

姜黄素对子宫颈癌 Hela 细胞凋亡及 SPLUNC1 蛋白表达的影响

任妍¹, 高慧婕¹, 高红刚¹, 王光辉¹, 孔佑华²

1. 济宁医学院基础医学教研室, 山东日照 276800; 2. 济宁医学院组织学与胚胎学教研室, 山东济宁 272000

摘要: **目的** 探讨姜黄素对子宫颈癌 Hela 细胞凋亡及对短的上腭、肺及鼻咽上皮克隆 1 (short palate lung and nasal epithelium clone 1, SPLUNC1) 表达的影响。**方法** 取对数生长期 Hela 细胞, 分别设置对照组 (姜黄素 0 $\mu\text{mol/L}$)、实验 A 组 (姜黄素 4 $\mu\text{mol/L}$)、实验 B 组 (姜黄素 8 $\mu\text{mol/L}$)、实验 C 组 (姜黄素 16 $\mu\text{mol/L}$)、实验 D 组 (姜黄素 32 $\mu\text{mol/L}$)、实验 E 组 (姜黄素 64 $\mu\text{mol/L}$)、实验 F 组 (姜黄素 128 $\mu\text{mol/L}$)。采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定姜黄素对子宫颈癌 Hela 细胞的增殖抑制作用, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色观察细胞凋亡形态, 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V/碘化丙啶 (AnnexinV-FITC/PI) 双染流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 检测 SPLUNC1 蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 实验各组细胞增殖抑制率均明显增加 (P 均 < 0.05), 且除实验 F 组外, 细胞增殖抑制率随姜黄素剂量增加而增加, 呈剂量依赖性, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05); 其半数抑制浓度 (IC_{50}) = 43.32 $\mu\text{mol/L}$ 。对照组细胞形态正常, 实验 C、D、E 组出现了典型的细胞凋亡形态变化, 细胞核碎裂、固缩。与对照组比较, 实验 C、D、E 组凋亡率随姜黄素剂量增加而增加, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05); 与对照组比较, 实验 C、D、E 组 SPLUNC1 蛋白表达随姜黄素剂量增加而下降。**结论** 在一定浓度范围内, 姜黄素可明显促进子宫颈癌 Hela 细胞凋亡, 抑制 Hela 细胞的增殖, 其作用可能与下调 SPLUNC1 的表达相关。

关键词: 姜黄素; 子宫颈癌; Hela 细胞; 凋亡; 短的上腭、肺及鼻咽上皮克隆 1

中图分类号: R 737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)01-0011-04

Effects of curcumin on cervical cancer Hela cell apoptosis and expression of SPLUNC1 protein

REN Yan*, GAO Hui-jie, GAO Hong-gang, WANG Guang-hui, KONG You-hua

* Department of Basic Medical Sciences, Jining Medical University, Rizhao, Shandong 276800, China

Corresponding author: KONG You-hua, E-mail: 1494943186@qq.com

Abstract: Objective To study the effects of curcumin on cervical cancer Hela cell apoptosis and expression of short palate lung and nasal epithelium clone 1 (SPLUNC1) protein. **Methods** Hela cells in logarithmic growth phase were designed as control group (curcumin 0 $\mu\text{mol/L}$), experiment group A (curcumin 4 $\mu\text{mol/L}$), experiment group B (curcumin 8 $\mu\text{mol/L}$), experiment group C (curcumin 16 $\mu\text{mol/L}$), experiment group D (curcumin 32 $\mu\text{mol/L}$), experiment group E (curcumin 64 $\mu\text{mol/L}$), experiment group F (curcumin 128 $\mu\text{mol/L}$). The 4-methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to detect the inhibition effect of curcumin on cervical cancer Hela cells proliferation. 4', 6-diamidino-2-phenyl indole (DAPI) staining was used to observe the morphological changes of cell apoptosis. AnnexinV-FITC/PI double staining flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate. Western blot method was used to detect the relative expression level of SPLUNC1 protein. **Results** Compared with control group, the cell proliferation inhibitive rates in all experimental groups significantly increased (all $P < 0.05$), and the cell proliferation inhibitive rates increased with the increase of curcumin doses in a dose-dependent manner (all $P < 0.05$) except experiment group F. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was 43.32 $\mu\text{mol/L}$. The cellular morphology in control group was normal, while typical apoptotic morphological changes of nuclear fragmentation and condensation appeared in experiment group C, D and E. Compared with control group, cell apoptosis rates increased with the increase of curcumin doses (all $P < 0.05$) in experiment group C, D and E, and the expression levels of SPLUNC1 protein decreased with the increase of curcumin doses (all $P < 0.05$) in experiment group C, D and E.

