

# 姜黄素逆转人结肠癌耐奥沙利铂细胞株 HCT-116/L-OHP 的耐药性

马好<sup>1</sup>, 孔德松<sup>2</sup>, 倪敏<sup>2</sup>, 蒋泽砚<sup>1</sup>, 陈正鑫<sup>1</sup>, 顾荏冰<sup>1</sup>, 樊志敏<sup>2\*</sup>  
(1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 南京中医药大学第三附属医院, 南京 210001)

**[摘要]** 目的: 构建人结肠癌奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)耐药细胞株 HCT-116/L-OHP, 观察姜黄素(curcumin, Cur)对其耐药的逆转作用, 并探讨其可能的耐药机制。方法: 采用浓度梯度递增法, 逐步提高作用于亲代人结肠癌细胞 HCT-116 的 L-OHP 浓度, 建立耐 L-OHP 的细胞株 HCT-116/L-OHP; 通过 cell counting kit-8(CCK-8)法检测 L-OHP 和 Cur 对 HCT-116 以及 HCT-116/L-OHP 细胞的细胞毒性, 观察 Cur 能否逆转耐药; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测耐药相关蛋白的表达, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测相关 mRNA 的改变。结果: 成功建立了耐 L-OHP 的人结肠癌耐药细胞株并命名为 HCT-116/L-OHP, 其耐药指数为 12.6。与 HCT-116 细胞株比较, HCT-116/L-OHP 细胞株中切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)蛋白及 mRNA 表达水平显著上升( $P < 0.01$ ), B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), 谷胱甘肽-S-转移酶- $\pi$ (glutathione-S-transferase- $\pi$ , GST- $\pi$ ), 多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP), P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp), 凋亡抑制基因(Survivin)的表达亦显著上升( $P < 0.01$ ); 不同浓度姜黄素(5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用后, ERCC1 表达下降( $P < 0.01$ ), Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 表达也有不同程度下降( $P < 0.05$ )。结论: HCT-116/L-OHP 细胞株具有稳定的耐药性, 其耐药机制可能为 ERCC1 的表达上调, 而导致 Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 等相关蛋白表达上调, 使肿瘤细胞获得耐药性。姜黄素对 HCT-116/L-OHP 的耐药性具有逆转作用, 其作用机制可能是通过降低 ERCC1 的表达, 从而下调 Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 等耐药相关 mRNA 及蛋白的表达, 增加肿瘤对 L-OHP 的敏感性, 从而逆转肿瘤细胞的耐药。

**[关键词]** 结直肠肿瘤; 耐药性; 奥沙利铂; 姜黄素; 细胞; HCT-116

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0063-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191223

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190301.1503.021.html>

**[网络出版时间]** 2019-03-04 14:02

## Effect of Curcumin in Reversing Resistance of Human Colon Carcinoma Against Oxaliplatin Cell Line HCT-116/L-OHP

MA Hao<sup>1</sup>, KONG De-song<sup>2</sup>, NI Min<sup>2</sup>, JIANG Ze-yan<sup>1</sup>, CHEN Zheng-xin<sup>1</sup>, GU Li-bing<sup>1</sup>, FAN Zhi-min<sup>2\*</sup>  
(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;  
2. The Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct oxaliplatin (L-OHP) drug-resistant cell line HCT-116/L-OHP in human colon cancer, in order to observe the reversal effect of curcumin (cur) on its drug resistance, and preliminarily explore the possible drug resistance mechanism. **Method:** The concentration gradient increasing method was used to gradually increase the L-OHP concentration of HCT-116 in parental colon cancer cells, and the cell line HCT-116/L-OHP resistant to L-OHP was established. The cytotoxicity of L-OHP and curcumin to HCT-116 and HCT-116/L-OHP cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method to observe whether

