

姜黄素通过 PI3K/Akt 通路抑制髓母细胞瘤 Daoy 细胞增殖

毛蜀, 何密斯, 刘桂元, 张雄, 李昱, 唐俐 (400016 重庆, 重庆医科大学病理生理学教研室, 重庆医科大学病理学教研室, 重庆医科大学神经科学研究中心)

[摘要] 目的 研究姜黄素对髓母细胞瘤PI3K/Akt通路的作用, 探讨其抑制髓母细胞瘤Daoy细胞增殖的机制。方法 MTT法检测姜黄素对髓母细胞瘤细胞的生长抑制作用; 流式细胞术分析细胞凋亡率; 免疫细胞化学染色检测PI3K、p-Akt和Akt在细胞中的定位和表达情况; Western blot和RT-PCR分别检测PI3K、p-Akt和Akt蛋白及mRNA的表达水平。结果 20-100 μ mol/L姜黄素处理24、48和72h后, 细胞生长出现不同程度的抑制, 并且呈时间-剂量依赖关系($P<0.05$); 姜黄素处理48h后细胞出现明显的凋亡。免疫细胞化学染色发现PI3K、p-Akt和Akt阳性表达于细胞质或细胞膜, 姜黄素处理细胞后阳性表达减少($P<0.05$)。Western blot和RT-PCR检测结果发现姜黄素处理后PI3K、p-Akt蛋白表达水平和PI3K mRNA水平都明显减弱($P<0.05$), Akt总蛋白表达水平变化不明显。结论 姜黄素能抑制髓母细胞瘤细胞生长, 并通过抑制PI3K/Akt信号通路而调控髓母细胞的增殖。

[关键词] 髓母细胞瘤; 姜黄素; PI3K/Akt信号通路

[中图分类号] R739.41 **[文献标志码]** A

Curcumin inhibits proliferation via PI3K/ Akt pathway in human medulloblastoma Daoy cell

Mao Shu, He Misi, Liu Guiyuan, Zhang Xiong, Li Yu, Tang Li (Department of Pathophysiology, Department of Pathology, Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role PI3K/Akt signaling pathway in curcumin-inhibited cell proliferation in medulloblastoma Daoy cells. **Methods** Daoy cells were treated with curcumin at different concentrations and time intervals. The proliferation was analyzed by MTT assay, apoptosis was determined by flow cytometry, and the expression of PI3K, Akt and p-Akt at mRNA and protein levels was detected by immunocytochemistry, RT-PCR and western blotting. **Results** Exposure of cells to curcumin resulted in marked decrease in cell proliferation in dose- and time-dependent manners. Treatment of cells with curcumin at 35 μ mol/L for 48 h also resulted in a significant increase in apoptosis (~45%). The expression of PI3K and p-Akt in Daoy cells were decreased upon curcumin treatment by immunohistochemistry assay. Furthermore, treatment of cells with curcumin caused a significant decrease in the expression of PI3K and p-Akt at mRNA and protein levels. However, the expression of total Akt were not altered upon curcumin treatment. **Conclusion** Curcumin can inhibit cell proliferation and induce apoptosis in medulloblastoma Daoy cells through the PI3K/Akt signaling pathway.

[Key words] Medulloblastoma cell; Curcumin; PI3K/Akt pathway

Corresponding author: Tang Li, E-mail: tanglicq@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (NSFC No.81272571), 重庆市自然科学基金 (CSTC, 2009BB5064), 重庆市渝中区科技计划项目 (No.20120208)

[通信作者] 唐俐, E-mail: tanglicq@126.com

髓母细胞瘤(Medulloblastoma, MB)是一种多发于儿童第四脑室的恶性肿瘤, 占儿童中枢神经系统肿瘤的10%~20%。发病高峰在7岁左右, 预后差, 发病机制不明确。目前治疗以手术切除和放化疗为主, 但效果并不

理想。髓母细胞瘤生物学特性与干细胞类似，以往研究发现Sonic Hedgehog和Wnt信号通路的激活支持了髓母细胞瘤是胚胎性肿瘤的发生^[1]。近年发现PI3K/Akt对维护胚胎干细胞的多向潜能有着更重要的作用，同时也参与髓母细胞瘤的发生发展^[2]。

