

具有高水解稳定性的姜黄素类似物的抗多药耐药肿瘤作用研究

张 峰¹, 陈敬清², 岑 娟², 陈笑鸽², 丁秀秀², 吴春蕊^{2*}

1. 河南大学药学院, 河南 开封 475004

2. 河南大学 天然药物与免疫工程重点实验室, 河南 开封 475004

摘要: **目的** 探讨具有较好水解稳定性的姜黄素结构类似物的抗多药耐药肿瘤活性及机制。**方法** 对人白血病多药耐药细胞 K562/A02 孵育姜黄素及其类似物 1~19, MTT 法筛选其对 K562/A02 细胞的生长抑制作用; 高效液相色谱法测定姜黄素及其类似物 3、4 的水解稳定性; 流式细胞术检测姜黄素及其类似物 3、4 对 K562/A02 细胞凋亡、线粒体膜电位 (MMP)、活性氧 (ROS) 量及细胞周期分布的影响; 分光光度法检测 K562/A02 细胞 caspase-3 活性变化; Western blotting 法检测 K562/A02 细胞 P-糖蛋白 (P-gp) 表达、荧光法检测 K562/A02 细胞内阿霉素的累积效应。**结果** 姜黄素结构类似物 3、4 与姜黄素对 K562/A02 细胞的生长抑制作用相近, 但类似物 3、4 水解稳定性较姜黄素有显著增高; 与对照组比较, 姜黄素及其类似物 3、4 均能够通过降低 K562/A02 细胞 MMP、增加 caspase-3 活性促进细胞凋亡, 但此过程中细胞内 ROS 并未显著增加; 姜黄素及其类似物 3、4 可显著降低 K562/A02 细胞 G₂/M 期和 S 期的细胞比例, 亚二倍体增加; Western blotting 结果显示姜黄素及其类似物 3、4 对 P-gp 有显著下调作用, 可增加细胞内阿霉素的累积。**结论** 姜黄素结构类似物 3、4 具有较高的水解稳定性, 且保持了姜黄素的抗多药耐药肿瘤活性。

关键词: 姜黄素; 结构类似物; 水解稳定性; 多药耐药; 凋亡; P-糖蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)12-1736-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.016

Study on curcumin analogues with high hydrolytic stability against multidrug-resistant tumor

ZHANG Feng¹, CHEN Jing-qing², CEN Juan², CHEN Xiao-ge², DING Xiu-xiu², WU Chun-rui²

1. College of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China

2. Key Laboratory of Natural Medicine and Immuno-Engineering, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanisms of a series of curcumin analogues with better hydrolytic stability on multidrug-resistant tumor. **Methods** Human leukemia multi-drug resistant K562/A02 cells were incubated with curcumin and its analogues 1–19. MTT method was applied for screening the inhibition on the growth of K562/A02 cells; HPLC was used to detect the hydrolytic stability of curcumin and its analogues 3 and 4; The effects of curcumin and its analogues 3 and 4 on apoptosis, mitochondrial membrane potential (MMP), reaction oxygen species (ROS) content, and cell cycle distribution of K562/A02 cells were measured by flow cytometry; Spectrophotometric method was used to detect the caspase-3 activity; The expression of P-glycoprotein (P-gp) was assayed by Western blotting; Fluorometric method was applied to evaluating the intracellular Adriamycin accumulation of anti-tumor drug. **Results** Analogues 3 and 4 exhibited the inhibitory effect on the growth of K562/A02 cells as similar as that of curcumin, but their hydrolytic stability was significantly higher than that of curcumin. Compared with the control group, curcumin and its analogues 3 and 4 could significantly promote apoptosis by reducing MMP and increasing caspase-3 activity of K562/A02 cells, but no obvious increase in intracellular ROS was found. In addition, the cell proportion of K562/A02 cells in G₂/M and S phases was significantly reduced in the presence of curcumin and its analogues, while the hypodiploid increased. Besides, Western blotting indicated that the P-gp was significantly downregulated with an increase of intracellular anti-tumor drug accumulation. **Conclusion** The analogues 3 and 4 of curcumin have the better hydrolytic stability than that of curcumin, while the anti-resistant tumor activity is maintained.

