

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.25.005

姜黄挥发油对黑色素瘤 wm9 细胞增殖与凋亡的影响*

叶振源,涂云华,薛月萃,荣冬芸,咎雪娟,潘军玲,曹 煜
(贵州医科大学附属医院皮肤性病科 550004)

[摘要] **目的** 研究姜黄挥发油对黑色素瘤 wm9 细胞增殖与凋亡的影响。**方法** 应用不同浓度的姜黄挥发油作用于黑色素瘤的 wm9 细胞。用细胞增殖计数试剂盒(CCK8)检测增殖抑制率,倒置显微镜观察细胞形态学变化,ELISA 法检测 Caspase-3 酶活性,流式细胞检测细胞周期和凋亡。**结果** 姜黄挥发油在不同浓度下,对黑色素瘤 wm9 细胞作用表现不同,当药物浓度达到 40 mg/L,倒置显微镜下可见到典型的凋亡细胞;Caspase-3 酶活性随着药物浓度的递增,呈现药物浓度-酶活性正相关性;经姜黄挥发油作用后的 wm9 细胞被阻滞在 G₂/M 期。**结论** 姜黄挥发油诱导黑色素瘤 wm9 细胞凋亡的机制与细胞周期 G₂/M 期阻滞、Caspase 酶活化参与凋亡有关。

[关键词] 凋亡;增殖;姜黄挥发油;wm9 细胞

[中图分类号] R751 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)25-3472-03

Effect of turmeric volatile oil on proliferation and apoptosis of melanoma wm9 cells*

Ye Zhenyuan, Tu Yunhua, Xue Yuecui, Rong Dongyun, Zan Xuejuan, Pan Junling, Cao Yu

(Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of turmeric volatile oil on the proliferation and apoptosis of melanoma wm9 cells. **Methods** Different concentration of turmeric volatile oil were applied on melanoma wm9 cells; Detection of proliferation inhibition rate by cell counting kit-8(CCK8); Morphological changes of cells were observed by inverted microscope; Caspase-3 activities were evaluated by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA); Cell cycle and apoptosis was analyzed with flow cytometry(FCM). **Results** The effects of turmeric volatile on melanoma wm9 cells were different in different concentrations, when the drug concentration reached at 40 mg/L, typical apoptotic cells can be seen under the inverted microscope, Caspase-3 activities were positively correlated with drug concentration. Cell cycle of Wm9 cells were blocked in G₂/M phase after exposed to turmeric volatile oil. **Conclusion** Turmeric volatile oil has capability of apoptois-inducing in Wm9 cells. Moreover, turmeric volatile oil activated the key enzyme of apoptosis pathway and arrested cell cycle in G₂/M phase, which maybe the mechanism of turmeric volatile oil to inhibit proliferation and differentiation of tumor cells.

[Key words] apoptosis; proliferation; turmeric volatile oil; wm9 cells

黑色素瘤是来源于皮肤及其他器官黑素细胞产生的恶性肿瘤,近年来研究结果显示中国发病率为 0.53/10 0000,且随年龄增加而增加^[1]。本病恶性程度较高,转移发生早,病死率高,因此及时治疗很重要。目前治疗方式包括手术治疗和药物治疗。药物方面化疗药物仍然是临床一线治疗的首选^[2],但其在杀死肿瘤细胞的同时,也对正常细胞造成了影响,从而导致了一系列不良反应。姜黄是芭蕉目和姜科类植物,在临床上有降血脂、抗氧化、免疫调节等作用^[3-5],且不良反应少,有较大的临床应用价值,姜黄挥发油主要通过气相色谱-质谱从姜黄植物提取^[6]。本实验主要研究姜黄挥发油对黑色素瘤 wm9 细胞增殖、凋亡的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 姜黄挥发油(贵阳舒美达药厂有限公司,以 100:1 比例与二甲基亚砷混合,使药物充分溶解,稀释至 1 mg/mL,滤过除菌,置于 4℃ 冰箱存放),黑色素瘤 wm9 细胞(贵州中国科学院天然产物化学重点实验室赠予),胎牛血清(杭州四季青有限公司),RPMI1640 培养基(上海浩然生物技术有限公司),CCK8(上海前尘生物科技有限公司),倒置荧光显微镜(OLYMPUS IX53-A12PH),Caspase-3 酶试剂盒(北京

