

## 莪术油对直肠癌 SW1463 细胞株增殖、凋亡及 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

廖彬汛<sup>1</sup>, 唐超<sup>2</sup>, 潘年松<sup>3</sup>, 赵慧芳<sup>3</sup>, 罗俊<sup>2\*</sup>

1. 黔西南州人民医院, 贵州 兴义 562400

2. 贵州医科大学 药理教研室, 贵州 贵阳 550004

3. 遵义医药高等专科学校 药理学教研室, 贵州 遵义 563002

**摘要:** 目的 探讨莪术油对直肠癌 SW1463 细胞株增殖、凋亡及相关蛋白 Caspase-3、Bax、Bcl-2 表达的影响。方法 水蒸气蒸馏法提取黔产莪术挥发油, 配制成 40、80、120、160、200、240、280 mg/L 浓度梯度, 干预 SW1463 细胞 24、48、72 h, MTT 法检测莪术油对 SW1463 细胞的增殖抑制率; Giemsa 染色法观察莪术油对 SW1463 细胞凋亡形态的影响; 蛋白免疫印迹法 (Western blotting) 检测 Caspase-3、Bax 与 Bcl-2 蛋白表达。结果 莪术油对 SW1463 细胞的增殖有明显抑制作用, 并呈现时间-剂量相关性, 24、48、72 h 的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 144.33、134.11、120.04 mg/L; Giemsa 染色可见细胞明显的凋亡形态学特征; 莪术油干预 SW1463 细胞 24 h 后, 与对照组比较, Caspase-3、Bax 蛋白表达显著上调、Bcl-2 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.05$ )。结论 莪术油能明显抑制 SW1463 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与上调 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达、下调 Bcl-2 蛋白表达相关。

**关键词:** 直肠癌细胞; 莪术油; 细胞增殖; Caspase-3; Bax; Bcl-2; 细胞凋亡

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)07-0897-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.003

## Effects of zedoary turmeric oil on cell proliferation and apoptosis and Caspase-3, Bax, Bcl-2 protein expression in rectal carcinoma cell line SW1463

LIAO Bin-xun<sup>1</sup>, TANG Chao<sup>2</sup>, PAN Nian-song<sup>3</sup>, ZHAO Hui-fang<sup>3</sup>, LUO Jun<sup>2</sup>

1. QianXiNan People's Hospital, Xingyi 562400, China

2. Department of Pharmacology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

3. Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563002, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of zedoary turmeric oil on proliferation and apoptosis of SW1463 cell line and the expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2. **Methods** Volatile oil from *Curcuma Rhizoma* in Guizhou was extract by steam distillation, which was used to intervene SW1463 cells for 24, 48 and 72 h at concentration of 40, 80, 120, 160, 200, 240 and 280 mg/mL. MTT method was used to detect the inhibitory rate of zedoary turmeric oil on SW1463 cell proliferation. Effects of different concentrations of zedoary oil on apoptosis of SW1463 cells were observed by Giemsa staining. Western blotting was used to detect Caspase-3, Bax and Bcl-2 protein expression. **Results** Zedoary turmeric oil inhibited the proliferation of SW1463 cells and showed a time dose correlation, and half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of 24, 48 and 72 h was 144.33, 134.11 and 120.04 mg/L, respectively. Giemsa staining showed obvious morphological characteristics of apoptotic cells. Western blotting results showed that compared with control group, the expression of Caspase-3 and Bax in cells treated with zedoary turmeric oil for 24 h were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ), and the expression of Bcl-2 protein was significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Zedoary turmeric oil can obviously inhibit the proliferation of SW1463 cells and induce apoptosis, which may be related to the up-regulation of Caspase-3 and Bax protein expression and down-regulation of Bcl-2 protein expression.

