

姜黄素对鼻咽癌细胞 RECK 基因甲基化以及 MMP-9 表达与活性的影响

王柏琦^{1,2}, 陈艳华¹, 蒋丽琴¹, 程爱兰²

(1. 南华大学附属第二医院肿瘤内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所)

摘要: **目的** 探讨姜黄素对鼻咽癌细胞回复诱导半胱氨酸丰富蛋白含 kazal 基元 (RECK) 基因甲基化以及基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 表达的影响。 **方法** 体外培养鼻咽癌细胞系 CNE-1, 用 1、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, 采用 Western blot 和实时定量 PCR 分别检测 RECK、MMP-9 蛋白和 mRNA 表达; 高效液相色谱-电喷雾质谱检测 RECK 甲基化; MTT 法检测 CNE-1 细胞的增殖。同时采用明胶酶谱实验观察姜黄素处理前后 MMP-9 酶活性变化。 **结果** CNE-1 细胞未刺激时 RECK 表达水平较低, 而经 1 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, 能显著增强 RECK 蛋白和 mRNA 的表达。高效液相色谱-电喷雾质谱结果显示, 30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, RECK 启动子、全基因组以及细胞核内甲基化水平分别降低为 $(69.04 \pm 10.62)\%$ 、 $(61.13 \pm 7.08)\%$ 、 2.80 ± 1.32 。同时, 姜黄素能显著降低 CNE-1 细胞中 MMP-9 蛋白和 mRNA 表达以及 MMP-9 的酶活性。 **结论** 姜黄素可能通过能上调 RECK 基因表达, 降低细胞内甲基化水平, 从而抑制 MMP-9 的表达与活性而发挥对 CNE-1 细胞生长抑制作用。

关键词: 鼻咽癌; 回复诱导半胱氨酸丰富蛋白含 kazal 基元; 甲基化; 姜黄素

中图分类号: R739.62

文献标识码: A

Effect of Curcumin on RECK Methylation and MMP-9 Expression and Activity in Nasopharyngeal Carcinoma Cells

WANG Baiqi, CHEN Yanhua, JIANG Liqin, et al

(Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of curcumin on reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) gene methylation, and expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** Nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1 was cultured in vitro, and stimulated by 1, 10 and 30 $\mu\text{mol/L}$ curcumin for 48h, expression of RECK and MMP-9 were detected by Western blot and real-time PCR, respectively. RECK methylation was determined by HPLC chromatographic and mass spectrometric methods. Cell proliferation was assessed by MTT assay. Expression and the enzymic activity of MMP-9 were detected by Western blot and Gelatin zymography assay, respectively. **Results** The expression level of RECK was very low in unstimulated cells, and 1 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ could decrease the protein and mRNA level. HPLC chromatographic and mass spectrometric analysis demonstrated that 30 $\mu\text{mol/L}$ could decrease level of the promoter methylation, global DNA methylation and the methylation activity of the nuclear extract to $(69.04\% \pm 10.62)\%$ 、 $(61.13 \pm 7.08)\%$ 、 2.80 ± 1.32 , respectively, as compared to untreated cells. In addition, curcumin could also decrease the protein and mRNA level of MMP-9, and enzymic activity. **Conclusion** Curcumin increase RECK gene expression and down-regulate its methylation, and then attenuate MMP-9 to inhibit CNE-1 cells growth.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs; methylation

收稿日期: 2013-11-17

基金项目: 国家自然科学基金 (81372894).

作者简介: 王柏琦, 硕士, 主治医师, 研究方向: 鼻咽癌的发病机制与防治, E-mail: wangbaiqi99@126.com. 通讯作者程爱兰, 博士, 教授, 研究方向: 鼻咽癌的发病机制与防治, E-mail: ailan_cheng@hotmail.com.

