

姜黄素阻断 NF- κ B 信号通路促进食管鳞癌 细胞凋亡的体外研究

田芳^{1,2}, 宋敏³, 许培荣², 刘红涛², 薛乐勋²

Curcumin Promotes Apoptosis of Esophageal Squamous Carcinoma Cell Lines Through Inhibition of NF- κ B Signaling Pathway

TIAN Fang^{1,2}, SONG Min³, XU Pei-Rong², LIU Hong-Tao², XUE Le-Xun²

1. 郑州大学基础医学院

病理生理学教研室,

河南 郑州 450052

2. 郑州大学细胞生物学研究室,

河南 郑州 450052

3. 郑州大学第一附属医院

肿瘤科,

河南 郑州 450052

1. Department of Pathophysiology,

School of Basic Medicine,

Zhengzhou University,

Zhengzhou, Henan, 450052,

P. R. China

2. Department of Cell Biology,

Zhengzhou University,

Zhengzhou, Henan, 450052,

P. R. China

3. Department of Oncology,

The First Affiliated Hospital,

Zhengzhou University,

Zhengzhou, Henan, 450052,

P. R. China

通讯作者:薛乐勋

Correspondence to: XUE Le-Xun

Tel: 86-371-66658332

Fax: 86-371-66658332

E-mail: xuelx@371.net

基金项目:教育部“十五”211工程
重点建设项目

Grant: “211 Project” of Education
Ministry of China

收稿日期:2007-11-21

修回日期:2008-03-07

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Activation of NF- κ B signaling pathway plays a critical role in the initiation and progression of carcinogenesis. However, the role of NF- κ B pathway in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) has not been fully elucidated. Studies have shown that curcumin possesses anti-infection and anti-oxidation effects. This study was to evaluate whether curcumin could induce apoptosis through inhibition of NF- κ B signaling pathway in ESCC cells. **METHODS:** Expressions of pI κ B α and Bcl-2 were detected using Western blot after incubation of ESCC cells with curcumin (50 μ mol/L) at different time points. Apoptosis and the number of viable ESCC cells were analyzed using flow cytometry and MTT, respectively, after the treatment of curcumin, 5-FU, or the combination of curcumin and 5-FU. **RESULTS:** In two ESCC cell lines, EC9706 and Eca109, curcumin inhibited I κ B α phosphorylation and Bcl-2 in a time-dependent manner; curcumin alone increased cell apoptosis ($P < 0.05$), and the effect became more prominent when it was combined with 5-FU ($P < 0.05$); curcumin plus 5-FU exerted a stronger inhibition effect on cell proliferation than curcumin alone ($P < 0.05$) or 5-FU alone ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Curcumin inhibits the phosphorylation of I κ B α , leading to suppression of proliferation, induction of apoptosis and an increase of the sensitivity of ESCC cell lines towards 5-FU.

KEYWORDS: Esophageal carcinoma; EC9706 cells; Eca109 cells; Curcumin; Signaling pathway; NF-kappaB; I κ B α ; Bcl-2; Apoptosis

【摘要】背景与目的:活化的核转录因子-kappa B(nuclear factor-kappa B,NF- κ B)信号通路参与调控多种与炎症、抗凋亡、肿瘤形成和转化有关的基因表达。但在食管鳞癌中的作用尚不清楚。姜黄素具有抗感染、抗氧化等多种药理作用。本研究将探讨姜黄素是否能够通过阻断 NF- κ B 信号通路对食管鳞癌细胞增殖、抗凋亡产生影响。方法:Western blot 法检测 EC9706 和 Eca109 细胞中加入姜黄素(50 μ mol/L)培养不同时间后,pI κ B α 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达情况。在 EC9706 和 Eca109 细胞中加入姜黄素培养 72 h,流式细胞仪检测凋亡细胞情况。MTT 法检测姜黄素单独或与 5-FU 联合对细胞增殖的影响。结果:Western blot 的结果显示,在姜黄素作用下 EC9706 和 Eca109 细胞中 pI κ B α 和 Bcl-2 蛋白的表达水平随着时间的延长逐渐下降。在单独使用姜黄素后,就可促进 EC9706 和 Eca109 细胞的凋亡($P < 0.05$);当与 5-FU 联合使用时,可明显提高 EC9706 和 Eca109 细胞对化疗药物的敏感性,凋亡细胞显著增加($P < 0.05$)。姜黄素与 5-FU 联合应用 48 h 和 72 h,可明显抑制 EC9706 和 Eca109 细胞的增殖,与单独使用姜黄素或 5-FU 组相比,细胞存活率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:姜黄素可以通过抑制 I κ B α 的磷酸化阻断 NF- κ B 信号通路,促进细胞凋亡,抑制细胞增殖,增加细胞对 5-FU 的敏感性。

