

## 基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.011

姜黄素通过 TGF- $\beta$ 1 信号通路抑制  
人肺泡横纹肌肉瘤细胞株 PLA-802 的机制研究刘德伟<sup>1</sup>, 杨明<sup>2</sup>, 李勇国<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学基础医学院法医教研室, 重庆 400016; 2. 四川省南充市公安局刑警支队技术大队, 南充 637000)

**【摘要】**目的: 观察姜黄素对人横纹肌肉瘤 (Rhabdomyosarcoma, RMS) 细胞株 PLA-802 的抑制作用, 以及对细胞内 TGF- $\beta$ 1/Smad 4 的表达的影响, 探索姜黄素抑制 RMS 细胞生长的机制。方法: 体外培养人 RMS 细胞株 PLA-802, 并用不同浓度的姜黄素作用不同的时间。用 MTT 检测姜黄素对 PLA-802 细胞生长情况的影响, 用流式细胞术检测细胞周期的变化情况, RT-PCR 和 Western blot 分别检测细胞内 TGF- $\beta$ 1 和 Smad 4 的 mRNA 和蛋白水平的表达。结果: MTT 结果显示姜黄素显著降低了 PLA-802 细胞的存活率 ( $P < 0.05$ )。流式细胞结果表明姜黄素明显降低了 S 期而增加了 G<sub>1</sub> 期 ( $P < 0.05$ )。而 TGF- $\beta$ 1 和其下游因子 Smad4 的 mRNA 和蛋白水平的表达也明显受到姜黄素的抑制, 且这种抑制作用呈浓度-时间依赖性 ( $P < 0.05$ )。结论: 姜黄素发挥其抑制 PLA-802 细胞的作用可能是通过抑制 TGF- $\beta$ 1 信号通路, 这将为临床治疗肺泡 RMS 提供新的思路。

**【关键词】**姜黄素; 信号通路; 横纹肌肉瘤**【中国图书分类法分类号】**DF795.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-05-24Inhibitory effect of Curcumin on human alveolar rhabdomyosarcoma  
cell line PLA-802 through inhibiting TGF- $\beta$ 1 signaling pathwayLIU Dewei<sup>1</sup>, YANG Ming<sup>2</sup>, LI Yongguo

(1. Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University;

2. Criminal Police Detachment, Technology Brigade, Nanchong Public Security in Sichuan)

**【Abstract】Objective:** To observe the inhibitory effect of Curcumin on human alveolar rhabdomyosarcoma cell line PLA-802 in vitro, to detect the expressions of TGF- $\beta$ 1 and Smad 4, and to explore its potential mechanisms. **Methods:** Human alveolar rhabdomyosarcoma cell line PLA-802 was cultured and treated with Curcumin at different concentration and at different time points. The effect of Curcumin on PLA-802 cell proliferation was studied by means of MTT; the cell cycle was detected with flow cytometry; RT-PCR and western blot were used to detect the expressions of TGF- $\beta$ 1 and Smad 4 at mRNA and protein levels. **Results:** The viability of PLA-802 cells treated with Curcumin was obviously decreased ( $P < 0.05$ ). Analysis of the cell cycle revealed that Curcumin induced a significant decrease in cells in the S phase and an increase in cells in the G<sub>1</sub> phase ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the expressions of TGF- $\beta$ 1 and its downstream factor-Smad 4 at mRNA and protein levels were inhibited by Curcumin in a concentration and time dependent manner ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Curcumin perhaps plays its inhibitory effects on PLA-802 cells through inhibiting the activity of TGF- $\beta$ 1 signaling pathway, which will provide an important therapeutic potential for treating human alveolar rhabdomyosarcoma.