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma)是我国南方地区最常见的恶性肿瘤之一,EB 病毒感染、遗传因素、营养状况、年龄等均与本病的发生存在一定关联^[1],但其发病机制目前仍不明了。近年来,DNA 甲基化等表观遗传学的改变在肿瘤中的作用日益受到重视^[2]。生理条件下,DNA 甲基化是维持 DNA 稳定性以及 DNA 与蛋白质相互作用所必须^[3]。然而 DNA 异常甲基化也可导致多种癌基因的激活和(或)抑癌基因的失活。其中最常见的抑癌基因包括回返引导半胱氨酸丰富蛋白含 kazal 基元(Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs, RECK)、Ras 相关区域家族 1A(Ras association domain family 1A, RASSF1A)等,这些抑癌基因的失活与鼻咽癌的发生密切相关^[4]。近年来研究显示,RECK 蛋白可抑制机体基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)的水解从而抑制肿瘤细胞血管发生与转移^[4]。

姜黄素是一种二酮类化合物,目前已经研究显示姜黄素对多种肿瘤细胞具有抑制作用^[5]。但迄今为止,姜黄素能否影响鼻咽癌细胞中 RECK 基因的甲基化,目前仍不清楚。本研究拟从姜黄素入手,观察食源性物质能否影响鼻咽癌 CNE-1 细胞系中 RECK 基因的表达和甲基化,并观察其是否能影响 MMP-9 的活性而发挥抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

姜黄素(纯度 98%)为 sigma 产品。DNA 提取试剂盒购自 Qiagen,核蛋白提取试剂盒购自 Pierce。抗 MMP-9 多克隆抗体购自 Santa Cruz, HPR 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物有限公司。EpiQuik DNMT 活性检测试剂盒购自 Epigentek 公司。其他分析纯产品主要购自上海生工生物工程公司。

1.2 细胞培养与 MTT 实验

CNE-1 鼻咽癌细胞系购于 ATCC,用含有 10% FBS 和 1% 青霉素、链霉素的 RPMI-1640 培养基培养,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。MTT 法检测细胞的增殖活性。即 100 μL 细胞(约 3 × 10³)接种于 96 孔板中培养过夜,每组设 3 复孔。第二天换成含 5% 胎牛血清和 1% 青霉素、链霉素的 RPMI-1640 培养基,并加入不同浓度的姜黄素,继续培养 72 h。结束前 4 h 各孔加入 MTT 溶液 20 μL

(5 mg/mL),随后弃上清,并加入 200 μL DMSO,充分混匀,用酶标仪测定各孔的吸光度值(OD₅₇₀),并计算抑制率。抑制率=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值 × 100%。

1.3 Western blot 与甲基化活性分析

细胞处理完毕后,800 rpm 离心 5 min,弃上清,冰冷的 PBS 洗涤细胞两次。加入 200 μL 细胞裂解缓冲液重悬浮细胞(裂解液含蛋白酶抑制剂 cocktail Set III, 1 mM β-甘油磷酸酯、1 mmol/L 钒酸钠、1 mmol/L 氟化钠、1 mmol/L 苯甲磺酰基氟化物, 20 mmol/L pH 7.0 HEPES、150 mmol/L NaCl、0.1% NP-40),冰上裂解 40 min。1 000 rpm 离心 15 min 后,获取上清。经 5%~15% SDS-PAGE 后,Western blot 检测 RECK 或 MMP-9 的表达。同时采用 EpiQuik™ DNMT 试剂盒检测 CNE-1 细胞核蛋白中的甲基化活性。

1.4 DNA 提取和水解

获取 1 × 10⁷ 个姜黄素处理后的 CNE-1 细胞,按照 Qiagen 提供的试剂盒操作步骤提取基因组 DNA 用于全细胞甲基化分析。DNA 根据参考文献提供的方法进行^[6],即 200 ng 基因组 DNA 于 100 ℃、3 min 热处理变性,置于冰上冷却后加入 1/10 体积的醋酸铵(0.1 mol/L, pH 5.3)和 2 U 的核酸酶 P1(Sigma),45 ℃ 孵育 2 h 后加入 1/10 体积的 NH₄HCO₃(浓度 1 mol/L)和 0.002 U 的毒液磷酸二酯酶 I,37 ℃ 孵育 1 h。随后加入 0.5 U 碱性磷酸酶,37 ℃ 培养 1 h。

1.5 高效液相色谱-电喷雾质谱检测 DNA 甲基化

液相色谱包括 HPLC 系统(Agilent 1100 型),色谱柱(Atlantis dC18 柱, Waters),预柱(Waters)。流动相为 0.1% 甲酸-甲醇,流速为 0.2 mL/min。电喷雾离子模式为正离子,扫描范围为 m/z 100~2 000,离子源温度 450 ℃,喷雾电压为 415 kV,破簇电压为 55 V,入口电压 6V。碰撞能电压 13 V,气帘气为 138 kPa,气体 1 为 221 kPa,气体 2 为 379 kPa,碰撞气体为 41 kPa^[6]。采用 Sciex Analyst software 软件(版本 1.3.1)处理数据。