关键词:食管肿瘤; EC9706 细胞; Eca109 细胞; 姜黄素; NF- κ B; 信号通路; I κ B α ; Bcl-2; 凋亡

中图分类号:R735.1 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2008)06-0566-05

食管癌是世界上常见的恶性肿瘤之一,其死亡率居整个恶性肿瘤死亡的第6位^[1]。食管鳞癌是一种侵袭性很强的肿瘤,它预后差、临床进展迅速,多伴有淋巴结转移且易复发。核转录因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)是近年来发现的转录调控因子, NF- κ B 最常见的形式是由 p50 和 p65 组成的异源二聚体,在绝大多数静止期的细胞中, NF- κ B 与其抑制物 I κ B α 蛋白相结合,以非活性形式存在于细胞质中。许多刺激物可以通过对 I κ B α 的磷酸化而使其降解,使解离的 NF- κ B 进入到核内并暴露它的核识别位点,从而促进靶基因的转录。NF- κ B 调控的下游基因包括 IL-1、COX2、MMP9 等促进肿瘤发生的基因; VEGF、TNF 等与肿瘤血管生成有关的基因; ICAM-1、VCAM-1 等与肿瘤转移有关的基因; bcl-2、cIAP、TRAF 等与肿瘤抗凋亡有关的基因^[2]。活化的 NF- κ B 信号通路可增强肿瘤细胞对化疗药物的抵抗力,从而产生耐药性。有研究表明,在多种人类肿瘤,如肝癌、肠癌、宫颈癌中, NF- κ B 信号通路的激活在肿瘤的发生发展中起着重要的作用^[3-5]。

姜黄为姜科姜黄属植物,其主要活性成分为姜黄素,它具有抗感染、抗氧化、抗凝血、降血脂和抗动脉粥样硬化等多种药理作用。最近的一些研究表明,姜黄素可以抑制肿瘤细胞增殖和促进细胞凋亡,因此可以作为一种药物或作为传统化疗药物的辅助用药,用于肿瘤治疗^[6-8]。姜黄素是否能够抑制食管鳞癌细胞的增殖并促进细胞凋亡,姜黄素作用于食管鳞癌细胞的机制是否与 NF- κ B 信号通路有关,姜黄素是否能够成为食管鳞癌治疗中的辅助用药,尚不清楚。本文重点研究姜黄素是否能够通过阻断活化的 NF- κ B 信号通路,对食管鳞癌细胞的增殖和耐药等产生影响。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞系及细胞培养:人食管癌细胞 Eca109 由本室保存,人食管癌细胞 EC9706 由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠。细胞在含有体积分数为 10% 的胎牛血清、100 u/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液(Gibco 公司)中,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 的条件下培养,实验细胞均处于对数生长期。

抗体和试剂:鼠抗人 pI κ B α (sc-8404)和 Bcl-2

(sc-7382)单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒购自 Pierce 公司。姜黄素和 MTT 购自 Sigma 公司。凋亡试剂盒 Annexin V-FITC Kit 购自美国 BECKMAN COULTERTM 公司。

