姜黄素对宫颈癌小鼠的抗肿瘤活性及免疫功能的影响

陈祥艳[1]，孙云[1]，陈舒[1]，林超[1]，陈聪[2*](1.温州市中医院妇科，浙江 温州 325200；2.温州市人民医院，浙江 温州 325200)

摘要：目的 探讨姜黄素对宫颈癌小鼠的抗肿瘤活性及免疫功能的影响。**方法** 采用腹腔及前肢腋下接种 U14 细胞建立宫颈癌小鼠模型，随机分为模型组、姜黄素组和阳性对照组，每组 10 只。模型组给予 0.9% NaCl 0.2 mL，姜黄素组给予 100 mg·mL^{-1} 的姜黄素 0.2 mL，连续灌胃 14 d，阳性对照组给予顺铂 3 mg·kg^{-1}·d^{-1}，每隔 3 d 腹腔注射 1 次，共 5 次。比较各组移植瘤形态，检测各组肿瘤体积和重量并计算抑瘤率，ELISA 法检测血清中白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子(TNF-α)、干扰素-γ(IFN-γ)、骨桥蛋白(OPN)、癌胚抗原(CEA)和鳞状细胞癌抗原(SCC-Ag)水平，流式细胞仪检测 CD3$^+$、CD4$^+$、CD8$^+$细胞及 NKT 细胞含量。**结果** 模型组肿瘤细胞核大、深染，核质增加，核分裂多，姜黄素组和阳性对照组肿瘤细胞明显皱缩，核固缩或碎裂，病理性核分裂减少。姜黄素组和阳性对照组肿瘤体积、质量、IL-2、TNF-α、IFN-γ、OPN、CEA、SCC-Ag、CD8$^+$水平显著低于模型组，而抑瘤率、CD3$^+$、CD4$^+$和 NKT 细胞含量显著高于模型组，差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论** 姜黄素可抑制宫颈癌小鼠的抗肿瘤活性，其机制可能为增强免疫功能，降低炎症因子和肿瘤标志物水平。

关键词：姜黄素；宫颈癌；抗肿瘤活性；免疫功能

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2019)15-1861-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.002

引用本文：陈祥艳, 孙云, 陈舒, 等. 姜黄素对宫颈癌小鼠的抗肿瘤活性及免疫功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1861-1864.

Effect of Curcumin on Anti-tumor Activity and Immune Function in Cervical Cancer Mice

CHEN Xiangyan[1], SUN Yun[1], CHEN Shu[1], LIN Chao[1], CHEN Cong[2*](*1.Department of Gynaecology, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou 325200, China; 2.Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325200, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of curcumin on anti-tumor activity and immune function in cervical cancer mice. **METHODS** Cervical cancer mice model were established by U14 cells inoculated into abdominal cavity and forelimb axillary. The model mice were randomly divided into model group, curcumin group and positive control group, with 10 mice in each group. The model group was given 0.2 mL 0.9% NaCl, the curcumin group was given 100 mg·mL^{-1} curcumin, continuous intragastric administration for 14 d, and the positive control group was given 0.2 mL 3 mg·kg^{-1}·d^{-1} cisplatin, once every 3 d, for five times. The morphology of transplanted tumor was compared. The tumor volume and weight were measured and the tumor inhibition rate was calculated. The serum levels of IL-2, TNF-α, IFN-γ, OPN, CEA and SCC-Ag were detected by ELISA. The content of CD3$^+$, CD4$^+$, CD8$^+$ and NKT cells were detected by flow cytometry. **RESULTS** In the model group, the nuclei were large and hyperchromatic, nucleoplasm increased, and mitosis multiple division. In curcumin group and positive control group, cancer shrunk, nuclei coagulated or fragmented, and pathological mitosis reduced. The levels of tumor volume, weight, IL-2, TNF-α, IFN-γ, OPN, CEA, SCC-Ag and CD8$^+$ in curcumin group and positive control group were significantly lower than the model group, and the tumor inhibition rate, CD3$^+$, CD4$^+$ and NKT cell content were significantly higher than the model group, the differences were statistically significant (P<0.05). **CONCLUSION** Curcumin can inhibit the anti-tumor activity of cervical cancer mice, the mechanism may be related to the reduction of inflammatory factors and tumor markers by enhancing immune function.