姜黄素 (Curcumin) 是从姜黄根茎中提取的一种酚类化合物，具有抗炎、抗氧化、抗诱变、抗病毒以及抗肿瘤等多种药理作用。研究发现姜黄素可通过 Sonic Hedgehog 和 Wnt 等信号通路抑制髓母细胞瘤的增殖^[3-4]。目前姜黄素对髓母细胞瘤中 PI3K/Akt 通路的作用尚不清楚。本研究用姜黄素处理髓母细胞瘤 Daoy 细胞，观察其对细胞增殖的影响，并检测 PI3K/Akt 通路中关键分子的表达情况，探讨姜黄素防治髓母细胞瘤的可能机制。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

人髓母细胞瘤细胞株Daoy由第三军医大学卞修武教授惠赠。兔抗PI3K、Akt和p-Akt购自美国Santa Cruz公司；兔抗 β -actin抗体购自北京中杉生物公司；辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购自美国联科生物公司；MEM培养基购自赛博飞生物公司；胎牛血清(FBS)购自北京元亨金马生物公司；二甲基亚砷(DMSO)购自美国Sigma公司；姜黄素(Curcumin)购自美国Sigma公司；SP免疫组化试剂盒和浓缩型DAB试剂均购自北京康为世纪生物科技有限公司；RNA提取试剂盒和DNA marker均购自TaKaRa公司；逆转录试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司；Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 姜黄素用DMSO溶解配成10 mol/L的母液,再用MEM培养液稀释成500 μ mol/L分装,-20 $^{\circ}$ C避光保存备用。实验前用MEM以工作液稀释,DMSO终浓度<0.1%。

1.2.2 细胞培养 由含有10%新生胎牛血清加100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素的MEM培养液于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱培养,实验使用细胞均为处于对数生长期的细胞。

1.2.3 MTT法检测姜黄素对细胞增殖的影响 取对数生长期细胞,按 1×10^4 / 100 μ l/孔接种于96孔细胞培养板。设对照组(Ct组)、姜黄素处理组(Cur组)。细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂饱和湿度培养过夜待其贴壁后,Cur组加入不同浓度姜黄素(20, 40, 60, 80, 100 μ mol / L)。每组设5个复孔,并设DMSO对照,24、48和72h后,每孔加入MTT溶液(5 g / L)20 μ l继续培养4 h,彻底吸去培养液,加入二甲基亚砷100 μ l / 孔,震荡10 min,终止反应。酶标仪570nm读取光密度值(OD),计算增殖抑制率。抑制率=(1-处理组OD值 / 对照组OD值) \times 100%。实验重复3次。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 根据MTT结果,选用35 μ mol/L姜黄素作用细胞24、48和72h后,1000 \times g离心5 min收集细胞,PBS液冲洗2次,用80%乙醇4 $^{\circ}$ C固定细胞12h。PBS液洗涤2次,加入Annexin V-FITC染液1ml,4 $^{\circ}$ C孵育60 min,流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.2.5 免疫细胞化学染色检测PI3K、Akt和p-Akt在细胞中的表达 细胞接种于6孔板中的盖玻片上,35 μ mol/L姜黄素作用48h。PBS洗涤3次,4%多聚甲醛室温固定15min,PBS洗2次,0.5%Triton X-100 孵育20min,PBS

洗3次, 3% H_2O_2 孵育15 min, 血清封闭20min, 加入兔抗PI3K(1:200)、Akt(1:200)、p-Akt (1:200) 4℃过夜。次日加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG, 37℃ 30 min, PBS洗3次, DAB显色(避光, 镜下观察至棕色), 苏木素复染, 中性树脂固定。采用双盲法统计实验结果, 每张切片在高倍镜下随机选取5个视野统计阳性细胞所占百分比, 以细胞膜和(或)细胞浆出现棕黄色颗粒为PI3K阳性表达, 以细胞浆和(或)细胞核中出现棕黄色颗粒为Akt阳性表达。<5%为(-), <25%为(+), 25%~50%为(++), >50%为(+++)。

