

# 莪术醇联合5-氟尿嘧啶对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响

刘皓葳, 王娟, 秦建莉, 李旭梅, 陈旭\*  
(桂林医学院, 广西桂林 541004)

**[摘要]** **目的:**探讨莪术醇(curcumol)联合5-氟尿嘧啶(5-Fu)对大肠癌 LoVo 细胞增殖和凋亡作用的影响,以及药物处理后,LoVo 细胞中增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)表达量的变化情况。**方法:**莪术醇( $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )单独或联合5-Fu( $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用大肠癌 LoVo 细胞,用噻唑蓝(MTT)比色法检测各组药物对细胞增殖的抑制作用,采用流式细胞术分析各组对细胞凋亡作用的影响,应用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞中,增殖和凋亡相关蛋白 PCNA, Bcl-2 蛋白表达的变化情况。**结果:**与空白组比较,莪术醇,5-Fu 单独给药以及联合用药,均可以有效抑制大肠癌 LoVo 细胞的增殖,促进细胞凋亡( $P < 0.05$ ),同时可以降低 PCNA, Bcl-2 蛋白的表达( $P < 0.05$ );与单独给药组比较,联合用药后,凋亡的促进作用更为明显( $P < 0.05$ )。与空白组比较,各药物组可以更有效的抑制 PCNA, Bcl-2 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。**结论:**莪术醇联合5-氟尿嘧啶能有效抑制人大肠癌 LoVo 细胞的增殖和凋亡,与单独用药组比较,联合用药可以使癌细胞的敏感性增强,极大程度的促进人大肠癌 LoVo 细胞凋亡,且这些机制可能与下调 PCNA, Bcl-2 蛋白表达有关。

**[关键词]** 莪术醇; 5-氟尿嘧啶(5-Fu); 大肠癌细胞; 增殖和凋亡; 增殖细胞核抗原(PCNA); B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0130-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181717

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180615.1006.002.html>

**[网络出版时间]** 2018-06-15 14:23

## Effect of Curcumol Combined with 5-fluorouracil on Proliferation and Apoptosis of Colorectal Carcinoma Cell Line LoVo

LIU Hao-wei, WANG Juan, QIN Jian-li, LI Xu-mei, CHEN Xu\*  
(Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of curcumol combined with 5-fluorouracil (5-Fu) on the proliferation, apoptosis and the changes in the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), B cell lymphoma-2 (Bcl-2) in colorectal carcinoma cell line LoVo. **Method:** LoVo cells were treated with curcumol ( $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and/or 5-Fu ( $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The proliferation of LoVo cells were detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. The apoptosis were analyzed by flow cytometer. The changes in PCNA and Bcl-2 expressions were detected by Western blot. **Result:** Curcumol, 5-Fu and combination group could inhibit the proliferation and promote the apoptosis of LoVo cells. The rates of inhibition and apoptosis were significantly different from control group ( $P < 0.05$ ). And the expressions of PCNA and Bcl-2 were obviously decreased, with a significant difference from control group ( $P < 0.05$ ). After combined treatment, the promoting effect of apoptosis was more obvious than single treatment group ( $P < 0.05$ ), and the expressions of PCNA and Bcl-2 protein were

**[收稿日期]** 20171207(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31460229,81760663,81760443);广西壮族自治区自然科学基金项目(2015GXNSFAA139313);桂林市科学研究与技术开发计划项目(20170109-38);广西医药人才产业小高地项目(201707)

**[第一作者]** 刘皓葳,在读硕士,从事天然药物的抗肿瘤机制研究,E-mail: haowei\_liu@163.com

**[通信作者]** \*陈旭,博士,教授,从事天然药物的抗肿瘤机制研究,E-mail: chenxu@glmc.edu.cn

significantly decreased, with a significant difference from control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Curcumol combined with 5-Fu could effectively inhibit the proliferation and promote the apoptosis of LoVo cells. Compared with the single treatment group, the combination of curcumol and 5-Fu can increase the sensitivity of cancer cells and greatly promote the apoptosis of LoVo cells. These mechanisms may be related to the down-regulation of PCNA and Bcl-2 protein expressions.

