

# 姜黄素通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ 预防大鼠大肠癌变的实验研究

刘留宾 段长农 马增翼 许 刚

**摘要** **目的** 探讨姜黄素对二甲基肼(DMH)诱导的大鼠大肠癌发生的防治作用及其机制。**方法** Wistar大鼠按随机数字表法分为模型组(20只)和姜黄素组(20只),同时设正常对照组(10只)。应用DMH 20 mg/kg皮下注射诱导制备大鼠大肠癌模型。计算各组大鼠大肠肿瘤的诱癌率及抑制率;利用免疫组化和Western blot方法观察姜黄素对大鼠大肠黏膜组织过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ )表达的影响。培养人结肠癌HT 29细胞株,分为正常对照组、姜黄素加2-氯-5-硝基-N-苯基苯酰胺(GW9662)干预组和姜黄素组。采用MTT法检测不同浓度姜黄素对人结肠癌HT 29细胞株生长的抑制作用,Western blot方法检测姜黄素对人结肠癌HT 29细胞株PPAR $\gamma$ 表达的影响。**结果** 模型组大鼠诱癌率为80.00%(12/15),明显高于姜黄素组58.82%(10/17)( $P < 0.05$ ),姜黄素对DMH诱导的大鼠大肠癌的抑制率达26.46%。与正常对照组比较,模型组和姜黄素组PPAR $\gamma$ 表达均明显增强( $P < 0.01$ );与模型组同期比较,姜黄素组PPAR $\gamma$ 表达亦明显增强( $P < 0.05$ )。MTT实验表明姜黄素可以抑制体外培养人结肠癌细胞株HT 29的增殖,且呈剂量和时间依赖性。与对照组比较,GW9662干预组及姜黄素组PPAR $\gamma$ 表达均增强( $P < 0.01$ );与GW9662干预组比较,姜黄素组PPAR $\gamma$ 表达亦增强( $P < 0.05$ )。**结论** 姜黄素可抑制DMH诱导的大鼠大肠癌的形成,抑制体外培养的大肠癌细胞增殖,这种作用可能是通过激活PPAR $\gamma$ 途径实现。

**关键词** 姜黄素;过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ ;大肠癌;结肠癌细胞株;HT 29

Curcumin Inhibited Rat Colorectal Carcinogenesis by Activating PPAR $\gamma$ : an Experimental Study  
LIU Liu-bin, DUAN Chang-nong, MA Zeng-yi, and XU Gang Department of Gastroenterology, 456 Hospital of the PLA, Jinan (250031), China

**ABSTRACT** **Objective** To explore the chemopreventive effect of curcumin on DMH induced colorectal carcinogenesis and the underlining mechanism. **Methods** Totally 40 Wistar rats were divided into the model group and the curcumin group by random digit table, 20 in each group. Meanwhile, a normal control group was set up ( $n = 10$ ). A colorectal cancer model was induced by subcutaneously injecting 20 mg/kg DMH. The tumor incidence and the inhibition rate were calculated. The effect of curcumin on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in rat colon mucosal tissues was observed using immunohistochemistry and Western blot. HT 29 cell line were cultured and divided into a control group, the curcumin + GW9662 (2-chloro-5-nitro-N-4-phenylbenzamide) intervention group, and the curcumin group. The inhibition of different concentrations curcumin on HT 29 cell line was detected using MTT. The expression of curcumin on PPAR $\gamma$  was also detected using Western blot. **Results** The tumor incidence was 80.00% (12/15 cases) in the model group, obviously higher than that of the curcumin group (58.82%, 10/17 cases,  $P < 0.05$ ). The inhibition rate of curcumin on DMH induced colorectal carcinoma reached 26.46%. Compared with the normal control group, the expression of PPAR $\gamma$  protein was significantly increased in the curcumin group and the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group at the same time point, the expression of PPAR $\gamma$  protein was significantly enhanced in the

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No. 2009ZRB01346)

作者单位:解放军第456医院消化内科(济南 250031)

