

姜黄油诱导人肝癌细胞凋亡及其机制

雷 慧¹, 谭佳妮², 李绍平³, 李海涛^{1*}, 季 晖^{2**}

(¹南京中医药大学药理学教研室, 南京 210046; ²中国药科大学药理学教研室, 南京 210009;

³澳门大学中华医药研究院, 澳门)

摘 要 探讨姜黄油的抗肝癌作用及其作用机制, 采用二甲基噻唑蓝比色法(MTT)检测肝癌细胞的活力, 流式细胞仪检测细胞凋亡率以及线粒体膜电位的变化, Western blot 方法检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-9 以及细胞色素 C 的表达。结果发现, 姜黄油能时间依赖性地抑制肝癌细胞的生长, 降低线粒体膜电位并诱导其凋亡; 升高细胞内 Bax 与 Bcl-2 的比值; 诱导细胞色素 C 从线粒体中的释放并激活 caspase-9 和 caspase-3。结果提示姜黄油可能通过线粒体途径诱导肝癌细胞的凋亡。

关键词 姜黄油; 肝癌; 凋亡

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)03-0263-04

Turmeric oil induces human hepatoma cell apoptosis via mitochondrial pathway

LEI Hui¹, TAN Jiani², LI Shaoping³, LI Haitao^{1*}, JI Hui^{2**}

¹Department of Pharmacology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046; ²Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao, China

Abstract To evaluate the anti-human hepatocellular carcinoma activity of turmeric oil (TO). Cell viability was assessed by MTT assay, cell apoptosis and mitochondrial membrane potential were measured by flow cytometry. The protein abundance of Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-9 and cytochrome C was analyzed by Western blot. The results demonstrated TO-induced apoptosis of Bel-7402 cells in a time- and dose- dependent manners. It was characterized by loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and enhanced Bax/Bcl-2 ratio. The release of cytochrome C from mitochondria and the activation of caspase-9 and -3 indicated that TO might induce apoptosis of Bel-7402 cells via mitochondrial-mediated pathway.

Key words turmeric oil; hepatocellular carcinoma; apoptosis

姜黄油是姜科姜黄属植物姜黄 (*Curcuma longa*) 的有效成分之一, 主要化学成分为 α 、 β -姜黄酮、姜烯、水芹烯、1,8-桉叶素、香桉烯、龙脑、去氢姜黄酮等^[1-2], 其资源丰富, 价格低廉。姜黄油具有明显的抗氧化、抗感染、抗真菌、抗病毒、降血脂等作用, 且不良反应小^[3-4]。近来研究表明, 姜黄油具有一定的抗肿瘤作用, 对肺癌 A549、角朊细胞等多种肿瘤细胞有一定的抑制和杀伤作用^[5]。本实验前期用 GC-MS 分析方法对姜黄油所含的化学成分进行了明确鉴定^[6]。本文对姜黄挥发油对肝癌细胞生长、增殖及凋亡的影响进行研究, 并探讨

其可能的作用机制, 为不断探索姜黄油的抗肿瘤作用提供实验依据, 同时为寻找高效低毒的天然抗肿瘤药开辟新的途径。

1 材 料

1.1 药品与试剂

姜黄油(澳门大学中华医药研究院制备); MTT(美国 Sigma 公司); DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司); 新生牛血清(FBS, 美国 PAA 公司); 顺铂(齐鲁制药有限公司); FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒(美国 BD Pharmingen 公司); 线粒体膜电位检测试剂盒(上海碧云天生

* 收稿日期 2012-12-28 通信作者 * Tel: 025-86503505 E-mail: lihaitao0003@sina.com

** Tel: 025-86205849 E-mail: Huijiepu@163.com

物有限公司);一抗 Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3、caspase-9、cleaved-caspase-9、细胞色素 C、 β -actin 以及预染 Marker(美国 Bioworld 公司)。

1.2 仪器

SH 1000 酶联免疫检测仪(日本 Corona 公司);FACSCanto™ 流式细胞仪(美国 BD 公司);Clinx Chemiscope 2850 荧光及化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.3 细胞

人肝癌细胞(HepG2, SMMC-7721 及 Bel-7402)购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法

2.1 细胞培养

SMMC-7721、Bel-7402 细胞用 DMEM 高糖培养基,HepG2 细胞用 RPMI-1640 培养基(培养基中含体积分数 10% 的新生牛血清,100 IU/mL 青霉素以及 100 IU/mL 链霉素),细胞置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 姜黄油对细胞增殖的影响

