

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.010

· 基础研究 ·

姜黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞增殖的抑制作用及其可能机制

赵莉, 蔡轶, 何艳华, 覃媛(广州医科大学药学院蛇毒研究所, 广东广州 510182)

[摘要] **目的:**观察姜黄素对鼻咽癌细胞株 C666-1 增殖及凋亡的影响,探讨其可能的作用机制。**方法:**0、10、25、50 及 100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 或 50 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素不同时间(0、6、12 及 24 h)后, CCK-8 法检测 C666-1 细胞的增殖情况, TUNEL 法检测细胞凋亡, Western blotting 检测不同浓度姜黄素作用 24 h 后细胞内 AMPK、S6K1 及 S6 蛋白磷酸化情况。**结果:**与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后, 对 C666-1 细胞增殖的抑制作用显著增强[(38.33 \pm 6.53)%、(21.14 \pm 5.36)% vs (100 \pm 0.00)% , 均 $P < 0.05$]; 50 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 6、12、24 h 后, 对 C666-1 细胞增殖的抑制作用显著增强[(49.6 \pm 5.67)%、(47.7 \pm 6.65)%、(46.86 \pm 9.4)% vs (100 \pm 0.00)% , 均 $P < 0.05$]。50、100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用后细胞的凋亡率显著增加[(43 \pm 12.53)%、(48 \pm 8.54)% vs (2.87 \pm 1.03)% , 均 $P < 0.05$], 50 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 12、24 h 后, 细胞凋亡率随作用时间延长而增加[(35.33 \pm 5.86)%、(47.33 \pm 13.01)% vs (4.33 \pm 3.21)% , 均 $P < 0.05$]。50、100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素可促进细胞内 AMPK 磷酸化, 抑制其下游 mTOR 信号通路中 S6K 及 S6 蛋白的磷酸化活化[(3.87 \pm 1.38)、(0.19 \pm 0.16)、(0.39 \pm 0.24) vs 1; (4.34 \pm 1.34)、(0.059 \pm 0.043)、(0.11 \pm 0.095) vs 1, 均 $P < 0.05$]。**结论:**姜黄素可显著抑制鼻咽癌 C666-1 细胞增殖和诱导细胞凋亡, 其机制可能与影响 AMPK、S6K1 及 S6 蛋白磷酸化有关。

[关键词] 姜黄素; 鼻咽癌; 雷帕霉素靶蛋白; C666-1 细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R739.6; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)03-0293-05

Inhibitory effect and mechanism of curcumin on nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells proliferation and apoptosis

Zhao Li, Cai Yi, He Yanhua, Qin Yuan(Venom Research Institute, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the effect of curcumin on mTOR signaling, proliferation and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells *in vitro*. **Methods:** C666-1 cells were stimulated by curcumin at increasing concentrations (0, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h or at a concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$ for 0, 6, 12 h and 24 h. Cell proliferation was assessed with the Dojindo's Cell Counting Kit-8 (CCK-8), cell apoptosis by a TUNEL-based assay and levels of AMPK, S6K, S6 proteins by Western blotting. **Results:** Curcumin inhibited C666-1 cell proliferation and induced C666-1 cell apoptosis in dose- and time-dependent manners. In parallel with changes in cell proliferation and apoptosis, levels of phosphorylated AMPK were increasing but levels of phosphorylated S6K1 and S6 proteins were decreasing with the dose of curcumin used; against the baseline levels arbitrarily set as 1 in C666-1 cells in the non-treatment control group, the fold of changes in levels of phosphorylated AMPK, S6K1 and S6 proteins was 3.87 \pm 1.38, 0.19 \pm 0.16 and 0.39 \pm 0.24, respectively, in cells treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h and was 4.34 \pm 1.34, 0.059 \pm 0.043 and 0.11 \pm 0.095, respectively, in cells treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. **Conclusion:** Curcumin may inhibit nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and induce nasopharyngeal carcinoma cell apoptosis through an mTOR signaling pathway-dependent mechanism.