1.2.6 Western blot 检测 PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白水平的表达 35 μ mol/L 姜黄素作用 48h, 蛋白提取试剂盒提取对照组和处理组蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白 50 μ g 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将分离后的蛋白电转移到 PVDF, 5%脱脂牛奶室温封闭 1h, 加入兔抗 PI3K(1:200)、Akt(1:200)、p-Akt(1:200), 4℃过夜。次日 TBST 洗涤, 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1:5000)室温孵育 1h, 采用 ECL 化学发光显影, Chmidoxr 化学发光成像系统(美国 BIO-RAD 公司)检测分析蛋白。

1.2.7 RT-PCR 检测 PI3K 和 Akt mRNA 转录水平的表达 根据 Genbank 中 PI3K、Akt 基因序列, 由北京鼎国生物技术公司设计合成引物。PI3K: 上游: 5'GAGTCCTATTGTCGTGCATGTGG3', 下游: 5'AAGCCTGAGGTTTCCTAGTTGAT3'; Akt: 上游: 5'TGCTGGAGGACAATGACTAC3', 下游: 5'CACGATACCGCAAAGAA3'; GAPDH: 上游 5'GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC3', 下游 5'AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC3'。试剂盒提取细胞总 RNA, 按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板按 Tap 酶说明书进行 PCR 扩增。PCR 反应的循环条件为 94℃ 3min; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 45s, 共 33 个循环; 72℃ 5 min。取各管扩增产物于 2%琼脂糖凝胶中电泳, 经 BIO-RAD 凝胶成像系统观察结果。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件, 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 阳性表达率用 χ^2 检验, 独立样本比较采用 t 检验, 多样本比较用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 Daoy 细胞增殖的影响

MTT 检测结果显示, 随着姜黄素浓度的增大, 细胞增殖抑制率增加, 当姜黄素达 60 μ mol/L 时, 细胞抑制率最明显, 差异有统计学意义(F=99.847, P<0.05)。经姜黄素作用不同时间后, 细胞的增殖也受到明显抑制, >48h 时抑制作用显著, 差异有统计学意义(F=131.829, 132.382, 215.999, 175.238, P<0.05)。24h 的 IC₅₀ 为 35 μ mol/L, 72h 的 IC₅₀ 为 25 μ mol/L。见图 1。表明姜黄素对 Daoy 细胞的增殖具有抑制作用, 呈剂量-时间依赖性。

