维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0825-03

姜黄素对宫颈癌 Caski 细胞中 Pleiotrophin 蛋白表达的影响

范婷婷,赵纯全,杨 蕾

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究姜黄素(Curcumin)对宫颈癌 Caski 细胞的增殖及原癌基因(Pleiotrophin,PTN)表达的影响。方法:MTT 法检测不同浓度的姜黄素对 Caski 细胞增殖的影响;免疫细胞化学染色观察经姜黄素处理组和未处理组细胞中 PTN 表达的差别;免疫印迹 Western blotting 技术检测不同浓度的姜黄素对 Caski 细胞中 PTN 表达的影响。结果:姜黄素能抑制 Caski 细胞的增殖,并且这种抑制作用呈剂量依赖性。免疫细胞化学结果显示 PTN 在实验组中的表达显著低于对照组。Western blotting 检测结果显示姜黄素抑制 PTN 的表达,并且对 PTN 表达的抑制程度依赖于姜黄素的浓度。结论:姜黄素能抑制宫颈癌 Caski 细胞的增殖及 PTN 表达,这种对 PTN 表达的抑制可能是其抗肿瘤作用机制之一。

【关键词】姜黄素;多效因子;宫颈癌

【中国图书分类法分类号】R711.74 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-17

Effect of curcumin on the protein expression of pleiotrophin in cervical cancer caski cells

FAN Ting-ting, et al

(*Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of curcumin on the proliferation and the protein expression of Pleiotrophin(PTN) in cervical cancer Caski cells. *Methods*: MTT was used to assay the proliferation of Caski cells which were treated with different concentrations of curcumin. The immunocytochemistry was used to assay the distinctive expression of PTN in Caski cells which were treated by curcumin or not. The effects of curcumin with different concentrations on the protein levels of PTN were tested by Western blotting. *Results*: The proliferation of Caski cells were inhibited by curcumin in a does-dependent manner. Immunocytochemistry assessment showed the expression of PTN was significant down-regulated after treated with curcumin. Western blotting showed the curcumin could down-regulate the expression of PTN, and this was a does-dependent action. *Conclusion*: Curcumin could inhibit the proliferation and the PTN expression of Caski cells significantly, which may be one of the molecular mechanisms anticancer of curcumin.

【Key words】 Curcumin; Pleiotrophin; Cervical cancer

姜黄素是一种从姜科植物里提取的生物多酚,它具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤等作用,特别是其抗肿瘤的作用日益为人们所关注。国内外有众多学者对姜黄素的抗肿瘤作用及其机制做了大量的研究,证实了姜黄素抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的作用确切,另有Ⅰ期临床试验证明,连续 3 个月每天口服姜黄素 8 000mg 并未发现其对人体有毒副作用[1],因此可判定它是一种具有良好应用前景的抗癌新药。目前在宫颈癌的研究方面,关于姜黄素对 PTN 的影响尚未见报道,本实验通过研究姜黄素对宫颈癌 Caski 细胞株中 PTN 表达的影响,从而为相关的后续实验提供理论依据。

作者介绍:范婷婷(1979-),女,硕士,研究方向:妇科肿瘤。

通讯作者:赵纯全,男,副教授,E-mail:zcq113@yahoo.com.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

宫颈癌 Caski 细胞株由重庆医科大学基础研究所提供,姜黄素为 Sigma 公司产品,溶于少量的二甲亚砜(DMSO),配制成 1 000μg/ml,-20℃保存备用。兔抗人 PTN 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒均为北京中杉公司产品。PVDF 膜购自 Millipore 公司。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在 37℃,5%CO_2,正常氧浓度,饱和湿度的条件下,用含 10%小牛血清,100μg/ml 青霉素,100μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液培养 Caski 细胞至对数生长期。

1.2.2 细胞增殖的测定(MTT 法) 取对数生长期的 Caski 细胞,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液配制成 1×10^4 个/ml 的细胞悬液,充分吹打后接种于 96 孔板中,200μl/孔。将培养板置于 5%CO_2,37℃的孵箱中培养。待细胞贴壁后于实验组加入姜黄素母液,使其终末浓度分别为 10μg/ml、20μg/ml、40μg/ml。每个浓度设 4 个复孔,同时每个浓度的实验组平行设不加细胞,只加培养液和同一浓度药物的空白对照孔。培养 48h 后,吸去培养基,换上无血清的 RPMI1640,并加入 MTT(四甲基偶氮唑盐)20μl,继续培养 4h。最后彻底弃去培养上清液,每孔加入 150μl DMSO(二甲亚砜),上机测 570nm 下的吸光值(A)。

