

姜黄素对人胰腺癌细胞增殖抑制作用 及对 Wnt 信号通路的影响

宋 魏 崔 云 张建波 孙淼淼 夏庆欣

(郑州大学附属肿瘤医院, 郑州, 450001)

摘要 目的:探究姜黄素对人胰腺癌 SW1990 细胞增殖抑制作用及对 Wnt 信号通路的影响。方法:低/中/高剂量观察组人胰腺癌 SW1990 细胞分别以终浓度为 20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理, 100 μL /孔, 对照组细胞则以等体积生理盐水处理, 分别干预 24、48、72 h。以噻唑蓝 (MTT) 法及 Annexin-V/FITC 双染法分别检测人胰腺癌细胞 SW1990 增殖及凋亡情况, 反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法及细胞爬片免疫细胞化学技术检测人胰腺癌细胞 SW1990 β -链蛋白 (β -Catenin) mRNA 及 β -Catenin 蛋白表达情况。结果:干预 72 h 后低/中/高剂量观察组人胰腺癌 SW1990 细胞增殖抑制率 (%) 分别为 (4.59 ± 1.32) 、 (40.01 ± 3.87) 、 (60.98 ± 5.97) ; 对照组及低/中/高剂量观察组人胰腺癌 SW1990 细胞凋亡率 (%) 分别为 (8.14 ± 1.25) 、 (13.04 ± 1.03) 、 (27.15 ± 1.62) 、 (59.21 ± 1.46) ; β -Catenin 蛋白免疫细胞化学 (ICC) 评分 (分) 分别为 (5.78 ± 0.56) 、 (4.42 ± 0.61) 、 (2.57 ± 0.58) 、 (1.38 ± 0.63) 。观察组凋亡率显著高于对照组, β -Catenin mRNA 相对表达量及 β -Catenin 蛋白 ICC 评分显著低于对照组 ($P < 0.05$), 且增殖抑制率、凋亡率随姜黄素作用浓度增加逐渐升高 ($P < 0.05$), 增殖抑制率亦随干预时间延长逐渐升高 ($P < 0.05$); β -Catenin mRNA 相对表达量及 β -Catenin 蛋白 ICC 评分随姜黄素作用浓度增加逐渐降低 ($P < 0.05$)。结论:姜黄素可有效下调人胰腺癌细胞 SW1990 β -Catenin 基因表达, 抑制 Wnt 信号通路活化, 具有显著的增殖抑制作用, 且具有明显的时间-剂量依赖性。

关键词 胰腺癌细胞; 姜黄素; 增殖抑制; Wnt 信号通路

Effects of Curcumin on Proliferation Inhibition of Human Pancreatic Cancer Cell and the Influence on Wnt Signaling Pathway

Song Wei, Cui Yun, Zhang Jianbo, Sun Miaomiao, Xia Qingxin

(Zhengzhou University Affiliated Tumor Hospital, Zhengzhou 450001, China)

Abstract Objective: To explore the proliferation inhibition effect of curcumin on human pancreatic cancer SW1990 cell and the influence on Wnt signaling pathway. **Methods:** The human pancreatic cancer cells SW1990 in experimental-L/M/H group were treated with final concentration of 20, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, 100 μL /hole, and cells in control group were treated with isovolumetric saline. Each group was intervened for 24, 48, 72 h respectively. The proliferation and apoptosis were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method and Annexin-V/FITC double staining respectively, expression of β -Catenin mRNA and β -Catenin protein in human pancreatic cancer SW1990 cell were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) method and cell climbing immunocytochemistry technique respectively. **Results:** 72 h after intervened, the proliferation inhibition rates (%) of human pancreatic cancer SW1990 cell in experimental-L/M/H group were 4.59 ± 1.32 , 40.01 ± 3.87 , 60.98 ± 5.97 respectively; Apoptosis rates (%) in control group and experimental-L/M/H group were 8.14 ± 1.25 , 13.04 ± 1.03 , 27.15 ± 1.62 , 59.21 ± 1.46 respectively; β -Catenin protein immunocytochemistry (ICC) score (score) were 5.78 ± 0.56 , 4.42 ± 0.61 , 2.57 ± 0.58 , 1.38 ± 0.63 respectively. The apoptosis rate in experimental groups were higher than that in control, and β -Catenin mRNA relative expression and β -Catenin protein ICC score were lower than those in control group ($P < 0.05$), and the proliferation inhibition rate, apoptosis rate in experimental groups increased gradually with the increase of curcumin action concentration ($P < 0.05$). Proliferation inhibition also increased gradually with the lengthen of action time ($P < 0.05$); the β -Catenin mRNA relative expression and β -Catenin protein ICC score decreased gradually with the increase of curcumin action concentration ($P < 0.05$). **Conclusion:** Curcumin can down-regulate the expression of β -Catenin in human pancreatic cancer SW1990 cell effectively, inhibit the Wnt signaling pathway excitation, and has significant proliferation inhibition effect, which has an obvious time-dose dependence.

