

姜黄素对人肺成纤维细胞凋亡及细胞周期的影响

郝小惠¹, 郭志义¹, 张银红², 刘和亮^{1,2}, 田炜¹, 裴鑫¹

(1. 河北联合大学医学实验研究中心, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 研究姜黄素对人肺成纤维细胞 (human lung fibroblasts, HLFs) 体外生长、细胞周期及凋亡的影响。方法 应用 CCK-8、Annexin-V/PI、PI 流式细胞分析术、免疫印迹法, 检测姜黄素对细胞的增殖、凋亡、细胞周期和 Bax 蛋白表达的影响。结果 姜黄素对 HLFs 的增殖有抑制作用, 可促进 HLFs 的早期凋亡, 对细胞周期可产生 G₂/M 期阻滞, 增加 HLFs 的 Bax 蛋白的表达。结论 姜黄素可抑制 HLFs 的增殖并能诱导其凋亡, 其机制可能与细胞的 G₂/M 期阻滞及凋亡相关蛋白的表达增强有关。

关键词: 姜黄素; 成纤维细胞; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R994

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2011)06-0411-04

Effect of curcumin on the apoptosis and the cell cycle of human lung fibroblasts

HAO Xiao-hui*, GUO Zhi-yi, ZHANG Yin-hong, LIU He-liang, TIAN Wei, PEI Xin

(* : Medical Experiment Research Center, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of curcumin on the growth, cell cycle and apoptosis of human lung fibroblasts (HLFs) in vitro. **Methods** The proliferation of HLFs was detected by CCK-8 assay, the apoptosis was detected by Annexin-V/PI fluorescence staining, cell cycle was analyzed by flow cytometry, Bax protein was detected by Western blot method. **Results** The results showed that curcumin could inhibit the growth of HLFs and promote the early apoptosis of HLFs, it also could arrest the cell cycle in G₂/M phase and up-regulate the expression of Bax protein in HLFs. **Conclusion** Curcumin may inhibit the proliferation of HLFs and induce its apoptosis in vitro; its mechanism probably related to the arrest of cell cycle in G₂/M phase and enhanced expression of Bax protein.

Key words: curcumin; fibroblast; cell cycle; apoptosis

以往研究发现, 矽肺患者的巨噬细胞培养上清可介导体外成纤维细胞增殖和胶原分泌增加^[1], 可能在矽肺纤维化的形成中起作用。姜黄素 (curcumin) 是姜科植物姜黄的根茎中分离出的主要活性物质, 对人体安全无害, 具有广泛的生物学活性, 包括抗氧化、抗炎、抗癌、降血糖、保肝和抗 HIV 等^[2]。近年来, 姜黄素在治疗纤维化疾病方面的作用受到更多学者的关注, 发现姜黄素在体外通过抑制肝星状细胞的活化、增殖, 促进其凋亡从而抑制肝纤维化程度^[3]。本实验研究拟通过姜黄素对体外 AM 培养上清刺激的肺成纤维细胞的增殖、凋亡和细胞周期的影响, 观察姜黄素是否具有抗肺纤维化作用。

1 材料与方法

1.1 材料

姜黄素 (C-4386, Sigma 公司), 用 DMSO 溶解, 新鲜配制成 10 mmol/L 的储存液, 用 0.22 μm 微孔滤

膜过滤, DMEM 培养基稀释成相应浓度后待用。HLF-1 细胞株为本实验室保存的细胞株。胎牛血清、DMEM 培养基 (Gibico 公司); CCK-8 检测试剂盒 (碧云天生物公司); PI 染料 (Sigma 公司); 流式细胞仪 (FACS Calibur, BD 公司)。

