

姜黄素联合 FOLFOX 诱导胃癌细胞发生凋亡及其机制研究

周 香¹ 游 涛¹ 王维明² 郑志强¹

摘要 **目的** 观察姜黄素联合 FOLFOX (folinic acid fluorouracil oxaliplatin) 对胃癌细胞株 BGC-823 生长的影响,并探讨其可能的发生机制。**方法** 设立空白对照组、姜黄素组、FOLFOX 组 [5-FU (0.1 mmol/L) + 奥沙利铂 (5 μ mol/L)] 及姜黄素联合 FOLFOX 组。CCK8 法检测细胞活性, Hoechst 染色观察细胞凋亡, Caspase-3 试剂盒检测 Caspase-3 活性, 实时荧光定量 PCR 法测定 Bcl-2、Bax mRNA 表达的变化, Western blot 法测定 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化。**结果** 各用药组均能抑制 BGC-823 细胞增殖、诱导细胞凋亡、增加 Caspase-3 的活性、降低 Bcl-2 mRNA 及 Bcl-2 蛋白表达而增加 Bax mRNA 及 Bax 蛋白表达, 且姜黄素联合 FOLFOX 组疗效优于姜黄素组及 FOLFOX 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 姜黄素联合 FOLFOX 组能够明显抑制 BGC-823 细胞的增殖, 其联合作用可能通过促进 Bax 的表达及 Caspase-3 的活性、抑制 Bcl-2 表达, 从而加速肿瘤细胞的凋亡。

关键词 姜黄素; 5-氟尿嘧啶联合奥沙利铂化疗方案; 胃癌; 凋亡

Curcumin Combined FOLFOX Induced Cell Apoptosis of Gastric Cancer and Its Mechanism Research ZHOU Xiang¹, YOU Tao¹, WANG Wei-ming², and ZHENG Zhi-qiang¹ 1 Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang (325027), China; 2 Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Zhejiang (325000), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of curcumin combined folinic acid fluorouracil oxaliplatin (FOLFOX) on the gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 and to explore its possible mechanisms. **Methods** Cells were divided into five groups, i.e. the blank control group, the curcumin group, the FOLFOX group (0.1 mmol/L 5-FU + 5 μ mol/L oxaliplatin), and the curcumin combined FOLFOX group. CCK-8 was used to detect cell activity. The cell apoptosis was observed using Hoechst dyeing. Caspase-3 test kit was applied to test Caspase-3 vitality. The mRNA expressions of Bcl-2 and Bax were detected by real time fluorescent quantitative PCR. The expressions of Bcl-2 and Bax protein were determined by Western blot. **Results** The BGC-823 cells' proliferation could be inhibited, apoptosis induced, the Caspase-3 activity increased, expressions of Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein lowered, while Bax mRNA and Bax protein expressions increased in each medicated group. Besides, the efficacy of the curcumin combined FOLFOX group was superior to that of the curcumin group and the FOLFOX group, showing statistical difference ($P < 0.01$). **Conclusion** Curcumin combined FOLFOX could significantly inhibit the proliferation of BGC-823 cells possibly via promoting Bax expression and Caspase-3 activity, inhibiting Bcl-2 expression, thus inducing apoptosis.

KEYWORDS curcumin; FOLFOX; gastric cancer; apoptosis

胃癌是全球第四大恶性肿瘤,由胃癌导致的死亡

人数在恶性肿瘤中位居第二,仅次于肺癌^[1]。长期以来,化学药物是药物治疗胃癌的主要手段,胃癌术前、术中、术后均可辅化疗以增加手术切除率,减少复发率,提高生存率。5-氟尿嘧啶 (fluorouracil, 5-FU) 联合奥沙利铂的化疗方案称为 FOLFOX (folinic acid fluorouracil oxaliplatin) 方案,其在临床中广泛应用

基金项目:温州市科技计划资助项目 (No.Y20100033)

作者单位:1.温州医学院附属第二医院普外科 (浙江温州 325027); 2.温州医学院附属第一医院普外科 (浙江温州 325000)

通讯作者:游 涛, Tel:13957706972, E-mail:youtao@wzmc.net

于治疗胃癌, Louvet C 等^[2]报道应用 FOLFOX 方案治疗局部或转移的晚期胃癌, 有效率为 44.9%。如何进一步提高化疗药物的治疗效果、减少药物不良反应一直是医学领域努力的方向。姜黄素是从姜科姜黄属植物姜黄根茎中提取的一种酚性色素, 不良反应少。姜黄素能够加强 FOLFOX 对结肠癌的抑瘤作用^[3]。本研究试观察姜黄素是否能够加强 FOLFOX 对胃癌的抑瘤作用并探究其可能机制。