癌细胞生长抑制率 =(1- 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值)× 100%

1.2.3 免疫细胞化学染色 取对数生长期细胞,配成单细胞悬液,分别接种于内部放有盖玻片的 24 孔板中,继续培养至贴壁。于实验组加入终末浓度为 20μg/ml 的姜黄素。待 48h 后固定实验组和对照组的细胞爬片,按照 SP 试剂盒说明书进行免疫细胞化学实验,最后 DAB 显色,在光镜下观察两组细胞的染色强度。

1.2.4 Western blotting 免疫印迹方法检测 PTN 的表达 用终末浓度为 10μg/ml、20μg/ml、40μg/ml 的姜黄素分别处理培养瓶中处于对数生长期的 Caski 细胞。48h 后收集细胞,PBS 洗涤,用蛋白提取液裂解细胞。收集细胞裂解液,用考马斯亮兰定量测定总蛋白浓度。然后进行 SDS-PAGE,将蛋白电转移至硝酸纤维膜上。用 5%的脱脂奶粉封闭后,加入兔抗人 PTN 多抗(1:400),兔抗人 β-actin 多抗(1:1 000)。最后加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG,用增强化学发光检测试剂盒放射自显影于 X 线胶片上。

1.2.5 实验结果的统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件包进行方差分析和 t 检验,以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 姜黄素对 Caski 细胞增殖的影响

MTT 比色法检测发现,姜黄素可显著抑制 Caski 细胞的增殖,并且抑制作用随着其浓度的增加而增强($P<0.01$)。浓度分别为 10μg/ml、20μg/ml、40μg/ml 的姜黄素作用 48h 后,其抑制率分别为:39.5%、54.4%、60.4%(见表 1)。

表1 MTT 法检测不同浓度姜黄素对 Caski 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	A 值($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)
0μg/ml	0.621 ± 0.069	
10μg/ml	0.376 ± 0.045*	39.5
20μg/ml	0.283 ± 0.028*	54.4
40μg/ml	0.246 ± 0.025*	60.4

注:与对照组相比,*$P<0.01$



图 1 对照组中 PTN 蛋白的表达(SP×400)



图 2 处理组中 PTN 蛋白的表达(SP×400)

2.2 姜黄素对 Caski 细胞中 PTN 表达的影响

免疫细胞化学染色结果显示 PTN 在 Caski 细胞中呈强阳性表达。棕黄色颗粒定位于细胞浆和细胞核中。与对照组相比,经姜黄素处理后的细胞中 PTN 表达明显减弱。见图 1 与图 2。

2.3 Western blotting 检测结果

不同浓度的姜黄素(10μg/ml、20μg/ml、40μg/ml)作用 Caski 细胞 48h 后,用 Western blotting 法检测细胞中 PTN 的表达情况。结果显示,随着姜黄素浓度的升高,PTN 表达逐渐降低,见图 3。

3 讨 论

姜黄素在抗肿瘤方面,具有谱较广,毒副作用

维普资讯 http://www.cqvip.com

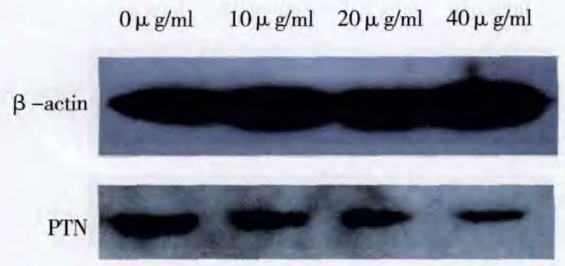


图 3 不同浓度姜黄素对 Caski 细胞中 PTN 表达的影响

小等优点，因此尤为受到人们的重视。体外研究表明，姜黄素能通过多条通路和调节多种肿瘤相关因子来抑制癌细胞的增殖并诱导其凋亡[2]。Pleiotrophin（Ptn）又名多效因子，是一种分子量为 18ku，与肝素有高亲和力的生长因子[3]。它具有多种生物学活性：促进血管生成、促进有丝分裂、刺激神经突触生长及诱导细胞迁移等作用[4]。作为一种原癌基因，PTN 在多种人类肿瘤及肿瘤细胞系均有表达，包括乳腺癌、成神经细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、胰腺癌、结肠癌、脑胶质瘤、肝癌、喉癌等[5]。既往研究已证明 PTN 在宫颈癌中表达增高[6]。本实验选用姜黄素作用于宫颈癌 Caski 细胞株，来研究姜黄素对 Caski 细胞的增殖和 PTN 表达的影响。

