

· 基础研究 ·

姜黄素对人食管癌耐药细胞逆转作用的实验研究

刘 华¹ 白美玲² 郭 颖² 张晓丽¹ 张林西¹ 罗 强¹ 孙 黎¹

摘要 **目的** 研究姜黄素对食管癌耐药细胞的作用及作为食管癌多药耐药逆转剂的可能性。**方法** 采用 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用体外培养 Eca-109/Taxol 细胞及 Eca-109 细胞,倒置显微镜观察姜黄素对 Eca-109/Taxol 细胞作用的形态变化,CCK-8 法检测姜黄素对两种细胞的增殖抑制率并计算姜黄素的逆转效应。流式细胞术检测姜黄素对 Eca-109/Taxol 细胞的凋亡率及测定罗丹明 123 在癌细胞内的蓄积。采用全自动酶标仪检测 Caspase-3 活性、免疫细胞化学法检测 P-gp 在癌细胞中的表达。**结果** Eca-109/Taxol 细胞经不同浓度姜黄素作用后,细胞生长变慢、细胞变圆,部分细胞悬浮于培养液中。随着姜黄素浓度的增高,对 Eca-109/Taxol 细胞生长抑制作用逐渐增强。姜黄素对 Eca-109/Taxol 细胞具有明显的耐药逆转作用,10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素逆转 2.50 倍,40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素逆转 6.83 倍,且在一定浓度范围内呈剂量依赖性。姜黄素与低浓度 Taxol 联合应用,可使 Eca-109/Taxol 细胞中 Caspase-3 活力提高。流式细胞仪检测显示,随姜黄素浓度的增加,癌细胞的凋亡率逐步增高,20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后凋亡率为 $(13.6 \pm 1.3)\%$,80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素凋亡率为 $(43.5 \pm 1.6)\%$,组间比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),同时可使 Eca-109/Taxol 细胞内 Rho123 的蓄积增高($P < 0.01$);20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素对 Eca-109/Taxol 细胞作用 24 h 可明显抑制 P-gp 在 Eca-109/Taxol 细胞中的表达。**结论** 姜黄素对 Eca-109/Taxol 细胞生长具有抑制作用,可以较强地逆转癌细胞对 Taxol 耐药性,可能是食管癌临床化疗中较好的耐药逆转药物。

关键词 食管癌;姜黄素;多药耐药;细胞凋亡

Curcumin Reversed Human Esophageal Carcinoma Drug Resistant Cells LIU Hua¹, BAI Meiling², GUO Ying², ZHANG Xiao-li¹, ZHANG Lin-xi¹, LUO Qiang¹, and SUN Li¹ 1 Life Science Research Center, Hebei North University, Hebei (075000); 2 Department of Pathology, Basic Medical College of Hebei North University, Hebei (075000)

ABSTRACT **Objective** To study the effects of curcumin on esophageal carcinoma cell drug resistant cells, and to study its possibility as reversal agent. **Methods** The cell lines of Eca-109/Taxol and Eca-109 were cultured by 20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$ curcumin *in vitro*. Morphological changes of Eca-109/Taxol cells treated by curcumin were observed under inverted microscope. The proliferative inhibition rates of curcumin against two cell lines were detected by CCK-8 assay and the reversal effect of curcumin was calculated. The apoptosis rate of Eca-109/Taxol cells was detected by flow cytometry. The accumulation of Rho123 in cancer cells was determined. Caspase-3 activity was detected by automatic microplate reader. The expression of P-gp in cancer cells was detected by immunocytochemistry. **Results** Eca-109/Taxol cells grew slowly and became round. Partial cells were suspended in the culture solution after treated by different concentrations of curcumin. The inhibition effect on Eca-109/Taxol cell growth was gradually enhanced as increased concentrations of curcumin. Curcumin had significantly reversal effect on Eca-109/Taxol cells, 2.50 times by 10 $\mu\text{mol/L}$ curcumin and 6.83 times by 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, showing dose dependent manner in certain concentration ranges. Combining curcumin with low concentration Taxol could elevate the activity of Caspase-3 in Eca-109/Taxol cells. Flow cytometry showed that

