

# 姜黄素联合顺铂对人前列腺癌 PC-3 细胞株的影响

郭巍, 强亚勇, 贺晓龙, 汪峰, 张斌斌, 马亚东

(延安大学附属医院泌尿外科, 延安 716000)

**【摘要】 目的** 观察姜黄素联合顺铂(DDP)对人前列腺癌 PC-3 细胞株抗肿瘤活性作用的影响,并探讨其作用机制。**方法** 采用 MTT 法检测姜黄素单独或联合顺铂对人前列腺癌 PC-3 细胞株的抑制率;采用流式细胞术检测不同浓度姜黄素和顺铂单药、联合处理后对人前列腺癌 PC-3 细胞株凋亡率变化;RT-PCR 检测姜黄素单独或联合顺铂对人前列腺癌 PC-3 细胞株作用后 P53 的 mRNA 蛋白表达。**结果** 不同浓度的姜黄素组随着药物浓度增加、作用时间延长,细胞抑制率上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );联合用药组明显高于单一用药组( $P < 0.05$ ),两药联合具有协同作用;姜黄素和顺铂均促进人前列腺癌 PC-3 细胞株凋亡,联合用药可显著增加凋亡率;RT-PCR 结果显示联合用药组能使 P53 mRNA 蛋白表达水平较单药组上升。**结论** 姜黄素对人前列腺癌 PC-3 细胞株具有生长抑制作用,且具有剂量和时间依赖性,其与顺铂联合具有协同抑制作用,其协同作用可能与上调 P53 mRNA 表达有关。

**【关键词】** 前列腺肿瘤;顺铂;姜黄素;细胞凋亡

中图分类号:R737.25 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2017.02.019

**The influence of Curcumin combined with Cisplatin on human prostate cancer cell line PC-3** Guo Wei, Qiang Yayong, He Xiaolong, Wang Feng, Zhang Binbin, Ma Yadong (Department of Urology, the Affiliated Hospital Yan'an University, Yan'an 716000, China)

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of Curcumin combined with Cisplatin (DDP) on human prostate cancer cell line PC-3 and explore the mechanism. **Methods** MTT assay was used to detect the inhibition rate of Curcumin alone or combination with Cisplatin on human prostate cancer cell line PC-3. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. RT-PCR method was used to analyze the mRNA expression level of p53. **Results** The cell inhibition rate increased with the increase of concentration and action time of Curcumin. The effect of the combined treatment group was significantly higher than that of each single medication group ( $P < 0.05$ ). The combination had a synergistic effect. Both Curcumin and Cisplatin induced the apoptosis of human prostate cancer cell line PC-3, and the combination could significantly increase the apoptosis rate ( $P < 0.05$ ). RT-PCR results showed that the expression level of P53 mRNA was increased more in the combination group compared with that in the single drug group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Curcumin can inhibit the growth of human prostate cancer cell line PC-3 with a dose- and time-dependent manner. The combination with Cisplatin have a synergistic inhibitory effect, which may be related to the upregulation of P53 expression.

**【Key words】** Prostatic neoplasms; Cisplatin; Curcumin; Apoptosis

前列腺癌于 60 岁开始出现发病高峰,而我国人口老龄化持续增长与代谢综合征异常(肥胖、高血糖、高血压等)两大因素导致在未来的 10 年内前列腺癌的发病率将逐步升高<sup>[1-2]</sup>。前列腺癌患者的生存率与疾病的临床分期和治疗方法有关,在我国,初诊前列腺癌的患者仅有 1/3 为局限性病变<sup>[3]</sup>,造成手术治愈率不高。顺铂(DDP)是传统抗肿瘤药物,抗癌作用强但不良反应明显,易出现耐药性。寻找到低毒性、抗癌作用强,并能与传统抗肿瘤药物起到

协同作用的药物,在治疗前列腺癌方面具有良好的前景。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人前列腺癌 PC-3 细胞株购自上海拜力生物公司。RPMI-1640 培养基与胎牛血清购自 GIBCO 公司,姜黄素、MTT、DMSO 及 PI 购自美国 Sigma 公司,Trizol 与 AnnexinV FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司,P53 引物由北京三博远志生物公司设计合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及实验分组** 人前列腺癌 PC-3 细