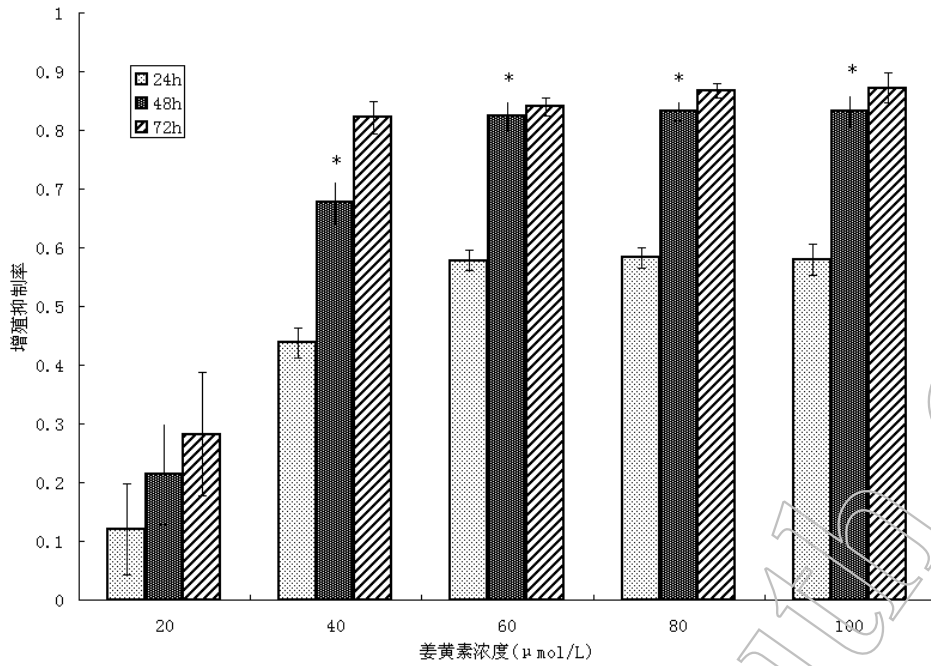


图1 不同浓度姜黄素对髓母细胞瘤 Daoy 细胞的抑制作用

2.2 姜黄素对 Daoy 细胞凋亡的影响

姜黄素作用不同时间后, 流式细胞术分析结果显示: 48h后, 与Ct组比较, Cur组细胞出现明显的凋亡, 见图2。表明一定浓度的姜黄素能促进髓母细胞瘤凋亡。

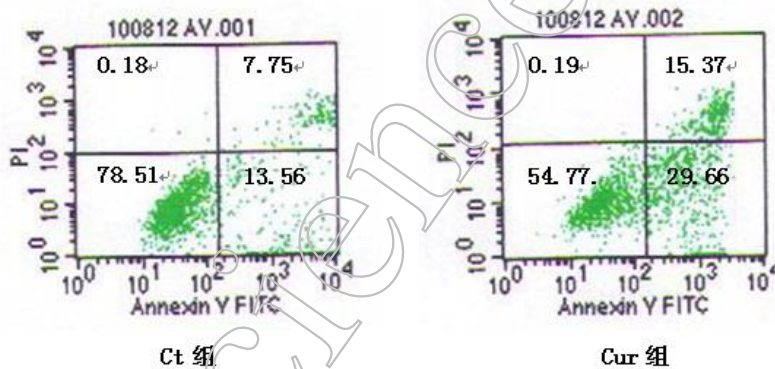
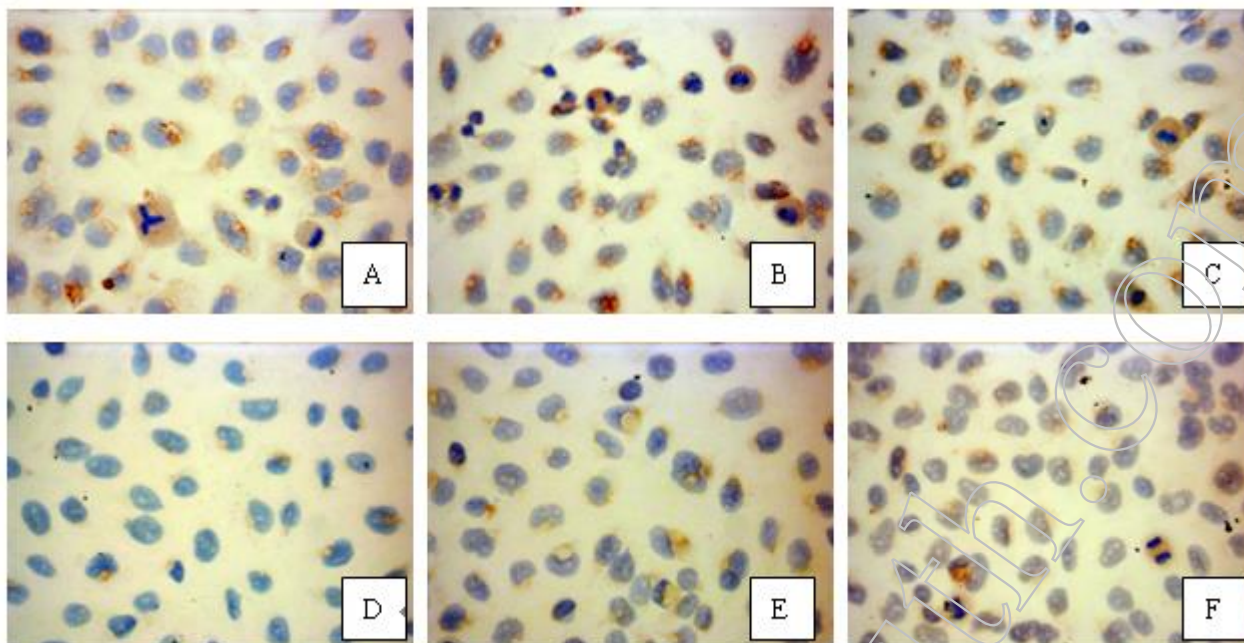


