

姜黄素上调前列腺癌细胞 LNCaP 中 *maspin* 基因的表达

时平, 陈蔚文[△], 胡晓燕, 于春晓, 张鹏举, 姜安丽*, 张建业*

(山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 研究姜黄素对前列腺癌细胞 LNCaP 凋亡的影响和对 *maspin* 基因表达的调控作用。方法 利用不同浓度的姜黄素处理前列腺癌细胞 LNCaP, MTT法和 DNA电泳检测不同时相 LNCaP细胞的活性和凋亡情况, RT-PCR和 Western blotting检测转录水平和翻译水平 *maspin* 基因的表达情况。将包含 *maspin* 5'侧启动子区 847 bp (-764 ~ +83) DNA的荧光素酶表达载体 pGL3-*maspin*瞬时转染 LNCaP,姜黄素作用细胞 48 h后,应用荧光素酶测定系统检测 *maspin* 启动子的表达活性作用。结果 姜黄素抑制 LNCaP细胞的生长活性,诱导 LNCaP细胞的凋亡,增强 LNCaP细胞中 *maspin* 基因的表达。结论 姜黄素增强 LNCaP细胞中 *maspin* 基因的表达是通过促进启动子的转录活性起作用的。

关键词: 姜黄素; 前列腺癌; *maspin* 基因; 雄激素受体

中图分类号: R963; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2006)12 - 1152 - 05

Curcumin up-regulates the expression of *maspin* gene in prostate cancer cell line LNCaP

SHI Ping, CHEN Wei-wen[△], HU Xiao-yan, YU Chun-xiao, ZHANG Peng-ju, JIANG An-li*, ZHANG Jian-ye*

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: **Aim** To study the effect of curcumin on the apoptosis of prostate cancer cell line LNCaP and regulation of expression of *maspin* gene. **Methods** MTT and DNA electrophoresis were used to examine the cell growth and apoptosis of prostate cancer cell line LNCaP after treated with different doses of curcumin. The expression of *maspin* gene at transcription level and translation level was also detected by RT-PCR and Western blotting. pGL3-*maspin* luciferase expression vector, containing 847 bp (-764 - +83) DNA of *maspin* gene 5' promoter region, was transiently transfected into LNCaP cell. Through detecting the activity of luciferase, the effect of curcumin on the promoter of *maspin* was studied. **Results** Curcumin inhibited cell growth, induced the apoptosis and enhanced the expression of *maspin* gene in LNCaP cells. **Conclusion** Curcumin up-regulated expression of *maspin* gene in LNCaP cells through enhancing the transcription activity of promoter of *maspin* gene.

Key words: curcumin; prostate carcinoma; *maspin* gene; androgen receptor

姜黄素 (curcumin) 是从草本植物姜黄的根茎中提取出来的一种酚类色素,它在印度被用作烹调中的调味品,并用于治疗炎症等疾病。流行病学研究发现印度人大肠癌的低发病率部分归功于食物中的

天然添加剂姜黄素^[1]。后续的大量研究证明姜黄素具有广泛的抑癌作用^[2,3]。近年来发现姜黄素可以在体内外抑制前列腺癌细胞的生长,抑制机制复杂^[4,5]。

1994年, Zou等^[6]发现了一个新的 II型抑癌基因 *maspin* (mammary serine protease inhibitor) 编码的蛋白产物是丝氨酸蛋白酶抑制剂,其生物学功能主要包括:促进胚胎形成和哺乳动物腺体发育;抑制肿瘤细胞的生长和转移;抑制癌灶中血管的生成;增

收稿日期: 2006-04-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371564, 30470820).

* 通讯作者 Tel: 86 - 531 - 88382092,

E-mail: zhjy@sdu.edu.cn

[△] 该作者与第一作者对本文有同等贡献

强诱导细胞的凋亡。该基因与前列腺癌密切相关:在前列腺正常细胞中表达,在前列腺癌细胞中表达降低或缺失,其表达水平与细胞恶性程度成反比^[7]。在肿瘤细胞中 *maspin* 基因很少突变,其在正常前列腺上皮细胞和肿瘤细胞中表达的差异主要与转录水平的调控有关^[8]。因此 *maspin* 基因可以作为肿瘤治疗的靶点,刺激 *maspin* 基因的表达具有重要的意义。已发现去甲基化药物 野生型 P53 蛋白、乳香脂等多种因素可诱导 增强前列腺癌细胞中 *maspin* 基因的表达^[9,10]。本研究拟探讨姜黄素对雄激素受体 (AR) 表达阳性并具有雄激素依赖性的前列腺癌细胞 LNCaP 的增殖及 *maspin* 基因表达调控的作用。

