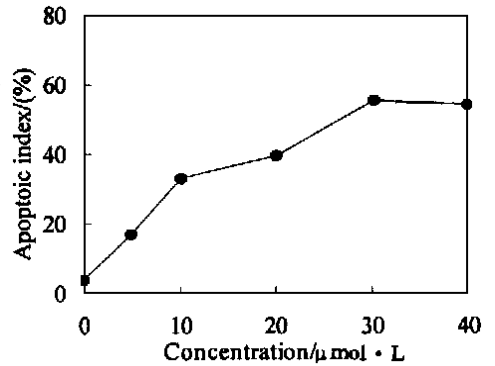


图 3 姜黄素对M GC 80-3 细胞凋亡指数的影响

Fig. 3 Effect of curcumin on apoptotic index of M GC 80-3 cell

表 2 姜黄素对M GC 80-3 细胞细胞周期的影响

Tab. 2 Effect of curcumin on cell cycles of M GC 80-3 cell (%)

组别	G0/G1	S	G2/M
对照组 ¹⁾	49.1	43.2	7.7
10	54.7	22.6	22.7
20	49.2	20.8	29.9

1) μmol/L

半胱氨酸^[8]等。目前, 凋亡细胞形态观察仍然被用作判定细胞凋亡的指标之一, 凋亡形态主要表现在细胞皱缩、胞核固缩、染色质凝聚, 并常伴有凋亡小体形成^[9]。本文以 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理 M GC80-3 细胞 24 h, 在倒置显微镜下观察, 即可见培养的细胞由原来带有突起的梭状或多角状变为圆形细胞, 并大量从培养玻片上脱落 (结果未显示); 经 Giem sa 染色后观察, 可见典型的凋亡细胞形态特征 (见图 2)。凋亡细胞的另一典型特征是染色体 DNA 呈 180~ 200 bp 倍数级断裂, DNA 琼脂糖电泳时表现为“梯形条带”^[8]。虽然并非所有细胞凋亡均出现该电泳特征, 但该特征为凋亡细胞所特有。在本文中, 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以上的姜黄素处理组均能观察到“梯形 DNA 条带”, 表明姜黄素具有诱导 M GC 80-3 细胞凋亡的作用。

从细胞存活率曲线 (图 1) 来看, 姜黄素诱导 M GC 80-3 细胞凋亡作用既具有量—效关系也具有时—效关系。以 Giem sa 染色计数凋亡指数, 由于贴壁细胞凋亡在染色处理过程中会从培养玻片上脱落, 不能真实反映细胞凋亡率, 故本文另采用断裂及未断裂 DNA 定量测定方法来检测凋亡效率, 以

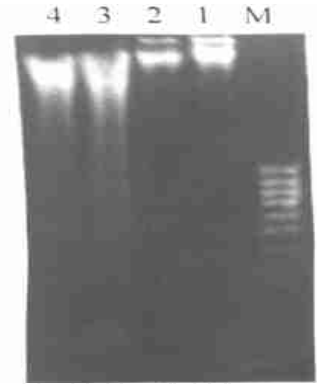


图 4 姜黄素对 M GC 80-3 DNA 断裂的影响
M: 100bp DNA ladder
1 ~ 4: 0, 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理组
Fig 4 Effect of curcumin on DNA fragmentation of M GC 80-3 cell

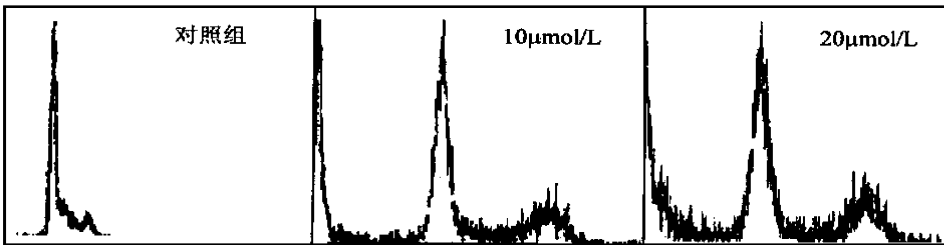


图 5 姜黄素对 M GC 80-3 细胞周期分布的影响 (处理 24 h)
Fig 5 Effect of curcumin on distribution of cell cycles of M GC 80-3 cell

