右旋龙脑促进姜黄素抑制 A375 黑色素瘤细胞增殖的研究

吴萍[1]，陈建平[2]，李琳[1]，苏健裕[1]，曾峰[3]
（1.华南理工大学轻工与食品学院,广东广州 510640）（2.广东海洋大学食品科技学院,广东湛江 524088）
（3.江西吉安宇峰天然植物香料有限公司,江西吉安 343000）

摘要：本文运用 MTT 实验考察姜黄素和右旋龙脑分别在单独作用和联合作用时对黑色素瘤细胞 A375 存活率的影响，并进一步运用流式细胞术分析右旋龙脑联合姜黄素抑制黑色素瘤细胞 A375 增殖的原因。结果表明，姜黄素单独作用对 A375 细胞增殖有显著的抑制效应，而右旋龙脑单独作用对 A375 细胞增殖没有表现出明显的抑制作用。当用 40 μg/mL 右旋龙脑预处理 3 h，再与 20 μmol/L 姜黄素联合作用 A375 细胞 72 h 后，其细胞存活率达到最低为 10.93%，这比 20 μmol/L 姜黄素单独处理时细胞的存活率降低了 18.27%。进一步的流式结果表明，相比单独姜黄素处理，右旋龙脑与姜黄素联合处理后能明显提高 SubG1 峰和 G2/M 比例，右旋龙脑（40 μg/mL）与姜黄素（20 μmol/L）联合作用黑色素瘤细胞 A375 后，其 SubG1 和 G2/M 的含量分别从对照组的 2.0%和 16.4%升高到 16.8%和 40.1%，表明右旋龙脑与姜黄素主要是通过诱导细胞凋亡和 G2/M 阻滞来抑制黑色素瘤细胞 A375 增殖。

关键词：姜黄素；右旋龙脑；抗增殖；联合作用
文章篇号：1673-9078(2016)6-7-12 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.002

Potentiation of the Inhibitory Effect of Curcumin on A375 Melanoma Cell Proliferation by D-borneol

WU Ping[1], CHEN Jian-ping[2], LI Lin[1], SU Jian-yu[1], ZENG Feng[3]
(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)
(3.Ji'an Yu Feng Natural Species CO., LTD., Ji'an 343000, China)

Abstract: An MTT assay was performed to investigate the effects of curcumin and d-borneol, alone or in combination, on the viability of A375 melanoma cells. The mechanism underlying the inhibitory effect of these compounds on melanoma A375 cell proliferation was determined by flow cytometry. The results indicated that curcumin alone could significantly inhibit A375 cell proliferation; however, d-borneol alone did not exhibit any obvious inhibitory effect on proliferation. When melanoma A375 cells were pretreated with 40 μg/mL d-borneol for three hours and then treated with 20 μmol/L curcumin for 72 hours, the lowest cell-viability rate (10.93%) was observed, which was 18.27% lower than the proliferation of cells treated with curcumin alone. Further, flow cytometric analysis indicated that compared with curcumin-alone treatment, a combination of curcumin and d-borneol could significantly increase sub-G1 peaks and G2/M phase ratios. When melanoma A375 cells were treated with a combination of d-borneol (40 μg/mL) and curcumin (20 μmol/L), the populations of SubG1 and G2/M increased to 16.8% and 40.1%, respectively, compared with 2.0% and 16.4% in the control group. These observations indicate that curcumin combined with d-borneol inhibits A375 cell proliferation by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest.

Key words: curcumin; d-borneol; anti-proliferative; combined effects

收稿日期：2015-06-10
基金项目：广东省自然科学基金面上项目(2014A030313265)；广东省扬帆计划项目（201312H05）；省部产学研结合项目(2013B020311009，2010A011200019，2011B010600029)；华南理工大学中央高校基本科研业务费（2015ZZ050）；广东省 2015 年度省公益研究与能力建设专项资金项目（2015A020209020）资助
作者简介：吴萍（1992-），女，硕士研究生，研究方向为糖类物质及其药物制备与生物利用
通讯作者：苏健裕（1979-），男，博士，副研究员，研究方向为糖类物质及其药物制备与生物利用