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(No. H2014405033);河北北方学院重大课题资助项目(No. ZD201414)

作者单位:1. 河北北方学院生命科学研究中心(河北 075000);2. 河北北方学院基础医学院病理学教研室(河北 075000)

通讯作者:张林西, Tel:0313-4029351, E-mail: zlxwxi@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170315.040

the apoptosis rates gradually increased with rising concentration of curcumin. The apoptosis rates were $13.6\% \pm 1.3\%$ and $43.5 \pm 1.6\%$ respectively after treated by $20 \mu\text{mol/L}$ and $80 \mu\text{mol/L}$ curcumin for 24 h, with statistical difference between the two groups ($P < 0.01$). Meanwhile, Rho123 accumulation was increased in Eca-109/Taxol cells ($P < 0.01$). Expression of P-gp in Eca-109/Taxol cells after treated by $20 \mu\text{mol/L}$ curcumin for 24 h could be markedly inhibited. Conclusions Curcumin could inhibit the growth of Eca-109/Taxol cells, and reverse thier drug resistance to Taxol. It might be a good reversal agent to drug resistance in clinical chemotherapy of esophageal carcinoma.

KEYWORDS esophageal carcinoma; curcumin; multidrug resistance; apoptosis

食管癌是我国高发恶性肿瘤之一,临床就诊患者以中晚期为主,化疗是食管癌临床治疗的重要手段之一^[1]。目前,术后化疗疗效不佳或化疗失败的重要原因之一是肿瘤在化疗过程中发生多药耐药(multiple drug resistance, MDR)。探寻 MDR 逆转药物(逆转剂)是对抗 MDR 的主要方法之一。中医学认为,姜黄具有活血行气、通经止痛等功效。其主要成分姜黄素(curcumin)药理作用广泛,有抗氧化、抗炎、降血脂、抗动脉粥样硬化等作用。近年来,其抗肿瘤活性受到学者关注^[2,3],机制尚不清楚,关于其作为食管癌化疗耐药逆转剂的研究少见报道。本研究以食管癌耐药细胞为研究对象,探讨姜黄素逆转食管癌细胞耐药作用,为姜黄素作为食管癌等恶性肿瘤化疗耐药较好的逆转药物提供理论依据。

材料与方法

1 细胞 人食管癌 Eca-109 细胞购自武汉 Pro-cell 公司,货号:CL-0077,河北北方学院生命科学研究冻存;紫杉醇耐药细胞 Eca-109/Taxol 购自上海博谷生物科技有限公司。

2 药物 姜黄素购于北京索莱宝科技有限公司(批号:C7090),纯度 95%;紫杉醇为北京双鹭药业股份有限公司产品(批号:20140322)。

3 主要试剂及仪器 CCK-8 试剂盒(KGA317-2)、消化液(含 0.25% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA)(KGY0012)、胎牛血清(批号:20140118)、蛋白定量检测试剂盒(Bradford 法)(KGA802)及 PI 染色试剂盒(批号:20140410)等购自南京凯基生物科技发展有限公司;Caspase-3 活性检测试剂盒(C1116)购自碧云天生物技术有限公司;RPMI1640 培养基(批号:31800022)为 Gibco 公司产品;罗丹明 123(Rho123, 62669-70-9)为 Sigma 公司产品;PV6000 二步法检测试剂盒(20140621)、P-gp 一抗(ZM-0189)及 DAB 显色剂(ZLI-9018)等购自北京中杉金桥生物技术有限公司。流式细胞仪为美国 BD 公司(型号:FACS AriaII)