胞用 RPMI-1640 培养液培养,培养液中加入 10% 胎牛血清、100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞贴壁后实验分组:(1)对照组:加 5% 血清培养液(2)单药实验组:姜黄素的浓度分别为 5.0、10.0、20.0、40.0 μmol/L, DDP 的浓度分别为 0.5、1、2、4 μg/mL。(3)联合组:姜黄素浓度为 2.5 μmol/L 不变,联合单药浓度 DDP。(4)空白组:在无细胞的孔中加 5% 培养液。实验组每个浓度设 5 个平行孔,温育 24 h、48 h。

1.2.2 MTT 法 用 0.25% 胰蛋白酶消化对数生长长期的人前列腺癌 PC-3 细胞,以每孔为 3 × 10<sup>3</sup> 个细胞接种于 96 孔培养板中培养 24 h 后分组。每孔加入浓度为 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL,培养 4 h。吸净上清液,每孔加 DMSO 150 μL 振荡 10 min,使用酶标仪测定波长为 490 nm 处的吸光度值,空白组调零。细胞增殖抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。采用金正均法判断联合用药是否具有协同作用,公式:  $q = (Ea + b) [Ea + (1 - Ea) / Eb]$ 。公式中 (Ea + b) 为联合用药的抑制率, Ea、Eb 分别为 DDP 和姜黄素单药的抑制率。  $q = 0.85 - 1.15$  表示两药作用相加,  $q < 0.85$  表示两药有拮抗作用,  $q > 1.15$  表示两药有协同作用。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将 PC-3 细胞制成细胞悬液以 2 × 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup> 的密度接种 6 孔板内并分 4 组,对照组加 5% 血清培养液,实验组为姜黄素组(5.0 μmol/L)、DDP 组(1.0 μg/mL)及姜黄素与 DDP 联合组。药物作用 48 h 后收集细胞,严格遵守凋亡检测试剂盒内染色步骤染色,于流式细胞仪上检测并计算细胞凋亡率。

1.2.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 按照 Trizol 试剂盒说明书操作抽提实验组处理 48 h 的 PC-3 细胞总 RNA,并合成 cDNA 于 -80 °C 保存。按照 RT-PCR 试剂盒步骤操作并分析相对含量值。P53 蛋白相对定量值为 P53 与 β-actin 灰度值的比值。引物序列、大小及退火温度见表 1。

表 1 被检测基因所使用的引物序列

基因	序列(5'→3')	产物长度(bp)	Tm(°C)
β-actin	上游引物	gaaaa tetgg ccacc cacct	141 61.8
	下游引物	gggggt gttga aggtc tcaaa	
P53	上游引物	acate tggcc ttgaa accac	349 65.0
	下游引物	aaagc gagac ccagt ctcaa	

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件包进行分析,所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间差异比较采用 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MTT 实验结果 与对照组相比,不同浓度的姜黄素、DDP 对 PC-3 细胞作用 24 h、48 h 后均有抑制作用,PC-3 细胞生长抑制作用随着姜黄素、顺铂药物浓度增加,作用时间延长,其产生的抑制作用越明显,呈现出时间、剂量依赖性关系。不同浓度组、不同时间组之间抑制率相比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2。5.0 μmol/L 的姜黄素与不同浓度的 DDP 联用均对 PC-3 细胞的增值有抑制作用,其联合用药组抑制作用明显强于单药组 ( $P < 0.01$ ),按照联合用药公式推算,姜黄素与 DDP 联合  $q$  均大于 1.14,两者之间呈协同作用。

表 2 不同浓度的姜黄素和顺铂对 PC-3 细胞生长的抑制率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	试剂浓度	24 h	48 h
对照组	0	0	0
姜黄素	5.0 μmol/L	9.15 ± 1.82	23.13 ± 2.44
	10.0 μmol/L	16.84 ± 2.32	38.35 ± 2.10 <sup>b</sup>
	20.0 μmol/L	23.92 ± 3.20	48.40 ± 2.88
	40.0 μmol/L	30.32 ± 2.26 <sup>a</sup>	54.78 ± 3.40 <sup>ab</sup>
DDP	0.5 mg/L	4.33 ± 0.56	5.99 ± 3.38
	1.0 mg/L	10.58 ± 1.53	16.14 ± 2.27
	2.0 mg/L	14.16 ± 1.65	39.50 ± 2.30 <sup>ab</sup>
	4.0 mg/L	24.80 ± 2.37	59.82 ± 3.53 <sup>ab</sup>
姜黄素 + DDP	5.0 μmol/L	15.42 ± 2.17	31.85 ± 2.09
	+0.5 mg/L		
	5.0 μmol/L	17.13 ± 1.83	44.84 ± 2.32 <sup>ab</sup>
	+1.0 mg/L		
	5.0 μmol/L	24.20 ± 2.15	65.77 ± 3.13 <sup>ab</sup>
	+2.0 mg/L		
	5.0 μmol/L	34.95 ± 2.24 <sup>a</sup>	80.74 ± 2.47 <sup>ab</sup>
	+4.0 mg/L		