[Key words] curcumin; nasopharyngeal carcinoma; mammalian target of rapamycin; C666-1 cell; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 293-297]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81302357), 广东省自然科学基金资助项目(No. S2013040016493), 广东高校优秀青年创新人才培养计划资助项目(No. 2013LYM0075)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81302357), the Guangdong National Natural Foundation(No. 2013040016493), and the Foundation for Distinguished Young Talents in Higher Education of Guangdong Province (No. 2013LYM0075)

[作者简介] 赵莉(1979 -), 女, 山东省淄博市人, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤药理方面的研究。E-mail: zhaoli790122@163.com

[通信作者] 蔡轶(Cai Yi, Corresponding author), E-mail: yicaisysu@163.com

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种发生于鼻咽部的鳞状上皮细胞癌,我国华南地区高发^[1-2]。放疗联合辅助化疗是鼻咽癌的常规治疗手段,针对早期局部病灶治疗效果较好^[3],但传统化疗方案常导致胃肠功能紊乱、骨髓抑制等不良反应,患者较难耐受,影响治疗效果和生活质量。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路整合来自细胞内外的各种信号,对细胞代谢、生长增殖及存活等生理过程发挥着中心调节作用^[4,5],在人类癌症中发现 mTOR 信号通路调节异常^[5]。姜黄素(curcumin)是一种提取自姜科姜黄属植物根茎的多酚类活性物质,具有抗氧化、抗炎、保护心脑血管系统以及抗肿瘤活性^[6]。mTOR 信号通路是否参与姜黄素诱导鼻咽癌细胞凋亡的过程,国内外尚未见相关文献报道。本研究观察姜黄素对鼻咽癌细胞株 C666-1 的增殖及凋亡的影响,通过检测 mTOR 上游负向调控 mTOR 活性的能量感受器 AMP 激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)、下游核糖体蛋白 S6 激酶 1(S6 kinase 1, p70 S6K1)等,初步探讨雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路在其中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鼻咽癌细胞株 C666-1 由南方医科大学基础医学院肿瘤研究所姚开泰院士惠赠。DMEM 高糖培养基、胎牛血清(Gibco)及 P-AMPK α (Thr172)兔单抗、p70 S6K 兔多抗、P-S6(Ser235/236)兔多抗、P-p70 S6K(Thr389)小鼠单抗购自基因公司。姜黄素(纯度 > 98%)购自 Aladdin 公司,用二甲基亚砜(DMSO)配成 50 mmol/L 储液, -20℃ 避光保存。Cell Counting Kit-8(CCK-8)为日本同仁化学研究所产品,TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司,AMPK α 1/2 兔多抗、S6 小鼠单抗、 β -actin 小鼠单抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠及羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司,ECL 化学发光试剂购自 Thermo Scientific 公司。

1.2 细胞培养与处理

C666-1 细胞使用 DMEM 高糖培养基(胎牛血清 10%),置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。取对数生长期细胞,接种至细胞培养板,待细胞贴壁后血清饥饿 12 h,随后无血清条件下加入姜黄素培养预定时间,进行相应实验。每个实验重复 3 次。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖率

将对数生长期 C666-1 细胞,以 1×10^5 /孔的密

度接种于 96 孔板,经前期处理后,无血清条件下加入 0、10、25、50 及 100 μ mol/L 姜黄素作用 24 h 或 50 μ mol/L 姜黄素作用 0、6、12 及 24 h,每组设 6 个平行孔。于培养结束前 1 h,每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,实验结束时,将 96 孔板置于酶标仪 450 nm 波长处检测各孔光密度(D_{450})。细胞增殖率(%) = 实验组 D_{450} /对照组 $D_{450} \times 100\%$ 。