便客观地反映药物诱导细胞凋亡的效率

目前, 姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡作用已被肯定, 但其诱导机制尚不清楚。最近, 许建华等^[3]报道用姜黄素诱导人肝癌 BEL-7 402 细胞凋亡, 可使细胞周期阻滞于 S 期; Chen 等^[10]的结果显示经姜黄素处理的血管平滑肌细胞以 G₁ 期阻滞为主, S 期细胞则下降; 而 Hanif 等^[11]人的结果表明大肠腺癌细胞以 G₂/M 阻滞为主。本文结果显示姜黄素处理 M GC 80-3 细胞后主要发生 G₂/M 期阻滞, 提示在不同的细胞中可能存在不同的诱导凋亡机制。因此, 有关姜黄素诱导细胞凋亡的机制尚待深入研究。

致谢: 本文在完成过程中, 承蒙徐洵教授、李祺福副教授等的热心指导和帮助, 在此致以衷心的感谢。

参考文献:

- [1] 袁守军, 韩锐 姜黄素的癌化学预防作用[M]. 国外医学肿瘤学分册, 1997, 24(5): 264- 268
- [2] 马晓华, 沃兴德, 梁海曼 姜黄素抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞凋亡的研究概况[M]. 国外医学肿瘤学分册, 1999, 26(1): 21- 23
- [3] 许建华, 赵蓉, 柯丹如, 等 姜黄素对人肝癌 BEL -7402 细胞杀伤动力学及周期时相的影响[J]. 福建医科大学学报, 1998, 32: 236- 239
- [4] Chen J, Jin K L, Chen M Z, et al Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death[J]. J. Neurochem. , 1997, 69: 232- 245
- [5] Ioannou Y A, Chen F W. Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis[J]. Nucleic Acid Res , 1996, 24: 992- 993
- [6] Li X, Melamed M R, Darzynkiewicz Z. Detection of apoptosis and DNA strand breaks with fluorochromes of different color[J]. Exp. Cell Res , 1996, 222: 28- 37
- [7] 黄韧敏, 袁淑兰, 宋毅, 等 丹参酮 IIA 诱导 HL -60 细胞凋亡[J]. 癌症, 1998, 17: 164- 166
- [8] Tsai J C, Jain M, Hsieh C M, et al Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells[J]. J. Biol Chem. , 1996, 271: 3 667- 3 670
- [9] 李德玲, 王会信, 周廷冲 细胞程序性死亡判定方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23: 322- 325
- [10] Chen H W, Huang H C. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells[J]. Br. J. Pharmacol, 1998, 124: 1 029- 1 040
- [11] Hanif R, Qiao L, Shiff S J, et al Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway[J]. J. Lab. & Clin. Med , 1997, 130: 576- 584

Induction Human Gastric Cancer Line MGC 80-3 Cell Apoptosis by Curcumin

CHEN Rui-chuan¹, MA Shen-ping², SU Jin-hua¹, JIANG Xua-xun²

(1. Cancer Research Center, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China;

2 Dept. of Biology, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: Experiments were conducted to determine the effects of curcumin on inducing human gastric cancer cell line MGC 80-3 apoptosis. While treated with 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, cell viability of MGC 80-3 was decreased with increasing the curcumin concentration and treatment time. The typical apoptotic morphology could be seen in 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin-treated cells when stained with Giemsa. DNA electrophoresis on agarose showed that the "DNA ladder bands", a typical feature of apoptotic cell, appeared in the above 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin-treated groups when the MGC 80-3 cell were treated with 0, 10, 20 and 30 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, respectively. Under such treatment conditions, the apoptotic efficiencies were determined as 7.3%, 39.2%, 50.5% and 64.3% by DNA quantitative method. From these results, it can be concluded that curcumin has the effect of inducing cell apoptosis on MGC 80-3. By analysis with flow cytometry, cell cycles showed G₂/M arresting after treatment with 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, which suggest an association between G₂/M arresting and MGC 80-3 cell apoptosis induced by curcumin.

Key words: curcumin; gastric carcinoma; MGC 80-3; apoptosis