

姜黄素抑制人宫颈癌 CaSki 细胞裸鼠移植瘤的生长

刘冬菊¹, 姚 宇¹, 黄文革²

(1. 广州中医药大学第三附属医院, 广州 510360; 2. 中山大学实验动物中心, 广州 510080)

【摘要】 目的 探讨姜黄素对人宫颈癌 CaSki 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用。**方法** 建立人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型, 35 只荷瘤裸鼠随机分为 5 组, 姜黄素高剂量(200 mg/kg)、中剂量(100 mg/kg)、低剂量(50 mg/kg)组、溶剂对照组和顺铂组(3 mg/kg), 每组 7 只, 姜黄素连续灌胃给药 15 d, 顺铂组每 3 d 腹腔注射给药, 共 5 次。停药 24 h 后处死裸鼠, 测量裸鼠体重、移植瘤体积、瘤重, 计算抑瘤率; 光镜下观察移植瘤组织形态学变化;**结果** 处理组的移植瘤体积均明显小于空白对照组 ($P < 0.01$)。姜黄素高、中、低剂量组抑瘤率分别为 44.3%、40.1% 和 33.3%; HE 染色法显示姜黄素处理组小鼠的移植瘤组织出现明显坏死改变;**结论** 姜黄素对人宫颈癌 CaSki 细胞移植瘤的生长具有明显的抑制作用。

【关键词】 宫颈癌; 姜黄素; 移植瘤

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 02-0007-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.002.002

Inhibitory effect of curcumin on the growth of human cervical carcinoma (CaSki) xenografts in nude mice

LIU Dong-ju¹, YAO Yu¹, HUANG Wen-ge²

(1. the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510360, China;
2. Laboratory Animal Center of Zhongshan University, Guangzhou 510080)

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effect of curcumin on the growth of human cervical carcinoma CaSki xenografts in nude mice. **Methods** Human cervical cancer cell line CaSki cells were inoculated subcutaneously into nude mice. Thirty-five tumor-bearing mice were randomly divided into 5 groups: curcumin high dose (200 mg/kg), moderate dose (100 mg/kg), low dose (50 mg/kg), solvent control group and cisplatin group (3 mg/kg), 7 mice in each group. Curcumin was orally administered once per day for consecutive 15 days. Intraperitoneal injection of cisplatin was given every three days, for a total of five times. The mice were sacrificed 24 h after the end of treatment and the body weight, tumor volume, tumor weight were measured and the inhibition rate was calculated. The histological changes of tumor tissue was examined. **Results** The tumor volumes of the treated group were significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). The tumor inhibition rate of the curcumin high, medium and low dose groups were 44.3%, 40.1% and 33.3%, respectively. Apparent necrosis was observed in the tumors of the curcumin-treated groups. **Conclusion** Curcumin possesses apparent inhibitory effect on the growth of transplanted tumors of human cervical cancer CaSki cells in nude mice.

【Key words】 Cervical cancer; Curcumin; Xenografts; Nude mice

[基金项目] 广东省科技计划基金项目(编号:2012B061700029)。

[通讯作者] 刘冬菊(1971-), 女, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事妇科肿瘤的研究。Email: weila_dongju@163.com。

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,发病率居女性恶性肿瘤第二位。我国每年子宫颈癌新病例数为 13.15 万,约占全球总数的 1/3,每年有 2 万~3 万妇女死于子宫颈癌。以顺铂为基础的化放疗晚期及转移宫颈癌主要的治疗方式。顺铂严重的消化道反应、肾毒性、神经毒性及骨髓移植的不良反应使其在临床应用受到限制。因此迫切需要寻找并研究高效无毒副作用的新药。大量研究发现中药姜黄素(curcumin)具有多种生物学活性,是一种具有良好发展前景的药物。它具有抗癌广谱、不良反应小的优点,已成为目前研究热点。本文主要探讨姜黄素对人宫颈癌 CaSki 细胞裸鼠移植瘤生长的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞、药品及主要试剂

人宫颈癌 CaSki 细胞购于广州龙龙生物科技有限公司。姜黄素(Sigma 公司);注射用盐酸顺铂(齐鲁制药有限公司);BD Matrigel:购于广州龙龙生物科技有限公司。1640 培养基及胎牛血清购自 Gibco 公司;