**[收稿日期]** 20181031(013)

**[基金项目]** 南京市医学科技发展重点项目(ZKX16056);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(WSN-201)

**[第一作者]** 马好,在读硕士,从事中医外科学肛肠疾病研究,E-mail:mahao921113@126.com

**[通信作者]** \*樊志敏,主任中医师,从事肛肠科疾病的中西医临床诊疗及研究工作,E-mail:Fanzm711@163.com

curative resistance could be reversed. Western blot was used to detect the expressions of drug-resistance-related proteins. Real-time PCR was used to detect changes in related genes. **Result:** Human colon cancer cell line resistant to L-OHP were successfully established and named as HCT-116/L-OHP, with a drug resistance index of 12.6. Compared with HCT-116 cell lines, the expression levels of resected and repaired cross complementation gene 1 (ERCC1) protein and gene in HCT-116/L-OHP cell lines were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), glutathione-s-transferase-consciousness (GST-consciousness), multidrug resistance-associated protein (MRP), P-glycoprotein (P-gp) and apoptotic inhibitory gene (Survivin) also increased significantly ( $P < 0.01$ ). After the treatment with different concentrations of curcumin (5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), the expression of ERCC1 decreased ( $P < 0.01$ ), and the expressions of Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin also decreased to different degrees ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** HCT-116/L-OHP cell lines have a stable drug resistance, and its drug resistance mechanism may be up-regulated with the expression of ERCC1, which leads to the up-regulation of Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin and other related proteins, and enables tumor cells to acquire drug resistance. Curcumin can reverse the drug resistance of HCT-116/L-OHP, and its mechanism may be to reduce the expression of ERCC1, thereby down-regulating the expressions of Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin and other drug-resistant related genes and proteins, and increase the sensitivity of tumor to L-OHP, so as to reverse the drug resistance of tumor cells.

[**Key words**] colorectal neoplasms; drug resistance; oxaliplatin; curcumin; cell; HCT-116

结肠癌是一种常见的消化道肿瘤,严重威胁人类生命健康。在世界范围内,其发病率居恶性肿瘤第 3 位,死亡率居恶性肿瘤第 4 位。近年来,我国结肠癌的发病率和死亡率都呈显著上升趋势<sup>[1]</sup>。现代社会随着人们生活习惯和饮食结构的改变,我国结肠癌的发病率逐年递增,虽然外科手术切除是目前较为常用的一种治疗手段,但其单独治疗并不能达到十分理想的治疗效果<sup>[2]</sup>,且对于晚期患者,常常失去手术机会,化疗则成为主要的治疗手段。奥沙利铂(L-OHP)是目前临床上常用的铂类化疗药物,在结肠癌的内科治疗中占有重要地位,其主要机制是通过与脱氧核糖核酸双链共价结合形成链间交联,从而阻断 DNA 的复制和转录,以发挥抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。但长期大剂量应用 L-OHP 的毒副作用和耐药性已成为化疗失败的主要原因,严重影响其疗效。切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)是核苷酸切除修复(NER)系统的关键基因,近年的研究提示,铂类药物的耐药与 ERCC1 的高表达有关<sup>[4-6]</sup>。如何提高结肠肿瘤患者对于奥沙利铂药物治疗的敏感性,逆转耐药,提高疗效是目前临床治疗中晚期结肠癌迫切需要解决的难点。

目前肿瘤的耐药逆转剂已成为肿瘤化疗研究的热点,而中药低毒高效的特性使之得到越来越多研究者的青睐,成为近年来肿瘤耐药逆转剂的研究热点。姜黄素(Cur)是从中国传统中药姜黄的根茎中分离提取的一种多酚类化合物。既往的研究证实,

姜黄素对多种肿瘤包括结直肠癌均有良好的抑瘤作用<sup>[7-9]</sup>。另外也有研究发现,姜黄素对肿瘤的耐药性也具有一定的逆转作用<sup>[10-12]</sup>。Mehdi 等<sup>[12]</sup>研究发现姜黄素联合 5-氟尿嘧啶(5-FU)可通过降低错配修复能力提高 5-FU 对结直肠癌耐药株的化疗效应。关于姜黄素能否逆转结直肠癌对 L-OHP 的耐药,其机制是否与 ERCC1 的表达相关,目前尚无深入的研究。本研究旨在构建人结肠癌耐奥沙利铂细胞株 HCT-116/L-OHP,并通过检测亲本细胞及耐药细胞中 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),谷胱甘肽-巯基-转移酶- $\pi$ (GST- $\pi$ ),多药耐药相关蛋白(MRP),P-糖蛋白(P-gp),凋亡抑制基因(Survivin)等蛋白及 mRNA 的表达情况反映其耐药程度,观察姜黄素对细胞的耐药性是否有逆转作用,并探讨在姜黄素的作用下耐药细胞的耐药性改变是否与 ERCC1 的表达相关。为临床上应用姜黄素作为治疗结肠癌时的治疗用药提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人结肠癌 HCT-116 细胞株,购自上海中科院细胞库中心。