1.2 矽肺患者 AM 的获取

II 期矽肺患者肺泡灌洗液由中国煤炭工人北戴河疗养院尘肺康复中心提供。灌洗液经无菌过滤, 4 ℃、1 500 r/min 离心 20 min, 细胞团用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次后, 加入含体积分数 10% FBS 的 DMEM, 经台盼蓝排斥实验证实 95% 以上细胞存活, 将细胞稀释成 1 × 10⁶ 个/ml 的细胞悬液, 置培养瓶中, 待细胞贴壁, 弃培养液, PBS 清洗 3 次, 加入无血清 DMEM 培养液, 继续在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后吸出培养液, 保存于 -70 ℃ 备用。

1.3 HLFs 的细胞同步化

将 HLFs 胰酶消化后按相同比例不同实验需要, 随机接种于不同的培养板中, 以含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h 后, 换成含体积分数为 0.5% FBS 的 DMEM 继续培养 24 h, 使其同步化。

收稿日期: 2011-06-30; 修回日期: 2011-09-22

基金项目: 河北省科技厅科技支撑项目 (10276116D); 河北省教育厅课题 (Z2009136); 唐山市科技局课题 (09130202A)

作者简介: 郝小惠 (1971—), 女, 副教授, 研究方向: 肺纤维化疾病, E-mail: haoxiaohui2005@163.com。

1.4 HLFs 实验分组

未处理组: 每组加入等体积的无血清 DMEM 培养液及 1% FBS-DMEM 稀释的不同浓度的姜黄素, 使姜黄素的终浓度分别为 0、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$, FBS 的终浓度为 0.5%。

AM 处理组: 每组加入等体积的 24 h 矽肺患者 AM 培养液及 1% FBS-DMEM 稀释的不同浓度的姜黄素, 使姜黄素的终浓度分别为 0、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$, FBS 的终浓度为 0.5%。

1.5 CCK-8 检测姜黄素对 HLFs 增殖的影响

将 HLFs 用 0.25% 胰酶消化后, 调整细胞密度, 按 3 000 个/孔的细胞数接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 换含 0.5% FBS-DMEM 培养基培养 24 h, 使细胞同步化。分别按上述未处理组和 AM 处理组, 以及不同浓度的姜黄素分组, 每孔加入 200 μl 培养基 (均含 0.5% FBS) 各组 4 孔平行, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 每孔加入 20 μl 的 CCK-8 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值, 用 0.5% FBS-DMEM 培养基做空白对照。

1.6 Annexin-V/PI 染色检测细胞凋亡

将 HLFs 接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 0.5% FBS-DMEM 培养基同步化 24 h 后, 按未处理组和 AM 处理组, 以及不同浓度的姜黄素分组, 每孔加入 2 ml 培养基 (均含 0.5% FBS)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 0.25% 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 重悬细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 185 μl Annexin V-FITC 结合液重悬细胞后, 加入 5 μl Annexin V-FITC, 10 μl 的 PI 染色液混匀。室温避光孵育 10 min, 随即进行流式细胞仪检测分析, 以 Annexin V (+) /PI (-) 细胞的含量代表早期凋亡细胞。以上实验重复 3 次以上。

1.7 PI 染色法检测 HLFs 细胞周期

同上述分组将细胞接种于 6 孔板, 细胞同步化后, 细胞经姜黄素作用 24 h 后, 将各组待检测细胞用胰酶消化, 离心收集细胞, PBS 清洗一次, 然后用含有 75% 乙醇的 PBS 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。分析前用 PBS 离心洗涤细胞, 加入 10 mg/L 的 RNaseA 1 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PI (终浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$) 浸染 15 min 后上机检测, 以上实验重复 3 次以上。

1.8 Western blot 检测 HLFs 中 Bax 蛋白的表达

将细胞接种于 6 孔板, 同上经姜黄素作用细胞 24 h 后将细胞裂解, 收集裂解液。用 BSA 法进行蛋白定量。以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 蛋白上样量为 30 μg ; 电泳后转膜 (90 mA, 1 h)。