姜黄油对 SMMC-7721、Bel-7402 以及 HepG2 细胞生长的抑制作用采用 MTT 法进行检测。根据文献[7]所述,取对数生长期的细胞,消化后用完全培养液调整浓度为每毫升 8×10^4 个,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,置于培养箱内培养 12 h 后,吸弃上清液,给药组每孔加入梯度浓度的加药培养基(3% 新生牛血清,1% 双抗)200 μ L,空白对照组只加完全培养基,各组均设 6 个复孔。培养 24 h、48 h 或 72 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μ L,继续培养 4 h 后弃去培养液,每孔加入 DMSO 150 μ L,于 570 nm 波长处测各孔吸收度(A)。计算相应浓度的药物对肿瘤细胞增殖的抑制率,应用 SPSS 软件计算药物的 IC₅₀。

2.3 姜黄油对肝癌细胞凋亡率的影响

分别用 20,40,80 μ g/mL 姜黄油处理 Bel-7402 细胞 48 h,同时设定溶剂对照组(DMSO,终浓度小于 0.05%),每组设 3 个复孔,胰酶消化后,收集细胞用 Annexin V、PI 避光室温孵育 15 min 后,于流式细胞仪检测。

2.4 线粒体膜电位检测

分别用 20,40,80 μ g/mL 姜黄油处理 Bel-7402

细胞 48 h,同时设定溶剂对照组(DMSO,终浓度小于 0.05%),每组设 3 个复孔,用线粒体膜电位检测试剂盒中 JC-1 染色工作液 37℃ 避光孵育 20 min,JC-1 染色缓冲液洗 2 次后用流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化。

2.5 Western blot 检测

分别用 20,40,80 μ g/mL 姜黄油处理 Bel-7402 细胞 48 h,同时设定溶剂对照组(DMSO,终浓度小于 0.05%)。PBS 洗 2 次后培养瓶置于冰上,分别应用细胞裂解液或线粒体提取试剂盒裂解细胞或提取线粒体,BCA 试剂盒测定样品蛋白含量,蛋白定量后分别取蛋白 80 μ g 加入上样缓冲液,95℃ 变性 10 min。8%~12% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭后依次加入相应的一抗 4℃ 孵育过夜。隔天,用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min;再加入 HRP 标记的二抗体以结合一抗,室温孵育 2 h。TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min。加入化学发光试剂后用凝胶成像系统拍照成像。目的蛋白的灰度除以内参 β -actin 的灰度以校正误差,所得结果代表样品的目的蛋白相对含量。

2.6 数据分析

以上每组实验及检测均重复 3 次以上,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间显著性比较,样本均数间的比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 姜黄油对细胞增殖的影响

3 种肝癌细胞经不同浓度的姜黄油或顺铂作用后,细胞的增殖均受到不同程度的抑制,并呈剂量及时间依赖性,72 h 时对人肝癌细胞株 Bel-7402、HepG2、SMMC-7721 细胞的 IC₅₀ 分别为 41.2,58.8,66.2 μ g/mL,结果显示姜黄油对 Bel-7402 细胞抑制活性最强。相同培养条件下,阳性药顺铂对人肝癌细胞株 Bel-7402 细胞在 72 h 的 IC₅₀ 为 9.56 μ g/mL。

3.2 姜黄油对肝癌细胞凋亡的影响

Bel-7402 细胞经不同质量浓度(20,40,80 μ g/mL)的姜黄油作用 48 h 后,数据显示随着姜黄油质量浓度的增加,与空白对照组相比,细胞凋亡率也随之增加(图 1)。

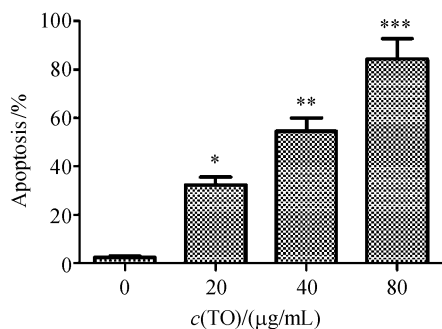


Figure 1 Turmeric oil (TO) induces Bel-7402 cell apoptosis
The Bel-7402 cells were treated with turmeric oil (20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h. Apoptosis was determined by FITC-Annexin V/PI staining by flow cytometry