**1.2 试剂** 奥沙利铂(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 170728AG);0.25% 胰蛋白酶(0.02% EDTA),DMEM 培养液(Gibco 公司,批号分别为 1894145,8117295);胎牛血清(AusGeneX 公司,批号 FBSSA01016-2);cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 KQ749);姜黄素

(Sigma 公司,批号 MKCD2451),临用时以少量二甲基亚砷(DMSO)溶解,再加培养液稀释至所需浓度(DMSO 终体积分数 < 0.01%);逆转录试剂 iscript cDNA synthesis kit, iQ SYBR Green Super mix (Bio-Rad 公司,批号分别为 1708891, 1708882);鼠抗人单克隆抗体 ERCC1,鼠抗人单克隆抗体 Bcl-2,鼠抗人单克隆抗体 MRP1,兔抗人多克隆抗体 Survivin,兔抗人多克隆抗体 PGP,山羊抗人多克隆抗体 GST- $\pi$ , $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(Abcam 公司,批号分别为 ab2356, ab692, ab24102, ab469, ab103477, ab53943, ab8229);trizol 试剂(Ambion 公司,批号 135306)。

**1.3 仪器** Epoch 型全波长酶标仪(美国 Bio Tex 公司);BX43 型正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);DMI3000B 型倒置荧光显微镜(德国徕卡公司);BSC1300-II-B2 型生物安全柜,CJV1000-Y 型净化工作台(中国山东新华公司);HF90 型细胞培养箱(中国上海力康公司);ChemiDoc XRS + 型全自动化学发光凝胶成像分析系统,Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳系统,Mini Trans-Blot 型转膜印迹系统(美国 Bio-Rad 公司);7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司);NanoDrop2000 型核酸蛋白分析仪(美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

**2.1 构建人结肠癌耐奥沙利铂细胞株 HCT-116/L-OHP** 取对数生长期的人结肠癌 HCT-116 细胞,以  $5 \times 10^5$  个/mL 细胞接种于培养皿中。待细胞贴壁后,将培养基更换为 L-OHP 质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养液继续培养。5~7 d 后,予细胞传代。传 3 代,细胞可在含药培养基中稳定生长,此时培养基中 L-OHP 增加至  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,继续传代培养至细胞稳定生长后逐渐增加 L-OHP 的质量浓度,直至细胞可在 L-OHP  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养液中稳定生长,此时的细胞亚系即被命名为 HCT-116/L-OHP。

### 2.2 CCK-8 法检测 HCT-116/L-OHP 耐药指数<sup>[13]</sup>

消化 HCT-116, HCT-116/L-OHP 细胞,制备单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔  $3 \times 10^3$  个;置 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 24 h,取出培养板,弃培养液加入不同质量浓度奥沙利铂(1, 2, 5, 10, 20, 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),每组 3 个复孔,同时设不加药物为空白组。每孔终体积为 200  $\mu\text{L}$ ;再次置于培养箱培养 48 h,去其培养液,每孔加入含 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$  的培养液 200  $\mu\text{L}$ ,染色 2 h,酶标仪 450 nm 测各孔吸

光度 A。计算 HCT-116 和 HCT-116/L-OHP 的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>);存活率 =  $A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ ;抑制率 =  $1 - \text{存活率}$ ;耐药指数(RI) =  $\text{IC}_{50}(\text{HCT-116/L-OHP})/\text{IC}_{50}(\text{HCT-116})$ 。