用含有 5% 脱脂奶粉的 TBS 溶液室温封闭 1 h, Bax 抗体 (santa cruz, 北京中杉金桥) 以 1:500 稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBS 洗 3 次, 每次 5 min。二抗室温孵育 2 h, 0.5% TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用化学发光法 (ECL) 显影, β -actin 作为内参照。

2 结果

2.1 CCK-8 检测不同浓度姜黄素对 HLFs 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果表明, 姜黄素对未处理组和 AM 处理组的 HLFs 的增殖均有不同程度的抑制作用。方差分析结果显示, 未处理组中姜黄素是 0 $\mu\text{mol/L}$ 时, HLFs 的吸光度值为 1.132 ± 0.126 , 当姜黄素浓度为 12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞吸光度测量值分别为 1.014 ± 0.026 、 0.751 ± 0.026 和 0.343 ± 0.011 , 即随着姜黄素浓度的增加, 细胞吸光度值减小, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。AM 处理组也得到相同的结果, 当姜黄素是 0 $\mu\text{mol/L}$ 时, HLFs 的吸光度值为 1.232 ± 0.134 , 当姜黄素浓度为 12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞吸光度值分别为 1.114 ± 0.034 、 0.851 ± 0.034 、 0.474 ± 0.081 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。即随着浓度的增加, 姜黄素对 HLFs 的增殖抑制作用增强。对同一浓度的姜黄素, 抑制作用 AM 处理组较未处理组为弱, 两者相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 由于 AM 培养上清对 HLFs 的增殖作用所致。

2.2 PI 检测不同浓度姜黄素对 HLFs 细胞周期的影响

PI 检测的 HLFs 细胞周期结果如表 1 所示, 姜黄素可对 HLFs 的细胞周期产生影响, 主要体现在使细胞周期阻滞在 G_2/M 期, 表现在 G_2/M 期细胞比例增加, 随着姜黄素浓度的增加, G_2/M 期的阻滞作用增强, 两者相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 姜黄素对不同处理组 HLFs 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	G_1/G_0 期	G_2/M 期	S 期
未处理组	0	86.54 ± 3.53	4.65 ± 0.82	8.81 ± 1.32
	25	87.02 ± 4.80	$8.37 \pm 1.16^*$	$4.61 \pm 1.58^*$
	50	82.66 ± 5.47	$13.12 \pm 1.92^*$	$4.22 \pm 1.24^*$
AM 处理组	0	62.32 ± 3.53	4.19 ± 0.82	33.48 ± 2.32
	25	63.02 ± 5.47	$9.25 \pm 1.43^{**}$	$27.70 \pm 1.24^*$
	50	61.29 ± 4.80	$13.50 \pm 1.52^*$	$25.21 \pm 1.58^*$

注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组相比, * $P < 0.05$ 。

2.3 Annexin-V/PI 染色检测不同浓度姜黄素对 HLFs 细胞凋亡的影响

图 1 为 Annexin-V/PI 双荧光染色, 用流式细胞分析术检测的细胞早期凋亡结果, 表 2 为结果的统计

分析,显示姜黄素可诱导 AM 处理组及未处理组的 HLFs 凋亡的发生,在 50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内,随着姜黄素浓度的增加,HLFs 的早期凋亡率增加。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。同一浓度的姜黄素作用于 AM 处理组与未处理组后,凋亡率的发生差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 姜黄素对各组 HLFs 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	姜黄素浓度 ($\mu\text{mol/L}$)			
	0	12.5	25	50
未处理组	3.17 $\pm$ 0.58	6.28 $\pm$ 1.17*	12.91 $\pm$ 2.55*	21.15 $\pm$ 3.28*
AM 处理组	2.18 $\pm$ 0.43	5.00 $\pm$ 1.11*	9.84 $\pm$ 2.16*	15.18 $\pm$ 2.13*

