

消化系及腹部疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000565

姜黄素联合 FOLFOX 方案对胃癌细胞株 BGC-823 的抑制和诱导凋亡的作用

郑晓珂, 王利娟

(郑州大学第五附属医院肿瘤科, 郑州 450052)

【摘要】目的:探讨姜黄素联合 FOLFOX 方案(奥沙利铂/氟尿嘧啶方案)对胃癌细胞株 BGC-823 的增殖和凋亡作用以及可能发生的机制。**方法:**以胃癌细胞株 BGC-823 cell 为研究对象, 设置空白对照组、姜黄素组(10 $\mu\text{mol/L}$)、FOLFOX 组[5-FU (0.1 mmol/L)+奥沙利铂(5 mmol/L)]和姜黄素联合 FOLFOX 组 4 组, 采用 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率, Hoechst 染色观察细胞凋亡情况, real-time PCR 和 Western blot 分别检测 Bcl-2、Bax mRNA 和蛋白表达变化, Caspase-3 活性检测试剂盒测定 Caspase-3 活性。**结果:**①CCK8 显示, 与空白对照组比较, 各用药组均抑制 BGC-823 细胞的增殖, 姜黄素联合 FOLFOX 组的抑制作用最明显, 差异均有统计学意义($P<0.05$); ②Hoechst 染色结果显示, 各用药组凋亡细胞明显多于空白对照组, 姜黄素联合 FOLFOX 组凋亡细胞最明显; ③real-time PCR 和 Western blot 证实, 与空白对照组比较, 各用药组 Bcl-2 mRNA、Bcl-2 蛋白降低而 Bax mRNA、Bax 蛋白升高, 姜黄素联合 FOLFOX 组变化更明显, 差异均有统计学意义($P<0.05$); ④Caspase-3 活性检测证实, 各用药组 Caspase-3 活性均升高, 姜黄素联合 FOLFOX 组最高, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**姜黄素联合 FOLFOX 能抑制胃癌细胞株 BGC-823 细胞增殖, 诱导凋亡, 机制可能与 Bax 激活/Bcl-2 失活, 活化 Caspase-3 信号通路有关。

【关键词】姜黄素; 5-氟尿嘧啶联合奥沙利铂化疗方案; BGC-823; 增殖; 凋亡

【中图分类号】R73-36*1

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-09-02

Effect of curcumin combined FOLFOX regimen on proliferation inhibition and apoptosis-inducing of gastric carcinoma BGC-823

Zheng Xiaoke, Wang Lijuan

(Department of Oncology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of curcumin combined folinic acid fluorouracil oxaliplatin (FOLFOX) on proliferation inhibition and apoptosis-inducing of the gastric cell line BGC-823, and to explore its possible mechanisms. **Methods:** Gastric cancer cell line BGC-823 cells were divided into blank control group, curcumin group (10 $\mu\text{mol/L}$), FOLFOX group (5-FU 0.1 mmol/L + Oxaliplatin 5 mmol/L) and curcumin combined FOLFOX group. CCK-8 was used to detect the cell proliferation. Cell apoptosis was observed by Hoechst staining. The mRNA and protein expressions of Bcl-2 and Bax were measured by real-time quantitative PCR and Western blot. Caspase-3 vitality was tested by Caspase-3 test kit. **Results:** The proliferation inhibition rate of BGC-823 cell in curcumin combined FOLFOX group was significantly higher than those in other groups ($P<0.05$). Hoechst staining showed that apoptotic cells in medicated groups were higher than those in control group, being the most obvious in FOLFOX group. Compared with those in the control group, the expressions of Bcl-2 mRNA, Bcl-2 protein were decreased in other groups, while the expressions of Bax mRNA, Bax proteins were increased with statistically significant differences ($P<0.05$). Caspase-3 activity was also increased significantly in the medicated groups, especially in curcumin combined FOLFOX group ($P<0.05$). **Conclusion:** Curcumin combined FOLFOX could inhibit the proliferation and induce apoptosis of GC-823 cells, which was related with the activation Bax / inactivation Bcl-2 and the activation of Caspase-3.