Conclusions Curcumin could significantly promote apoptosis of cervical cancer Hela cell, and inhibit proliferation of Hela cell, and its effect may be associated with down-regulation of SPLUNC1 protein expression.

Key words: Curcumin; Cervical cancer; Hela cell; Apoptosis; Short palate lung and nasal epithelium clone 1

子宫颈癌是常见的一种女性肿瘤,流行病学调查显示其发病率呈不断上升趋势,严重影响女性身心健康和和生活质量^[1-2]。姜黄素是一种由中药姜黄根茎中提取的酚性色素,具有抗肿瘤、抗氧化等作用^[3]。药理研究表明,姜黄素主要通过抑制细胞生长及促进细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用^[4]。短的上腭、肺及鼻咽上皮克隆 1 (short palate lung and nasal epithelium clone 1, SPLUNC1) 表达具有相对的组织特异性,且在多种肿瘤组织中高表达^[5]。本研究旨在探讨姜黄素在子宫颈癌 Hela 细胞凋亡中的作用机制,并初步探讨其对 SPLUNC1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人子宫颈癌 Hela 细胞(上海通派生物科技有限公司);姜黄素(美国 Sigma 公司)。

1.2 主要试剂 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V(Annexin V-FITC)细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma 公司),DAB 染色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司),SPLUNC1 抗体(北京达科生物技术有限公司), β -actin(上海信裕生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器 L420 型离心机(长沙湘仪离心机有限公司),倒置相差显微镜(日本索尼公司),BSW-880 超净工作台(江苏苏净集团有限公司),流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.4 研究方法

1.4.1 细胞培养 人子宫颈癌 Hela 细胞常规培养于 DMEM 培养液中,置于 5% CO₂、37℃、饱和湿度的孵育箱中孵育,再应用 0.25% 胰酶常规消化,传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.4.2 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期 Hela 细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 5×10^3 个细胞,分别设置对照组(姜黄素 0 $\mu\text{mol/L}$)、实验 A 组(姜黄素 4 $\mu\text{mol/L}$)、实验 B 组(姜黄素 8 $\mu\text{mol/L}$)、实验 C 组(姜黄素 16 $\mu\text{mol/L}$)、实验 D 组(姜黄素 32 $\mu\text{mol/L}$)、实验 E 组(姜黄素 64 $\mu\text{mol/L}$)、实验 F 组(姜黄素 128 $\mu\text{mol/L}$),每组设 3 个复孔,根据 MTT 试剂盒说明书标准进行操作,培养 48 h,于酶标仪 490 nm 处测定吸光度值(A 值),实验重复 3 次,计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.4.3 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色观察细胞凋亡形态 取对数生长期 Hela 细胞悬液,以 1×10^4 个/孔于 24 孔板中放入已灭菌的细胞爬片,盖好,孵育过夜,分别加入实验 C、D 和 E 组浓度的姜黄素,终体积为每孔 2 ml;培养 48 h,取出 24 孔培养板,弃去废液,4℃预冷,以 PBS 清洗 3 次,再以 4% 多聚甲醛固定 30 min,加入 2 ml 的 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 染色液染色 15 min,取出爬片,自然风干,封片液封片,荧光显微镜观察,激发波长 350 nm,发射波长 460 nm。