癌症为一类慢性非传染性疾病，越来越受到公众的重视。据世界卫生组织统计，2010 年时，全球新增癌症患者超过 1240 万，其中，死亡人数高达 760 余万；预计到 2020 年，全球每年新发癌症病例将高达 1500 万。而黑色素瘤相比其他肿瘤细胞，具有较强的侵袭、转移能力，其患者平均生存期仅 6~9 个月[1]。近几年随着人们健康意识的增强，希望通过安排合理饮食结构，科学摄入与营养成分，从而预防癌症的发生。其中天然植物中的天然活性物质由于其具有良好的抗肿瘤作用效应，因而，在日常食品中被添加其中，从而起到抗肿瘤的功效。

姜黄素（Curcumin, Cur）是一种酸性多酚类物质（结构式如图 1a 所示），是一种常用的食品用着色剂，广泛应用于咖喱中，因其具有广泛的药理作用，如抗氧化、抗炎、抗肿瘤等，并且毒副作用低、安全性高，成为近年来研究的热点[2]。然而姜黄素溶解度低、稳定性差，从而大大降低了其生物利用度，因此需要研究出一种方法能使姜黄素在小剂量情况下便能发挥最大的生物活性[3]。右旋龙脑（Natural borneol, NB）（结构式如图 1b 所示）作为一种食用香料或较高价值的医用材料，广泛应用于食品和药品工业[4]。右旋龙脑具有很强的渗透能力，能改善细胞层的细胞膜磷脂分子排列，明显疏松细胞连接，抑制细胞膜 P-糖蛋白（P-glycoprotein）功能，增强细胞膜流动性，影响磷脂双分子细胞膜的通透性，以促进细胞间隙转运药物通过细胞层[5]。因此，本文旨在利用天然植物资源中富含的能够促进人体有健康的天然产物，右旋龙脑与姜黄素联合用药作用于 A375 黑色素瘤细胞，不仅促进了姜黄素抑制肿瘤的效果，而且推动了现代医药与食品的紧密结合，从而大大拓展了右旋龙脑的应用范围。

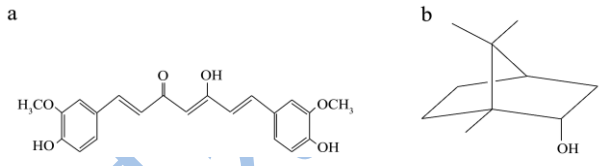


图 1 姜黄素（a）和右旋龙脑（b）的结构

Fig.1 Chemical structures of curcumin (a) and d-borneol (b)

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

姜黄素（curcumin）标准品，3-（4,5-二甲基噻唑-2）-2,5-二苯基四氮唑溴盐（MTT）分析纯和碘化丙锭（PI）分析纯均购自Sigma公司；右旋龙脑（NB）标准品购自广东嘉应制药股份有限公司；DMEM, 胎牛血清，青霉素和链霉素均购于美国Hyclone公司；人黑色素瘤A375细胞购自美国ATCC公司。

1.2 仪器与设备

BP301S 电子天平，德国 Sartorius 公司；VERSAmax酶标仪，美国Molecular Devices公司；TS100倒置显微镜，日本Nikon公司；Epics-XL 流式细胞仪，美国Beckman Coulter公司。

1.3 细胞培养

A375复苏后培养在含10%胎牛血清，100 U/mL青霉素和50 U/mL链霉素的DMEM完全培养基中。细胞置于培养箱中培养（37 ℃，5% CO_2），根据细胞的生长状态传代，取对数生长期细胞用于以下的各个实验。

1.4 MTT 测定细胞存活率[7]

将 A375、L02 细胞接种于 96 孔培养板，置于培养箱中（37 ℃，5% CO_2）培养 24 h 后，加入不同浓度的姜黄素和右旋龙脑分别进行单独处理和联合处理 72 h。然后，往培养板加入 MTT（5 mg/mL）20 μL/孔，37 ℃孵育 4 h 后弃上清，加入 DMSO 150 μL/孔，振荡 10 min，紫色结晶物充分溶解后，在 570 nm 处用酶标仪（Specta Max 250）测定各孔吸光度值[5]。以对照组吸光值为 100%，计算药物处理组细胞存活率，同时作图求得半数抑制浓度（IC_{50}）。