Key words: curcumin; analogues; hydrolytic stability; multidrug-resistance; apoptosis; P-glycoprotein

收稿日期: 2013-12-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1204830); 教育部留学归国人员科研启动基金; 河南省教育厅科学技术研究重点项目资助计划项目 (13A310064)

*通信作者 吴春蕊 (1979—), 女, 副教授, 研究方向为天然成分结构修饰。Tel: (0378)2864665 E-mail: cwu@henu.edu.cn

中医认为,姜黄 *Curcuma longa* L. 性温,味辛、苦,归脾、肝经,具有破血行气、通经止痛之功效。当代药理学研究表明,姜黄素(curcumin)是姜黄的主要活性成分,具有显著的抗炎、抗氧化、抗肿瘤活性,且其毒性较低,临床研究表明每人每天口服 12 g 姜黄素仍无毒副作用^[1]。姜黄素用于治疗胰腺癌、多发性骨髓瘤等疾病已进入了临床试验阶段,研究表明其抗肿瘤作用可能与诱导凋亡有关。然而姜黄素不稳定、易降解,对其进行质量控

制有一定难度,也大大降低了其生物利用度,限制其临床应用。研究发现加入一定量的去甲氧基姜黄素或十二烷基硫酸钠,可提高姜黄素的稳定性^[2]。但添加剂的使用不仅增加了生产成本,而且带来了各种不安全的隐患。因此,本课题组对姜黄素不稳定部分进行结构改造^[3],获得姜黄素的结构类似物 1~19 (图 1),通过抗耐药肿瘤活性筛选,拟获得稳定性较高且能够保留优势活性的姜黄素结构类似物。

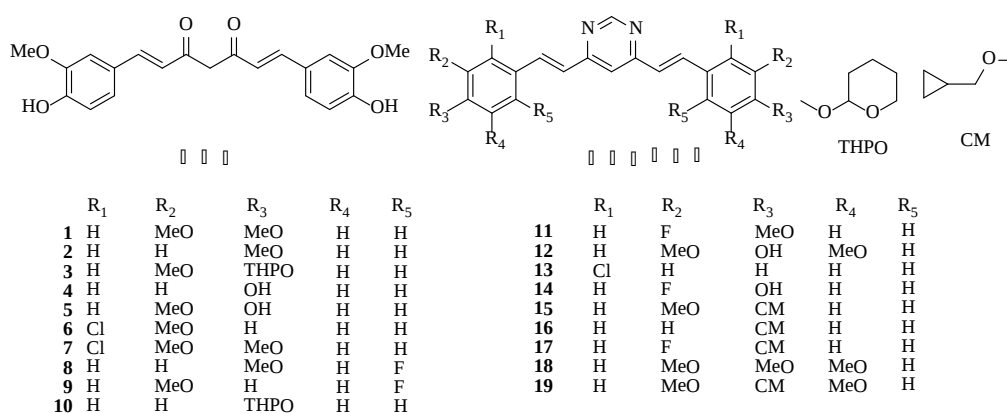


图 1 姜黄素及姜黄素结构类似物的结构

Fig. 1 Chemical structures of curcumin and its analogues

1 材料

1.1 药物与试剂

链霉素、青霉素、MTT、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCF-DA)、姜黄素(质量分数 95%)为 TCI 公司产品;姜黄素类似物 1~19 均为自制,质量分数>98%。胎牛血清购于杭州四季青公司,PRMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品,Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、caspase-3 活性检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、蛋白定量检测试剂盒均为南京凯基生物科技有限公司产品;P-糖蛋白(P-gp)、β-actin 抗体和 IgG-HRP 二抗为美国 Santa Cruz 公司产品;所用化学试剂均为市售分析纯。阳性药阿霉素、长春新碱及紫杉醇均为阳性对照药品,为 Sigma 公司产品。

1.2 细胞

人红细胞系白血病细胞 K562 及其耐药株 K562/A02 细胞购自天津血液病研究所。

1.3 仪器

TACS Calibur 流式细胞仪(Becton Dickinson); Agilent 1100 型高效液相色谱仪(Agilent);高内涵

活细胞成像系统(Thermo Scientific); LDZX 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); Thermo Barnstead NANO pure DlamondUV/UF 超纯水系统(Thermo Scientific); PB-21 型 pH 计(Sartorius AG); TGL-18B-C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);高速低温台式离心机(Thermo Scientific); 3121 型二氧化碳培养箱(Thermo Scientific); ZHJH-C1112 型超净工作台(上海智诚分析仪器制造有限公司);倒置生物显微镜(宁波舜宇仪器有限公司);QL-861 型旋涡混合器(海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 MTT 细胞毒实验

