

姜黄素抑制膀胱癌 T24 细胞增殖及 Hsp90 α 的表达

龙向阳,许武军,谢 皇,刘 俊,阳 宁,张 涛,汪 翼,陈 仙,罗志刚
(南华大学附属第二医院泌尿外科,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨姜黄素对膀胱癌 T24 细胞增殖以及热休克蛋白 90 α (Hsp90 α)表达的影响。 **方法** 培养 T24 细胞株,分别用不同浓度姜黄素(0,5,10,15,20 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 24 小时和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素分别处理细胞不同时间(0,6,12,24,48 小时),采用四唑盐(MTT)比色法,检测 T24 细胞的生长抑制率,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR),检测 Hsp90 α 基因 mRNA 的表达,以蛋白免疫印迹法(Western blotting),检测 Hsp90 α 蛋白质的表达。 **结果** 姜黄素处理后的 T24 细胞代谢 MTT 能力降低,细胞生长抑制率明显增加;细胞 Hsp90 α 基因 mRNA 和蛋白质的表达均下调,并且这些效应呈浓度和时间依赖性($P<0.05$)。 **结论** 姜黄素可能通过调控 Hsp90 α 的表达而抑制 T24 细胞的增殖。

关键词: 姜黄素; 膀胱癌; 热休克蛋白 90 α ; 细胞增殖

中图分类号:R737.14 文献标识码:A

Effects of Curcumin on Inhibiting the Proliferation of Bladder Cancer T24 Cells and Hsp90 α Expression

LONG Xiangyang, XU Wujun, XIE Huang, et al

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

Abstract: **Objective** To investigate the effect of curcumin in cell proliferation and expression of heat shock protein 90 alpha (Hsp90 α) in bladder cancer cells. **Methods** Culture of bladder cancer cell line (T24 cell line), The cells were treated with different concentrations of curcumin (0,5,10,15,20 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours, or 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin were treated with 0,6,12,24,48 h, respectively. Then the growth inhibition rate of T24 cells was detected by the colorimetric assay of four thiazole salt (MTT), the expression of Hsp90 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the expression of Hsp90 protein was detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the metabolism ability of T24 cells decreased and the cell growth inhibition rate was increased significantly after the curcumin treatment. At the same time, the expression of Hsp90 mRNA and protein in T24 cells was down regulated, and these effects were concentration and time dependent ($P<0.05$). **Conclusion** Curcumin may inhibit the proliferation of bladder cancer cells by regulating the expression of Hsp90.

Key words: curcumin; bladder cancer; Hsp90; cell proliferation

姜黄是一种中药,姜黄素是从姜黄中提取出来的一种天然成分。研究表明,姜黄素具有多种生物学活性,如抗肿瘤、抗氧化、降血脂、抗炎、利胆等^[1]。近年来,姜黄素在抗肿瘤方面的作用越来越引人注意,其抗肿瘤作用已经成为其主要的药理作用之一。越来越多的研究发现姜黄素对膀胱癌有明

显的作用,比如,姜黄素可激活人膀胱癌 T24 细胞自噬,进而诱导其凋亡^[2,3];姜黄素对膀胱癌 EJ 细胞的生长产生抑制作用等^[4],但是,对于姜黄素在肿瘤细胞中发挥生物学作用靶点及分子机制尚未明确。热休克蛋白 α (heat shock protein 90 alpha, HSP90 α) 是一种非常重要的热休克蛋白,它在多种肿瘤细胞中高表达,可影响肿瘤细胞凋亡,进而影响肿瘤的发生发展^[5-7],唐伟,等^[6]研究发现 Hsp90 α

在膀胱癌组织中高表达,可作为判断膀胱癌预后的指标之一。因此,本研究以姜黄素处理 T24 细胞,探讨姜黄素对 T24 细胞增殖及 Hsp90 α 表达的影响,为临床上应用姜黄素治疗膀胱癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 T24 细胞生长于 RMPI 1640 培养基(Gibco 公司)中,其中含浓度为 10% 的新生牛血清(杭州四季青),培养基中加有青、链霉素各 100 U/mL。细胞培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 ,静置培养,每 2~3 天更换培养液,以 1:3 比例传代。

1.2 四唑盐(MTT)比色法检测细胞的生长抑制率 取培养的处于对数生长期的 T24 细胞,接种至 96 孔板中,先换无血清培养基培养 24 h,再用含有不同浓度姜黄素的培养液培养一定的时间,然后再加入新鲜配制的 MTT 工作液(Sigma 公司分装)培养细胞 4 h,通过全自动酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度,经公式计算细胞的生长抑制率。计算公式如下:

$$\text{生长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组吸光度} - \text{实验组吸光度}}{\text{对照组吸光度}} \times 100\%$$