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs drug untreated group

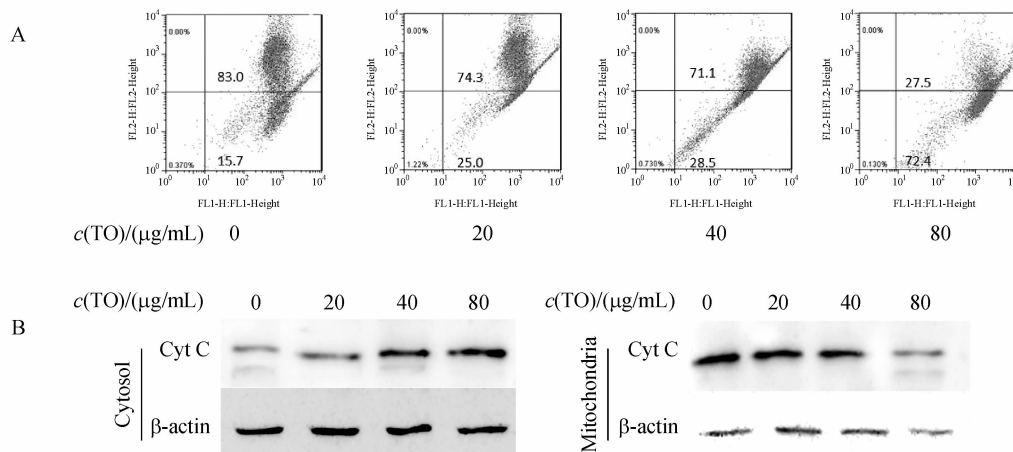


Figure 2 Turmeric oil (20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$) induces decrease in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cytochrome C (Cyt C) release in Bel-7402 cells after treated for 48 h

A: $\Delta\Psi_m$ was detected using JC-1 staining and analyzed by flow cytometric. Percentage of bottom right quadrant and top right quadrant represent $\Delta\Psi_m$ decrease; B: Western blot assay was used to examine cytosolic CytC and mitochondrial CytC expression

4 讨论

本实验采用相同浓度梯度的姜黄油分别作用于人肝癌细胞 SMMC-7721、Bel-7402 及 HepG2 细胞,比较药物对 3 种细胞株增殖的抑制作用。实验结果表明,姜黄油对 3 种肝癌细胞的抑制作用呈现一定的时间及剂量依赖性,对 Bel-7402 细胞抑制活性最强,因此选入肝癌 Bel-7402 细胞为研究对象,考察 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ 3 个浓度的姜黄油对 Bel-7402 细胞增殖的抑制作用。

诱导细胞凋亡是消除肿瘤细胞的一个重要机制。线粒体是细胞凋亡的调控中心^[8],线粒体膜电位下降在线粒体介导的凋亡中被认为是典型的

3.3 姜黄油对肝癌细胞线粒体膜电位及细胞色素 C 释放的影响

用 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的姜黄油作用 48 h 后,第 4 象限低荧光部分细胞所占百分比分别为 25.0%, 28.5% 和 72.4% (图 2-A),表明随着姜黄油化合物浓度增加,线粒体膜电位降低幅度加大。同时细胞浆中细胞色素 C 含量升高,而线粒体中的细胞色素 C 含量减少 (图 2-B)。

3.4 姜黄油对凋亡相关蛋白的影响

Western blot 方法检测线粒体凋亡通路相关蛋白的表达。结果表明,姜黄油作用于细胞后,细胞内 Bax 与 Bcl-2 之比升高,并促使细胞色素 C 的释放,激活 caspase-9 和 caspase-3,进而诱导细胞凋亡 (图 3)。

现象^[9]。线粒体膜电位的下降会触发细胞色素 C 由线粒体释放至胞浆,而细胞色素 C 从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤^[10]。释放到胞浆的细胞色素 C 在 dATP 存在的条件下能与凋亡相关因子 1 (Apaf-1) 结合,使其形成多聚体,并促使 caspase-9 与其结合形成凋亡小体, caspase-9 被激活。被激活的 caspase-9 能进一步激活 caspase-3,从而诱导细胞凋亡^[11]。实验结果表明,随着姜黄油给药剂量及给药时间的递增,凋亡的肿瘤细胞数量也逐渐增加。通过线粒体膜电位的检测发现,姜黄油能降低线粒体的膜电位。蛋白检测结果显示姜黄油能调节相关蛋白的表达,使 Bax 与 Bcl-2 的比值升高,并促使细胞色素 C 的释放激活 Caspase 途径,