材料和方法

材料 各种酶均购自 Takara 公司。姜黄素购自 Sigma 公司。雄激素依赖性前列腺癌细胞株 LNCaP 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。含有 *maspin* 基因 5' 上游 847 bp (-764 ~ +83) 启动区序列的荧光素酶报道基因表达载体 pGL3-*maspin* 由本研究所贺美兰博士构建。pRL-TK 质粒由本校遗传教研室龚瑶琴教授惠赠。脂质体 Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 产品。双荧光素酶检测系统 (Dual-luciferase Assay System) 为 Promega 公司产品; *maspin*, β -*tubulin* 等基因的单克隆抗体购自美国 BD Biosciences 公司,所用二抗均购自北京中山生物公司。ECL Western blotting 试剂盒购自美国 Santa Cruz 生物公司。RPMI 1640 及胎牛血清为 Gibco 公司产品。PCR 引物由上海生工生物公司合成。

细胞培养 LNCaP 细胞在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养,培养基为 RPMI 1640,含 10% 胎牛血清及青霉素、链霉素各 100 u · mL⁻¹。

MTT 法检测姜黄素对 LNCaP 细胞增殖的影响 取对数生长期的 LNCaP 细胞,以细胞数 1×10^4 孔接种于 96 孔板,加入不同浓度的姜黄素 (0, 10, 20, 30 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h 或 48 h, 对照组加等体积培养液,并加入与加药组相同浓度的 DMSO 以消除其对细胞生长的影响。终止培养前 4 h, 加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT (50 μL 孔), 继续培养。4 h 后弃净培养基,加入 DMSO 100 μL 溶解甲臜结晶,置酶标仪上测 A₇₀₀ 值, 各组每次测 8 孔, 重复 3 次取均值。以下式计算细胞相对存活率: 细胞相对存活率 (%) = (A_{试验组} / A_{对照组}) × 100%, 以空白组 A 调

零。以细胞相对存活率为纵坐标,姜黄素浓度为横坐标绘制曲线。

琼脂糖凝胶电泳检测姜黄素对 LNCaP 细胞 DNA 裂解的影响 按基因组 DNA 快速提取试剂盒 (上海申能博彩公司) 说明书操作, 提取经或未经姜黄素处理的 LNCaP 细胞染色体 DNA。弃培养基, PBS 洗涤细胞 1 次, 加入裂解缓冲液 1 mL 吹打, 12 000 r · min⁻¹ 室温离心细胞裂解液 10 min, 上清液移入 3S 柱, 加入异丙醇 100 μL , 10 000 r · min⁻¹ 离心 1 min, 洗液 500 μL 洗 3 次, 10 000 r · min⁻¹ 离心 2 min, 加入 TE 50 μL , 10 000 r · min⁻¹ 离心 2 min, 收集洗脱液, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

Western blotting 检测姜黄素对 LNCaP 细胞 *maspin* 基因表达的影响 收集经姜黄素处理 48 h 的 LNCaP 细胞, 提取总蛋白, BCA 法定量, 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 电转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭, 鼠抗人单克隆 anti-*maspin* (1:1 000) 杂交, 羊抗鼠 IgG 为二抗 (1:500), 内参照为 β -*tubulin* (Sigma, 1:1 000), ECL 系统染色。

