

姜黄素对大肠癌细胞 Caspase-3 和 PARP 表达的影响

吴亚丽¹, 吕芳², 郭立达^{*2}

(1. 广东轻工职业技术学院 食品与生物工程系 / 广东高校特色调味品工程技术开发中心, 广东 广州 510300;

2. 河北工业职业技术学院 环境与化学工程系, 河北 石家庄 050091)

摘要: 为了探讨姜黄素对 LoVo 细胞凋亡与凋亡相关蛋白 Caspase-3 和多聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶(PARP)表达的影响,明确其治疗大肠癌的生物学基础。用不同浓度姜黄素处理体外培养的人大肠癌 LoVo 细胞,采用 MTT 法检测姜黄素对 LoVo 细胞的增殖抑制作用,倒置显微镜观察姜黄素对 LoVo 细胞集落形成的影响;Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡;采用分光光度法检测 Caspase-3 酶活性;Western blotting 检测姜黄素作用前后 Caspase-3 和 PARP 蛋白表达的差异。结果显示姜黄素可抑制人大肠癌 LoVo 细胞的生长增殖,并能抑制细胞集落的形成,降低细胞增殖生存率,激活 Caspase-3 的表达,呈量效和时间依赖性,20 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度姜黄素能显著诱导 LoVo 细胞凋亡,上调 Caspase-3 和 PARP 蛋白表达。这表明姜黄素能显著抑制 LoVo 细胞的增殖并诱导其发生凋亡,其分子机制与调节 Caspase-3 和 PARP 的表达相关。

关键词: 姜黄素;Caspase-3;PARP;凋亡;大肠癌

中图分类号: Q 255 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)07—0751—05

Effects of Curcumin on Caspase-3 and PARP Expression of Colorectal Carcinoma Cells

WU Yali¹, LV Fang², GUO Lida^{*2}

(1. Department of Food, Guangdong Industry Technical College / Centre of Guangdong Higher Education for Engineering and Technological Development of Speciality Condiments, Guangzhou 510300, China; 2. Department of Environment and Chemical Engineering, Hebei College of Industry and Technology, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: This study aimed to elucidate the biological basis for the treatment of colorectal cancer using curcumin, by investigating the effects of curcumin on apoptosis of LoVo and the expression of apoptosis-related protein Caspase-3 and poly ADP-ribose polymerase(PARP). The human colorectal carcinoma cells LoVo was conventionally cultured in vitro by curcumin with different concentrations. Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assays were performed to examine the inhibition

收稿日期: 2014-09-13

基金项目: 广东高校特色调味品工程技术开发中心建设项目(GCZX-B1103);河北省科技厅支撑计划项目(13272511);河北省中医药管理局资助项目 (2013005);河北工业职业技术学院博士基金资助项目 (BZ1201);广东轻工职业技术学院校级科研项目 (KJ201322)。

作者简介: 吴亚丽(1981—),女,河北石家庄人,讲师,主要从事生物技术、检测技术研究。E-mail:ericascut@126.com

* 通信作者: 郭立达(1980—),女,河北石家庄人,理学博士,讲师,主要从事生物技术、检测技术研究。E-mail:lidaguo815@foxmail.com

of LoVo cell proliferation induced by curcumin. The effect of curcumin on LoVo cells colony formation was observed under an inverted microscope. The fluorescent dye Hoechst 33258 was used to detect the apoptotic cells. The enzyme activity of Caspase-3 was measured using a spectrophotometric method. The levels of Caspase-3 and PARP expression before and after curcumin treatment were determined with Western blot analysis. The LoVo cells proliferation and the cell colony formation could be inhibited by curcumin. The cell proliferation and survival of LoVo were reduced and the expression of Caspase-3 was activated dependent on the treated concentration and duration. The apoptosis of LoVo cell was significantly induced and the expressions of Caspase-3 and PARP were increased by curcumin with a concentration above 20 $\mu\text{mol/L}$. The results suggested that curcumin could significantly inhibit LoVo cell proliferation and induce cell apoptosis. The molecular mechanism was associated with the regulation of Caspase-3 and PARP expression.