实验动物:SPF 级 BALB/c nu/nu 雌性裸小鼠 35 只,4~5 周龄,体质量(15~20)g,购于中山大学(大学城)实验动物中心,生产合格证编号:SCXK(粤)2011-0029。动物级别 SPF 级,NO:44008500006263。所有裸鼠均由中山大学(北校区)实验动物中心饲养,医学实验动物使用许可证编号:SYXK(粤)2012-0081。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:人宫颈癌 CaSki 细胞常规进行细胞复苏、传代,调整细胞浓度,取对数生长期的细胞进行试验。

1.2.2 裸鼠的饲养:裸鼠饲养于中山大学实验动物中心 SPF 屏障系统的洁净层流架内,温度(25 ± 1)℃,相对湿度 40%~60%。实验用裸鼠所用的垫料、食物、水等均经过灭菌处理。

1.2.3 人宫颈癌 CaSki 细胞裸鼠皮下移植瘤的建立:CaSki 细胞以 2×10^6 个细胞铺至 10 cm^2 的培养皿中,培养 48 h 后用 0.25% 胰酶消化消化细胞,计数,离心,用无血清的培养基稀释到所需浓度,并计算好所需细胞,取出并离心;取出溶解的 Matrigel(浓度为 100%),用无血清的培养基稀释至 50%;按照细胞悬液:50% Matrigel = 1:1 混匀。Matrigel 终

浓度为 25%,细胞密度为 2×10^6 个/200 μL ;酒精消毒后,用 1.0 mL 注射器将 0.2 mL 细胞悬液(约 2.0×10^6 细胞)注入裸鼠右侧腋窝处皮下。待移植瘤大小约 100 mm^3 ,按数字随机法分为 5 组,每组 7 只,进行给药。①溶剂对照组:0.5% 羧甲基纤维素钠 0.2 mL;② Curcumin 低剂量组:50 mg/kg;③ Curcumin 中剂量组:100 mg/kg;④ Curcumin 高剂量组:200 mg/kg;⑤顺铂组,顺铂 3 mg/kg。顺铂组腹腔注射,每 3 d 1 次,其余各组每天灌胃 1 次,共 15 d。

1.2.4 肿瘤体测量及抑瘤率的计算:定期观察小鼠的饮食、精神、排便情况,于给药前一日及给药后每 3 d 用游标卡尺测量移植瘤的长径(a)、短径(b);给药前用电子天平测量裸鼠体质量。停药后 24 h,将裸鼠颈椎脱臼法处死,剥取瘤组织,可见部分裸鼠肿瘤旁有淋巴结转移,称重瘤组织,常规剖腹观察未见腹水及其它脏器转移,称瘤体重量,计算抑瘤率。抑瘤率(IR%) = $[(\text{对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重}] \times 100\%$ 。按以下公式计算肿瘤体积。肿瘤体积(V) = $ab^2/2$ 。

1.2.5 移植瘤组织病理学观察:取瘤后,10% 中性甲醛液固定,标本经脱水、包埋、切片,HE 染色。用 Leica DM5000B 普通光学显微镜观察各组裸鼠移植瘤组织及心、肝、肺、肾等组织标本的结构变化。

1.2.6 统计学方法:用 SPSS 19.0 统计软件包进行数据处理,瘤体生长曲线采用重复测量方差分析,不同组间比较采用 One-way ANOVA 分析。

2 结果

2.1 裸鼠成瘤情况及各治疗组对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

裸鼠接种 CaSki 后,5~7 d 可见直径约 2~3 mm 的瘤样结节,质地软。继续观察接种第 15 天,瘤样结节质地渐硬,本实验 35 只裸鼠成瘤率为 100%。按裸鼠肿瘤体积大小随机分 5 组,每组 7 只,治疗前各组裸鼠平均体重无明显统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 荷瘤裸鼠治疗前后体质量的变化

用药期间,顺铂组小鼠逐渐出现活动减少,厌食,皮肤干涩,消瘦等表现。其余各组一般状况良好,未见药物不良反应。经过 15 d 治疗,各组裸鼠的平均体重如表 1 示,顺铂组与对照组相比,裸鼠体质量明显下降($P < 0.01$),姜黄素各治疗组裸鼠