材料与方法

1 材料 人胃腺癌 BGC-823 细胞购自中科院上海细胞生物研究所细胞库, 用含 10% 的小牛血清(杭州四季青生物工程公司)的 1640 培养基(美国 Gibco 公司), 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养传代; 姜黄素(美国 Sigma 公司生产, 生产批号: C1386, 规格: 5 g/支), 5-FU(美国 Sigma 公司生产, 生产批号: F6627, 规格: 1 g/支), 奥沙利铂(美国 Sigma 公司生产, 生产批号: 09512, 规格: 5 mg/支); CCK-8 试剂盒、Caspase-3 活性检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; PrimeScript RT reagent Kit、SYBR Premix Ex TaqTM 购自日本 Takara 公司; 兔抗人 Bcl-2 及 Bax 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

2 实验方法

2.1 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率 实验分空白组、对照组、药物组(姜黄素组、FOLFOX 组、姜黄素 + FOLFOX 组), 各组细胞均在 37℃ 共同孵育 48 h, 按照试剂盒说明书, 每孔加 CCK-8 溶液 10 μL, 继续温育 1 h 后, 酶标仪测定 450 nm 波长处各孔的吸光度(OD 值), 计算细胞增殖抑制率(%) = $(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{药物组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.2 Hoechst 染色观察细胞凋亡情况 调整细胞浓度为 1×10^5 /mL, 接种于放有无菌盖玻片的 6 孔板内的任意 4 个孔, 每孔 500 μL, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 12 h 后, PBS 洗涤 2 遍, 设置空白对照组、姜黄素组(10 μmol/L)、FOLFOX 组[5-FU(0.1 mmol/L) + 奥沙利铂(5 μmol/L)]、姜黄素(10 μmol/L)联合 FOLFOX 组[5-FU(0.1 mmol/L) + 奥沙利铂(5 μmol/L)], 孵育 12 h 后, 按照染色说明书, 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 2 遍后, Hoechst 33258 染色液染色 5 min, 洗涤后抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜(×400)观察凋亡细胞的形态。

2.3 Caspase-3 活性测定 分组同上, 培养箱

中培养 24 h 后, 按试剂盒说明书方法, 检测 Caspase-3 活性。收集各组细胞, 加入 50 μL 试剂盒提供的裂解液, 冰浴 15 min, 4℃ 18 000 r/min 离心 10 min, 转移上清液, 取少量样品用 Bradford 法测定蛋白浓度, 将偶联底物(Ac-DEVD-pNA)加入上清液中(调整终浓度为 3 mg/mL), 37℃ 水浴孵育 2 h, 用酶标仪测定 405 nm 下的光吸收值。用试剂盒提供的不同浓度的 pNA 作为标准品在相同的条件下求得标准曲线, 算出 Caspase-3 的活性单位。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 Bcl-2 及 Bax mRNA 表达 分组同上, 培养 24 h 后 Trizol 法提取总 RNA。取 500 ng 的 RNA, 按试剂盒 DRR037A 说明书逆转录合成 cDNA。引物探针由上海基康生物技术有限公司设计并合成。Bcl-2 引物, 上游引物: 5'-CGCAGAGGGGCTACGAGT-3'; 下游引物: 5'-GTTGACGCTCTCCACACACAT-3'。Bax 引物, 上游引物: 5'-TTCTGACAGGCAACTTCAACTG-3'; 下游引物: 5'-CAACCACCCTGGTCTTGGAT-3'。内参基因 ACTB 引物, 上游引物: 5'-CGTGGACATCCGCAAGAC-3'; 下游引物: 5'-AAGAAAGGGTGTAAACGCAACTAAG-3'。荧光定量 PCR 反应体系及条件参照 SYBR Premix Ex TaqTM 说明书。数据采用 LightCycler 480 Software 分析。

2.5 Western blot 法检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达 细胞分组同上, 提取总蛋白, 并计算出上样体积。变性后 SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 电转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, TBST 洗膜, 然后加入 Bcl-2 及 Bax 一抗(1:500) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后加入辣根过氧化酶标记的 IgG 二抗(1:6 000) 室温孵育 2 h, 应用超敏 ECL 化学发光试剂盒曝光, 以 tubulin 蛋白作为内参照。采用 Image Tool 凝胶图像分析系统进行分析。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件分析。所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组样本均数比较进行方差齐性检验, 方差齐性组间比较采用单因素方差分析, 两两间比较采用 LSD 法, 方差不齐组间比较采用 Tamhane's T2 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞增殖抑制率比较(表 1) 先筛选出各药物 48 h 的 IC₅₀ 做为联合用药浓度, 姜黄素、5-FU 及奥沙利铂的 IC₅₀ 分别为 10 μmol/L, 0.1 mmol/L 及 5 μmol/L。CCK-8 检测结果显示:

与空白对照组比较,各用药组均能够抑制 BGC-823 细胞的增殖($P < 0.01$),其中姜黄素联合 FOLFOX 组的细胞抑制率最高,与其他两个用药组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),姜黄素能促进 FOLFOX 对细胞的抑制作用。

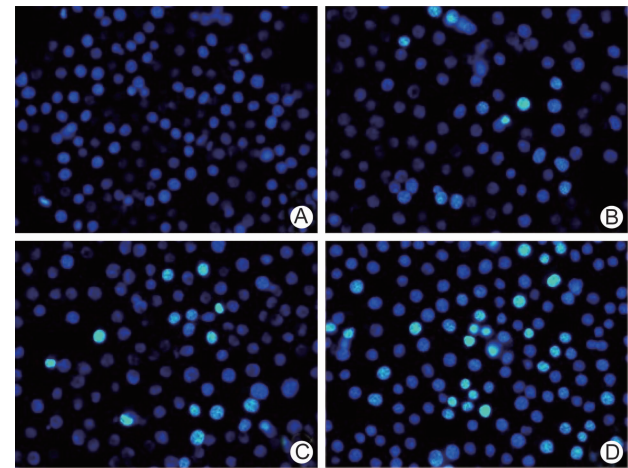
2 各组 Caspase-3 活性变化比较(表 1) 与空白对照组比较,各用药组均能增加 BGC-823 细胞的凋亡,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与姜黄素组及 FOLFOX 组比较,姜黄素联合 FOLFOX 组 Caspase-3 活力值明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 各组细胞增殖抑制率及 Caspase-3 活性变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	Caspase-3 活性(U)
空白对照	1.21 ± 0.03	0.94 ± 0.01
姜黄素	0.87 ± 0.01 * [△]	6.90 ± 0.04 * [△]
FOLFOX	0.36 ± 0.02 * [△]	11.50 ± 0.10 * [△]
姜黄素联合 FOLFOX	0.22 ± 0.02 *	21.90 ± 0.24 *

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与姜黄素联合 FOLFOX 组比较,[△] $P < 0.01$

3 Hoechst 染色观察细胞凋亡情况(图 1) 凋亡细胞核皱缩,呈亮蓝色,致密浓染,或呈碎块状致密浓染,染色结果可见姜黄素组细胞凋亡多于空白对照组,FOLFOX 组凋亡细胞明显多于空白对照组,而姜黄素联合 FOLFOX 组凋亡细胞最多。



注: A 为空白对照组;B 为姜黄素组;C 为 FOLFOX 组;D 为姜黄素联合 FOLFOX 组

图 1 荧光显微镜观察细胞凋亡情况比较 (Hoechst 染色, ×400)

4 各组 Bcl-2、Bax mRNA 表达比较(表 2) 与空白对照组比较,各用药组 Bcl-2 mRNA 表达降低

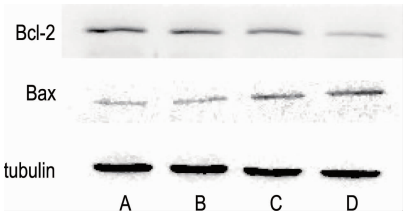
而 Bax mRNA 表达增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。姜黄素联合 FOLFOX 组的 Bcl-2 mRNA 表达最低,Bax mRNA 表达最高,与姜黄素组及 FOLFOX 组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 各组 Bcl-2、Bax mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 mRNA ^{2-ΔΔCt} (×10 ⁻³)	Bax mRNA ^{2-ΔΔCt} (×10 ⁻³)
空白对照	3.52 ± 0.03	2.92 ± 0.02
姜黄素	3.19 ± 0.01 * [△]	3.42 ± 0.04 * [△]
FOLFOX	2.93 ± 0.02 * [△]	5.72 ± 0.03 * [△]
姜黄素联合 FOLFOX	2.73 ± 0.02 *	5.74 ± 0.04 *

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与姜黄素联合 FOLFOX 组比较,[△] $P < 0.01$