最终导致细胞凋亡。

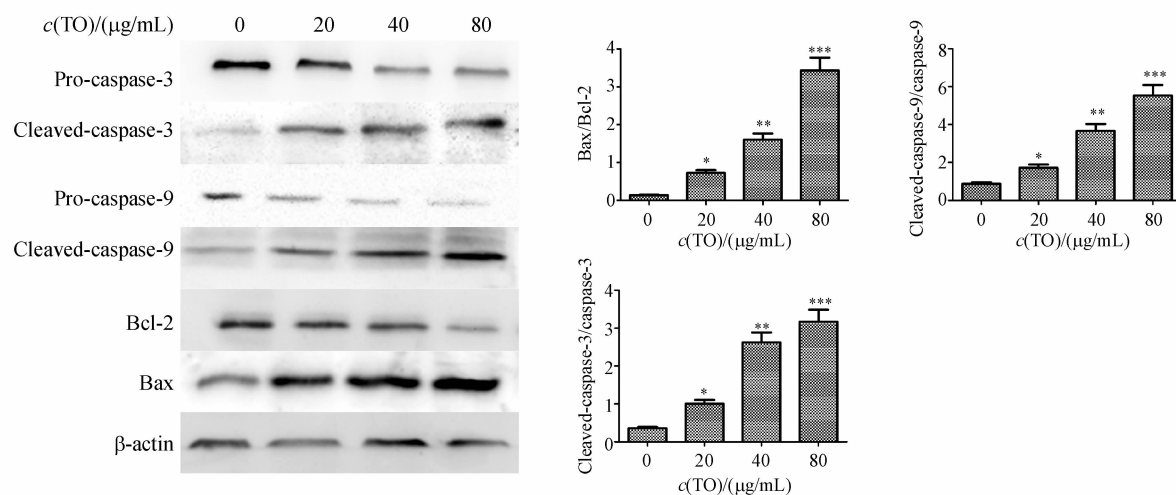


Figure 3 Expression of apoptosis-related proteins in Bel-7402 cells treated with turmeric oil for 48 h by Western blot assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs untreated group

本研究初步证明了姜黄油对肿瘤细胞的诱导凋亡作用,这可能是其抗肿瘤的作用机制之一,为深入探索姜黄油的抗肿瘤作用提供了实验依据,同时为寻找高效低毒的天然抗肿瘤药物开辟新的途径。

参考文献

- [1] Jayaprakasha GK, Negi PS, Anandharamakrishnan C, *et al.* Chemical composition of turmeric oil – a byproduct from turmeric oleoresin industry and its inhibitory activity against different fungi [J]. *Z Naturforsch C*, 2001, **56**(1/2): 40 – 44.
- [2] Jayaprakasha GK, Jena BS, Negi PS, *et al.* Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: a byproduct from curcumin production [J]. *Z Naturforsch C*, 2002, **57**(9/10): 828 – 835.
- [3] Lee Y. Activation of apoptotic protein in U937 cells by a component of turmeric oil [J]. *BMB Rep*, 2009, **42**(2): 96 – 100.
- [4] Zhao Z, Wen D, Wei L, *et al.* A study on the mechanisms of anti-mutagenesis of turmeric oil [J]. *Carcinog Teratog Mutag* (癌变·畸变·突变), 1999, **11**(2): 75 – 77.
- [5] Sun X, Zheng Y, Li D, *et al.* *In vivo* studies on anti-tumor effects

of the emulsion injection extracted from turmeric volatile oil and active constituents [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2008, **24**(7): 976 – 977.

- [6] Ling J, Wei B, Lv G, *et al.* Anti-hyperlipidaemic and antioxidant effects of turmeric oil in hyperlipidaemic rats [J]. *Food Chem*, 2012, **130**(2): 229 – 235.
- [7] Olie RA, Simões-Wüst AP, Baumann B, *et al.* A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2000, **6**(1): 2 805 – 2 809.
- [8] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, **4**(2): 139 – 163.
- [9] Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in apoptosis; an update [J]. *Apoptosis*, 2003, **8**(2): 115 – 128.
- [10] Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, *et al.* Toxic proteins released from mitochondria in cell death [J]. *Oncogene*, 2004, **23**(16): 2 861 – 2 874.
- [11] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade [J]. *Cell*, 1997, **91**(4): 479 – 489.