基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0665-03

姜黄素对胶质瘤细胞 ATP 酶的影响

陈 松,程 远
(重庆医科大学附属第二医院神经外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨姜黄素(curcumin)对人脑胶质瘤 U-251 细胞 ATP 酶的影响及诱导胶质瘤细胞凋亡的机制。方法:分别用 20、40、80 和 100 μmol/L 姜黄素处理 U-251 细胞 24 h,用 MTT 法测定姜黄素对 U-251 细胞增殖的抑制作用;流式细胞仪检测细胞凋亡,比色法测定 ATP 酶活力。结果:姜黄素抑制 U251 细胞的增殖;诱导 U251 细胞凋亡;姜黄素明显使细胞质膜 ATP 酶活力明显降低。结论:姜黄素通过抑制细胞质膜 ATP 酶活性可诱导胶质瘤细胞凋亡和抑制增殖。

【关键词】姜黄素;胶质瘤细胞 U-251;ATP 酶;凋亡
【中国图书分类法分类号】R739.41 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-16

Effect of curcumin on the activity of ATPase in U-251 cells

CHEN Song, et al
(*Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of curcumin on the activity of ATPase and the mechanism of apoptosis in U-251 cell. *Methods:* U-251 cells were treated with 20, 40, 80, 100 μmol/L curcumin for 24 h and the growth inhibition rates of U-251 cells were measured with MTT method. Cell apoptosis was inspected with flow cytometry (FCM). The activities of ATPase were determined by colorimetry method. *Results*: Curcumin inhibited the proliferation of U-251 cells and induced apoptosis of U-251 cells.level of ATPase in U-251 plasma Membrane was low remarkably. *Conclusion*: Curcumin induced apoptosis and inhibited proliferation of U-251 cell via inhibition of activation of plasma Membrane ATPase.

【Key words】Curcumin; Human glioma cell U-251; ATPase; Apoptosis

姜黄素(curcumin)是从姜黄中提取的一种植物多酚,其药理作用广泛,主要有抗炎、抗氧化、抗凝、降血脂、抗肿瘤等作用[1,2]。自 1985 年,印度 Kuttan 等首次提出姜黄和姜黄素具有抗肿瘤作用以来,国内外学者已证实姜黄素具有抑制肿瘤前列腺 Pc-3MLNCap、人鼻咽癌 NCE 细胞、胃腺癌 SGC7901 细胞、人肝癌 BEL-7402-1,宫颈癌等细胞的增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的作用[3~5]。ATP 酶(ATPase)是普遍存在于组织细胞及细胞器膜上的一种蛋白酶,它在维持细胞内钙稳态、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用[6]。目前有关姜黄素对人脑胶质瘤的药理研究较少,尤其对其作用机制了解甚少,本文就姜黄素对胶质瘤细胞 ATP 酶的影响作一研究。

作者介绍:陈 松(1982-),男,硕士,
研究方向:脑肿瘤的蛋白组学。
通讯作者:程 远,男,教授,E-mail:chengyuan023@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(30870723)。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

姜黄素、溴化噻唑蓝四唑(MTT,用 PBS 配成 2 g/L)、碘化丙啶(Propidium iodide,PI) RNase A 购自 Sigma 公司;Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自深圳晶美;DMSO,1640 培养基、胎牛血清、胰酶均购自 HYCLON 公司,Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶测定试剂盒,考马斯亮蓝蛋白测试盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 仪器

酶联免疫检测仪为 Bio-Rad 公司产品;722 N 可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司生产。FACSort 流式细胞仪(美国 BD 公司),奥豪斯电子天平 SR6010,奥豪斯国际贸易上海有限公司。CO_2 恒温培养箱 ThermoForma3110(Thermo Forma 公司)。高压蒸汽消毒器 YXQ·SG41·280(上海医用核子仪器厂)。

1.3 细胞系的培养与传代

人脑胶质瘤细胞株(U251)购自武汉大学典型培养物保

藏中心。采用含 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、10%胎牛血清的 1640 培养液，在 37℃、5% CO_2 及饱和湿度下培养，隔天换液，待细胞长至 80%~90% 密度时，用 0.02% EDTA 和 0.25%胰酶消化，按 1:1 传代。

1.4　姜黄素贮存液的配制

以少量二甲亚砜(DMSO)助溶，加入 1640 配制成 10 mmol/L 的贮存液，0.22 μm 微孔滤器过滤除菌，分装，避光 -20℃保存，2 周内有效。使用时用含 2%血清的 1640 培养液稀释至所需浓度，DMSO 含量小于 0.1%。