1.5 流式细胞仪检测其细胞凋亡情况[8]

A375 细胞接种到到 6 cm 培养皿，预培养 24 h 后，加入不同浓度的右旋龙脑和姜黄素分别进行单独处理和联合处理 72 h 后，去掉培养液，0.25%胰蛋白酶消化细胞，培养液吹打后收集，1500 r/min 离心 5 min，倒掉上清，加入 1 mL 预冷的 70%乙醇，-20 ℃固定放置过夜；次日，离心（1600 r/min，5 min）收集细胞，PBS 洗 2 次，加 PI 工作液 500 μL，避光染色 15 min。上机前，细胞用 300 目（孔径 40~50 μm）尼龙网过滤，上机检测。利用 Becklnan 流式细胞分析仪测定细胞 DNA 含量，每个样品分析 10000 个细胞，应用软件 Multicycle （Phoenix Flow Systems, San Diego, CA）记录各时相细胞的 DNA 的含量，凋亡细胞含有亚二倍体 DNA，细胞比例通过定量图中 Sub-Gl 凋亡峰计算。

1.6 数据分析

以上各项指标均重复 3 次，取其平均值，数据采用 origin 8.0 进行方差分析。与空白对照组相比，$p<0.05$ 用*表示，$p<0.01$ 用**表示。

2 结果与讨论

2.1 单独的姜黄素和右旋龙脑对黑色素瘤细胞 A375 存活率的影响

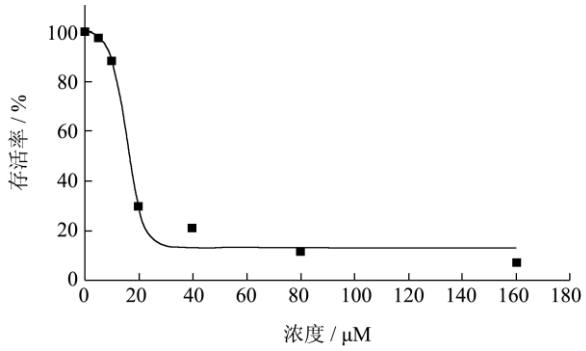


图 2 不同浓度的姜黄素作用黑色素瘤细胞 A375 存活率影响

Fig.2 Effect of different concentrations of curcumin on viability of A375 cells

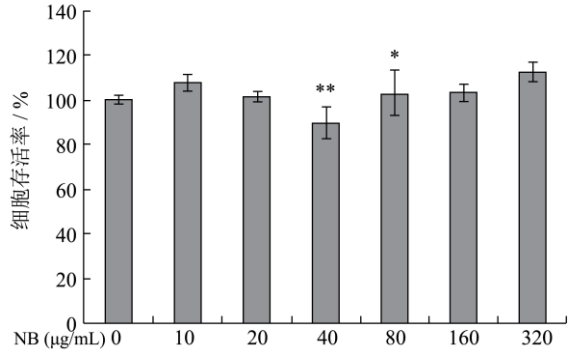


图 3 不同浓度右旋龙脑处理黑色素瘤细胞 A375 细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of D-borneol on viability of A375 cells

首先，采用MTT法测定姜黄素、右旋龙脑分别单独作用考察其对黑色素瘤细胞A375存活率的影响。由图2可以看出，随着姜黄素浓度的增加，黑色素瘤细胞A375的存活率呈下降趋势，呈现出浓度依赖性。例如，当姜黄素浓度为20 μmol/L，其细胞存活率为29.20±0.19%，当姜黄素浓度提高到160 μmol/L时，其细胞存活率达到最低为6.89±0.12%。通过曲线拟合得到单独姜黄素处理A375的IC_{50}=16.43 μmol/L，因此姜黄素具有较强的抗肿瘤作用。同样采用曲线拟合计算得到右旋龙脑的IC_{50}=4852.89 μg/mL，基本上没有抗肿瘤作用。由图3可知，右旋龙脑浓度在40 μg/mL和80 μg/mL相比较对照组具有显著性，即表现出相对较好的抑制肿瘤活性。因此，选择姜黄素浓度为10、20、40 μmol/L和右旋龙脑浓度为40 μg/mL和80 μg/mL进行联合给药研究。

