

氧化应激在姜黄素诱导肺癌细胞凋亡中的作用

林 妙¹, 姚庆华², 汪玉琪², 陈良良²

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘 要: [目的] 探讨姜黄素诱导肺癌 A549 细胞凋亡中氧化应激的作用。[方法] 将不同浓度 (5~40 μM) 的姜黄素作用于肺癌细胞株 A549 细胞, 以 MTT 法检测姜黄素不同浓度 (5~40 μM) 在不同时间点 (3、6、12、24、48 h) 对 A549 细胞的抑制增殖率, 流式细胞术检测细胞凋亡率; DCFH-DA 探针染色流式检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的变化, 硫代巴比妥酸法检测丙二醛 (malondialdehyde, MDA), Western blot 检测 Bcl-2、Bax 和 HSP70 的表达。[结果] 20 μM 姜黄素作用细胞 12h 和 24h 时, 细胞增殖抑制率分别为 32.17% 和 52.16%。姜黄素对 A549 细胞的生长抑制作用呈剂量和时间依赖性。A549 细胞凋亡率和坏死率随着姜黄素的浓度增高而增加。经姜黄素处理后, 细胞内活性氧显著性降低, 丙二醛活性下降, HSP70 活性下降, Bax/Bcl-2 比值增高。[结论] 姜黄素可调节肺癌细胞内氧化还原状态, 从而促进肿瘤细胞凋亡。

关键词: 姜黄素; 肺癌; 凋亡; 氧化应激; 热休克蛋白 70

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2015)03-0229-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.03.A013

Role of Oxidative Stress on Curcumin Induced Lung Cancer Cell Apoptosis

LIN Miao¹, YAO Qing-hua², WANG Yu-qi², et al.

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of curcumin on the proliferation and apoptosis in A549 lung cancer cells. [Methods] Different concentrations (5~40 μM) of curcumin treated with A549 cells in different times (3, 6, 12, 24, 48h). The cell viability was determined by MTT assay. The apoptosis was detected by flow cytometry. The level of reactive oxygen species (ROS) was determined with DCFH-DA by flow cytometry, and malondialdehyde (MDA) was detected by malondialdehyde barbituric acid method. Bcl-2, Bax, HSP70 activity was assayed by Western blot. [Results] 20 μM curcumin treated with cell for 12h and 24h, the cell proliferation inhibition rate was 32.17% and 52.16%, respectively. The inhibitory effect of curcumin on A549 cells was in a dose- and time-dependent manner. Apoptosis and necrosis rate of A549 cells increased with concentration of curcumin. After curcumin treated, intracellular ROS significantly reduced, MDA activity declined, then HSP70 activity declined, Bax/Bcl-2 ratio increased. [Conclusion] Curcumin could regulate intracellular REDOX state and promote the tumor cell apoptosis in lung cancer.

Key words: curcumin; lung cancer; apoptosis; oxidative stress; heat shock protein 70

近年来, 肺癌发生率不断攀升^[1], 对肿瘤的研究也在不断地深入。细胞信号转导与肿瘤的发生发展和复发转移密切相关。活性氧簇是信号转导途径之一, 不仅参与肿瘤发生, 而且参与调控肿瘤的生长、分化、迁移和凋亡^[2]。

姜黄素是从中药姜黄的根茎中提取的一种天然酚类色素, 其抗肿瘤作用近年来备受关注。既往研究多集中在细胞凋亡和 DNA 复制等方面^[3,4], 从氧化损伤角度的研究还相对较少。抗炎和抗氧化是姜黄素一个重要的药理作用, 在预防由氧自由基介导的肿瘤发生中发挥着重要的作用^[5]。而热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 是体内应激状态下表

收稿日期: 2014-10-17; 修回日期: 2014-11-12

通讯作者: 陈良良, E-mail: cllzjh@163.com

达的一类细胞内源性保护蛋白,在应激状态下如热休克、氧化应激等作用下表达增多,通过参与 Bcl-2 家族癌基因调控肿瘤细胞凋亡功能。本研究旨在探讨姜黄素诱导肺癌 A549 细胞凋亡中氧化应激状态、HSP70 水平的调节与细胞抑制、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