本实验结果显示姜黄素对宫颈癌 Caski 细胞株的增殖具有明显的抑制作用，当姜黄素的浓度为 10μg/ml、20μg/ml、40μg/ml 时，其抑制率分别为 39.5%、54.4%、60.4%，说明姜黄素的抑制作用呈剂量依赖性。从免疫细胞化学染色的结果可以看出 PTN 在 Caski 细胞中高表达，棕黄色颗粒定位于细胞浆和细胞核中。而在经过姜黄素处理后的细胞中，PTN 的表达显著降低，提示姜黄素能抑制 Caski 细胞中 PTN 的表达。我们随后采用 Western blotting 的方法对这种现象进行定量检测，结果证明 PTN 的表达随着姜黄素浓度的增高而降低。由以上研究结果我们推测：姜黄素可能通过抑制 PTN 的表达，从而抑制了 PTN 的多种生物学活性，达到其抗肿瘤的作用，但姜黄素是通过何种机制来抑制 PTN 的表达仍需要作进一步的研究。本实验研究姜黄素对 PTN 的作用，旨在为后续相关实验提供新的思路并为宫颈癌治疗的临床用药提供一定的理论依据。

参 考 文 献

[1] Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions[J]. Anticancer Res, 2001; 21(4B): 2895-2900.

[2] Lin JK, Jin-shian SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin[J]. Proc Natl Sci Counc ROC(B), 2001; 25(2): 59-66.

[3] Papadimitriou E, Polykratis A, Hatziapostolou M, et al. Heparin affin regulatory peptide: a new target for tumour therapy[J]? Curr Cancer Drug Targets, 2004; 4(6): 471-482.

[4] Kadomatsu K. The midkine family in cancer, inflammation and neural development[J]. Nagoya J Med Sci, 2005; 67(3-4): 71-82.

[5] 张宏艳，李 刚，宋三泰.Pleiotrophin 研究进展[J]. 国外医学遗传学分册，2005；28(2)：65-68.

[6] Moon HS, Park WI, Sung SH, et al. Immunohistochemical and quantitative competitive PCR analyses of midkine and pleiotrophin expression in cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2003; 88(3): 289-297.

（责任编辑：谭乐勤）

（上接第 824 页）

ulcer heal-ing: histological and ultrastructural assessment[J]. Aliment Pharmacol Ther, 1991; 5(s 1): 79-90.

[2] Tarnawski A, Stuchura J, Krause WJ, et al. Quality of gastric ulcer healing: a new emerging concept[J]. J Clin Gastroenterol, 1991; 13(s 1): S42-47.

[3] Forbes GM, Glaser ME, Cullen DJE, et al. Duodenal ulcer treated with Helicobacter pylori eradication: seven-year follow-up[J]. Lancet, 1994; 343: 258-260.

[4] Higuchi K, Aradawa T, NebidiH, et al. Rebamipide prevents recurrence of gastric ulcers without affecting Helicobacter pylori status [J]. DigDisSci, 1998; 43(9s): s99-s106.

[5] 叶任高，陆再英.内科学[M]. 第 6 版.北京：人民卫生出版社，2004.3.

[6] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则[M]. 第 1 版.北京：中国医药科技出版社，2002.364-366.

[7] Neuhaus OW, Letzring M. Determination of hexosamines in conjunction with electrophoresis on starch[J]. A nal Chem, 1975; 29(8): 1230-1233.

[8] 萨姆布鲁克 J，拉塞尔 DW.分子克隆试验指南（下册）[M]. 北京：科学出版社，2002.1713-1726.

[9] Barnard JA, Beauchamp RD, Russell WE, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastro intestinal pathophysiology[J]. Gastr enter-ology, 1995; 108(5): 564-580.

[10] 林三仁. 加强对胃粘膜保护机制的研究[J]. 胃肠病学，1999；4(3)：131.

[11] 李兆申，湛先保，许国铭.胃粘膜损伤与保护 - 基础与临床[M]. 上海：上海科技出版社，2004.107-111.

[12] 刘海军，许国铭，李兆申.氨基已糖和磷脂含量评价胃粘膜防御机制[J]. 新消化病学杂志，1997；5(7)：427-428.

（责任编辑：关蕴良）