

姜黄素对 A549 细胞亚群 SP 及 NON-SP 细胞凋亡的诱导作用

李小江¹, 贾英杰¹, 张文治², 张莹¹, 贾伟颖³, 孟醒³

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

2. 天津市神经外科研究所, 天津 300060

3. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 探讨姜黄素对人肺腺癌 A549 细胞亚群 SP 及 NON-SP 生长的影响及其作用靶点。方法 从 A549 细胞中分选出 SP 及 NON-SP 细胞, 通过软琼脂克隆形成实验及体外致瘤性对其进行鉴定。将 SP 及 NON-SP 细胞用不同浓度的姜黄素 (10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理, MTT 法检测姜黄素对 SP 及 NON-SP 细胞生长的抑制作用; 荧光定量 PCR 法检测细胞中 survivin、caspase-3 基因表达。结果 不同浓度的姜黄素对 SP、NON-SP 细胞的生长产生不同程度的抑制作用, 浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的时细胞生存率最低, 且与作用时间呈正相关, 对 SP 细胞的抑制作用明显强于 NON-SP 细胞。姜黄素抑制 survivin 基因的表达, 促进 caspase-3 基因的表达, 其对 SP 细胞凋亡的诱导作用明显强于 NON-SP 细胞。结论 SP 细胞的致瘤性高于 NON-SP 细胞。姜黄素主要通过抑制 SP 细胞的生长、下调 survivin 基因的表达和促进 caspase-3 基因的表达而产生诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

关键词: 姜黄素; 人肺腺癌 A549; NON-SP 细胞; SP 细胞; caspase-3 表达; survivin 表达

中图分类号: R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)18-2581-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.018

Apoptosis induction of curcumin on A549 cell subsets SP and NON-SP cells

LI Xiao-jiang¹, JIA Ying-jie¹, ZHANG Wen-zhi², ZHANG Ying¹, JIA Wei-ying³, MENG Xing³

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Neurosurgery Institute, Tianjin 300060, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of curcumin on A549 tumor cell growth of subsets SP and NON-SP cells and the specific targets. **Methods** The subsets SP and NON-SP cells were separated from A549 tumor strain of the human lung adenocarcinoma, and these cells were identified with soft agar clone formation test and tumorigenicity *in vitro*. Curcumin with different concentration (10, 20, 30, and 40 $\mu\text{mol/L}$) was used to deal with these cells. Using MTT method to make sure the inhibition of curcumin on the growth of SP and NON-SP cells. PCR was used to measure the expression of survivin and caspase-3. **Results** Curcumin at different concentration showed the different inhibition on SP and NON-SP cells. Curcumin (30 $\mu\text{mol/L}$) showed more inhibition on SP cells than NON-SP cells with the lowest cell viability and was time-dependent. Curcumin could suppress the expression of survivin and promote the expression of caspase-3. The apoptosis degree of SP cell was clearly higher than that of NON-SP cell. **Conclusion** Tumorigenicity of SP cell is higher than that of NON-SP cell. Curcumin induces the apoptosis of tumor cells through inhibiting the growth of SP cell, down-regulating the expression of survivin, and promoting the expression of caspase-3 gene.

Key words: curcumin; A549; NON-SP cell; SP cell; caspase-3 expression; survivin expression

恶性肿瘤中存在肿瘤干细胞, 后者是肿瘤复发、转移的根本原因。前期实验发现, 人肺腺癌 A549 细胞系中的 SP 细胞亚群可能富集了肺癌干细胞^[1]。SP 细胞占 A549 细胞总量的 1.09%, 而经维拉帕米处理后可降至 0.20%, SP 细胞亚群可产生 SP 及

NON-SP 2 种细胞, 而 NON-SP 细胞只能增殖, 不能分化^[1]。姜黄素是从传统中药郁金、姜黄中提取有效成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、清除自由基等作用, 对肺癌的疗效显著^[2-3]。本实验探讨从 A549 细胞中分选出的 SP 和 NON-SP 细胞亚群的生

收稿日期: 2013-06-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001578)