5 各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达比较(图 2) Western blot结果显示,与空白对照组比较,姜黄素组及 FOLFOX 组 Bcl-2 蛋白表达降低(相对值分别为 0.82 ± 0.02,0.72 ± 0.01),而 Bax 蛋白表达增高(相对值分别为 1.09 ± 0.02,2.36 ± 0.03),差异有统计学意义($P < 0.01$)。姜黄素联合 FOLFOX 组 Bcl-2 蛋白表达最低(相对值 0.39 ± 0.01),Bax 蛋白表达最高(相对值 3.18 ± 0.04),与姜黄素组及 FOLFOX 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注: A 为空白对照组;B 为姜黄素组;C 为 FOLFOX 组;D 为姜黄素联合 FOLFOX 组

图 2 各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达比较

讨 论

研究报道即便是早期诊断的胃癌患者,虽有超过 50% 的人数接受了手术治疗,但这些人群中仍有 60% 会出现局部复发或远处转移^[4]。因此包括化学治疗在内的综合治疗是当前胃癌治疗的研究方向。现今胃癌的化疗基本方案为 FOLFOX,其主要是通过抑制酶的活性、阻止 DNA 的合成及阻滞细胞周期、促进细胞凋亡而发挥细胞毒性作用。但同时存在不良反应多、价格昂贵、疗效有限等缺陷。寻找一种既能提高疗效,又不增加费用及不良反应的药物是目前国内外研究的热点。

姜黄(姜科)的主要活性成分姜黄素,至今没有发现任何可见的毒性,且取得容易、价格便宜,已被证明对多种肿瘤,如结肠癌、肝癌、卵巢癌、乳腺癌等具有增殖抑制和凋亡诱导作用^[3, 5-7]。Bielak-Żmijewska A 等^[8]研究发现,姜黄素可增强膀胱癌细胞对其他化疗药的敏感性。Patel BB^[3]等证实姜黄素能够协同 FOLFOX 方案诱导结肠癌细胞凋亡。但姜黄素联合 FOLFOX 能否增强对胃癌细胞的抑制作用目前尚未报道。本实验通过 CCK-8 法和 Hoechst 染色观察了姜黄素联合 FOLFOX 对胃癌 BGC-823 细胞增殖及凋亡的影响,结果显示联合用药能更好地发挥诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖的效应。

该实验进一步通过 Real-time PCR 及 Western blot 方法研究其机制,发现姜黄素联合 FOLFOX 可以有效增加 Bax 表达水平、与此同时降低 Bcl-2 表达;且 Caspase-3 试剂盒测定结果也发现联合用药能明显促进 Caspase-3 的活性。Bax 和 Bcl-2 是通过激活线粒体通路调节细胞凋亡的一对重要信号分子,在外界因素诱导下 Bax 激活/Bcl-2 失活可以协同促进线粒体膜电位降低,进而线粒体内外膜交换孔开放,促进细胞色素 C 等小分子物质释放到细胞质,通过活化 Caspase-3 激活核酸内切酶,导致细胞的凋亡^[9, 10]。可见,姜黄素联合 FOLFOX 方案诱导凋亡的机制与激活线粒体通路相关。

综上所述,姜黄素能促进 FOLFOX 诱导胃癌细胞凋亡,其机制与激活线粒体通路密切关联,其具体的作用靶点及体内实验有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Van Cutsem E. The treatment of advanced gastric cancer: new findings on the activity of the taxanes[J]. *Oncologist*, 2004, 9(Suppl 2): 9-15.
- [2] Louvet C, Andre T, Tigaud JM, et al. Phase II study of oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in locally advanced or metastatic gastric cancer patients[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(23): 4543-4548.
- [3] Patel BB, Sengupta R, Qazi S, et al. Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(2): 267-273.
- [4] Ajani JA. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer[J]. *Oncologist*, 2005, 10(Suppl 3): 49-58.
- [5] Xia Y, Jin L, Zhang B, et al. The potentiation of curcumin on insulin-like growth factor-1 action in MCF-7 human breast carcinoma cells[J]. *Life Sci*, 2007, 80(23): 2161-2169.
- [6] Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, et al. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(11): 3423-3430.
- [7] Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, et al. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, 34(1-2): 109-115.
- [8] Bielak-Żmijewska A, Piwocka K, Magalska A, et al. P-glycoprotein expression does not change the apoptotic pathway induced by curcumin in HL-60 cells[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 53(2): 179-185.
- [9] Xu JD, Cao XX, Long ZW, et al. BCL2L10 protein regulates apoptosis/proliferation through differential pathways in gastric cancer cells[J]. *J Pathol*, 2011, 223(3): 400-409.
- [10] Barrezueta LF, Oshima CT, Lima FO, et al. The intrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas of Brazilian patients: immunoeexpression of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bak, Bax, Bad) determined by tissue microarray analysis[J]. *Mol Med Report*, 2010, 3(2): 261-267.

(收稿:2012-07-19 修回:2013-01-14)