通讯作者:许刚, Tel: 0531-51653803, E-mail: 395110516@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.04.0471

curcumin group ( $P < 0.05$ ). MTT analysis showed that curcumin could inhibit the proliferation of *in vitro* HT 29 cells in dose and time dependent manners. The expression of PPAR $\gamma$  protein was significantly increased in the GW9662 group and the curcumin group, showing statistical difference when compared with the normal control group ( $P < 0.01$ ). Compared with the GW9662 group, the expression of PPAR $\gamma$  protein was significantly increased in the curcumin group ( $P < 0.01$ ). Conclusion Curcumin could inhibit DMH-induced rat colorectal carcinogenesis and the growth of *in vitro* cultured HT 29 cell line, which might be achieved by activating PPAR $\gamma$  signal transduction pathway.

**KEYWORDS** curcumin; peroxisome proliferator-activated receptor gamma; colorectal cancer; colon cancer cell line; HT 29

大肠癌是一种发病率和病死率较高的恶性肿瘤,其发病率呈不断增高的趋势<sup>[1]</sup>。选择安全有效的化学预防剂是大肠癌防治研究的重点。既往研究发现,姜黄素能够抑制大肠癌、肝癌细胞的增殖、诱导细胞凋亡,具有预防大肠癌发生的作用<sup>[2,3]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ ) 是核激素受体超家族成员,在脂肪细胞分化、代谢、炎症反应及细胞凋亡调节中发挥重要作用<sup>[4-8]</sup>。研究表明 PPAR $\gamma$  参与调控结肠上皮细胞周期和细胞分化,从而发挥抗肿瘤作用<sup>[9-11]</sup>。本实验分别从动物水平和细胞水平探讨姜黄素对大肠癌的防治作用是否通过调控 PPAR $\gamma$  途径而实现。

## 材料与方法

1 动物 50 只,雄性 Wistar 大鼠,SPF 级,6 ~ 8 周龄,体重 173 ~ 180 g,购于山东大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK 20090001,实验动物使用许可证号:SYXK (鲁) 20100011。

2 药物 姜黄素 (curcumin) 购自美国 Sigma 公司 (批号:C7727)。

3 主要试剂及仪器 二甲基胍 (DMH) (Sigma, D161608); GW9662 (Sigma, M6191); RPMI1640 (GIBCO 公司, 1313945); 胎牛血清 (Hyclone 公司, 10100-147-FBS); 兔抗鼠 PPAR $\gamma$  单克隆抗体 (Santa Cruz 公司, sc-7196); 鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司, sc-130301); 鼠抗人 PPAR $\gamma$  单克隆抗体 (Santa Cruz 公司产品, sc-7273); 辣根过氧化物酶标记二抗 (GenScript Corporation 金思特科技有限公司产品, 羊抗兔 hx9201, 羊抗鼠 hx9301); 人结肠癌 HT 29 细胞株 (购自南京凯基药物筛选中心); CO $_2$  细胞培养箱 (日本 SANYO 公司); Multiskan FC 酶标仪 (美国 Thermo SCIENTIFIC 公司); Minispin 离心机 (德国 EPPENDORF 公司); FluorChem Q 化学发光成像系统 (美国 Cell BioSciences 公司); 生物洁净工作

台 (苏州安泰空气技术有限公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus IX53-A21PH)。

4 动物模型的制备、分组及给药方法 参照文献 [12]。利用二甲基胍 (DMH) 诱导大鼠大肠癌模型。40 只大鼠按随机数字表法分为模型组 (20 只) 和姜黄素组 (20 只), 同时设正常对照组 (10 只)。模型组给予标准固体饲料加 DMH, 姜黄素组给予含 0.2% 姜黄素的固体饲料加 DMH, DMH 给药方法为 20 mg/kg 体重, 皮下注射, 1 周 1 次, 每周称重 1 次以调整 DMH 的用量, 持续 18 周。正常对照组给予标准固体饲料加皮下注射与 DMH 等体积的生理盐水。然后各组大鼠给予标准固体饲料 (姜黄素组加 0.2% 姜黄素) 持续至 32 周。3 组实验周期均为 32 周。大肠癌诱癌率 (%) = 荷瘤动物只数 / 受检动物只数  $\times$  100%; 大肠癌抑制率 (%) = (模型组肿瘤诱癌率 - 实验组肿瘤诱癌率) / 模型组肿瘤诱癌率  $\times$  100%。实验过程中模型组中有 5 只大鼠、姜黄素组 3 只大鼠于 12 周后死亡。