1.2 方法

1.2.1 姜黄素的配制 以少量 DMSO 溶解姜黄素粉剂,配成 100 μ mol/L 的溶液,置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。临用时,以完全培养液稀释姜黄素到所需浓度, DMSO 终浓度<0.1%。对照组培养液为含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,其中 DMSO 终浓度<0.1%。

1.2.2 胞浆、胞核蛋白的制备 按照细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒说明书,分别提取细胞质、细胞核蛋白,Bradford 法检测蛋白质的含量,-70 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 Western blot 测定蛋白的表达 在 EC9706 和 Eca109 细胞中加入姜黄素,分别培养 0、1、3 h 和 6 h 后,收集对照组和实验组细胞提取细胞质蛋白,检测 pI κ B α 和内参 actin 的表达。同时在 EC9706 和 Eca109 细胞中加入姜黄素分别培养 0、2、4 h 和 8 h 后,收集对照组和实验组细胞提取总蛋白检测 Bcl-2 的表达。经 12% SDS-PAGE 分离,电转到硝酸纤维膜上。5% 的脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 2 h,抗体按 1:100 孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 溶液洗涤 10 min \times 3 次,硝酸纤维膜分别与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:50 000)室温孵育 1 h 后, TBST 溶液洗涤 10 min \times 3 次, DAB 显色。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测凋亡细胞 在 EC9706 和 Eca109 细胞中加入姜黄素培养 72 h,或联合使用姜黄素和 5-FU 培养 72 h,分别收集对照组和实验组细胞,制备各组单细胞悬液,计数细胞。取至少 1 \times 10⁶ 个细胞移入新的 1.5 mL 离心管中,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,形成细胞团。小心移去上清液,冰预冷 PBS 洗细胞 2 次,保证每管细胞数至少 1 \times 10⁶ 个细胞。加 5 μ L Annexin V-FITC 和 2.5 μ L PI 到 100 μ L 的细胞悬液中,轻轻混匀;以未染色细胞调零,以 Annexin V-FITC 单染管和 PI 单染管做为基准参照,测定每个上样管数据,利用 CellQuest3.0 软件进行参数获取和资料分析,计算凋亡细胞百分比。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖 取培养至对数生长期的 EC9706 和 Eca109 细胞,调整细胞密度为 1 \times 10⁴/mL,接种于 96 孔板。将 EC9706 和 Eca109 细胞分为以下 4 组:对照组、姜黄素(50 μ mol/L)组、5-FU 组、姜黄素+5-FU 组;分别培养 24、48 h 和 72

h。同时设空白组和含有 0.1% DMSO 的阴性对照组,每一浓度设 5 个复孔。作用结束后,加入 MTT 20 μ L,继续培养 4 h 后去上清,每孔加入 200 μ L DMSO,振荡 15 min,在酶标仪上读出吸光值度(A 值)。细胞增殖率=(实验孔平均 A 值/对照孔平均 A 值) \times 100%。

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,统计学数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,对计量资料,两样本均数比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 姜黄素对 NF- κ B 信号通路的阻断作用

Western blot 的结果显示,EC9706 和 Eca109 细胞中 pI κ B α 蛋白的表达水平随着姜黄素作用时间的延长逐渐下降(图 1),I κ B α 磷酸化水平的降低,会直接影响 NF- κ B 的活化。

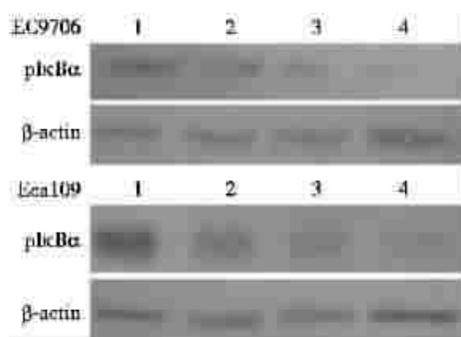


图 1 Western blot 法检测姜黄素(50 μ mol/L)对 2 种细胞中 I κ B α 磷酸化蛋白表达的影响

Figure 1 Effects of curcumin (50 μ mol/L) on the expression of pI κ B α in EC9706 and Eca109 cell lines detected by Western blot

Lane 1: 0 h; Lane 2: 1 h after incubation with curcumin; Lane 3: 3 h after incubation with curcumin; Lane 4: 6 h after incubation with curcumin.