**Key words:** rectal cancer cells; zedoary turmeric oil; cell proliferation; caspase-3; Bax; Bcl-2; cell apoptosis

收稿日期: 2017-02-21

基金项目: 贵州省厅校联合项目[黔科合 LG 字 (2011) 006 号]; 贵州省社会发展项目[黔科合 SY (2008) 3027 号]

作者简介: 廖彬汛 (1992—), 男, 在读硕士研究生, 主要研究方向为肿瘤药理学。Tel: 18886034794 E-mai: 1065700592@qq.com

\*通信作者 罗俊 (1963—), 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药药理学。Tel: 18685150822 E-mai: 724730885@qq.com

结直肠癌 (colorectal carcinoma, CRC), 是常见的下消化道恶性肿瘤之一, 占胃肠道肿瘤的第二位。结直肠癌在发达国家发病率居恶性肿瘤第三位, 死亡率居第二位, 我国结直肠癌发病率居第三位, 且近年来呈上升及年轻化趋势, 其复发、转移或死亡率接近 50%<sup>[1-3]</sup>。莪术为姜科姜黄属植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val.、广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 和温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎, 具有行气破血、消积止痛之功效<sup>[4]</sup>。现代药理研究表明, 莪术油具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎等广泛药理作用<sup>[5-6]</sup>。莪术油中含有大量的抗肿瘤活性成分<sup>[7]</sup>, 已有研究表明, 莪术油具有抗乳腺癌、肝癌、宫颈癌、直肠癌等作用<sup>[8-11]</sup>。莪术油作为一种植物来源的抗肿瘤药用组分, 在防治肿瘤方面具有极为广泛的应用前景。

大多数肿瘤的发生发展是由细胞增殖和凋亡调控失衡引起的, 因此, 抑制肿瘤生长, 治疗肿瘤可以通过药物诱导肿瘤细胞凋亡来实现, 临床上经常采用药物调控相关凋亡因子以达到治疗肿瘤的目的。Caspase-3、Bax、Bcl-2 在诱导肿瘤细胞凋亡中发挥着重要作用, Caspase 是一类蛋白酶家族, 成员较多, Caspase 与真核细胞凋亡密切相关, 并参与细胞的生长、分化与凋亡调节。目前认为 Caspase 是一切凋亡信号传导的共同通路, 在多种肿瘤细胞凋亡过程中均有 Caspase 活性的变化<sup>[12]</sup>, 许多研究表明, 药物或者某些生物因子所诱导的肿瘤细胞凋亡, 都是通过激活 Caspase 途径开始的。其中起核心作用的是 Caspase-3, Caspase-3 被激活后可裂解产生 17 kU 的活性亚单位, 后者进一步激活“Caspases 活化的核酸内切酶(CAD)”, 活化的 CAD 可切割 DNA, 导致细胞凋亡<sup>[13]</sup>。Bax、Bcl-2 均属于原癌基因 Bcl-2 基因家族, 其中 Bax 促进细胞凋亡; 而 Bcl-2 能抑制细胞凋亡。在多数肿瘤中, 上调 Bcl-2 或下调 Bax 能抑制肿瘤细胞凋亡, 反之, 下调 Bcl-2 或上调 Bax 则促进肿瘤细胞凋亡<sup>[14]</sup>。细胞中的 Bcl-2/Bax 表达比例与肿瘤的发生和发展有着密切的联系。

中药诱导肿瘤细胞凋亡治疗肿瘤是一个非常有效的治疗手段。大量研究表明, 莪术油对体外培养的多种肿瘤细胞均有较强的抑制作用, 能够破坏肿瘤细胞, 影响肿瘤细胞的核酸代谢, 从而诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[15-16]</sup>。但目前有关莪术油对直肠癌细胞

作用的报道较少, 故本实验从诱导肿瘤细胞凋亡的角度出发, 探讨黔产莪术油对肿瘤细胞中凋亡因子表达的影响, 阐述其对 SW1463 细胞的抑制作用及相关机制, 为莪术油抗直肠癌的临床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药物

黔产莪术, 购于遵义绿普森农业有限公司, 经遵义市食品药品检验所冯华研究员鉴定为广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang。莪术油, 是根据《中国药典》(2015 年版) 第四部通则 2204 挥发油测定法, 由黔产莪术鲜品经水蒸气蒸馏法提取得到的挥发油, 提取率为 0.7 mL/100 g, 吉马酮质量分数为 10.178%, 呋喃二烯质量分数为 12.236%, 符合药典标准, 无水硫酸钠干燥备用。