**【Key words】**Curcumin; TGF- $\beta$ 1 signaling pathway; alveolar rhabdomyosarcoma

横纹肌肉瘤 (Rhabdomyosarcoma, RMS) 是常见的儿童软组织恶性肿瘤, 多来源于胚胎间质的横纹肌。根据其形态表现和临床特点分为四类: 胚胎型、肺泡型、葡萄状型和多形性 RMS。目前手术、化疗、放疗等多种治疗手段已经广泛用于 RMS 的治疗, 并取得了一定的疗效, 但总的预后不佳<sup>[1]</sup>。研究提示

TGF- $\beta$ 1 可能成为治疗 RMS 的新靶点<sup>[2-4]</sup>。

姜黄素是一种天然的酚类抗氧化剂, 具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤作用<sup>[5]</sup>。姜黄素能够通过抑制 TGF- $\beta$ 1 的活性而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[6,7]</sup>, 而对软组织肉瘤的作用, 特别是 RMS 几乎没有报道。因此, 本研究旨在通过研究姜黄素对人 RMS 细胞株 PLA-802 的抑制作用, 以及对细胞内 TGF- $\beta$ 1/Smad4 的表达的影响, 探讨姜黄素抑制 RMS 细胞生长的可能机制, 为治疗 RMS 提供新的思路。

作者介绍: 刘德伟 (1983-), 男, 法医师,

研究方向: 法医病理学。

通信作者: 李勇国, 男, 高级实验师, Email: liyg6465@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

1.1.1 细胞 PLA-802 细胞用 DMEM (含 10% 的胎牛血清) 培养基, 于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

1.1.2 试剂 姜黄素总 RNA 提取试剂 Biozol、RT-PCR 反应试剂盒、PVDF 膜 (Millipore, US)、抗体 TGF-β1 和 Smad4。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 实验分组: DMEM 对照组、姜黄素组 (5、10、20、40、80 μmol/L)。时间相点分为处理 12、24、48 h 和 72 h。PLA-802 细胞以 10<sup>4</sup> 个/ml 密度接种于 96 孔板, 每组设定 6 个平行孔。细胞贴壁 24 h 后, 分别加入上述不同浓度的药物处理不同的时间点, 酶标仪测定细胞的吸光值 (A<sub>490 nm</sub>), 然后计算抑制率。抑制率 = (1 - 处理组 A<sub>490 nm</sub> / 对照组 A<sub>490 nm</sub>) × 100%。

1.2.2 流式细胞仪检测 根据实验分组, 用药物处理 PLA-802 细胞作用 48 h (根据 MTT 结果筛选出的最佳作用时间点) 后, 用 PBS 冲洗细胞, 75% 的预冷乙醇固定过夜, PI 染色后流式细胞仪检测其细胞周期。

1.2.3 RT-PCR 检测 设计和合成引物, TGF-β1, 5'-GCT AAT GGT GGA CCG CAA CAA C-3' (sense), 5'-CAG CAG CCG GTT ACC AAG-3' (antisense); Smad4, 5'-CAG CTA TAA CTA CAA ATG GAG C-3' (sense), 5'-TTG TTC AAT GGC CGA TCC CAT -3' (antisense); β-actin, 5'-CTC GTC ATA CTC CTG CTT GCT G 3', 5'-CGG GAC CTG ACT GAC TACC TC 3'。按常规步骤提取总 RNA, 然后进行反转录和 PCR 扩增。最后的产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 终产物片段长度为分别为 229、338、546 bp。用 Bio-rad 凝胶成像系统软件分别测定 TGF-β1、Smad4 和 β-actin mRNA 的吸光度值, 然后计算其比值表示结果, 即: 相对吸光度 (A) = 目的基因 mRNA A 值 / β-actin mRNA A 值。

1.2.4 Western blot 检测 收集细胞提取总蛋白, 并测定蛋白的浓度为 (2.05 ± 0.12) mg/ml。取蛋白样品 25 μl, 经过 SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白电转移至 PVDF 膜, 以 5% 脱脂奶粉 TBST 液封闭后, 加入一抗 4 ℃ 孵育过夜, 洗涤后加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h 后, ECL 底物化学发光显色后曝光显影。通过 Chemi DocXRS 化学发光成像系统, 进行曝光分析, 然后计算其比值表示结果, 即: 相对吸光度 (A) = 目的蛋白 A 值 / β-actin 蛋白 A 值。