姜黄素($C_{21}H_{20}O_6$)购自 Sigma 公司,分子质量 368.38,以二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成 100mM 储存液,置于 -20°C 避光保存。二甲基亚砜(DMSO)、MTT 均购自 Promega 公司,RPMI1640 购自 Thermo 公司;Bcl-2、Bax、HSP70 抗体购自 CST 公司。丙二醛试剂盒和 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。碘化丙啶(PI)、AnnexinV-FITC 购自 BD 公司。

1.2 细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞株购自中国科学院上海细胞中心。将 A549 细胞接种于 10cm 细胞培养皿中,加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液,于 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养,2~3d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

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,胰酶消化收集,以 2.0×10^4 /孔的密度接种于 96 板中,培养 24h 后,加入含不同浓度(5、10、20、40 μM)的姜黄素培养液 100 μl 继续培养。按姜黄素浓度分为 4 组,每组设 3 个复孔。同时设阴性对照组和空白对照组。在各时间段(3、6、12、24、48h)结束后,弃培养液,每孔加 MTT 工作液(MTT 液:培养基=1:9 配制)100 μl ,培养 30min 结束后,酶标仪 490nm 处测定各孔 OD 值。计算药物对细胞增殖的抑制率(%)=[1-(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值)] $\times$ 100%。

1.4 流式细胞仪结合 PI 及 AnnexinV-FITC 双标记染色测定细胞凋亡

选取生长对数期的细胞,以 50×10^4 /孔接种于 60mm 培养皿中,培养 24h 后,分别加入姜黄素(5~40 μM) 处理各组细胞,于不同时间点离心收集,用

PBS 洗涤 2 次,1 $\times$ binding buffer 100 μl 重悬细胞,分别加入 AnnexinV-FITC 和 PI 各 5 μl ,室温避光孵育 15min,再加入 1 $\times$ binding buffer 400 μl ,在 1h 内上机检测。

1.5 检测细胞中活性氧和丙二醛的活性

活性氧(reactive oxygen species,ROS) 是需氧细胞在代谢过程中产生的一系列活性氧簇,是氧化应激的一个重要指标;丙二醛(malondialdehyde,MDA) 是脂质过氧化终产物之一,常作为判断脂质过氧化的指标。活性氧导致的氧化应激是细胞凋亡中的一个重要环节,ROS 水平的变化引发氧化还原反应,进一步影响 MDA 水平的变化,最终诱发细胞凋亡。本实验中用荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 水平。无血清 RPMI1640 培养液稀释制备 10 μM 浓度的 DCFH-DA 工作液。姜黄素处理的各组细胞收集后悬浮于 1ml DCFH-DA 工作液中, 37°C 培养箱避光孵育 30min,每 3~5min 震荡混匀 1 次。PBS 洗涤 3 次,1mlPBS 重悬细胞后在 1h 内上流式细胞仪检测。

取对数生长期 A549 细胞,给予不同浓度姜黄素处理细胞后,获取蛋白样品与 Western blot 方法相同,BCA 法检测样本蛋白浓度后,按照各自说明书方法和操作要求,硫代巴比妥酸法检测 MDA 活性。

1.6 Western blot 检测 Bax、Bcl-2 和 HSP70 活性

不同浓度姜黄素处理 A549 细胞后,胰酶消化、收集细胞。加 PBS 制备成 1×10^6 /ml 细胞悬液,置于冰浴中,用超声细胞仪破碎细胞,功率 300W,超声 20s,间隔 20s,反复 5~6 次,显微镜下观察细胞破碎情况,制成的蛋白样品用 BCA 法检测样本蛋白浓度后冻存于 -80°C 冰箱内待测。蛋白定量后,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10min 变性,每个泳道上蛋白样品 20 μg ,经 10%聚丙烯酰胺凝胶 SDS-PAGE 电泳后,在半干转膜仪中将蛋白转移至 PVDF 膜上;5%脱脂牛奶室温封闭 2h,TBST 洗膜,再用含 5%脱脂牛奶的 TBST 按试剂说明进行适当的一抗稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗膜后辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5000) 37°C 孵育 1h,TBST 洗膜,采用 ECL 法对目的条带进行发光, β -actin 作为内参照。用 Gel-Pro_analyzer 软件分析各条带的 A 值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.5 统计学软件,组间比较采用单因素方差分析或配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 姜黄素抑制 A549 肺癌细胞增殖