作者简介: 李小江 Tel: 13820639756 E-mail: zxqlvelxj@126.com

物学特征,观察姜黄素诱导细胞凋亡的作用及其作用靶点,为郁金、姜黄临床上用于抗肿瘤治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

姜黄素,质量分数为98%,天津化标生物技术有限公司;Amresco 异硫氰酸胍, Solarbio 公司;Amresco 十二烷基肌氨酸钠、柠檬酸三钠,天津市元立化工有限公司;焦碳酸二乙酯(DEPC),二硫苏糖醇(DTT),Sigma 公司;水饱和酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、 β -巯基乙醇、乙酸钠均为分析纯。Go Taq Green Master mix、M-MLV 逆转录酶,上海叶舟生物科技有限公司;Oligo (dT) 18 Primers,北京泰泽瑞达科技有限公司;核糖核酸酶抑制剂,北京全式金生物技术有限公司;dNTP Mixture,北京智杰方远科技有限公司;Quanti Tect™ SYBR Green PCR 试剂盒,北京淘素生物科技有限公司;DL2000,上海工硕生物技术有限公司 TaKaRa;DMEM 培养液,北京艾克美医学科技有限公司;胎牛血清,上海乔南生泰科学仪器有限公司。内参基因为 β -actin,济南朋远生物技术有限公司。

1.2 动物与细胞

Balb/c 裸鼠,8~12 周龄,体质量 18~20 g,购自早稻田(北京)生物科技发展有限公司,许可证号 SCXK-(军)2007-004。

人肺腺癌 A549 细胞系,购自天津化标生物技术有限公司。

1.3 仪器

TGL-16B 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;101-3 鼓风式干燥箱,上海锦屏仪器仪表有限公司;德国 Rotor-Gene RG-3000 型 RT-PCR 仪;TC-96/g/h (b) PCR 仪,杭州博日科技有限公司;HW-8C 微量恒温器,绍兴市卫星医疗设备制造有限公司。

2 方法

2.1 A549 干细胞的培养与分选

A549 细胞置于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养液中,在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养;0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)与 0.25%胰蛋白酶(1:1)混合液消化、传代。采用免疫磁珠方法^[4]分选 A549 细胞系 SP (CD133⁺) 及 NON-SP 细胞 (CD133⁻)。

2.2 软琼脂克隆形成实验鉴定 A549 肺腺癌干细胞

取对数生长期 A549 细胞、新分选的 SP 细胞和 NON-SP 细胞,用 2×RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 400/mL,置 6 孔板上(6 孔板事先用 0.5% 琼脂糖与 2×RPMI 1640 培养液的 1:1 混合液铺板,每孔 1 mL,待凝固后将 2×RPMI 1640 培养液稀释的细胞悬液与 0.3%琼脂糖按 1:1 混匀),每孔 1 mL,每种细胞 6 个复孔。待上层胶凝固后置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 3 周,每孔加入 5 mg/mL MTT 1 mL,37 °C 孵育 1 h,计算集落形成率。

2.3 SP、NON-SP 细胞体外致瘤性实验

将 SP、NON-SP 细胞收集后调整密度,按 1:1 的比例与基质胶混合,于裸鼠腹壁 sc100 μ L,每种细胞接种 10 只裸鼠。每周观察肿瘤生长状况 1 次,第 4 周时将小鼠断颈处死,摄片后摘取皮下肿瘤,计算肿瘤体积计。

2.4 MTT 法检测姜黄素对肿瘤细胞生长的影响

新分选的 SP、NON-SP 细胞和对数生长期 A549 细胞(未分选消化)用台盼蓝染色法计数活细胞数目,调整细胞密度为 1×10^4 /mL,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,于培养箱内常规培养 24 h,每孔加入含姜黄素 10、20、30、40 μ mol/L 的完全培养基 100 μ L,每种浓度设 6 个平行孔,空白对照组只加完全培养基。将细胞置于培养箱内常规培养 24 h,MTT 法检测姜黄素对细胞增殖的影响。