2.2 姜黄素作用下 Bcl-2 的表达

EC9706 和 Eca109 细胞在姜黄素(50 μ mol/L)作用 0、2、4、8 h 后,分别提取细胞总蛋白检测 Bcl-2 蛋白的表达情况。结果表明,与对照组细胞相比,在姜黄素作用早期 Bcl-2 的表达就开始下降(图 2)。抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下调,将会促进 EC9706 和 Eca109 细胞的凋亡。

2.3 姜黄素单独或与 5-FU 联合对 EC9706 和 Eca109 细胞凋亡的影响

单独使用姜黄素(50 μ mol/L)72 h 后,就可促进 EC9706 和 Eca109 细胞的凋亡($P<0.05$);当与

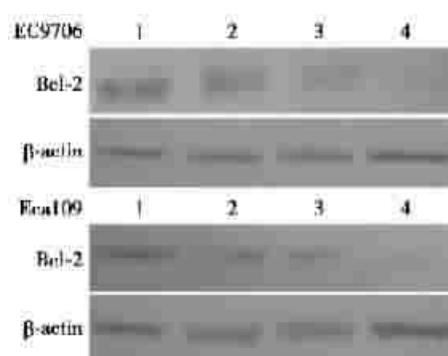


图 2 Western blot 法检测姜黄素(50 μ mol/L)对 2 种细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达

Figure 2 Effects of curcumin (50 μ mol/L) on the expression of Bcl-2 in EC9706 and Eca109 cell lines detected by Western blot

Lane 1: 0 h; Lane 2: 2 h after incubation with curcumin; Lane 3: 4 h after incubation with curcumin; Lane 4: 8 h after incubation with curcumin.

5-FU (327 μ g/mL) 联合使用时,可明显提高 EC9706 和 Eca109 细胞对 5-FU 的敏感性,凋亡和坏死细胞均显著增加($P<0.05$),见表 1。

表 1 流式细胞仪检测姜黄素作用下 EC9706 和 Eca109 细胞的凋亡

Table 1 The apoptotic percentages of EC9706 and Eca109 cell lines after treatment with curcumin and/or 5-FU detected by flow cytometry

Group	Apoptotic rate (%)	
	EC9706	Eca109
Control	2.03 \pm 0.08	2.66 \pm 0.25
Curcumin	10.80 \pm 0.59 ^a	16.00 \pm 0.10 ^a
5-FU	13.54 \pm 0.71	19.20 \pm 0.37
Curcumin+5-FU	27.01 \pm 0.33 ^b	32.45 \pm 0.50 ^b

^a $P<0.05$, vs. control group; ^b $P<0.05$, vs. 5-FU group

2.4 姜黄素与 5-FU 联合对 EC9706 和 Eca109 细胞增殖的影响

结果显示,姜黄素与 5-FU 联合应用在 48 h 和 72 h,可明显抑制 EC9706 和 Eca109 细胞的增殖,与单独使用姜黄素或 5-FU 组相比,细胞存活率显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

活化的 NF- κ B 信号通路可以促进多种下游调控基因的表达,包括细胞因子(TNF、IL-1)、趋化因子(IL-8、RANTES)、粘附分子(ICAM-1、VCAM-1)及与肿瘤发生发展有关的多种基因的表达(COX2、MMP9、Bcl-2、cIAP)。这些基因的过表达在促进肿