表 1 各组裸鼠体重、肿瘤体积、瘤重的变化($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Changes of the body weight, tumor size and tumor weight of the nude mice ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	剂量 Dose mg/kg	鼠重 Body wight (g)	瘤体积 Tumor volume (mm ³)	瘤重 Tumor weight g	抑制率 Inhibition rate %
对照 Control		17.83 ± 0.82	129.59 ± 91.14	0.119 ± 0.594	
姜黄素 Cur	50	17.00 ± 1.51	102.39 ± 62.09 ^a	0.079 ± 0.057	0.333
姜黄素 Cur	100	16.82 ± 1.60	74.68 ± 34.40 ^{ab}	0.071 ± 0.033	0.401
姜黄素 Cur	200	16.20 ± 1.62	67.73 ± 27.69 ^{ab}	0.066 ± 0.048	0.443
顺铂 Cisplatin	3	15.61 ± 1.26 ^a	65.19 ± 21.72 ^{ab}	0.054 ± 0.023 ^a	0.543

与对照组比较^a $P < 0.05$, 与姜黄素低剂量组比较^b $P < 0.05$

Note. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$. Compared with the curcumin low dose group, ^b $P < 0.05$.

体重与对照组及之前相比,并无明显变化($P > 0.05$)。

2.3 各处理组裸鼠肿瘤体积变化

接种瘤细胞后各组肿瘤体积均逐渐增大,对照组肿瘤体积增长较快,各治疗组移植瘤体积均小于对照组,且差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。随着姜黄素治疗剂量的增高,移植瘤体积减缓。姜黄素低剂量组肿瘤体积与顺铂组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。姜黄素中、高剂量组与顺铂比较无统计学意义。(表 1,图 1)。

2.4 各处理组裸鼠肿瘤生长抑制率和瘤重的比较

顺铂组肿瘤生长抑制率为 54.3%,姜黄素低、中、高剂量组抑制裸鼠 CaSki 皮下移植瘤的抑制率分别为 33.3%、40.1%、44.3%,见表 1。在治疗终点,各治疗组移植瘤质量比对照组均有降低,顺铂组与对照组相比具有统计学意义($P < 0.05$),而姜黄素组与对照组比较则差异无统计学意义($P > 0.05$)。姜黄素各处理组瘤重与对照组比较差异无统计学意义,顺铂组瘤重与对照组比较具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 裸鼠移植瘤组织的病理学观察

各组肿瘤细胞呈漩涡状、簇团状生长,被增生的纤维组织间隔,肿瘤细胞呈圆形或卵圆形,核大,核仁清晰,部分肿瘤细胞胞浆可见空泡,瘤团间可见坏死灶形成。随姜黄素治疗剂量的增高,瘤组织的坏死区域逐渐增大(图 2,见文后彩插 1)。

3 讨论

姜黄素(curcumin)是从姜科植物姜黄根茎中提取的一种酚性色素,具有抗炎、抗氧化、抗动脉硬化、预防血栓和抗肿瘤的多种生物学效应^[1-3]。美国国立癌症研究所已经用姜黄素进行 I 期临床试验^[4]。体外实验证实姜黄素对胃癌^[5]肺癌^[6]乳腺癌^[7]等多种肿瘤细胞具有抑制生长和诱导凋亡的

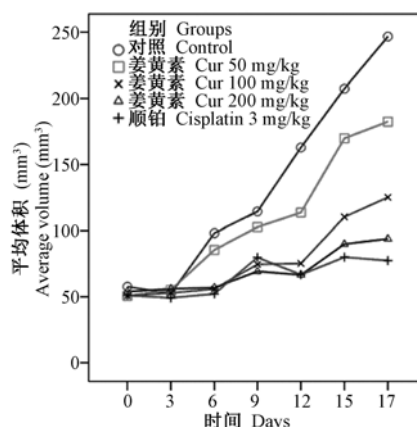


图 1 裸鼠宫颈癌的生长曲线($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Fig. 1 The growth curves of transplanted cervical tumor in the nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

作用。目前认为姜黄素能影响肿瘤发生发展的多个环节与步骤,抗肿瘤机制也是多方面的。

姜黄素可通过调控 Bcl-2 基因家族及激活 p53 蛋白等方式,抑制肿瘤细胞生长并诱导肿瘤细胞凋亡;姜黄素还可通过抑制 NF-KB 活化、抑制 STATs 通路、抑制 MAPK 通路等不同的方式诱导肿瘤细胞周期阻滞;徐唠等^[8]研究表明姜黄素能抑制人宫颈癌 CaSki 细胞生长,降低 CaSki 细胞侵袭和迁移能力,其机制与降低 MMP-2, MTL-MMP and NF-KB 的表达有关。

