论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1454-05

姜黄素通过 Wnt 信号转导通路抑制肺癌细胞 A549 增殖的研究

岳 秀[1,2],蒋幼凡[1],刘 晓[1,2],刘 翩[1,2]

(1. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010;2. 重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:从研究 Wnt 信号通路的关键因子—核蛋白 β-catenin 入手,探讨姜黄素(Curcumin,Cur)可能存在的抑制肺癌细胞增殖的分子学机制。方法:MTT 法检测不同浓度的 Cur 对肺癌细胞 A549 的生长抑制情况,分析药物浓度和细胞增殖抑制率之间的关系;Western blot 法检测 Cur 作用后,A549 细胞核蛋白 β-catenin 含量的变化;RT-PCR 方法验证 Cur 对细胞 c-myc 基因表达的影响;流式细胞仪观察经 Cur 作用后细胞周期的改变。结果:Cur 以浓度依赖方式抑制肺癌细胞 A549 的增殖,该药物浓度与抑制率之间有明显的线性相关性(r=0.933 3)。细胞经 Cur 干预 48 h 后,核蛋白 β-catenin 的含量和促癌基因 c-myc 的表达含量均有所下降。流式细胞仪观察细胞周期的结果提示,Cur 能够阻止肺癌细胞 A549 由 G_1 期进入 S 期,提高 G_0/G_1 期细胞的百分比。结论:Cur 能够抑制 A549 细胞胞浆内 β-catenin 蛋白进入胞核,阻断 Wnt 信号转导通路,进而抑制下游靶基因 c-myc 的表达,阻止肺癌细胞 A549 由 G_1 期进入 S 期,有效抑制了 A549 细胞的增殖。

【关键词】姜黄素;β-catenin;Wnt 信号转导通路;A549 细胞

【中国图书分类法分类号】R730.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-20

Curcumin inhibits proliferation of lung cancer cell A549 through Wnt signaling pathway

YUE Xiu, et al

(*Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medicical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the possible molecular mechanism of inhibiting the proliferation of lung cancer cells by studing curcumin regulating neucleoprotein β-catenin, the key factor of Wnt signaling pathway. *Methods*: Non-toxic different doses of curcumin affected human lung adenocarcinoma cell A549 for 48 hours. Inhibitory effect of curcumin on proliferation of A549 cells was evaluated by MTT assay. The correclation of doses and inhibition ratio was analyzed statistically. The neucleoprotein levels of β-catenin was analyzed by Western blot. The expression level of c-myc was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). The exchange of cell cycle was examined by flow cytometry(FCM). *Results*: Curcumin inhibited the proliferation of A549 in a concentration-dependent manner(P<0.05), and there was obvious linear correlation between drug concentrations and inhibition ratio(r=0.933 3). The expresson of nucleoprotein β-catenin and oncogene c-myc were all down-regulated in A549 cells(P<0.05) after treatment with curcumin. Curcumin prevented A549 cells from G_1 to S phase period, and raised the percentage of G_0/G_1 phase cells(P<0.05). *Conclusion*: Curcumin could prevent β-catenin protein of A549 cells into the nucleus from the cytoplasm, block Wnt signal transduction pathway and inhibit the expression of downstream target genes c-myc. Thereby, curcimin prevents lung cancer cells from G_1 phase to S phase, and effectively inhibit the proliferation of A549 cells.

【Key words】 Curcumin; β-catenin; Wnt signaling pathway; A549 cell

化学治疗是肺癌综合治疗的重要手段之一,但是目前多数化疗药物在临床应用过程中易导致肺癌细胞继发耐药,并带来严重的不良反应。因此,寻找高效低毒的新型抗肿瘤药物就成为肺癌治疗的当务之急。

姜黄素(Curcumin,Cur)是从姜黄、郁金、莪术和菖蒲等草本植物的根茎中提取的一种酚类色素,近年来有研究表明,Cur 能够抑制各种肿瘤的生长、侵

作者介绍:岳 秀(1978-),女,硕士,
研究方向:肺癌的早期诊断与治疗。

通讯作者:蒋幼凡,女,教授,E-mail:zengzuo1992@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局中医药科研项目(No.2004-B-80)。