KEYWORDS: curcumin; cervical cancer; anti-tumor activity; immune function

宫颈癌是仅次于乳腺癌的女性恶性肿瘤，其发病率逐渐升高，严重影响女性的工作和生活，目前化疗是其治疗的主要手段，但对于中晚期及复发转移患者疗效较差，且易产生骨髓抑制、神经损伤等严重不良反应[1-2]。中药防治肿瘤具有不良反应小、成本低等特点。姜黄素为从姜科及天南星科中药提取的天然酚类化合物，现代研究证实其具有抗炎、抗氧化、免疫调节等多种生物学功能，对乳腺癌、肝癌、肺癌等多种肿瘤细胞的启动、发生和发展均有良好的抑制作用[3-4]。姜黄

基金项目：浙江省中医药科技计划项目(2015ZA199)

作者简介：陈祥艳，女，硕士，主治医师　Tel: (0577)88078234　E-mail: cjcj9898@126.com　*__通信作者：__陈聪，女，硕士，副主任医师　Tel: (0577)88078234　E-mail: 123883159@163.com

素对宫颈癌免疫功能的影响尚无相关研究报道。本实验旨在通过研究姜黄素对宫颈癌 U14 模型小鼠的抑瘤率、炎症因子、肿瘤标注物及免疫性 T 细胞亚群的影响，探讨姜黄素对宫颈癌小鼠的抗肿瘤活性和免疫功能的影响。

1 材料

1.1 动物

健康清洁级 6~8 周龄昆明小鼠，♀♂各半，体质量(18±2)g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，实验动物许可证号：SCXK(京)2017-0011。

1.2 药品与试剂

姜黄素(美国 Sigma 公司，批号：c1386-5g)；注射用盐酸顺铂[每支 20 mg，齐鲁制药(海南)有限公司]；HE 染色试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司，批号：20180317)；小鼠宫颈癌 U14 细胞(北京协和医科大学细胞库)；白细胞介素-2(IL-2，批号：5120605)、肿瘤坏死因子(TNF-α，批号：170508)和干扰素-γ(IFN-γ，批号：110423)检测试剂盒均购自上海生工技术有限公司；骨桥蛋白(osteopontin，OPN，批号：20170412)、癌胚抗原(CEA，批号：2017114)和鳞状细胞癌抗原(SCC-Ag，批号：E0938)试剂盒均购自南京建成生物科技公司；小鼠淋巴细胞分离液(深圳达科为生物技术公司)；FITC 试剂盒(杭州联科生物技术公司，批号：080314)。

1.3 仪器

NI500 显微镜(日本尼康公司)；13R 离心机[力康集团力新仪器(上海)有限公司]；7600 全自动生化分析仪(日本日立公司公司)；Biotek aQuant 型酶标仪(上海坤肯生物化工有限公司)；FAC Scalibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

2 方法

2.1 模型制备与分组

30 只昆明小鼠适应性饲养 5 d 后，按文献[5]的方法，将 0.2 mL 小鼠宫颈癌 U14 细胞悬液(1×10^7)注射至小鼠右侧背部皮下，建立宫颈癌 U14 模型小鼠，于接种 24 h 后，随机分为模型组、姜黄素组和阳性对照组，每组 10 只。

2.2 给药方法

于接种 7 d 后，模型组给予 0.9% NaCl 0.2 mL，姜黄素组给予 100 $mg\cdot mL^{-1}$ 姜黄素 0.2 mL，连续灌胃 14 d，阳性对照组给予顺铂 3 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，每隔 3 d 腹腔注射 1 次，共 5 次。

2.3 肿瘤体积和质量

末次给药 24 h 后，颈椎脱臼法方式处死各组小鼠，剥离肿瘤组织，测量肿瘤最长径(a)和最短径(b)，肿瘤称重，计算肿瘤体积和抑瘤率。体积=$(a\times b^2)/2$，抑瘤率=(1–治疗组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%。

2.4 HE 染色

取肿瘤组织，固定 24 h 后，经酒精脱水和二甲苯透明后，石蜡包埋，切片，切片间距 5 mm，苏木素-伊红染色，树胶封片后，光学显微镜观察结构。

2.5 炎症因子检测

末次给药 24 h 后，颈椎脱臼处死前，摘眼球方式取血，置 1.5 mL 抗凝离心管中 3 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min，离心半径为 10.5 cm，吸取上清液，采用 ELISA 法检测血清中 IL-2、TNF-α 和 IFN-γ 水平，按试剂盒说明书操作。