**[Key words]** curcumol; 5-fluorouracil (5-Fu); colorectal carcinoma; proliferation and apoptosis; proliferating cell nuclear antigen; B cell lymphoma-2

结直肠癌是我国发病率、致死率排名第5的恶性肿瘤,除手术切除病灶外,联合放化疗是术后控制复发和转移的重要手段<sup>[1]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-Fu)作为治疗结直肠癌的核心药物,其在体内转化为5-氟脱氧尿嘧啶核苷酸,抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶抑制DNA的合成,从而抑制肿瘤的生长及发展,但是其毒副作用明显,患者不容易耐受,且易出现耐药性,使其治疗效果降低,因此联合用药是治疗的常用手段。中医药在对结直肠癌的放化疗方面有较好的辅助作用,同时具有抑制肿瘤细胞的复发和转移,延长患者的生命周期,改善生活质量等积极的作用。莪术醇作为广西道地药材莪术的挥发油中提取的有效单体成分,具有抗肿瘤<sup>[2-8]</sup>,抗菌和抗血栓等药理活性。本课题组前期研究发现莪术醇能够抑制结肠癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,同时体内裸鼠成瘤实验也表明莪术醇能够明显抑制直肠癌的生长,而对裸鼠的体质量无影响<sup>[4]</sup>。

目前治疗结肠癌最常用的方法仍是以5-Fu为基础的辅助化疗,联合应用莪术醇对结肠癌细胞增殖及凋亡的作用及机制尚不清楚。增殖细胞核抗原(PCNA)直接与细胞增殖有关<sup>[9-10]</sup>,且在恶性肿瘤细胞中表达异常,极大可能是药物作用靶点,莪术醇是否可以与PCNA作用来抑制结直肠癌的增殖,未见报道。B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)是与凋亡相关的重要因子,抑制其表达是诱导肿瘤细胞凋亡的机制之一<sup>[11]</sup>。本研究以大肠癌LoVo细胞为研究对象,给予莪术醇单药及莪术醇联合5-氟尿嘧啶干预,观察其对LoVo细胞增殖、凋亡的影响,并探讨增殖PCNA和凋亡相关蛋白Bcl-2在大肠癌LoVo细胞中表达量的变化情况,旨在探讨莪术醇对大肠癌LoVo细胞增殖、凋亡的影响及其机制。

## 1 材料

**1.1 材料与试剂** 人大肠癌细胞株LoVo为本课题组传代保存;莪术醇(中国食品药品检定研究院,批号100185-200506);胎牛血清(美国Gemini公司,批号A11F00G);DMEM培养(美国Gibco公司,批号

8117182);噻唑蓝(MTT,南宁博美生物科技有限公司,批号K190622);二甲亚砜(DMSO,成都科龙化工试剂厂,批号2016033001);凋亡试剂(美国BD公司,批号7235944);RIPA强裂解液(上海碧云天公司,批号P0013B);PCNA单克隆抗体(沈阳万类生物公司,批号15070120);Bcl-2单克隆抗体(美国Abcam公司,批号ab32124); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(北京中杉金桥公司,批号15041);鼠二抗、兔二抗(北京依玛博科技有限公司,批号分别为1707,0904);ECL超敏化学发光试剂(美国Thermo公司,批号1705061)。

**1.2 仪器** C6plus型流式细胞仪(美国BD公司);Galaxy 170S型二氧化碳培养箱(德国Eppendorf公司);A2-4S1级2型生物安全柜(新加坡Esco公司);infinite M200Pro型酶标仪(瑞士Tecan公司);Mini-PROTEAN Tetra型电泳槽、转膜槽(美国Bio-Rad公司);JS-780型凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 药物的配制及实验分组** 药物配制,莪术醇采用无水乙醇配制成 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 原液,5-Fu用磷酸盐缓冲液(PBS)配制成 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 原液,临用前用培养基稀释。莪术醇<sup>[2]</sup>,5-Fu<sup>[12]</sup>质量浓度根据参考文献,通过预实验调整后,将实验分为以下4组:空白组,莪术醇单独处理组( $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),5-Fu单独处理组( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),联合用药组(莪术醇 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 联合5-Fu  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

