

[文章编号] 1000-4718(2006)11-2194-04

姜黄素对前列腺癌细胞 LNCaP 增殖的影响*

杨磊, 张莲英[△], 陈蔚文, 胡晓燕, 张建业, 崔福爱

(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: 姜黄素对前列腺癌细胞株 LNCaP 增殖和凋亡的影响。方法: 用不同剂量的姜黄素分别处理 LNCaP 细胞, 显微镜下观察细胞形态; MTT 法检测细胞生长情况; 流式细胞技术 (FCM) 检测细胞凋亡率; 然后检测姜黄素处理 LNCaP 细胞后培养液中总前列腺特异抗原 (PSA) 的变化, 并用免疫印迹 Western blotting 技术检测雄激素受体 (AR) 的表达。结果: 姜黄素能够抑制前列腺癌细胞 LNCaP 的增殖和生长, 40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 最强, 细胞存活率为对照的 40%; 姜黄素诱导 LNCaP 细胞凋亡, 细胞形态呈凋亡特征, 且 40 $\mu\text{mol/L}$ 作用最强, 凋亡率为 9.23%; 姜黄素抑制 LNCaP 细胞 PSA 表达, 且 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理细胞 24 h 对 PSA 表达的抑制作用最强, PSA 含量仅为对照的 20%; Western blotting 检测结果显示姜黄素抑制 AR 的表达, 并且对 AR 表达的抑制程度依赖于姜黄素的浓度。结论: 姜黄素抑制 LNCaP 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 且表现出时间和剂量依赖性。姜黄素抑制 LNCaP 细胞 PSA 与 AR 受体的表达。

[关键词] 前列腺肿瘤; 姜黄素; 细胞凋亡; LNCaP 细胞

[中图分类号] R737.25 [文献标识码] A

Effect of curcumin on the proliferation and apoptosis in LNCaP cells

YANG Lei, ZHANG Lian-ying, CHEN Wei-wen, HU Xiao-yan, ZHANG Jian-ye, CUI Fu-ai

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China. E-mail: zhanglianying@sdu.edu.cn)

[ABSTRACT] AIM: To observe the effect of curcumin on the proliferation and apoptosis of prostate cancer cell line LNCaP. **METHODS:** LNCaP cells were treated with different doses (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$) of curcumin and its effects were analyzed in cell growth and apoptosis by microscope, MTT colorimetric assay and flow cytometry. The expression of prostate specific antigen (PSA) was measured by AXSYMTM system - chemical luciferase methods and expression of androgen receptor (AR) was detected by Western blotting. **RESULTS:** The results showed that curcumin inhibited the proliferation of LNCaP cells. The cell growth was inhibited by curcumin in a dose dependent manner and the optimal dose and time was 40 $\mu\text{mol/L}$, 24 h. Curcumin induced apoptosis in LNCaP cells, the most dramatic dose was 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, at this dose the apoptosis rate was 9.23%. Curcumin inhibited the expression of PSA in LNCaP cells and the most dramatic dose and time was 40 $\mu\text{mol/L}$, 24 h. The PSA in this group was 20% of the control group. Curcumin inhibited the expression of AR on prostate cancer cells. **CONCLUSION:** Curcumin decreases proliferation and induces apoptosis in LNCaP cells in a dose-dependent manner. Curcumin also inhibites the expression of PSA and AR on LNCaP cells.

[KEY WORDS] Prostatic neoplasms; Curcumin; Apoptosis; LNCaP cells

姜黄素是从多年草本植物姜黄中提取的一种酚类色素,它具有消炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化和降血脂等作用^[1]。近年来,随着医学与分子生物学的发展,人们对姜黄素的抗诱变及抗癌作用有了进一步认识。在西方前列腺癌是男性肿瘤发病率最高的恶性肿瘤之一,前列腺癌与前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA) 关系密切,多数前列腺癌患者无论早期或晚期均有 PSA 持续表达,高度表达者