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组相比, * $P < 0.05$ 。

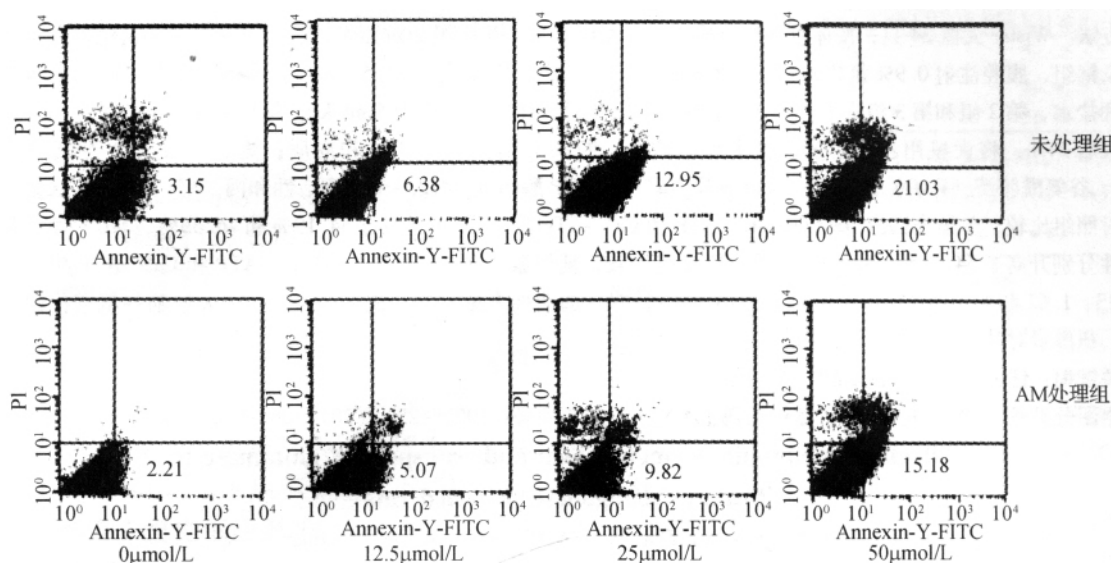
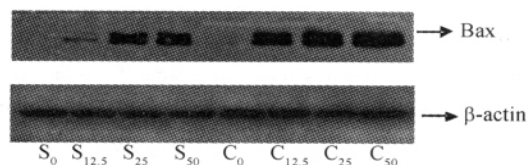


图 1 Annexin-V/PI 检测不同浓度姜黄素对 HLFs 凋亡的结果

2.4 Western blot 检测不同浓度姜黄素对 HLFs 的 Bax 蛋白表达的影响

由图 2 可见,AM 处理组和未处理组的姜黄素浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时,HLFs 极少或几乎不表达 Bax 蛋白,当姜黄素浓度增加时,两组 Bax 蛋白的表达均增强,并随着姜黄素浓度的增加 Bax 的表达也增强。图中还显示,同一浓度的姜黄素,AM 处理组和未处理组相比,Bax 的表达量相对较低。



注: S 表示 AM 处理组, C 表示未处理组。

图 2 不同浓度姜黄素对 HLFs 的 Bax 蛋白表达的影响

3 讨论

研究表明,姜黄素在 10 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,在体外能呈剂量依赖性地抑制肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 等多种细胞的增殖,当浓度 $> 50 \mu\text{mol/L}$ 时这种抑制作用下降,因此在我们的实验中选择 0 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 作为姜黄素作用浓度,研究姜黄素对肺成纤维细胞株 HLF-1 的作用及其机制^[4]。我们以往的实验已经证实在体外应用矽肺患者支气管肺泡灌洗所得的 AM 经一定时间的培养后,其培养上