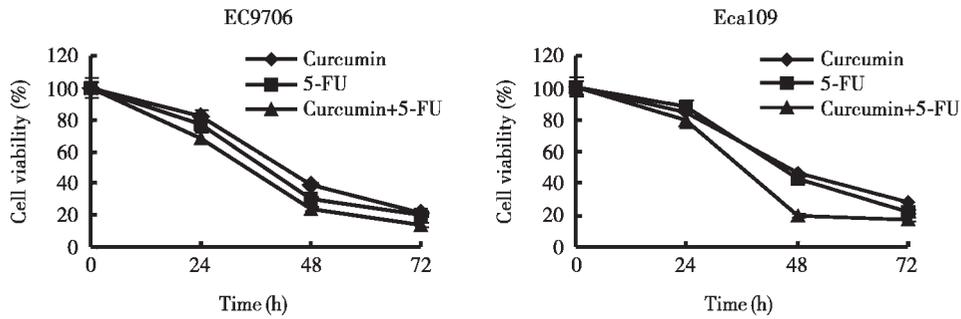


图3 姜黄素与 5-FU 单独或联合使用抑制 EC9706 和 Eca109 细胞的增殖

Figure 3 Effects of curcumin (50 μmol/L) alone, or 5-Fu (327 μg/mL) alone, or the combination of curcumin and 5-FU on the proliferation of EC9706 and Eca109 cell lines detected by MTT assay

瘤细胞的生成、转化、浸润和转移、抗凋亡及增加对化疗药物的耐受性等方面起着重要的作用,肿瘤的这些特征将会使患者的预后欠佳。因此,抑制 NF-κB 信号通路或许会有助于下调与肿瘤发生发展有关基因的表达,增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。姜黄素可以通过不同的机制产生抗炎抗肿瘤的特性^[9-11],研究表明,姜黄素可以通过干预 NF-κB 信号通路影响肿瘤细胞的生长和凋亡^[12,13]。

本研究使用 Western blot 法检测姜黄素 (50 μmol/L) 作用 EC9706 和 Eca109 细胞 0、1、3 h 和 6 h 后,细胞中 pIκBα 蛋白的表达。结果显示,EC9706 和 Eca109 细胞中 pIκBα 蛋白的表达水平随着姜黄素作用时间的延长逐渐下降,IκBα 磷酸化水平的降低会直接影响 NF-κB 的活化。提示,姜黄素可以抑制食管鳞癌细胞中 IκBα 磷酸化,使 NF-κB 不能从 NF-κB-IκBα 复合物上解离,NF-κB 不能进入细胞核起始转录。因此,姜黄素可以通过阻断 NF-κB 信号通路对食管鳞癌细胞的增殖产生影响。

大量的证据表明,细胞出现凋亡异常会引起肿瘤的发生和发展,更重要的是引起肿瘤细胞对化疗药物的耐受性。在肾癌细胞中,姜黄素可以诱导死亡受体(DR5)在 mRNA 和蛋白水平上的表达,从而促进由 TRAIL 诱发的细胞凋亡^[14]。本研究采用 Western blot 法检测姜黄素是否能够下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达。与对照组细胞相比,Bcl-2 的表达在姜黄素作用早期就开始下降。抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下调,将会促进 EC9706 和 Eca109 细胞的凋亡。同时采用流式细胞仪检测姜黄素单独或联合使用 5-FU 对细胞凋亡的影响。结果显示,单独使用姜黄素就可促进 EC9706 和 Eca109 细胞的凋亡 ($P < 0.05$);当与 5-FU (327 μg/mL) 联合使用时,可明显

提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,凋亡和坏死的细胞均显著增加 ($P < 0.05$)。

