论著

文章编号:1000-5404(2007)24-2350-04

# 姜黄素对膀胱癌细胞增殖及凋亡的影响

杨家荣,陈 磊,杨 慧,潘铁军 (广州军区武汉总医院泌尿外科,武汉 430070)

**提 要: 目的** 探讨中药姜黄素对膀胱癌细胞(T24)增殖及凋亡的影响及可能机制。**方法** 以培养的T24细胞为研究对象,姜黄素组加入终浓度为1、10、100 μmol/L的姜黄素,对照组不加姜黄素,12、24、48 h后观察T24细胞的形态变化,分别用MTT法、TUNEL染色、RT-PCR、免疫印迹及图像分析技术检测各组细胞生长、凋亡发生、AKT1蛋白及转录水平、caspase 3蛋白含量的变化。**结果** 姜黄素组T24细胞生长抑制率显著上升,细胞凋亡发生显著升高,AKT1蛋白活性水平降低,转录水平无显著变化,caspase 3蛋白含量显著升高。**结论** 姜黄素能抑制T24细胞的生长并促进其凋亡,其发生与其抑制T24细胞PKB/AKT信号通路有关。

**关键词**: 姜黄素;膀胱癌;蛋白激酶B

**中图法分类号**: R285.5;R329.28;R737.14 **文献标识码**: A

# Curcumin inhibits proliferation of cell strain of bladder carcinoma and induces its apoptosis

YANG Jia-rong, CHEN Lei, YANG Hui, PAN Tie-jun (Department of Urinary Surgery, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 400070, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect and possible mechanism of curcumin on the proliferation and apoptosis of cell strain of bladder carcinoma. **Methods** In curcumin group, T24 cells were treated with curcumin of 1, 10, 100 μmol/L respectively, while no curcumin treatment in control group. The growth, apoptosis, AKT1 protein activity and mRNA level, caspase 3 content of T24 cells were observed by MTT, TUNEL, RT-PCR, immunoblot and image analysis technology 12, 24 and 48 h after the commencement of curcumin treatment. **Results** In the curcumin group, the inhibition rate, apoptosis and the content of caspase 3 of T24 cells increased significantly. The activity of AKT1 protein decreased, but the mRNA level of AKT1 showed no changes. **Conclusion** Curcumin can inhibit the growth of T24 cells and induce the cell apoptosis, which mechanism is related to the inhibition of AKT1 signal pathway of T24 cells.

**Key words**: curcumin; bladder carcinoma; protein kinase B

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,无论是早期的手术,还是随后的放疗和化疗对身体的伤害都较大,患者生存率低,对其发生机制研究及治疗新药物的发现是解决膀胱癌临床治疗的根本途径。随着生物技术的发展,从分子水平上入手,解决膀胱癌的发生发展也有了实现的可能[1,2]。姜黄素(curcumin)是姜科植物姜黄的主要成分,有研究报道,姜黄素具有抗氧化、抗炎、降血脂、抗病毒、抗凝等广泛作用[3,4]。本研究通过观察姜黄素对体外培养膀胱癌T24细胞株AKT蛋白及转录水平及其底物caspase 3的变化影响,探讨姜黄素在T24细胞增殖和凋亡中对信号通路的影响机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

T24细胞株购自上海细胞生物研究所,姜黄素和MTT购自美国Sigma公司,RPMI1640培养基、小牛血清购自HyClone公司,p-AKT1(Ser473,代表AKT1活性)及caspase 3兔抗人多克隆抗体购自Santa Cruz公司,其他常用试剂为国产分析纯。

### 1.2 细胞培养

T24细胞使用的是含10%小牛血清、100 U/ml青霉素及100 μg/ml链霉素的RPMI1640培养基,在5% $CO_2$、饱和湿度、37 ℃孵箱中培养,每2天传代1次,取对数生长期细胞用于实验。