1.5　姜黄素对 U251 增殖的影响采用 MTT 法检测

取对数生长期细胞，调整细胞浓度为 1×10^6 个 /L，细胞接种于 96 孔培养板中，每孔 100 μl，24 h 后加无血清 1640 培养液培养 24 h，使细胞同步化于静止期。弃上清，加不同浓度姜黄素(0、20、40、80、100 μmol/L)，每组设 5 个复孔，培养 24 h，弃上清，每孔加 10 μl MTT 和 100 μl 无血清 1640 培养液，继续培养 4 h，去培养液，加 100 μl DMSO 振荡溶解，酶标仪以测量波长 570 nm 测吸光度值。抑制率(%)=[1-(药物组吸光度值 / 对照组吸光度值)]×100%。

1.6　流式细胞仪检测细胞凋亡率

分别收集空白组及各浓度药物(20、40、80、100 μmol/L)作用 24 h 后的 U251 细胞 2×10^6 个。用冷 PBS 洗 2 次，置 0℃水浴中，加结合缓冲液 490 μl，轻轻混匀加入 FITC-Annexin V 5 μl 和 PI 10 μl，20 min 后用流式细胞仪检测。

1.7　姜黄素对胶质瘤细胞 ATP 酶活力的测定

取不同浓度姜黄素作用(0、20、40、80、100 μmol/L)后的细胞，0.25% 胰酶消化，1 000 r/min 离心收集细胞，PBS 液洗 2 遍，细胞用 1 ml 细胞裂解液[150 mmol/L 的 NaCl，150 mmol/L 的 Tris-HCl，1 mmol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA)，1%的 Triton-X 100，pH=8.0]裂解。1 500 r/min 离心 10 min，取上清以分光光度计于波长 660 nm 处测定样品吸光度，计算 Na^+-K^+-ATP 酶、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活力。具体步骤参照试剂盒说明书。另外，以考马斯亮蓝法测定上清中总蛋白含量。ATPase 活力[umol Pi/(mg Pro·h)]=(测定管光密度值 - 对照管光密度值)/ 标准管光密度值·0.1 μmol/0.1 μl·n·6/m 式中：n- 反应体系中样本稀释倍数；m- 取样的蛋白质量，mgPro。

1.8　数据的统计分析

用 SPSS 1 3.0 软件进行单因素方差分析，$P<0.05$ 具有统计学意义。

2　结　果

2.1　姜黄素对 U251 胶质瘤细胞增殖的影响

U251 细胞体外生长活跃，经 20、40、80、100 μmol/L 的姜黄素处理 24 h 后，U251 细胞生长均不同程度地减慢，并呈时间、浓度依赖性。与对照组(0 μmol/L)相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2　姜黄素对细胞凋亡的影响

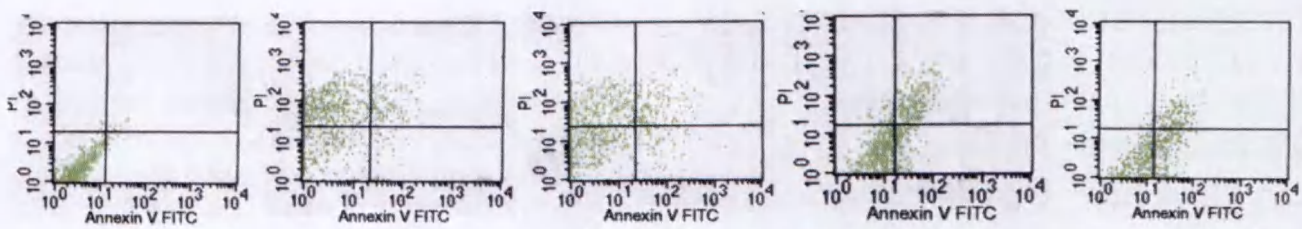
在 20、40、60、80 μmol/L 浓度出现明显凋亡细胞，各组的凋亡指数(%)分别是(16.47 ± 4.72)、(25.62 ± 5.13)、(40.80 ± 6.09)，(54.92 ± 4.14)与对照组 0 μmol/L(3.56 ± 2.57)% 相

表 1　不同浓度姜黄素对细胞增值的影响($\bar{x}\pm s$，n=5)

浓度(μmol/L)	抑制率%
0	8.42+2.57
20	16.83+4.72
40	25.58+5.13
80	43.50+6.09
100	53.18+4.14