低浓度姜黄素(5~10 μ M)作用肿瘤细胞短时间(3~6h)内,与对照组相比,对细胞的增殖抑制并不明显,20 μ M 姜黄素作用细胞 12h 时,细胞增殖抑制率约为 32.17%;20 μ M 姜黄素作用 24h 后,细胞增殖抑制率为 52.16%($t=4.464$, $P=0.0459$),对细胞生长有明显的抑制作用。与对照组相比 40 μ M 姜黄素作用 48h 后细胞增殖抑制率达到 70.93%($t=16.47$, $P=0.0098$)(Figure 1)。可见姜黄素对 A549 细胞的生长抑制作用呈剂量和时间依赖性。

2.2 姜黄素诱导 A549 细胞凋亡

不同浓度(5~40 μ M)姜黄素作用于 A549 细胞 24h 后的凋亡率、坏死率及存活细胞率详见 Table 1。

Table 1 The apoptosis and necrosis rate of curcumin on A549 cell

Curcumin (μ M)	A549 cells		
	Apoptosis cells (%)	Necrosis cells (%)	Viable cells (%)
0	2.93 $\pm$ 0.89	2.36 $\pm$ 0.96	94.35 $\pm$ 0.57
5	10.12 $\pm$ 1.13	6.51 $\pm$ 0.82	78.83 $\pm$ 0.37
10	14.25 $\pm$ 0.74	7.97 $\pm$ 1.35	62.79 $\pm$ 0.41
20	36.64 $\pm$ 0.71**	9.97 $\pm$ 2.42	50.02 $\pm$ 0.78
40	44.72 $\pm$ 1.64*	15.52 $\pm$ 0.54	38.64 $\pm$ 1.98

与对照组相比,低浓度(5、10 μ M)姜黄素作用于肿瘤细胞 24h,只有少量凋亡和坏死。当姜黄素浓度为 20 μ M 时,细胞凋亡大量增加,凋亡率为(36.64 $\pm$ 0.71)%($P<0.05$),坏死率为(9.97 $\pm$ 2.42)%,存活细胞较对照组减少。当药物浓度达到 40 μ M 时,细胞凋亡为(44.72 $\pm$ 1.64)%($P<0.01$),坏死细胞为(15.25 $\pm$ 0.54)%,存活细胞进一步减少。表明姜黄素诱导 A549 细胞凋亡作用具有浓度依赖性,凋亡率和坏死率随着姜黄素的浓度增高而增加。

2.3 姜黄素处理后细胞内活性氧水平和 MDA 变化

在低浓度(5、10 μ M)姜黄素处理 A549 细胞 24h 后,ROS 水平并没有明显下降,而随着浓度的增加 ROS 产生量迅速下降,高浓度组(20、40 μ M)比对照组下降了 36.8%和 51.37%(t 值分别为 16.11 和 12.20, P 均 <0.05)(Figure 3)。

不同浓度姜黄素处理细胞 24h 后,20 μ M 姜黄素组相比对照组的 MDA 降低了 1.37nmol/mg ($t=11.31$, $P<0.05$),40 μ M 姜黄素组 MDA 则降低 1.47 nmol/mg ($t=9.82$, $P<0.05$)(Figure 2)。