### 1.3 统计学分析

所有数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用统计软件 SPSS11.0 进行数据分析。多组间均值的比较采用重复测量设计的方差分析。实验组与对照组比较采用 Dunnett-t 检验。

## 2 结果

### 2.1 Curcumin 对 PLA-802 细胞生长的抑制作用

检查结果显示, 当姜黄素浓度为 5、10、20 μmol/L 时, 与对照组比较, PLA-802 细胞的 A<sub>490 nm</sub> 值变化不大, 而当浓度为 40、80 μmol/L 时, A<sub>490 nm</sub> 值明显低于对照组, 且差异有统计学

意义 ( $P < 0.05$ )。而当相同浓度的姜黄素处理不同时间后, PLA-802 细胞的 A<sub>490 nm</sub> 值均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见图 1)。所有结果表明, 姜黄素对 PLA-802 细胞有生长抑制作用, 且这种作用呈显著的浓度-时间依赖性。

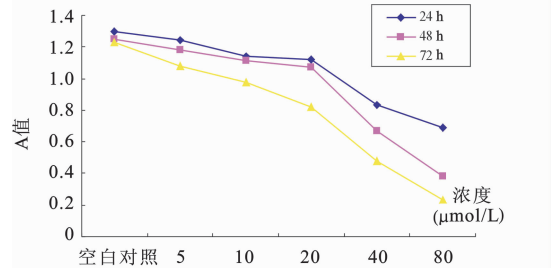


图 1 姜黄素对 PLA-802 细胞的生长抑制作用

Fig. 1 Inhibition of Curcumin on the growth of PLA-802 cells

表 1 不同浓度姜黄素对 PLA-802 细胞 A 值的影响

Tab. 1 Effects of different dosages of Curcumin on the A values in PLA-802 cells

浓度/时间	24 h	48 h	72 h
对照组	1.25 ± 0.12	1.18 ± 0.09	1.20 ± 0.11
5 μmol/L	1.21 ± 0.17	1.15 ± 0.12	1.14 ± 0.25
10 μmol/L	1.11 ± 0.08	1.01 ± 0.11	0.98 ± 0.14
20 μmol/L	1.01 ± 0.20 *	0.87 ± 0.15#	0.82 ± 0.21 *
40 μmol/L	0.83 ± 0.19 *	0.67 ± 0.13#	0.49 ± 0.09 *
80 μmol/L	0.67 ± 0.17 **	0.38 ± 0.12##	0.23 ± 0.12 **

注: \*,  $P < 0.05$ , 与对照组相比较; \*\*,  $P < 0.01$ , 与对照组相比较;

#,  $P < 0.05$ , 与对照组相比较; ##,  $P < 0.01$ , 与对照组相比较;

★,  $P < 0.05$ , 与对照组相比较; ★★,  $P < 0.01$ , 与对照组相比较

### 2.2 姜黄素对 PLA-802 细胞的细胞周期的影响

与对照组比较, 当姜黄素浓度为 5、10、20 μmol/L 时, 处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 的 PLA-802 细胞的比例差异无统计学意义; 而随着姜黄素浓度的增加, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 的 PLA-802 细胞的比例较对照显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 S 期和 G<sub>2</sub>/M 的比例则显著下降 ( $P < 0.05$ ) (见图 2)。

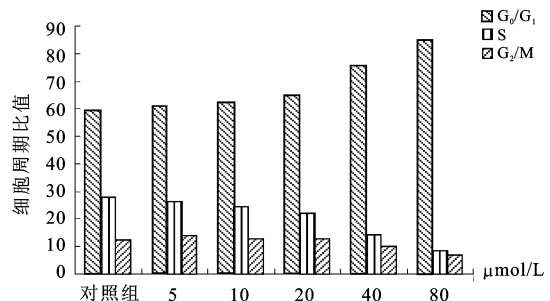


图 2 姜黄素对 PLA-802 细胞周期的影响

Fig. 2 Effects of Curcumin on the cell cycle of PLA-802 cells

### 2.3 姜黄素对 PLA-802 细胞中 TGF-β1 mRNA 和蛋白水平的抑制作用

结果显示, 经姜黄素处理后, PLA-802 细胞中 TGF-β1 mRNA 和蛋白水平的表达较对照组有显著下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且这种抑制作用呈浓度-时间依赖性 ( $P$