表 2　用不同浓度姜黄素处理后流式细胞术检测细胞凋亡构成比($\bar{x}\pm s$，n=5)

分组	curcumin (μmol/L)				
	0	20	40	80	100
UL	1.21 ± 0.30	53.10 ± 0.01	39.37 ± 0.08	5.79 ± 0.44	1.55 ± 0.39
UR	1.40 ± 0.12	12.20 ± 0.69	16.03 ± 0.34	24.68 ± 2.58	22.92 ± 4.43
LL	95.22 ± 17.11	30.43 ± 7.04	35.01 ± 8.42	53.41 ± 6.40	43.53 ± 7.37
LR	2.16 ± 2.48	4.27 ± 4.70	9.59 ± 5.11	16.12 ± 7.51	32.00 ± 10.71
UR+LR(%)	3.56 ± 2.57	16.47 ± 4.72	25.62 ± 5.13	40.80 ± 6.09	54.92 ± 4.14



A. 0 μmol/L　　B.20 μmol/L　　C.40 μmol/L　　D.80 μmol/L　　E.100 μmol/L

图 1　用不同浓度姜黄素处理 U-251 细胞后的流式结果图

表 3 姜黄素对 U-251 细胞 ATP 酶活力的影响($\bar{x}\pm s$, μmolpi/mgprot/h)

分组	curcumin(μmol/L)				
	0	20	40	80	100
Na^+-K^+-ATPase 活力	1.340 0 ± 0.409 6	1.263 3 ± 0.424 4	0.600 0 ± 0.097 1	0.361 7 ± 0.073 6	0.200 0 ± 0.536 9
Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活力	0.506 7 ± 0.134 6	0.368 3 ± 0.101 9	0.296 7 ± 0.080 0	0.105 0 ± 0.081 7	0.050 0 ± 0.191 1

比,差异有显著性($P<0.05$)。

2.3 *姜黄素对胶质瘤细胞 ATP 酶活力的影响*

不同浓度姜黄素作用(20、40、80、100 μmol/L)后胶质瘤细胞 Na^+-K^+-ATP 酶活力降低,除对照组 0 μmol/L 和 20 μmol/L 相比无明显差异,其余每组与正常组相比有显著性差异($P<0.05$)且各剂量组间有明显的剂量-反应关系。Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活力降低,各组与正常组相比有显著性差异($P<0.05$)除 20 μmol/L 和 40 umol/L,80 μmol/L 和 100 μmol/L 相比无显著性差异,*各剂量组间有明显的剂量—反应关系*。

3 讨 论

ATP 酶广泛存在于组织细胞膜及细胞器膜上,能催化 ATP 分解释放能量,以供机体组织细胞进行各种生理活动。Na^+-K^+-ATP 酶及 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶是存在于细胞膜内的专一性 ATP 酶。能催化 ATP 水解释放能量,主动转运离子,保持细胞膜内外离子浓度平衡与梯度差。细胞内外的离子平衡对维持细胞容积,渗透压,信息传递,控制营养物质进入等方面均起着重要作用。在 Na^+、K^+、Mg^{2+} 存在下,Na^+-K^+-ATPase 每分解 1 个分子 ATP,伴随 3 个 Na^+ 向细胞外,2 个 K^+ 向细胞内转运,形成外向电流和细胞膜的静息电位。从某种意义上讲,Na^+-K^+-ATPase 的活性标志着细胞活力和状态的改变,而 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 的作用是将 Mg^{2+} 泵入细胞内,将 Ca^{2+} 由细胞内向细胞外转运。细胞钙稳态是实现细胞生理功能和保持细胞结构完整的必要条件。钙稳态依赖于钙移位酶 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase,细胞内储库(内质网,线粒体)对钙的隔离作用和钙结合蛋白等 3 个环节的正常运转。而且钙离子是重要的第二信使,在细胞信号传导中有重要的调控作用。