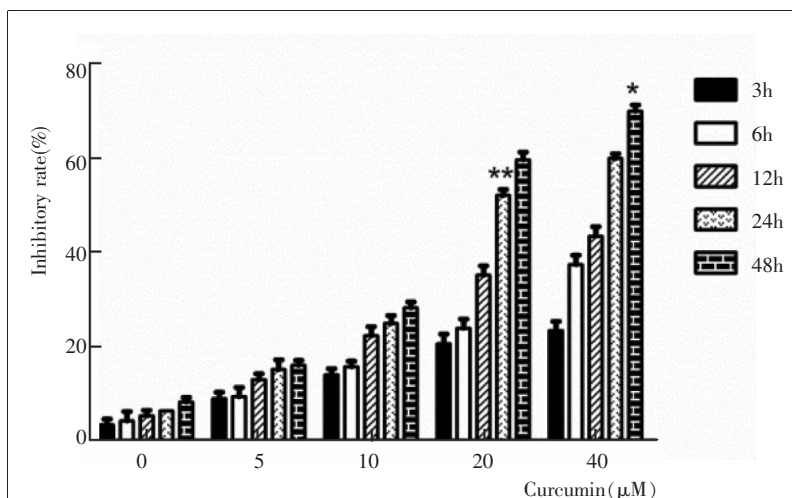


Figure 1 The inhibitory rate of curcumin on A549 cell

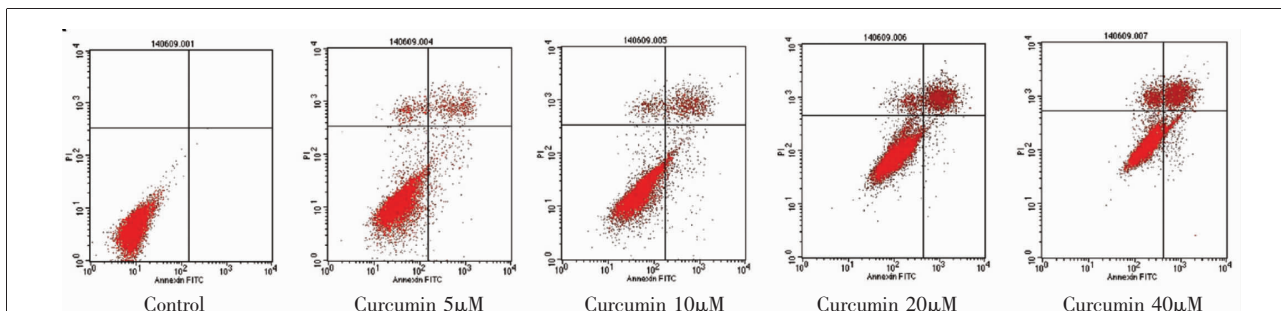


Figure 2 The apoptosis of curcumin on A549 cell

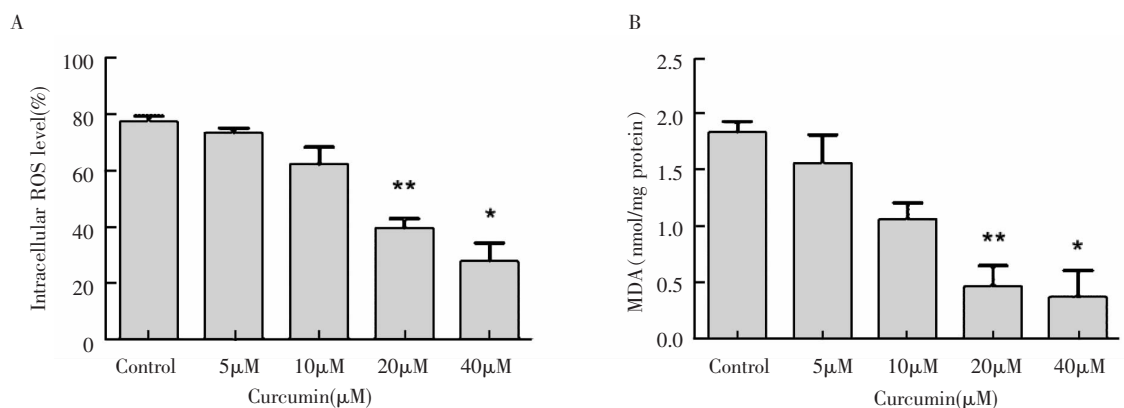


Figure 3 The ROS and MDA level of curcumin on A549 cell

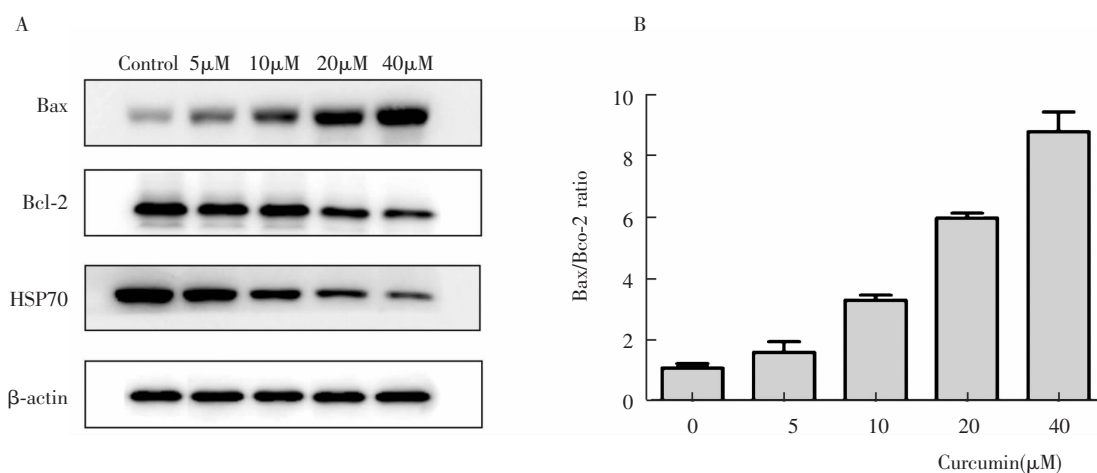


Figure 4 The Bax、Bcl-2、HSP70 protein level of curcumin on A549 cell

2.4 姜黄素对 HSP70、Bcl-2 家族蛋白表达的影响

随着姜黄素浓度的增加,热休克蛋白 HSP70 的表达也下调,促凋亡蛋白 Bax 水平明显上调,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平则明显下调(Figure 4)。Bax/Bcl-2 也随着浓度的增加而增大,对照组 Bax/Bcl-2 比值为 0.891%, 20 μM 姜黄素组则为 5.96%, 40 μM 组为 8.79%,与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。