图2 流式细胞术检测Daoy细胞凋亡率

2.3 免疫细胞化学染色检测姜黄素对PI3K、Akt和p-Akt蛋白表达的影响

PI3K、Akt和p-Akt蛋白在对照组髓母细胞瘤中的表达呈强阳性, 胞质或胞膜出现棕褐色或黄色颗粒, 阳性表达率分别为80.7%、84.8%和87.5%。35μmol/L姜黄素作用48h后, 其阳性表达率明显下降, 分别为25.3%、58.8%和26.7%。两组比较, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。见图3。表明姜黄素能抑制PI3K和Akt蛋白的表达。



A: Ct 组 PI3K 强阳性表达; B: Ct 组 Akt 强阳性表达; C: Ct 组 p-Akt 强阳性表达;
D: Cur 组 PI3K 阳性表达明显减少; E: Cur 组 Akt 弱阳性表达; F: Cur 组 p-Akt 阳性表达

图3 髓母细胞瘤中PI3K和Akt表达情况(sp×400)

2.4 Western blot检测姜黄素对PI3K、Akt和p-Akt蛋白表达的影响

经姜黄素处理后, PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平均较对照组有所降低, 两组比较差异有统计学意义 ($t=15.530, 33.482, P<0.05$), 而 Akt 总蛋白水平变化不明显 ($t=6.777, P>0.05$)。见图 4。表明姜黄素能降低 PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达。

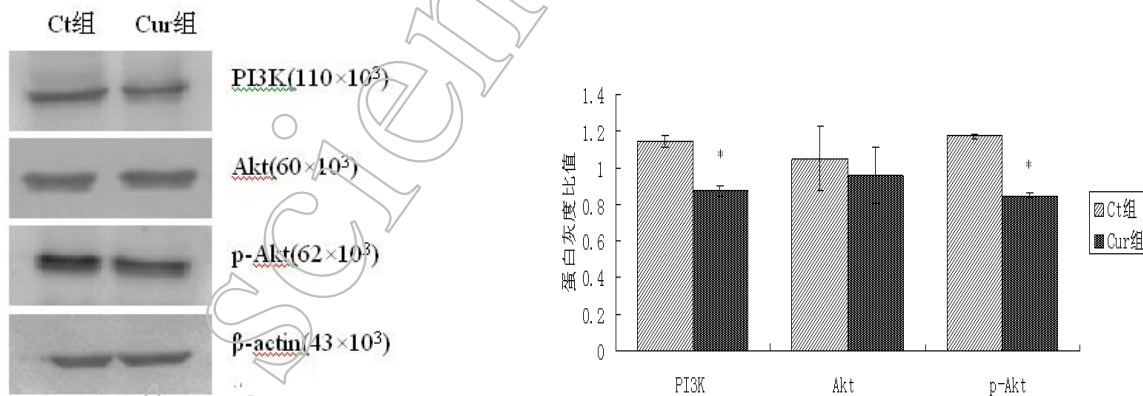


图4 Western blot 检测两组 Daoy 细胞中蛋白的表达

2.5 RT-PCR 检测姜黄素对PI3K、Akt和p-Akt mRNA转录的影响

姜黄素处理后, PI3K mRNA 转录水平较对照组降低, 两组比较差异有统计学意义 ($t=12.468, p<0.05$), Akt mRNA 转录水平变化不明显 ($t=5.370, p>0.05$)。见图 5。表明姜黄素抑制了 PI3K mRNA 的转录水平。