2.6 肿瘤标志物检测

取血清，采用 ELISA 法检测血清 OPN、CEA 和 SCC-Ag 水平，按试剂盒说明书操作。

2.7 免疫性 T 细胞亚群检测

取各组小鼠血液至流式管中，分别加入 10 μL $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$和 NKT 单抗和 50 μL EDTA 抗凝血，混合均匀，避光孵育 20 min，每管加入 2 mL 溶血素，避光孵育 20 min，2 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min，离心半径为 10.5 cm，弃去上清，每管加 2 mL PBS 混匀，离心弃去上清，重复洗涤 2 次，弃上清，加 2 mL PBS 重悬混匀后流式分析外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$和 NKT 细胞。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 进行统计数据分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多个样本均数的比较采用单因素方差分析，两两比较用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠肿瘤组织病理形态学比较

模型组肿瘤细胞核大、深染，核质增加(箭头标识)，核分裂多，说明模型造模成功；姜黄素组和阳性对照组癌细胞明显皱缩(箭头标识)，核固缩或碎裂，病理性核分裂减少，说明姜黄素可有效干预宫颈癌 U14 模型小鼠，但姜黄素与顺铂对肿瘤组织病理形态无明显不同。结果见图 1。

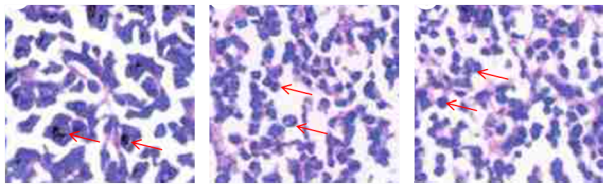

图 1 各组小鼠宫颈癌移植瘤组织病理形态(HE，200×)

Fig. 1 Pathology morphology of cervical cancer xenografts in each group of mice(HE, 200×)

3.2 各组小鼠肿瘤体积、质量和抑瘤率的比较

与模型组比较，姜黄素组和阳性对照组肿瘤体积、质量显著降低，抑瘤率显著增加，差异有统计学意义(P<0.05)。而姜黄素组和阳性对照组体积、质量和抑瘤率比较，差异无统计学意义。结果见表 1。

表 1 各组小鼠肿瘤体积、质量和抑瘤率比较($\bar{x}\pm s$, n=10)

Tab. 1 Comparison of tumor volume, weight and tumor inhibition rate in each group of mice($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	肿瘤体积/mm^3	瘤重/g	抑瘤率/%
模型组	107.12±31.04	0.17±0.09	0.00±0.00
姜黄素组	53.26±10.37[1)]	0.08±0.06[1)]	51.37±5.29[1)]
阳性对照组	50.61±9.43[1)]	0.07±0.08[1)]	49.86±4.85[1)]

注：与模型组比较，[1)]P<0.05。

Note: Compared with model group, [1)]P<0.05.

3.3 各组小鼠炎症因子水平的比较

姜黄素组和阳性对照组 IL-2、TNF-α 和 IFN-γ 水平显著低于模型组，差异有统计学意义(P<0.05)。而姜黄素组和阳性对照组 IL-2、TNF-α 和 IFN-γ 水平比较，差异无统计学意义。结果见表 2。

表 2 各组小鼠白 IL-2、TNF-α 和 IFN-γ 水平比较($\bar{x}\pm s$, n=10)

Tab. 2 Comparison of IL-2, TNF-α and IFN-γ in each group of mice ($\bar{x}\pm s$, n=10) pg·mL^{-1}

组别	IL-2	TNF-α	IFN-γ
模型组	86.23±7.69	67.31±7.12	17.08±3.61
姜黄素组	43.12±6.53[1)]	36.27±5.48[1)]	8.64±2.55[1)]
阳性对照组	39.86±7.32[1)]	33.63±6.05[1)]	7.97±2.83[1)]

注：与模型组比较，[1)]P<0.05。

Note: Compared with model group, [1)]P<0.05.