**2.2 MTT比色法检测细胞增殖** 将人大肠癌细胞LoVo以 $1 \times 10^4$ 个/mL接种于96孔板中,细胞贴壁后,依照分组加入药物。每组设置5个复孔,分别培养1~3 d后,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT  $20 \mu\text{L}$ ,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养4 h,弃去孔中液体,每孔加入DMSO  $150 \mu\text{L}$ , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床中放置30 min,直至结晶紫完全溶解后,于490 nm波长下测量其吸光度A,计算细胞增殖情况。

**2.3 流式细胞术检测细胞凋亡** 人大肠癌细胞

LoVo 以  $2 \times 10^4$  个/mL 接种于 70 mm 培养皿中, 每皿接种 5 mL, 细胞贴壁后, 加入不同浓度成分的药物, 依照分组加入药物。培养 48 h 后, 收集细胞。每组细胞加入 banding buffer 100  $\mu$ L, PI 5  $\mu$ L, FITC 25  $\mu$ L, 避光放置 30 min, 再加入 banding buffer 100  $\mu$ L 筛网过滤后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达** 将人大肠癌细胞 LoVo 以  $2 \times 10^4$  个/mL 接种于 100 mm 培养皿中, 每皿接种 9 mL, 细胞贴壁后, 依照分组加入药物。在 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后, 收集细胞。每孔加入细胞裂解液 500  $\mu$ L, 冰上放置 30 min 后, 4  $^{\circ}$ C, 12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 20 min。收集细胞蛋白。BCA 蛋白定量后进行 Western blot 实验。配制 10% SDS-PAGE 凝胶, 电泳后电转于 NC 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h, 4  $^{\circ}$ C 孵育一抗 (1:1 000) 过夜。PBST 洗膜 4 次, 共 30 min, 室温孵育相应二抗 (1:4 000) 1 h, PBST 洗膜 4 次, 共 30 min。ECL 暗室发光, 压制胶片。将胶片进行灰度值扫描, 进行统计分析。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 采用单因素方差分析对数据进行统计学处理, 组间两两比较选用 LSD 检验进行显著性分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 莪术醇, 5-Fu 联合用药对人大肠癌 LoVo 细胞增殖的抑制作用** 各组药物对 LoVo 细胞进行处理, 与空白组比较, 各组均能有效抑制 LoVo 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 抑制率随着时间的增加呈递增趋势。莪术醇 3 d 抑制率为 52.77%, 5-Fu 组 3 d 抑制率为 85.20%, 联合用药组的抑制率为 87.69%。见表 1。

表 1 莪术醇与 5-Fu 联用对人结肠癌细胞 LoVo 增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Inhibitory effect of curcumol combined with 5-Fu on LoVo cells proliferation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	质量浓度 /mg $\cdot$ L <sup>-1</sup>	24 h	48 h	72 h
空白	-	-	-	-
莪术醇	50	16.83 $\pm$ 3.13 <sup>1)</sup>	28.72 $\pm$ 2.51 <sup>1)</sup>	44.65 $\pm$ 1.56 <sup>1)</sup>
5-Fu	2	40.94 $\pm$ 2.91 <sup>1)</sup>	69.48 $\pm$ 0.92 <sup>1)</sup>	85.19 $\pm$ 0.25 <sup>1)</sup>
联合用药	50 + 2	46.69 $\pm$ 4.56 <sup>1)</sup>	74.22 $\pm$ 0.93 <sup>1)</sup>	87.70 $\pm$ 0.55 <sup>1)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 莪术醇, 5-Fu 联合用药对人大肠癌 LoVo 细胞**

凋亡作用的影响 莪术醇, 5-Fu 联合作用人大肠癌 LoVo 细胞 48 h 后, 与空白组比较, 各用药组细胞凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ ); 莪术醇, 5-Fu 联合作用细胞凋亡率明显高于单独使用莪术醇和单独使用 5-Fu 组的凋亡率 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