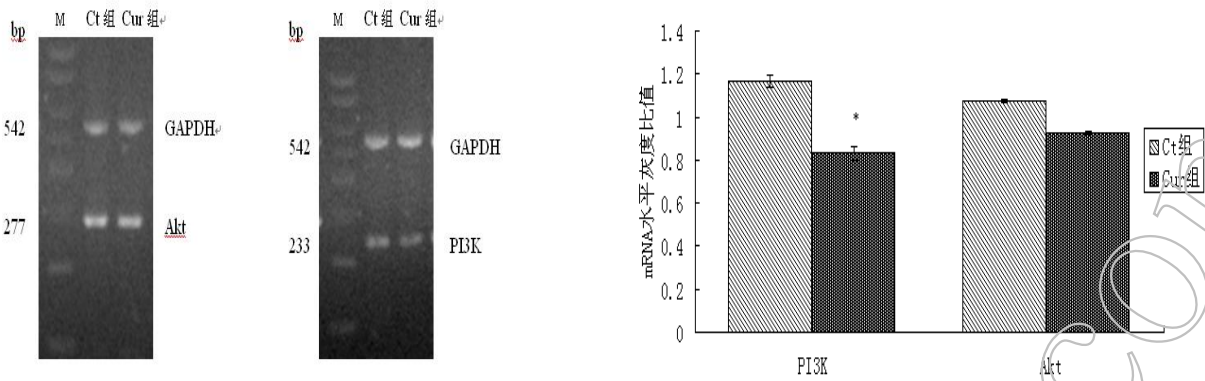


图5 RT-PCR 检测两组 Daoy 细胞中基因的转录水平

3 讨论

大量研究已经证实姜黄素对多种肿瘤有强烈的杀伤作用。姜黄素通过抑制 NF- κ B、COX-2、Bcl-2、Bcl-X 诱导肿瘤细胞的凋亡^[5]，通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制乳腺癌增殖^[6]。姜黄素可抑制 PI3K/Akt 信号通路促进膀胱癌 EJ 细胞的凋亡^[7]，或通过调控 Akt 信号通路抑制结肠癌的增殖^[8]。近年来，姜黄素对髓母细胞瘤的作用已有些许研究，但其对髓母细胞瘤中 PI3K/Akt 的作用机制尚不清楚。

本研究用 MTT 法测定姜黄素对髓母细胞瘤 Daoy 细胞株的生长抑制效应，实验结果表明姜黄素对 Daoy 细胞具有明显的生长抑制作用，并能诱导细胞发生凋亡，随着药物浓度的增加，细胞的生长抑制率及细胞凋亡率均明显升高。肿瘤的发生、发展与细胞凋亡异常密不可分，使用能够抑制肿瘤细胞生长，促进肿瘤细胞凋亡的抗癌药物是目前治疗肿瘤的主要手段。

PI3K/Akt 信号通路调节肿瘤细胞的增殖和存活，与肿瘤的侵袭转移行为关系密切。Akt 作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶是 PI3K 调控的主要靶蛋白之一。Akt 通过 PH 结构域与活化的 PI3K 激活产物相结合，自身发生磷酸化而被激活，调节细胞的增殖、分化、凋亡^[9]。Akt 的磷酸化水平可以作为衡量 PI3K 活性的指标反映 PI3K 信号通路的活性。人类多种肿瘤如卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌和胃癌等，PI3K 和 Akt 常显示过表达^[10-13]。PI3K/Akt 通路在髓母细胞瘤中的作用研究也日渐深入。林晓等^[14]采用免疫组化方法，发现髓母细胞瘤组织中 PI3K 和 Akt 蛋白的表达率显著高于对照脑组织。PI3K 可通过 Akt 信号通路促进髓母细胞瘤的增殖^[2]，并能调控辐射后髓母细胞瘤干细胞的生存^[15]。另有研究发现，PI3K/Akt 最重要的负调控因子-肿瘤抑制基因 PTEN 的缺失或者失活导致了 PI3K/Akt 异常激活而发生髓母细胞瘤^[16]。PI3K/Akt 下游的信号分子 NF- κ B、GSK-3 β 的异常表达也与髓母细胞瘤的进展有关^[17-19]。GSK-3 β 作为 Wnt/ β -catenin 通路中的负向调节因子，通过影响 β -catenin 的磷酸化而参与了 PI3K/Akt 信号通路对髓母细胞瘤增殖的调控^[20]。这些研究结果均提示 PI3K/Akt 参与了髓母细胞瘤的发生发展，是髓母细胞瘤预防和治疗的重要靶点。

本研究通过免疫细胞化学染色、Western blot 和 RT-PCR 检测发现，姜黄素处理 Daoy 细胞后，PI3K、p-Akt 蛋白和 mRNA 的表达水平比对照组下降，表明姜黄素抑制了髓母细胞瘤 Daoy 细胞中 PI3K 的表达。本研究中总 Akt 蛋白的表达没有明显改变，但 p-Akt 水平降低，提示姜黄素可通过抑制 PI3K 活性，从而抑制 AKT 的表达及活化。但姜黄素对 PI3K/Akt 信号通路下游分子的作用还不清楚，需要进一步探讨。