宝赛生物技术有限公司),BD FACS Verse 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司),ELX800 酶联免疫检测仪(美国 Biotech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 黑色素瘤 wm9 用 RPMI1640 培养基(含 1%青霉素、1%链霉素双抗、10%胎牛血清),置于 5%CO₂ 恒温 37℃ 条件下,饱和湿度培养箱中培养,每 2 天传代 1 次,待细胞进入对数生长期。

1.2.2 细胞增殖抑制率检测 在 96 孔板中加入 100 μL 的细胞悬液,并调整其细胞密度为 2.0×10⁵/mL 将培养板置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱培养 24 h,向培养板加入不同浓度的姜黄挥发油,参考涂云华浓度梯度方法^[7],最终使其浓度分别到 5、10、20、40 mg/L,同时设置细胞对照组和空白对照组,且每孔设 6 个复孔,将培养板在培养箱孵育 24、48、72 h,在培养结束时间前 1.5 h 向每孔加入 10 μL CCK8 溶液,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值(A 值),细胞增殖抑制率(%)=(对照组-实验组)/(对照组-空白对照组)×100%。

1.2.3 细胞形态学观察 取处于对数生长期的细胞,用 RPMI1640 培养基调整使其对数生长期细胞密度为 1.5×10⁵/mL,

* 基金项目:贵州省中药现代化专项项目(黔科合中药字[2012]5018 号)。 作者简介:叶振源(1988—),住院医师,硕士,主要从事中草药方面的研究。

表 1 姜黄挥发油作用 WM9 细胞增殖抑制率比较(±s)

组别	24 h		48 h		72 h	
	A ₄₅₀	抑制率(%)	A ₄₅₀	抑制率(%)	A ₄₅₀	抑制率(%)
对照组	0.93±0.01	—	0.96±0.05	—	0.99±0.00	—
5 mg/L	0.85±0.12	0.09±0.15 *	0.87±0.01	0.11±0.08 *	0.91±0.05	0.10±0.07 *
10 mg/L	0.85±0.05	0.10±0.07 *	0.85±0.05	0.14±0.00 *	0.85±0.06	0.17±0.07 *
20 mg/L	0.80±0.00	0.16±0.00 *	0.73±0.07	0.29±0.14 *	0.77±0.07	0.26±0.07 *
40 mg/L	0.76±0.02	0.21±0.02 *	0.55±0.10	0.51±0.10 *	0.65±0.04	0.40±0.05 *

* :P<0.05,与对照组比较;—:此项无数据。

接种于 6 孔板,置于 5%CO₂ 37℃ 的培养箱中,培养 12 h 孵育过夜,分别加入终浓度为 5、10、20、40 mg/L 姜黄挥发油培养液,对照组则加入 10%FBS RPMI1640 培养基同步培养,置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养 48 h,观察细胞形态变化。

1.2.4 Caspase-3 酶活性检测 取处于对数生长期的黑色素瘤 wm9 细胞,调整细胞密度为 1×10⁵/mL,接种于 6 孔板,每孔 1 mL,培养 12 h,加入不同体积药物,总体积为 2 mL,使其终浓度为 5、10、20、40 mg/L,同时设细胞对照组,培养 48 h,胰酶消化,离心收集细胞,取 50 μL 裂解液加入,均匀吹打,置冰上裂解 30 min,其间涡旋振荡 3~4 次,每次 10 s,4℃,12 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清液,将上清液转移到 96 孔板中,按照 Caspase-3 酶活性检测试剂盒使用说明书操作方法,取细胞提取液 5 μL,加入含荧光底物 Ac-DEVD-AMC 的 Caspase-3 反应缓冲液每孔 45 μL,37℃ 避光,孵育 4 h,用酶标仪在波长为 460 nm 测定 A 值。Caspase-3 活化程度=实验组 A₄₆₀/正常对照 A₄₆₀。