润和凋亡[11],但是对肺癌的研究目前报道较少,为此,本研究选择 A549 细胞作为研究对象,探讨 Cur 通过 Wnt 信号转导通路对肺癌生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

肺癌细胞株 A549 由中国科学院上海细胞所提供;Cur 购自美国 Sigma 公司;RPMI1640 培养基、小牛血清购自美国 Hyclone 公司;细胞裂解液为上海申能博彩生物公司产品;鼠抗人 β-catenin、β-tublin 由 Santa Cruz 公司生产;核蛋白提取试剂盒由南京凯基生物公司生产;辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IGg、羊抗兔 IGg 购自北京中杉金桥生物公司;MTT、DMSO 为美国 Sigma 公司产;核酸分子标记物、RT-PCR 两步法试剂盒由 TaKaRa 生物公司提供;c-myc 引物及内参照引物序列应用生物学软件 primer5.0 设计,由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 Cur 对细胞增殖的抑制率 Cur 用少许 DMSO 溶解配成储存液,用时以培养基稀释成 10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L 等不同浓度,并调节各组培养基中 DMSO 终浓度为 0.1%;取对数生长期细胞,以 0.1%胰酶消化后,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液制成 5×10^4 个/ml 单细胞悬液,以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,于 37℃,5%CO_2 孵箱培养。细胞贴壁后实验组换用含不同浓度 Cur 的培养液,阴性对照组用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养 48 h,每孔均设置 4 个平行复孔。实验终止前 4 h 每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl,37℃再培养 4 h。吸弃孔内培养液,每孔加入 180 μl DMSO,震荡 10 min 后,在酶联免疫检测仪上以 570 nm 波长测定各孔吸光值(A 值),计算增殖抑制率并绘制浓度-增殖抑制曲线。细胞增殖抑制率 =(1-实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%。

1.2.2 Western Blot 法测定核蛋白 β-catenin 的表达 取对数生长期 A459 细胞,以 5×10^5 个/ml 密度接种于培养瓶中培养。不同浓度 Cur 作用 48 h 后,按核蛋白提取试剂盒说明方法裂解细胞核,收集核蛋白。以 β-tublin 为内参,8%的 SDS-PAGE 电泳分离后,电转至 PVDF 膜上。PVDF 膜经封闭液封闭 1 h 后,加入小鼠抗人 β-catenin 单克隆抗体作一抗(工作浓度为 1∶300),4℃摇床过夜。用辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠作为二抗(工作浓度为 1∶1 000),37℃孵育 2 h,TBET 缓冲液洗涤后,加入化学发光剂,ECL 发光法检测蛋白表达,用 Quantity One 图像分析系统进行灰度分析。

1.2.3 RT-PCR 方法检测 c-Myc mRNA 按华舜公司总 RNA 抽提试剂盒操作步骤提取各实验组及对照组细胞总 RNA,用紫外分光光度计根据 260 nm 的吸光值测定 RNA 纯度,并进行 RNA 定量。

每组取 0.5 μg RNA 作为模板逆转录成 cDNA,c-myc 基因上游引物序列为 TTCGGGTAGTGGAAAACCAG,下游引物序列为 CAGCAGCTCGAATTTCTCC,片断长度为 203 bp;内参 β-actin 上游引物序列为 GACTACCTCATGAAGGTC,下游引物序列为 GATCCACATCTGCTGGAA,片断长度为 500 bp,逆转录条件为 42℃,10 min。随后进行 PCR 扩增,c-myc 基因反应条件为 94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,62℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环。β-actin 内参反应条件为 94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统保存图像,Quantity One 系统进行灰度分析。

