

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.011

姜黄素通过 TGF- β 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¹, 杨明², 李勇国¹

(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- β 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- β 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 G₁ 期 ($P < 0.05$)。而 TGF- β 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- β 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】2011-05-24

Inhibitory effect of Curcumin on human alveolar rhabdomyosarcoma cell line PLA-802 through inhibiting TGF- β 1 signaling pathway

LIU Dewei¹, YANG Ming², 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-beta1 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- β 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 G₁ phase ($P < 0.05$). Furthermore, the expressions of TGF- β 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 the activity of TGF- β 1 signaling pathway, which will provide an important therapeutic potential for treating human aleovar rhabdomyosarcoma.

【Key words】Curcumin; TGF- β 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^[1]。研究提示

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。

TGF- β 1 可能成为治疗 RMS 的新靶点^[2~4]。

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^[5]。姜黄素能够通过抑制 TGF- β 1 的活性而抑制肿瘤细胞的生长^[6,7], 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- β 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。

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 °C、5% CO₂ 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 10⁴ 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_{490 nm}),然后计算抑制率。抑制率 = (1-处理组 A_{490 nm}/对照组 A_{490 nm}) × 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 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 °C 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(̄x ± 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 Dunnnett-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_{490 nm} 值变化不大,而当浓度为 40、80 μmol/L 时, A_{490 nm} 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_{490 nm} 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。

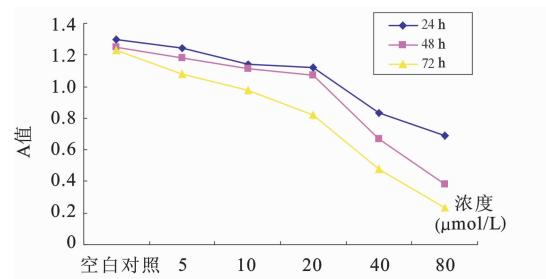


图 1 姜黄素对 PLA-802 细胞的生长抑制作用

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 G₀/G₁ 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,G₀/G₁ 的 PLA-802 细胞的比例较对照显著增加($P < 0.05$),而 S 期和 G₂/M 的比例则显著下降($P < 0.05$)(见图 2)。

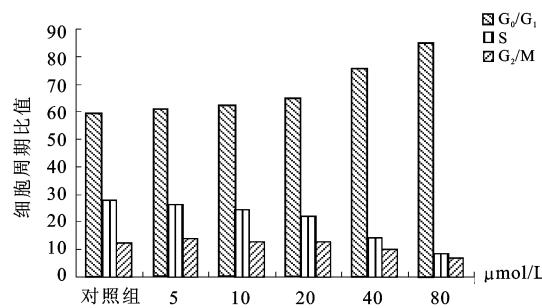


图 2 姜黄素对 PLA-802 细胞周期的影响

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 ₀ /G ₁	S	G ₂ /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 [*]	17.8 ± 3.2 [*]	12.4 ± 2.0 [*]
40 μmol/L	75.6 ± 2.5 [#]	14.3 ± 3.1 [#]	10.1 ± 1.7 [#]
80 μmol/L	84.7 ± 3.4 [#]	8.5 ± 1.3 [#]	6.8 ± 0.8 [#]

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

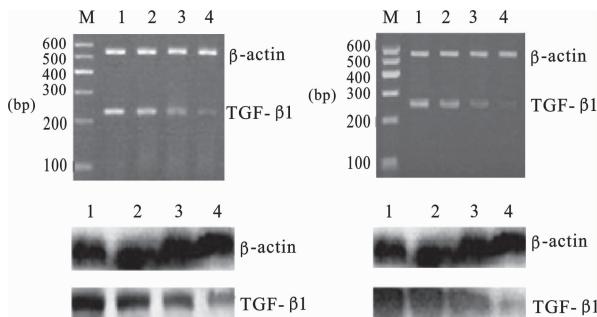


图 3 姜黄素对 PLA-802 细胞中 TGF-β1 mRNA 和蛋白水平表达的影响

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)。

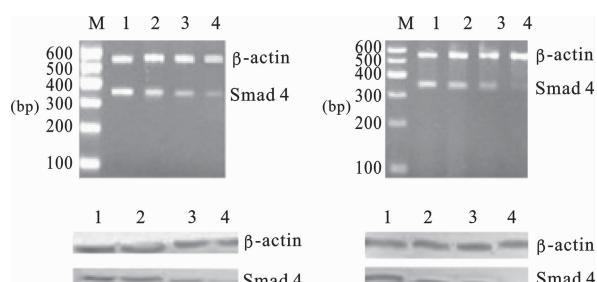


图 4 姜黄素对 PLA-802 细胞中 Smad 4 mRNA 和蛋白水平表达的影响

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的转录因子

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^[8]。

Wang 等^[4]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^[9]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^[10],酶^[11],转录因子^[12],激酶^[13],抗凋亡蛋白^[14]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 G₀/G₁ 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^[15]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,NAi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】2011-12-23

Effects 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-β1 and TGF-β receptor in human rhabdomyosarcoma[J]. Clin Exp Pathol (Chinese), 2002, 18(1):61-64.
- [5] Hatchera 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 SiO₂-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-beta1 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 Ca²⁺ 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-beta1 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-kappaB 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-beta1 signaling pathway in rhabdomyosarcoma[J]. Tumor, 2004, 24(5):440-443.

(责任编辑:唐秋姗)