**2.3 CCK-8 法检测不同浓度姜黄素对敏感细胞 HCT-116 及耐药细胞 HCT-116/L-OHP 细胞株的增殖抑制作用** 消化 HCT-116 及 HCT-116/L-OHP 细胞,制备单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔  $3 \times 10^3$  个;置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 24 h,取出培养板,弃培养液加入不同质量浓度姜黄素(5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),每组 3 个复孔,同时设不加药物为空白组。每孔终体积为 200  $\mu\text{L}$ ;再次置于培养箱培养 48 h,去其培养液,每孔加入含 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$  的培养液 200  $\mu\text{L}$ ,染色 2 h,酶标仪 450 nm 测各孔的 A,计算抑制率。并以药物的不同浓度和细胞的存活率作图,确定细胞的 IC<sub>50</sub>。

**2.4 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 HCT-116/L-OHP 耐药细胞中药处理前后 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 蛋白的表达** 实验分组为 HCT-116 组(正常组),HCT-116/L-OHP(模型组),HCT-116/L-OHP(Cur 低浓度  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,HCT-116/L-OHP(Cur 中浓度  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,HCT-116/L-OHP(Cur 高浓度  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组。取 HCT-116 细胞及 HCT-116/L-OHP 细胞,经不同浓度姜黄素处理后,消化收集细胞,加入细胞裂解液,于 4 °C,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,提取细胞总蛋白,取蛋白样品 30  $\mu\text{g}$  经 SDS-PAGE 电泳后,100 V 恒压电泳 2 h,分离蛋白,然后进行转膜。加入一抗 ERCC1(1:500),P-gp(1:500),Bcl-2(1:500),GST- $\pi$ (1:2 000),MRP1(1:50),Survivin(1:5 000), $\beta$ -actin(1:500),过夜,再加入二抗(1:2 000)。洗膜后,用化学发光凝胶成像系统进行 ECL 化学发光显色,用 Image J 软件将各蛋白条带的灰度进行数值化, $\beta$ -actin 蛋白作为内参,以目的蛋白条带与内参蛋白条带的灰度值的比值反映目的蛋白的表达水平。

**2.5 Real-time PCR 检测 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin mRNA 表达** 实验分组同 2.4 项。用 trizol 法提取总 RNA,用酶标仪检测 RNA 纯度和浓度。用 RNA 样品 5  $\mu\text{g}$  进行反向转录。根据测定的 RNA 浓度,计算逆转录 5  $\mu\text{g}$  所需的 RNA 量。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,逆转录反应条件为 42 °C 反应 60 min,70 °C,5 min 终止反应,-20 °C 保存待用。PCR 反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,PCR 反应条件为 95 °C

5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环, 72 °C 10 min。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行结果分析求得各 mRNA 的相对表达量。所用引物由南京谨庭生物科技有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
ERCC1	上游 ATGTCTGACCACCGTGAA	188
	下游 TGTTCCAGAGATCCAAATGTG	
Bcl-2	上游 GCCTTCTTTGAGTTCGGTG	83
	下游 AGTCATCCACAGGGCGAT	
GST- $\pi$	上游 CAGGAGGGTCACTCAAAG	437
	下游 CAGTTGTAGTCAGCGAAG	
MRP1	上游 GGCATCTCAGCAACTCGTCTT	250
	下游 ATTAGCTTCCACGTCTCCTCTT	
P-gp(MDR1)	上游 AGCTCATCGTTGTCTACAGTTCG	403
	下游 TCCACGGACACTCCTACGAGT	
Survivin	上游 AAGAACTGGCCCTTCTTGGA	313
	下游 CAACCGGACGAATGCTTTT	
$\beta$ -actin	上游 CATGTACGTTGCTATCCAGGC	268
	下游 CTCCTTAATGTCACGCACGAT	

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 24.0 统计软件对数据进行分析, 通过线性回归法计算  $IC_{50}$  值, 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用单因素方差分析比较组间差异,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 人结肠癌耐奥沙利铂细胞株 HCT-116/L-OHP 的建立** 获得了 L-OHP 的耐药细胞 HCT-116/L-OHP, 且生长状态良好。HCT-116/L-OHP 细胞可在含  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  L-OHP 的培养液中维持培养。L-OHP 作用 HCT-116 细胞的  $IC_{50}$   $5.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 显著低于作用 HCT-116/L-OHP 细胞的  $IC_{50}$  ( $71.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ ), RI 为 12.6, 符合中度耐药, 见表 2。