1.6 Real-Time PCR 分析

采用定量 RT-PCR 检测 RECK 和 MMP-9 的表达。细胞处理完毕,用 Trizol 试剂提取总 RNA,取 2 μg RNA 用于 MMP-9 mRNA 分析。反应条件:50 ℃ 2 min,95 ℃ 3 min,然后 95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 40 个循环。反应在 ABI prism 7700 上进行。所得的数据与内参 β-actin 之比作为

相对值。

表 1 姜黄素对 RECK 启动子区域、全基因组以及细胞核 DNA 甲基化的影响

1.7 明胶酶谱实验

姜黄素处理细胞后,获取 25 μL 培养上清用于聚丙烯酰胺凝胶电泳(含 2 mg/mL 明胶 A 和明胶 B)。电泳结束后,卸下凝胶并将其置于 Triton X-100(2.5%)的洗涤液中震荡洗涤以去除 SDS。随后将凝胶放入 100 mL 孵育液中(100 mmol/L Tris, 10 mmol/L CaCl₂),37 ℃中孵育 24 h,经 0.5% 考马斯亮蓝染色并脱色后,用凝胶成像系统拍照。

2 结 果

2.1 姜黄素增加 CNE-1 细胞 RECK mRNA 和蛋白表达

如图 1 所示,CNE-1 细胞基础状态下 RECK 蛋白表达水平较低,而经 10 μmol/L 和 30 μmol/L 姜黄素处理后,细胞内 RECK 蛋白的表达显著增高(图 1A)。与 Western blot 结果类似,real-time PCR 结果显示,不同浓度的姜黄素也能增强其 mRNA 的表达,其趋势与蛋白表达一致(图 1B)。

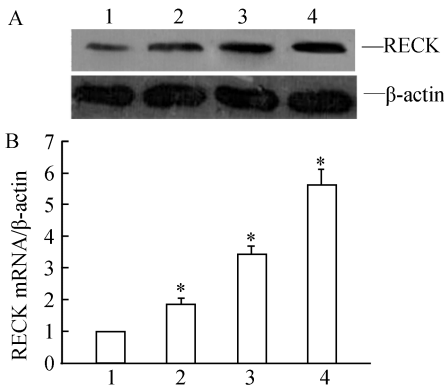


图 1 姜黄素增加 CNE-1 细胞 RECK 蛋白和 mRNA 表达 A:Western blot 检测 RECK 蛋白表达;B:Real time PCR 检测 RECK mRNA 表达. 1:对照组;2:1 μmol/L 姜黄素;3:10 μmol/L 姜黄素;4: 30 μmol/L 姜黄素. 与对照组比较, *:P<0.05

2.2 姜黄素能降低 RECK 启动子区域以及全基因组以及细胞核 DNA 甲基化

高效液相色谱-电喷雾质谱结果显示,30 μmol/L姜黄素处理 CNE-1 细胞后,与对照组相比,RECK 启动子甲基化水平降低为(69.04 ± 10.62)%,全基因组甲基化水平降低为(61.13 ± 7.08)%,CNE-1 细胞核的甲基化活性降为 2.8 ± 1.31,见表 1。

2.3 姜黄素能下调 CNE-1 细胞 MMP-9 的表达水平

Western blot 结果显示,CNE-1 细胞 MMP-9 表达水平较高,1、10、30 μmol/L 姜黄素处理细胞后,MMP-9 蛋白水平显著降低(图 2A)。Real-time PCR 结果也显示其 mRNA 也随着姜黄素浓度的增高而逐渐降低(图 2B)。