### 1.3 实验分组及处理

分为对照组和姜黄素组,姜黄素组按姜黄素浓度分3组,即1、10、100 μmol/L组,每个浓度组加入的姜黄素终浓度分别

作者简介:杨家荣(1971-),男,辽宁省营口市人,硕士研究生,主治医师,主要从事膀胱癌的防治及机制方面的研究。电话:13507153055,E-mail: devil0012005@hotmail.com

收稿日期:2007-01-11;修回日期:2007-04-29

为 1、10、100 μmol/L，分别处理 12、24、48 h 后进行相应检测。

### 1.4　指标检测

1.4.1　MTT 法检测细胞生长抑制率　取对数期生长细胞，调整细胞数至 $1\times10^5$ ml$^{-1}$，接种于 96 孔培养板中，每孔 100 μl，加入不同浓度药物，每孔 20 μl，重复 6 孔，分别培养 12、24、48 h 后，弃上清。每孔加入 MTT(10 mg/ml)10 μl，培养 4 h，弃去培养液，每孔加入二甲基亚砜 150 μl，振荡 10 min，酶标仪测 490 nm 处吸光度值[$D$(490)]，计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%) = [1 − $D$(490)$_{姜黄素组}$]/$D$(490)$_{对照组}$ × 100%

1.4.2　TUNEL 染色及凋亡率测定　应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷缺口末端标记(TUNEL)检测术，在不同的时相点收集细胞爬片，用 PBS 洗 3 次，蒸馏水洗 2 次，4% 多聚甲醛室温固定 30 min，PBS 冲洗，然后按 TUNEL 试剂盒说明进行操作。DAB 显色后，细胞核染成棕黄色者为阳性细胞，即凋亡细胞。高倍视野(400 倍)下记总细胞数和阳性细胞数，计算凋亡百分率。

1.4.3　免疫印迹法测定 p-AKT1 及 caspase 3 蛋白水平　收集各组细胞后用裂解液裂解细胞，提取总蛋白，紫外分光光度计进行蛋白定量，以 1∶1体积比与上样缓冲液混合，取 20 μl 上样。浓缩胶电泳电压为 80 V，分离胶为 130 V，电泳 4 h 后 PVDF 膜转印，15 V 常温作用 20 min。PVDF 膜用 5% 牛血清白蛋白 PBS 液封闭 1 h，然后加入 p-AKT1 抗体(抗体稀释度 1∶500)或 caspase 抗体(抗体稀释度 1∶500)4 ℃过夜，TBS 洗膜 10 min ×4 次，HRP 标记山羊抗兔 IgG(抗体稀释度 1∶5 000)室温反应 1 h，超敏化学发光法显色，凝胶分析系统分析记录条带光密度。图像分析系统分析，以相应蛋白条带的积分光密度值表示检测蛋白相对强度。

1.4.4　逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 AKT1 mRNA 表达　用 Trizol 提取 T24 细胞总 RNA，用紫外分光光度计测总 RNA 纯度和含量，选取 β-actin 为内参，AKT1 扩增上游引物：5′-ACCGCAACAACGCCATCT-3′；下游引物：5′-TGCAGGAGCGCACAATCA-3′。逆转录条件：42 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min，4 ℃ holding。PCR 反应条件：94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，62 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，共进行 30 个循环；72 ℃ 5 min，4 ℃ holding。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶分析系统记录分析。以 β-actin 为内参照，结果以 AKT1/β-actin 密度比值表示。

### 1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

## 2　结果

### 2.1　人膀胱癌 T24 细胞生长状况

姜黄素组细胞经处理后，可见部分贴壁细胞脱落，悬浮于培养液中，细胞体积变小，伴核固缩，尤以 100 μmol/L 姜黄素处理 48 h 最显著，对照组细胞成片生长，饱满舒展，贴壁良好，少有脱落。