1.2.4 细胞周期分析 取对数生长期的 A549 细胞,加入 10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L 的 Cur 作为实验组,同时设立阴性对照组继续培养,48 h 后终止培养,PBS 清洗 2 次并配成单细胞悬液,再用预冷无水乙醇固定过夜。检测前离心去除乙醇,碘化丙啶染色 30 min,每组均取 5 000 个细胞,用流式细胞仪测定细胞周期中不同时相的细胞数,结果以各时相细胞百分比表示。

1.3 统计学分析

所有数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析,采用 t 检验和直线回归分析,以 $P\leqslant0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Cur 抑制 A549 细胞增殖的作用

不同浓度 Cur(10、20、40、80 μmol/L)作用 A549 肺癌细胞 48 h 后,细胞增殖抑制率由 14.7%上升至 63.8%,并呈浓度效应关系(图 1)(P=0.024 7),表明 Cur 能够抑制人肺腺癌细胞 A549 的增殖,且该抑制作用呈浓度依赖性增加(r=0.933 3)。

2.2 Cur 对 A549 细胞核蛋白 β-catenin 表达的影响

Western Blot 结果显示,Cur 作用 A549 细胞 48 h 后,实验组的核蛋白 β-catenin 表达水平明显低于阴性对照组(P<0.05)(图 2,表 1),表明 Cur 可以减少细胞核内 β-catenin 蛋白的含量。

2.3 Cur 对 c-myc 基因表达的下调

从 RT-PCR 结果可见(图 3,表 1),Cur 作用 A549 细胞后,各实验组 c-myc RNA 较对照组均明显减少(P<0.05),80 μmol/L 浓度组减少最明显。不仅证实了 Cur 能够抑制 c-myc 基因表达,同时从下

调 Wnt 信号通路靶基因方面证实了 Cur 对该通路的阻断作用。

2.4 Cur 对 A549 细胞周期的影响

流试细胞仪结果分析显示(表 1),Cur 作用A549 细胞 48 h 后,处于 G_0/G_1 期的细胞数明显多于未经姜黄素处理的对照组($P<0.05$),且随着药物浓度的增加,G_0/G_1 期细胞数逐渐增多,其中 80 μ mol/L 浓度 G_0/G_1 期细胞百分比最多,比阴性对照组升高了 20.89%。表明 Cur 抑制 A549 细胞分裂与增殖的作用机制为阻止细胞由 G_1 期进入 S 期。

3 讨 论

肺癌是全世界最常见的肿瘤之一,在我国近十年来肺癌的发生率和死亡率均呈逐年递增的趋势。肺癌的生物学特性复杂,恶性程度高的特点决定了80%的肺癌患者在确诊时已属于晚期而失去手术机会,而常规化疗、放疗又因为副作用大、细胞继发耐药而影响疗效。因此,寻找能够有效治疗肺癌的新方法,并且同时减少治疗副作用就成为临床研究中的重要任务。

Wnt/β-catenin 信号通路是与肿瘤的发生发展密切相关的信号转导通路,目前国外已经在包括肺癌等多种实体瘤中均检测到 β-catenin 的高表达[2],β-catenin 是 Wnt 信号通路中最关键的通道传递分子,它是一种可以存在于细胞膜、细胞质和细胞核内的多功能胞质蛋白。在没有 Wnt 信号刺激的情况下,细胞质内的 β-catenin 和 GSK-3β、Axin、APC 组成降解复合物,促使 β-catenin 很快降解,使胞质 β-catenin 保持在较低水平[3]。Wnt 信号通路启动后,