有关姜黄素对肿瘤细胞增殖的影响和诱导肿瘤细胞凋亡的作用,国内外学者已有报道[7,8],但多数研究针对非颅脑肿瘤,如前列腺 Pc-3MLNCap、人鼻咽癌 NCE 细胞、胃腺癌 SGC7901 细胞、人肝癌 BEL-7402-l 等肿瘤细胞。吴志敏实验表明姜黄素通过改变 FAK 表达和激活 caspase 诱导人脑胶质瘤 U251 细胞凋亡。也有实验表明肿瘤细胞的 ATP 酶活性异常升高与其肿瘤恶性度成正比。本实验结果不仅证明以上类似结果,即姜黄素能抑制 U251 胶质瘤细胞增殖,诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡,而且表明姜黄素可显著降低 Na^+-K^+-ATPase 活性和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活性,并通过对 Na^+-K^+-ATPase 活性和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 的影响,达到抗肿瘤作用。其机制可能是(1)姜黄素能抑制 Na^+-K^+-ATPase 活性,切断肿瘤组织异常增生的物质基础[9,10]。肿瘤细胞对糖和氨基酸等营养物质的摄取较正常细胞为多,K^+ 可维持细胞内丙酮酸激酶的活性,活性丙酮酸激酶是糖酵解作用和蛋白质合成所必需的酶。Na^+-K^+-ATPase 活性异常升高,可引起细胞内高 K^+ 状态,从而引发糖解,增强蛋白合成。另外肿瘤细胞还会依靠依赖于 Na^+ 和细胞内外 Na^+ 浓度梯度的存在,而后者依赖于 Na^+-K^+-ATPase 的转运,降低其活性阻断营养物质输入自然切断了肿瘤组织异常增生所需的能量来源之一,也是抑制肿瘤发生发展的途径之一;(2) *抑制 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活性可以破坏细胞的钙稳态*[11-13]。当细胞钙稳态失调、细胞内 Ca^{2+} 浓度增高时将触发一系列细胞反应过程,对细胞产生一系列危害。如激活某些 ATP 酶,导致细胞高能磷酸盐水解;激活蛋白酶及磷脂酶,使细胞质膜上的蛋白及磷脂成分水解,质膜完整性遭破坏, 膜外物质进入膜内。进入细胞内的大量钙聚积在线粒体,干扰了线粒体产生高能磷酸盐的功能,造成细胞能量缺乏,最终导致细胞损伤如凋亡[14]。(3)Mg^{2+} 是多种酶参与 ATP 反应所必需的底物, 在糖代谢过程中,Mg^{2+} 可促进糖进入细胞膜,促进糖的氧化磷酸化和糖酵解,而姜黄素使 Mg^{2+} 在细胞内含量减少,可致糖的氧化磷酸化脱耦联,使糖代谢的中间产物不能在线粒体内正常氧化[15],使胶质瘤细胞得不到足够的能量影响其功能促使其凋亡。

综上所述,姜黄素显著抑制胶质瘤细胞的 Na^+-K^+-ATPase、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 等转运蛋白的活性,使膜通透性发生改变,导致膜电位下降,造成细胞内外离子梯度紊乱,使得细胞内 K^+ 浓度减少,Na^+ 浓度增加使得物质转运受阻,细胞渗透压升高,从而切断肿瘤细胞对糖和氨基酸等营养物质的需求,出现 Ca^{2+} 超载可以激活一些水解酶使质膜完整性遭破坏并干扰了线粒体产生高能磷酸盐的功能,而 Mg^{2+} 浓度减少使糖的氧化磷酸化脱耦联,影响能量的代谢从而影响细胞正常生理功能,诱导凋亡的发生;当质膜完全失去完整性时,细胞内容物倾出,最终导致细胞死亡。所以抑制细胞膜上 ATPase 的活性可能是姜黄素抑制胶质瘤细胞的增殖并促进其凋亡的机制之一。

参 考 文 献

[1] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises[J]. Mol Pharm, 2007, 4(6): 807-818.

[2] Payton F, Sandusky P, Alworth W L. NMR study of the solution structure of curcumin[J]. Nat Prod , 2007, 70(2): 143-146.

[3] Dhillon N, Wolff R A, Abbruzzese J L, et al. Phase II clinical trial of curcumin in pa-

基础研究 文章编号：0253-3626(2009)06-0668-04

Dicer 在胃癌细胞和胃癌组织的表达及意义

聂 娜，吴小翎，刘 波
（重庆医科大学附属第二医院消化内科，重庆 400010）

【摘 要】目的：探讨 Dicer 在胃癌（Gastric carcinoma）细胞和胃癌组织中的表达及意义。方法：应用 Western-Blot 和逆转录－聚合酶链反应（Reverse transcriptase polymerase chain reaction，RT-PCR）检测正常胃粘膜细胞株 GES-1、人胃癌细胞株 SGC-7901，25 例胃癌手术标本及癌旁配对组织 Dicer 的含量。结果：1.Western-Blot 和 RT-PCR 结果表明 Dicer 在人胃癌细胞株 SGC-7901 的表达水平明显低于正常胃粘膜细胞株 GES-1（$P<0.05$），在胃癌手术标本组织的表达水平明显低于癌旁配对组织（$P<0.05$）；2.Dicer 表达水平与胃癌分化程度有关。低分化组低于中分化组（$P<0.05$），中分化组低于高分化组（$P<0.05$）。结论：在胃癌细胞株和胃癌组织中 Dicer 表达明显降低并且 Dicer 表达与胃癌分化程度相关。