### 2.2　MTT 实验结果

姜黄素组细胞抑制率随着姜黄素浓度的增加和作用时间的延长而增加，呈明显的量效和时效关系。见表 1。

### 2.3　姜黄素对细胞凋亡的影响

姜黄素 100 μmol/L 组膀胱癌细胞凋亡率最高，明显高于对照组，且随着时间的延长，凋亡率逐渐增加。见表 2 和图 1、2。

**表 1　姜黄素组 MTT 法检测细胞生长抑制率结果($n$ = 6，%，$\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| 姜黄素 1 μmol/L 组 | 13.6 ± 1.6 | 21.7 ± 1.7 | 36.3 ± 2.1 |
| 姜黄素 10 μmol/L 组 | 25.7 ± 1.8$^{a}$ | 40.6 ± 2.4$^{a}$ | 51.2 ± 3.5$^{a}$ |
| 姜黄素 100 μmol/L 组 | 55.3 ± 3.8$^{ab}$ | 76.8 ± 3.7$^{ab}$ | 85.9 ± 5.6$^{ab}$ |

a：$P$ < 0.01，与姜黄素 1 μmol/L 组比较；b：$P$ < 0.01，与姜黄素 10 μmol/L 组比较

**表 2　细胞凋亡率统计结果(%，$\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 3.6 ± 1.2 | 4.3 ± 1.5 | 4.4 ± 1.3 |
| 姜黄素 1 μmol/L 组 | 20.3 ± 2.1$^{a}$ | 28.9 ± 3.1$^{a}$ | 35.5 ± 2.1$^{a}$ |
| 姜黄素 10 μmol/L 组 | 31.3 ± 2.6$^{ab}$ | 42.6 ± 3.8$^{ab}$ | 48.9 ± 3.1$^{ab}$ |
| 姜黄素 100 μmol/L 组 | 41.5 ± 3.4$^{ab}$ | 52.3 ± 3.6$^{ab}$ | 63.3 ± 3.7$^{ab}$ |

a：$P$ < 0.01，与对照组比较；b：$P$ < 0.01，与姜黄素 1 μmol/L 组比较

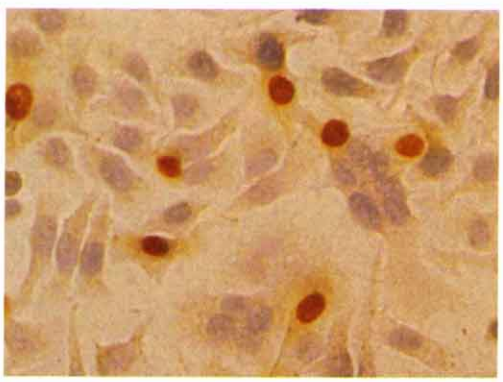


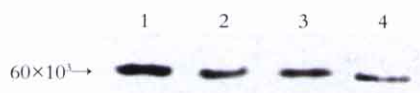
**图 1　姜黄素 10 μmol/L 组处理 12 h TUNEL 染色结果**　(×400)



**图 2　姜黄素 100 μmol/L 组处理 12 h TUNEL 染色结果**　(×400)

### 2.4　姜黄素对 p-AKT1 蛋白水平的影响

姜黄素各浓度组 p-AKT1 水平显著降低，且随着时间的延长，p-AKT1 水平逐渐降低，100 μmol/L 组 p-AKT1 水平最低，说明 AKT1 活性显著降低。见图 3 和表 3。