RT-PCR 检测姜黄素对 LNCaP 细胞 *maspin* 基因表达的影响 收集经不同浓度姜黄素处理的 LNCaP 细胞, Trizol 法提取总 RNA, 参照 RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司) 操作说明采用二步法进行逆转录以及 PCR 扩增。基因 *maspin* 扩增引物为: 5'-TGC TGCCTACTTTGTTGGCAAGT-3' 和 5'-TGATACTGTC AATGTTTCCCCATACAGA-3'。内参照 β -*actin* 的扩增引物为 5'-GTGGGGCGCCCAGGCACCACGATG-3' 和 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'。以总 RNA 为模板 (4.8 μg), 在 20 μL 反应体系中, 以随机六聚体引物为逆转录引物, 加入 M-MLu 逆转录酶 25 °C 10 min, 42 °C 1 h, 70 °C 10 min 合成 cDNA 第一链。取逆转录产物 2 μL 作为模板, 先加入 *maspin* 引物, 94 °C 预变性 3 min 后, 加入 Taq 酶 0.5 μL 。扩增条件: 94 °C 50 s, 52 °C 50 s, 72 °C 1 min, 8 个循环。继而加入 β -*actin* 引物, 扩增条件为 94 °C 50 s, 52 °C 50 s, 72 °C 1 min, 20 个循环, 最后一个循环, 72 °C 延长 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

荧光素酶活性测定姜黄素对 *maspin* 启动子的作用 取 LNCaP 细胞按细胞数 1.5×10^5 孔接种于 24 孔板。24 ~ 60 h 后, 当细胞融合度大于 90% 时, 进行转染, 每孔加 pGL3-*maspin* 1 μg 、pRL-TK 0.04 μg 脂质体 Lipofectamine™ 2000 2 μL 及无血清无抗生素培养基 500 μL 。转染后 48 h 收集细胞, 测定荧

光素酶活性,实验步骤按照 Dual-luciferase Assay System 试剂盒的说明书进行。吸去细胞培养液, PBS冲洗细胞 1 次,每孔加入 $1 \times$ PLB 细胞裂解液 50 μ L,室温 10 min。荧光测定管中加 LAR II (luciferase assay reagent) 100 μ L,再加细胞裂解液 20 μ L,放置发光仪中,测定 pGL3 中的 firefly 荧光素酶活性,读数为 M1;然后加入 Stop & Glo Reagent 100 μ L,测定内参照质粒 pRL-TK 中的 Renilla 荧光素酶活性,读数为 M2。M1/M2 为被检测质粒转染细胞所得的荧光素酶的相对活性。发光仪程序设置:延迟 2 s,测量时间 10 s。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 *t* 检验进行两组均数间的差异性分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。采用复孔处理,每组实验重复 3 次。

结果

1 姜黄素对 LNCaP 细胞增殖的影响

以不同浓度的姜黄素 (10, 20, 30 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别处理 LNCaP 细胞 24 h 或 48 h, MTT 法测定 LNCaP 细胞的存活率。结果如图 1 所示,姜黄素可以抑制 LNCaP 细胞的增殖。这种抑制作用呈剂量和时间依赖性,姜黄素在 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h 对 LNCaP 细胞增殖的抑制率可达到 40%。

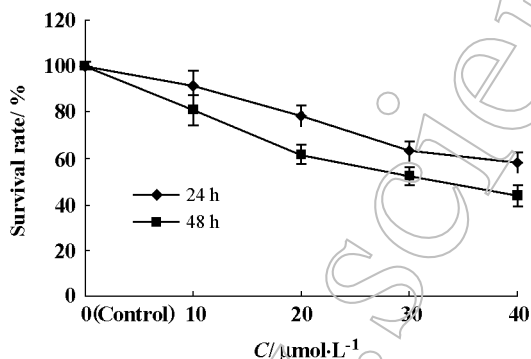


Figure 1 Curcumin inhibits the proliferation of LNCaP cells. 1×10^4 cells in 0.1 mL in triplicate were cultured in a 96-well plate in the presence or absence of curcumin (10 to 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24 h and 48 h

2 姜黄素对 LNCaP 细胞凋亡的诱导

经 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素处理的 LNCaP 细胞,分别于 8, 24 和 48 h 等 3 个时间点收集,提取染色体 DNA,观察细胞在不同时期的 DNA 裂解状况。图 2 显示 LNCaP 细胞在经过姜黄素处理 8 h 后开始出现 DNA 的断裂,但不太明显。24 h 后出现明显的梯状条带 (ladder)。48 h 后凋亡程度进一步增加。

3 姜黄素对 LNCaP 细胞中 maspin 蛋白表达的影响

为检测翻译水平姜黄素对 LNCaP 细胞中 maspin 蛋白表达的影响,以不同浓度的姜黄素处理 LNCaP 细胞 48 h 后,收集细胞,提取总蛋白,Western blotting 检测 maspin 蛋白表达水平,以 β -tubulin 作为内对照。结果如图 3 所示,与未经处理的对照相比, LNCaP 细胞经姜黄素处理后, maspin 蛋白表达增加,且具有剂量依赖性。