占 90% 以上,因此 PSA 已作为前列腺癌临床诊断和治疗监测的敏感指标之一^[2]。雄激素及其受体在前列腺癌的发生发展过程中发挥重要作用^[2]。PSA 的表达受雄激素调节^[3],雄激素进入前列腺上皮细胞后首先与细胞核内雄激素受体 (androgen receptor, AR) 结合,引起 AR 构象改变,随后 AR 与热休克蛋白解离,受体磷酸化后形成二聚体,二聚体与 PSA 启动子中雄激素应答元件结合,诱导 PSA 基因的转录

[收稿日期] 2005-03-15 [修回日期] 2005-06-06

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30171026); 山东省中医药局立项项目

△ 通讯作者 E-mail: zhanglianying@sdu.edu.cn

表达^[4]。本研究在细胞水平探讨姜黄素对前列腺癌细胞增殖和凋亡的影响。

材 料 和 方 法

1 材料

姜黄素(curcumin)购自 Sigma 公司,前列腺癌细胞 LNCap,由本室保存。ECL 系统 Western blotting 试剂盒购自北京中山生物公司,硝酸纤维素膜购自北京鼎国生物技术发展中心,AR 单克隆抗体(鼠抗人)辣根过氧化物酶标记的抗体(羊抗鼠)购自北京中山公司。

2 细胞培养

LNCap 细胞在 37 ℃、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 1 × 10⁵ U/L。

3 姜黄素对 LNCap 细胞形态的影响

在生长对数期的 LNCap 细胞中分别加入姜黄素至终浓度为 0 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L、40 μmol/L,并于 0、12、24 和 48 h 倒置显微镜下观察 LNCap 细胞,激光扫描共聚焦显微镜摄像系统对各实验组细胞形态进行图像采集。

4 MTT 法测细胞生长曲线

LNCap 细胞以 3.0 × 10⁴ cells/well 接种于 96 孔细胞培养板中,37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养,不同浓度 0 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L、40 μmol/L 的姜黄素处理 12、24、36 和 48 h 终止培养,终止培养前 4 h 加入 5 g/L MTT 10 μL,终浓度为 0.5 g/L,4 h 后弃上清液,DMSO 溶解 MTT 结晶,用 Biotek Microplate EJ309 酶标测定仪测 A 值,检测波长 570 nm,参考波长为 630 nm,各组每次测 12 孔,重复 3 次取均值,以下式计算细胞相对存活率(以空白组 A 值调零):

细胞相对存活率(%) = (A 实验组/A 对照组) × 100%
结果进行统计学分析。各组实验均重复 3 次。

5 FCM 测细胞生长周期

分别以终浓度为 0 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L、40 μmol/L 的姜黄素处理 LNCap 细胞 24 h 后收集,1 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗涤,70% 乙醇 4 ℃ 固定过夜,保存于 4 ℃ 备用;LNCap 细胞同法洗两次,500 目铜网过滤,离心,加碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色液,4 ℃ 避光过夜。流式细胞仪测定 DNA 荧光强度及散射光参数,激发光波长 488 nm,并用凋亡软件测定细胞凋亡率及细胞周期分布。

6 姜黄素对 LNCap 细胞 PSA 表达的影响

用不同浓度的姜黄素处理 LNCap 细胞 12、24、36 和 48 h 后收集细胞培养液,用美国雅培第 3 代 AXSYM™ 系统化学发光法测定总 PSA。以 PSA 值为纵坐标,以时间为横坐标作相关曲线。

7 Western blotting 检测 AR 的表达

不同浓度的姜黄素分别处理 LNCap 细胞,24 h 后收集细胞,PBS 洗涤,用 1 × SDS 加样缓冲液(50 mmol/L Tris - Cl, pH 6.8, 100 mmol/L DTT, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝,10% 甘油)裂解细胞。收集裂解液,用 Bradford 蛋白定量测定试剂初步测定蛋白浓度,进行 SDS - PAGE。然后将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上,加入鼠抗人 AR 单抗(1:1 000)、鼠抗人 actin 多抗(1:2 000)及羊抗鼠 HRP II 抗,最后用 ECL 荧光 Western blotting 试剂盒进行显色。