【Key words】curcumin; 5-fluorouracil and oxaliplatin chemo-therapy; BGC-823; proliferation; apoptosis

作者介绍: 郑晓珂, Email: 905066116@qq.com,

研究方向: 恶性肿瘤综合治疗。

通信作者: 王利娟, Email: 805285637@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30900122)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150318.1531.001.html>

(2015-03-18)

胃癌是世界第 4 大恶性肿瘤,死亡率居高不下,目前,国内外胃癌指南均推荐采取以外科手术为主的综合治疗,近年来,越来越多的循证医学证据表明新辅助治疗或术后辅助治疗能进一步提高疗效和延长生存期。FOLFOX 方案是治疗结直肠癌的一线化疗方案^[1-2],研究表明 FOLFOX 方案治疗晚期胃癌的有效率可达到 46%~63%^[3],如何进一步提高疗效和减少不良反应,提高患者的化疗依从性是未来研究的方向。姜黄素是从姜科姜黄属植物根茎中提取的一种色素成分,研究认为其具有抗肿瘤的作用,可以增强化疗药物抗肿瘤效果且具有不良反应小的特点^[2]。本研究旨在探讨姜黄素联合 FOLFOX 方案作用于胃癌肿瘤细胞株 BGC-823,评价其协同抗肿瘤作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃腺癌细胞株 BGC-823 购自中科院上海细胞库,姜黄素(上海谱振生物科技有限公司),5-FU、奥沙利铂和四甲基偶氮唑蓝均购自 Sigma 公司,1640 培养基、Trizol 试剂购自 Gibco 公司、CCK-8 试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒和 PCR 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司,细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒,Caspase-3 活性检测试剂盒均购自杭州碧云天生物技术研究所,兔抗人 Bcl-2 及 Bax 多克隆抗体均购自 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CCK-8 法测定细胞增殖的抑制作用 将处于对数生长期的细胞,胰酶消化处理后,3 000 个/孔接种于 96 孔板中培养过夜,24 h 贴壁生长后加入含有药物的培养液干预,每组设置 5 个复孔,做 3 次平行实验。分为空白对照组、姜黄素组(10 μ mol/L)、FOLFOX 组[5-FU(0.1 mmol/L)+奥沙利铂(5 mmol/L)]和姜黄素联合 FOLFOX 组[姜黄素(10 μ mol/L)+5-FU(0.1 mmol/L)+奥沙利铂(5 mmol/L)]。继续培养 48 h 后,每孔加入 10 μ l CCK8 溶液,继续培养 1.5 h,应用 Thermo FC 全自动酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(A 值)。

1.2.2 Hoechst 染色显微镜下观察细胞凋亡 取洁净盖玻片在 70%酒精中浸泡 5 min,用无菌的 PBS 洗涤 3 次,再用细胞培养液洗涤 1 次,将盖玻片置于 6 孔板中,按 5 000 个/孔接种细胞,24 h 后,分别加入空白组(培养基)、姜黄素组、FOLFOX 组和姜黄素联合 FOLFOX 组,继续在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中 48 h 后,吸尽培养液,加入 4%多聚甲醛固定 10 min,去除固定液,PBS 洗涤 2 遍,每次 3 min,加入 0.5 ml Hoechst 染色液,染色 5 min,滴加 1 滴荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,封片,荧光镜下观察细胞凋亡情况。

1.2.3 Caspase-3 活性测定 将处于对数生长期的细胞,3 000 个/孔接种于 6 孔板中培养过夜,24 h 贴壁生长后,加

入含有药物的培养液干预 48 h,按 Caspase 3 活性检测试剂盒所附说明书进行操作,收集细胞,应用 GDYQ-MA100 酶标仪在 405 nm 下测定光吸收值,计算各组 Caspase-3 酶活性。

1.2.4 Real-time PCR 法检测 Bcl-2、Bax mRNA 分组及处理同 1.2.1,采用 TRIzol 一步法提取总 RNA。引物探针由上海闪晶分子生物科技有限公司设计合成。Bax 上游引物:5'-TTCTGACAGGCAACTTCAACTG-3';下游引物:5'-CAACC-ACCCTGGTCTTGGAT-3';Bcl-2 上游引物:5'-CGCAGA-GGGGCTACGAGT-3';下游引物:5'-GTTGACGCTCTCCACA-CACAT-3'; β -actin 上游引物:5'-CGTGGACATCCGCAAA-GAC-3',下游引物:5'-AAGAAAGGCTGTAACGCAACTAAG-3'。反转录及 PCR 严格按照说明书进行,结果采用 TL988 型实时荧光定量 PCR 仪(西安天隆科技有限公司生产)进行分析。