1：对照组；2：姜黄素 1 μmol/L 组；3：姜黄素 10 μmol/L 组；4：姜黄素 100 μmol/L 组

**图 3　姜黄素处理 12 h 后各组 p-AKT1 免疫印迹检测结果**

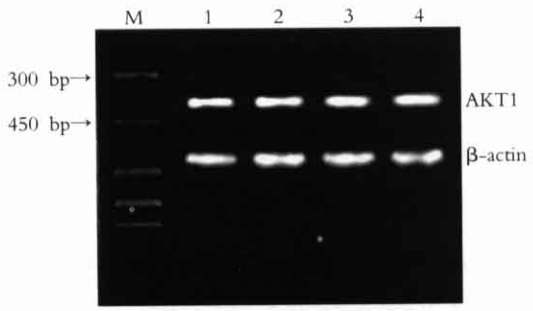
表3 各组 p-AKT1 水平统计结果(灰度值,$\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 123.6 ±11.3 | 136.9 ±10.1 | 145.1 ±12.6 |
| 姜黄素 1 μmol/L 组 | 81.3 ±5.8[a] | 71.4 ±6.3[a] | 67.5 ±5.9[a] |
| 姜黄素 10 μmol/L 组 | 69.3 ±4.7[ab] | 62.6 ±4.9[ab] | 51.2 ±4.8[ab] |
| 姜黄素 100 μmol/L 组 | 41.1 ±2.4[ab] | 32.5 ±2.1[ab] | 21.6 ±1.5[ab] |

a: $P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.01$,与姜黄素 1 μmol/L 组比较

## 2.5 姜黄素对 AKT1 mRNA 水平的影响

AKT1 mRNA 长为 370 bp,结果显示,姜黄素各浓度组 AKT1 mRNA 与对照组比较无显著变化($P>0.05$)。见图 4 和表4。




M: 标准; 1: 对照组; 2-4: 姜黄素 1、10、100 μmol/L 组

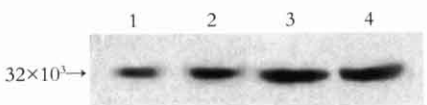
**图4 各组 12 h AKT1 mRNA 水平检测结果**

表4 各组 AKT1 mRNA/β-actin 值统计结果($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.702 ±0.031 | 0.725 ±0.039 | 0.691 ±0.034 |
| 姜黄素 1 μmol/L 组 | 0.723 ±0.036 | 0.736 ±0.034 | 0.699 ±0.032 |
| 姜黄素 10 μmol/L 组 | 0.753 ±0.039 | 0.728 ±0.032 | 0.719 ±0.033 |
| 姜黄素 100 μmol/L 组 | 0.708 ±0.041 | 0.751 ±0.038 | 0.726 ±0.044 |

## 2.6 姜黄素对 caspase 3 蛋白水平的影响

姜黄素各浓度组 caspase 3 蛋白水平显著升高,100 μmol/L 组 caspase 3 水平最高,且随着时间的延长,caspase 3 水平逐渐升高。见图 5 和表 5。




1: 对照组; 2-4: 姜黄素 1、10、100 μmol/L 组

**图5 各组 caspase 3 24 h 免疫印迹检测结果**

表5 各组 caspase 3 水平统计结果(灰度值,$\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 12 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 65.3 ±4.4 | 67.4 ±5.1 | 69.6 ±5.1 |
| 姜黄素 1 μmol/L 组 | 83.6 ±4.3[a] | 113.5 ±9.3[a] | 135.8 ±9.2[a] |
| 姜黄素 10 μmol/L 组 | 110.5 ±8.2[ab] | 140.7 ±8.1[ab] | 154.8 ±10.6[ab] |
| 姜黄素 100 μmol/L 组 | 135.6 ±9.7[ab] | 159.3 ±8.6[ab] | 169.3 ±9.7[ab] |

a: $P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.01$,与 1 μmol/L 组比较

## 3 讨论

姜黄素是一种具有广泛应用前景的新药。为了解姜黄素对膀胱癌 T24 细胞增殖和凋亡的作用及机制,本研究运用不同浓度姜黄素处理 T24 细胞,在不同时间观察姜黄素的作用,发现姜黄素组凋亡细胞显著增多,且呈量效关系。抗凋亡是肿瘤细胞发生机制的重要环节[5],姜黄素对 T24 细胞具有促凋亡作用,说明姜黄素具有抗肿瘤作用。