【关键词】Dicer；胃癌；逆转录－聚合酶链反应
【中国图书分类法分类号】R5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-13

The expression and significance of Dicer in gastric cell lines and gastric cancer tissue

NIE Na, et al
(*Department of Gastroenterology and Hepatology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect the expression and significance of Dicer in gastric cell lines and gastric cancer tissue. *Methods*: Western-Blot and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression of Dicer in normal gastric mucosa cell line GES-1, human gastric cancer cell line SGC-7901, 25 surgical removed gastric cancer tissue and paired para-tumor tissue. *Results*: 1.The expression of Dicer in human gastric cancer cell line SGC-7901 was lower than that in normal gastric mucosa cell line GES-1 ($P<0.05$), the expression of Dicer in gastric cancer tissue was lower than that in complete sequence tissue ($P<0.05$); 2.The expression of Dicer is correlated with differentiation degrees of gastric cancer.The expression of Dicer in poorly differentiation group is lower than that in moderately differentiation group ($P<0.05$), and the expression of Dicer in moderately differentiation group is lower than that in well differentiation group ($P<0.05$). *Conclusion*: The expression of Dicer is obvious

作者介绍：聂 娜（1982- ），女，硕士，研究方向：胃癌方面。
通讯作者：吴小翎，男，教授，E-mail：zzb68485383@126.com。

tients with advanced pancreatic cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2006, 24 (18 s): 14151.

[4] 潘国凤，张晓东，朱晓新.姜黄素抗肿瘤作用及其机制研究最新进展[J]. 中药药理与临床，2007，23(5)：247-252.

[5] 范婷婷，赵纯全，杨 蕾.姜黄素对宫颈癌 Caski 细胞中 Pleiotrophin 蛋白表达的影响[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(7)：825-827.

[6] Inge L J, Rajasekaran S A, Yoshimoto K. Evidence for a potential tumor suppressor role for the Na^+-K^+-ATPase beta1-subunit[J]. Histol Histop athol, 2008, 23 (4): 459-467.

[7] Singh S, Khar A.Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2006, 6(3): 259-270.

[8] Tamvakopoulos C, Dimas K.Metabolism and anticancer activity of the curcumin analogue, dimethoxycurcumin[J]. Clin. Cancer Res, 2007, 13: 1269-1277.

[9] Nilsson B, Mijatovic T, Mathieu A, et al. Targeting Na^+/K^+-ATPase in non-small cell lung cancer[J]. NSCLC, 2007, 25: 18144.

[10] Duran M J, Pressley, Thomas A.Regulation of Na^+/K^+-ATPase in prostate cancer: a role for PKC[J]. FASEB, 2007, 21: A1428.

[11] Balasubramanian S, Eckert R L. Curcumin suppresses AP1 transcription factor-dependent differentiation and activates apoptosis in Human epidermal keratinocytes[J]. Biol. Chem, 2007, 282: 6707-6715.

[12] Aung C, Roberts-Thomson S, Monteith G. Role of plasma membrane calcium ATPase (PMCA) in colon cancer[J]. AACR Meeting Abstracts, 2007, 2007: A35.

[13] Bartolommei G, Francesco, Buoninsegni T. Clotrimazole inhibits the Ca^{2+}-ATPase (SERCA) by interfering with Ca^{2+} binding and favoring the E2 conformation[J]. Biol. Chem, 2006, 281: 16384-16390.

[14] Kamath R, Jiang Z H, Sun G M, et al. c-Abl kinase regulates curcumin-induced cell death through activation of c-Jun N-Terminal kinase[J]. Mol. Pharmacol. 2007, 71: 6-72.

[15] Krstic D, Krinulovic K, Vasic V. Inhibition of Na^+/K^+-ATPase and Mg^{2+}-ATPase by metal ions and prevention and recovery of inhibited activities by chelators[J]. Enzyme Inhib Med Chem, 2005, 20(5): 469-476.

（责任编辑：冉明会）