1.4.4 Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 Hela 细胞悬液以 1×10^5 接种于 6 孔板中,待贴壁后,弃去上清液,分别加入实验 C、D 和 E 组浓度的姜黄素,终体积为 2 ml/孔,孵育 48 h,胰酶消化(胰酶消化时间不宜过长,以防引起假阳性),收集细胞,然后再以 pH = 7.4 预冷 PBS 清洗 3 次,用 PBS 重悬细胞,计数,使每管 0.1 ml 含 $(1 \sim 5) \times 10^4$ 细胞;再次离心收集细胞沉淀,用 400 μl Binding Buffer 悬浮细胞;再加入 5 μl Annexin V-FITC,混匀,加入 5 μl PI,混匀,室温避光反应 10 min,用美国 BD 公司流式细胞仪检测。

1.4.5 Western blot 检测 SPLUNC1 蛋白表达 取对数生长期 Hela 细胞悬液,分别加入实验 C、D 和 E 组浓度的姜黄素,孵育 48 h,胰酶消化,离心;采用 PIRA 裂解液提取细胞总蛋白,应用 BCA 法测定蛋白浓度,10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,然后将其半干转印至 PVDF 膜,再利用 5% 脱脂奶粉中封闭 1.5 h,加 SPLUNC1 抗体在 4℃ 条件下过夜;洗膜后加入二抗稀释液(1:1 000),在室温条件下孵育 60 min。采用增强化学发光法(ECL)显色曝光,使用凝胶成像系统扫描分析,且检测 β -actin 蛋白表达,作为内参照物。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件处理数据。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性和方差齐性检验后,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测对照组和不同浓度姜黄素组细胞增殖抑制率 与对照组比较,实验各组抑制率均明显增加(P 均 < 0.05);且除实验 F 组外,细胞增殖抑制率随姜黄素剂量增加而增加,呈剂量依赖性,差异有

表 1 MTT 法检测各组细胞增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

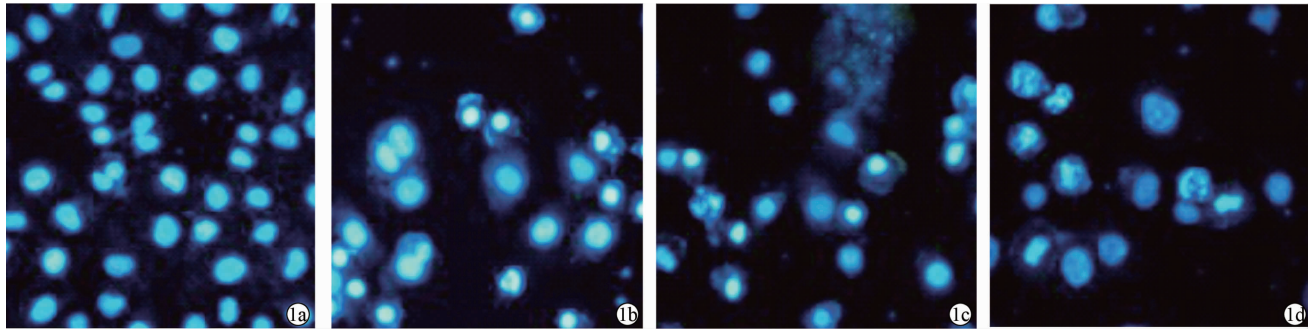
| 组别 | 复孔数 | 抑制率 (%) |
|---------------------------------|-----|------------------------------------|
| 对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 0 |
| 实验 A 组 (4 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 8.92 \pm 1.76 ^① |
| 实验 B 组 (8 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 18.43 \pm 3.45 ^{①②} |
| 实验 C 组 (16 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 34.28 \pm 5.49 ^{①②③} |
| 实验 D 组 (32 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 49.83 \pm 8.91 ^{①②③④} |
| 实验 E 组 (64 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 62.37 \pm 10.39 ^{①②③④⑤} |
| 实验 F 组 (128 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 60.98 \pm 10.81 ^{①②③④⑤} |

注:与对照组比, ^① $P < 0.05$;与实验 A 组比, ^② $P < 0.05$;与实验 B 组比, ^③ $P < 0.05$;与实验 C 组比, ^④ $P < 0.05$;与实验 D 组比, ^⑤ $P < 0.05$ 。