### 1.2 细胞株

人直肠癌 SW1463 细胞株, 由上海奥陆生物技术有限公司提供, 来源 ATCC, 批号 CCL-234。

### 1.3 主要试剂

BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液 (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号分别为 00121506、1014D); 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司, 批号 1618862); 噻唑蓝 (MTT)、姬姆萨染料 (Solarbio 公司, 批号分别为 705B059, 1128B024); DAB 显色试剂盒、Caspase-3、Bcl-2、Bax 兔多克隆抗体 (武汉博士德公司, 批号分别为 K163323C、BA0588、BAO412、BAO315); 内参 GAPDH 兔多克隆抗体 (Proteintech 公司, 批号 10494-1-AP); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥公司, 批号 109525)。

### 1.4 主要仪器

ZNHW 型电热套 (巩义市予华仪器厂); XS205 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多科学仪器有限公司); SK8300GT 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); 011007 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 2001HY-6003 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司); Centrifuge 5810R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); KJ-210A 型振荡器 (姜堰市康健医疗器具有限公司); ELx800-MV 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); DYY-7C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); IX71 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); TS-8 型转移脱色摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); Universal Hood II 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); Image Pro Plus 图像分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将 SW1463 细胞株接种于细胞培养瓶中, 加入 3 mL 含 10% FBS 的培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中进行传代培养。

### 2.2 MTT 法检测 Tween-80 对细胞增殖的影响

取对数生长期的 SW1463 细胞, 用 0.25% 胰酶液消化, 制成单细胞悬液, 调整细胞密度为  $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 按每孔 150  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板, 细胞培养 24 h 后弃去上清。将细胞分为阴性对照组 (不含聚山梨酯-80), 聚山梨酯-80 (0.002%、0.004%、0.006%、0.008%、0.010%、0.012%、0.014%、0.016% 的梯度体积浓度) 组, 每个梯度浓度组设 6 个平行复孔。各组加入含不同浓度药物的培养基 200  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h, 于培养结束前 4 h, 每孔加入 MTT 20  $\mu\text{L}$  (5 mg/mL), 培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 摇床低速振荡 10 min, 置于酶标仪上, 490 nm 波长测定吸光度 (A) 值。

### 2.3 MTT 法检测莪术油对 SW1463 细胞抑制作用

细胞培养同“2.2”项, 将细胞分为空白调零组 (仅加培养基)、对照组 (无血清培养基)、莪术油 (40、80、120、160、200、240、280 mg/L) 组。加入不同浓度药物, 分别培养 24、48、72 h, MTT 比色法检测药物对 SW1463 细胞的增殖抑制率, 采用 SPSS 17.0 软件通过回归法计算半数抑制率 (IC<sub>50</sub>)。细胞抑制率 =  $1 - (A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}})$ 。药物作用于细胞 24 h 就已经产生了明显的抑制作用, 半数抑制率 (IC<sub>50</sub>) 为 144.33 mg/mL, 因此选择药物作用 24 h, 浓度范围 80~200 mg/L 作进一步研究。

### 2.4 细胞的形态学观察

将对数生长期的 SW1463 细胞制成单细胞悬液, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^5/\text{mL}$  后接种于 24 孔板, 培养至对数生长期, 加入含不同浓度莪术油 (80、120、160、200 mg/L) 的培养液, 设对照组 (无血清培养基), 干预 SW1463 细胞 24 h, 倒置显微镜下观察各组细胞形态变化, 并采用 Giemsa 染色观察莪术油对细胞抑制作用及形态学的影响。

### 2.5 Western blotting 法检测相关蛋白表达

将 SW1463 细胞接种 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中, 加入 3 mL 含 10% FBS 的培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中进行传代培养。培养细胞至对数生长期, 不同浓度药物 (80、120、160、200 mg/L) 干预 SW1463 细胞 24 h, 对照组加入无血清