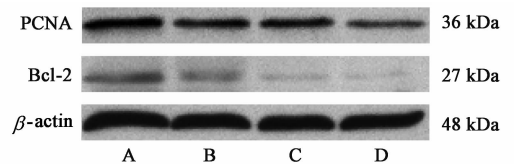
表 2 莪术醇联合 5-Fu 对人大肠癌 LoVo 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Apoptosis of LoVo cells after treatment with curcumol and 5-Fu ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /mg $\cdot$ L <sup>-1</sup>	凋亡率 /%
空白	-	5.55 $\pm$ 0.55
莪术醇	50	7.90 $\pm$ 0.20 <sup>1)</sup>
5-Fu	2	9.10 $\pm$ 0.20 <sup>1)</sup>
联合用药	50 + 2	23.00 $\pm$ 0.80 <sup>1,2,3)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与莪术醇组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 5-Fu 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 同)。

**3.3 莪术醇, 5-Fu 联合用药对人大肠癌 LoVo 细胞 Bcl-2, PCNA 蛋白表达的影响** 莪术醇, 5-Fu 联合作用人大肠癌 LoVo 细胞 48 h 后, 与空白组比较, 各用药组 Bcl-2, PCNA 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 联合用药组 Bcl-2, PCNA 蛋白表达低于单独使用莪术醇, 5-Fu 组 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 表 3。



A. 空白组; B. 莪术醇组; C. 5-Fu 组; D. 联合用药组

图 1 各组中大肠癌 LoVo 细胞 Bcl-2, PCNA 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PCNA and Bcl-2 protein in each group

表 3 莪术醇联合 5-Fu 对人大肠癌 LoVo 细胞中 Bcl-2, PCNA 蛋白表达情况的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of curcumol combined with 5-Fu on PCNA and Bcl-2 protein in LoVo cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /mg $\cdot$ L <sup>-1</sup>	PCNA / $\beta$ -actin	Bcl-2 / $\beta$ -actin
空白	-	100	100
莪术醇	50	67.35 $\pm$ 7.04 <sup>1)</sup>	52.58 $\pm$ 5.41 <sup>1)</sup>
5-Fu	2	65.04 $\pm$ 9.00 <sup>1)</sup>	13.91 $\pm$ 1.38 <sup>1)</sup>
联合用药	50 + 2	48.98 $\pm$ 9.97 <sup>1,2,3)</sup>	8.11 $\pm$ 0.86 <sup>1,2,3)</sup>

### 4 讨论

姜科植物莪术具有行气破血、消瘀止痛的作用, 中医典籍认为气血亏虚、瘀滞是西方医术所说的

“癌”的发生原因<sup>[13]</sup>。莪术醇作为莪术中的有效单体化合物,近些年被证实具有抑制肺癌、肝癌、鼻咽癌等多种癌细胞增殖的作用<sup>[2-8]</sup>。5-Fu 作为治疗结直肠癌的化疗药物,极易耐药,让细胞对药物的敏感性降低,治疗效果变差。癌症的发生发展过程经历着由少数基因的突变向多数基因突变的方向发展,联合用药一直是癌症治疗的首选方法,传统中草药提取物毒性低,联合传统化疗药物用于癌症的治疗,可以提高疗效,亦不扩大毒副作用。本研究中,采用莪术醇(50 mg·L<sup>-1</sup>)与 5-Fu(50 mg·L<sup>-1</sup>)联合用药,能有效抑制人大肠癌 LoVo 细胞的增殖,与单独用药组比较,联合用药可以使癌细胞的敏感性增强,极大地促进人大肠癌 LoVo 细胞凋亡。

PCNA 在正常细胞和癌细胞中都存在。它参与 DNA 甲基化, DNA 修复, 染色质重塑等多种细胞代谢途径, 从而影响细胞增殖。癌细胞的增殖能力强, 同时 PCNA 表达量也变得异常。近些年来, PCNA 也被看作可能是一个非致癌的抗癌靶点, 抑制它可能控制癌细胞的异常增殖<sup>[9-10]</sup>, 有研究表明, 在结直肠癌组织中 PCNA 的表达量增高明显<sup>[14]</sup>。本实验结果显示, 莪术醇和 5-Fu 均可以下调 PCNA 蛋白的表达, 并且联合用药后, 下调作用更明显。这表明莪术醇和 5-Fu 均可能通过影响 PCNA 蛋白的表达, 抑制大肠癌 LoVo 细胞的增殖。