结 果

1 姜黄素对 LNCap 细胞形态的影响

姜黄素处理后 24 h 组的 LNCap 细胞,在显微镜下观察发现细胞形态有明显的变化,部分细胞出现凋亡征象,表现为细胞收缩变圆,胞体变小,与周围失去联系,胞膜形成泡状突起,胞质收缩;有典型凋亡小体存在。而对照组细胞没有明显变化(图 1)。

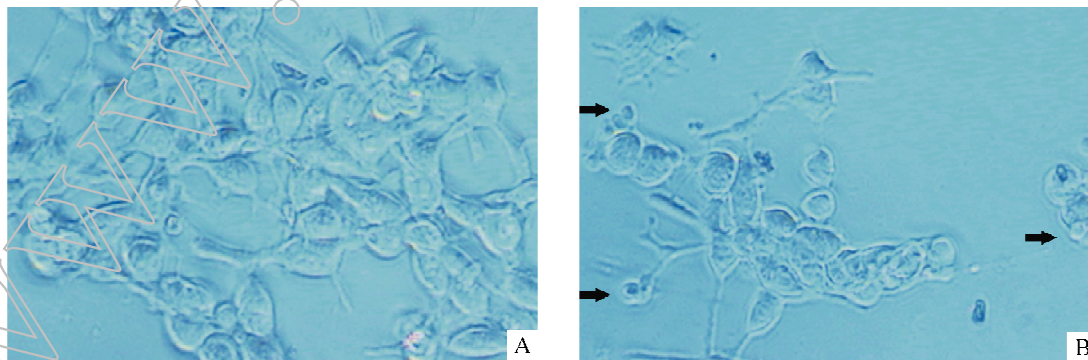


Fig 1 Morphological change were observed in prostate LNCap cells by phase - contrast microscopy (×200). A: normal cells; B: cells treated with 40 μmol/L curcumin.

图 1 相差显微镜下观察前列腺癌 LNCap 细胞的形态变化

2 MTT 测细胞存活率

MTT 法测的 LNCap 细胞的存活率,结果显示姜黄素能够抑制细胞的增殖和生长,并于 40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 最强,细胞存活率为对照的 40% (图 2)。

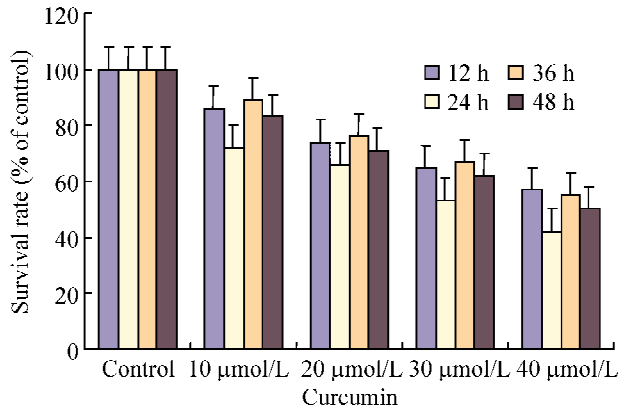


Fig 2 Survival rate of cells by MTT colorimetric assay. $\bar{x} \pm s$. $n = 12$. $P < 0.01$ each group vs control.

图 2 MTT 法测定细胞存活率

3 FCM 测细胞生长周期

姜黄素可诱导 LNCap 细胞凋亡,0、10、20、30 和 40 μmol 姜黄素作用于细胞的凋亡率分别为 1.20、1.22、2.22、3.69 和 9.23%。40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素效果最显著,10、20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用不明显。

4 姜黄素对 PSA 表达的影响

不同浓度的姜黄素分别处理 LNCap 细胞 12、24、36 和 48 h 测 PSA 值为纵坐标,以时间为横坐标的曲线如图 (图 3) 示。结果发现随着姜黄素作用时间的延长,PSA 的表达显著降低,24 h 时达最低值,仅为对照组的 20% - 30%,之后 PSA 表达增加;40 $\mu\text{mol/L}$ 抑制作用最强。

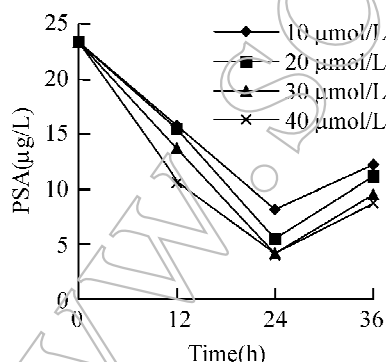


Fig 3 Effect of curcumin on PSA expression. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. $P < 0.01$ each group vs control.