2.5 荧光定量 PCR 法检测 survivin 与 caspase-3 基因表达

取空白对照组和加入姜黄素 30 μ mol/L 组的肿瘤组织样品约 30 mg,加 8~10 倍体积的万用 PCR 裂解液匀浆器匀浆,激烈振荡溶胞后于 -20 °C 冻存,进行 RT 反应(制备 cDNA 模板)。RT 反应条件:42 °C、1 h;95 °C、5 min。产物于 -20 °C 冻存。Survivin 基因退火温度为 57 °C,caspase-3 基因退火温度为 57 °C。4.1% Agrose 凝胶电泳检测 PCR 反应产物。Survivin PCR 反应体系由 survivin 上游引物和下游引物各 1.0 μ L、cDNA 模板 2.0 μ L、ddH₂O 6.0 μ L 组成;caspase-3 PCR 反应体系由 caspase-3 上游引物和下游引物各 1.0 μ L、cDNA 模板 2.0 μ L、ddH₂O 6.0 μ L 组成。

2.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 统计学软件进行数据分析。两组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 A549 肺腺癌干细胞的分选与鉴定

肺癌干细胞即 SP 细胞被 CD133 棕染标记 (图 1)。软琼脂克隆形成试验显示, SP 细胞与 NON-SP 细胞均具有体外形成集落的能力, 至培养第 21 天, NON-SP 的集落形成率为 $(13.33 \pm 1.76) \%$, 低于 SP 的 $(30.67 \pm 2.57) \%$ ($P < 0.05$)。

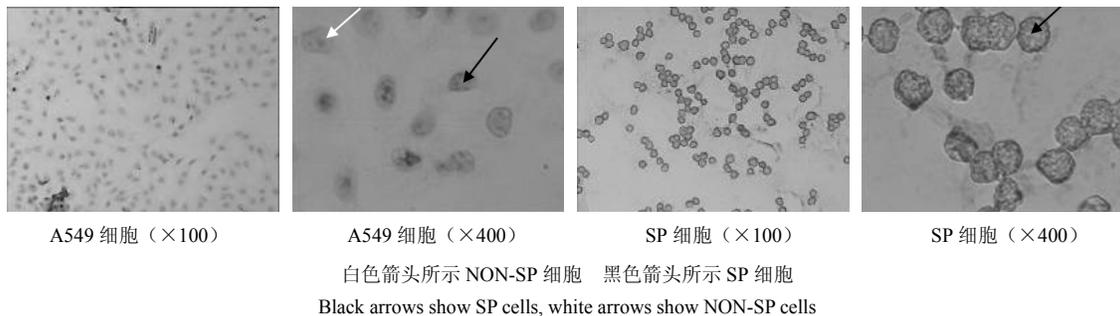


图 1 A549 细胞分选后 A549 细胞与 SP 细胞 (CD133⁺) 的光镜观察

Fig. 1 Light microscopy of A549 cells and SP cells in (CD133⁺) after A549 sorting

3.3 对肿瘤细胞生长的影响

不同浓度的姜黄素对 SP、NON-SP 细胞的生长均显示抑制作用, 其作用强度随着时间的延长而增强, 浓度为 $30 \mu\text{mol/L}$ 时, 2 种细胞的生存率最低。姜黄素对 SP 细胞生长的抑制作用明显强于对 NON-SP 细胞的作用。结果见图 2、3。

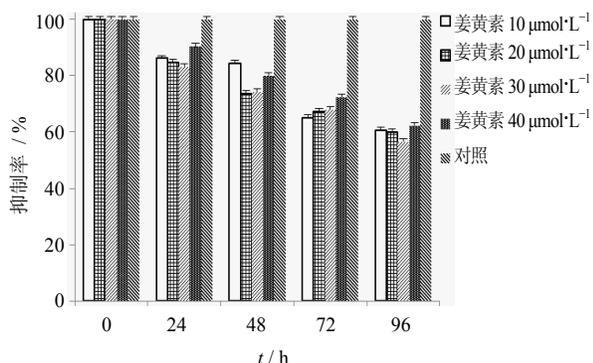


图 2 姜黄素对 SP 细胞生长的影响 ($n = 6$)

Fig. 2 Effect of curcumin on SP cell growth ($n = 6$)