5 大鼠大肠癌组织学观察 模型组和姜黄素组在第 12 周分别取出 10 只大鼠, 检测大肠异常隐窝病灶 (aberrant crypt foci, ACF) 的形成及 PPAR $\gamma$  蛋白的表达。其余大鼠于实验 32 周后剖杀。肉眼正常组织、肿瘤组织各取两块, 一块用于提取细胞蛋白质, 另一块用 4% 中性多聚甲醛固定。组织固定 24 h 后进行组织病理学及免疫组化检查。

6 细胞培养及分组 人结肠癌细胞株 HT 29 常规培养于含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 培养条件为 37  $^{\circ}$ C, CO $_2$  浓度为 5%, 根据细胞生长情况, 每 2 ~ 3 天用 0.25% 的胰酶消化, 进行传代培养。将细胞分为对照组、姜黄素加 2-氯-5-硝基-N-苯基苯酰胺 (GW9662) 干预组、姜黄素组。

7 MTT 法检测细胞生长状态 取处于对数生长期的 HT 29 细胞进行实验。将细胞按  $1 \times 10^4$  / 孔密度接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  条件下培

养。姜黄素和 GW9662 均以 DMSO 溶解,细胞培养液稀释至 10、20、40、80 μmol/L 加于细胞,同时设阴性对照组(加 DMSO 作溶剂)、空白对照(不加细胞)。每组设 3 个复孔。GW9662 提前 30 min 加入。加药培养 12、24、48、72 h 后,每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL, 37 °C 继续孵育 4 h。吸去上清液,每孔加入 DMSO 200 μL, 振荡 10 min 使结晶充分溶解。用酶标仪在 570 nm 波长处测定光吸收值。按公式(细胞存活率 =  $A_{\text{实验孔}} / A_{\text{对照孔}} \times 100\%$ )计算细胞存活率。

**8 Western blot 检测 PPAR $\gamma$  蛋白表达** 组织和细胞总蛋白提取及蛋白质定量按照试剂盒说明操作。所有抽提的蛋白均 -70 °C 保存待测。取 50 μg 细胞总蛋白,10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,以含 5 % 脱脂奶粉的 TBST 液封闭后,加入 1 抗  $\beta$ -actin 抗体(1:2 000)、PPAR $\gamma$  抗体(1:50),4 °C 孵育过夜,洗涤后加入含辣根过氧化物酶标记 2 抗,室温振荡 1 h。ECL 底物化学发光显色后曝光显影。实验重复 3 次。目标条带使用 Furi-FR2980 图像分析系统进行分析,目标蛋白表达量使用  $\beta$ -actin 进行校正。

**9 统计学方法** 采用 SPSS 10.0 统计学软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,若数据符合正态分布方差齐,组间均数比较采用单因素方差分析,多个样本均数间两两比较采用 LSD 检验,非正态分布采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**结 果**

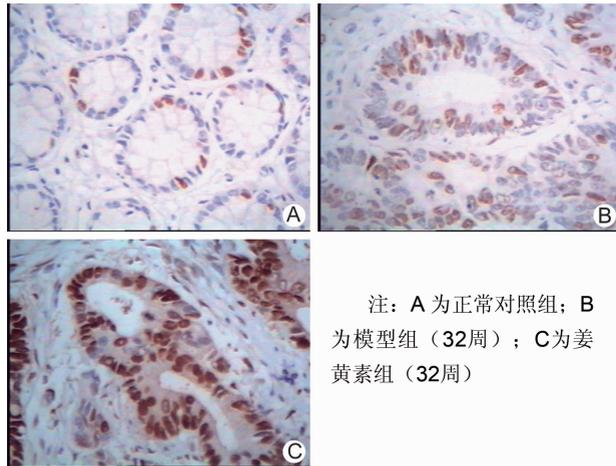
**1 各组大鼠大肠癌诱癌率及抑制率比较(表 1)** 模型组、姜黄素组大鼠大肠癌诱癌率分别为 80.00% (12/15)、58.82% (10/17),姜黄素组大肠癌诱癌率明显低于模型组( $P < 0.05$ )。姜黄素对 DMH 诱导的大鼠大肠癌的抑制率达 26.46%。