K562 及其耐药株 K562/A02 细胞接种至 96 孔板(每孔 3 000 个细胞),阳性药组加入相应浓度(1、10、100 μmol/L)的阿霉素、长春新碱及紫杉醇,受试药物组分别加入不同浓度(1、10、100 μmol/L)的姜黄素及其结构类似物 1~19,对照组加入等体积的生理盐水。48 h 后,每孔加入 0.5 mg/mL MTT 反应 4 h,离心、弃去培养液,加入二甲基亚砷

(DMSO) 100 μ L 溶解结晶, 酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞生长抑制率, 每个浓度设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 姜黄素类似物水解稳定性的检测

对结构改造获得的化合物 **1~19** 采用紫外分光光度法检测其水解稳定性^[4], 结果表明各化合物 48 h 降解率均在 15% 以内。根据 MTT 细胞毒性实验结果发现, 仅有类似物 **3**、**4** 基本保留了姜黄素对耐药细胞的抑制活性, 其他化合物尽管稳定性高, 但并无进一步研究开发的价值。因此, 采用 HPLC 法进一步验证姜黄素类似物 **3**、**4** 的水解稳定性^[5]。精确称量姜黄素及结构类似物 **3**、**4** 用 DMSO 溶解, 配制 10 mmol/L 备用母液。每种样品配制 A、B、C 3 种溶液: A, 取 10 μ L 母液, 用无水乙醇定容至 5 mL, 配制终浓度为 20 μ mol/L 乙醇溶液, 作为对照溶液; B, 取 10 μ L 母液, 用 50% 无水乙醇和 50% 磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 定容至 5 mL, 配制终浓度为 20 μ mol/L 的 50% 乙醇溶液; C, 配制方法同 B, 配制完成后并经 37 $^{\circ}$ C、48 h 降解即得。实验需先配制 C 溶液, 置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内放置 48 h, 样品取出前配制 B 溶液, HPLC 法测定, 计算降解率。色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-异丙醇-水-冰醋酸 (20:27:48:5); 体积流量 0.5 mL/min, 柱温为室温; 进样量 20 μ L; 姜黄素、姜黄素衍生物 **3**、**4** 的检测波长分别为 426、380、374 nm。

降解率 = (B 组溶液的峰面积 - C 组溶液的峰面积) / B 组溶液的峰面积

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 10 μ mol/L 姜黄素及筛选出的水解稳定性高且具有较好抗耐药肿瘤细胞活性、对正常细胞无毒性的姜黄素结构类似物 **3**、**4** 处理 K562/A02 细胞 48 h, 离心, 收集细胞, 弃上清液, 用冰 PBS 洗 2 遍, 离心后, 加入 500 μ L 结合缓冲液重悬。分组置于不同 EP 管中, 先加入 5 μ L Annexin V/FITC, 再加入 5 μ L PI, 振荡混匀, 避光放置于 37 $^{\circ}$ C 条件下 30 min, 转移至流式细胞检测管后上流式细胞仪检测。使用 BD FACSDiva Software 软件采集样本并进行数据分析。

2.4 Caspase-3 活性的检测

取对数生长期的 K562/A02 细胞, 以 1×10^5 /mL 密度接种于 50 mL 培养瓶中, 受试化合物组中加入 10 μ mol/L 的姜黄素及姜黄素类似物 **3**、**4**, 对照组给

予等体积的 PBS。培养 48 h 后离心收集细胞, 用 PBS 洗涤后个样本加入 50 μ L 冰冷的 Lysis 缓冲液, 置冰上裂解, 经 4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清 BCA 法测定蛋白浓度; 吸取含 200 μ g 蛋白的细胞裂解液, 并用 Lysis 缓冲液补足至 50 μ L, 加入 50 μ L 2 $\times$ Reaction 缓冲液, 再加入 5 μ L caspase-3 的底物于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h, 用酶标仪在 405 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。实验重复 3 次。

2.5 线粒体膜电位的检测

通过 JC-1 染色法检测线粒体膜电位 (MMP)。参照线粒体膜电位检测试剂盒操作, 将 K562/A02 细胞按照 1×10^6 /mL 的密度接种于 50 mL 培养瓶中, 10 μ mol/L 的姜黄素及姜黄素类似物 **3**、**4** 孵育 48 h 后胰酶消化、离心收集细胞, 收集的细胞用新鲜配制终质量浓度为 5 μ g/mL 的 JC-1 工作液于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。用 PBS 洗涤细胞清除多余的染料, 流式细胞术检测细胞偶联的荧光强度。