<0.05)(见图3)。

表 2 不同浓度姜黄素对 PLA-802 细胞周期的影响  
Tab.2 Effects of different dosage of Curcumin on the cell cycle of PLA-802 cells

组别	细胞周期(%)		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
对照组	60.9±1.8	25.0±2.9	14.1±1.7
5 μmol/L	62.5±2.1	24.6±2.3	12.9±0.9
10 μmol/L	64.9±3.5	22.3±2.9	12.8±3.1
20 μmol/L	69.8±4.9 <sup>*</sup>	17.8±3.2 <sup>*</sup>	12.4±2.0 <sup>*</sup>
40 μmol/L	75.6±2.5 <sup>#</sup>	14.3±3.1 <sup>#</sup>	10.1±1.7 <sup>#</sup>
80 μmol/L	84.7±3.4 <sup>#</sup>	8.5±1.3 <sup>#</sup>	6.8±0.8 <sup>#</sup>

注:\*,*P*<0.05,与对照组相比较;#,*P*<0.01,与对照组相比较

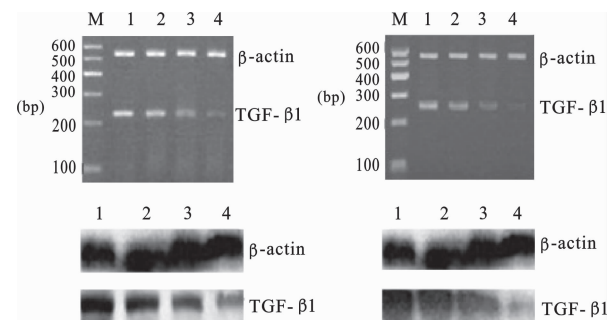


图 3 姜黄素对 PLA-802 细胞中 TGF-β1 mRNA 和蛋白水平表达的影响  
Fig.3 Effects of Curcumin on the expression of TGF-β1 mRNA and protein in PLA-802 cells

2.4 姜黄素对 PLA-802 细胞中 Smad 4 mRNA 和蛋白水平的抑制作用

结果显示,经姜黄素处理后,PLA-802 细胞中 Smad 4 mRNA 和蛋白水平的表达较对照组有显著下降,差异有统计学意义(*P*<0.05),且这种抑制作用也呈浓度-时间依赖性(*P*<0.05)(见图4)。

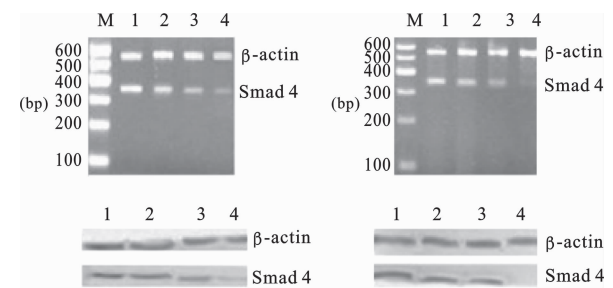


图 4 姜黄素对 PLA-802 细胞中 Smad 4 mRNA 和蛋白水平表达的影响  
Fig.4 Effects of Curcumin on the expression of Smad 4 mRNA and protein in PLA-802 cells

3 讨论

TGF-β1 是一类重要的生长因子,它可以通过影响其下游的靶基因 Smads 家族的成员的表达而发挥其调节细胞增生、分化、凋亡、迁移等重要功能,而 Smads 能够直接地影响或协同地与其它转录因子