清可刺激成纤维细胞的增殖,并促进胶原的分泌增加。因此我们分别选取了 0、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素分别作用于未经 AM 培养上清作用的体外培养的 HLF-1 细胞和经 AM 培养上清作用的 HLF-1 细胞,目的是观察姜黄素对 AM 培养上清作用的肺成纤维细胞的增殖有否抑制作用以及探讨可能的相关机制。在 CCK-8 所检测的实验结果中可以看出,姜黄素对 AM 处理组和未处理组的 HLF-1 细胞的增殖均有抑制作用,在 0 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,随着姜黄素浓度的增加这种抑制增殖的作用增强,即这种抑制作用具有剂量依赖性。由于 AM 培养上清对 HLF-1 的促增殖作用,在相同的姜黄素浓度下,未处理组和处理组相比,姜黄素对未处理组的抑制增殖作用较强,两者相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

姜黄素对 HLFs 的作用还体现在姜黄素可促进成纤维细胞凋亡的发生。在利用 Annexin-V/PI 双染色,采用流式细胞分析术来检测姜黄素对成纤维细胞早期凋亡的影响时可见,在未处理组和处理组均出现了随着姜黄素浓度的增加,细胞早期凋亡率增加的趋势。表明姜黄素可在体外诱导成纤维细胞凋亡的发生从而可能起到抑制纤维化发生的作用。同样由于 AM 处理组的促增殖作用,相同浓度的姜黄素作用下,未处理组的早期凋亡率的发生要大于 AM 处理组。

(下转第 435 页)

入院后,给予鼠神经生长因子、B 族维生素、活血化瘀、改善能量代谢药物治疗,同时配合中频脉冲电治疗、高压氧、功能锻炼。直至全部病例临床完全康复。治疗 70~421 d,平均治疗 (165.8±93.5) d。

在诊断和治疗超过一年后观察全部患者,均达到理想康复状态。跟腱反射正常,四肢远端肌力正常、四肢远端感觉正常。53 例肌电图复查显示四肢未见神经原性损害,4 例肌电图复查提示受损神经较前均有显著改善。有 6 例患者仍诉有全身乏力、四肢远端湿冷感、手足多汗等不适症状,但临床体检未发现相应阳性体征。

3 讨论

3.1 本起正己烷中毒事件发生于无尘车间,由于正己烷具有高挥发性和蓄积性,工作人员虽有一次性口罩、手套及隔离衣防护亦未能幸免,中毒途径主要考虑为呼吸道长期吸入,尚不能完全排除部分有皮肤吸收可能。

3.2 慢性正己烷中毒主要表现为多发性周围神经病,其特点为隐匿性和进展缓慢,轻者为远端感觉性周围神经病,较重的出现运动神经损伤,严重者可发生下肢肌肉萎缩,甚至瘫痪。病理研究表明,轴索肿胀与轴索变性始终被视为正己烷中毒性周围神经病的特征性形态损伤^[1]。57 例患者临床表现均提示有不同程度周围神经损害症状及体征,肌电图有确切神经原性损害,感觉神经受损较运动神经明显,与文献报告相符^[2]。亦有文献报告,正己烷中毒可引起肝功能异常,可能具有心脏毒性,还可引起眼部损害^[3]。本起中毒事件中所有患者均动态观察血常规、肝肾功能、心肌酶谱、视力等,入院时均无异常,在治疗早期发现有 6 例白细胞减低,有 1 例心肌酶谱升高,有 1 例丙氨酸氨基转移酶升高,考虑与治疗药物有关,经药物调整和常规治疗后很快恢复正常,57 例发病前后均未发现视力损害。

(上接第 413 页)

在应用免疫印迹法检测 Bax 这一凋亡相关蛋白的研究中得到了相同的结果,即姜黄素可诱导肺成纤维细胞表达 Bax 蛋白,随着姜黄素浓度的增加,Bax 蛋白的表达量逐渐增强。因此姜黄素可在体外通过诱导肺成纤维细胞的凋亡和促进凋亡相关蛋白 Bax 的表达,抑制肺成纤维细胞的增殖、活化,从而起到抑制肺纤维化的作用。尤其是姜黄素对 AM 培养上清作用下的肺成纤维细胞的促凋亡作用的存在为我们进一步研究用姜黄素预防和治疗矽肺纤维化提供了一定的理论依据。