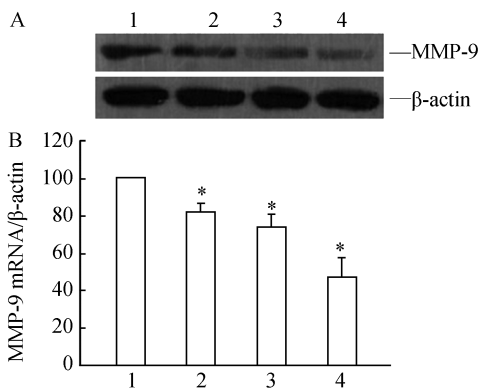


图 2 姜黄素抑制 CNE-1 细胞 MMP-9 蛋白和 mRNA 表达 A:Western blot 检测 MMP-9 蛋白表达;B:Real time PCR 检测 MMP-9 mRNA 表达. 1:对照组;2:1 μmol/L 姜黄素;3:10 μmol/L 姜黄素;4: 30 μmol/L 姜黄素. 与对照组比较, *:P<0.05

2.4 姜黄素对鼻咽癌细胞增殖及 MMP-9 酶活性的影响

CNE-1 细胞在浓度为 10、30 μmol/L 姜黄素作用下的存活率分别为 44% 和 23%。此外,明胶酶谱实验显示,姜黄素也能显著抑制其酶活性,随着姜黄素浓度的增高,酶活性逐渐降低(图 3)。

3 讨 论

肿瘤从原发部位脱落并引起细胞外基质降解,是转移发生的关键步骤。在此过程中,MMPs 发挥至关重要作用,其中以 MMP-9 最为重要^[4,7]。RECK 是调控 MMP-9 蛋白表达与活性的重要分子^[8]。正常情况

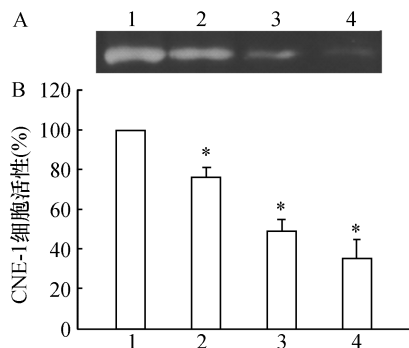


图3 姜黄素对鼻咽癌细胞增殖及 MMP-9 酶活性的影响

A:明胶酶谱实验检测 MMP-9 酶活性;B:MTT 检测 CNE-1 细胞增殖。
1:对照组;2:1 μmol/L 姜黄素;3:10 μmol/L 姜黄素;4:30 μmol/L 姜黄素。与对照组比较,* : $P < 0.05$

下,RECK 基因广泛存在于机体各种组织细胞中,调控细胞的生长增殖等功能。但在各种恶性肿瘤细胞中,RECK 蛋白往往呈低表达,且其基因中存在异常的甲基化,从而导致其功能减弱或消失,最终无法发挥对 MMP-9 的负调控作用而参与肿瘤的发生^[9-10]。本研究证实,CNE-1 细胞内 RECK 的 mRNA 和蛋白水平较低。经 1 ~ 30 μmol/L 姜黄素处理后,RECK 基因 mRNA 和蛋白水平随姜黄素浓度的升高而增加。这表明姜黄素能有效上调鼻咽癌细胞中因甲基化而失活的 RECK 基因的表达。此外,CNE-1 细胞中启动子、全基因组以及细胞核中甲基化 RECK 含量较高,而姜黄素处理后,甲基化水平显著降低。由于 RECK 基因甲基化后导致其对 MMP-9 的负调控功能减弱或消失,从而有利于肿瘤细胞从原发部位脱落并转移。姜黄素通过抑制其启动子区域甲基化,从而诱导 RECK 基因表达而重新获得对 MMP-9 的调控作用,这可能是其抗癌活性的一种新的分子机制^[11]。

Western blot 结果也证实,姜黄素能抑制 CNE-1 细胞中 MMP-9 的表达,并能在一定程度上降低其酶活性。鉴于 MMP-9 基因上游存在 RECK 的调控位点,因此姜黄素对 MMP-9 的抑制可能与上调 RECK 基因的表达有关。由于 MMP-9 是肿瘤细胞降解细胞外基质的重要分子,其表达水平和酶活性受到抑制后,无疑能降低肿瘤细胞从原发部位脱落和发生远处转移的能力^[12]。

有研究显示,使用姜黄素处理鼻咽癌细胞后,能导致 E-钙粘蛋白表达增高以及促进癌细胞凋亡,这与 DNA 甲基化酶抑制剂相似^[13-14]。也有研究显示某些因超甲基化而沉默的抑癌基因,如 GSTP1 和 MGMT,也能被姜黄素等去甲基化药物诱导而重新