1.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 mRNA 的表达 采用 TRIZOL 法常规提取细胞总 RNA,经紫外线分光光度仪测定其 OD260/OD280 的比值,确定所提取总 RNA 的质量及浓度后,首先按逆转录试剂盒(Promega 公司)的说明进行逆转录反应,然后以其转录产物 cDNA 进行 PCR 反应。PCR 反应程序按说明书(Promega 公司)进行,反应体系为 25 μL ,扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,扩增循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 32 个循环,然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 510 min 延伸。反应产物经琼脂糖凝胶电泳后,采用凝胶图像分析系统分析各组扩增产物及内参片段灰度值,以二者的比值代表靶分子 mRNA 表达的变化。

1.4 免疫印迹法检测蛋白质的表达 常规提取 T24 细胞总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品加 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液后煮沸 10~15 min 使其变性,采用 SDS-PAGE 垂直电泳(每孔上样量为 20 μL ,分离胶浓度为 10%),然后电转移至 PVDF 膜,以 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗(1:1 000)摇育过夜,TBST 液漂洗后(3 次,5 min/次),室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)2 h,再经 TBST 液漂洗(3 次,5 min/次),PVDF 膜经蛋白质印迹发光检测试剂盒显示于化学发光成像分析系统(Tanon 公

司)。结果分析以目的蛋白面积灰度值减去背景灰度值以及对照蛋白灰度值的比值进行半定量分析。

1.5 数据处理与统计分析 实验所获得数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析或 t 检验,统计结果经 SPSS19.0 统计软件分析,以 $P < 0.05$ 视为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同浓度的姜黄素对 T24 细胞生长抑制率的影响 分别以 0,5,10,15,20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素处理细胞 24 h,采用 MTT 法检测 T24 细胞的生长抑制率,结果发现,姜黄素处理组细胞代谢 MTT 的能力显著下降,细胞生长抑制率明显上升,且呈浓度依赖性效应($P < 0.05$),结果请见图 1。

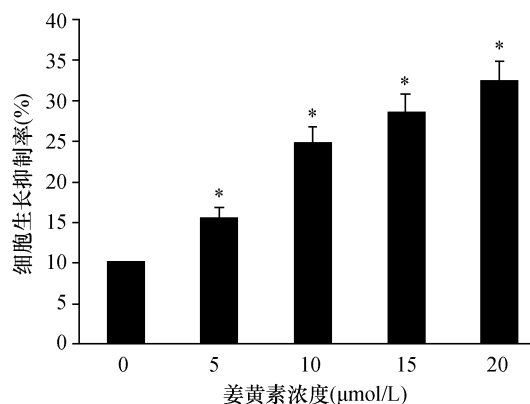


图1 不同浓度的姜黄素对 T24 细胞生长抑制率的影响
与 0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组比较, *: $P < 0.05$

2.2 10 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理不同时间后 T24 细胞生长抑制率的变化 以 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素分别处理细胞 0,6,12,24,48 h,然后采用 MTT 法检测 T24 细胞的生长抑制率,结果发现,随着姜黄素处理时间的延长,细胞代谢 MTT 的能力逐渐下降,细胞生长抑制率逐渐增加,效应呈时间依赖性($P < 0.05$),结果请见图 2。

2.3 不同浓度的姜黄素对 T24 细胞 Hsp90 α 表达的影响 分别以 0,5,10,15,20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素处理细胞 24 h,分别采用 RT-PCR 和蛋白质免疫印迹法检测 Hsp90 α 基因 mRNA 和蛋白质的表达,结果发现,与对照组比较,姜黄素处理 T24 细胞后,Hsp90 α 基因 mRNA 和蛋白质的表达显著下调,且这种效应呈浓度依赖性($P < 0.05$),结果请见图 3。

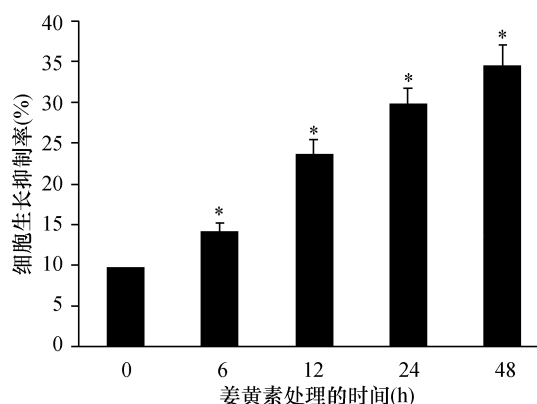


图 2 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用不同时间对 T24 细胞生长抑制率的影响 与对照组(0 小时)比较, *: $P < 0.05$