Uetsuka 等^[15]在对耐药的胃癌细胞的研究中发现,5-FU 可以引起细胞中 NF-κB 信号通路的激活;对于非耐药细胞,5-FU 可以促进 Caspase-3 和 Caspase-5 的表达,诱导细胞凋亡;当使用 NF-κB 抑制剂和 5-FU 联合应用时,可明显增加凋亡细胞数。另有研究显示姜黄素作用机制较复杂,可以通过多种途径诱导凋亡^[8,16]。本研究采用 MTT 法检测姜黄素单独或联合 5-FU 对 EC9706 和 Eca109 细胞增殖的影响。结果显示,与单独使用姜黄素或 5-FU 组相比,姜黄素与 5-FU 联合应用 48 h 和 72 h 可明显抑制 EC9706 和 Eca109 细胞的增殖,细胞存活率显著降低,差异有显著性 ($P < 0.05$)。提示,活化的 NF-κB 信号通路在 EC9706 和 Eca109 细胞的耐药性中起着一定作用,姜黄素可以通过抑制 NF-κB 的活性来增加 EC9706 和 Eca109 细胞对 5-FU 的敏感性,降低药物的用量,减少药物引起的副作用,其作用机制有待进一步研究。

总之,姜黄素作为一种化合物,副作用小且无毒,可以抑制食管鳞癌细胞中 IκBα 磷酸化,从而阻断 NF-κB 信号通路,促进食管鳞癌细胞对 5-FU 的敏感性,使肿瘤细胞凋亡数增加,有望成为食管癌治疗中的辅助用药。

[参 考 文 献]

[1] Pisani P, Parkin D M, Bray F. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990 [J]. Int J Cancer, 1999, 83 (1):18-29.
 [2] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, et al. NF-κB in development and progression of human cancer [J]. Virchows Arch, 2005, 446(5):475-482.
 [3] Wang J H, Huang Q K, Chen M X. The role of NF-κB in

- hepatocellular carcinoma cell [J]. *Chin Med J*, 2003,116(5): 747-752.
- [4] Yu H G, Yu L L, Yang Y. Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis [J]. *Oncology*, 2003,65(1):37-45.
- [5] Nair A, Venkatraman M, Maliekal T T. NF- κ B is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix [J]. *Oncogene*, 2003 9,22(1):50-58.
- [6] Khor T O, Keum Y S, Lin W, et al. Combined inhibitory effects of curcumin and phenethyl isothiocyanate on the growth of human PC-3 prostate xenografts in immunodeficient mice [J]. *Cancer Res*, 2006,66(2):613-621.
- [7] Aggarwal B B, Shishodia S, Takada Y, et al. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(20):7490-7498.
- [8] Radhakrishna Pillai G, Srivastava A S, Hassanein T I, et al. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin [J]. *Cancer Lett*. 2004, 208(2): 163-170.
- [9] Reddy R C, Vatsalab P G, Keshamounia V G, et al. Curcumin for malaria therapy [J]. *J BBRC*, 2005,326(2):472-474.
- [10] Pal S, Bhattacharyya S, Choudhuri T, et al. Amelioration of immune cell number depletion and potentiation of depressed detoxification system of tumor-bearing mice by curcumin [J]. *Cancer Detec Prev*, 2005,29(5):470-478.
- [11] Aggarwal B B, Kumar A, Bharti A C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies [J]. *Anticancer Res*, 2003,23(1A):363-398.
- [12] Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, et al. Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Cancer*, 2006,106(11):2503-2513.
- [13] Thompson K H, Bo'heimerle K, Polishchuk E, et al. Complementary inhibition of synoviocyte, smooth muscle cell or mouse lymphoma cell proliferation by a vanadyl curcumin complex compared to curcumin alone [J]. *J Inorganic Biochem*, 2004,98(12):2063-2070.
- [14] Jung E M, Lim J H, Lee T J, et al. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5) [J]. *Carcinogenesis*, 2005,26(11):1905-1913.
- [15] Uetsuka H, Haisa M, Kimura M, et al. Inhibition of inducible NF-kappaB activity reduces chemoresistance to 5-fluorouracil in human stomach cancer cell line [J]. *Exp Cell Res*, 2003,289(1):27-35.
- [16] Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Magalska A, et al. Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006,5(4):927-934.

[编辑及校对:张 菊]