**表 1 各组大鼠大肠癌诱癌率及抑制率比较**

组别	n	荷瘤鼠数量 (只)	大肠癌诱癌率 (%)	大肠癌抑制率 (%)
正常对照	10	0	0.00	—
模型	15	12	80.00	—
姜黄素	17	10	58.82*	26.46

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$

**2 各组大鼠大肠组织 PPAR $\gamma$  蛋白表达情况(图 1)** 正常对照组大鼠大肠组织 PPAR $\gamma$  呈较弱表达,DMH 诱导大鼠组织肠上皮细胞 PPAR $\gamma$  表达增强。姜黄素组 PPAR $\gamma$  表达增强,主要集中于细胞核部位。



注: A 为正常对照组; B 为模型组(32周); C 为姜黄素组(32周)

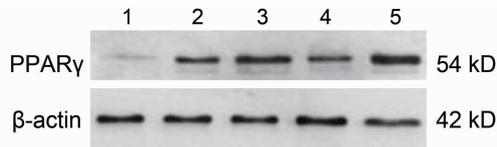
**图 1 各组大鼠大肠组织 PPAR $\gamma$  蛋白表达情况图(免疫组化,  $\times 400$ )**

**3 各组大鼠 PPAR $\gamma$  蛋白表达比较(表 2, 图 2)** 诱癌第 12、32 周时模型组及姜黄素组大肠癌组织 PPAR $\gamma$  蛋白表达均明显高于正常对照组( $P < 0.01$ )。与模型组同期比较,姜黄素组诱癌第 12、32 周 PPAR $\gamma$  表达增强( $P < 0.05$ )。

**表 2 各组大鼠 PPAR $\gamma$  蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	时间	n	PPAR $\gamma$ 蛋白表达
正常对照	第 32 周	10	0.338 $\pm$ 0.082
模型	第 12 周	10	1.156 $\pm$ 0.192*
	第 32 周	5	0.926 $\pm$ 0.162*
姜黄素	第 12 周	10	1.806 $\pm$ 0.089* $\Delta$
	第 32 周	7	1.932 $\pm$ 0.210* $\Delta$

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$



注:1 为正常对照组;2 为模型组(12 周);3 为姜黄素组(12 周);4 为模型组(32 周);5 为姜黄素组(32 周)

**图 2 各组大鼠大肠组织 PPAR $\gamma$  蛋白表达比较图**

**4 不同浓度姜黄素对 HT 29 细胞增殖的影响(图 3)** 结果表明不同浓度的姜黄素(0、10、20、40、60 μmol/L)处理 HT 29 细胞 48 h 后,细胞的生长有明显的抑制作用,并且随着浓度的升高,抑制作用更明显( $IC_{50} = 59 \mu\text{mol/L}$ ),并且随药物作用时间的延长,抑制作用逐渐增强。说明姜黄素可以抑制体外培养的人结肠癌细胞株 HT-29 的增殖,且呈剂量和时间依赖性。