1.2.5 细胞周期测定 细胞培养方法同 1.2.4,加入不同体积药物,使其终浓度分别为 5、10、20、40 mg/L,总体积 2 mL,同时设细胞阴性对照组,并收集细胞,培养 48 h,用 PBS 洗涤细胞 1 次(2 000 r/min 离心 5 min),使其细胞浓度为 1×10⁶/mL,离心后去除上清液,加入 70%乙醇 500 μL 固定 2 h,4℃ 保存,染色前用 PBS 洗去固定液,加入 100 μL RnaseA 37℃ 水浴 30 min,再加入 400 μL PI 染色混匀,4℃ 避光 30 min,上机检测。

1.2.6 细胞凋亡检测 细胞培养方法同 1.2.4,加入姜黄挥发油,药物浓度设置同 1.2.4,总体积 2 mL,设置细胞对照组,培养 48 h,4℃ 离心 5 min 收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,4℃ 离心 5 min,调整使其细胞浓度 1×10⁵/mL,加入 100 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞,5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI Staining Solution 轻轻混匀。避光、室温 10 min,加入 400 μL 1×Binding Buffer,混匀,用 BD FACS Verse 流式细胞仪测定细胞凋亡。

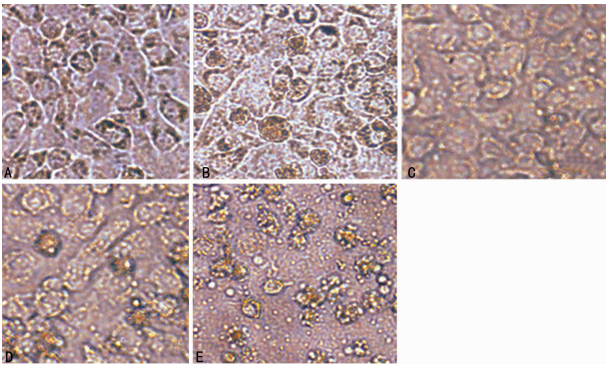
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料用 ±s 表示,同一时段的不同浓度组间比较采用单因素方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞增殖抑制率检测 不同浓度姜黄挥发油作用黑色素瘤 wm9 细胞不同时间段后,均有抑制作用,且随着药物浓度的增高,抑制率呈增高趋势,且其作用方式呈现时间-剂量相关性。作用 48 h 时,增殖抑制作用较为明显,与对照组相比,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1。

2.2 细胞形态学观察 正常黑色素瘤 wm9 呈多种细胞形态,贴壁生长,细胞核呈圆形或椭圆形,深染,核仁小、核浆丰富,胞

质少。加入药物后,细胞形态不规则,细胞间隙增大,细胞增殖速度明显变慢。当药物浓度浓度达到 20 mg/L,细胞核固缩,部分肿瘤细胞膜开始破裂,可见部分细胞内容物释放,当药物浓度达到 40 mg/L,已不能见到正常肿瘤细胞结构,可见大量的细胞碎片。见图 1。



A:对照组;B:5 mg/L 姜黄挥发油处理细胞;C:10 mg/L 姜黄挥发油处理细胞;D:20 mg/L 姜黄挥发油处理细胞;E:40 mg/L 姜黄挥发油处理细胞。

图 1 不同浓度姜黄挥发油对 wm9 细胞形态变化的影响(×200)