图 3 姜黄素对 PSA 含量的影响

5 Western blotting 检测 AR 表达

不同浓度姜黄素分别处理 LNCap 细胞 24 h 后,Western blotting 检测 AR 表达,结果见图 (图 4)。姜黄素抑制 AR 的表达,并且对 AR 表达的抑制程度依

赖于姜黄素的浓度。

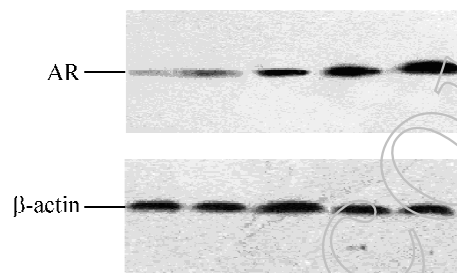


Fig 4 AR expression detected by Western blotting experiment. From right to left:0, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin.

图 4 Western blotting 检测 AR 表达

讨论

目前治疗前列腺癌的主要手段是内分泌治疗,包括外科去势、抗雄激素等,治疗的原理是减少雄激素水平或与雄激素竞争与 AR 结合,从而激活 AR 的生物学作用,此类治疗对于雄激素依赖性前列腺癌有较好的治疗效果,但对晚期激素非依赖性的患者疗效不佳,当前虽然有观点认为雄激素非依赖性前列腺癌不依赖 AR 途径,但多数研究认为该种前列腺癌 AR 仍然表达甚至高表达^[4,5],之所以对内分泌治疗不敏感可能由几方面的原因引起:(1) AR 过度表达,低浓度雄激素即可诱发其生物学效应;(2) AR 不需要配体,在一些生长因子或细胞因子的作用下也可激活。因此,如果能完全阻断 AR 的表达,不仅会有效抑制雄激素依赖性前列腺癌的生长增殖,对雄激素非依赖性前列腺癌也能产生同样的效果。

本实验发现姜黄素抑制前列腺癌细胞的生长,40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 最强,细胞存活率为对照的 40%;进一步发现姜黄素能够抑制 LNCap 细胞 PSA 表达,且 40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理细胞 24 h,对 PSA 表达的抑制作用最强,PSA 含量仅为对照的 20%。PSA 的表达受雄激素的调节,实验结果显示姜黄素抑制 AR 的表达,且抑制强弱与姜黄素的剂量呈正比。因而推测姜黄素通过抑制 AR 的表达使 AR 量减少,减弱了雄激素对 PSA 基因表达的调节作用,使 PSA 量减少,同时也抑制了前列腺细胞的生长。有些物质可上调 AR 的表达,例如生长因子使 AR 增加 5 倍^[6]。通过姜黄素对 AR 基因表达的影响研究,可以为其在前列腺癌药物治疗中的应用前景提供有力的分子生物学依据。

[参 考 文 献]

- [1] Dorai T, Gehani N, Katz AE. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. II. Curcumin inhibits

- tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor and depletes the protein[J]. *Mol Urol*, 2000, 4(1): 1-6.
- [2] Montgomery BT, Young CYF, Bilhartz DL, et al. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP[J]. *Prostate*, 1992, 21(1): 63-73.
- [3] Young CYF, Montgomery BT, Andrews PE. Hormonal regulation of prostate-specific antigen mRNA in a human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(14): 3748-3752.
- [4] Chen CD, Welshie DS, Tran C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy[J]. *Nat Med*, 2004, 10(1): 33-39.
- [5] Taplin ME, Balk SP. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91(3): 483-490.
- [6] Weiss-Messer E, Merom O, Adi A, et al. Growth hormone (GH) receptors in prostate cancer: gene expression in human tissues and cell lines and characterization, GH signaling and androgen receptor regulation in LNCaP cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 220(1-2): 109-123.