2.2 姜黄素与右旋龙脑联合作用对黑色素瘤细胞 A375 抗增殖效果

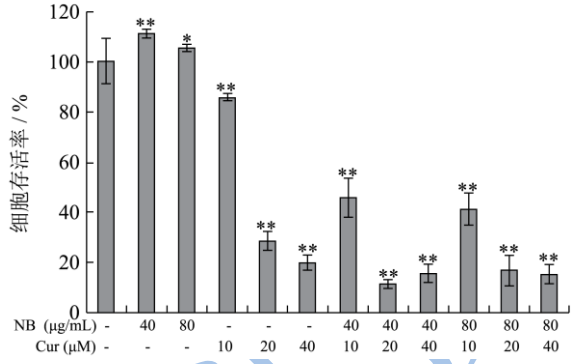


图 4 NB 预处理 3 h 加 Cur 处理 72 h 后对黑色素瘤细胞 A375 存活率的影响

Fig.4 Effect of three-hour pre-treatment with d-borneol before curcumin treatment on the viability of A375 cells

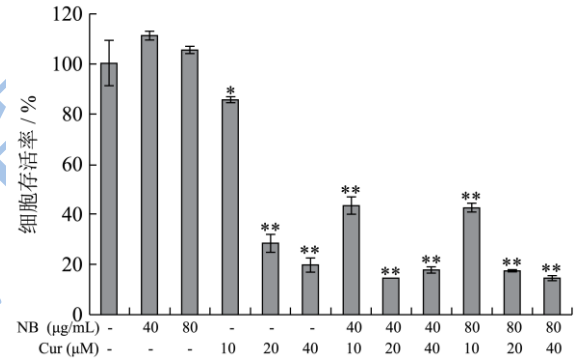


图5 NB预处理6 h加Cur处理72 h后对黑色素瘤细胞A375存活率的影响

Fig.5 Effect of six-hour d-borneol pre-treatment before curcumin treatment on the viability of A375 cells

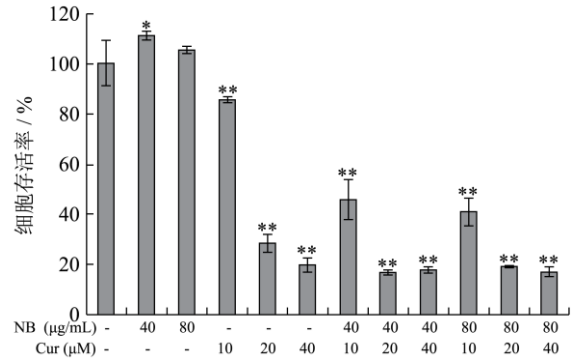


图6 NB预处理9h加Cur处理72 h后对黑色素瘤细胞A375存活率的影响

Fig.6 Effect of nine-hour d-borneol pre-treatment before curcumin treatment on the viability of A375 cells

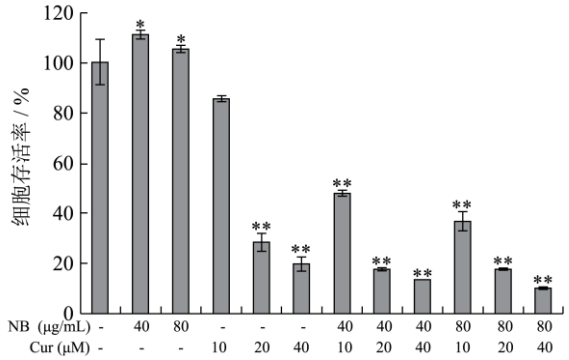


图7 NB预处理12 h加Cur处理72 h后对黑色素瘤细胞A375存活率的影响

Fig.7 Effect of 12-h d-borneol pre-treatment before curcumin treatment on the viability of A375 cells

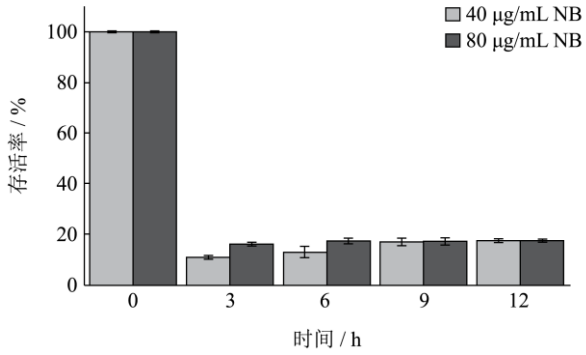


图8 NB预处理不同时间加Cur处理72 h后对黑色素瘤细胞A375存活率的影响

Fig.8 Effect of different d-borneol pre-treatment times with curcumin treatment on the viability of A375 cells