产品,全自动酶标仪(型号:Stat Fax-2100)为美国 Awareness 公司产品。

4 细胞培养 Eca-109 细胞、紫杉醇耐药细胞 Eca-109/Taxol 培养于含 10% 胎牛血清、 100 U/mL 青霉素与链霉素 RPMI-1640 培养基中;Eca-109/Taxol 细胞的 RPMI-1640 培养基中添加终浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的紫杉醇,以维持其耐药性,置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中传代培养,每 1~2 天换液 1 次。倒置显微镜下观察,根据生长情况用消化液 $2.0 \sim 3.0 \text{ mL}$ 进行传代,并用 95% 完全培养基 + 5% DMSO 液氮冻存。取对数生长期细胞进行实验。

5 药物配制 10 mmol/L 姜黄素溶液的配制:用分析天平称取姜黄素粉剂,以二甲基亚砜(DMSO)溶解姜黄素粉剂,配成 10 mmol/L 的母液, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,EP 管分装, -20°C 避光保存。使用时,以培养基稀释姜黄素至所需浓度,保证其中 DMSO 终浓度 $< 0.1\%$ 。

6 形态学观察 倒置显微镜下观察 Eca-109/Taxol 细胞和 Eca-109 细胞正常生长及添加药物后的形态变化并拍照。

7 姜黄素对食管癌细胞生长抑制作用 CCK-8 法检测不同浓度姜黄素(10 、 20 、 40 、 $80 \mu\text{mol/L}$)作用于 Eca-109/Taxol 和 Eca-109 细胞的增殖抑制率。接种 96 孔板,每孔 $200 \mu\text{L}$,继续培养。待细胞贴壁后分别加入浓度为 10 、 20 、 40 、 $80 \mu\text{mol/L}$ 的姜黄素溶液作为实验组。对照组中加入相同浓度的 DMSO。实验组在培养 24 h 后更换培养液,分别在实验组和对照组细胞中加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 37°C 孵育 4 h 后,振动 10 min 使之混匀。实验组与对照组均设 6 个复孔。选择 450 nm 波长,用全自动酶联免疫检测仪检测各孔的吸光度(OD_{450})值,计算不同药物浓度作用下,姜黄素对两种细胞的生长抑制率。生长抑制率的计算公式为:抑制率($\%$) = (实验组 OD_{450} 值 - 对照组 OD_{450} 值)/对照组 OD_{450} 值 $\times 100\%$ ^[4]。并根据 IC_{50} 计算软件确定 IC_{50} 值(抑制率为 50% 的药物浓度)。选

取抑制率 <10% 的药物浓度为姜黄素的无毒剂量。

8 姜黄素对 Eca-109/Taxol 细胞 MDR 的逆转作用 取对数生长期的 Eca-109/Taxol 细胞按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板,细胞贴壁后加药;Taxol 等倍稀释成 4 个梯度浓度 (0.8、0.4、0.2、0.1 μg),设 Taxol 单用组、Taxol + 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组、Taxol + 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组和 Taxol + 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组;每组设 6 个复孔,终体积为 200 μL ;培养 24 h,每孔加入 CCK-8 10 μL ,继续培养 4 h,在酶标仪 450 nm 处测吸光度 OD 值,取 6 个复孔 OD 值均数计算细胞增殖抑制率(方法同前);并计算耐药逆转倍数 (Taxol 单用组 IC_{50} 与联合用药组 IC_{50} 比值)^[5]。

9 Caspase-3 活性检测 取对数生长期的 Eca-109/Taxol 细胞,分别加入 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素及联合 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的 Taxol 培养 24 h 后收集细胞,进行 Caspase-3 活性检测。按照试剂盒操作说明书进行,每个样品重复 3 次,取平均值。通过测定 pNA 标准曲线,根据 Caspase-3 酶活性变化的 pNA 释放量与 Caspase-3 酶活性呈正比,测定 pNA 释放量的 OD 值。计算 $\text{OD}_{\text{诱导剂}}/\text{OD}_{\text{阴性对照}}$ 的倍数来确定不同药物浓度诱导 Caspase-3 的活化程度(以试剂盒中的 Lysis Buffer 和 Reaction Buffer 作为空白对照)。