3.4 各组肿瘤标志物比较

姜黄素组和阳性对照组的 OPN、CEA 和 SCC-Ag 水平显著低于模型组，差异有统计学意义(P<0.05)。而姜黄素组和阳性对照组 OPN、CEA 和 SCC-Ag 水平比较，差异无统计学意义。结果见表 3。

表 3 各组小鼠 OPN、CEA 和 SCC-Ag 水平比较($\bar{x}\pm s$, n=10)

Tab. 3 Comparison of OPN, CEA and SCC-Ag in each group of mice ($\bar{x}\pm s$, n=10) ng·mL^{-1}

组别	OPN	CEA	SCC-Ag
模型组	18.19±2.49	1.24±0.24	1.77±0.35
姜黄素组	10.64±1.57[1)]	0.81±0.21[1)]	0.51±0.17[1)]
阳性对照组	9.89±1.74[1)]	0.82±0.26[1)]	0.49±0.22[1)]

注：与模型组比较，[1)]P<0.05。

Note: Compared with model group, [1)]P<0.05.

3.5 免疫性 T 细胞亚群的比较

姜黄素组和阳性对照组 CD3$^+$、CD4$^+$和 NKT 细胞含量显著高于模型组，而 CD8$^+$细胞含量显著低于模型组，差异有统计学意义(P<0.05)。但姜黄素组和阳性对照组 CD3$^+$、CD4$^+$、CD8$^+$细胞及 NKT 细胞含量比较，差异无统计学意义。结果见表 4。

表 4 各组小鼠 CD3$^+$、CD4$^+$、CD8$^+$细胞及 NKT 细胞含量的比较($\bar{x}\pm s$, n=10)

Tab. 4 Comparison the contents of CD3, CD4$^+$, CD8$^+$ cell and NKT cell in each group of mice($\bar{x}\pm s$, n=10) %

组别	CD3$^+$	CD4$^+$	CD8$^+$	NKT
模型组	47.26±9.57	26.23±4.15	36.12±4.51	5.34±0.97
姜黄素组	52.12±10.67[1)]	31.04±5.27[1)]	31.86±5.42[1)]	6.17±1.13[1)]
阳性对照组	51.45±10.02[1)]	30.56±4.89[1)]	30.27±5.05[1)]	6.25±1.35[1)]

注：与模型组比较，[1)]P<0.05。

Note: Compared with model group, [1)]P<0.05.

4 讨论

宫颈癌是发病率高、致死率高的妇科恶性肿瘤，发病率仅次于乳腺癌，目前宫颈癌的诊断已基本完善，但其治疗仍是该病的难点[6]。中医药治疗肿瘤有独特优势，可提高肿瘤患者的免疫机能。蒋晓芳等研究发现[7]，复方苦参注射液联合放化疗治疗宫颈癌可减少不良反应，增强患者细胞免疫功能，从而提高临床疗效及患者生活质量。姜黄素为多酚类化合物，近年来在肿瘤方面具有较多的研究[8]，李季等[9]发现，姜黄素可促进肿瘤细胞凋亡，减少肿瘤微血管形成，具有显著的抗肿瘤作用。江红等研究发现[10]，姜黄素能够抑制宫颈癌皮下移植瘤模型中外周血和肿瘤组织中 MMP2、MMP9 和 VEGF 的表达。但目前尚缺乏姜黄素对宫颈癌小鼠抗肿瘤活性及免疫功能的研究，对炎症因子、肿瘤标注物及免疫性 T 细胞亚群的影响尚未见报道。

本研究发现，姜黄素可减少肿瘤体积、质量，增加抑瘤率，改善宫颈癌移植瘤组织形态，降低

IL-2、TNF-α、IFN-γ、OPN、CEA、SCC-Ag 水平和 $CD8^+$细胞含量，升高 $CD3^+$、$CD4^+$和 NKT 细胞含量。说明姜黄素可抑制宫颈癌小鼠抗肿瘤活性，降低炎症因子和肿瘤标志物水平，增强免疫功能。宫颈癌小鼠局部免疫失衡是致癌的关键，免疫因子水平的高低与 TNF-α 等炎性因子密切相关，T 细胞是细胞免疫的主要效应细胞，T 细胞亚群比例失调，可导致 CEA、SCC-Ag 等肿瘤标注物水平显著升高[11-12]。姜黄素可通过调控癌基因、抑癌基因、凋亡基因及其蛋白的表达、诱导细胞周期停滞和调控细胞凋亡信号等途径抑制肿瘤细胞生长与转移[13]。刘冬菊等研究发现[14]，姜黄素可能是通过降低人宫颈癌 Caski 细胞裸鼠移植瘤中 MIF、VEGF-C 的表达发挥抗宫颈癌淋巴转移作用。胡金杰发现姜黄素可改善乙肝大鼠的肝功能损伤及肝纤维化过程，持续降低 TGF-β1、TNF-α 水平[15]。与本研究发现的姜黄素通过改善免疫功能、降低炎症反应，均说明姜黄素对宫颈癌具有良好的抗肿瘤活性。综上所述，姜黄素可通过增强免疫功能，从而降低炎症因子和肿瘤标志物水平，发挥对宫颈癌小鼠抗肿瘤活性。