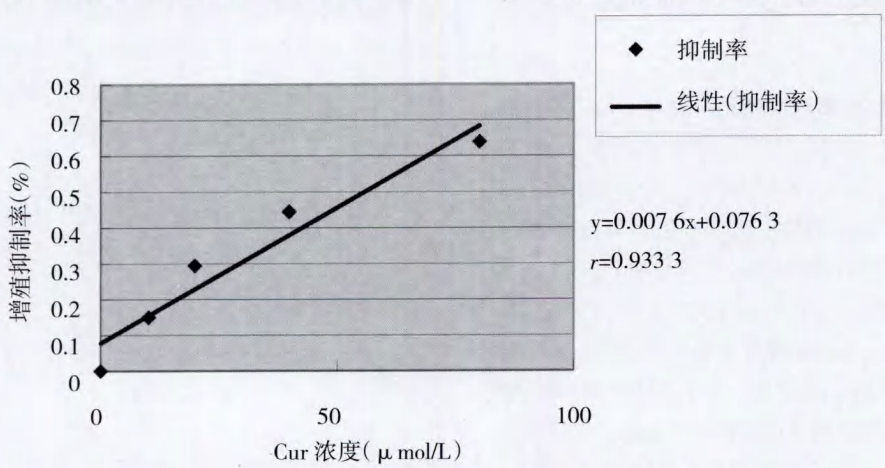
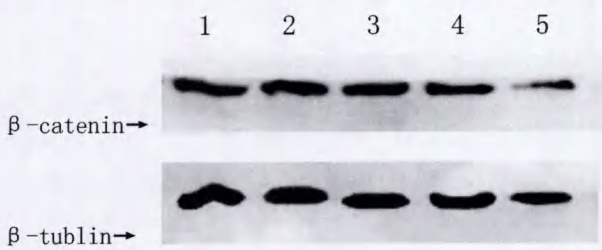
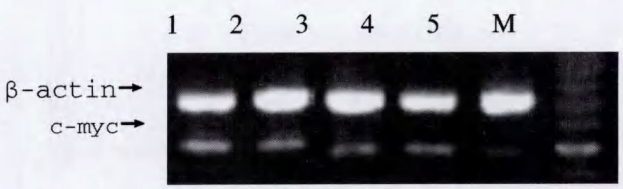


图 1 不同浓度 Cur 对 A549 细胞的增殖抑制曲线



1. 阴性对照组;2~5. 10、20、40、80 μ mol/L 浓度 Cur 分别作用 48 h 后

图 2 Cur 作用后 A549 核蛋白 β-catenin 的表达



1. 阴性对照组;2~5. 10、20、40、80 μ mol/L 浓度 Cur 分别作用 48 h 后

图 3 Cur 作用后 A549 细胞 c-myc 基因的表达

表 1 Cur 作用后 β-catenin、c-myc RNA 的表达及细胞周期的变化

浓度(μ mol/L)	阴性对照	10	20	40	80	P 值
β-catenin	0.92 ± 0.032	0.81 ± 0.064	0.73 ± 0.047	0.75 ± 0.033	0.48 ± 0.057	0.042 5
c-myc	0.38 ± 0.058	0.27 ± 0.029	0.19 ± 0.063	0.26 ± 0.097	0.11 ± 0.071	0.018 7
G_0/G_1 期(%)	63.03	74.28	72.12	80.33	83.92	0.012 5

激活胞浆内 β-catenin 入核并与核内转录因子 TCF/LEF（又称 T 细胞/淋巴细胞增强因子）结合[4]，激活下游重要靶基因 c-myc 的表达。c-myc 决定细胞从 G_0/G_1 期进入 S 期的开关，是较早出现的细胞恶化的分子标志，与肺癌启动、恶性增生密切相关[5]。正常情况下，c-myc 基因不显示转录活性或低水平表达；只有受某些因子激活时，c-myc 基因才大量表达，产生转录因子调控其他基因转录，使细胞由静止期进入增殖期，促进癌细胞的增殖、侵润与转移[6,7]。