2.6 细胞内活性氧 (ROS) 的检测

取对数生长期的 K562/A02 细胞以 1×10^6 /mL 的密度接种于 50 mL 培养瓶中, 10 μ mol/L 的姜黄素及姜黄素类似物 **3**、**4** 分别作用 48 h 后收集细胞, 加入终浓度为 100 μ mol/L 的荧光探针 DCF-DA, 避光、37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。细胞用 PBS 洗涤 3 次, 并用 1 mL PBS 重悬。流式细胞仪在激发波长为 488 nm 和发射波长为 530 nm 下检测荧光强度, 指示细胞内 ROS 的量。

2.7 流式细胞仪分析细胞周期

取对数生长期细胞, 经 10 μ mol/L 的姜黄素及姜黄素类似物 **3**、**4** 作用 48 h 后, 离心收集细胞, 将细胞在 70% 的冰乙醇中于 4 $^{\circ}$ C 固定 12 h, 然后离心除去乙醇, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 100 μ g/mL RNA 酶溶液 150 μ L 中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 加入终质量浓度为 100 μ g/mL 的 PI 溶液室温避光孵育 15 min, 用流式细胞仪分析, 激发波长 488 nm, 发射波长 615 nm。使用软件根据细胞 FL2-A 的荧光道数进行 DNA 倍体分析, 分析时通过设门法去除细胞碎片和细胞团块的干扰。

2.8 Western blotting 检测 P-gp 的表达

以 10 μ mol/L 的姜黄素及姜黄素类似物 **3**、**4** 处理 K562/A02 细胞 48 h, 收集细胞 PBS 洗涤 2 次, 加 100 μ L 含 PMSF 的裂解液冰上裂解 30 min, 其间反复吹打 3~4 次, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清按照 BCA 蛋白测定试剂盒说明书检测

蛋白质的量。样品与等体积 $2\times$ 加载缓冲液混匀, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min , 6% SDS-PAGE 电泳, 转移蛋白至 PVDF 膜, 将 PVDF 膜浸润在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中 1 h , 加入特异性一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h , 最后加入发光底物 X 射线曝光显示目的蛋白条带。

2.9 荧光法检测细胞内阿霉素的累积

取对数生长期的 K562/A02, 以 $5\times 10^3/\text{mL}$ 密度接种于预先处理过的 96 孔培养板中, 每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$, 受试化合物组中分别加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 姜黄素及姜黄素类似物 **3**、**4**, 药物作用 48 h 后, 离心去除药物, 再加入终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 阿霉素和 Hoechst 33342 ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$) 染色 30 min , 用 PBS 洗 3 次, 应用高内涵活细胞成像系统的 Target Activation BioApplication 软件进行分析^[6]。

2.10 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 12.0 统计软件处理数据, 两样本均数比较采用 t 检验, 多组间均数比较采用方差分析。

3 结果

3.1 姜黄素及其类似物的对肿瘤细胞生长的影响

姜黄素对 K562 细胞的生长抑制率高于等浓度阿霉素的作用, 但弱于长春新碱与紫杉醇的作用; 姜黄素结构类似物 **1**~**5**、**8**、**10**~**11**、**16**~**17** 对 K562 细胞的生长抑制率高于姜黄素组, 见表 1。对多药耐药细胞 K562/A02, 姜黄素及其类似物在 10 、 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时对细胞生长的抑制率强于阿霉素的作用, 但稍弱于长春新碱的作用, 其中姜黄素结构类似物 **3**、**4** 作用较强, 与各浓度下姜黄素的抗耐药肿瘤活性相似, 见表 2。此外, 撤药 1 周后, 显微镜观察发现姜黄素组细胞逐渐恢复生长, 类似物 **3**、**4** 组则出现细胞生长的持续抑制效应。

3.2 姜黄素及其类似物的水解稳定性

实验结果显示, 姜黄素在有水溶剂中易分解, 经结构改造后, 姜黄素结构类似物分解率极显著下降 ($P<0.001$), 提示结构改造成功。HPLC 法测得姜黄素及其结构类似物 **3**、**4** 的降解率分别为 $(30.59\pm 1.09)\%$ 、 $(5.24\pm 0.77)\%$ 、 $(2.01\pm 0.58)\%$ 。此外, 姜黄素、姜黄素结构类似物 **3**、**4** 在无水乙醇 (溶液 A) 中最大吸收波长分别为 426 、 380 、 374 nm , 而在 50% 乙醇溶液 (溶液 B、C) 中最大吸收红移至 430 、 384 、 376 nm , 这与溶剂极性增强有关。