AKT,即蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。由于 AKT 催化区与 PKA 和 PKC 都有同源性,因此又被命名为 AC 相关的激酶(related to A and C kinase, RAC)[6,7]。研究已经证实,AKT 在肿瘤的发生发展中具有重要作用,在大多数肿瘤组织中,AKT 过度表达与肿瘤的形成有关,而且,AKT 还可诱导细胞周期的改变和发展[8]。多种致癌基因可通过激活 AKT 达到阻断生理性细胞凋亡的目的,从而使细胞失去正常增殖与分化的能力,导致癌变[9]。本研究结果显示,姜黄素能抑制膀胱癌细胞增殖并诱导其凋亡,Western blot 检测结果显示姜黄素作用后的 AKT 活性显著降低,提示姜黄素可能通过下调 AKT 活性而诱导细胞凋亡。

肿瘤发生发展是一个多因素综合作用的结果,其凋亡受多种相关基因调控,其中,caspase 家族是重要的 AKT 底物之一。caspase 3 在细胞凋亡中起极其重要的作用,它在 caspase 级联反应中属于终末因子,直接启动细胞凋亡,Fas 和 TNF-α 通过各自死亡结构域相关蛋白与 caspase 8 或 caspase 10 结合,活化 caspase 8 和 caspase 8 酶,启动级联反应,最后导致 caspase 3 活化,引起细胞凋亡[10,11]。本研究显示,姜黄素作用后癌细胞 caspase 3 表达显著增高,由此推断,促使 caspase 3 表达增高是姜黄素诱导 T24 细胞凋亡的主要机制之一。

对 AKT1 的 mRNA 水平检测结果表明,姜黄素各浓度组 AKT1 mRNA 与对照组比较无显著变化。说明 AKT1 的转录并没有受到影响,在此同样水平下,AKT1 的蛋白总表达量应不受影响,但是由于其活化机制受到限制,因此,p-AKT1 水平显著下降,使其活性的发挥受到了影响,导致其促增殖和抗凋亡功能的发挥受到了影响。有研究证实,AKT1 活化后可抑制 caspase 8 和 caspase 10 的激活,进而抑制 caspase 3 的活性,使细胞凋亡减少。姜黄素使 T24 细胞 AKT1 活性降低,导致其对 caspase 8 和 caspase 10 的抑制作用受到了限制,caspase 3 活性增强,使细胞凋亡增加。

总之,姜黄素能抑制膀胱癌细胞增殖并诱导其凋亡,可能与其抑制 AKT 活性、增强 caspase 3 活性有关。随着姜黄素作用机制的逐渐阐明,为其用于膀胱癌治疗提供新的途径。

**参考文献:**

[1] Cai T, Nesi G, Boddi V, *et al*. Prognostic role of the tumor-associated tissue inflammatory reaction in transitional bladder cell carcinoma[J].

Oncol Rep, 2006, 16(2): 329 - 334.
[2] Akdogan B, Dogan H S, Eskicorapci S Y, *et al*. Prognostic significance of bladder tumor history and tumor location in upper tract transitional cell carcinoma[J]. J Urol, 2006, 176(1): 48 - 52.
[3] Kaur G, Tirkey N, Bharrhan S, *et al*. Inhibition of oxidative stress and cytokine activity by curcumin in amelioration of endotoxin-induced experimental hepatoxicity in rodents[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 145(2): 313 - 321.
[4] Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Magalska A, *et al*. Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(4): 927 - 934.
[5] Garcia-Santos G, Antolin I, Herrera F, *et al*. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells[J]. J Pineal Res, 2006, 41(2): 130 - 135.
[6] Shi-Wen X, Chen Y, Denton C P, *et al*. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(6): 2707 - 2719.
[7] Sanchez-Martin L, Sanchez-Sanchez N, Gutierrez-Lopez M D, *et al*. Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/AKT-1 [J]. J Biol Chem, 2004, 279(16): 16194 - 16205.
[8] Georgakis G V, Li Y, Rassidakis G Z, *et al*. Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma[J]. Br J Haematol, 2006, 132(4): 503 - 511.
[9] Hara S, Oya M, Mizuno R, *et al*. AKT activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor[J]. Ann Oncol, 2005, 16(6): 928 - 933.
[10] Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, *et al*. Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin[J]. Int J Cancer, 2006, 118(4): 812 - 820.
[11] Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, *et al*. Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2005, 22(2): 137 - 147.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2007)24-2353-01