Cur 的抗肿瘤作用早已得到共识，近年国外学者又通过实验证明，Cur 具有抑制肺癌的生长、侵润的药理学作用[8]；Cur 联合化疗可以减少常规化疗药物的剂量，减轻毒副作用，在肺癌的非手术治疗中占有重要的地位[9]。但是关于 Cur 干预肺癌细胞生物学行为的具体机制国内外尚无文献报道。本实验首先应用 MTT 方法证实了 Cur 具有抑制肺癌 A549 细胞增殖的药理学特性，并且得出了 Cur 浓度和细胞增殖抑制率之间具有线性依赖关系。为进一步揭示 Cur 的抗肿瘤机制与 Wnt 信号转导通路的联系，我们在裂解肺腺癌 A549 细胞核后，分别采用 Western Blot 方法和 RT-PCR 方法分析核蛋白与核 RNA 的表达，试图比较 Cur 作用前后细胞核内蛋白 β-catenin 以及 Wnt 信号转导通路下游基因 c-myc 的表达变化情况。从实验结果来看，未经 Cur 作用的 A549 细胞核蛋白 β-catenin 及 c-myc RNA 有较强的表达；经不同浓度 Cur 作用 48 h 后，细胞核内 β-catenin 蛋白和 c-myc 基因的表达均下降（$P<0.05$）。提示 Cur 可能通过阻止细胞浆内的游离 β-catenin 蛋白进入细胞核，从而阻断 Wnt 信号转导通路的方式，减少下游靶基因 c-myc 的转录活性。应用流式细胞仪检测 Cur 对 A549 细胞周期的影响发现，Cur 能够增加 G_0/G_1 期 A549 细胞比例，且随着药物浓度的增加，G_0/G_1 期细胞数量有逐渐增加的趋势，其机制可能为 c-myc 基因表达受到抑制，从而阻止了肺癌细胞由 G_0/G_1 期进入 S 期，同时进一步证实了 Cur 抑制 A549 细胞分裂、增殖的药理学效应。

本实验证明了 Cur 降低人肺癌细胞 A549 增殖的机制：Cur 抑制细胞质内 β-catenin 蛋白进入细胞核，减少核内 β-catenin 蛋白的含量，进而阻断 Wnt 信号转导通路，抑制下游靶基因 c-myc 的转录活性，阻止 A549 细胞 G_0/G_1 期进入 S 期，从而有效抑制了肺癌细胞的增殖。尽管本实验结果对 Cur 如何抑制 β-catenin 进入细胞核的具体分子学机制尚未完全阐明，但本实验为进一步探讨 Cur 的调控肺癌细胞信号转导通路的分子生物学机制提供了基础，而且为临床中 Cur 联合化疗治疗肺癌提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] Chen A,Xu J. Activation of PPAR by curcumin inhibits moser cell growth and mediates suppresion of gene expression of cyclin D1 and EGFR[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2005,288(3):447-456.

[2] Huang CL,Liu D,Nakano J,et al. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer[J]. Clin Oncol,2005,23(34):8765-8773.

[3] 王凤玮，温 玲，朱思伟，等.结直肠癌组织中突变型 Axin2 对 Wnt 信号转导系统的调控及机制[J]. 癌症，2007，26(10):1041-1046.

[4] Xu HT, Wei Q, Liu Y,et al. Overexpression of axin downregulates TCF-4 and inhibits the development of lung cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2007,14(11):3251-3259.

[5] Nakashima T,Liu D,Nakano J,et al. Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients[J]. Oncol Rep,2008,19(1):203-209.

[6] Partanen JI,Nieminen AI,Makela TP,et al. Suppression of oncogenic properties of c-Myc by LKB1-controlled epithelial organization [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(37):14694-14699.

[7] Li Y,Guessous F,Johnson EB,et al. Functional and molecular interactions between the HGF/c-Met pathway and c-Myc in large-cell medulloblastoma[J]. Lab Invest,2007,3(1):101-107.

[8] Lev-Ari S,Starr A,Vexler A,et al. Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis,down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity[J]. Anticancer Res,2006,26(6B):4423-4430.

[9] 张梅春，赵子文，曾 军，等.姜黄素对耐药顺铂人肺腺癌细胞 Survivin 表达及其化疗敏感性的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志，2007，14(19):1454-1457.

（责任编辑：关蕴良）