2.3 Caspase-3 酶活性检测 姜黄挥发油对黑色素瘤 wm9 具有促凋亡作用,且随着药物浓度的增加,呈药物浓度-酶活性正相关,当药物浓度浓度达到 40 mg/L,此时酶活性达到最大值。见表 2。

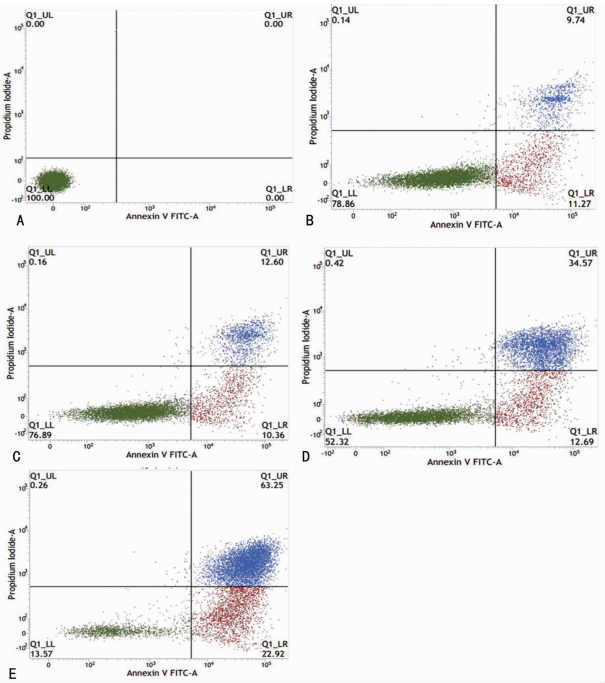
表 2 不同浓度姜黄挥发油作用 wm9 细胞 Caspase-3 酶活性比较(±s)

组别	A 值	酶活性
对照组	0.06±0.01	—
5 mg/L	0.08±0.06	0.89±0.34 *
10 mg/L	0.09±0.00	1.68±0.20 *
20 mg/L	0.11±0.03	1.82±0.26 *
40 mg/L	0.14±0.02	2.27±0.21 *

* :P<0.05,与对照组比较;—:此项无数据。

2.4 细胞凋亡检测 姜黄挥发油作用于细胞 48 h 后,黑色素瘤 wm9 细胞均有不同程度的凋亡,随着药物浓度的增加,凋亡率亦增加,呈现药物浓度-凋亡率正相关性,早期凋亡率分别为(12.30±0.01)、(11.95±0.04)、(14.63±0.12)、(25.74±0.20)%,晚期凋亡率(10.18±0.02)、(13.74±0.13)、(35.68±0.21)、(58.14±0.13)%。早期凋亡率和晚期凋亡率在药物浓度为 40 mg/L 达到最大值,且在同等药物浓度下,晚

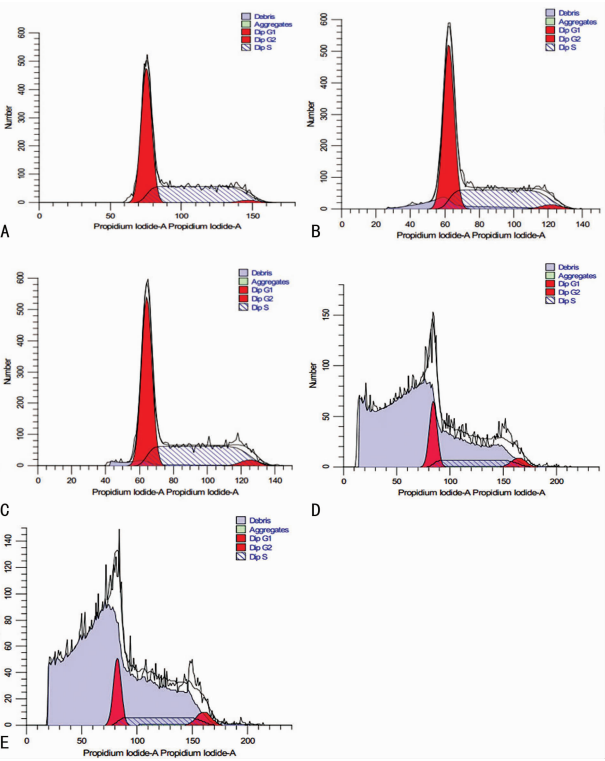
期凋亡率较早期凋亡率更高,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。