表 1 姜黄素及其类似物对 K562 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Inhibition of curcumin and its analogues on growth of K562 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	生长抑制 率 / %	组别	C/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	生长抑制 率 / %
阿霉素	10	23.47 ± 1.22	9	10	32.27 ± 1.33
长春新碱	10	$88.32\pm 2.33^{##}$	10	10	$43.26\pm 1.03^{##}$
紫杉醇	10	$74.53\pm 3.45^{##}$	11	10	$49.45\pm 2.10^{##}$
姜黄素	10	33.98 ± 1.09	12	10	35.09 ± 0.89
1	10	$42.93\pm 1.67^{##}$	13	10	33.67 ± 1.21
2	10	$38.92\pm 0.89^{##}$	14	10	29.94 ± 0.77
3	10	$49.87\pm 2.11^{##}$	15	10	33.33 ± 2.46
4	10	$52.12\pm 2.12^{##}$	16	10	$56.65\pm 1.57^{##}$
5	10	$49.66\pm 1.37^{##}$	17	10	$61.38\pm 3.11^{##}$
6	10	29.89 ± 0.77	18	10	24.98 ± 1.89
7	10	15.02 ± 0.52	19	10	26.05 ± 1.52
8	10	$39.31\pm 2.12^{##}$			

与姜黄素组比较: $^{##}P<0.01$

$^{##}P<0.01$ vs curcumin group

3.3 姜黄素及其类似物的凋亡诱导作用

如表 3 所示, 双染结果表明 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素及其类似物 **3**、**4** 对耐药细胞 K562/A02 主要通过凋亡诱导作用产生细胞毒性, 晚期凋亡及坏死的细胞比例较晚期凋亡比例低。在同样浓度下, 类似物 **3**、**4** 的作用均优于姜黄素的作用。

3.4 姜黄素及其类似物的凋亡诱导特点

图 2 结果表明, 姜黄素与其类似物 **3**、**4** 对 K562/A02 细胞有较强的 caspase-3 激活作用 (图 2-A), 其诱导的凋亡作用与细胞内 MMP 显著下降有关 (图 2-B), 但姜黄素作用细胞后细胞内 ROS 并未发现显著升高 (图 2-C), 提示姜黄素并不通过增加细胞内 ROS 发挥促凋亡作用。而姜黄素类似物 **3**、**4** 对细胞内 ROS 反而有一定的降低作用, 推测此作用可能与其抗氧化能力有关。

3.5 姜黄素及其类似物对细胞周期的影响

如表 4 所示, $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素及其类似物 **3**、**4** 对 K562/A02 细胞 G_0/G_1 期无显著影响, 但均能减少处于 G_2/M 期和 S 期的细胞比例, 相应亚二倍体量增加, 指示细胞凋亡增强, 此结果与 Annexin V/FITC-PI 双染结果一致: 姜黄素与其类似物 **3**、**4** 均可显著增加细胞凋亡, 且类似物 **3**、**4** 作用较强。