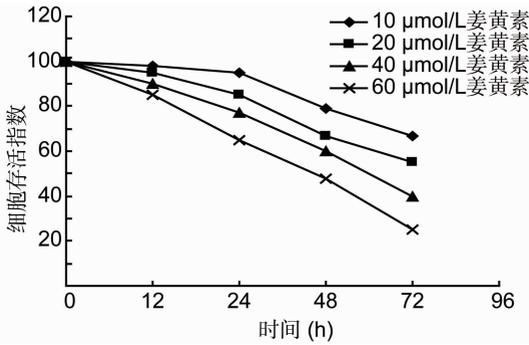


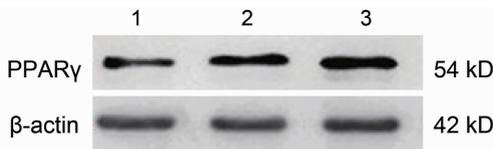
图3 不同浓度姜黄素对 HT 29 细胞增殖的影响

5 各组 HT 29 结肠癌细胞株 PPAR $\gamma$  蛋白表达比较(表 3, 图 4) 与对照组比较, GW9662 干预组 HT 29 结肠癌细胞株 PPAR $\gamma$  表达增强 ( $P < 0.01$ ), 姜黄素组 PPAR $\gamma$  表达亦增强 ( $P < 0.01$ ); 与 GW9662 干预组比较, 姜黄素组 PPAR $\gamma$  表达增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 3 各组 HT 29 结肠癌细胞株 PPAR $\gamma$  蛋白表达相对量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PPAR $\gamma$ 蛋白表达
对照	3	0.745 $\pm$ 0.063
GW9662 干预	3	1.374 $\pm$ 0.102 *
姜黄素	3	1.821 $\pm$ 0.119 * $\Delta$

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 GW9662 干预组比较,  $\Delta P < 0.05$



注: 1 为对照组; 2 为 GW9662 干预组; 3 为姜黄素组

图 4 各组 HT 29 结肠癌细胞株 PPAR $\gamma$  蛋白表达比较图

## 讨 论

本研究前期实验研究证实姜黄素能够抑制 DMH 诱导的大鼠大肠异常隐窝病灶 (ACF) 的形成, 同时研究还证实姜黄素抑制大鼠大肠癌细胞增殖、促进大肠癌细胞凋亡是其有效预防大鼠大肠癌发生的机制之一<sup>[2,3,12]</sup>。本实验证实姜黄素组大肠癌发生率明显低于模型组 ( $P < 0.05$ )。姜黄素对 DMH 诱导的大鼠大肠癌的抑制率达 26.46%。说明姜黄素能够抑制 DMH 诱导的大鼠大肠癌的发生。

PPAR $\gamma$  为配体依赖的核转录因子, 被配体激活后与维甲酸 X 受体 (RXR) 结合形成异源二聚体, 再与 DNA 上 PPAR 反应元件结合, 调控下游靶基因包括 COX-2、NF- $\kappa$ B 等的表达, 从而调节糖脂代谢以及细胞

增殖、分化和凋亡等<sup>[13,14]</sup>。为进一步探讨姜黄素抑制肿瘤细胞生长增殖的机制, 本研究利用免疫组化和 Western blot 法检测 DMH 诱导的大鼠大肠癌细胞 PPAR $\gamma$  的表达。结果显示: 正常对照组大鼠大肠组织 PPAR $\gamma$  呈较弱表达, DMH 诱导后大鼠组织肠上皮细胞 PPAR $\gamma$  表达增强。与模型组比较, 姜黄素组 PPAR $\gamma$  表达明显增强, 主要集中于细胞核部位。说明姜黄素能够激活 PPAR $\gamma$  的活性, 后者进入细胞核调控靶基因的表达。Western blot 结果也显示: 诱癌 12、32 周时模型组及姜黄素组大肠组织 PPAR $\gamma$  蛋白表达均明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 姜黄素组 PPAR $\gamma$  表达增强 ( $P < 0.05$ )。说明姜黄素可能通过促进 PPAR $\gamma$  表达而达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。

本课题进一步从分子水平研究了姜黄素对培养的人结肠癌细胞株 HT 29 生长的影响及其对 PPAR $\gamma$  表达的调控作用。结果发现姜黄素能够抑制 HT 29 细胞的增殖, 且呈剂量和时间依赖性, 随药物浓度的增加和时间的延长, 抑制作用逐渐增强。Western blot 结果显示: 姜黄素使 HT 29 细胞 PPAR $\gamma$  的表达增强, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。应用 PPAR $\gamma$  特异性阻断剂 GW9662 能够部分阻断姜黄素对 HT 29 细胞 PPAR $\gamma$  表达的上调作用。