作用。Smad 4 是 TGF-β1/Smads 信号通路中的关键的信号转导分子,它能够将来自上游的信号分子转入细胞核内。一旦 Smad 4 的表达受到抑制,那 TGF-β1/Smads 信号转导通路就会被阻断。在肿瘤发展的早期,肿瘤细胞的生长会被 TGF-β1/Smads 信号通路所阻断。如果该通路中的任意一个基因出现变异,就会将信息传递给瘤细胞,避免 TGF-β1 对瘤细胞的生长抑制作用,促进肿瘤的进一步发展。而对于处于进展期的肿瘤,TGF-β1/Smads 则能够促进肿瘤的生长,并增强其侵袭性和肿瘤的恶性程度<sup>[8]</sup>。

Wang 等<sup>[4]</sup>发现 RMS RD 细胞能够异常地分泌 TGF-β1, TGF-β1 受体和表达其下游的分子 Smads。Ye 等<sup>[9]</sup>发现当短发夹 RNA 调节的内源性的 Smad 4 表达沉默,就会阻断 TGF-β1/Smad 信号分子的转导, RD 细胞的生长就会受到抑制。而且,利用 TGF-β1 治疗可以部分抵消 Smad 4-shRNA 对细胞的生长抑制和诱导凋亡的作用。所有这些都提示:TGF-β1/Smad 4 信号通路在 RMS 的发生和发展中起着重要作用,它可能是 RMS 治疗的一个重要靶点。

姜黄素能够抑制多种上皮源性的肿瘤,其抗癌机制十分复杂,主要抑制:多种生长因子<sup>[10]</sup>,酶<sup>[11]</sup>,转录因子<sup>[12]</sup>,激酶<sup>[13]</sup>,抗凋亡蛋白<sup>[14]</sup>等。本实验首先证实了姜黄素对 PLA-802 细胞生长的影响。MTT 结果表明姜黄素能够显著抑制 PLA-802 细胞的生长,且这种抑制作用呈现明显的浓度-时间依赖性。流式细胞术结果显示姜黄素显著降低了处于 S 期的肿瘤细胞数量,大多肿瘤细胞都处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。并且证实了姜黄素处理 PLA-802 细胞前,该肿瘤细胞都能够表达 TGF-β1 和 Smad 4,这与 Wang 等<sup>[15]</sup>所报道的结果一致。利用姜黄素处理细胞后,发现随着姜黄素药物浓度的增加和作用时间的延长,TGF-β1 和 Smad 4 mRNA 和蛋白水平的表达都显著减弱。这表明,姜黄素能够抑制 TGF-β1/Smad 4 信号通路的活性,且这种抑制作用有浓度-时间依赖性。

总之,外源性的姜黄素对 PLA-802 细胞生长的抑制作用可能是通过阻断内源性的 TGF-β1/Smad 4 通路的活性实现的,这将为临床治疗 RMS 提供一个新的理论。但是,姜黄素抑制 TGF-β1/Smad 4 信号通路的确切机制仍需要进一步研究,而体内研究也需要进一步开展,以便为将姜黄素作为预防或治疗 RMS 的有效的药物提供最为充分的依据。

参 考 文 献

[1] Stevens M. Treatment for children rhabdomyosarcoma: the cost of cure[J]. Lancet Oncol,2005,6(2):77-84.

## 基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.012

下调肝癌衍生生长因子表达水平对胶质瘤  
U373 细胞增殖及凋亡的影响

陆红,王霞

(新疆医科大学第五附属医院门诊部,乌鲁木齐 830011)

**【摘要】**目的:研究下调肝癌衍生生长因子(Hepatoma-derived growth factor,HDGF)的表达水平对胶质瘤细胞 U373 增殖及凋亡能力的影响。方法:设计并合成 HDGF 靶向 siRNA,以脂质体为介质瞬时转染入 U373 细胞,采用 RT-PCR 及 Western blot 检测 HDGF 基因及蛋白表达水平的变化,判断 RNA 干扰的效果、流式及 MTT 法检测细胞凋亡及增殖变化。结果:用脂质体瞬时转染 siRNA 至 U373 细胞中,RT-PCR 及 Western blot 实验结果证实转染 48 h 后,U373 细胞中 HDGF 基因及蛋白表达水平明显下调。MTT 结果显示,RNAi 下调 HDGF 后的 U373 细胞相对于空白和阴性对照组,细胞在体外增殖能力明显减弱( $P < 0.01$ ),U373 细胞凋亡率明显上升( $P < 0.05$ )。结论:HDGF 蛋白在胶质瘤的发生发展过程中起着促进作用,可能成为一个新的肿瘤分子治疗靶点。