表2 姜黄素及其类似物对 K562/A02 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Inhibition of curcumin and its analogues on growth of K562/A02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	生长抑制率 / %	组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	生长抑制率 / %	组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	生长抑制率 / %
阿霉素	1	31.95 $\pm$ 1.22 ^{##}	5	1	31.74 $\pm$ 1.44 ^{##}	13	1	37.51 $\pm$ 0.57 ^{##}
	10	28.91 $\pm$ 1.11		10	31.57 $\pm$ 1.39		10	42.55 $\pm$ 0.44 ^{##}
	100	34.96 $\pm$ 0.91		100	46.07 $\pm$ 2.11		100	83.44 $\pm$ 2.83
长春新碱	1	29.47 $\pm$ 1.62 ^{##}	6	1	23.20 $\pm$ 1.56 ^{##}	14	1	37.96 $\pm$ 0.46 ^{##}
	10	48.24 $\pm$ 2.44 ^{##}		10	35.66 $\pm$ 3.24		10	33.75 $\pm$ 0.48
	100	96.43 $\pm$ 4.47		100	38.69 $\pm$ 1.82		100	22.89 $\pm$ 3.12
紫杉醇	1	22.95 $\pm$ 0.47 ^{##}	7	1	16.28 $\pm$ 0.67	15	1	26.65 $\pm$ 2.32 ^{##}
	10	43.32 $\pm$ 1.09 ^{##}		10	20.67 $\pm$ 2.19		10	29.53 $\pm$ 3.22
	100	79.77 $\pm$ 2.12		100	32.48 $\pm$ 2.77		100	30.90 $\pm$ 2.04
姜黄素	1	18.85 $\pm$ 0.32	8	1	21.35 $\pm$ 0.89	16	1	25.92 $\pm$ 1.75 ^{##}
	10	33.27 $\pm$ 2.31		10	32.40 $\pm$ 2.17		10	27.76 $\pm$ 2.48
	100	93.48 $\pm$ 3.77		100	44.62 $\pm$ 0.64		100	38.87 $\pm$ 1.93
1	1	26.26 $\pm$ 0.89 ^{##}	9	1	34.12 $\pm$ 2.14 ^{##}	17	1	25.33 $\pm$ 1.87 ^{##}
	10	63.65 $\pm$ 3.22 ^{##}		10	36.53 $\pm$ 1.88		10	33.66 $\pm$ 3.12
	100	71.48 $\pm$ 2.32		100	45.42 $\pm$ 2.78		100	26.49 $\pm$ 2.64
2	1	30.16 $\pm$ 2.11 ^{##}	10	1	26.54 $\pm$ 0.99 ^{##}	18	1	40.88 $\pm$ 2.03 ^{##}
	10	41.05 $\pm$ 2.12 ^{##}		10	26.65 $\pm$ 1.53		10	39.99 $\pm$ 3.01
	100	51.58 $\pm$ 3.39		100	41.00 $\pm$ 1.99		100	35.58 $\pm$ 2.35
3	1	30.70 $\pm$ 1.76 ^{##}	11	1	25.80 $\pm$ 1.43 ^{##}	19	1	34.19 $\pm$ 1.46 ^{##}
	10	46.56 $\pm$ 0.78 ^{##}		10	25.61 $\pm$ 0.66		10	41.31 $\pm$ 1.99 ^{##}
	100	92.97 $\pm$ 3.55		100	40.69 $\pm$ 2.78		100	42.06 $\pm$ 2.45
4	1	29.01 $\pm$ 2.01 ^{##}	12	1	33.68 $\pm$ 2.22 ^{##}			
	10	35.65 $\pm$ 0.57		10	26.21 $\pm$ 1.82			
	100	94.52 $\pm$ 2.89		100	44.14 $\pm$ 1.92			

与同浓度姜黄素比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs curcumin group at same concentration表3 姜黄素及其类似物对 K562/A02 细胞的凋亡诱导作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Induction of curcumin and its analogues on apoptosis of K562/A02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	凋亡率 / %		正常活细胞 / %
	早期凋亡	晚期凋亡与坏死	
对照	2.32 $\pm$ 0.78	1.57 $\pm$ 0.21	96.11 $\pm$ 1.12
姜黄素	15.90 $\pm$ 1.20 ^{**}	6.75 $\pm$ 1.10 ^{**}	77.35 $\pm$ 1.58 ^{**}
3	29.37 $\pm$ 2.93 ^{**##}	10.97 $\pm$ 1.30 ^{**##}	59.66 $\pm$ 3.85 ^{**##}
4	25.54 $\pm$ 3.68 ^{**#}	8.09 $\pm$ 1.34 ^{**}	66.37 $\pm$ 4.27 ^{**#}

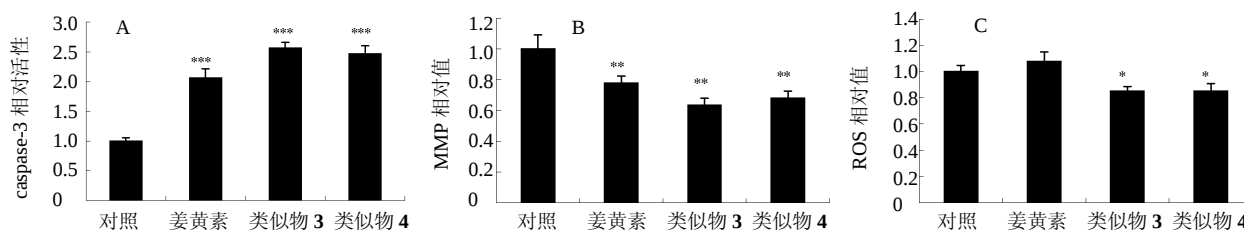
与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与姜黄素组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs curcumin group