接下来，进一步考察右旋龙脑与姜黄素联合作用时对 A375 细胞存活率的影响。实验结果如图 4、5、6 和 7 所示。由图 4、5、6 和 7 可以看出，当右旋龙脑预处理时间为 3 h，右旋龙脑浓度为 40 μg/mL 与姜黄素浓度为 20 μmol/L 联合作用 72 h 时，细胞的存活率最低为 10.93%，比单独的 20 μmol/L 姜黄素处理 72 h 降低了 18.27%；右旋龙脑浓度为 80 μg/mL 与 20 μmol/L 姜黄素处理 72 h 后，细胞的存活率为 16.27%，比单独的 20 μmol/L 姜黄素处理 72 h 降低了 12.93%；当右旋龙脑预处理时间为 6 h，右旋龙脑浓度为 40 μg/mL 与姜黄素浓度为 20 μmol/L 联合作用 72 h 时，细胞的存活率为 13.86%，比单独的 20 μmol/L 姜黄素处理 72 h 降低了 15.34%，说明右旋龙脑促进了姜黄素对 A375 的抑制作用，姜黄素浓度对 A375 存活率影响较大。由图 8 可知，当右旋龙脑预处理时间为 3 h，右旋龙脑的最佳浓度为 40 μg/mL 时，右旋龙脑联合姜黄素对黑色素瘤 A375 抑制作用最强。陈建平等人[6]研究表明：右旋龙脑与姜黄素联合作用于 HepG2，右旋龙脑不仅能够提高 HepG2 细胞的细胞膜通透性，使得更多的姜黄素类化合物进入细胞，而且右旋龙脑能够下调转运蛋白 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 的表达量，减少姜黄素类化合物从细胞内泵出，从而提高姜黄素类化合物在细胞内的含量，从而通过研究其机理发现 NB 促进姜黄素类化合物抑制 HepG2 细胞增殖是通过介导 ROS 过量产生从而启动 p53 通路激活下游信号诱导 HepG2 细胞发生 G2/M 期细胞周期阻滞。因此后边的实验选取右旋龙脑浓度为 40 μg/mL，预处理时间为 3 h 用于流式分析。

2.3 姜黄素与右旋龙脑的联合作用对 A375 细胞形态学观察

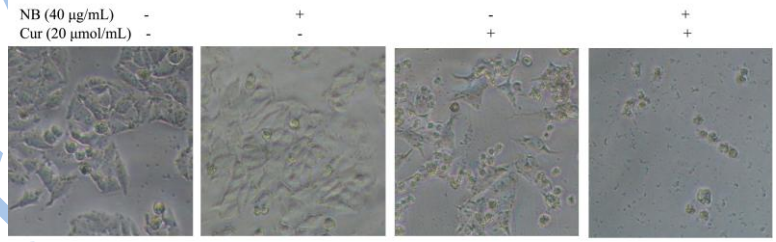


图 9 NB 预处理 3 h 后加入姜黄素作用 72 h 的黑色素瘤细胞 A375 形态

Fig.9 Morphology of A375 cells with three hours of d-borneol pre-treatment followed by 72 hours of curcumin treatment

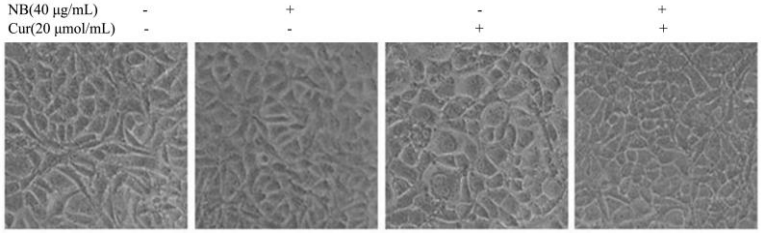


图 10 NB 预处理 3 h 后加入姜黄素作用 72 h 的 L02 形态

Fig.10 Morphology of A375 cells with three-hour d-borneol pre-treatment followed by 72 hours of curcumin treatment