10 流式细胞术检测细胞凋亡 接种 Eca-109/Taxol 细胞,在对数生长期,实验组加入浓度分别为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素,对照组不加姜黄素,培养 24 h。收集细胞,制备单细胞悬液;用冷 PBS 缓冲液离心洗涤 2 次;加入 PI 染液,混匀,避光染色 20 min,再加入冷 PBS 洗涤 1 次,加入 2.0 mL PBS 缓冲液重悬细胞,进行流式细胞仪检测。

11 流式细胞术测定 Rho123 荧光强度 在细胞中的滞留取对数生长期的食管癌 Eca-109/Taxol 细胞,制备成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 单细胞悬液,分装于 EP 管中,每管 1 mL 分别加入终浓度为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素及 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 (Rho123,只加 Rho123 为阴性对照组,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养 2 h,1 500 $\times g$ 离心 5 min,PBS 清洗 2 次,再重悬于冷 PBS 中,流式细胞仪检测 Rho123 荧光强度,重复 3 次,取平均值。

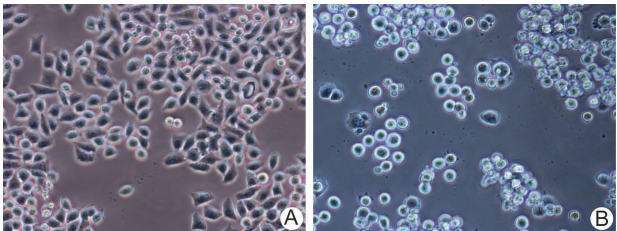
12 姜黄素作用前后 Eca-109/Taxol 细胞中 P-gp 蛋白表达 取对数生长期 Eca-109/Taxol 细胞,按每孔 2×10^5 个接种于放盖玻片的 6 孔板中;贴壁后分别加入 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素,继续培养 24 h,吸弃培养液,取出盖玻片,预冷 PBS 清洗 3 min $\times$ 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 3 min $\times$ 3 次,采

用 PV6000 二步法检测 P-gp 蛋白表达。

13 统计学方法 用 SPSS 12.0 统计分析软件对相关数据进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,用 Scheffe 法做两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

结 果

1 各组 Eca-109/Taxol 细胞形态学变化(图 1) Eca-109/Taxol 细胞和 Eca-109 细胞都呈贴壁生长,上皮样单层排列,多边形,两细胞株在细胞形态上并无明显差别。耐药细胞生长较为缓慢,需 3 ~ 4 天传代 1 次。添加不同姜黄素作用后,细胞生长变慢,细胞变圆,大小不一,部分细胞悬浮于培养液中。



注:A 为正常生长的 Eca-109/Taxol 细胞;B 为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素作用 24 h 后 Eca-109/Taxol 细胞

图 1 Eca-109/Taxol 细胞形态 ($\times 400$)

2 姜黄素对食管癌细胞的生长抑制率比较(表 1) 随着姜黄素浓度的增高,对 Eca-109/Taxol 和 Eca-109 两细胞生长抑制作用逐渐增强,但是姜黄素对两种细胞的生长抑制作用比较接近,对 Eca-109 细胞的作用稍显大一些。姜黄素在浓度 $\leq 20 \mu\text{mol/L}$ 条件下,对两种细胞抑制率均 $< 10\%$ 。姜黄素对 Eca-109/Taxol 和 Eca-109 两种细胞的 IC_{50} 值分别为 $(306.16 \pm 10.12) \mu\text{mol/L}$ 、 $(262.74 \pm 4.38) \mu\text{mol/L}$,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 姜黄素对 Eca-109/Taxol 和 Eca-109 细胞作用 24 h 后抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

姜黄素 ($\mu\text{mol/L}$)	<i>n</i>	抑制率 (%)	
		Eca-109/Taxol	Eca-109
10	6	4.38 ± 0.64	5.63 ± 0.69
20	6	8.47 ± 0.81	9.73 ± 0.64
40	6	16.57 ± 0.89	17.05 ± 0.59
80	6	21.34 ± 1.52	26.01 ± 1.62