3.6 姜黄素及其类似物对 K562/A02 细胞 P-gp 表达的影响

Western blotting 检测显示,与对照组相比,经 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素或其类似物 3、4 分别作用 48 h 后, K562/A02 细胞 P-gp 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 姜黄素与其类似物 3、4 的作用效果相似,结果见图 3。

3.7 姜黄素及其类似物对 K562/A02 细胞内阿霉素累积的影响

高内涵活细胞成像系统检测 K562/A02 细胞内阿霉素的累积,荧光强度扫描数据表明(图 4):对照组的阿霉素在细胞中累积较少、荧光强度低,而预孵了姜黄素及其类似物 3、4 各组则均可显著增



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

图 2 姜黄素及其类似物 3、4 诱导 K562/A02 细胞凋亡与细胞内 caspase-3 活性 (A)、MMP (B) 和 ROS (C) 水平的相关性
Fig. 2 Correlation between induction of curcumin and its analogues 3 and 4 on apoptosis in K562/A02 cells and intracellular caspase-3 activation (A), MMP level (B), and ROS generation (C)

表 4 姜黄素及其类似物对 K562/A02 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effect of curcumin and its analogues on cell cycle in K562/A02 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	细胞周期分布 / %			
	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M 期	S 期	亚二倍体
对照	57.42 ± 1.26	21.14 ± 1.42	18.97 ± 0.46	2.46 ± 0.69
姜黄素	57.79 ± 1.60	16.54 ± 0.69**	18.22 ± 1.03	7.45 ± 1.94*
3	58.57 ± 1.54	13.58 ± 0.69**	15.56 ± 0.92**	12.30 ± 2.00**
4	58.10 ± 1.86	14.96 ± 0.86**	15.38 ± 0.51***	11.56 ± 2.03**

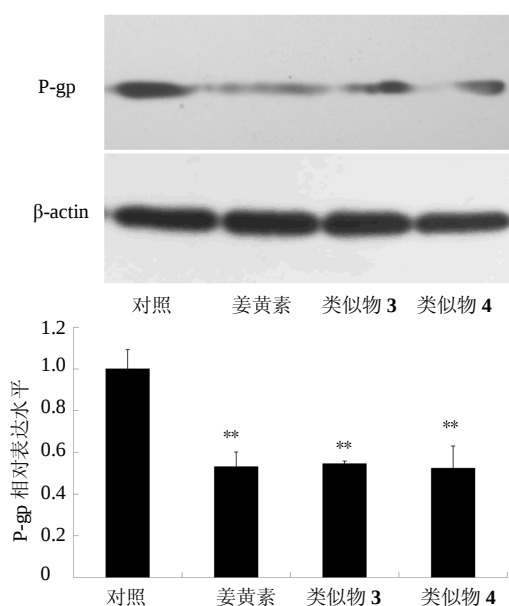


图 3 姜黄素及其类似物降低 K562/A02 细胞 P-gp 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Decreasing effect of curcumin and its analogues on P-gp expression in K562/A02 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

加阿霉素在细胞内的累积、荧光强度显著增加。此实验结果进一步验证了姜黄素及其类似物 3、4 对耐药细胞 P-gp 的抑制作用。

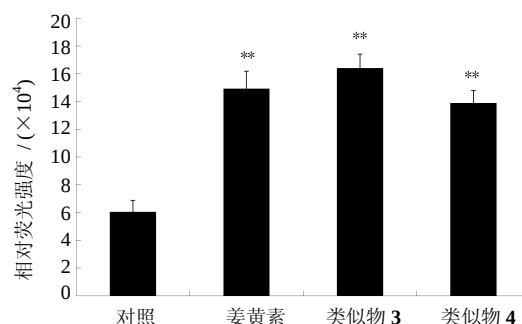


图 4 姜黄素及其类似物对 K562/A02 细胞内阿霉素累积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of curcumin and its analogues on intracellular adriamycin accumulation of K562/A02 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

虽然姜黄素具有显著的抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒等活性,但是姜黄素不稳定、易降解、代谢快的问题还是极大地限制了其制备、储存及应用。这与姜黄素的化学结构有关,它的分子结构高度对称、共轭,其中 β -二酮中的一个酮常以烯醇的形式存在,分子中心部分的 α , β -双不饱和的 1, 3-二酮是代谢不稳定的最大因素,在水溶液和磷酸缓冲溶液中姜黄素的 β -二酮极易断裂。因此普遍认为姜黄素分子中心部分是导致姜黄素在体内迅速降