本研究结果提示, 姜黄素通过调控 PI3K/AKT 信号转导通路影响髓母细胞瘤细胞增殖, 但该信号转导途径中所涉及的其他调控分子还需进一步明确。深入研究姜黄素对髓母细胞瘤的作用机制, 对探索姜黄素对肿瘤预防和治疗作用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Ninib Baryawno, Baldur Sveinbjörnsson, Per Kogner, et al. Medulloblastoma A disease with disorganized developmental signaling cascades[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9 (13) : 2548-2554.
- [2] K. Höland, F. Salm, A. Arcaro. The Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway as a Therapeutic Target in Grade IV Brain Tumors[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2011, 11 (8) : 894-918.
- [3] Maha H. Elamin, 1 Zakia Shinwari, , et al. Curcumin Inhibits the Sonic Hedgehog Signaling Pathway and Triggers Apoptosis in Medulloblastoma Cells[J]. *MOLECULAR CARCINOGENESIS*, 2010, 49 (3) :302 - 314.
- [4] Kah Jing Lim, Savita Bisht, Eli E. Bar, et al. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin inhibits growth, clonogenicity and stem-like fraction in malignant brain tumors[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2011, 11(5): 464-473.
- [5] H. Hatcher, R. Planalp, J. Cho, et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials[J]. *Cell. Mol. Life Sci*, 2008, 65 (11) : 1631-1652.
- [6] Prasad CP, Rath G, Mathur S, et al. Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 181(2):263-271.
- [7] 王晶宇, 王志平, 赵俊丽, 等. 姜黄素作用PTEN /PI3K /AKT 通路诱导膀胱癌EJ细胞凋亡[J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(1):26-28.
- [8] Sara M. Johnson, Pat Gulhati, Isela Arrieta, et al. Curcumin Inhibits Proliferation of Colorectal Carcinoma by Modulating Akt/mTOR Signaling[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(8): 3185 - 3190.
- [9] 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(3): 306-311.
- [10] Almhanna K, Strosberg J, Malafa M. Targeting AKT protein kinase in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(12):4387-4392.
- [11] Riggio M, Polo ML, Blaustein M, Colman-Lerner A, et al. PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer[J]. *Carcinogenesis*. 2012, 33(3):509-518.
- [12] Carden CP, Stewart A, Thavasu P, et al. The association of PI3 kinase signaling and chemoresistance in advanced ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(7):1609-1617.
- [13] Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*. 2012, 7(8):1315-1326.
- [14] 林晓, 林青, 唐俐, 等. 髓母细胞瘤中PI3K、AKT 及Nrf2 的表达及其意义[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24 (9):1057-1060.
- [15] Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK, et al. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo[J]. *Genes Dev*, 2008, 22 (4) :436-448.
- [16] Wolfgang Hartmann, Boris Dizon-Sontgerath, Arend Koch, et al. Phosphatidylinositol 3 -Kinase/AKT Signaling Is Activated in Medulloblastoma Cell Proliferation and Is Associated with Reduced Expression of PTEN[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12 (10) :3019-3027.
- [17] Susan E Spiller, Naomi J Logsdon, Lindsey A Deckard, et al. Inhibition of nuclear factor kappa-B signaling reduces growth in medulloblastoma in vivo[J]. *BMC Cancer* 2011, 11:136.
- [18] Addanki P. Kumar, Gretchen E. Garcia, Jon Orsborn, et al. 2-Methoxyestradiol interferes with NF-κB transcriptional activity in primitive neuroectodermal brain tumors: implications for management[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24 (2) :209 - 216.
- [19] D Meley, DG Spiller, MRH White, et al. p53-mediated delayed NF-κB activity enhances etoposide-induced cell death in medulloblastoma[J]. *Cell Death and Disease*, 2010, 1 (5) : e41.
- [20] Ninib Baryawno, Baldur Sveinbjörnsson, Staffan Eksborg, et al. Small-Molecule Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Inhibit Wnt/β-Catenin Pathway Cross-Talk and Suppress Medulloblastoma Growth[J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (1) :266-276.