Key Words Pancreatic cancer cell; Curcumin; Proliferation inhibition; Wnt signaling pathway

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.05.044

胰腺癌是临床比较常见消化系统肿瘤,绝大多数患者发病时已经处于中晚,患者手术切除控制率不足20%,5年生存率低下,影响预后。姜黄素是由姜科植物姜黄中所提取的多酚类色素,其药理学作用广泛,近年来许多研究^[1-2]证实其可有效抑制多种肿瘤的生长及转移,参与多种抗肿瘤途径,具有直接及间接的抗肿瘤作用,但目前有关其对人胰腺癌的抗肿瘤作用及机制研究尚少,本研究旨在探究姜黄素对人胰腺癌细胞SW1990的增殖抑制作用,并初步分析其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胰腺癌SW1990细胞,由中国科学院上海生物研究所馈赠。

1.1.2 试剂与仪器 姜黄素(纯度>98%,美国Sigma公司,生产批号:B6938);噻唑蓝(MTT)试剂盒及Annexin-V/FITC双染凋亡检测试剂盒(上海贝博生物公司);反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);兔抗 β -链蛋白(β -Catenin)(美国Cell Signaling Technology公司)等。主要仪器AccuriC6型流式细胞仪(美国BD公司);JYH27020电泳仪及T100型PCR仪(美国Bio-Rad公司);XSP-11CC倒置生物显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 人胰腺癌SW1990细胞培养、分组与干预 取人胰腺癌SW1990细胞^[3],加含10%胎牛血清及青链霉素的RPMI-1640培养基置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,每2~3d换液1次,待细胞生长至85%左右融合时以0.25%胰酶消化并常规传代培养,取对数期细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,接种于96孔板中,低/中/高剂量观察组人胰腺癌细胞SW1990分别以终浓度为20、50、100 μ mol/L姜黄素处理,100 μ L/孔,对照组细胞则以等体积生理盐水处理,各孔均设置8个复孔,分别干预24、48、72 h。

1.2.2 MTT法检测人胰腺癌SW1990细胞增殖情况 细胞分组及处理同1.2.1,各组分别干预24、48、72 h后,加5 mg/mL MTT溶液,20 μ L/孔,37℃孵育4 h,加二甲基亚砜,150 μ L/孔,检测各孔490 nm下吸光度值OD_{490 nm},计算人胰腺癌SW1990细胞增殖抑制率=(1-观察组OD_{490 nm}/对照组OD_{490 nm}) $\times$ 100%。实验重复3次^[4]。

1.2.3 Annexin-V/FITC双染法^[5]检测人胰腺癌

SW1990细胞凋亡情况 细胞分组及处理同1.2.1,干预72 h后收集各组细胞,1 000 r/min离心5 min,加195 μ L缓冲液悬浮细胞,加5 μ L Annexin V-FITC避光孵育15 min,然后加10 μ L碘化丙啶(PI)冰浴避光孵育10 min,1 h内以流式细胞仪检测人胰腺癌SW1990细胞凋亡率,实验重复3次。

1.2.4 RT-PCR法^[6]检测人胰腺癌SW1990细胞 β -Catenin mRNA表达情况 细胞分组及处理同1.2.1,干预72 h后收集各组细胞,提取细胞总RNA,反转录为cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增。经凝胶成像分析系统进行扫描、分析,以 β -actin为参照,计算各组人胰腺癌SW1990细胞 β -Catenin mRNA相对表达量。