解的原因^[7-8]。本课题组通过对其中心部分改造,设计合成了一系列姜黄素类似物,拟从中筛选获得稳定性高、活性优越的苗头化合物。因此,在实验设计中,姜黄素分子中心部分选取代谢不敏感的电子等排体嘧啶环替换原有结构,不仅使酮羰基还原和1,3-二酮的断裂难以进行,而且最大限度地保持了原中心基团的理化性质:嘧啶环维持了分子中心部分的共轭性和平面性;2个氮原子均含有孤对电子,是优势氢键受体;并且鉴于嘧啶环的缺电子性质,2个碳碳双键的Michael受体的性质也予以最大程度的保留。此外,尽量不改变姜黄素周边的芳环,同时以3,4-氧代和2-卤代对其进行合理取代。和已知的类似物相比,本课题组设计的类似物对姜黄素分子结构的继承性更强,因此更有可能保留姜黄素原有的优势活性。

肿瘤多药耐药(MDR)是临床肿瘤化疗的最大障碍,表现为肿瘤细胞对结构各异、机制不同的多种药物均产生耐药的特点。多药耐药的主要机制是P-gp的过度表达,使抗肿瘤药物难以在细胞内达到有效浓度^[9]。迄今为止,尚未探索出有效的治疗措施。近20年来研究显示姜黄素在抑制敏感肿瘤细胞的转移、增生和浸润的过程中有多个作用靶点,但对其抗耐药肿瘤的作用研究较少^[10]。本研究发现姜黄素对耐药细胞K562/A02表现出较好的生长抑制作用,部分经结构修饰后的姜黄素结构类似物也同样表现出较好的抗耐药肿瘤细胞活性。进一步研究表明,姜黄素结构类似物3、4抗耐药肿瘤作用与姜黄素近似,机制研究表明其抗耐药肿瘤的作用与激活细胞凋亡通路有关,表现为降低细胞MMP、增加caspase-3活性、促进细胞凋亡,但此过程并未伴随细胞内ROS的大量产生。此外经姜黄素和其类似物3、4处理的细胞G₂/M期和S期细胞比例均有显著下调,亚二倍体显著增加,也提示细胞凋亡的增加。Western blotting结果提示姜黄素及其类似物3、4抗耐药肿瘤的作用可能与其下调P-gp有关,这与以往文献报道的姜黄素作用一致^[11-12]。此外,在细胞毒实验中发现,类似物3、4在撤药1周后

后仍对K562/A02细胞有持续的生长抑制作用,而姜黄素组撤药后细胞逐渐恢复生长,提示类似物3、4可能具有比姜黄素更为持久的潜在抗肿瘤作用,其作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 罗廷顺,李洪文,刘正文,等.姜黄素的提取分离与药理作用研究进展[J].现代药物与临床,2011,26(2):102-107.
- [2] 韩刚,毕瑞,全乐,等.去甲氧基姜黄素对姜黄素稳定作用的研究[J].中药材,2008,31(4):592-594.
- [3] Achelle S, Nouria I, Pfaffinger B, et al. V-Shaped 4, 6-bis(arylvinyl) pyrimidine oligomers: synthesis and optical properties[J]. J Org Chem, 2009, 74(10): 3711-3717.
- [4] 厉凤霞,李晓丽,李斌.葡萄糖-聚乙二醇-姜黄素的合成及其对姜黄素性能的改善[J].合成化学,2011,19(1):15-18.
- [5] 赵欣,王爱里,袁园,等.姜黄中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的光稳定性分析[J].中草药,2013,44(10):1338-1341.
- [6] Xie S Q, Li Q, Zhang Y H, et al. NPC-16, a novel naphthalimidepolyamine conjugate, induced apoptosis and autophagy in human hepatoma HepG2 cells and Bel-7402 cells[J]. Apoptosis, 2011, 16(1): 27-34.
- [7] Mishra S, Karmodiya K, Suroliya N, et al. Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents[J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16(6): 2894-2902.
- [8] Liang G, Shao L, Wang Y, et al. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(6): 2623-2631.
- [9] 张峰,岑娟.肿瘤多药耐药模型的建立与评价方法[J].药物评价研究,2013,36(5):377-381.
- [10] 余美荣,蒋福升,丁志山.姜黄素的研究进展[J].中草药,2009,40(5):828-831.
- [11] Tang X Q, Bi H, Feng J Q, et al. Effect of curcumin on multidrug resistance in resistant human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(8): 1009-1016.
- [12] 范景辉,张毕奎.姜黄素对药物转运体影响的研究进展[J].中国药房,2011,35(22):3351-3353.