培养基。弃掉培养液, 收集细胞, 加入 RIPA 细胞裂解液冰浴裂解 30 min, 提取细胞总蛋白, 离心取上清备用, BCA 法测定蛋白含量, 定量成总体积 20  $\mu\text{L}$  含总蛋白 30  $\mu\text{g}$  的待测样品。SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 3% BSA 封闭 1 h 后, 加入一抗 GADPH (1:8 000)、Caspase-3 (1:100)、Bax (1:200)、Bcl-2 (1:200), 4 °C 过夜, TBST 漂洗, 加入山羊抗兔的二抗 (1:8 000), 常温孵育 1 h, 漂洗, 加入 ECL 工作液, 在凝胶成像仪上显色, 用凝胶图像处理系统分析条带的灰度值。

### 2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 聚山梨酯-80 对直肠癌 SW1463 细胞增殖的影响

聚山梨酯-80 浓度 < 0.012% 时, 各时间点内 A 值与阴性对照组比较无明显差异, 没有统计学意义, 表明在此浓度范围内聚山梨酯-80 对细胞的增殖并无明显影响。但当聚山梨酯-80 浓度  $\geq 0.012\%$  时聚山梨酯-80 组 A 值较阴性对照组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 表明对肿瘤细胞的增殖有抑制作用, 结果见表 1。

### 3.2 对直肠癌 SW1463 细胞增殖的影响

不同浓度莪术油分别干预细胞 24、48、72 h 后, 计算莪术油对 SW1463 细胞增殖的抑制率, 随着药物的浓度增高和作用时间的加长, 抑制率增大, 呈一定的时间剂量相关性, 与对照组比较差异显著。用 SPSS 17.0 软件计算出莪术油对 SW1463 细胞的 IC<sub>50</sub>, 24 h 为 144.33 mg/L、48 h 为 134.11 mg/L、72 h 为 120.04 mg/L。见表 2。

### 3.3 对直肠癌 SW1463 细胞形态学的影响

对照组 SW1463 细胞呈梭形或椭圆形, 贴壁生长, 细胞长势良好, 胞质均匀透明, 胞核清晰, 边界清楚。不同浓度的药物作用 SW1463 细胞 24 h 后, 细胞形态发生不同程度的改变, 80 mg/L 莪术油作用下细胞的数量开始减少, 细胞开始出现皱缩, 胞膜尚完整。随着质量浓度的升高, 细胞明显减少, 排列紊乱, 胞膜遭到破坏。高质量浓度时, 细胞大量死亡, 细胞稀少、皱缩, 形态呈不规则改变, 并可见漂浮的死细胞和细胞碎片。Giemsa 染色可见对照组细胞核染成蓝紫色, 胞浆染成粉红色, 随着药物质量浓度的增加, 胞膜慢慢开始被破坏, 细胞核开始固缩, 核染色着紫色, 呈固缩状或圆珠状, 有大量细胞核碎裂散布于胞浆中。见图 1。

表1 Tween-80 对 SW1463 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )Table 1 Effect of Tween-80 on proliferation of SW1463 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

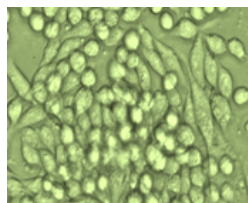
| 组别      | 浓度/%  | A 值          |               |               |
|---------|-------|--------------|---------------|---------------|
|         |       | 24 h         | 48 h          | 72 h          |
| 阴性对照    | —     | 0.380±0.025  | 0.290±0.018   | 0.127±0.007   |
| Tween-8 | 0.002 | 0.397±0.024  | 0.254±0.011   | 0.114±0.010   |
|         | 0.004 | 0.387±0.019  | 0.249±0.019   | 0.117±0.011   |
|         | 0.006 | 0.396±0.018  | 0.266±0.019   | 0.116±0.010   |
|         | 0.008 | 0.382±0.024  | 0.266±0.019   | 0.107±0.009   |
|         | 0.010 | 0.343±0.026  | 0.215±0.012   | 0.107±0.010   |
|         | 0.012 | 0.287±0.022* | 0.198±0.025** | 0.107±0.010*  |
|         | 0.014 | 0.255±0.026* | 0.195±0.016*  | 0.113±0.005** |
|         | 0.016 | 0.257±0.028* | 0.206±0.023** | 0.110±0.010** |