3.4 对 survivin 和 caspase-3 基因表达的影响

姜黄素抑制 survivin 基因的表达, 促进 caspase-3 基因的表达, 其中对 SP 细胞基因表达的作用明显强于 NON-SP 细胞, 表明其对 SP 细胞凋亡的诱导作用明显强于 NON-SP 细胞。结果见图 4。

4 讨论

姜黄素可通过不同途径诱导肿瘤细胞凋亡: (1) 通过抑制 bcl 基因表达而增加 Bax 蛋白的表达, 进一步激活 caspase-8、caspase-3, 抑制肺腺癌 A549

3.2 SP 和 NON-SP 细胞体外致瘤性

SP、NON-SP 细胞体外致瘤性分析显示, SP 与 NON-SP 细胞均具有外致瘤性, 至接种肿瘤细胞第 4 周时, 接种 NON-SP 细胞小鼠的肿瘤体积为 $(10.81 \pm 2.94) \text{mm}^3$, 而接种 SP 细胞小鼠的肿瘤体积为 $(41.71 \pm 11.79) \text{mm}^3$, 差异明显 ($P < 0.05$), 表明 SP 细胞的致瘤性更强。

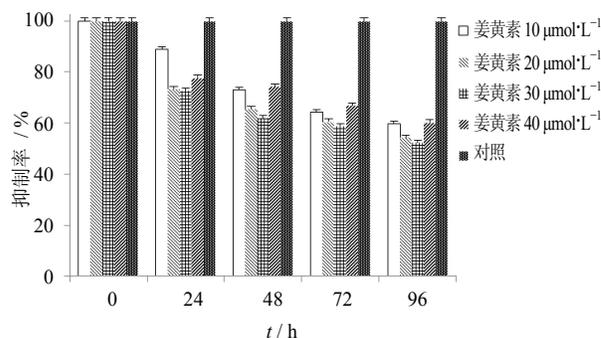


图 3 姜黄素对 NON-SP 细胞生长的影响 ($n = 6$)

Fig. 3 Effect of curcumin on NON-SP cell growth ($n = 6$)

细胞生长, 提高对肿瘤坏死因子 (TNF) 相关凋亡诱导配体的敏感性^[5]; (2) 通过激活 P53 蛋白, 抑制 A549 细胞增殖, 诱导 A549 细胞凋亡^[6]; (3) 增强 caspase-8 的表达, 激活 caspase-3 和 caspase-7 的表达, 促进人肺癌细胞的凋亡^[7]; (4) 通过抗血管生成而起到抗肿瘤作用^[8-9]。

在肺癌中 survivin 表达水平上调, 其表达水平、定位和肺癌的组织类型、细胞分化和凋亡程度、肿瘤分期系统 (TNM) 分期、侵袭转移以及患者存活时间、预后有关, survivin 表达水平上调是不良预后指标^[10-12]。caspase-3 则为一组选择性地剪切蛋白质, 其功能的丧失或结构变化, 可促进细胞凋亡。caspase-3 是凋亡信号转导通路中的效应分子, 参与细胞的生理及病理性死亡过程, 其以磷酸化方式激活后导致细胞的不可逆性凋亡, 它的表达下调可以