Keywords: curcumin, Caspase-3, PARP, apoptosis, colorectal cancer

大肠癌是消化道系统常见的恶性肿瘤,其发病率呈逐年上升的趋势,但目前对大肠癌的治疗效果并不理想,为了预防癌的转移和复发,减轻患者痛苦,提高生存质量,众多的医药科研工作者将目光投向了植物来源的物质,将普遍存在于食物中的植物源化合物用于癌症的化学治疗或化学预防^[1-2]。

姜黄素是从中药姜黄根茎中提取的一种天然植物多酚,为姜黄的主要活性成分,其药理作用非常广泛,在许多肿瘤细胞中发挥着抗氧化、抗炎、抗肿瘤和化学预防作用^[3-4]。目前,姜黄素的体内外抗癌研究已经成为肿瘤化学预防及治疗领域的热点之一。因姜黄素的抗癌机制比较复杂,至今未完全阐明。作者拟探讨姜黄素对大肠癌细胞的凋亡诱导,及对 Caspase-3 和 PARP 蛋白的调节,为进一步阐明姜黄素的抗肿瘤机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人大肠癌细胞株 LoVo;广州军区广州总医院医学实验科惠赠。姜黄素:购自 Sigma 公司;胎牛血清:购自杭州四季青生物技术有限公司;噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO):购自北京索来宝科技有限公司;Caspase-3 活性分光光度计检测试剂盒:购自上海碧云天生物技术有限公司;Caspase-3 单抗购自 abcam 公司;PARP 单抗:购自上海艾博思生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 LoVo 细胞的培养 人大肠癌细胞株 LoVo 培养于含 10%血清的 RPMI1640 培养液中,饱和湿度条件下培养。每 2~3 d 更换一次培养液,待细胞融合率达到 85%左右时,用胰蛋白酶消化,进行传代培养^[1]。

1.2.2 MTT 比色法分析细胞活力 收集生长良好的 LoVo 细胞,接种于 96 孔培养板。待细胞贴壁后,更换为 0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 梯度浓度的姜黄素培养液,实验组(T,梯度姜黄素培养液)接种 6 个孔,阴性对照组(C,培养液中不含姜黄素)接种 3 个孔,空白对照组(B,等量 PBS)接种 3 个孔,饱和湿度条件下继续孵育培养 24,48,72 h。待培养结束,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL ,继续孵育 4 h,吸弃孔内上清,加入 DMSO 150 μL /孔,静置孵育 30 min。在酶联免疫检测仪上测定 570 nm 光吸收值,参照郭立达等的方法^[1],计算细胞存活率。

1.2.3 集落形成实验 含 0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 梯度浓度姜黄素的 RPMI1640 培养液孵育 LoVo 细胞 2 h 后,计数细胞,按每孔 200 个接种到 24 孔培养板中,饱和湿度条件下培养 6~9 d,PBS 清洗 2 次,体积分数 3%戊二醛固定 10 min,显微镜下观察计数,参照郭立达等的方法^[1],计算集落形成率和细胞相对增生活率。

1.2.4 Hoechst 33258 染色 用 0~80 $\mu\text{mol/L}$ 梯度浓度姜黄素培养液孵育 LoVo 细胞 48 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤 2 次,加入 5 mg/mL Hoechst 33258 避

光孵育 20 min 后, PBS 洗涤 1 次, 荧光显微镜下观察标记的细胞。

1.2.5 Caspase-3 活性的测定 处于对数期生长的 LoVo 细胞, 其一用含 0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的培养液孵育 48 h; 其二用 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的培养液孵育 0、3、6、12、24、48 h, 培养结束后, PBS 洗涤 2 次, 离心收集细胞, 加入裂解液冰浴裂解 15 min; 收集上清, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。同时, 取少量样品按照 Caspase-3 酶活性检测试剂盒说明进行检测。