**3.2 姜黄素对敏感细胞株 HCT-116 及耐药细胞株 HCT-116/L-OHP 的增殖抑制作用** 在低浓度姜黄素的作用下, 敏感细胞株 HCT-116 和耐药细胞株 HCT-116/L-OHP 的增殖抑制率增高, 敏感细胞株 HCT-116 较耐药细胞株 HCT-116/L-OHP 增殖抑制率升高更明显; Cur 浓度增高时两者增殖抑制率下降, 但无统计学差异, 见表 3。

**3.3 姜黄素对 HCT-116/L-OHP 细胞 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 蛋白表达的影响** 与正常组相比, 模型组 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ ,

表 2 奥沙利铂对耐药细胞株 HCT-116/L-OHP 与敏感细胞株 HCT-116 增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Oxaliplatin in inhibiting proliferation of HCT-116/L-OHP and HCT-116 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	L-OHP/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖抑制率/%
HCT-116	1	40.34 $\pm$ 3.10
	2	35.51 $\pm$ 4.66
	5	42.07 $\pm$ 4.84
	10	51.07 $\pm$ 1.35
	20	65.18 $\pm$ 2.91
	50	69.29 $\pm$ 0.65
HCT-116/ L-OHP	100	94.51 $\pm$ 4.22
	1	7.55 $\pm$ 2.02
	2	3.05 $\pm$ 4.71
	5	8.59 $\pm$ 1.40
	10	10.95 $\pm$ 2.95
	20	22.13 $\pm$ 0.70
	50	41.67 $\pm$ 2.16
	100	58.39 $\pm$ 3.77

表 3 姜黄素对 HCT-116 及 HCT-116/L-OHP 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of curcumin on survival rate of HCT-116 and HCT-116/L-OHP cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	Cur/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖抑制率/%
HCT-116	5	1.29 $\pm$ 0.11
	10	1.84 $\pm$ 0.17
	20	0.30 $\pm$ 0.04
	30	0.22 $\pm$ 0.01
	40	0.22 $\pm$ 0.02
HCT-116/ L-OHP	5	1.04 $\pm$ 0.08
	10	1.23 $\pm$ 0.19
	20	0.29 $\pm$ 0.01
	30	0.23 $\pm$ 0.06
	40	0.17 $\pm$ 0.01

MRP, P-gp, Survivin 蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 姜黄素 (10, 20, 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理后 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 蛋白表达显著下降 ( $P < 0.01$ ), 呈浓度依赖性。见表 4, 图 1。

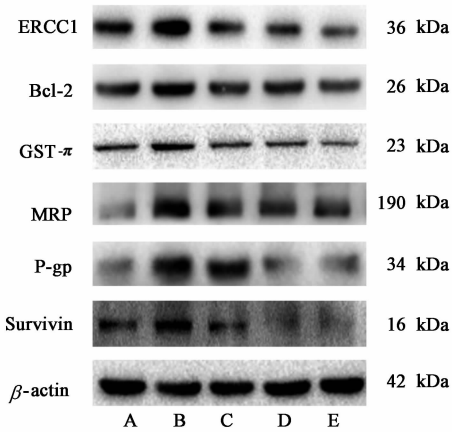
**3.4 姜黄素对细胞 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin mRNA 表达的影响** 与正常组比较, 模型组 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin

表 4 姜黄素对 HCT-116/L-OHP 细胞 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of curcumin on expressions of ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ERCC1/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	GST- $\pi$ / $\beta$ -actin	MRP/ $\beta$ -actin	P-gp/ $\beta$ -actin	Survivin/ $\beta$ -actin
正常	-	0.68 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.02
模型	-	0.89 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.98 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>	1.08 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	0.83 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.67 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>
姜黄素	10	0.63 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.75 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.69 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.56 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.41 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>
	20	0.50 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.60 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	0.54 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>
	30	0.58 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.44 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.44 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.36 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。