1.2.5 Western blot 法测定 Bcl-2、Bax 蛋白 分组及处理同上,收集各组样品,BCA 法测定每组蛋白样品的蛋白浓度。蛋白变性后采用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,选用 PVDF 膜转膜,Western 封闭液,室温封闭 60 min。加入 Bcl-2、Bax 一抗(1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 TBST 漂洗 10 min $\times$ 3 次后,加入 HRP 标记的二抗(1:2 000)孵育 2 h 后 TBST 漂洗 10 min $\times$ 3 次。ECL 化学法发显色,曝光,分析结果,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析处理。所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各分组细胞增殖抑制作用和 Caspase-3 活性的比较

与空白对照组比较,其他各组 A 值明显较低,各用药组均明显抑制胃腺癌细胞 BGC-823 的增殖,组间比较,姜黄素联合 FOLFOX 组的抑制作用最明显,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),表明两药具有协同抑制作用,48 h 最明显(表 1)。各用药组 Caspase-3 活性均比空白对照组高,均增强了对胃腺癌细胞 BGC-823 的凋亡;姜黄素联合 FOLFOX 组的增强作用最为明显,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)(表 1)。

表 1 各分组细胞增殖抑制作用和 Caspase-3 活性的变化
($\bar{x} \pm s, n=15$)

Tab.1 Changes of Caspase-3 activity and inhibition of cell proliferation in each group($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	A 值	Caspase-3 活性 (U)
空白对照组	1.20 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.02
姜黄素组	0.85 $\pm$ 0.01 ^{ab}	6.81 $\pm$ 0.03 ^{ab}
FOLFOX 组	0.37 $\pm$ 0.01 ^{ab}	11.50 $\pm$ 0.09 ^{ab}
姜黄素联合 FOLFOX 组	0.21 $\pm$ 0.02 ^a	20.61 $\pm$ 0.25 ^a

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与姜黄素联合 FOLFOX 比较, $P<0.05$ ($n=15$)

2.2 显微镜下细胞凋亡情况

荧光显微镜下观察,细胞变圆,细胞膜向内皱缩、胞浆浓缩、呈亮蓝色,致密浓染,细胞核固缩破裂呈团块状。Hoechst 染色实验结果显示,姜黄素组和 FOLFOX 组凋亡细胞明显多于空白对照组,但姜黄素联合 FOLFOX 组凋亡细胞最明显。见图 1。

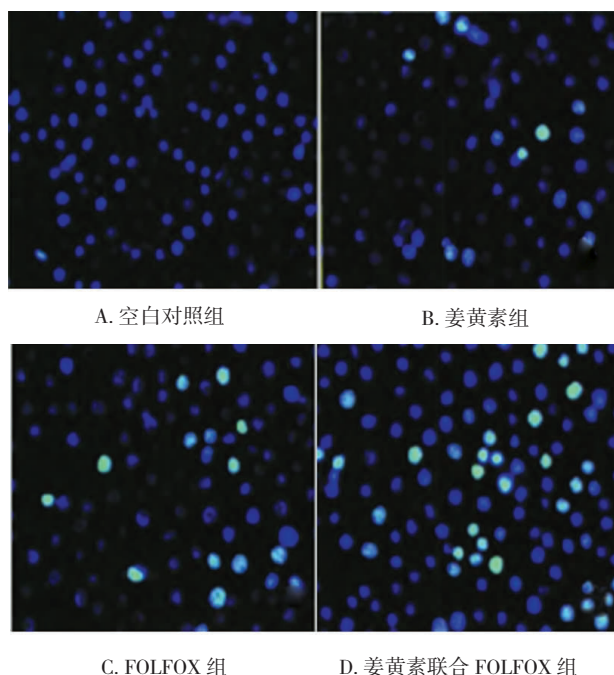


图 1 荧光显微镜下细胞凋亡的比较 (Hoechst 染色)

Fig.1 Comparison of cell apoptosis by fluorescence microscopy (Hoechst-staining)