1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

接种于 48 孔板的 C666-1 细胞,无血清条件下加入 0、25、50 及 100 μ mol/L 姜黄素作用 24 h 或 50 μ mol/L 姜黄素作用 0、6、12 及 24 h,待姜黄素作用结束后,按照 TUNEL 检测试剂盒说明书依次进行操作。弃培养基,PBS 漂洗,4% 多聚甲醛固定,PBS 漂洗,1% Triton X-100 通透,漂洗,3% H₂O₂ 封闭,漂洗,加入 DNase I 反应液反应,加入 TdT 酶反应液反应,最后于荧光显微镜激发波长 450-500 nm,发射波长 515-565 nm 处检测荧光。镜下细胞核呈绿色的细胞为 TUNEL 反应阳性细胞,即凋亡细胞。随机计数 10 个高倍视野下阳性细胞所占百分数即为细胞凋亡率。

1.5 Western Blotting 检测 SIRT1 蛋白水平

以 2×10^6 /孔的密度将 C666-1 细胞接种于 6 孔板,经 0、25、50 及 100 μ mol/L 姜黄素处理 24 h 后,弃培养基,按照文献[6]蛋白提取方法提取细胞总蛋白。加入 Laemmli buffer(62.5 mmol/L pH 6.8 的 Tris-HCl,2% w/v SDS,10% 甘油,50 μ mol/L 的 β -巯基乙醇,0.01% w/v 溴酚兰),刮取并收集细胞裂解液,100℃ 煮沸 5 min,低温高速离心 3 min, $\times 13\ 400\ g$ 。取 10 μ l 上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、免疫印迹,检测 SIRT1 蛋白表达,蛋白条带使用 BioRad Quality One 软件进行灰度定量分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 姜黄素抑制 C666-1 细胞增殖

量效实验中,与 0 μ mol/L 组比,50、100 μ mol/L 姜黄素作用 24 h 后,对 C666-1 细胞增殖的抑制作用显著增强[(38.33 \pm 6.53)%、(21.14 \pm 5.36)% vs (100 \pm 0.00)%],均 $P < 0.05$ 。时效实验中,50 μ mol/L 姜黄素作用 6、12、24 h 后,对 C666-1 细胞增殖的抑制作用显著增强[(49.6 \pm 5.67)%、(47.7 \pm 6.65)%、(46.86 \pm 9.4)% vs (100 \pm 0.00)%],均 P

<0.05](图 1)。

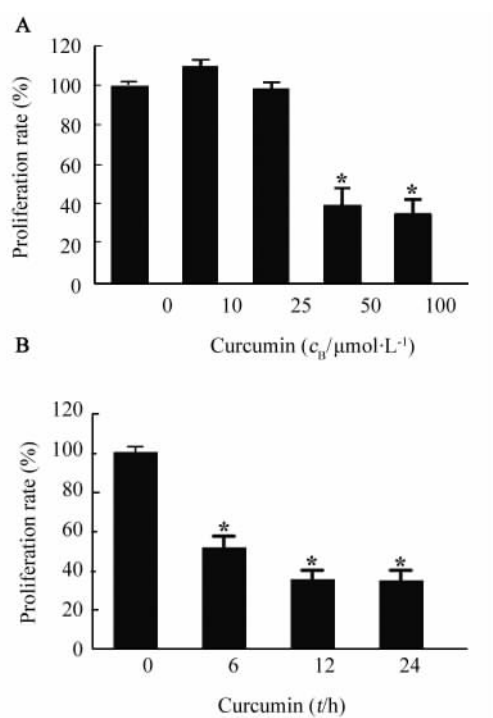


图 1 姜黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞增殖的影响
Fig. 1 Effect of curcumin on proliferation of nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells

A: Treatment with different concentration of curcumin for 24 h, * $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ group;
B: Treatment with 50 $\mu\text{mol/L}$ curcumin for different time, * $P < 0.05$ vs 0 h group

2.2 姜黄素诱导 C666-1 细胞凋亡

量效实验中, 0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 24 h 后, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 组的诱导凋亡作用显著增强[(43 ± 12.53)%、(48 ± 8.54)% vs (2.87 ± 1.03)%], 均 $P < 0.05$ 。时效实验中, 50 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 12、24 h 后, 诱导凋亡作用显著增强[(35.33 ± 5.86)%、(47.33 ± 13.01)%], vs (4.33 ± 3.21)%], 均 $P < 0.05$](图 2)。