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;同一试剂浓度内,与 24 h 时比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 流式细胞仪结果显示,对照组 PC-3 细胞凋亡率为 1.53%;姜黄素组、DDP 组单药作用 PC-3 细胞 24 h 的凋亡率分别为 5.45%、9.66% ( $P < 0.05$ );而姜黄素 5.0 μmol/L 与 DDP 1.0 μmol/L 联合作用 24 h 的凋亡率明显升高,为 28.39% ( $P < 0.05$ )。联合用药后,可形成明显的凋亡峰,显著高于单药组,表明姜黄素、

DDP 均可以有效诱导 PC-3 的凋亡率,在 PC-3 细胞中姜黄素与 DDP 存在协同作用。

**2.3 RT-PCR 检测 P53 的 mRNA 表达** 姜黄素诱导 PC-3 细胞 48 h 后, P53 蛋白对照组、姜黄素单药组、DDP 单药组与联合组的相对定量值为 0.204、0.342、0.350 和 0.598。联合组与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 单药组与对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。提示姜黄素与顺铂联合能一定程度上能上调 P53 基因 mRNA 表达。

### 3 讨论

姜黄素是从中药姜黄中提取的一种色素,具有多种药理学作用。研究发现,姜黄素通过清除羟基自由基、清除过氧化反应活性的自由基和增强抗氧化酶活性、减轻氧化应激损伤等途径来实现抗氧化作用<sup>[4]</sup>;通过抑制核转录因子、环氧合酶-2、干扰素等炎性介质和调控皮质类固醇途径来实现抗炎作用<sup>[5-7]</sup>;通过对总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇成分的影响降低血脂及血糖<sup>[8-9]</sup>;可以抑制肝星状细胞(HSC)的活化和诱导受损肝细胞凋亡来阻止肝纤维化的发生<sup>[10]</sup>;通过降低 p300/CBP 和乙酰化组蛋白 H3/乙酰化组蛋白 H4 的脑源性神经营养因子,在神经性疼痛治疗中发挥了积极作用<sup>[11]</sup>;可以产生有效的神经保护作用防止由于脊髓损伤<sup>[12]</sup>;通过调节多种细胞信号传导通路和肿瘤相关因子发挥抗癌作用,并能增强化疗药物和放疗的敏感性<sup>[13]</sup>。研究发现,姜黄素对肺癌细胞<sup>[14]</sup>、胃癌细胞<sup>[15]</sup>、人成骨肉瘤细胞<sup>[16]</sup>等实验中都具有抑制增殖、促进凋亡的作用。顺铂是一种广谱的传统抗癌药物,在临床应用杀肿瘤细胞效果好,但治疗中不仅不良反应大,而且易产生耐药性<sup>[17-18]</sup>。其通过两方面导致耐药的发生<sup>[19]</sup>:(1)防止铂类药物与脱氧核糖核酸(DNA)的结合,从而防止肿瘤细胞 DNA 的破坏。(2)修复系统对损伤的 DNA 进行修复并且肿瘤细胞逃逸机制的发生,使一直被破坏的细胞仍然不被杀灭。本实验结果显示,姜黄素及顺铂对人前列腺癌 PC-3 细胞的生长均有抑制增殖的作用,并且对时间、剂量具有明显的依赖性。有学者发现,姜黄素联合顺铂可以对膀胱癌 T24 细胞下调 keap1-nrf2 通路,使抗肿瘤作用增强<sup>[20]</sup>。本次研究也发现姜黄素联合顺铂抑制 PC-3 细胞增殖起协同增效作用。