A:自然凋亡;B~E:药物浓度分别 5、10、20、40 mg/L。

图 2 不同浓度姜黄挥发油诱导 wm9 细胞凋亡

2.5 细胞周期检测 细胞周期检测发现 G₁、S 期细胞随着药物浓度的增高,细胞数目呈现递减趋势,呈现药物-细胞数目负相关性。而 G₂ 期细胞随着药物浓度的增高,该期细胞数目呈现递增趋势。见图 3。



A:对照组;B~E:药物浓度分别 5、10、20、40 mg/L。

图 3 不同浓度姜黄挥发油对细胞周期的影响

3 讨 论

姜黄为姜科植物姜黄的干燥根茎,作为一种中药在现代研

究广泛,现在对其药理作用已做了相关的研究,表明其在肿瘤、慢性肝病、肾病、糖尿病、皮肤病等疾病的治疗上有一定的优势^[8]。其中姜黄的主要成分姜黄素对于抗肿瘤已有相关研究,如乳腺癌、结肠癌^[9-10]。姜黄的另一种成分姜黄挥发油在抗肿瘤方面的研究却鲜有报道,相关文献表明姜黄挥发油对抗急性单核细胞白血病 THP-1 细胞具有增殖抑制剂促凋亡作用^[7],然而对于其抗黑色素瘤细胞方面尚无研究。

本研究主要探讨姜黄挥发油对于黑色素瘤 wm9 细胞的作用效果。实验研究结果表明,姜黄挥发油对于黑色素瘤 wm9 细胞生长具有抑制作用,且随着药物浓度的递增,其抑制作用越明显,呈现时间-浓度相关性,当药物浓度为 40 mg/L,其对细胞的抑制作用最明显。Caspase 是凋亡信号通路中重要的蛋白酶之一,也是与凋亡密切相关的调节基因,在细胞凋亡过程中与其他蛋白共同作用调控细胞的凋亡^[11],而 Caspase-3 能够切割不同的底物,经激活后能剪切细胞结构蛋白和抑制 DNA 修复作用,同时参与凋亡启动和凋亡程序执行,从而导致细胞死亡,是其最重要的关键凋亡调节基因和终末执行酶^[12]。实验结果显示,随着药物浓度递增,酶活性增加,表明药物对其有促凋亡作用。流式细胞仪用于检测细胞周期与细胞凋亡,细胞周期调控是一个精细的生物学过程,涉及了多个基因和蛋白的参与,进而形成了复杂的信号分子网络系统,而恶性肿瘤最基本的生物学特征是肿瘤细胞失控性增殖,而其生物学基础是细胞周期调控紊乱^[13]。本实验结果表明,G₁、S 期细胞随着药物浓度增加,细胞数目递减,而 G₂ 期细胞随着药物浓度的增高,细胞数目呈递增趋势,表明细胞被阻滞在 G₂/M 期,从而干扰了正常细胞周期,阻断了细胞正常有丝分裂,再次论证了姜黄挥发油对于黑色素瘤 wm9 的增殖抑制作用。

综上所述,姜黄挥发油诱导凋亡的机制与细胞周期 G₂/M 期阻滞、Caspase 酶活化参与凋亡有关,在此基础上,作者还将进一步探索姜黄挥发油诱导黑色素瘤 wm9 细胞凋亡的具体信号通路,为探索黑色素瘤的新型药物提供理论依据。

参考文献

[1] 唐智柳,石建伟,蔡美玉,等. 中国皮肤黑色素瘤发病及其影响因素分析[J]. 中国肿瘤,2014,23(10):829-833.