总之, 本研究从动物和细胞水平深入探讨了姜黄素预防 DMH 诱导的大鼠大肠癌发生的机制, 体内研究发现姜黄素可以通过促进 PPAR $\gamma$  表达而达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。细胞水平研究发现 PPAR $\gamma$  特异性阻断剂 GW9662 能够部分阻断姜黄素对 HT 29 细胞 PPAR $\gamma$  表达的上调作用, 表明了姜黄素可能作为 PPAR $\gamma$  的配体发挥调控作用。

## 参 考 文 献

- [1] Jin H, Tan X, Liu X, et al. The study of effect of tea polyphenols on microsatellite instability colorectal cancer and its molecular mechanism [J]. Int J Colorectal, 2011, 26(3): 395-396
- [2] 许刚, 田克立, 吴战军, 等. 姜黄素和儿茶素联合应用对二甲基胍诱导大鼠大肠癌增殖和凋亡的影响 [J]. 中华消化杂志, 2006, 26(7): 626-627
- [3] 许刚, 张亚历, 田克立, 等. 姜黄素和儿茶素联合预防二甲基胍诱导大肠癌的研究 [J]. 中华消化杂志, 2005, 25(6): 499-500.
- [4] 周香, 游涛, 王维明, 等. 姜黄素联合 FOLFOX 诱导胃癌细胞发生凋亡及其机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(6): 810-813.
- [5] Xu J, Fu Y, Chen A. Activation of peroxisome

- proliferator activated receptor gamma contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285(1): G20-G30.
- [6] Yoshitani SI, Tanaka T, Kohno H, et al. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary capsaicin and rotenone [J]. Int J Oncol, 2001, 19(5): 929-939.
- [7] Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as 'Curecumin': From kitchen to clinic[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(4): 787-809.
- [8] Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials [J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(3): 511-545.
- [9] Min KW, Zhang X, Imchen T, et al. A peroxisome proliferator-activated receptor ligand MCC-555 imparts anti-proliferative response in pancreatic cancer cells by PPARgamma-independent up-regulation of KLF4 [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 263(2): 225-232.
- [10] Tsukahara T, Haniu H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression suppresses proliferation of human colon cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(3): 524-527.
- [11] Fujita M, Tohji C, Honda Y, et al. Cytotoxicity of 15-deoxy-(12, 14)-prostaglandin J (2) through PPARγ-independent pathway and the involvement of the JNK and Akt pathway in renal cell carcinoma[J]. Int J Med Sci, 2012, 9(4): 555-566.
- [12] Xu G, Ren G, Xu X et al. Combination of curcumin and green tea catechins prevents dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(1): 390-395.
- [13] Yokoyama Y, Xin B, Shigeto T, et al. Combination of ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, and cisplatin enhances the inhibition of growth of human ovarian cancers [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(8): 1219-1228.
- [14] Ramer R, Heinemann K, Merkord J, et al. COX-2 and PPAR-γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(1): 69-82.

(收稿:2013-10-11 修回 2014-12-26)

## 第十九次全国儿科中西医结合学术会议征文通知

中国中西医结合学会儿科专业委员会拟于2015年10月中旬在北京召开第十九次全国儿科中西医结合学术会议,届时将进行专题报告、学术交流及儿科专业委员会改选换届工作。欢迎踊跃投稿,现将征文事宜通知如下。

**征文内容** (1)中西医结合及中医、西医各专业的临床论著、实验研究、护理经验和专题综述;(2)临床疑难、重症、少见病例报道;(3)中西医结合药理、药效研究;(4)中西医结合理论及方法研究;(5)对儿科中西医结合工作的建议等。

**论文要求** 尚未公开发表;稿件需有全文及摘要;稿件一律用 Microsoft Word 文档;稿件请注明作者单位、准确通信地址、邮政编码、电话及 E-mail 等联系信息;稿件一律发至 [bjyyyyek@sina.com](mailto:bjyyyyek@sina.com);参会者可授予继续教育学分6分。

**截稿日期** 2015年8月20日。

**联系方式** 杨爱君, Tel:13651105763;杨惠静, Tel:13621146657;刘力戈, Tel:13501021136。