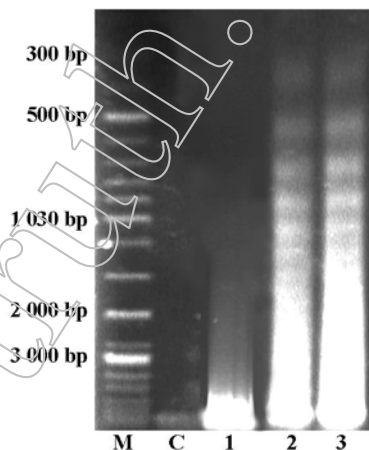


Figure 2 The DNA electrophoresis of LNCaP cells after curcumin treatment for different periods of time. With the time lasting, the cell apoptosis increased and reached to the maximum after 48 h. M: Marker; C: Control. 1: 8 h; 2: 24 h; 3: 48 h

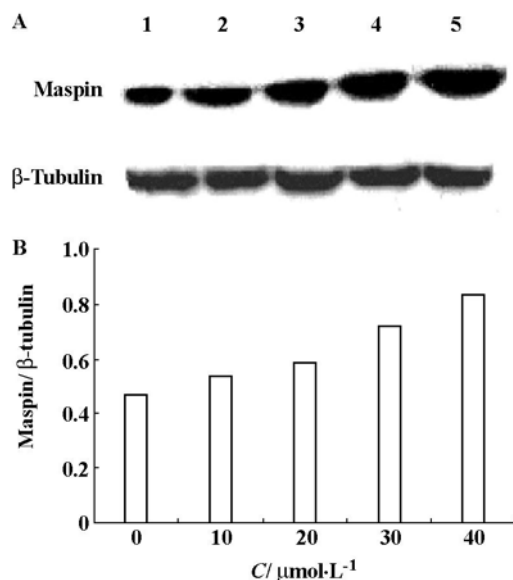


Figure 3 Induction of maspin protein expression in LNCaP cells treated with curcumin. A: Western blotting detection of maspin protein expression in LNCaP cells exposed to different doses of curcumin for 48 h. Curcumin inducing effect on the expression of maspin protein is dose dependent. B: Relative density of maspin protein normalized to internal control

4 姜黄素对 LNCaP 细胞中 *maspin* mRNA 表达的影响

为检测转录水平姜黄素对 LNCaP 细胞中 *maspin* 基因表达的影响,以不同浓度的姜黄素作用 LNCaP 细胞 24 h 后,收集细胞提取总 RNA,逆转录 mRNA 得到 cDNA,PCR 扩增 *maspin* mRNA, β -actin 作为内对照,1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物。结果如图 4 所示,同未经处理的对照相比,姜黄素作用的 LNCaP 细胞中 *maspin* 转录产物的丰度明显升高,升高幅度随姜黄素浓度的增加而增加。

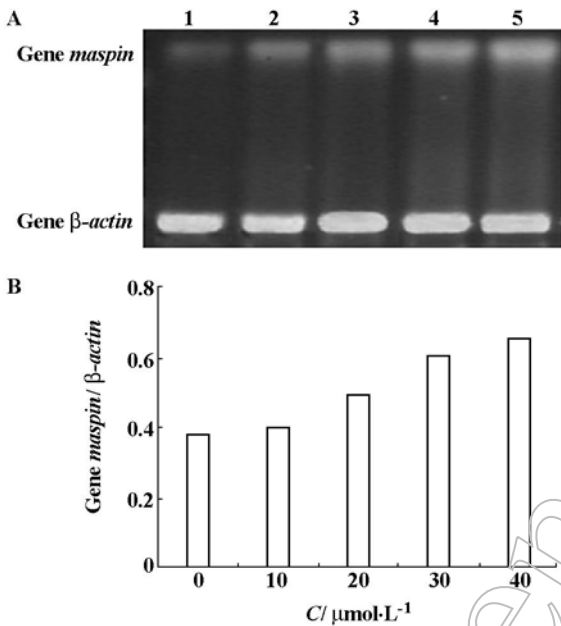


Figure 4 Induction of *maspin* mRNA expression in LNCaP cells treated with curcumin. A: RT-PCR detection of *maspin* mRNA in LNCaP cells treated with different doses of curcumin for 24 h. The PCR products were examined by 1.2% agarose gel electrophoresis. Used as a loading control, the mouse house keeping gene β -actin was also amplified. Curcumin inducing effect on the expression of *maspin* mRNA is dose dependent. B: Relative density of *maspin* mRNA expression normalized to internal control