A. 正常组; B. 模型组; C~E. 姜黄素 (10, 20, 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组

图 1 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin protein expressions

表 5 姜黄素对细胞 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of curcumin on expressions of ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin mRNA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ERCC1	Bcl-2	GST- $\pi$	MRP	P-gp	Survivin
正常	-	1.01 $\pm$ 0.18	1.03 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.11	1.03 $\pm$ 0.17	1.04 $\pm$ 0.15	1.04 $\pm$ 0.25
模型	-	3.63 $\pm$ 0.79 <sup>1)</sup>	3.47 $\pm$ 0.34 <sup>1)</sup>	1.79 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>	2.52 $\pm$ 0.19 <sup>1)</sup>	2.93 $\pm$ 0.18 <sup>1)</sup>	3.17 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>
姜黄素	10	2.50 $\pm$ 0.20 <sup>2)</sup>	2.73 $\pm$ 0.14 <sup>3)</sup>	1.48 $\pm$ 0.21	1.94 $\pm$ 0.15 <sup>3)</sup>	2.35 $\pm$ 0.19 <sup>3)</sup>	2.09 $\pm$ 0.13 <sup>3)</sup>
	20	2.39 $\pm$ 0.34 <sup>3)</sup>	2.12 $\pm$ 0.16 <sup>3)</sup>	1.28 $\pm$ 0.16 <sup>3)</sup>	1.73 $\pm$ 0.14 <sup>3)</sup>	1.91 $\pm$ 0.16 <sup>3)</sup>	2.09 $\pm$ 0.22 <sup>3)</sup>
	30	1.70 $\pm$ 0.20 <sup>3)</sup>	2.16 $\pm$ 0.21 <sup>3)</sup>	1.22 $\pm$ 0.15 <sup>3)</sup>	1.64 $\pm$ 0.10 <sup>3)</sup>	1.65 $\pm$ 0.08 <sup>3)</sup>	1.89 $\pm$ 0.20 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

敏感细胞组与耐药细胞组的细胞生长抑制率随奥沙利铂浓度的增高而上升,呈现出剂量依赖性。且相同剂量下耐药细胞株抑制率较敏感株明显降低,实验结果提示,本研究建立了具有一定耐药性的耐药细胞株。奥沙利铂对耐药细胞的抑制作用较差,而采用不同浓度的姜黄素作用于敏感细胞株 HCT-116 以及耐药细胞株 HCT-116/L-OHP 后,观察到相同浓度的姜黄素下耐药细胞株与敏感细胞株的抑制率无明显差异,说明姜黄素对耐药细胞仍具有良好的抑制作用,且具有浓度依赖性,由此,可认为姜黄素对

mRNA 表达均显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,姜黄素低质量浓度组 ERCC1, Bcl-2, MRP, P-gp, Survivin mRNA 表达明显下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),姜黄素中、高质量浓度组 ERCC1, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ );呈浓度依赖性。见表 5。

#### 4 讨论

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,对于晚期结直肠癌,化疗是主要的治疗方法,肿瘤产生耐药是降低化疗药物疗效的重要原因,其机制目前尚不明确,与耐药相关酶的异常、转运蛋白的异常、抗细胞凋亡通路异常以及肿瘤干细胞常等有关<sup>[14]</sup>。本研究的目的是观察姜黄素是否能够逆转 HCT-116/L-OHP 细胞株的耐药性并探究其机制。本实验中,

HCT-116 细胞株对奥沙利铂的耐药性有逆转效果。本实验 HCT-116/L-OHP 细胞中 ERCC1 的表达明显高于亲本敏感细胞株 HCT-116, Bcl-2, GST- $\pi$ , MRP, P-gp, Survivin 的表达也明显高于敏感细胞。Bcl-2 位于核膜的胞质面、内质网及线粒体外膜上,是细胞凋亡的负调因子,可以抑制促凋亡因子的释放从而保护细胞免于凋亡<sup>[15]</sup>。Survivin 也是一种抗凋亡基因,在多种肿瘤中均有表达,促进肿瘤细胞的增殖<sup>[16]</sup>,造成肿瘤耐药<sup>[17]</sup>。GST- $\pi$  基因定位于编码的 GST- $\pi$  蛋白,属于谷胱甘肽转移酶一种亚型,