说明姜黄素可以调节细胞内氧化应激状态从而致使 HSP70 表达降低, Bcl-2 表达下调, Bax 表达上调,致使 A549 细胞发生凋亡。

3 讨论

中药治疗是我国传统医学中的重要治疗手段之一。姜黄素是从姜黄中提取的一种酚类物质,具有多

种药效,如抗炎、抗氧化、抗诱变、抗凝、降血脂、抗动脉硬化、抗肿瘤和抗突变等作用。研究表明,姜黄素具有潜在的抗肿瘤效果,可以抑制多种肿瘤的转化、增殖、转移和血管生成,增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。近年的大量文献都证明姜黄素在体内外实验中都能够抑制多种肿瘤细胞生长增殖,诱导肿瘤细胞凋亡。姜黄素可以抑制 HT-29 结肠癌细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞、人胃癌 SGC-7902 等细胞增殖^[6,7]。可见姜黄素具有广泛的抗肿瘤作用。为此,本实验研究姜黄素在诱导肿瘤细胞凋亡过程中氧化应激的作用。

氧化应激是正常机体内即存在的一种不可避免的状态。机体在遭受各种有害刺激时,体内高活性分子如活性氧自由基(ROS)和活性氮自由基(RNS)产生过多,平衡被打破,从而通过线粒体、死亡受体、内质网应激等途径来介导细胞凋亡甚至组织损伤^[8]。