3 姜黄素对 Eca-109/Taxol 细胞耐药性的逆转作用(表 2) Taxol 浓度分别为 2.05、0.82、0.48、0.30 $\mu\text{g/mL}$ 。10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素逆转 2.50 倍,40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素逆转 6.83 倍。姜黄素在一定浓度范

表 2 姜黄素对 Eca-109/Taxol 细胞的逆转作用 ($\bar{x} \pm s$)

Taxol ($\mu\text{g/mL}$)	<i>n</i>	姜黄素 ($\mu\text{mol/L}$)			
		0	10	20	40
0.1	6	3.24 $\pm$ 0.24	6.05 $\pm$ 0.56	10.27 $\pm$ 1.09	18.03 $\pm$ 1.57
0.2	6	7.08 $\pm$ 0.60	17.02 $\pm$ 1.26	30.69 $\pm$ 1.71	39.22 $\pm$ 2.01
0.4	6	16.26 $\pm$ 1.02	31.27 $\pm$ 1.54	48.04 $\pm$ 1.77	57.78 $\pm$ 2.54
0.8	6	24.01 $\pm$ 1.34 *	46.22 $\pm$ 1.61 **	60.32 $\pm$ 2.28 **	79.27 $\pm$ 2.68 **

注:与 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

围内呈剂量依赖性, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 与 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

4 各组 Caspase-3 活性比较 (表 3) 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后酶活力为 1.13; 酶活力随着姜黄素浓度的增高而增加。而与低浓度 Taxol 联合应用后, 相对应的酶活力提高, 姜黄素与 Taxol 合用组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 各组 Caspase-3 活性比较

组别	<i>n</i>	酶活力(酶活力单位)
阴性对照	3	0
姜黄素 20 $\mu\text{mol/L}$	3	1.13
姜黄素 40 $\mu\text{mol/L}$	3	1.52
姜黄素 80 $\mu\text{mol/L}$	3	1.85
Taxol 0.2 $\mu\text{g/mL}$	3	1.28
Taxol 0.2 $\mu\text{g/mL}$ + 姜黄素 20 $\mu\text{mol/L}$	3	2.09 *
Taxol 0.2 $\mu\text{g/mL}$ + 姜黄素 40 $\mu\text{mol/L}$	3	2.91 *
Taxol 0.2 $\mu\text{g/mL}$ + 姜黄素 80 $\mu\text{mol/L}$	3	3.77 *

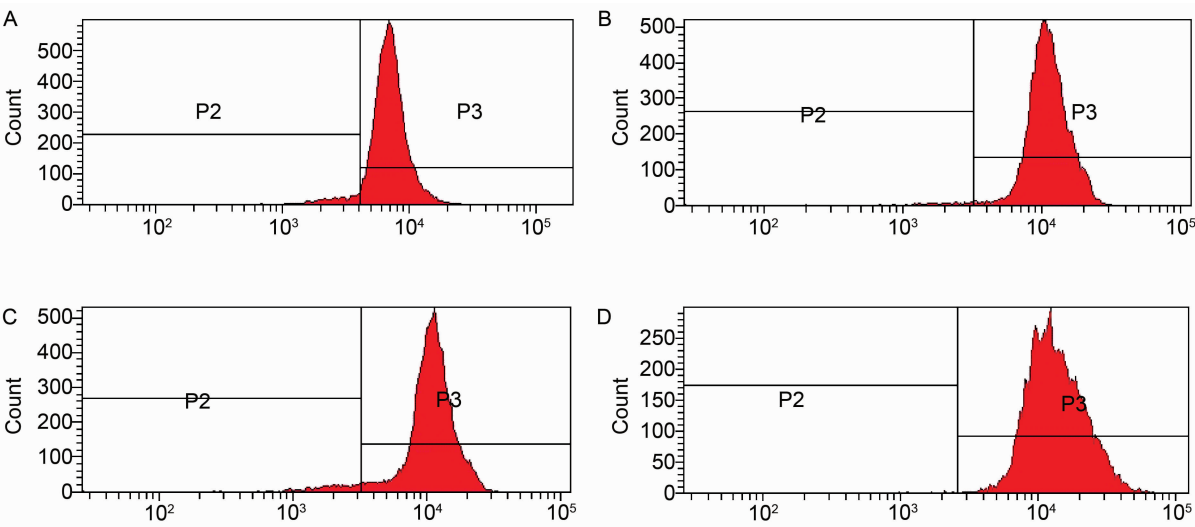
注:与姜黄素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P < 0.05$