2.3 姜黄素抑制细胞 mTOR 信号通路

0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用 C666-1 细胞 24 h, 提取细胞蛋白, western blotting 检测 AMPK、S6K 及 S6 三种蛋白磷酸化水平, 结果显示, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 对照组比, 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用组的 P-AMPK、P-S6K 及 P-S6 的相对表达量的差异均有统计学意义[(3.87 ± 1.38)、(0.19 ± 0.16)、(0.39 ± 0.24) vs 1; (4.34 ± 1.34)、(0.059 ± 0.043)、(0.11 ± 0.095) vs 1], 均 $P < 0.05$]。结果提示, 姜黄素可促进细胞内 AMPK 磷酸化, 抑制其下游 mTOR 信号通路中 S6K 及 S6 蛋白的磷酸化活化。

3 讨论

鼻咽癌具有高度侵袭性和转移性, 在中国南方尤其是广东、广西两省, 鼻咽癌发病率是欧美等其他国家的 25 ~ 30 倍^[2]。由于鼻咽癌发生部位隐蔽, 50% ~ 70% 的初诊患者都已处于临床病程的 II b-IV 期, 或已发生淋巴结转移^[9]。因鼻咽癌发生的特殊解剖位置, 治疗方法首选放疗联合顺铂为基础的辅助性化疗^[10], 但化疗药物带来的较难耐受的不良反应常常导致患者被迫中断疗程, 这可能增加患者复发或转移的几率。因此, 寻找一种高效低毒的抗肿瘤药物是目前鼻咽癌研究的热点。

目前, 姜黄素的抗肿瘤作用已成为研究热点。姜黄素安全性高、毒性作用小, 因此有望作为一种天然的抗肿瘤药物^[11-13]。目前发现姜黄素可呈时间和剂量依赖性地抑制白血病 K562、人胃癌 MGC80-3 细胞等肿瘤细胞增殖, 并诱导其凋亡^[11]。并可诱导鼻咽癌 CNE-2Z 细胞发生 S 期和 G₂/M 期阻滞, 抑制 Bcl-2 基因表达, 促凋亡基因 Bax 表达增加, 从而抑制其生长和增殖^[12-14], 提示姜黄素对鼻咽癌具有一定的抑制作用。目前为止, 姜黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞株的增殖及凋亡的影响并不清楚, 相应的分子机制也有待于进一步探讨。

mTOR 是一种丝/苏蛋白激酶, 联系磷脂酰肌醇 3 激酶/AKT 信号通路及其下游通路, 促进肿瘤细胞生长、存活及肿瘤耐药性^[14-15]。哺乳动物中, mTOR 有 mTORC1 和 mTORC2 两种存在形式, AMPK 则作为 mTOR 上游负向调控 mTOR 活性。mTORC1 下游底物有 S6K1 和真核细胞起始因子 4E 结合蛋白-1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1, 4E-BP1), 它们共同调控核糖体产生及蛋白合成^[16], 从而影响细胞的生长增殖等生理过程。通常通过检测其下游蛋白 (S6K 和 S6、4E-BP1) 的磷酸化水平间接反映 mTOR 的活性。

姜黄素可通过内质网应激、线粒体途径、caspase3 级联反应等方式诱导肿瘤细胞的凋亡^[17-19]。本研究发现, 50 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素体外作用 12 h, 即可抑制鼻咽癌细胞 C666-1 增殖, 并诱导其发生凋亡, 同时促进细胞内 AMPK 磷酸化, 进而抑制其下游 mTOR 信号通路中 S6K 及 S6 蛋白的磷酸化活化。提示姜黄素通过诱导凋亡及抑制 mTOR 信号通路, 抑制鼻咽癌 C666-1 细胞增殖。但关于姜黄素诱导 C666-1 细胞凋亡的确切机制以及 mTOR 信号通路是否参与姜黄素诱导的 C666-1 细胞凋亡, 尚需进一步验证。