1.2.6 免疫蛋白印迹 收集经不同浓度姜黄素 (0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 的 LoVo 细胞, PBS 清洗, RIPA 细胞裂解液冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 检测蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 常温封闭 1 h, 与一抗 (1:5 000 Caspase-3、1:5 000 PARP 和 1:5 000 actin) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次 (每次 10 min), 二抗室温孵育 1 h, 洗膜后, ECL 避光反应 3~5 min, 用化学发光分析系统观察并扫描图像, 利用 Fujifilm Las-4000 分析软件统计目标条带的光密度。

1.3 统计学方法

实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm\text{SD}$) 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 姜黄素对 LoVo 细胞生长增殖的影响

MTT 比色法结果显示不同姜黄素对 LoVo 细胞的生长均具有一定的抑制作用, 但在不同时段其抑制强度不尽相同。作用 24 h 后, 与空白对照组相比, 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素可明显抑制 LoVo 细胞活力 ($P<0.01$), 48 h 后, 相对更低浓度的姜黄素即可显著抑制 LoVo 细胞的生长; 而 72 h 后, 抑制作用比 48 h 更为明显 ($P<0.05$), 抑制率随培养时间的延长呈增长趋势, 即细胞活力呈下降趋势 ($P<0.05$)。在同一时段, 随姜黄素作用浓度的增加, 各组细胞活力均逐渐下降 ($P<0.05$), 呈明显剂量依赖关系, 结果见图 1。

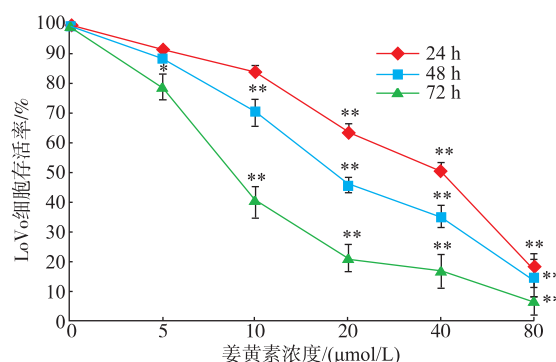
2.2 姜黄素对 LoVo 细胞集落的影响

如图 2 所示, 姜黄素浓度越高, 集落的形成率越低, 呈剂量依赖效应; 相对于对照组, 姜黄素处理组能显著降低 LoVo 细胞的相对增殖存活率 ($P<0.05$), 见图 2。

2.3 姜黄素对 LoVo 细胞核形态的影响

不同浓度姜黄素诱导 48 h 后 LoVo 细胞核形

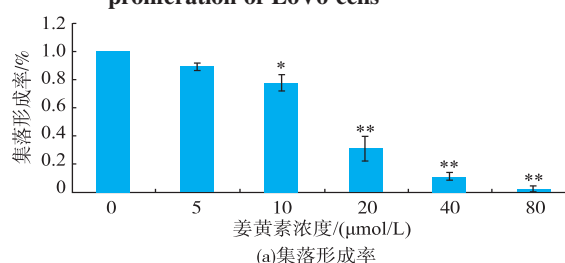
态的变化见图 3, 空白对照组 LoVo 细胞的细胞核形态圆润、染色均匀, 随姜黄素处理浓度增大, 出现了半月形细胞核, 细胞核碎裂, 并形成凋亡小体。



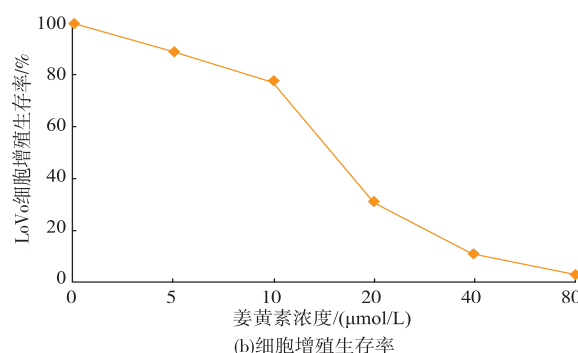
注: 与空白对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 姜黄素对 LoVo 细胞生长增殖的抑制作用