[2] 田红,肖桂芝,田苗,等. 黑色素瘤治疗药物的研究进展[J]. 现代药物与临床,2015,30(7):890-895.

[3] Ming SM,Lin G,Shuo T,et al. Effect of curcumin on the level of blood lipid and blood glucose in diabetic rat model[J]. Advanced Materials Res,2014,1051(1):419-422.

[4] Zabicka D. Turmeric-potent antioxidant,anti-inflammatory, anti-microbial and anticancer Spice [J]. Positive Health,2014,213(1):1.

[5] Cudell DR,Wilkinson F. Curcumin:powerful Immunomodulator from turmeric[J]. Curr Immunol Rev,2014,10(2):122-132.

[6] Gounder DK,Lingamallu J. Comparison of chemical composition and antioxidant potential of volatile oil from fresh ,dried and cured turmeric(Curcuma longa) rhizomes[J]. Industrial Crops Products,2012,38(1):124-131.

[7] 涂云华,康颖倩,周英,等. 姜黄挥发油对 THP-1 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 山东大学学报(医学版),2015,53(5):46-51.

[8] 章村田. 姜黄素药理作用研究进展[J]. (下转第 3477 页)

等^[8]采用 FQ-nRT-PCR 法对新疆伊犁地区牧羊犬的脑组织及 PBMC BDV 进行检测,其中脑组织 BDV 阳性率为 9%,PBMC 阳性率为 5%,虽然脑组织 BDV 阳性率高于外周血,但差异无统计学意义($P>0.05$)。Nakamura 等^[9]从 1 例精神分裂症患者脑组织中分离出了 BDV,但该患者 PBMC 中并未检出 BDV 核酸,故外周血中 BDV 核酸阴性并不能完全排除患者存在 BDV 感染。

冰岛是一个对动物进出口要求非常严格的国家,检测范围包括 BDV,但 Bjornsdottir 等^[10]首次在该地区马群中发现 BDV 相关抗体,推测出现这种现象可能的原因是迁徙的候鸟。最近有学者在美国的加拿大鹅中体内分离得出 1 株新的 BDV 序列,推测此类迁徙的水鸟能长距离携带该病毒^[11]。也有人提出,沿迁徙候鸟路径分布的马厩中的马有较高的 BDV 检出率^[12]。据统计蝙蝠体内可分离出 80 多种病毒,且蝙蝠种类繁多,在自然界分布广泛,喜群居、寿命长、善飞行等特点为病毒传播创造便利,蝙蝠在新发病毒传播及流行中起着重要作用。而随着人类城市的不断扩张,越来越多蝙蝠可长期定居于城市中,人们与蝙蝠的接触也逐渐增多,由此带来公共卫生问题不得不引起关注。

本研究采用 RT-PCR 检测组 82 只蝙蝠脑组织 BDV-P40 阳性率为 12.2%。BDV-P40 PCR 阳性产物测序与国外标准株 Strain V、H1766 比对同源性为 96.2%,有 3 个位点发生碱基互换(nt548G>T,nt550T>G,nt553A>T);与 He/80 比对同源性为 94.9%,有 4 个位点发生碱基互换(nt548G>T,nt550T>G,nt553A>T,nt609T>C)。本研究证实了贵州遵义地区蝙蝠存在 BDV 自然感染,该地区感染的 BDV-P40 核苷酸序列与 Strain V、H1766 存在高度同源性。BDV 是一种特殊的 RNA 病毒,其 RNA 具有高度保守性,从而保证了遗传的稳定性。蝙蝠脑组织中检出的 BDV-P40 基因片段虽存在部分碱基突变,但所编码的氨基酸序列未发生改变。