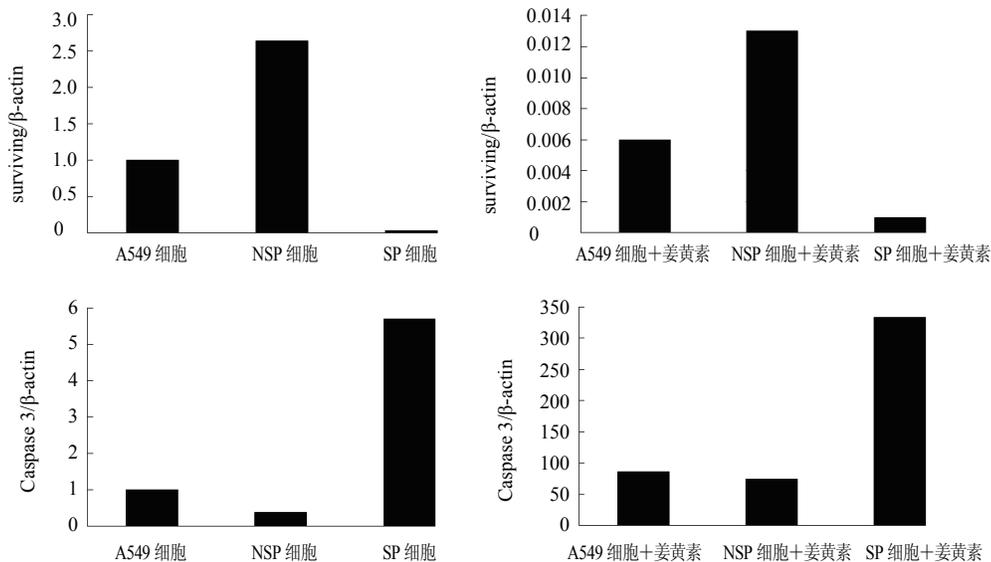


图 4 姜黄素对肿瘤细胞 survivin 及 caspase-3 基因表达的影响

Fig. 4 Effect of curcumin on tumor cells of survivin and caspase-3 gene expression

导致肿瘤细胞凋亡受阻^[13]。

本实验通过检测 survivin 及 caspase-3 基因表达, 从抑制细胞凋亡及促进细胞凋亡 2 个不同的角度考察姜黄素对 SP 及 NON-SP 细胞的影响。发现不同浓度的姜黄素对 SP 细胞和 NON-SP 细胞生长具有不同程度的抑制作用, 且随药物作用时间延长, 细胞生存率越低, 浓度为 30 μmol/L 时, 使细胞的生存率最低, 对 SP 细胞生长的抑制作用强于 Non-SP 细胞。由此可见, 姜黄素主要通过抑制肺癌 A549 细胞中 survivin 基因的表达, 促进 caspase-3 基因的表达而发挥诱导细胞凋亡的作用, 提示姜黄素主要通过抑制肺癌干细胞, 即 SP 细胞而达到抑制肿瘤生长的目的。

参考文献

[1] 谢 彤, 李 力, 茅乃权, 等. 人肺腺癌 A549 细胞系 SP 细胞亚群的分选和初步分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 17(10): 738-740.
 [2] 郑玉强, 邓立普. 姜黄素药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(2): 212-214.
 [3] 江金环, 刘 莉, 皮 江, 等. 姜黄素通过调控微管系统干扰 HepG2 细胞周期研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1144-1148.
 [4] 毛张凡, 徐小惠, 黄 杰, 等. 肺癌干细胞中存在容积激活氯通道 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(5): 944-946.
 [5] 田德增, 朱 辉, 梁永杰. 姜黄素改善肺癌 A549 细胞

对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体抵抗的机制 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(31): 105-107.
 [6] 何秋霞, 侯海荣, 袁延强, 等. 姜黄素对肺腺癌 A549 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10): 2130-2132.
 [7] 黄冬生, 李军姜. 姜黄素对人肺癌细胞凋亡相关蛋白 Survivin 表达的影响 [J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(6): 723-724.
 [8] Shukla S, Iaher H, Hartz A, et al. Curcumin inhibits the activity of ABCG2/BCRP1, a multidrug resistance-linked ABC drug transporter in mice [J]. Pharm Res, 2009, 26(2): 480-487.
 [9] 李剑明, 杨和平. 姜黄属中药活性成分对人内皮细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(22): 4539-4541.
 [10] Salz W, Eisenberg D, Plescia J, et al. A Survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior [J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3531-3534.
 [11] 李奕璇, 陈 全, 朱大冕. Survivin 启动子调控 sea 基因真核表达质粒的构建及其在肺癌细胞中的特异性表达 [J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(2): 147-149.
 [12] 李姝君, 杨志雄, 田鲜艳, 等. Survivin 在肺癌中表达意义及其与 Fas/FasL 表达的关系 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(20): 17-19.
 [13] Kleinberg L, Dong H P, Holth A, et al. Cleaved Caspase-3 and nuclear factor-kappa Bp65 are prognostic factors in metastatic serous ovarian carcinoma [J]. Hum Pathol, 2009, 40(6): 795-806.