Fig. 1 Effects of curcumin on the growth and proliferation of LoVo cells



(a) 集落形成率



(b) 细胞增殖生存率

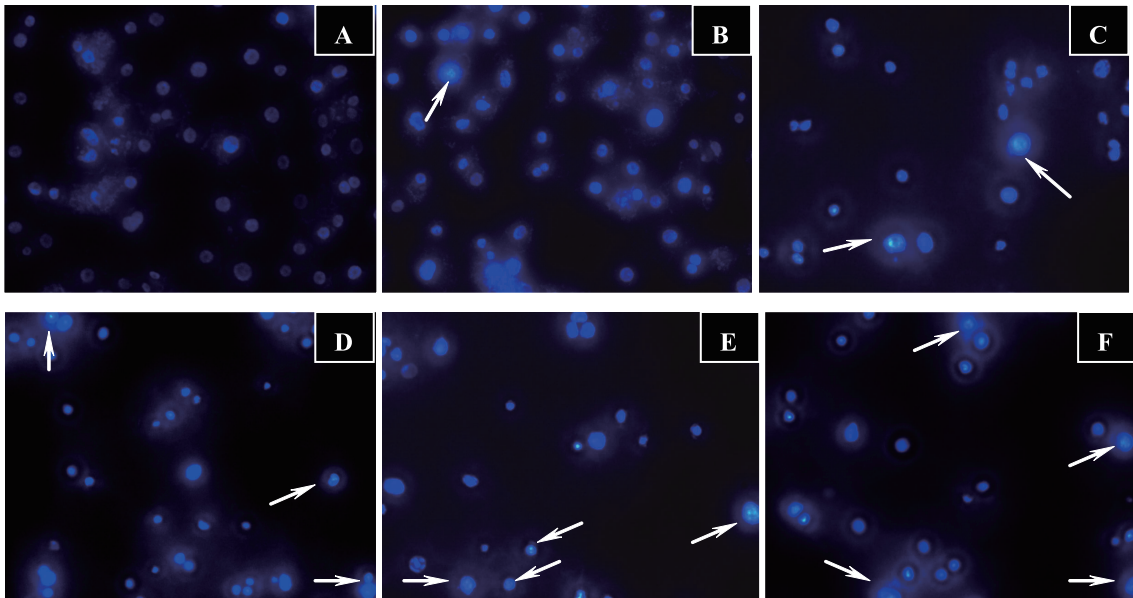
注: 与阴性对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 姜黄素对 LoVo 细胞集落形成的影响

Fig. 2 Effects of curcumin on colon formation of LoVo cells

2.4 姜黄素对 LoVo 细胞 Caspase-3 酶活的影响

Caspase-3 检测结果显示, 其酶活性随着姜黄素剂量的增加而增强, 呈浓度依赖关系。与空白对照组相比, Caspase-3 活性分别提高了 1.4、2.4、3.3 和 3.5 倍, 在统计学上有显著性差异 ($P<0.05$), 见图 4A。20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理的 LoVo 细胞, 直到作用持续维持 12 h 以上, Caspase-3 的活性才依次增强, 其中在 12、24 和 48 h 的酶活性为空白对照组的