实验证实,姜黄素的抗癌作用与对肿瘤细胞凋亡途径的调节密不可分<sup>[21-22]</sup>。姜黄素促进凋亡可能机制与姜黄素可以激活 caspase-3、caspase-8、

caspase-9<sup>[23]</sup>、调控 Bax/Bcl-2 比值<sup>[24]</sup>,并释放细胞色素 C 等因素有关。本实验结果显示,姜黄素与顺铂两药联合后,凋亡率明显高于单药组和对照组,表明姜黄素可以协同增强顺铂对 PC-3 细胞的凋亡途径。

P53 蛋白是一种可以抑制细胞分裂的蛋白质,在细胞信号传导途径中的作用有<sup>[25]</sup>:(1)对细胞周期的 G1 期和 G2/M 期有阻止作用;(2)可以调控 Bax/Bcl-2、Fas/Apo1 等蛋白影响细胞凋亡;(3)参与 DNA 重组和修复功能。Binhua 等<sup>[26]</sup>学者发现姜黄素作用肺癌 A549 细胞 48 h 后,能够调节 P53、Bax、Bcl-2、Caspase-3 的表达水平,抑制肺癌细胞的增殖;Weir 等<sup>[27]</sup>学者发现姜黄素通过激活 Caspase-3、PARP 降解、促进 p53 的磷酸化和细胞凋亡来抑制顺铂耐药的人卵巢癌细胞的增殖;另有冯冰霜等<sup>[28]</sup>发现姜黄素联合顺铂可能通过增加 p53 基因的表达来增加宫颈癌 Hela 细胞化疗敏感性。本实验结果显示,姜黄素与顺铂两药联合后与单药相比,可以协同增强促凋亡基因 P53 的表达,提示姜黄素可能通过 P53 途径调节 PC-3 细胞的增殖、凋亡作用和提高顺铂的敏感性。

姜黄素有多条细胞信号转导途径,与肿瘤生长转移、肿瘤细胞凋亡、肿瘤免疫和肿瘤药物耐受有着密切的关系,对传统化疗药来说可能是一种可靠的增敏药。

### 参考文献

- [1] YI H, QI Z, RAO J, et al. Longitudinal trends in prostate cancer incidence, mortality, and survival of patients from two Shanghai city districts: a retrospective population-based cohort study, 2000-2009 [J]. BMC Public Health, 2014, 14(8): 1-8.
- [2] 叶定伟, 朱耀. 中国前列腺癌的流行病学概述和启示 [J]. 中华外科杂志, 2015, 53(4): 249-252.
- [3] 马春光, 叶定伟, 李长岭, 等. 前列腺癌的流行病学特征及晚期一线内分泌治疗分析 [J]. 中华外科杂志, 2008, 46(12): 921-925.
- [4] RIVAS-ARREOLA MJ, ROCHA-GUZMÁN NE, GALLEGOS-INFANTE JA, et al. Antioxidant Activity of Oak (Quercus) Leaves Infusions against Free Radicals and their Cardioprotective Potential [J]. PJBs, 2010, 13(11): 537-545.
- [5] XIAOYAN Z, QIAN L, RUI MIN C, et al. Curcumin alleviates neuropathic pain by inhibiting p300/CBP histone acetyltransferase activity-regulated expression of BDNF and cox-2 in a rat model [J]. Plos One, 2014, 9(3):