5 姜黄素诱导 Eca-109/Taxol 细胞凋亡 随姜黄素浓度的增加, 癌细胞的凋亡率逐步增高, 20 $\mu\text{mol/L}$

姜黄素作用 24 h 后的凋亡率为 (13.6 $\pm$ 1.3)%, 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后的凋亡率为 (29.2 $\pm$ 1.1)%, 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后的凋亡率为 (43.5 $\pm$ 1.6)%, 20 $\mu\text{mol/L}$ 与浓度 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

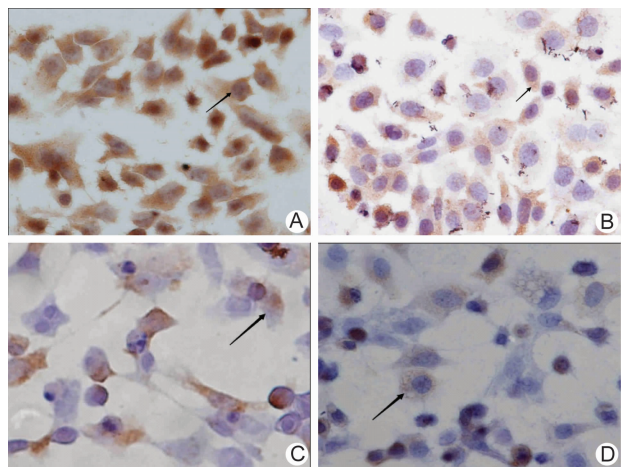
6 各组 Eca-109/Taxol 细胞内 Rho123 的荧光强度比较(图 2) 细胞内储留的 Rho123 的荧光强度在阴性对照组及 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组分别为 20.13 $\pm$ 0.96、31.28 $\pm$ 1.35、39.47 $\pm$ 1.49 和 54.22 $\pm$ 1.91。细胞内 Rho123 的蓄积在各浓度姜黄素组高于阴性对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

7 各组 Eca-109/Taxol 细胞中细胞 P-gp 蛋白表达比较(图 3) P-gp 在 Eca-109/Taxol 细胞质及胞膜呈较强的棕黄色(图 3A)即有较强的阳性表达, 经 20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素作用 24 h 之后 P-gp 表达明显减少, 由强阳性变为弱阳性(图 3B)。经 40 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素作用 24 h 之后 P-gp 表达也减少, 由强阳性变为弱阳性(图 3C); 经 80 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素作用 24 h 之后 P-gp 表达明显减少, 由强阳性变为弱阳性(图 3D)。



注: A 为阴性对照组; B 为 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; C 为 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; D 为 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组

图 2 各组 Eca-109/Taxol 细胞内 Rho 平均荧光强度比较



注: A 为 Eca-109/Taxol 细胞中 P-gp 阳性表达; B 为 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后; C 为 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后; D 为 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后; 箭头所示为阳性表达

图 3 各组 Eca-109/Taxol 细胞中 P-gp 蛋白表达比较 ($\times 400$)

讨 论

EC 在化疗过程中产生多药耐药是临床化疗取得理想疗效的主要障碍, 耐药性严重降低了常用化疗药物紫杉醇等的疗效, 使较多中晚期食管癌患者失去最佳治疗时间^[6]。因此, 研究食管癌的多药耐药机制及寻找高效低毒副作用的逆转药物具有重要意义。