中国病理生理杂志 Chinese Journal of Pathophysiology 2006, 22(11): 2197-2206

[文章编号] 1000-4718(2006)11-2197-02

高原红细胞增多症患者血浆组织因子水平

孙乃同¹, 贾乃镛², 顾明¹, 王纯斌¹, 卞杰¹

(¹江苏省盐城市第三人民医院血液科, 江苏盐城 224001; ²青海医学院附属医院血液科, 青海西宁 810001)

【摘要】 目的: 通过测定高原低氧环境中, 不同人群血浆组织因子水平, 探讨其在高原红细胞增多症病理变化中的作用。方法: 采用固相双抗体夹心酶联免疫吸附法测定高原红细胞增多症患者、高原世居健康人群及不同居住时间的高原移居健康人群血浆组织因子浓度, 与世居西宁健康人群对照, 进行方差分析和相关分析比较研究。结果: 高原红细胞增多症组血浆组织因子浓度明显高于对照组 ($P < 0.01$), 并与高原世居及移居各组比较均有显著差异 ($P < 0.01$); 高原红细胞增多症组血浆组织因子浓度与血红蛋白水平呈正相关 ($r = 0.608, P < 0.01$), 与血小板计数呈负相关 ($r = -0.862, P < 0.01$)。结论: 高原红细胞增多症患者及移居高原健康居民血浆组织因子水平明显升高。

【关键词】 高海拔; 缺氧; 红细胞增多症; 凝血致活酶

【KEY WORDS】 Altitude; Anoxia; Erythrocythemia; Thromboplastin

【中图分类号】 R363 **【文献标识码】** A

组织因子(tissue factor, TF)即凝血因子Ⅲ, 是外源性凝血系统的启动因子, 机体内活性最强的促凝物质之一。近几年的研究已清楚表明 TF 与血栓、弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)、肿瘤、缺氧等^[1-3]多种临床病理生理现象密切相关。位于 TF 启动子 -111 +14 bp 序列的 3 个 Egr-1 位点, 是缺氧时诱导 TF 基因转录的顺式调节元件。Nakanishi 等^[4]曾于模拟的高空缺氧条件下探讨 TF 表达水平及意义。本研究应用酶联免疫吸附实验(enzyme linked-immuno-sorbent assay, ELISA)方法, 测定高原红细胞增多症(high altitude polycythemia, HAPC)患者、高原移居、世居正常人群血浆 TF 的浓度, 并与西宁世居人群对照, 由此探讨 TF 与高原缺氧状态下 HAPC 发生、发展及凝血机制异常之间的关系。

材料和方 法

1 研究对象

HAPC 组, 20 例, 均为男性, 居住青海省果洛州玛多县

(海拔高度 4 300-4 500 m) 患者, 均按“中华医学会第三届全国高原医学学术会”推荐的关于 HAPC 诊断标准确诊。对照组及移居组、世居组、急进组分别为西宁健康志愿者及青海省果洛州玛多县移居(居住高原时间 > 1 年)、世居居民及短期居住高原(时间 < 1 月), 均为男性。所有研究对象均进行血常规、尿常规、心电图、胸透、肝功能及 B 超检查, 均排除各种急、慢性感染性疾病, 心、肾、肺疾患、肿瘤及其它严重疾病。其年龄上没有统计学意义。

2 样品的采集及保存

采集清晨空腹静脉血 10 mL, 按 1:9(抗凝剂:血)比例加入 3.8% 柠檬酸钠溶液, 至无菌试管中轻轻颠倒混匀后 3 000 r/min 离心 10 min, 收集血浆分装, 于液氮中冻存。测定前, 将冻存血浆置 37 °C 解冻 15 min, 并用样品缓冲液按 1:4 稀释。

3 方法

采用固相双抗体夹心 ELISA 方法测定血浆 TF, 严格按照

[收稿日期] 2005-03-22 [修回日期] 2005-06-28

Tel: 0515-8905945; E-mail: snt500@sohu.com

(下转第 2206 页)