新型病毒的不断爆发流行,无疑给经济建设及社会安宁带来了严重的影响。近来的中东呼吸综合征,因其致死率高于非典型肺炎(SARS),引起了人们极度的恐慌,同时也敲响了世界必须对新发病毒感染性疾病的进行实时监控的警钟。本研究证实了贵州地区蝙蝠存在 BDV 自然感染,但因缺乏从该地区动物或人脑组织分离出来的病毒株,对该地区蝙蝠自然感染 BDV 的来源尚无法做全面的解释。因此,尚需做进一步的调查研究,揭示该地区 BDV 的流行病学特征,为防止 BDV 的爆发流行打下基础。

参考文献

[1] Lipkin WI,Briese T,Hornig M. Borna disease virus - Fact

(上接第 3474 页)

河南中医,2015,35(5):1188-1190.

[9] Zhi DL,Xiang PL,Wei JZ,et al. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo[J]. Int J Clin Exp Pathol,2014,7(6): 2818-2824.

[10] Chang YJ,Huang CY,Hung CS,et al. GRP78 mediates the therapeutic efficacy of curcumin on colon cancer[J]. Tumour Biol,2015,36(2):633-641.

[11] Loana V. Inflammasome caspase[J]. Nature Immunol,

and fantasy[J]. Virus Res,2011,162(1/2):162-172.

[2] Bechter K. Updating the mild encephalitis hypothesis of schizophrenia[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,2013,42(S1):71-91.

[3] Sendow I,Ratnawati A,Taylor T,et al. Nipah virus in the fruit bat pteropus vampyrus in sumatera, Indonesia[J]. PLoS One,2013,8(7):e69544.

[4] Field H,De Jong C,Melville D,et al. Hendra virus infection dynamics in Australian fruit Bats[J]. PLoS One, 2011,6(12):e28678.

[5] Kinnunen PM,Palva A,Vaheri A,et al. Epidemiology and host spectrum of Borna disease virus infections[J]. J Gen Virol,2013,94(Pt 2):247-262.

[6] Schindler AR,Vogtlin A,Hilbe M,et al. Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts[J]. Mol Cell Probes,2007,21(1):47-55.

[7] Watanabe M,Zhong Q,Kobayashi T,et al. Molecular ratio between borna disease viral-p40 and -p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA[J]. Microbiol Immunol,2000,44(9):765-772.

[8] 何丰,冯裕星,孙后超,等. 牧羊犬外周血和脑组织博纳病病毒检测结果的比较[J]. 中国人兽共患病学报,2010, 26(4):337-340.

[9] Nakamura Y,Takahashi H,Shoya Y,et al. Isolation of borna disease virus from human brain tissue[J]. J Virol, 2000,74(10):4601-4611.

[10] Bjornsdottir S,Agustsdottir E,Blomstrom AL,et al. Serological markers of Bornavirus infection found in horses in Iceland[J]. Acta Vet Scand,2013,55(1):77.

[11] Payne S,Covaleda L,Guo JH,et al. Detection and characterization of a distinct bornavirus lineage from healthy Canada geese (branta canadensis) [J]. J Virol, 2011, 85 (22):12053-12056.

[12] Pitlik S,Teplitsky V,Richt JA,et al. Increased prevalence of Borna disease virus elisa and immunofluorescent antibodies in horses from farms situated along the paths of migratory birds[J]. Israel J Veterinary Med,2003,58(2): 80-85.

(收稿日期:2016-03-18 修回日期:2016-06-06)

2012,13(4):358.

[12] Xin MW,Hui M,Jiao L,et al. Dynamic change of SGK expression and its role in neuron apoptosis after traumatic brain injury[J]. Int J Clin Exp Pathol,2013,6(7):1282-1293.

[13] 詹启敏,陈杰. 细胞周期与肿瘤转化医学[J]. 中国肿瘤临床,2014,41(1):1-7.

(收稿日期:2016-03-11 修回日期:2016-05-21)