2.3 Bcl-2、Bax mRNA 和蛋白表达的比较

与空白对照组比较,各用药组 Bcl-2 mRNA 均降低,Bax mRNA 均升高,但姜黄素联合 FOLFOX 组 Bcl-2 mRNA 表达最低,Bax mRNA 表达最高,差异均有统计学意义($P<0.05$);各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达测定显示,各用药组 Bcl-2 蛋白表达相对值降低,Bax 蛋白表达相对值增高,但姜黄素联合 FOLFOX Bcl-2 蛋白表达相对值最低,Bax 蛋白表达相对值最高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2、图 2。

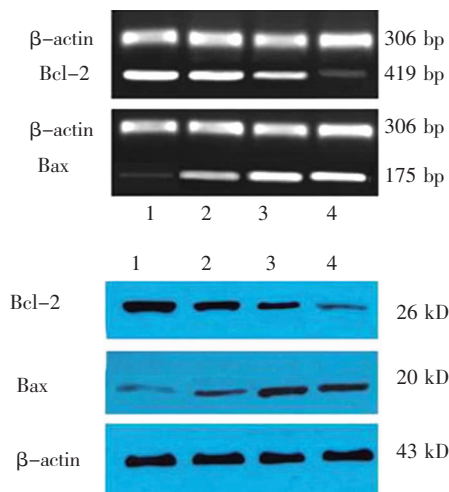


图 2 各分组 Bcl-2、Bax 蛋白表达 Western blot 图

Fig.2 Bcl-2 and Bax protein expression detected by Western blot

3 讨论

胃癌是世界范围内高发恶性肿瘤之一,死亡率较高,其发病隐匿,确诊时多属晚期,手术切除率 20%~30%左右,术后约有 60% 的患者发生复发和远处转移^[4]。化疗是肿瘤综合治疗的重要辅助治疗方法。目前,胃癌的基本化疗方案是 FOLFOX 方案,主要由奥沙利铂和 5-FU 组成,奥沙利铂是第 3 代的铂类抗癌化疗药物,其抗癌的作用主要通过对化合物的烷化,作用于 DNA,形成铂-DNA 加合物,促使 DNA 链的交联,干扰 DNA 的复制,导致细胞的死亡。5-FU 是胸苷酸合成酶抑制药,能在肿瘤细胞的各期发挥对细胞的抑制作用,奥沙利铂与 5-FU 联合应用具有协同作用。目前被推荐为晚期胃癌化疗的一线治疗方案,但是仍然存在因累积剂量增加而引起的外周感觉异常等不良反应,且存在临床疗效有限和价格昂贵等问题^[6]。探讨中药的抗癌作用及其

表 2 4 组 Bcl-2、Bax mRNA 和 Bcl-2、Bax 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=15$)

Tab.2 Expression levels of Bcl-2, Bax mRNA and Bcl-2, Bax protein in four groups($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	Bcl-2 mRNA ($\times 10^{-3}$)	Bax mRNA ($\times 10^{-3}$)	Bcl-2	Bax
空白对照组	3.56 ± 0.02	2.93 ± 0.02	0.87 ± 0.02	0.06 ± 0.01
姜黄素组	3.17 ± 0.01^{ab}	3.43 ± 0.03^{ab}	0.76 ± 0.02^{ab}	1.08 ± 0.02^{ab}
FOLFOX 组	2.89 ± 0.02^{ab}	5.61 ± 0.03^{ab}	0.74 ± 0.01^{ab}	2.34 ± 0.02^{ab}
姜黄素联合 FOLFOX 组	2.71 ± 0.02^a	5.71 ± 0.04^a	0.40 ± 0.01^a	3.19 ± 0.03^a

注:a,与空白对照组比较, $P<0.05$;b,与姜黄素联合 FOLFOX 比较, $P<0.05$ ($n=15$)