与肿瘤耐药的关系十分密切,有文献表明,GST- $\pi$  的表达可能影响肿瘤的发生发展、浸润及转移等。GST- $\pi$  可与化疗药物结合,减少药物作用,促进药物排出细胞外而产生耐药。P-gp 和多药耐药相关蛋白(MRP)是经典的多药耐药基因,两者同属于 ATP 结合盒膜转运蛋白超家族膜转运蛋白,能将细胞内药物主动转运至细胞外,降低细胞内药物浓度而导致肿瘤细胞耐药性的产生<sup>[18-19]</sup>。两者在结直肠癌耐药细胞中多呈高表达。近年的研究显示,P-gp 在大肠癌细胞中的表达水平与细胞的耐药程度有明显的相关性,P-gp 的过度表达可导致大肠癌产生原发性耐药,是造成化疗失败的重要因素<sup>[20]</sup>。Bcl-2, GST- $\pi$ ,MRP,P-gp, Survivin 等蛋白的表达升高提示 HCT-116/L-OHP 耐药性的提高。目前的研究发现,铂类药物耐药的主要机制有减少药物摄取积聚、通过共扼结合去除药物毒性、提高对铂类药物诱导产生的 DNA 加合物的耐受性及提高 DNA 修复能力等。由于奥沙利铂的作用靶点是 DNA,其耐药的机制可能与 DNA 修复异常相关。核苷酸切除修复(NER)系统是人类最重要的 DNA 损伤修复途径,是修复铂类药物所致 DNA 损伤的重要机制,多项研究证实,NER 途径中的基因表达异常与结直肠癌易感性以及化疗敏感性相关。切除 ERCC1 位于 19 号染色体,是一段具有 10 个外显子的 DNA 序列,全长 15 kb,其编码的产物为 ERCC1 蛋白。在核苷酸切除修复过程中起到限速酶作用,是 NER 途径的关键基因,ERCC1 蛋白和 XPF 构成 ERCC1-XPF 异二聚体,在 DNA 的损伤识别和切割中起到重要作用。ERCC1 表达过高则 DNA 损伤修复的能力提高,肿瘤对铂类药物的敏感性随之降低,表现为肿瘤的耐药。前期的相关研究也发现,ERCC1 的单核苷酸多态性可能导致结直肠癌易感性,并与患者对奥沙利铂的敏感性有关<sup>[21]</sup>。本实验结果也证实结直肠癌耐药细胞 HCT-116/L-OHP 的 ERCC1 表达异常增高,且 Bcl-2, GST- $\pi$ ,MRP,P-gp, Survivin 等耐药相关蛋白也随之增高,说明结直肠癌对奥沙利铂的耐药与 ERCC1 基因的异常表达密切相关。姜黄素是一种植物多酚,其化学结构为 C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub><sup>[22]</sup>。姜黄素具有抗炎,抗肿瘤以及逆转肿瘤细胞耐药等广泛的药用价值,杨苏钰等<sup>[23]</sup>发现姜黄素与黄芪甲苷联用后对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤出现转移后具有抑制作用,苗久旺等<sup>[24]</sup>研究表明双去甲氧基姜黄素可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖并诱导其凋亡。已有的研究证实姜黄素可以通过不同的机制逆转肿瘤细胞

的耐药,提高化疗效果。对大肠癌的耐药也有一定的逆转作用,相关研究表明姜黄素可通过抑制 P-gp 表达,抑制 MRP1,下调抗凋亡因子 Bcl-2,抑制 Survivin 的表达等多种途径逆转结直肠癌耐药<sup>[25]</sup>。本实验结果提示经姜黄素作用后,随着姜黄素浓度的增加 ERCC1 的表达逐渐降低,同时 Bcl-2, GST- $\pi$ ,MRP,P-gp, Survivin 的表达亦降低。说明姜黄素可通过抑制 ERCC1 的表达,调控耐药相关蛋白的表达,从而逆转耐药。

综上所述,姜黄素对人结肠癌耐药细胞株 HCT-116/L-OHP 的耐药性具有逆转作用,其作用机制可能是通过降低 ERCC1 的表达,从而影响 Bcl-2, GST- $\pi$ ,MRP,P-gp, Survivin 等蛋白的表达,以减少肿瘤细胞对化疗药物的外排,增加细胞内药物浓度,抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,从而逆转肿瘤细胞的多药耐药性。且姜黄素具有低毒、价廉、来源丰富的优势,因此,姜黄素有可能成为一种新的结肠癌耐药逆转剂,具有一定的临床应用价值和广阔的应用前景。