激活^[15],这也从侧面证明了姜黄素对 DNA 甲基化具有抑制作用,并能重新激活失活的抑癌基因。目前,DNA 去甲基化药物(如氮胞苷类药物)已经在临床上用于各种血液系统疾病的治疗并取得了一定的疗效^[16-17]。由于姜黄素对 DNA 甲基化具有一定的抑制作用,因此有望为鼻咽癌的治疗提供一种新的辅助手段。姜黄素来源于天然植物,其毒性低^[18]。此外,对于此氮胞苷类药物治疗无效的细胞,如干细胞,姜黄素可能具有更加广泛的应用价值。

参考文献:

- [1] Han BL, Xu XY, Zhang CZ, et al. Systematic review on Epstein-Barr virus (EBV) DNA in diagnosis of nasopharyngeal carcinoma in Asian populations[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6):2577-2581.
- [2] Hutajulu SH, Indrasari SR, Indrawati LP, et al. Epigenetic markers for early detection of nasopharyngeal carcinoma in a high risk population[J]. Mol Cancer, 2011, 10:48.
- [3] Fendri A, Khahir A, Hadri-Guiga B, et al. Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promoter is common and occurs in advanced stage of Tunisian nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Invest, 2010, 28(9):896-903.
- [4] Liu S, Ren S, Howell P, et al. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2008, 21(5):545-558.
- [5] Pan Y, Wang M, Bu X, et al. Curcumin analogue T83 exhibits potent antitumor activity and induces radiosensitivity through inactivation of Jab1 in nasopharyngeal carcinoma[J]. BMC Cancer, 2013, 13:323.
- [6] Liu Z, Liu S, Xie Z, et al. Characterization of in vitro and in vivo hypomethylating effects of decitabine in acute myeloid leukemia by a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS method[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(5):e31.
- [7] Morrison C, Mancini S, Cipollone J, et al. Microarray and proteomic analysis of breast cancer cell and osteoblast co-cultures; role of osteoblast matrix metalloproteinase (MMP)-13 in bone metastasis[J]. J Biol Chem, 2011, 286(39):34271-34285.
- [8] Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(22):13221-13226.
- [9] Noda M, Takahashi C, Matsuzaki T, et al. What we learn from transformation suppressor genes: lessons from RECK[J]. Future Oncol, 2010, 6(7):1105-1116.

(下转第 138 页)

- [10] Hong KJ, Wu DC, Cheng KH, et al. RECK inhibits stemness gene expression and tumorigenicity of gastric cancer cells by suppressing ADAM-mediated Notch1 activation [J]. J Cell Physiol, 2014, 229(2):191-201.
- [11] Jacomasso T, Trombetta-Lima M, Sogayar MC, et al. Downregulation of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in malignant melanoma; inverse correlation with membrane-type 1-matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase 2[J]. Melanoma Res, 2014, 24(1):32-39.
- [12] Siddesha JM, Valente AJ, Yoshida T, et al. Docosahexaenoic acid reverses angiotensin II-induced RECK suppression and cardiac fibroblast migration [J]. Cell Signal, 2014, 26(5):933-941.
- [13] 韦强, 韦敏怡, 梁秀就, 等. 上皮钙黏素/链接素黏附复合体在鼻咽癌组织中的表达及意义[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(7):789-792.
- [14] Zhang CY, Zhang L, Yu HX, et al. Curcumin inhibits the metastasis of K1 papillary thyroid cancer cells via modulating E-cadherin and matrix metalloproteinase-9 expression[J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(7):995-1000.
- [15] Niture SK, Velu CS, Smith QR, et al. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(2):378-389.
- [16] Thomas X. DNA methyltransferase inhibitors in acute myeloid leukemia; discovery, design and first therapeutic experiences [J]. Expert Opin Drug Discov, 2012, 7(11):1039-1051.
- [17] Si J, Bumber YA, Shu J, et al. Chromatin remodeling is required for gene reactivation after decitabine-mediated DNA hypomethylation [J]. Cancer Res, 2010, 70(17):6968-6977.
- [18] 彭湘玲, 李庆军, 张林. 姜黄素对阿霉素肾病大鼠 NADPH 氧化酶和 nephrin 表达的影响 [J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(5):460-464.

(此文编辑:蒋湘莲)