姜黄素是从姜科植物中药姜黄的地下根茎中分离出来的具有广泛生物活性的物质。姜黄素药理作用广泛, 主要有抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等^[7]。研究表明, 姜黄素对多种消化道肿瘤如食管癌、结肠癌、胃癌等具有显著的生长抑制作用^[8-10]。本研究发现, 姜黄素对食管癌 Eca-109/Taxol 和 Eca-109 细胞都具有明显的生长抑制作用, 且随着姜黄素浓度的增高, 对两细胞生长抑制作用逐渐增强, 但是姜黄素对两种细胞的生长抑制作用比较接近, 对两种细胞的 IC_{50} 值也比较接近。研究表明, 姜黄素不仅能够抑制癌细胞生长且可诱导肿瘤细胞发生凋亡^[11]。本研究中姜黄素可以诱导耐药食管癌细胞发生凋亡, 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后的凋亡率为 $(13.6 \pm 1.3)\%$, 而 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的凋亡率为 $(43.5 \pm 1.6)\%$ 。Caspase 家族是一类半胱氨酸蛋白酶类分子, 在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 其中 Caspase-3 为关键的调控分子^[12-14]。本研究中 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后 Caspase-3 活性为

1.85, 而与低浓度 Taxol 联合应用后, 相对应的酶活力提高, Taxol 0.2 $\mu\text{g/L}$ + 姜黄素 80 $\mu\text{mol/L}$ 组酶活力为 3.77, 与单用 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较, 差异有统计学意义。提示姜黄素增强了食管癌耐药细胞的凋亡。Caspase-3 在凋亡信号转导的酶级联反应中具有关键作用, 其激活是凋亡发生执行的分子标志^[15]。

姜黄是一味活血化瘀、行气止痛中药。姜黄素急性毒性试验测不出 LD_{50} , 小鼠最大耐受量实验认为姜黄素无明显急性毒性作用^[16]。由于其明显的抗肿瘤特性, 且无常用化疗药如紫杉醇、5-FU 等较大的毒副作用, 因此, 姜黄素是一种具有美好发展前景的抗癌药物, 美国国立肿瘤研究所已将其列为第 3 代恶性肿瘤化学预防药^[17]。

研究表明, 姜黄素不仅可以抑制癌细胞生长、诱导癌细胞凋亡, 在肝癌、胃癌等多药耐药研究中, 姜黄素能够逆转或部分逆转这些肿瘤细胞的多药耐药, 增强化疗药物的敏感性^[18-20], 但关于姜黄素逆转食管癌多药耐药性报道尚未见报道。本研究中发现, 与紫杉醇联合应用, 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素可以逆转 2.50 倍, 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素逆转 6.83 倍, 且在一定浓度范围内呈剂量依赖性。且实验发现, 姜黄素可以显著增强 Rho123 在耐药癌细胞内的蓄积, 且随着浓度的增高, Rho123 蓄积增强。Rho123 是 P-gp 的作用底物, 常以 Rho123 在细胞中外排评估 P-gp 泵的功能。本研究中耐药细胞经 20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素作用 24 h 之后 P-gp 表达明显减少, 由强阳性变为弱阳性。说明姜黄素可明显抑制 P-gp 在 Eca-109/Taxol 细胞中的表达。P-gp 蛋白是能量依赖性药物外排泵^[21], 耐药细胞内 Rho123 浓度的增高及癌细胞 P-gp 表达降低, 提示姜黄素可以通过抑制 Eca-109/Taxol 细胞膜上 P-gp 表达、降低 P-gp 泵外排功能, 从而提高耐药细胞内 Taxol 浓度, 这样增强了耐药细胞对 Taxol 的敏感性, 从而增强 Taxol 对食管癌细胞的杀伤作用, 但姜黄素对 P-gp 表达的调控机制有待进一步研究。

具有抗肿瘤作用的中药有效成分因其毒副作用小、多靶点逆转 MDR 而成为目前研究的热点。本研究提示, 姜黄素对于食管癌耐药细胞具有较强的生长抑制作用, 能够抑制食管癌耐药细胞 P-gp 表达, 且能够较显著地逆转食管癌对 Taxol 的耐药性, 增强其对化疗药物的敏感性, 可能是较好的食管癌耐药逆转剂, 但是关于其作用机制还有待进一步进行动物实验等研究。