表 2 AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡

| 组别 | 复孔数 | 凋亡率 (%) |
|--------------------------------|-----|---------------------------------|
| 对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 2.13 \pm 0.45 |
| 实验 C 组 (16 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 9.38 \pm 3.45 ^① |
| 实验 D 组 (32 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 17.19 \pm 5.62 ^{①②} |
| 实验 E 组 (64 $\mu\text{mol/L}$) | 3 | 32.92 \pm 6.32 ^{①②③} |

注:与对照组比较, ^① $P < 0.05$;与实验 C 组比较, ^② $P < 0.05$;与实验 D 组比较, ^③ $P < 0.05$ 。



注:1a:对照组;1b:实验 C 组;1c:实验 D 组;1d:实验 E 组。

图 1 DAPI 染色观察细胞凋亡形态 ($\times 200$)

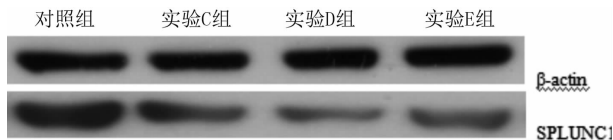


图 2 Western blot 检测 SPLUNC1 蛋白表达

统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 1。其半数抑制浓度 (IC_{50}) = 43.32 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 DAPI 染色观察对照组和不同浓度姜黄素组细胞凋亡情况 对照组 HeLa 细胞形态正常,实验 C、D、E 组出现了典型的细胞凋亡形态变化,细胞核碎裂、固缩;且细胞凋亡现象呈现随姜黄素剂量增加而愈加明显。见图 1。

2.3 AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术检测对照组和不同浓度姜黄素组细胞凋亡情况 与对照组比较,实验 C、D、E 组凋亡率随姜黄素剂量增加而增加,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 2。

2.4 Western blot 法测定 SPLUNC1 蛋白表达情况 与对照组比较,实验 C、D、E 组 SPLUNC1 蛋白表达随姜黄素剂量增加而下降。见图 2。

3 讨论

子宫颈癌是仅次于乳腺癌的女性癌症死亡的重要原因,且其发病趋于年轻化。目前,临床上治疗子宫颈癌的方法主要包括手术、化疗、放疗及综合治疗,其中手术和放疗对于早期子宫颈癌效果明显,但对中

晚期子宫颈癌效果并不理想^[6-8]。化疗是子宫颈癌主要辅助治疗手段,但其毒副作用明显,影响总体效果^[9-10]。故而,寻找疗效好且无明显毒副作用的药物,成为子宫颈癌研究的热点及趋势。

姜黄素是中药姜黄根茎中的有效成分。体外实验研究显示,姜黄素能够通过调节多种肿瘤相关因子及多条通路抑制肿瘤细胞的增殖和诱导肿瘤细胞的凋亡^[11-12]。体内实验研究显示,姜黄素能够抑制胃癌、皮肤癌等,缩小瘤体,减少肿瘤数目,且几乎无毒副作用。姜黄素抗癌机制主要包括以下几方面:(1)抑制肿瘤血管新生^[13-14]; (2)促进癌细胞凋亡^[15-17]; (3)参与信号转导^[18-19]; (4)促进促癌因素的排出。近年来研究显示姜黄素对乳腺癌、卵巢癌和子宫颈癌细胞均有抑制增殖和诱导凋亡作用。本研究表明,与对照组比较,除最高浓度组外实验各组 HeLa 细胞增殖抑制率均明显增加,说明姜黄素在一定浓度范围内可明显抑制 HeLa 细胞的增殖;对照组细胞形态正常,实验 C、D、E 组出现了典型的细胞凋亡形态变化,细胞核碎裂、固缩;与对照组比较,实验组 C、D、E 组凋亡率随姜黄素剂量增加而增加,说明姜黄素在一定浓度下可明显促进 HeLa 细胞凋亡。

SPLUNC1 确切的生物学功能至今尚不十分清楚,生物学信息分析表明,其编码蛋白的 N-端存在一个含 19 个氨基酸的信号肽。对 SPLUNC1 蛋白三维结构预测表明内部含一个杀菌/通透性增强蛋白结构