与阴性对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs negative control表2 莪术油对 SW1463 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )Table 2 Effect of zedoary turmeric oil on proliferation of SW1463 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

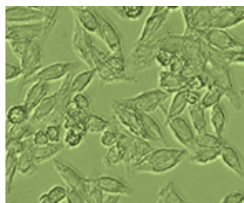
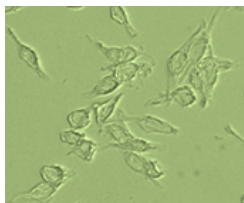
| 组别  | 浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 干预 24 h       |         | 干预 48 h       |         | 干预 72 h       |         |
|-----|--------------------------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|
|     |                          | A 值           | 细胞抑制率/% | A 值           | 细胞抑制率/% | A 值           | 细胞抑制率/% |
| 对照  | —                        | 1.197±0.017   | 0       | 1.060±0.031   | 0       | 1.322±0.014   | 0       |
| 莪术油 | 40                       | 1.028±0.043*  | 14.09   | 0.889±0.012*  | 16.04   | 1.079±0.008*  | 18.40   |
|     | 80                       | 0.835±0.016*  | 30.17   | 0.706±0.045*  | 33.38   | 0.830±0.013** | 37.22   |
|     | 120                      | 0.542±0.012*  | 54.68   | 0.463±0.012*  | 56.29   | 0.484±0.019** | 63.36   |
|     | 160                      | 0.411±0.008*  | 65.63   | 0.357±0.013** | 66.25   | 0.415±0.011** | 68.60   |
|     | 200                      | 0.374±0.007*  | 68.75   | 0.316±0.015** | 70.14   | 0.356±0.020** | 73.10   |
|     | 240                      | 0.326±0.025*  | 72.75   | 0.277±0.012** | 73.88   | 0.306±0.015** | 76.88   |
|     | 280                      | 0.253±0.014** | 78.86   | 0.194±0.014** | 81.64   | 0.200±0.008** | 84.91   |

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs blank group

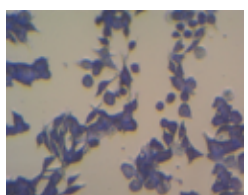
光学显微镜下直接观察:



对照组

莪术油 80 mg·L<sup>-1</sup>莪术油 120 mg·L<sup>-1</sup>莪术油 160 mg·L<sup>-1</sup>莪术油 200 mg·L<sup>-1</sup>

Giemsa 染色:



对照组

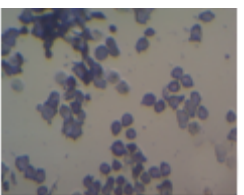
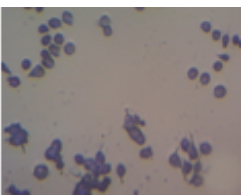
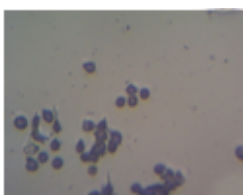
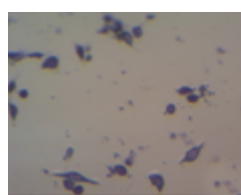
莪术油 80 mg·L<sup>-1</sup>莪术油 120 mg·L<sup>-1</sup>莪术油 160 mg·L<sup>-1</sup>莪术油 200 mg·L<sup>-1</sup>

图1 莪术油作用 SW1463 细胞 24 h 形态改变 (×200)

Fig. 1 Effect of 24 h processing with zedoary turmeric oil on SW1463 cell morphology (×200)

### 3.4 对 SW1463 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

不同浓度的莪术油 (80、120、160、200 mg/L) 干预 SW1463 细胞 24 h 后, 与对照组比较, 随着莪

术油质量浓度升高, 细胞内 Caspase-3 蛋白表达上调 ( $P<0.05$ ), Bcl-2 的蛋白表达下调, Bax 蛋白表达上调 ( $P<0.05$ ), Bcl-2/Bax 比值降低。结果见图 2。