1.2.5 细胞爬片免疫细胞化学技术^[7]检测人胰腺癌SW1990细胞 β -Catenin蛋白表达情况 取对数期人胰腺癌SW1990细胞,调整密度为 1×10^5 个/mL,接种于6孔板,各孔底部均铺有无菌载玻片,常规培养6 h后待细胞贴壁生长进行分组及处理,同1.2.1,各孔设6个复孔,干预72 h后,将细胞爬片以4%多聚甲醛固定15 min,免疫细胞化学技术染色,于倒置生物显微镜下以DAB显色并观察。细胞浆或细胞核呈棕黄色为阳性着色,无阳性计0分;阳性细胞1%~30%计1分;阳性细胞31%~70%计2分;阳性细胞71%~100%计3分,据着色强度无、浅黄色、黄色、棕黄色依次计0、1、2、3分,免疫细胞化学评分(ICC评分)=阳性细胞比例评分 $\times$ 着色强度评分。实验重复3次。

1.3 统计学方法 应用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较进行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对人胰腺癌SW1990细胞增殖及凋亡的影响 MTT检测显示,干预72 h后低/中/高剂量观察组人胰腺癌SW1990细胞增殖抑制率(%)分别为(4.59 $\pm$ 1.32)、(40.01 $\pm$ 3.87)、(60.98 $\pm$ 5.97);观察组细胞增殖抑制率随姜黄素作用浓度增加及干预时间延长逐渐升高($P < 0.05$)。见图1。Annexin-V/FITC双染法检测显示,干预72 h后对照组及低/中/高剂量观察组人胰腺癌SW1990细胞凋亡率(%)分别为(8.14 $\pm$ 1.25)、(13.04 $\pm$ 1.03)、(27.15 $\pm$ 1.62)、(59.21 $\pm$ 1.46);观察组细胞凋亡率高于对照组($P < 0.05$),且随姜黄素作用浓度增加逐渐升高($P < 0.05$)。

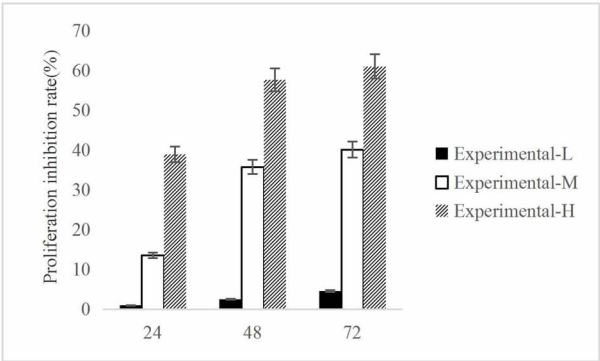


图1 人胰腺癌 SW1990 细胞增殖情况

2.2 姜黄素对人胰腺癌 SW1990 细胞 β -Catenin mRNA 表达的影响 干预 72 h 后对照组及低/中/高剂量观察组人胰腺癌细胞 β -Catenin mRNA 相对表达量分别为 (0.97 ± 0.10) 、 (0.80 ± 0.09) 、 (0.43 ± 0.11) 、 (0.21 ± 0.08) 。观察组细胞 β -Catenin mRNA 相对表达量较对照组降低 ($P < 0.05$), 且随姜黄素作用浓度增加逐渐降低 ($P < 0.05$)。见图 2。



图2 人胰腺癌 SW1990 细胞 β -链蛋白 mRNA 表达情况

2.3 姜黄素对人胰腺癌 SW1990 细胞 β -Catenin 蛋白表达的影响 观察组人胰腺癌 SW1990 细胞 β -Catenin 蛋白免疫细胞化学 (Immunocytochemistry, ICC) 评分高于对照组 ($P < 0.05$), 且随姜黄素作用浓度增大逐渐降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表1 姜黄素对人胰腺癌 SW1990 细胞 β -链蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	株数	ICC 评分
对照组	18	5.78 ± 0.56
姜黄素低剂量组	18	4.42 ± 0.61 *
姜黄素中剂量组	18	2.57 ± 0.58 * △
姜黄素高剂量组	18	1.38 ± 0.63 * △ ▲