域,能够与细菌细胞壁上脂多糖特异性结合,具有内毒素和直接杀菌作用。本研究初步表明,与对照组比较,不同浓度姜黄素各组 SPLUNC1 表达下降,说明姜黄素可通过下调 SPLUNC1 的表达促进凋亡,但其具体机制还需后续进一步深入研究。

综上所述,在一定浓度范围内,姜黄素可明显促进子宫颈癌 Hela 细胞的凋亡,其作用可能与下调 SPLUNC1 的表达相关。

参考文献

- [1] Chen D, Gyllensten U. Lessons and implications from association studies and post-GWAS analyses of cervical cancer [J]. *Trends Genets*, 2015, 31(1): 41-54.
- [2] 赵菊花. 不同职业妇女子宫肌瘤流行病学因素分析[J]. *临床医学研究与实践*, 2016, 1(5): 65.
- [3] Khalil J, El Kacemi H, Afif M, et al. Five years' experience treating locally advanced cervical cancer with concurrent chemoradiotherapy: results from a single institution [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 292(5): 1091-1099.
- [4] 徐炜, 陈清勇, 陈方园, 等. LIMK-1/cofilin 在姜黄素抑制人肺癌细胞增殖和转移中的作用 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2014, 29(1): 36-40.
- [5] 王爽, 李文路, 吕丽春, 等. SPLUNC1 基因在人体组织中的表达分布特征 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(5): 617-621.
- [6] Gill BS, Lin JF, Krivak TC, et al. National cancer data base analysis of radiation therapy consolidation modality for cervical cancer: the impact of new technological advancements [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 90(5): 1083-1090.
- [7] 刘健, 崔艳艳, 李胜泽, 等. 新辅助放疗联合手术治疗 I B2 ~ II A2 期子宫颈瘤临床预后因素分析 [J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(5): 427-433.
- [8] Endo D, Todo Y, Okamoto K, et al. Prognostic factors for patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy: a

retrospective analysis in a Japanese cohort [J]. *J Gynecol Oncol*, 2015, 26(1): 12-18.

- [9] 肖艳, 成慧君, 王莉. 贝伐珠单抗联合化疗治疗复发及转移性子宫颈癌的安全性及近期疗效观察 [J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 18(3): 29-30.
- [10] Al-Darwish AA, Al-Naim AF, Al-Mulhim KS, et al. Knowledge about cervical cancer early warning signs and symptoms, risk factors and vaccination among students at a medical school in Al-Ahsa, Kingdom of Saudi Arabia [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(6): 2529-2532.
- [11] 陈寒露, 陈海滔, 徐超, 等. 姜黄素对结肠癌细胞株 NKD2 及 CXCR4 基因表达影响的研究 [J]. *中国肿瘤*, 2016, 25(4): 297-302.
- [12] 张君, 童钟, 李迎霞, 等. 姜黄素对肿瘤细胞增殖的影响 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(8): 1545-1548.
- [13] El-Azab M, Hishe H, Moustafa Y, et al. Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 652(1/3): 7-14.
- [14] Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction [J]. *BioFactors*, 2013, 39(1): 27-36.
- [15] Mishra D, Singh S, Narayan G. Curcumin Induces Apoptosis in Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines Via PARP-1 Cleavage [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(8): 3865-3869.
- [16] 盛顺良, 莫湘琼, 欧阳新平, 等. 姜黄素对子宫肌瘤细胞增殖、凋亡的影响及机制探讨 [J]. *山东医药*, 2012, 52(34): 27-29.
- [17] 郑欣, 邓凤祥. 姜黄素对人皮肤鳞状细胞癌细胞 SCL-1 凋亡的影响及相关机制研究 [J]. *中国药师*, 2014, 17(7): 1079-1083.
- [18] 李帅师, 孙军. PI3K/AKT/mTOR 信号传导通路在姜黄素抑制人肝癌细胞 Cox-2 表达中的作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2014, 39(1): 30-34.
- [19] Crețu E, Trifan A, Vasincu A, et al. Plant-derived anticancer agents - curcumin in cancer prevention and treatment [J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2012, 116(4): 1223-1229.

收稿日期: 2016-07-06 修回日期: 2016-08-19 编辑: 王宇