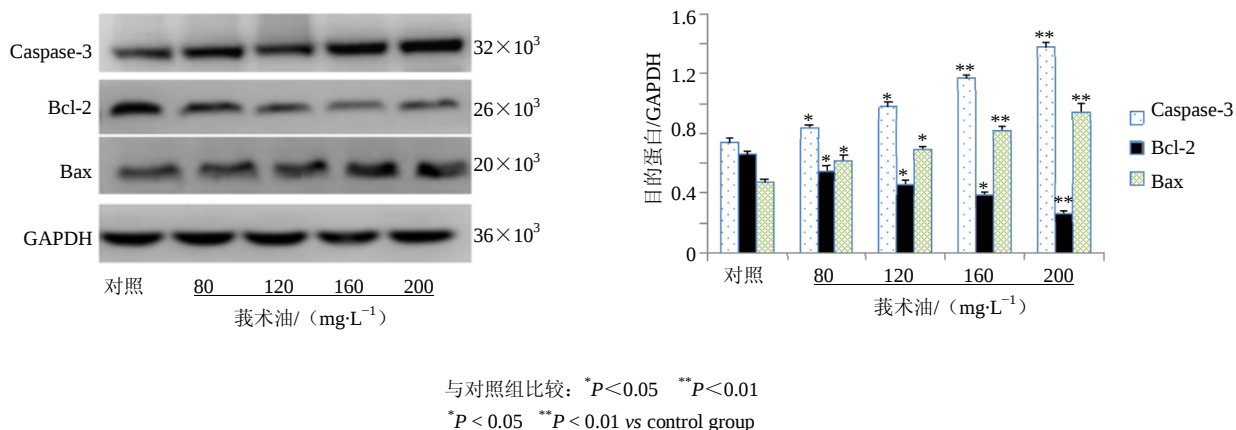


图 2 莪术油对 SW1463 细胞 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effects of zedoary turmeric oil on Caspase-3, Bcl-2 and Bax proteins expression in SW1463 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 4 讨论

目前结直肠癌的治疗是以手术为主<sup>[17]</sup>, 辅以化疗、中医中药治疗等<sup>[18]</sup>。中医治疗肿瘤显示出良好的效果及应用前景, 使其成为抗肿瘤治疗的有效手段之一<sup>[19]</sup>。抗肿瘤中药的种类繁多, 其中莪术油是抗肿瘤的代表性中药。其抗肿瘤机制主要有: 抑制肿瘤细胞增殖<sup>[20]</sup>、阻滞细胞周期<sup>[21]</sup>、诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[22]</sup>、遏制肿瘤转移<sup>[23]</sup>、抑制血管形成<sup>[24]</sup>, 逆转肿瘤细胞多药耐药性, 并且能够辅助其他化疗药物, 提高化疗疗效等, 除此之外, 还能通过增强机体的免疫功能发挥抗肿瘤作用<sup>[25]</sup>。

本研究通过体外培养直肠癌 SW1463 细胞, 采用莪术油干预, MTT 检测发现, 随着莪术油质量浓度增加, 干预时间的增长, 细胞抑制作用加强。表明黔产莪术油对直肠癌 SW1463 细胞增殖具有明显的抑制作用, 且呈一定的时间-剂量相关性。

肿瘤细胞的凋亡与细胞内的凋亡调节蛋白有着密切关系, 凋亡调节蛋白主要分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两大类<sup>[26]</sup>。在这些凋亡调节蛋白中, Bcl-2 家族在细胞凋亡调控中发挥重要作用, Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族中最主要的抑制和促进凋亡的蛋白<sup>[27]</sup>。Bcl-2 是 Bcl-2 家族中重要蛋白, 可抑制细胞凋亡; Bax 是 Bcl-2 同源基因, 可与 Bcl-2 形成异源二聚体, 促进细胞凋亡<sup>[28]</sup>, 在肿瘤发生和发展过程中, Bcl-2/Bax 被认为是调节肿瘤细胞凋亡的杠杆<sup>[29]</sup>, 其