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, △ $P < 0.05$; 与中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$

3 讨论

中医药在我国肿瘤的防治中有着悠久的历史, 其将胰腺癌归属于传统中医学理论中的“黄疸”“积聚”“伏梁”“痞块”等范畴, 主要病因为六淫邪毒侵袭, 情志不畅等导致气血津液运行不畅, 脏腑功能失调, 导致气滞、血瘀、热毒、痰湿等凝结于脏腑, 日久积聚而成痞块, 故治疗应遵循清热化湿、理气散结原则。姜黄姜黄素是姜黄的主要化学成分, 取自其根茎, 姜黄味苦、辛, 性温, 归脾、肝经, 可入气行气散

滞、活血化瘀等。姜黄素药理学作用广泛, 如抗癌、抗氧化、抗炎、抗纤维化等, 且具有毒性小、价廉、抗癌谱广等优势。近年来其抗肿瘤作用受到关注, 研究^[8]报道, 其对喉癌、乳腺癌、食管癌等具有显著的治疗效果; 且体外研究^[9]证实, 姜黄素可对喉癌 Hep-2 具有增殖抑制作用, 且呈明显时间-剂量依赖性; 蔡少鑫^[10]研究报道, 姜黄素可通过 HIF-1 α 抑制乳腺癌 MDA-MB-453 细胞增殖及转移; 本研究中观察组人胰腺癌 SW1990 细胞凋亡率高于对照组, 且增殖抑制率、凋亡率随姜黄素作用浓度增加逐渐升高, 增殖抑制率亦随干预时间延长逐渐升高, 提示姜黄素对人胰腺癌细胞也有显著的增殖抑制作用, 并呈明显的时间-剂量依赖性。

姜黄素可直接作用于细胞内相关蛋白及基因, 调节细胞间信号传导通路, 达到抗肿瘤的目的。本研究中观察组人胰腺癌 SW1990 细胞 β -Catenin mRNA 相对表达量及 β -Catenin 蛋白 ICC 评分低于对照组, 且随姜黄素作用浓度增加逐渐降低, 提示姜黄素对人胰腺癌 SW1990 细胞的增殖抑制作用可能与其显著下调 β -Catenin 表达, 抑制 Wnt 信号通路活化相关, 有关姜黄素抗胰腺癌的其他作用机制仍需进一步深入研究。

参考文献

[1] 张博, 叶丽红. 姜黄素抗癌机制研究进展[J]. 中医药学报, 2013, 41(1): 121-122, 封3.

[2] Vallianou NG, Evangelopoulos A, Schizas N, et al. Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin[J]. Anticancer Res, 2015, 35(2): 645-651.

[3] 姚义荣, 王莹, 刘军权, 等. 白桦脂酸对人 NK 细胞杀伤 SW1990 胰腺癌细胞影响及机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(1): 34-38.

[4] 代荣钦, 秦涛, 秦秉玉, 等. 丙戊酸钠对胰腺癌细胞株 SW1990 增殖和凋亡的影响及机制[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(1): 21-23.

[5] 姜鲜, 张红, 李佳, 等. 白藜芦醇对脂多糖诱导血管内皮细胞凋亡影响[J]. 现代预防医学, 2014, 41(11): 2053-2055.

[6] 李立方. 姜黄素对人胰腺癌细胞 SW1990 增殖及凋亡的影响及其机制研究[D]. 开封: 河南大学, 2014.

[7] 卞保祥, 宋子琰, 熊光苏. 舒林酸对人胰腺癌细胞 PANC-1 增殖和凋亡的影响及机制探讨[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 28(7): 23-26.

[8] 黄果, 王佑权, 谭米多, 等. 姜黄素抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 肿瘤药学, 2014, 4(5): 328-331.

[9] 闫茂生, 尹航, 李先明, 等. 姜黄素抑制喉癌 Hep2 细胞系增殖的 Rho/ROCK 机制研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(14): 1149-1152.

[10] 蔡少鑫, 陈成, 杨熹, 等. 姜黄素调控乳腺癌细胞增殖与转移机制研究[J]. 医药导报, 2013, 32(5): 561-564.