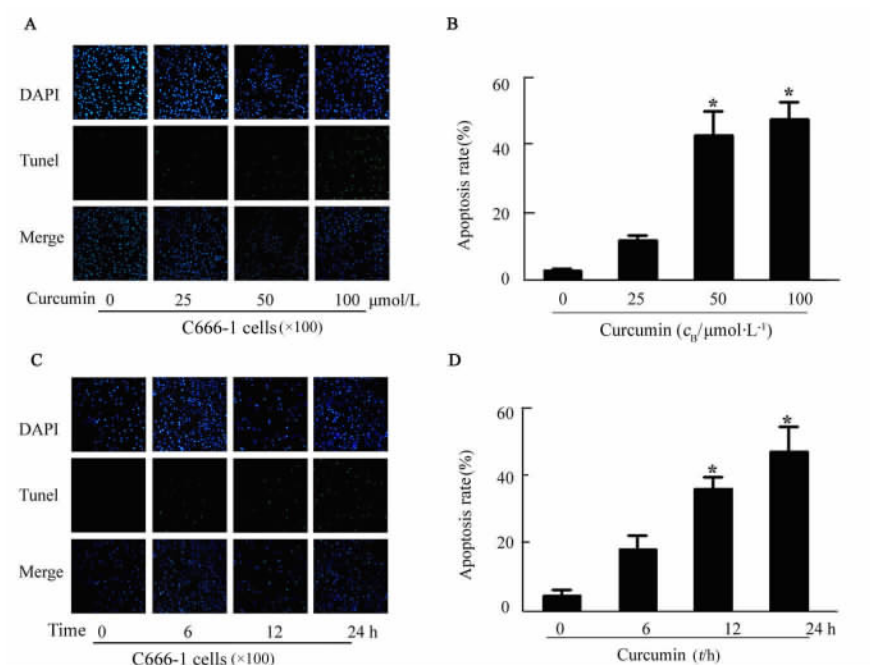


图2 姜黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of curcumin on apoptosis in nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells

A and B: Treatment with different concentration of curcumin for 24 h (* P < 0.05 vs 0 μmol/L group);
C and D: Treatment with 50 μmol/L curcumin for different time(* P < 0.05 vs 0 h group)