右旋龙脑 40 μg/mL 预处理黑色素瘤细胞 A375 3 h 后加入 20 μmol/L 姜黄素浓度处理黑色素瘤细胞 A375 72 h 后，在倒置显微镜下观察细胞形态。由下图 9 知：对照组黑色素瘤细胞 A375 贴壁性良好，胞质均匀饱满，在中心处聚集堆叠，轮廓清晰；右旋龙脑组细胞形态规则、胞膜完整、核染色质分布均匀，未出现凋亡小体。经 20 μmol/L 姜黄素处理后黑色素瘤细胞 A375 后缩小变圆，在培养液中悬浮，细胞数目减少。而经 40 μg/mL 右旋龙脑预处理黑色素瘤细胞 A375 3 h 后加入 20 μmol/L 姜黄素浓度处理黑色素瘤细胞 A375 72 h 后，细胞显著减少，细胞体积缩小，细胞间隙增大，胞膜皱缩、凹陷，出现凋亡小体，出现脱落等凋亡特征[9]。而姜黄素与右旋龙脑的联合作用对 L02 正常细胞形态学观察均无细胞形态上的改变，细胞饱满均匀，轮廓清晰。随后，对比正常细胞不同给药浓度与不同预处理时间下的细胞存活率，发现均 110%~130%的范围内，从而表明姜黄素与右旋龙脑的联合作用对细胞具有选择性，不会对正常细胞产生杀伤效用。

2.4 姜黄素与右旋龙脑联合作用 A375 后流式细胞术分析

流式细胞术的原理在于待测细胞经过荧光染料染色后，经过流式细胞仪的激光照射，被激发产生荧光，转换成电信号，反映出细胞状态[10]。而经过 PI 染色的细胞，因为 PI 特异性结合细胞 DNA，荧光强度和 PI 与细胞结合量呈现良好线性关系。当细胞凋亡的时候，细 胞内核酸酶的释放，将 DNA 降解，分解成小的片段，在标本制备中的固定处理时，细胞膜的完整性被破坏，使细胞内降解的 DNA 片段从细胞内流出，造成总体 DNA 含量减少，成为亚二倍体，凋亡峰的百分含量即为凋亡细胞所占的百分比[11]。

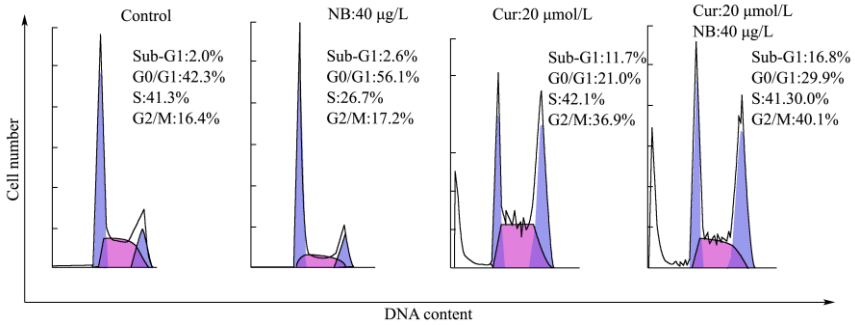


图 11 NB 与姜黄素联合作用对 A375 细胞周期的影响

Fig.11 Effect of d-borneol and curcumin co-treatment on the cell cycle of A375 cells

流式实验结果图表明，经过 72 h 的药物联合作用的实验组，Sub-G1 峰值有明显增加，从对照组的 2.0%上升到联合作用组的 16.8%，亚二倍体峰，也就是凋亡峰比例的增加说明联合抗增殖的作用导致了大量细胞凋亡。而 G2/M 期的细胞数量也有对照组的 16.4%上升 到了 40.1%，同样发生峰值的增加，说明姜黄素与右旋龙脑的联合作用也在 G2/M 期对黑色素瘤细胞 A375 有阻滞的效果。将单独加入姜黄素的实验组与联合作用的实验组作对比，发现不仅 Sub-G1 期细胞数量有增加，从 11.7%上升到了 16.8%，而且在 G2/M 期也有细胞数量的增加，说明右旋龙脑主要通过增加细胞凋亡和增强 G2/M 期细胞阻滞来促进姜黄素的抗增殖效果。