- e91303.
- [6] MIDURA-KIELA MT, RADHAKRISHNAN VM, LARMONIER CB, et al. Curcumin inhibits interferon- $\gamma$  signaling in colonic epithelial cells[J]. *Am J Physiol*, 2012, 302(1):85-96.
- [7] KUMARI A, DASH D, SINGH R. Lipopolysaccharide (LPS) exposure differently affects allergic asthma exacerbations and its amelioration by intranasal curcumin in mice[J]. *Cytokine*, 2015, 76(2):334-342.
- [8] SAHEBKAR A. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials investigating the effects of curcumin on blood lipid levels[J]. *Clinical Nutrition*, 2014, 33(3):406-414.
- [9] MIAO MS, GUO L, TIAN S, et al. Effect of curcumin on the level of blood lipid and blood glucose in diabetic rat model[J]. *Advan Mater Res*, 2014, 1051:419-422.
- [10] WANG ME, CHEN YC, CHEN IS, et al. Curcumin protects against thioacetamide-induced hepatic fibrosis by attenuating the inflammatory response and inducing apoptosis of damaged hepatocytes[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(10):1352-1366.
- [11] ZHU X, LI Q, CHANG R, et al. Curcumin alleviates neuropathic pain by inhibiting p300/CBP histone acetyltransferase activity-regulated expression of BDNF and cox-2 in a rat model[J]. *Plos One*, 2014, 9(3):e91303.
- [12] YU DS, CAO Y, MEI XF, et al. Curcumin improves the integrity of blood-spinal cord barrier after compressive spinal cord injury in rats[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 346(1/2):51-59.
- [13] WANG SH, LIN PY, CHIU YC, et al. Curcumin-Mediated HDAC Inhibition Suppresses the DNA Damage Response and Contributes to Increased DNA Damage Sensitivity[J]. *Plos One*, 2015, 10(7):e0134110.
- [14] YANG CL, LIU YY, MA YG, et al. Curcumin blocks small cell lung cancer cells migration, invasion, angiogenesis, cell cycle and neoplasia through janus kinase-stat3 signaling pathway[J]. *Plos One*, 2012, 7(5):e37960.
- [15] TAO L, XIAOJIAN Z, WENHUA X, et al. Curcumin induced human gastric cancer bgc-823 cells apoptosis by ros-mediated ASK1-MKK4-JNK stress signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9):15754-15765.
- [16] LEOW PC, QUAN T, ONG ZY, et al. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ $\beta$ -catenin antagonists against human osteosarcoma cells[J]. *Invest New Drugs*, 2010, 28(6):766-782.
- [17] 刘芳,冯胜强,刘德军,等. 紫杉醇联合顺铂治疗晚期乳腺癌 32 例分析[J]. *中国临床保健杂志*, 2007, 10(3):265-267.
- [18] 柳长青,徐汉杰,周颖,等. miR-199 在对顺铂敏感性不同的卵巢癌细胞株中的表达及其意义[J]. *中国临床保健杂志*, 2015, 18(3):290-293.
- [19] 高传柱,费凡,王天帅,等. 经典顺铂类抗肿瘤药物耐药性研究综述[J]. *昆明理工大学学报(自然科学版)*, 2013, 54(6):78-83.
- [20] ZHANG SN, YONG Q, WU XL, et al. Synergism inhibition of curcumin combined with cisplatin on T24 bladder carcinoma cells and its related mechanism[J]. *Zhong yao cai*, 2014, 37(11):2043-2046.
- [21] LIRDITTI FD, RABINKOV A, MIRON T, et al. Apoptotic killing of Behronic lymphocytic leukemia tumor cells by allicin generated in situ using a rituximab-alliinase conjugate[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(2):325-331.
- [22] 王风云,李伟宏,焦金菊,等. 姜黄素对子宫内腺癌细胞增殖抑制的初步研究[J]. *中国临床保健杂志*, 2012, 15(3):267-270.
- [23] HILCHIE AL, FURLONG SJ, KIMBERLY S, et al. Curcumin-induced apoptosis in PC3 prostate carcinoma cells is caspase-independent and involves cellular ceramide accumulation and damage to mitochondria[J]. *Nutrition & Cancer*, 2010, 62(3):379-389.
- [24] FAIÃO-FLORES F, SUAREZ JAQ, SOTO-CERRATO V, et al. Bcl-2 family proteins and cytoskeleton changes involved in DM-1 cytotoxic effect on melanoma cells[J]. *Tumour Biology*, 2013, 34(2):1235-1243.
- [25] 欧红梅,周长慧,涂宏刚,等. p53 基因状态对体外微核试验结果影响的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(1):170-173.
- [26] BINHUA Z, YINGLIN Z, BAOJIAN L, et al. Deubiquitinase inhibition of 19s regulatory particles by 4-arylidene curcumin analogue AC17 causes NF- $\kappa$ B inhibition and p53 reactivation in Human lung cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(8):1381-1392.
- [27] WEIR NM, SELVENDIRAN K, KUTALA VK, et al. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(2):178-184.
- [28] 冯冰霜,雷张涛,张春华,等. 姜黄素联合顺铂对宫颈癌 HeLa 细胞化疗敏感性的影响及机制探讨[J]. *中国医学前沿杂志:电子版*, 2015, 7(3):148-151.

(收稿日期:2016-05-26)