## 个案与短篇

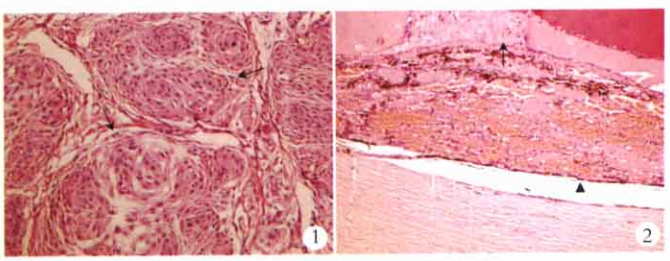
# 孤立性脉络膜血管瘤併蝶鞍嵴内侧脑膜瘤 1 例

刘少章，袁容娣，吴鸣宇 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科，重庆 400042）

眼球和颅内同时发生 2 个性质不同的肿瘤较少见，我院诊治 1 例孤立性脉络膜血管瘤併蝶鞍嵴内侧脑膜瘤，现报告如下。

## 1 临床资料

患者，男性，42 岁，因右眼视力下降 7 年，视力丧失 1 年余，眼红、胀痛 6 d，于 2006 年 5 月 9 日入院。7 年前右眼曾患“中心性浆液性脉络膜视网膜病变”，视力一直不佳。1 年前右眼失明，未行任何诊治；6 d 前突感右眼红、胀痛逐到我院就诊，门诊拟以“新生血管性青光眼”收入院。全身体检未见异常。眼部检查：视力：右眼无光感，左眼 0.6；右眼角膜水肿，周边前房消失，瞳孔直径 4 mm，不圆，虹膜上出现广泛新生血管，环状后黏连，晶状体密度增高，玻璃体混浊，眼底窥不清；左眼前、后节正常；眼压：右眼 50 mmHg，左眼 26 mmHg。诊断：右眼新生血管性青光眼。入院后予以降眼压治疗，行眼部 B 超检查。提示：①右眼玻璃体重度混浊（出血性）。②右眼球内占位病变待查。③视网膜脱离。为进一步了解眼球内占位病变及排出颅内情况，行头颅 MRI 检查，提示：①左侧蝶骨嵴内脑膜瘤。②右眼球内占位病变。患者于 5 月 11 日转到本院神经外科治疗，5 月 18 日在全麻下行左侧次冠状切口经左额下入路蝶骨嵴脑膜瘤切除术。病理诊断：脑膜瘤（蛛网膜上皮细胞型）（图 1）。5 月 26 日转入本院眼科行右眼球摘除术，病理诊断：①右眼后极部脉络膜海绵状血管瘤（图 2）。②新生血管性青光眼。③视网膜萎缩、脱离。④视神经萎缩。



瘤细胞呈巢状排列，细胞巢之间有结缔组织间隔，肿瘤细胞质丰富，细胞界限不清，呈合胞体状，核呈圆形或卵圆形（↑）

**图 1 脑膜瘤光学显微镜观察** （HE×200）

大量薄壁扩张血管衬以内皮细胞，间质少（▲），表面视网膜萎缩、脱离（↑）

**图 2 脉络膜海绵状血管瘤光学显微镜观察** （HE×200）

## 2 讨论

脉络膜血管瘤属先天性血管性错构瘤样病变，可孤立出现于眼底后极部，即孤立性脉络膜血管瘤，或弥漫浸入大部分脉络膜，成为 Sturge-weber 症的眼底表现。孤立性脉络膜血管瘤多见于中年人，单眼发生。病变多在眼底后极部，42% 部分或完全位于黄斑下[1]，视力减退或视物变形为常见就诊原因。邻

（下转 2356 页）

作者简介：刘少章（1954 - ），女，山东省郓城县人，主任医师，教授，主要从事眼战创伤方面的研究，发表论文 30 余篇。电话：（023）68757821，E-mail：sz_liu428@yahoo.com.cn

收稿日期：2007-07-10；修回日期：2007-08-26