3 结论

本实验采用了在不同的作用时间，不同的剂量浓度和不同的给药方式下，用姜黄素与右旋龙脑联合作用于黑色素瘤细胞 A375、L02 人体正常肝细胞，测定其对癌细胞的抗增殖的效果以及探究其抑制细胞增殖的原因：

3.1 采用右旋龙脑与姜黄素配合加药联合作用于黑色素瘤细胞 A375 和 L02 细胞，其中姜黄素为抗癌活性物质，右旋龙脑为可以增加姜黄素药效的辅助促进药物。在不同的时间段内用右旋龙脑预处理细胞，观察到在联合作用下的黑色素瘤细胞 A375 存活率低于用姜黄素单独作用的实验组的细胞存活率。且对正常细胞基本无影响。

3.2 通过 MTT 实验的测定，筛选出最佳的给药方案为：右旋龙脑预处理时间为 3 h，右旋龙脑和姜黄素的最佳浓度为 40 μg/mL、20 μmol/L。

3.3 流式细胞术分析姜黄素与右旋龙脑联合作用的结果显示，姜黄素抑制黑色素瘤细胞 A375 的增殖通过增加 Sub-G1 期细胞的凋亡，以及增加 G2/M 的细胞阻滞来实现。同时实验也发现，右旋龙脑提高了姜黄素的抗增殖效果。

参考文献

[1] 陈建平.右旋龙脑促进姜黄素类化合物抑制 HepG2 肝癌细胞增殖的分子机制研究[D].华南理工大学,2015
CHEN Jian-ping. Molecular mechanism underlying natural borneol potentiated curcuminoids inhibiting HepG2 human hepatocellular carcinoma cells growth [D]. South China University of Technology, 2015

[2] 陈建平,李琳,苏健裕.姜黄素的抗氧化及抗肿瘤活性研究[J].现代食品科技,2014,30(12):11-15
CHEN Jian-ping, LI Lin, SU Jian-yu. Study on antioxidant and antiproliferative activities of curcumin [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 11-15

[3] Ornchuma Naksuriya, Siriporn Okonogi, Raymond M Schiffelers. Curcumin Nano-formulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment [J]. Biomaterials, 2014, 35(10): 3365-3383

[4] Chen L, SU Jian-yu, Li Lin, et al. A new source of natural D-borneol and its characteristic [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(15): 3440-3447

[5] 苏健裕,陈建平,李冰,等.右旋龙脑-*β*-环糊精包合物稳定性和溶出度的研究[J].中华中医药杂志,2012,8(27):2196-2199
SU Jian-yu, CHEN Jian-ping, LI Bing, et al. Study on stability and dissolution of inclusion of D-borneol with *β*-cyclodextrin [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2012, 8(27): 2196-2199

[6] CHEN Tian-feng, WONG Yum-shing. Selenocystine induces reactive oxygen speciese mediated apoptosis in human cancer cells [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2009, 63(2): 105- 113

[7] ZHAO Lin, CHEN Jian-ping, SU Jian-yu, et al. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of 5-hydroxymethylfurfural [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(44): 10604-10611

[8] WANG Xiao-Meng, XIN Min-Hang, XU Jing. Synthesis and antitumor activities evaluation of m-(4-morpholinoquinazolin- 2-yl) benzamides in vitro and in vivo [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 96(26): 382-395

[9] CHEN Jian-ping, LI Lin, SU Jian-yu, et al. Synergistic apoptosis-inducing effects on A375 human melanoma cells of natural borneol and curcumin [J]. PLOS ONE, 2014, 9(6): 1-9

[10] 吴亚丽,谢俊霞,卢楠,等.姜黄素对结肠癌细胞增殖抑制和凋亡诱导的作用研究[J].现代食品科技,2014,30(4):74-79
WU Ya-li, XIE Jun-xia, LU Nan, et al. Effects of curcumin on proliferation and apoptosis of coloractal carcimnoma LoVo cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(4): 74-79

现代食品科技