值的高低与肿瘤细胞凋亡进展密切相关。邵淑丽<sup>[30]</sup>等的研究表明, 莪术油能够诱导肺癌 A549 细胞凋亡, 其机制可能与调节 Bcl-2、Bax 蛋白表达相关。本实验结果显示, 与对照组比较, 莪术油组 Bcl-2 蛋白表达量显著下调, Bax 蛋白表达量显著上调, 且 Bcl-2/Bax 明显降低。表明黔产莪术油可能通过下调 Bcl-2、上调 Bax 蛋白的表达, 抑制肿瘤细胞的生长, 诱导凋亡。

Caspases 是细胞凋亡的启动者和执行者, 其中 Caspase-3 蛋白是诱导肿瘤细胞凋亡的最重要因子, 在凋亡下游发挥重要作用<sup>[31-32]</sup>。目前已知的主要凋亡信号传导通路有线粒体通路、死亡受体通路, 均能激活凋亡因子 Caspase-3, 并可通过水解各种细胞成分使细胞凋亡<sup>[33]</sup>。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, Caspase-3 激活后, 可以令与细胞结构、细胞周期及 DNA 核酸复制等相关蛋白酶失活, 从而导致细胞凋亡, 同时 Caspase-3 活化可灭活 Bcl-2, Bcl-2 灭活后可促使细胞的功能和形态发生变化, 进一步诱导细胞凋亡。

本研究发现, 不同浓度莪术油干预 SW1463 直肠癌细胞 24 h 后, 显微镜下观察, 细胞形态发生不同程度的改变, 细胞的数量减少, 细胞回缩变小, 随着浓度升高, 细胞明显减少, 胞膜遭到破坏。高浓度时, 细胞大量死亡, 细胞稀少、皱缩, 形态呈不规则改变, 并可见漂浮的死细胞和细胞碎片。

Western blotting 检测发现,细胞内的 Caspase-3、Bax 随着药物浓度增高表达上调,Bcl-2 随着药物浓度增高表达降低,Bcl-2/Bax 降低,且莪术油组与对照组差异显著。因此,莪术油诱导直肠癌 SW1463 细胞凋亡可能与上调 Caspase-3、Bax 的表达和下调 Bcl-2 表达相关。

莪术油具有抗肿瘤、抗病毒、增强机体免疫等作用已经得到了大量的研究证实,近年来,人们对其药理、制剂、临床等方面也做了较为系统的研究,证实了莪术油是一个药理活性强、抗肿瘤疗效好、安全性高的药物。但是由于莪术油中成分较多,组分较为复杂,具有广泛的药理作用,其抗肿瘤的机制也较为复杂,本实验仅对其凋亡因子方面做了相关探讨,为进一步研究莪术油抗直肠癌提供实验依据。