以上均为姜黄素体外实验研究,而姜黄素体内实验国内外研究报道较少。通过对人类非小细胞肺癌动物研究,发现姜黄素降低了原位人类非小细胞肺癌裸鼠肿瘤的生长,增加了无胸腺小鼠的生存期,实验发现其机制与姜黄素抑制 COX-2, p65 的表达,降低 ERK1/2 的活性有关^[9]。

我们通过建立人宫颈癌 Caski 细胞裸小鼠移植瘤模型,研究不同剂量的姜黄素治疗肿瘤效果,实验中采用了 0.5% 羧甲基纤维素钠作为阴性对照,以细胞毒药物顺铂为阳性对照,对不同浓度姜黄素

治疗疗效进行观察评估。

通过对各处理组生长曲线和与阴性对照组比较,以及处理后平均瘤重比较,结果显示姜黄素对宫颈癌荷瘤裸鼠移植瘤生长有抑制作用。高、中、低浓度组的姜黄素的肿瘤抑制率分别为 44.3%、40.1% 和 33.3%,用药的效果呈剂量依赖性,随姜黄素剂量的增加,抑瘤效果增强(表 1)。用药期间荷瘤鼠没有进食减少、行动迟缓、消瘦,体表温度下降等副反应,说明姜黄素安全性高、无毒副作用。并且 HE 染色病理检查发现(图 2),随姜黄素治疗剂量的加大,瘤团间可见坏死灶的比例增大,与对照组比较具有统计学意义;这说明姜黄素通过破坏移植瘤周围的血管上皮组织,导致血栓的形成,阻断移植瘤的血液营养供应,最终导致肿瘤的出血性坏死、消退或消失。Yoysungnoen-Chintana P 等^[10]研究发现高剂量姜黄素具有抑制宫颈癌 CaSki 细胞裸鼠肿瘤的生长和血管生成的作用,其机制是通过下调 CaSki 细胞裸鼠移植瘤血管内皮生长因子、COX-2 和 EGFR 的表达,并认为姜黄素对宫颈癌具有治疗作用。

本研究结果显示,姜黄素对宫颈癌裸鼠移植瘤的生长具有抑制作用。为姜黄素成为新型抗肿瘤药及临床治疗宫颈癌提供了理论依据,姜黄素抑制肿瘤生长、转移的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Siddiqui AM, Cui XX, Wu RQ, et al. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated

by upregulation of peroxisome proliferators-activated receptor- γ [J]. Crit Care Med, 2006, 34(7): 1874-1882.

- [2] Shao ZM, Shen ZZ, Liu CH, et al. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells [J]. Int J Cancer, 2002, 98(2): 234-240.
- [3] Zhao J, Zhao Y, Zheng W, et al. Neuroprotective effect of curcumin on transient focal cerebral ischemia in rats [J]. Brain Res, 2008, 1229(7): 224-232.
- [4] Odot J, Albert P, Carlier A, et al. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells [J]. Int J Cancer, 2004, 111(3): 381-387.
- [5] 樊华, 俞军. 姜黄素对人胃癌细胞株 BGC-823 生长抑制及诱导凋亡的作用 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(5): 408-411.
- [6] 何秋霞, 侯海荣, 袁延强, 等. 姜黄素对肺腺癌 A549 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10): 2130-2132.
- [7] Choudhuri T, Pal S, Aggarwal ML, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction [J]. FEBS Lett, 2002, 512: 334-340.
- [8] 徐喏, 牟晓玲, 赵敬. 姜黄素对人宫颈癌细胞 Caski 侵袭转移的影响 [J]. 中山大学学报(医学科学版). 2009, 30(1): 92-95.
- [9] Lev-Ari S, Starr A, Katzburg S. Curcumin induces apoptosis and inhibits growth of orthotopic human non-small cell lung cancer xenografts [J]. J Nutr Biochem. 2014, 25(8): 843-850.
- [10] Yoysungnoen-Chintana P, Bhattarakosol P, Patumraj S. Antitumor and antiangiogenic activities of curcumin in cervical cancer xenografts in nude mice [J]. Biomed Res Int. doi: 10.1155/2014/817972. Epub 2014 Apr 16.

[修回日期]2014-11-04