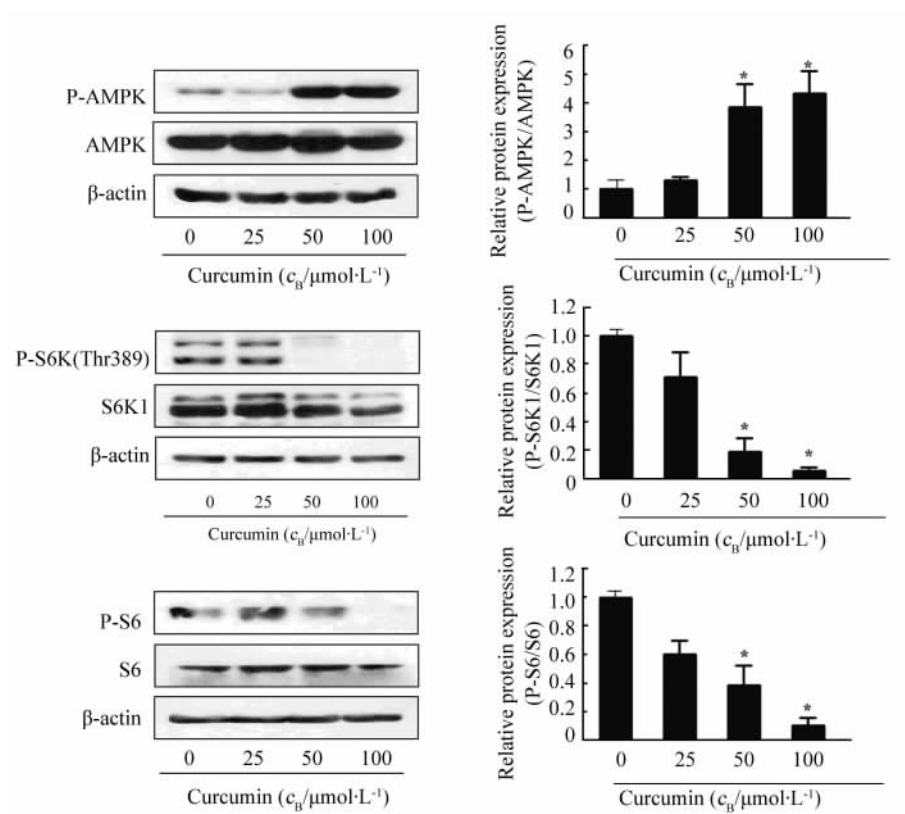


图3 姜黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞 mTOR 信号通路的影响

Fig.3 Effect of curcumin on mTOR signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells

Phosphorylation of AMPK, S6K1 and S6 in C666-1 treated with different concentration of curcumin for 24 h. * P < 0.05 vs 0 μmol/L group

[参 考 文 献]

- [1] Chen X, Hong Y, Feng J, et al. Concurrent chemoradiotherapy comparison of taxanes and platinum versus 5-fluorouracil and platinum in nasopharyngeal carcinoma treatment [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(1): 142-149.
- [2] Wei WJ, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma [J]. Lancet, 2005, 365(9476): 2041-2054.
- [3] Lee AW, Tung SY, Chua DT, et al. Randomized trial of radiotherapy plus concurrent-adjuvant chemotherapy vs radiotherapy alone for regionally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(15): 1188-1198.
- [4] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(1): 21-35.
- [5] Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer [J]. Trends Mol Med, 2005, 11(8): 353-361.
- [6] Tsang CK, Qi H, Liu LF, et al. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(3/4): 112-124.
- [7] 罗廷顺, 李洪文, 刘正文, 等. 姜黄素的提取分离与药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 102-107.
- [8] Zhao L, Wen ZH, Jia CH, et al. Metformin induces G1 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Anat Rec (Hoboken), 2011, 294(8): 1337-1343.
- [9] Hong B, Lui VW, Hui EP, et al. Reverse phase protein array identifies novel anti-invasion mechanisms of YC-1 [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(6): 842-852.
- [10] Al-Sarraf M, Leblanc M, Giri PG, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: Phase III randomized Intergroup study 0099 [J]. J Clin Oncol, 1998, 16(4): 1310-1317.
- [11] 沃兴德, 洪行球, 高承贤. 姜黄素最大耐受量试验 [J]. 浙江中医学院学报, 2000, 24(2): 55-82.
- [12] 沃兴德, 洪行球, 高承贤, 等. 姜黄素长期毒性试验 [J]. 浙江中医学院学报, 2000, 24(1): 61-65.
- [13] 曲佳, 陈玲珍, 詹昱, 等. 姜黄素对人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞外源性凋亡通路的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(1): 25-30.
- [14] Reuter S, Charlet J, Juncker T, et al. Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171: 436-447.
- [15] 梁统, 陈美珺, 周克元, 等. 姜黄素诱导低分化鼻咽癌细胞株 CNE-22 的凋亡 [J]. 癌症, 2004, 23(12): 1651-1654.
- [16] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance [J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 20): 3589-3594.
- [17] Chen J, Wei H, Xie B, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in drug-sensitive and -resistant leukemia cells [J]. Leuk Res, 2012, 36(12): 1526-1535.
- [18] Reddy CA, Somepalli V, Golakoti T, et al. Mitochondrial-targeted curcuminoids: A strategy to enhance bioavailability and anticancer efficacy of curcumin [J]. PLoS ONE, 2014, 9(3): e89351.
- [19] Gopal PK, Paul M, Paul S. Curcumin Induces caspase mediated apoptosis in JURKAT cells by disrupting the redox balance [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(1): 93-100.

[收稿日期] 2014 - 03 - 20

[修回日期] 2014 - 04 - 26

[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

参考文献题名后须标注文献类型和文献载体标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都须标上[文献类型标志]或[文献类型标志/文献载体标志]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。

现把常用的文献类型标志代码和电子文献载体标志代码介绍如下:

表 1 文献类型和文献载体标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联 机 网 络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		