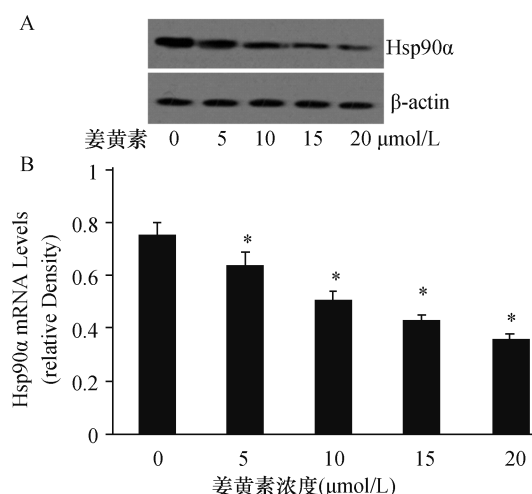


图 3 不同浓度的姜黄素对 T24 细胞 Hsp90 α 表达的影响 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组比较, *: $P < 0.05$

2.4 10 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理不同时间后 T24 细胞 Hsp90 α 表达的变化 以 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素分别处理细胞 0, 6, 12, 24, 48 小时后, 分别采用 RT-PCR 和蛋白质免疫印迹法检测 Hsp90 α 基因 mRNA 和蛋白质的表达, 结果发现, 随着姜黄素处理 T24 细胞时间的延长, Hsp90 α mRNA 和蛋白质的表达逐渐下调, ($P < 0.05$), 结果请见图 4。

3 讨 论

近年来, 随着我国人口老龄化状况的加剧以及环境因素的影响, 膀胱癌的发病率不断增高, 目前已经成为我国发病率最高的泌尿系统恶性肿瘤。目前膀胱癌治疗方面, 手术治疗及放疗和化疗均对机体损伤较大, 患者生存率偏低, 因此, 探讨膀胱癌的发

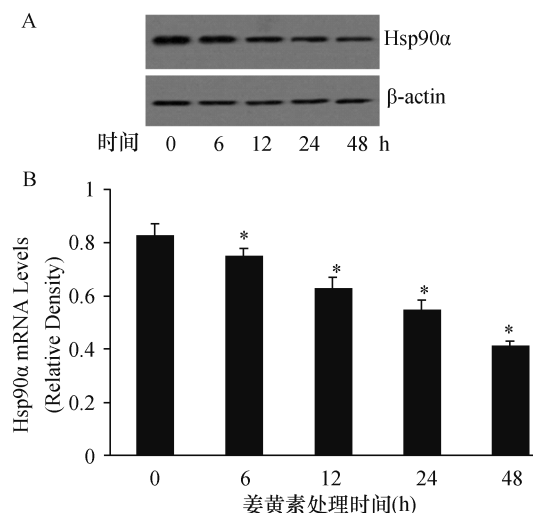


图 4 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用不同时间对 T24 细胞 Hsp90 α 表达的影响 与对照组(0 h)比较, *: $P < 0.05$

病机制及研发治疗膀胱癌的新药物是改善膀胱癌临床治疗效果的根本途径。姜黄素是列为第 3 代的肿瘤化疗药物之一, 属酸性的酚类物质, 是从姜黄的根茎中提取的一种天然化合物^[2,8]。姜黄素抗肿瘤机制十分复杂, 目前众多研究认为它主要的抗癌机制是抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭, 诱导肿瘤细胞的凋亡等^[8-10]。本研究应用姜黄素处理 T24 细胞, 结果发现随着姜黄素作用时间的延长和浓度的增加, T24 细胞的生长抑制率明显升高, 这表明姜黄素可以抑制 T24 细胞的增殖。

热休克蛋白在许多肿瘤中呈高表达, 与多种肿瘤的发生、肿瘤细胞的增殖分化和侵袭有关。Hsp90 α 热休克蛋白家族中重要的一员, 它是一种分子伴侣, 具有广泛的生物学功能。目前 Hsp90 α 被认为是一种新的肿瘤标志物, 与多种肿瘤的发生发展关系密切^[11-12]。有研究发现 Hsp90 α 在膀胱癌组织中高表达, Hsp90 抑制剂对膀胱癌的发生发展有着重要的作用^[13-14]。本研究中观察了姜黄素对 T24 细胞 Hsp90 α 表达的影响, 结果显示, 姜黄素处理后, T24 细胞中的 Hsp90 α 基因 mRNA 和蛋白的表达下调, 且其抑制效应呈时间和浓度依赖性。这些结果提示, 姜黄素可能是通过抑制 Hsp90 α 的表达而抑制 T24 细胞的增殖和分化。

参考文献:

- [1] 郑玉强, 邓立普. 姜黄素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, (2): 212-214.