5 姜黄素对 *maspin* 启动子活性的影响

在重组质粒 pGL3-*maspin* 中荧光素酶的表达受上游 *maspin* 启动子区的调节。pGL3-*maspin* 转染 LNCaP 细胞后,荧光素酶活性的高低直接反映了启动子作用的强度。将 pGL3-*maspin* 和内对照质粒 pRL-TK 共转染 LNCaP 细胞,6 h 后加入不同浓度的姜黄素作用 12 和 24 h 两个不同时相后, Dual-luciferase Assay System 测定荧光素酶的表达活性。结果显示(图 5)转染 *maspin* 启动子的 LNCaP 细胞

经过姜黄素处理后,随着浓度的增加和时相的延长,荧光素酶活性明显增强。40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素作用最明显,经过 12 和 24 h 后,活性分别增强 3.6 和 4.4 倍。

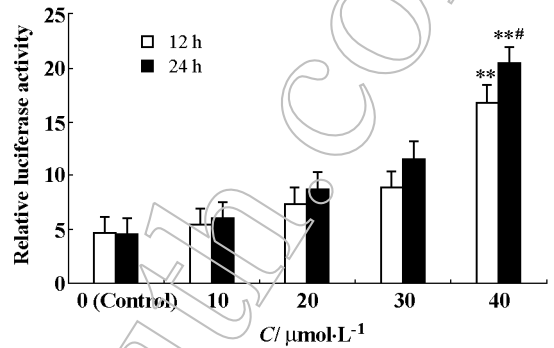


Figure 5 Measurement of luciferase activity in LNCaP cells transient transfection assay. LNCaP cells untreated and treated with various concentrations of curcumin were transfected with *maspin* promoter. The cells were plated at 2×10^5 cells/plate 1 day before the transfection. The transfection was performed using lipofectamine™ 2000 reagent. The *maspin* promoter reporter plasmid (1 μg) and the pRL-TK (0.04 μg) plasmid as an internal control were cotransfected into cells for 48 h. After being exposed to curcumin for 12 and 24 h, the cells were harvested for the luciferase assay. The data are presented as 4.4 fold and 3.6 fold induction over the reporter construct control alone for 24 h and 12 h, respectively. The same experiment was repeated 3 times in LNCaP cells. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs the 12 h group

讨论

姜黄素的主要药理作用包括抗炎、抗氧化、降血脂、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗 HIV 病毒等,且毒性很低。大量细胞试验和动物试验证明姜黄素具有明确的抗肿瘤活性,抗癌谱广,毒副作用小,具有广泛的应用前景。姜黄素的抗肿瘤机制包括多条途径:诱导肿瘤细胞的凋亡;阻断肿瘤细胞的生长信号途径;抑制肿瘤血管的生成等。本研究发现姜黄素具有诱导前列腺癌细胞 LNCaP 凋亡的作用,该作用呈剂量和时间依赖性。已有报道姜黄素诱导凋亡的途径可能是通过下调 NF- κ B 和 AP-1 介导其下游基因 *Bcl2* 和 *Bcl-xL* 的抑制,进而激活 caspase 诱导凋亡,而高浓度的姜黄素可能直接通过激活凋亡前的 caspase-3 前酶和 caspase-8 前酶诱导凋亡^[11]。

本研究发现姜黄素对抑癌基因 *maspin* 的表达有影响。Western blotting 结果显示姜黄素处理后的

LNCaP细胞质中 maspin 蛋白表达呈现剂量依赖性增加。Zhang 等^[12,13]的研究发现抑癌蛋白 maspin 可增强肿瘤细胞的凋亡,若在内皮细胞过表达还可诱导内皮细胞凋亡。因此,姜黄素诱导凋亡的机制除上述途径外,还可能通过增强 maspin 的表达起作用。由此可见姜黄素诱导前列腺癌细胞凋亡的机制是复杂的。