与化疗的联合应用效果,成为当前抗癌研究的主要热点和方向,具有重要的临床意义。

姜黄素是从姜科植物根茎中提取的一种有效植物多酚,体外实验表明,其对肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞的起抑制效应^[6],Lee 等^[7]动物实验证实,其对神经管细胞瘤也有抑制效应。本次研究应用 real time-PCR 和 Western blot 法,通过对各组胃腺癌细胞 BGC-823 的 Bcl-2 和 Bax 水平的表达比较各用药组的效果,发现姜黄素联合 FOLFOX 方案组可以更好的提高 Bax 的水平,而 Bcl-2 降低更加明显。应用 Caspase-3 试剂盒进行 Caspase-3 活性测定,联合用药组细胞 Caspase-3 活性更强。与国内周香等^[8]的研究报道相近。覃红斌等^[9]研究认为,姜黄素浓度达到 10 mg/L 以上时可产生剂量依赖性抑制肿瘤细胞的增殖,导致胃癌细胞的凋亡。细胞凋亡重要途径之一是线粒体凋亡途径,其中 Bcl-2/Bax 是一对重要的调节因子。Bcl-2 家族蛋白能直接调节通透性转换孔(permeability transition pore,PTP),影响线粒体细胞色素 C 的释放,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的失活和前凋亡蛋白 Bax 水平的激活促进线粒体膜电位的下降,导致 PTP 的开放,促进线粒体内细胞色素 C 释放进入细胞质,通过 Caspase-3 的作用激活 DNA 断裂因子,导致静息状态的核酸内切酶激活,最终引起 DNA 断裂,引起细胞凋亡^[10-11]。本次研究提示,姜黄素联合 FOLFOX 方案组促进肿瘤细胞的凋亡机制可能是通过线粒体的途径发挥作用。另有研究报道,姜黄素能促使自噬相关蛋白 Beclin 1 和 LC3 水平增高,凋亡相关蛋白 NF- κ B 上升,认为姜黄素可能是诱导细胞产生自噬性细胞凋亡;姜黄素可以抑制表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor,EGFR)及胰岛素样生长因子-1 受体(insulin-like growth factor-1 receptor,IGF-1R)而发挥作用,通过减少肿瘤干细胞而促进肿瘤细胞的凋亡;可能姜黄素是通过多种机制发挥作用^[2,12-13]。

本次研究是体外实验,其有效性还需要通过体内实验进一步证实,还需要通过动物实验研究其抑制胃癌细胞的效果和剂量水平的研究。本次研究探索了姜黄素联合 FOLFOX 方案组治疗的可能机制,

线粒体凋亡途径可能是姜黄素发挥作用的途径,姜黄素单独或联合 FOLFOX 方案的作用机制,尤其是联合用药不良反应如何都有待深入研究,为应用姜黄素等中医药开展抗胃癌治疗提供新的理论基础,为临床前研究提供科学的参考依据。

参 考 文 献

- [1] Nautiyal J,Kanwar SS,Yu Y,et al.Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells[J].Mol Signal,2011,20(6):7.
- [2] Yu Y,Kanwar SS,Patel BB,et al.Elimination of colon cancer stem-like cells by the combination of curcumin and FOLFOX[J].Transl Oncol,2009,2(4):321-328.
- [3] 于立江,潘月琴,马 德,等.紫杉醇联合 FOLFOX 方案在晚期胃癌二线化疗中的应用[J].肿瘤基础与临床,2013,26(6):535-536.
- [4] 丁 峰,杨 夙,王 巍,等.姜黄素诱导人胃癌 MGC-803 细胞凋亡的机制[J].中国老年学杂志,2012,32(12):2549-2551.
- [5] 曾冬香,毕延智,凌 扬,等.榄香烯乳注射液联合 FOLFOX4 方案治疗晚期胃癌的临床观察[J].临床肿瘤学杂志,2011,16(10):917-919.
- [6] 韦 达,俞 军,俞 乔.姜黄素对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖抑制作用及机制研究[J].山东中医药大学学报,2008,32(2):154-156.
- [7] Lee SJ,Krauthauser C,Maduskuie V,et al.Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo[J].BMC Cancer,2011,18(11):144.
- [8] 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):810-812.
- [9] 覃红斌,魏 蕾,张京伟,等.姜黄素诱导胃癌 BGC 细胞凋亡的作用及机制研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(11):1227-1229.
- [10] 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.
- [11] 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 Rep,2010,3(2):261-267.
- [12] 邓淑文,殷清华,苏 琦,等.姜黄素诱导人胃癌 SGC7901 细胞自噬性凋亡的研究[J].中国现代医学杂志,2012,22(31):30-32.
- [13] Patel BB,Gupta D,Elliott AA,et al.Curcumin targets FOLFOX-surviving colon cancer cells via inhibition of EGFRs and IGF-1R[J].Anticancer Res,2010,30(2):319-325.

(责任编辑:关蕴良)