可见氧化应激和细胞凋亡是密切相关的。生理状态下的 ROS 可调控细胞增殖：当细胞内 ROS 量超过一定阈值,ROS 可抑制细胞周期,更高浓度的 ROS 则可导致 DNA 断裂、细胞凋亡、坏死^[9]。通常肿瘤细胞内维持着较高的氧化状态,表现为较高水平的氧自由基和较低水平的抗氧化酶活性。这种较高的氧化状态,可激活如 NF- κ B 和 API 等敏感的转录因子和相关基因,从而确保肿瘤细胞的生存、增殖以及迁移。本文结果发现,姜黄素可降低 ROS 水平,从而进一步抑制了脂质过氧化物 MDA 的产生。这种改变抑制了 HSP70 的活性,却激活 Bcl-2 族基因 Bax/Bak 表达,凋亡前体蛋白激活了凋亡通路,最终产生细胞凋亡。

热休克蛋白是由于热休克激发染色体内基因转录合成特异性的蛋白,而在应激状态时表达增多的一类细胞内源性保护蛋白,其中 HSP70 是热休克蛋白家族中最重要的成员之一,与肿瘤细胞凋亡有着密切的联系。HSP70 在恶性肿瘤细胞中高水平表达,可以通过基因调解以及免疫应答来发挥抗肿瘤细胞凋亡作用。研究表明 HSP70 在应激状态下如热休克、氧化应激等作用下可表达增多,从而对通过参与 Bcl-2 家族癌基因肿瘤细胞凋亡功能的调控。HSP70 作为“分子伴侣”,引起 Bcl-2 家族中 Bax 基因发生构象变化,通过抑制 JNK(应激活化蛋白激酶)介导的 Bcl-2 家族基因的磷酸化来阻止细胞凋亡。Stankiewicz 等^[10]的研究中表明,HSP70 阻断热诱导凋亡主要是通过抑制 Bax 的活性,从而来保护线粒体内凋亡起始因子的释放^[10]。

综上所述,姜黄素可以通过调节氧化还原状态,抑制 HSP70 的表达来促使 A549 肺癌细胞凋亡。其主要是降低细胞内的 ROS 水平,降低 MDA 水平来抑制 HSP70 蛋白的表达,升高 Bax/Bcl-2 比值,最终使细胞产生凋亡。本研究只是对姜黄素诱导 A549 细胞凋亡作出一点探讨,目前姜黄素对肺癌细胞内信号通路的影响及其诱导肺癌凋亡的机制仍为完全阐明,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [2] Ranjan AP,Mukerjee A,Helson L,et al. Efficacy of liposomal curcumin in a human pancreatic tumor xenograft model;inhibition of tumor growth and angiogenesis[J].Anticancer Res,2013,33(9):3603-3609.
- [3] Ogiwara H,Ui A,Shiotani B,et al. Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor[J]. Carcinogenesis,2013,34(11):2486-2497.
- [4] Cao AL,Tang QF,Zhou WC,et al. Ras/ERK signaling pathway is involved in curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells [J]. J Asian Nat Prod Res,2014,10:1-8.
- [5] Iqbal M,Okazaki Y,Okada S. Curcumin attenuates oxidative damage in animals treated with a renal carcinogen,ferriic nitrilotriacetate(Fe-NTA);implications for cancer prevention[J]. Mol Cell Biochem,2009,324 (1-2):157-164.
- [6] Zhou QM,Chen QL,Du J,et al. Synergistic effect of combinatorial treatment with curcumin and mitomycin C on the induction of apoptosis of breast cancer cells;a cDNA microarray analysis[J].Int J Mol Sci,2014,15(9):16284-16301.
- [7] Xue X,Yu JL,Sun DQ,et al.Curcumin induces apoptosis in SGC-7901 gastric adenocarcinoma cells via regulation of mitochondrial signaling pathways [J].Asian Pac J Cancer Prev,2014,15(9):3987-3992.
- [8] Kaushik G,Kaushik T,Yadav SK,et al.Curcumin sensitizes lung adenocarcinoma cells to apoptosis via intracellular redox status mediated pathway[J]. Indian J Exp Biol,2012,50(12):853-861.
- [9] Trachootham D,Lu W,Ogasawara MA,et al. Redox regulation of cell survival [J]. Antioxid Redox Signa,2008,10(8):1343-1374.
- [10] Stankiewicz AR,Livingstone AM,Mohseni N,et al.Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by HSP70[J]. Cell Death Differ,2009,16(4):638-647.