**【关键词】**肝癌衍生生长因子;胶质瘤;RNA 干扰**【中国图书分类法分类号】**R730.264**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-12-23Effects of down-regulating hepatoma derived growth factor of glioma  
on the proliferation and apoptosis of U373 cells

LU Hong, WANG Xia

(Department of Outpatient, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University)

**【Abstract】Objective:** To evaluate the effects of down-regulating hepatoma derived growth factor (HDGF) of glioma on the proliferation and apoptosis of U373 cells. **Methods:** siRNA targeting human HDGF gene was designed and transfected transiently into U373 cells by lipo-

作者介绍:陆红(1961-),女,副主任医师,  
研究方向:恶性肿瘤化疗。

[2] Wang H, Yang G H, Bu H, et al. Systematic analysis of the TGF- $\beta$ -Smad signaling pathway in the rhabdomyosarcoma cell line RD[J]. Int J Exp Pathol, 2003, 84(3):153-163.

[3] Ye L, Zhang H, Zhang L, et al. Effects of RNAi-mediated Smad4 silencing on growth and apoptosis of human rhabdomyosarcoma cells[J]. Int J Oncol, 2006, 29(5):1149-1157.

[4] Wang H, Yang G H, Bu H. The expression of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$  receptor in human rhabdomyosarcoma[J]. Clin Exp Pathol (Chinese), 2002, 18(1):61-64.

[5] Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials[J]. Cell. Mol. Life Sci, 2008, 65(11):1631-1652.

[6] Jiang Z Y, Zou L, Shi S S, et al. Effects of curcumin on TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in serum and lung tissue of SiO<sub>2</sub>-induced fibrosis in mice[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2009, 25(5):399-400.

[7] Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-MAPK-dependent signaling in human ovarian cancer[J]. J Biol Chem, 2004, 279(10):8567-8576.

[8] Maurice D, Pierreux C E, Howell M, et al. Loss of Smad4 function in pancreatic tumors; C-terminal truncation leads to decreased stability[J]. J Biol Chem, 2001, 276(46a):43175-43181.

[9] Ye L, Zhang H, Zhang L, et al. Effects of RNAi-mediated Smad4 silencing on growth and apoptosis of human rhabdomyosarcoma cells[J]. Int J Oncol, 2006, 29(5):1149-1157.

[10] Saunders J A, Rogers L C, Klomsiri C, et al. Reactive oxygen species mediate lysophosphatidic acid induced signaling in ovarian cancer cells[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(12):2058-2067.

[11] Bilmen J G, Khan S Z, Javed M H, et al. Inhibition of the SERCA Ca<sup>2+</sup> pumps by curcumin. Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(23):6318-6327.

[12] Sullivan D E, Perris M, Nguyen H, et al. TNF- $\alpha$  induces TGF- $\beta$ 1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation[J]. Cell Mol Med, 2009, 13(8B):1866-1876.

[13] Lou J R, Zhang X X, Zheng J, et al. Transient metals enhance cytotoxicity of curcumin: potential involvement of the NF- $\kappa$ B and mTOR signaling pathways[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9):3249-3255.

[14] Li J, Wang Y, Yang C, et al. Polyethylene glycosylated curcumin conjugate inhibits pancreatic cancer cell growth through inactivation of Jab1[J]. Mol Pharmacol, 2009, 76(1):81-90.

[15] Wang S L, Yang G H, Bu H, et al. The protein expression of TGF- $\beta$ 1 signaling pathway in rhabdomyosarcoma[J]. Tumor, 2004, 24(5):440-443.

(责任编辑:唐秋姗)