#### 参考文献

- [1] 李明,顾晋. 中国结直肠癌 20 年来发病模式的变化趋势 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2006, 7(3): 214-217.
- [2] 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范 (2015 版) [J/CD]. 中华普通外科学文献: 电子版, 2015, 9(6): 506-523.
- [3] Ro T H, Mathew M A, Misra S. Value of screening endoscopy in evaluation of esophageal gastric and colon cancers [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(33): 9693-9706.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] Gupta S C, 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.
- [6] 赵志梅, 张立杰, 夏天, 等. 莪术主要单体成分抗炎、抗肿瘤作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 119-124.
- [7] 黄臣虎, 陆茵, 孙志广, 等. 莪术抗癌作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1745-1747.
- [8] 宋爱莉, 许振国. 莪术油对大鼠乳腺癌前病变组织中 VEGF mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 19(4): 679-681.
- [9] 王佳丽, 王秀, 夏泉, 等. 莪术油中 3 种倍半萜类化合物对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 中成药, 2014, 36(7): 1535-1539.
- [10] 张卫霞, 罗俊, 潘年松, 等. 莪术油对宫颈癌荷瘤裸鼠凝血功能及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 河南中医, 2015, 35(9): 2051-2053.
- [11] 许政旭, 朱诗国, 罗俊, 等. 莪术油对人直肠癌细胞株 SW1463 细胞增殖及免疫因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, (13): 102-106.
- [12] Xing Q, Wang B, Su H, et al. Elevated Th17 cells are accompanied by FoxP<sup>3+</sup> Treg cells decrease in patients with lupus nephritis [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(4): 949-958.
- [13] Niu Q, Cai B, Huang Z C, et al. Disturbed Th17/tregbalance in patients with rheumatoid arthritis [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(9): 2731-2736.
- [14] 杨连君. bcl-2, bax 与肿瘤细胞凋亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3): 232-234.
- [15] 王德立. 中药莪术研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(11): 3240-3242.
- [16] 吴海霞, 孙志明, 王勤. 莪术油的药理学研究及临床应用研究进展概况 [J]. 中国中医药导刊, 2011, 13(1): 79-83.
- [17] 蒋益兰, 赵晔, 程小燕. 结直肠癌术后中医药治疗现状概述 [J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(1): 113-114.
- [18] 李晓琳, 马婧. 中西医结合治疗结直肠癌的临床研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(3): 323-325.
- [19] 李宇飞, 李华山. 结直肠肿瘤中医药治疗的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, (36): 3748-3753.
- [20] Sun Y, Liu G, Zhang Y, et al. Synthesis and in vitro anti-proliferative activity of beta-elemene monosubstituted derivatives in HeLa cells mediated through arrest of cell cycle at the G1 phase [J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(3): 1118-1124.
- [21] 王为兰, 索菲娅, 苟萍, 等. 大蒜有机硫化物抗肿瘤分子机制的研究进展 [J]. 中成药, 2012, 34(4): 719-722.
- [22] Zhao Y S, Zhu T Z, Chen Y W, et al.  $\beta$ -elemene inhibits Hsp90/Raf-1 molecular complex inducing apoptosis of glioblastoma cells [J]. J Neurooncol, 2012, 107(2): 307-314.
- [23] 顾喜喜, 锁涛, 杨云柯, 等. 榄香烯预防胃癌 HGC-27 裸鼠腹腔转移的研究 [J]. 中国临床医学, 2011, 18(5): 603-605.
- [24] 许振国, 宋爱莉, 殷玉琨, 等. 莪术油对大鼠乳腺癌前病变组织 VEGF mRNA 表达的影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(8): 570-574.
- [25] Xu H B, Li L, Fu J, et al. Reversion of multidrug resistance in a chemoresistant human breast cancer cell line by  $\beta$ -elemene [J]. Pharmacology, 2012, 89(5-6): 303-312.
- [26] 李娜, 高俊岩, 刘敏. 细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展 [J]. 当代医学, 2009, 15(16): 13-14.

- [27] Babu P P, Suzuki G, Ono Y, et al. Attenuation of ischemia and/or reperfusion injury during myocardial infarction using mild hypo-thermia in rats: an immunohistochemical study of bcl- 2, bax, Bak and TUNEL [J]. *Pathol Int*, 2004, 54(12): 896-903.
- [28] Yuen H Y, Chan K K, Grills C, et al. Ran is a potential therapeutic target for cancer cells with molecular changes associated with activation of the PI3K/AKT/m TORC1 and Ras/MEK/ERK pathways [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(2): 380-391.
- [29] Oberst A, Bender C, Green D R. Living with death; the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals [J]. *Death Differ*, 2008, 15(7): 1139.
- [30] 邵淑丽, 李怀永, 孙宏岩, 等. 莪术油对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, (9): 1300-1307.
- [31] Oberst A, Pop C, Tremblay A G, et al. Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in Caspase-8 activation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(22): 16632-16642.
- [32] Pop C, Salvesen G S. Human caspases: activation, specificity, and regulation [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 21777-21781.
- [33] Hail N J, Carter B Z, Konopleva M, et al. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(6): 889-904.