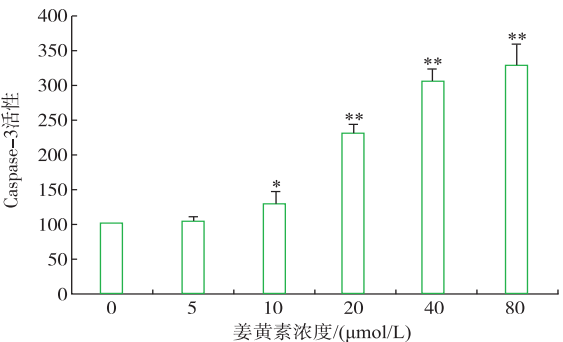


A:阴性对照组; 姜黄素实验组B:5 $\mu\text{mol/L}$; C:10 $\mu\text{mol/L}$; D:20 $\mu\text{mol/L}$; E:40 $\mu\text{mol/L}$; F:80 $\mu\text{mol/L}$

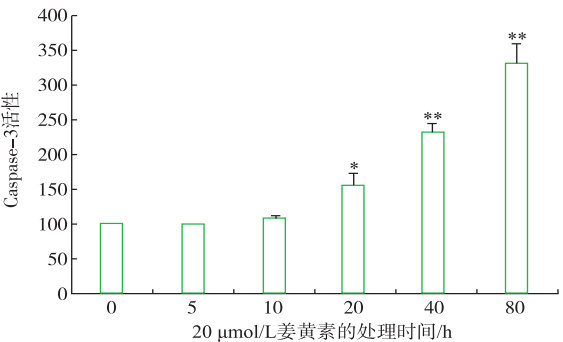
图3 姜黄素作用48 h对LoVo细胞核形态的影响($\times 400$ 倍)

Fig. 3 Effects of curcumin-treated LoVo cells for 48 h on morphological changes of cell nucleus (Amplification rate $\times 400$)

1.5, 2.5 和 3.4 倍 ($P < 0.05$); 且 Caspase-3 水平增加呈现时间依赖性, 见图 4(b)。



(a) 不同浓度姜黄素处理LoVo细胞48 h后对Caspase-3活性的影响



(b) 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理LoVo细胞不同时间对Caspase-3活性的影响

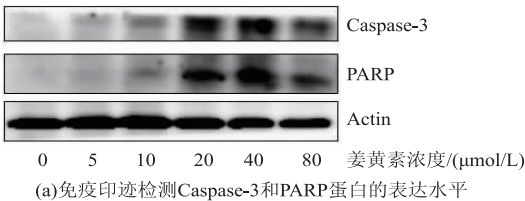
注: 与阴性对照组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图4 姜黄素对LoVo细胞Caspase-3活性的影响

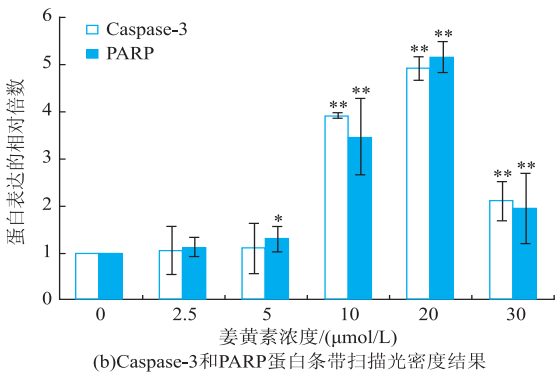
Fig. 4 Effect of curcumin-treated LoVo cells on Caspase-3 activity

2.5 姜黄素对Caspase-3和PARP表达的影响

Western blotting 结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理组能显著激活 Caspase-3 的表达 ($P < 0.01$), 5 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素激活 PARP 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 见图 5。



(a) 免疫印迹检测Caspase-3和PARP蛋白的表达水平



(b) Caspase-3和PARP蛋白条带扫描光密度结果

注: 与阴性对照组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图5 姜黄素对LoVo细胞Caspase-3和PARP蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of curcumin-treated LoVo cells on Caspase-3 and PARP protein expression