参 考 文 献

- [1] Liu Y, Ren Z, Yuan L, et al. Paclitaxel plus cispla-

- tin vs. 5-fluorouracil plus cisplatin as first-line treatment for patients with advanced squamous cell esophagealcancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(10): 2345–2350.
- [2] Reuter S, Eifes S, Dicato M, et al. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11): 1340–1351.
 - [3] Tong QS, Zheng LD, Lu P, et al. Apoptosis-inducing effects of curcumin derivatives in human bladder cancer cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(3): 279–287.
 - [4] 孙静, 易娟, 陈静, 等. 胰岛素抵抗的人肝癌细胞 HepG2 对多柔比星的敏感性[J]. *肿瘤*, 2009, 29(11): 1036–1039.
 - [5] 刘丽丽, 刘艳娥, 房国涛. 三七总皂苷逆转乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 多药耐药的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(4): 954–956.
 - [6] Qiang F, Guangguo R, Yongtao H, et al. Multidrug resistance in primary tumors and metastases in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(4): 641–648.
 - [7] Gupta SC, Patchva S, Koh W, et al. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3): 283–299.
 - [8] Zhang FJ, Zhang HS, Liu Y, et al. Curcumin inhibits Ec109 cell growth via an AMPK-mediated metabolic switch[J]. *Life Sci*, 2015, 134: 49–55.
 - [9] Guo Y, Shu L, Zhang C, et al. Curcumin inhibits anchorage-independent growth of HT29 human colon cancer cells by targeting epigenetic restoration of the tumor suppressor gene DLEC1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 94(2): 69–78.
 - [10] Liu X, Sun K, Song A, et al. Curcumin inhibits proliferation of gastric cancer cells by impairing ATP-sensitive potassium channel opening [J]. *World J Surg Oncol*, 2014, 12: 389–396.
 - [11] 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.
 - [12] Aoyama I, Yaegaki K, Calenic B, et al. The role of p53 in an apoptotic process caused by an oral malodorous compound in periodontal tissues: a review[J]. *J Breath Res*, 2012, 6(1): 017104.
 - [13] Janson V, Johansson A, Grankvist K. Resistance to caspase-8 and-9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance [J]. *Cell Death Dis*, 2010, 1: e78.
 - [14] Nimmanapalli R, Bhalla K. Targets in apoptosis signaling: promise of selective anticancer therapy[J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 223: 465–483.
 - [15] Liu P, Wang X, Hu C, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by trimethoxyl stilbene (TMS) in a lung cancer cell line [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(9): 2263–2269.
 - [16] 沃兴德, 洪行球, 高承贤. 姜黄素最大耐受量试验[J]. *浙江中医学院学报*, 2000, 24(2): 55–82.
 - [17] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs [J]. *Science*, 2011, 331(6017): 550–553.
 - [18] Hartojo W, Silvers AL, Thomas DG, et al. Curcumin promotes apoptosis, increases chemosensitivity, and inhibits nuclear factor kappaB in esophageal adenocarcinoma [J]. *Transl Oncol*, 2010, 3(2): 99–108.
 - [19] 曹仕琼, 尹太勇, 杨盛力. 姜黄素对 Bel7402/5-Fu 细胞系多药耐药逆转作用的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(2): 244–252.
 - [20] Hartojo W, Silvers AL, Thomas DG, et al. Curcumin promotes apoptosis, increases chemosensitivity, and inhibits nuclear factor kappaB in esophageal adenocarcinoma [J]. *Transl Oncol*, 2010, 3(2): 99–108.
 - [21] Mudududdla R, Guru SK, Wani A, et al. 3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylamino)-N-(4-fluorophenyl) thiophene-2-carboxamide overcomes cancer chemoresistance via inhibition of angiogenesis and P-glycoprotein efflux pump activity[J]. *Org Biomol Chem*, 2015, 13(14): 4296–4309.

(收稿:2015-09-10 修回:2017-02-17)

责任编辑:白霞

英文责编:张晶晶