为了确定姜黄素增强 maspin 的表达是在 maspin 基因的转录水平还是直接在其蛋白水平起作用,采用 RT-PCR 检测 maspin 基因的 mRNA,结果 mRNA 的表达在姜黄素处理后呈现增加的趋势。看来姜黄素增强 maspin 表达的作用是通过激活转录实现的。maspin 启动子 (pGL3-maspin) 的转染试验进一步证明: $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素作用 24 h 后,荧光素酶的活性比对照组增加了 4.4 倍,显然姜黄素通过一定的机制正向调控 maspin 的表达。基因 maspin 5'上游 847 bp (-764 ~ +83) 启动区序列中包含了最重要的正负调控元件 Ets 和 HRE^[14]。Nakamura 等^[15]证明姜黄素抑制前列腺癌细胞生长的机制之一是下调 AR 基因的表达和激活,而在前列腺癌细胞中,正调控元件 Ets 的失活,使可被 AR 识别的负调控元件 HRE 在 maspin 的转录调控中占优势,因而部分导致了 maspin 低表达^[14]。本课题组其他成员通过 EMSA 观察到经姜黄素处理的 LNCaP 核蛋白与未经处理的对比,AR 与 ARE 元件的结合带减弱,并且姜黄素可通过抑制 AR 的表达来抑制前列腺特异抗原 (PSA) 在 LNCaP 细胞中的表达^[16]。所以作者认为,姜黄素是通过抑制 AR 的表达从而降低 AR 与 maspin 启动子中 ARE 的结合来上调 maspin 基因表达的。而这种抑制也显示出了功能性的 maspin 蛋白水平的增加。姜黄素的这一作用也为前列腺癌的治疗提供了一条可能的新途径:即抑制其负性调节元件 (HRE) 的激活来增加 maspin 的表达,从而逆转恶性肿瘤的表型。

References

- [1] Mohandas KM, Desai DC. Epidemiology of digestive tract cancers in India. V. Large and small bowel [J]. Indian J Gastroenterol, 1999, 18: 118 - 121.
- [2] Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells [J]. Anticancer Res, 2001, 21: 873 - 878.
- [3] Ranjan D, Johnston TD, Reddy KS, et al. Enhanced apoptosis mediates inhibition of EBV transformed lymphoblastoid cell line proliferation by curcumin [J]. J Surg Res, 1999, 87: 1 - 5.
- [4] Asok M, Carlos BR, Devasis C, et al. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines [J]. Oncogene, 2001, 20: 7597 - 7609.
- [5] Dorai T, Cao YC, Dorai B, et al. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells *in vivo* [J]. Prostate, 2001, 47: 293 - 303.
- [6] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells [J]. Science, 1994, 263: 526 - 529.
- [7] Maass N, Teffner M, Rosel F, et al. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast [J]. J Pathol, 2001, 195: 321 - 326.
- [8] Domann FE, Rice JC, Hendrix MJ, et al. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers [J]. Int J Cancer, 2000, 85: 805 - 810.
- [9] Zou Z, Gao C, Nagaich AK, et al. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 6051 - 6054.
- [10] Primeau M, Gagnon J, Momparler RL. Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells [J]. Int J Cancer, 2003, 103: 177 - 184.
- [11] Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, et al. Curcumin down regulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines [J]. Oncogene, 2001, 20: 7597 - 7609.
- [12] Shi HY, Zhang W, Liang R, et al. Modeling human breast cancer metastasis in mice: maspin as a paradigm [J]. Histol Histopathol, 2003, 18: 201 - 206.
- [13] Li Z, Shi HY, Zhang M. Targeted expression of maspin in tumor vasculatures induces endothelial cell apoptosis [J]. Oncogene, 2005, 24: 2008 - 2019.
- [14] Zhang M, Magit D, Sager R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 5673 - 5678.
- [15] Nakamura K, Yasunaga Y, Segawa T, et al. Curcumin down-regulates AR gene expression and activation in prostate cancer cell lines [J]. Int J Oncol, 2002, 21: 825 - 830.
- [16] Yang L, Zhang LY, Chen WW, et al. Inhibition of the expression of prostate specific antigen by curcumin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 800 - 803.