其次姜黄素还可影响成纤维细胞细胞周期的表达^[5]。实验结果显示,姜黄素作用于肺成纤维细胞之后,可引起肺成纤维细胞细胞周期 G₂/M 期的细胞增多和 S 期细胞的减少,表明姜黄素有可能导致成纤维细胞的 G₂/M 期阻滞和 S 期细胞合成减少,抑制其

3.3 慢性正己烷中毒的治疗目前无特殊解毒剂,脱离接触是首要处理措施,大量 B 族维生素,配合针灸、理疗、高压氧、功能锻炼和心理治疗等综合治疗在临床实践中被证明是行之有效的方法^[4,5]。近年来神经生长因子广泛应用于治疗正己烷中毒性周围神经病,临床疗效肯定,无明显不良反应^[6,7]。我院采取鼠神经生长因子、B 族维生素、活血化瘀、改善代谢并配合高压氧、中频脉冲电、功能锻炼综合治疗,在治疗 30 d 后患者乏力、肢体发麻等临床症状均有较明显改善,直至 53 例患者肌电图完全正常出院,与以往报道病例相比病程短,效果显著。这一方面是由于综合治疗使患者病情迅速缓解,另一方面可能与 57 例患者以轻、中度中毒为主,病情严重程度不及以往病例有关。

参考文献:

- [1] Spencer P S, Schaumburg H H. Experimental and Clinical Neurotoxicology [M]. New York: Oxford University Press, 2000: 642-643.
- [2] 陈华强. 慢性正己烷中毒 121 例的神经肌电图观察 [J]. 临床神经电生理学杂志, 2005, 12 (4): 206-209.
- [3] 邝守仁. 正己烷中毒临床概述 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13 (4): 225-226.
- [4] 戴军, 陈兴年, 许炜璐, 等. 综合治疗慢性正己烷中毒致周围神经炎 28 例的疗效分析 [J]. 中华医学研究杂志, 2006, 6 (7): 786-787.
- [5] 李秋萍. 高压氧治疗正己烷中毒性周围神经病疗效分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2007, 20 (5): 299.
- [6] 吴小炼, 朱松华, 沈锦松. 神经生长因子治疗正己烷职业中毒周围神经病疗效观察 [J]. 浙江临床医学, 2003, 5 (5): 358.
- [7] 胡志兵, 刘薇薇, 江朝强, 等. 神经生长因子用于治疗正己烷中毒性周围神经病的临床研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22 (4): 347-348.

增殖,从而抑制肺纤维化的发生和发展。因此深入研究姜黄素抑制矽肺纤维化的作用以及机制,对矽肺纤维化的防治具有积极的意义。

参考文献:

- [1] 郝小惠, 张丽, 王献华. 二氧化硅刺激矽肺患者肺泡巨噬细胞介导的人胚肺成纤维细胞增殖及对胶原分泌的影响 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2007, 10 (3): 295-297.
- [2] Anand P, Ku Nnumarkkara A B, Newman R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. Mol Pharm, 2007, 4 (6): 807-818.
- [3] 何雅军, 舒建昌, 吕霞, 等. 姜黄素预防肝纤维化作用与肝星状细胞的关系 [J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14 (5): 337-340.
- [4] Lin Y L, Lin C Y, Chi C W, et al. Study on antifibrotic effects of curcumin in rat hepatic stellate cells [J]. Phytother Res, 2009, 23 (7): 927-932.
- [5] Park S D, Jung J H, Lee H W, et al. Zedoariae rhizoma and curcumin inhibits platelet derived growth factor induced proliferation of human hepatic myofibroblasts [J]. Immunopharmacol, 2005, 5 (3): 555-569.