(下转第 327 页)

- jury in rabbits[J]. J Surg Res, 2012, 178 (1): 223-232.
- [12] Yu S, Shi M, Liu C, et al. Time course changes of oxidative stress and inflammation in hyperoxia-induced acute lung injury in rats[J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(1): 93-103.
- [13] McDonald CI, Fung YL, Shekar K, et al. The impact of acute lung injury, ECMO and transfusion on oxidative stress and plasma selenium levels in an ovine model[J]. J Trace Elem Med Biol, 2015, 30: 4-10.
- [14] Ferreira HC, Mazzoli-Rocha F, Momesso DP, et al. On the crucial ventilatory setting adjustment from two- to one-lung ventilation[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2011, 178(2-3): 198-204.
- [15] Jorgenson A, Jaeger JM, de Souza DG, et al. Acute intraoperative pulmonary embolism: an unusual cause of hypoxemia during one-lung ventilation[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2011, 25(6): 1113-1115.
- [16] Wrigge H, Uhlig U, Zinserling J, et al. The effects of different ventilatory settings on pulmonary and systemic inflammatory responses during major surgery[J]. Anesth Analg, 2004, 98 (7): 775-781.
- [17] 胡婧, 都鹏飞, 贝丹丹. 外周血 IL-6 对新生儿脓毒症诊断价值的 Meta 分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(11): 1176-1182.
- [18] Hybertson BM, Lee YM, Cho HG, et al. Alveolar type II cell abnormalities and peroxide formation in Lungs of rats given IL-1 intratracheally [J]. Inflammation, 2000, 24 (4): 289-303.
- [19] Demir M, Amanvermez R, Kamali Polat A, et al. The effect of silymarin on mesenteric ischemia-reperfusion injury[J]. Med Princ Pract, 2014, 23(2): 140-144.
- [20] Wang C, Wang HY, Liu ZW, et al. Effect of endogenous hydrogen sulfide on oxidative stress in oleic acid-induced acute lung injury in rats [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(21): 3476-3480.
- [21] Kikuchi K, Kawahara KI, Uehikado H, et al. Potential of edaravone for neuroprotection in neurologic diseases that do not involve cerebral infarction[J]. Exp Ther Med, 2011, 2(5): 771-775.
- [22] Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(12): 1600-1619.
- [23] Yen CC, Lai YW, Chen HL, et al. Aerosolized human extracellular superoxide dismutase prevents hyperoxia induced lung injury[J]. PLoS One, 2011, 6 (10): 26870.

(本文编辑: 秦旭平)

(上接第 285 页)

- [2] 仇炜, 沈永青, 倪晓辰. 姜黄素激活人膀胱癌 T24 细胞自噬诱导细胞凋亡[J]. 河北医药, 2015, (20): 3054-3057.
- [3] 孔涛, 杨静哲, 代宏亮, 等. 姜黄素对人膀胱癌 T24 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(05): 527-528.
- [4] 孙明, 杨宇如, 李虹, 等. 姜黄素对膀胱癌 EJ 细胞的作用研究[J]. 中药材, 2004, (11): 848-850.
- [5] Hunter MC, O'Hagan KL, Kenyon A, et al. Hsp90 binds directly to fibronectin (FN) and inhibition reduces the extracellular fibronectin matrix in breast cancer cells[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86842.
- [6] 唐伟, 李家兵. HSP70 和 HSP90 α 在人膀胱癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, (6): 560-562.
- [7] 孙晓杰, 林梁, 赵玫, 等. ILK 与 HSP90 相互作用对乳腺癌细胞迁移影响及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(3): 161-165.
- [8] 鲁琼, 徐冉. 姜黄素的药理作用及在治疗膀胱癌中的研究进展. 中药药理与临床. 2012, (03): 133-136.
- [9] 苏宇, 张田, 李倩, 等. 姜黄素对膀胱癌 T24 细胞生物学行为的影响及其机制[J]. 山东医药, 2012, (19): 22-24.
- [10] 李倩, 苏宇, 陈亚娟, 等. 姜黄素对人膀胱癌细胞系 T₂₄ (24) 体外侵袭的作用[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2015, (2): 203-205.
- [11] Petters E, Sokolowska-Wedzina A, Otlewski J. Selection and characterization of single chain antibody fragments specific for Hsp90 as a potential cancer targeting molecule[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8): 19920-19935.
- [12] Qin DJ, Tang CX, Yang L, et al. Hsp90 is a novel target molecule of CDDO-Me in inhibiting proliferation of ovarian cancer cells [J]. PLoS One, 2015, 10 (7): e132337.
- [13] Acquaviva J, He S, Zhang C, et al. FGFR3 translocations in bladder cancer: differential sensitivity to HSP90 inhibition based on drug metabolism. Mol Cancer Res, 2014, 12(7): 1042-1054.
- [14] Anthony A. Re: potential role of hsp90 inhibitors in overcoming Cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells[J]. J Urol, 2013, 189(4): 1596.

(本文编辑: 秦旭平)