#### [参考文献]

- [1] 李道娟,李倩,贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(3):305-310.
- [2] 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.
- [3] Mayer R J. Oxaliplatin as part of adjuvant therapy for colon cancer: more complicated than once thought[J]. J Clin Oncol,2012,30(27):3325-3327.
- [4] QIU Y, ZOU Y B, LI K, et al. Effect of altered WIG-1 expression on DDP sensitivity in a DDP-resistant esophageal squamous cancer cell line[J]. Curr Cancer Drug Targets,2012,12(8):950-961.
- [5] LI W, Melton D W. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance [J]. Oncogene,2012,31(19):2412-2422.
- [6] 刘新福,尹婵,张辉,等. 胃癌组织中 ERCC1、TS 和 TUBB3 与化疗药物体外药敏相关性的实验研究[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(2):166-169.
- [7] Labbozzetta M, Notarbartolo M, Poma P, et al. Curcumin as a possible lead compound against hormone-independent, multidrug-resistant breast cancer[J]. Ann N Y Acad Sci,2009,51(11):1155-1165.
- [8] Lo Y L, Ho C T, Tsai F L. Inhibit multidrug resistance and induce apoptosis by using glycocholic acid and

- epirubicin [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 35 (1/2): 52-67.
- [9] Sharma R A, McLelland H R, Hill K A, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(7):1894-1900.
- [10] Shusuke T, Yoshinaga O, Thomas J, et al. Curcumin mediates chemosensitization to 5-fluorouracil through miRNA-induced suppression of epithelial-to-mesenchymal transition in chemoresistant colorectal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(3): 355-367.
- [11] 任金妹, 纪宏宇, 唐景玲, 等. 姜黄素抗肿瘤及逆转多药耐药的研究进展[J]. *中国药师*, 2013, 16(10): 1582-1585.
- [12] Mehdi S, Constanze B, Patricia K, et al. Curcumin chemosensitizes 5-fluorouracil resistant MMR-deficient human colon cancer cells in high density cultures[J]. *PLoS One*, 2017, 9(1): e85397.
- [13] 司徒镇强, 吴正军, 刘斌, 等. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 2001: 186-188.
- [14] 叶嘉诺, 郑坚, 朱莹杰, 等. 中药提取物逆转结肠癌多药耐药的研究进展[J]. *吉林中医药*, 2017, 37(4): 429-432.
- [15] Reed J C, Miyashita T, Takayama S, et al. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy[J]. *J Cell Biochem*, 1996, 60(1): 23-32.
- [16] Bilim V, Yuuki K, Ihoi T, et al. Double inhibition of XIAP and Bcl-2 axis is beneficial for retrieving sensitivity of renal cell cancer to apoptosis[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(5): 941-949.
- [17] Recchia F, Saggio G, Candeloro G, et al. Chemoimmunotherapy in the treatment of metastatic gastric cancer[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2007, 18(5): 597-604.
- [18] Sharom F J. Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1) [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 84(6): 979-992.
- [19] Balagopalan L, Coussens N P, Sherman E, et al. The LAT story: a tale of cooperativity, coordination, and choreography[J]. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2010, 2(8): a005512.
- [20] Jäeger W. Classical resistance mechanisms [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2009, 47(1): 46-48.
- [21] NI M, ZHANG W Z, QIU J R, et al. Association of ERCC1 and ERCC2 polymorphisms with colorectal cancer risk in a Chinese population[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4112.
- [22] Sharma R A, Gescher A J, Steward W P. Curcumin: the story so far [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(13): 1955-1968.
- [23] 杨苏钰, 唐德才, 曹子丰, 等. 黄芪甲苷配伍姜黄素对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤转移的抑瘤作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6): 155-160.
- [24] 苗久旺, 荆雪宁, 高茨, 等. 自噬对双去甲氧基姜黄素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡作用的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 167-171.
- [25] 王家智, 陈小伍, 朱达坚. 姜黄素逆转大肠癌多药耐药的研究进展[J]. *广东医学*, 2013, 34(5): 795-798.

[责任编辑 张丰丰]