REFERENCES

[1] 黄大丽. 青年与中老年宫颈癌患者临床特征及其宫颈癌病理特征的比较研究[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(6): 134-135.

[2] 王玲, 张建果, 陈兵, 等. 黄芪联合丹参注射液促进异环磷酰胺治疗老年宫颈癌患者增效减毒的机制[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(5): 1162-1164.

[3] 葛佳威, 程正健. 不同剂量姜黄素对宫颈癌裸鼠移植瘤生长及瘤组织 MIF、VEGF 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(7): 1738-1740.

[4] LIU D J, ZHAO Q S, YAO Y, et al. Effects of curcumin combined with cisplatin on growth and lymphatic metastasis of cervical cancer xeno-grafts in nude mice [J]. J Int Oncol(国际肿瘤学杂志), 2016, 43(4): 241-245.

[5] 尹兴忠, 赵冬梅, 刘蕾, 等. 肉桂醛对小鼠 U14 宫颈癌组织中 PI3K 表达的影响[J]. 中成药, 2017, 39(1): 188-191.

[6] LIAN X Y, ZHENG X Y, HAO Y T, et al. Expression of connective tissue growth factor in cervical cancer tissues and its correlative factors [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2017, 33(17): 1641-1643.

[7] JIANG X F, LIN S, LU H C, et al. Analysis of effects of radiochemotherapy combined with compound sophora injection on cellular immunity in patients with cervical cancer [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2016, 36(2): 119-121.

[8] REN Y, GAO H J, GAO H G, et al. Effects of curcumin on cervical cancer Hela cell apoptosis and expression of SPLUNC1 protein [J]. Chin J Clin Res(中国临床研究), 2017, 30(1): 11-14.

[9] LI J, ZOU B F, WANG Y H, et al. Effects of curcumin on ephrinA1, Bcl-2, ephA2 and Bcl-xL in patients with advaned cervical cancer [J]. Progr Mod Biomed(现代生物医学进展), 2016, 16(7): 1314-1317.

[10] JIANG H, MAO X G. Effects on expression of blood and tumor tissue MMP2, MMP9, VEGF in mouse cervical carcinoma xenograft model [J]. J Clin Exp Med(临床和实验医学杂志), 2016, 15(9): 832-835.

[11] LV H L, CHRN J. Levels of serum cytokines and cellular immunity in patients with cervical cancer and the interrelationship [J]. Maternal Child Health Care China(中国妇幼保健), 2015, 30(18): 2915-2917.

[12] LI H S, WANG J H, TIAN J, et al. Effects of paclitaxel plus carboplatin chemotherapy on immune function and serum levels of SCC-Ag and TSGF in patients with advanced cervical cancer [J]. Pract J Cancer(实用癌症杂志), 2018, 33(4): 556-560.

[13] HE S, WU Y P, CAI X Y, et al. Study on the effect of curcumin on growth and proliferation of heLa cell [J]. Progr Mod Biomed(现代生物医学进展), 2017, 17(1): 7-10, 19.

[14] LIU D J, YAO Y. Effects of curcumin on the expressions of MIF and VEGF-C in the human cervical cancer caski cells xenografts in nude mice [J]. J Basic Clin Oncol(肿瘤基础与临床), 2016, 29(1): 10-14.

[15] 胡金杰, 王文生, 陶然, 等. 姜黄素对乙型病毒性肝炎模型大鼠转化生长因子-β1、肿瘤坏死因子-α 表达水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(17): 4247-4249.

收稿日期：2018-10-25

(本文责编：蔡珊珊)