Bcl-2 家族是比较重要的凋亡调控因子, 与细胞增殖也密切相关。Bcl-2 是一种原癌基因, 在肿瘤细胞中, Bcl-2 的高表达可以使细胞逃逸死亡<sup>[11]</sup>。本实验结果显示, 在人大肠癌 LoVo 细胞中, 与单独用药组比较, 莪术醇联合 5-Fu 可以更有效的下调 Bcl-2 蛋白的表达, 也就说明莪术醇可能是通过调控 Bcl-2 蛋白, 从而增强 5-Fu 促人大肠癌 LoVo 细胞凋亡的作用。当然, 细胞凋亡也是抑制细胞生长的一个方式, PCNA 蛋白的下调, 影响了癌细胞正常生长进程, 从而导致凋亡的发生。联合用药可以增加药物作用靶点, 或是对某一靶点起到协同作用, 所以, 联合用药后, 由于更大程度地抑制了 PCNA 和 Bcl-2 蛋白的表达, 使得 LoVo 细胞的凋亡率显著增多。

综上所述, 莪术醇和 5-Fu 抑制 LoVo 细胞增殖和凋亡的机制可能与下调 PCNA, Bcl-2 蛋白表达有关, 莪术醇联合 5-Fu 作用人大肠癌 LoVo 细胞, 可以更好地抑制 LoVo 细胞增殖, 更大程度地促进细胞凋亡, 这些机制也可能与两者下调 PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达的协同作用有关, 这为莪术醇用于大肠癌治疗, 以及联合化疗药, 增强治疗效果提供了新的

启示。

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-32.
- [2] WANG J, LI X M, BAI Z, et al. Curcumol induces cell cycle arrest in colon cancer cells via reactive oxygen species and Akt/GSK3 $\beta$ /cyclin D1 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 210:1-9.
- [3] WANG J, HUANG F, BAI Z, et al. Curcumol inhibits growth and induces apoptosis of colorectal cancer LoVo cell line via IGF-1R and p38 MAPK pathway[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8):19851-19867.
- [4] 池碧霞, 王娟, 白准, 等. 莪术醇对结直肠癌细胞裸鼠移植瘤生长及其 VEGF 和 COX-2 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8):121-125.
- [5] 陈旭, 王娟, 蒋晓山, 等. 莪术醇对肺癌 A549 细胞凋亡诱导因子-聚 ADP 核糖聚合酶及 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19):157-159.
- [6] 王娟, 刁珂, 侯艳芳, 等. 莪术醇对 A549 细胞增殖、核因子- $\kappa$ B 及血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(10):3024-3027.
- [7] 张弘, 张连荣, 姜海军, 等. 莪术醇对胃癌 SGC7901 细胞凋亡及 AIF、Endo G 表达的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2015, 21(9):703-707.
- [8] 王娟, 陈旭, 曾建红. 莪术醇对鼻咽癌细胞 CEN-2 增殖与凋亡的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(7):790-792.
- [9] Kowalska E, Bartnicki F, Fujisawa R, et al. Inhibition of DNA replication by an anti-PCNA aptamer/PCNA complex[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(1):25-41.
- [10] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners[J]. J Cell Sci, 2003, 116(15):3051-60.
- [11] 任玉伟, 宿华威. Bcl-2 基因家族研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2015, 37(2):202-205.
- [12] 谭峻英, 何青春. 氧化苦参碱联合氟尿嘧啶对结肠癌 LoVo 细胞的影响[J]. 中国药师, 2009, 12(2):153-155.
- [13] 孙燕. 中医中药在肿瘤综合治疗中的应用[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(6):323-324.
- [14] 刘鹏, 张桂英, 李艳春, 等. PTEN, p53 和 PCNA 在大肠癌组织的表达及临床意义[J]. 医学临床研究, 2005, 22(9):1227-1229.

[责任编辑 张丰丰]