3 结 语

大肠癌是消化系统最常见的一种恶性肿瘤。降低其发病率,提高患者生存率最有效的方法就是使用食物来源的化学预防制剂以延缓癌变过程。姜黄素作为中药姜黄的一种活性物质,有着广泛的抗肿瘤谱。自 Kuttan 等^[9]研究发现了姜黄素的抗肿瘤作用后,许多报道证实了姜黄素的体内外抗肿瘤潜能^[6-8]。由于在不同肿瘤细胞中姜黄素发挥凋亡诱导的效应也大有不同^[9]。目前,姜黄素诱导大肠癌细胞 LoVo 发生凋亡的机制尚不明确。

通过 MTT 实验发现姜黄素对 LoVo 细胞的生长增殖有明显的抑制作用,呈现一定的剂量和效应依赖关系。Hoechst 33258 荧光染料对细胞进行染色,发现姜黄素能使 LoVo 细胞核形态发生改变,染色质致密浓染,并形成凋亡小体。

Caspase-3 是半胱氨酸蛋白酶家族一个重要的凋亡效应子^[10-14]。其被激活后可触发 caspases 级联反应,引起凋亡发生。作者采用 caspase-3 检测试剂盒和 Western blotting 技术来检测 Caspase-3 的活性,实验结果显示姜黄素可显著激活 Caspase-3 的表达,并呈现时间和浓度依赖性关系。PARP 是真核细胞中的 DNA 修复酶,可识别结构损伤的片段 DNA。Caspase-3 一旦被激活,即可诱导 PARP 发生断裂,使细胞进入凋亡途径。作者也发现,姜黄素处理能够诱导 LoVo 细胞中 Caspase-3 的激活,进而导致其底物 PARP 的裂解。

综上所述,姜黄素可明显抑制 LoVo 细胞的生长增殖,使细胞核发生形态学改变,通过上调 Caspase-3 和 PARP 蛋白的表达,诱导 LoVo 细胞发生凋亡。

参考文献:

- [1] 郭立达. 姜黄素联合奥沙利铂抗结肠癌作用及其相关机制研究[D]. 石家庄:河北师范大学,2012.
- [2] 郭立达, 焦振霞, 宋瑛, 等. 姜黄素诱导结肠癌 LoVo 细胞凋亡的作用及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 13(38): 2191-2195.
- [3] Sharma R A, Gescher A J, Steward W P. Curcumin: the story so far[J]. **Eur J Cancer**, 2005, 41(13): 1955-1968.
- [4] Shishodia S, Chaturvedi M M, Aggarwal B B. Role of curcumin in cancer therapy [J]. **Curr Probl Cancer**, 2007, 31(4): 243-305.
- [5] Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, et al. Potential anticancer activity of turmeric (Curcuma longa) [J]. **Cancer Letters**, 1985, 29(2): 197-202.
- [6] Li L, Aggarwal B B, Shishodia S, et al. Nuclear factor-kappaB and IkappaB kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis[J]. **Cancer**, 2004, 101(10): 2351-2362.
- [7] Odot J, Albert P, Carlier A, et al. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells [J]. **Int J Cancer**, 2004, 111(3): 381-387.
- [8] Goel A, Kunnumakkara A B, Aggarwal B B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic[J]. **Biochem Pharmacol**, 2008, 75(4): 787-809.
- [9] Cory S, Adams J M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch[J]. **Nat Rev Cancer**, 2002, 2(9): 647-656.
- [10] Cho B B, Toledo-Pereyra L H. Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke [J]. **J Invest Surg**, 2008, 21(3): 141-147.
- [11] Broughton B R, Reutens D C, Sobey C G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia[J]. **Stroke**, 2009, 40(5): e331-e339.
- [12] Moroni F. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage[J]. **Curr Opin Pharmacol**, 2008, 8(1): 96-103.
- [13] Wang Y K, Hong Y J, Wei M, et al. Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ [J]. **J Ethnopharmacol**, 2010, 132(1): 233-239.
- [14] Song J, Liu K, Yi J, et al. Luteolin inhibits lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in endothelial cells by a calcium/mitochondrion/Caspases-dependent pathway[J]. **Planta Med**, 2010, 76(5): 433-438.