

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.022.html>

◇药学研究◇

姜黄素对胃癌细胞增殖、迁移及 Hsp90/JAK/STAT3 通路的影响

李 磊 陈志武

摘要 目的 探讨姜黄素对胃癌细胞增殖与侵袭迁移的影响及其相关作用机制,为胃癌诊断、治疗提供新的途径。方法 用 CCK8 法比较不同处理组胃癌细胞的增殖能力,同时用 Trans-well 和划痕试验检测药物处理后细胞侵袭与迁移情况,通过实时荧光定量 PCR、Western blot 等技术检测癌细胞增殖相关信号通路热休克蛋白 90-贾纳斯激酶/信号转导因子和转录激活因子 3(Hsp90-JAK/STAT3) 中关键基因的转录与翻译水平。结果 CCK8 试验结果显示,姜黄素能明显抑制胃癌 SGC-7901 细胞株的增殖活性($P < 0.01$);Transwell 和划痕实验检测显示姜黄素对胃癌细胞的侵袭迁移能力起到显著抑制作用($P < 0.01$);实时荧光定量 PCR、Western blot 检测结果显示,姜黄素处理可使胃癌细胞中 Hsp90、JAK2 和 STAT3 的基因转录、蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。上述指标均呈现一定的浓度依赖性。结论 姜黄素能够显著降低胃癌细胞 SGC-7901 的增殖能力并抑制其侵袭和迁移,而这一过程可能与姜黄素对胃癌细胞中 Hsp90-JAK/STAT3 信号通路激活的抑制有关。因此,姜黄素在胃癌治疗方面可能会发挥重要作用。

关键词 姜黄素; 胃癌细胞; 增殖; 侵袭迁移; Hsp90-JAK/STAT3

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0448-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.022

胃癌发病率在我国各种恶性肿瘤中位居首位^[1]。幽门螺旋杆菌感染、工作压力增大以及生存环境改变等原因使患胃癌的人呈现年轻化趋势。很多胃癌早期症状不明显,造成胃癌早期诊断率低下^[2]。目前胃癌的治疗以手术切除为主,并辅助放化疗治疗,所以寻找高效的抗肿瘤药物尤为重要。侵袭和转移是恶性肿瘤治疗失败的主要原因,有效控制肿瘤的侵袭和转移是治疗的关键。姜黄素具有抗肿瘤作用,可影响肿瘤发生、发展的各个阶段,且几乎无不良反应^[3-4]。美国食品药品管理局已将其

2018-12-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81374002)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 李 磊, 男, 硕士研究生;

陈志武, 男, 教授, 博士生导师, 负责人, E-mail: wuzhicheng688@163.com

作为 21 世纪抗癌新药^[3-4]。该研究以胃癌 SGC-7901 细胞株为研究对象,探讨姜黄素对胃癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响及其分子机制,揭示了姜黄素对胃癌细胞的作用与作用靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料 TRIzol 试剂、RPMI1640 培养基、FBS、CCK8 均购自美国 Thermo 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 姜黄素购自上海碧云天生物科技公司; 一抗 GAPDH、JAK、STAT3 及二抗购自美国 Abcam 公司; 胃癌细胞 SGC-7901 购自中科院上海细胞所。

1.2 细胞培养及药物处理 首先将复苏的胃癌细胞加入含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 RPMI 1640 培养基, 放入恒温培养箱(37 °C, 5% CO₂) 中培养。当细胞汇合度达 90% 左右时消化、传代。将试验细胞分为 4 组, 每组按照 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度接种, 并用不同浓度姜黄素(0、15、25、35 μmol/L) 分别处理各组细胞并用于后续实验。

1.3 CCK8 法检测胃癌细胞增殖活性 姜黄素处理受试细胞后, 选取 24、48 h 时间点的细胞, 用含有 10% CCK8 的培养基对细胞进行换液, 置于培养箱中继续培养 4 h。在酶标仪 450 nm 波长下测定四组受试细胞的吸光度(optical density, OD) 值。

1.4 Transwell 实验检测胃癌细胞侵袭能力 姜黄素处理(0、25、35 μmol/L) 胃癌细胞 24 h 后, 胰酶消化, 用不含血清的 RPMI 1640 培养基制备细胞悬液, 将细胞悬液加入小室上室, 下室加入含有血清的培养液, 每组设置 3 个复孔, 保证每个小室内接种的细胞数一致。把细胞板置于恒温培养箱中培养 24 h。用棉签擦去上室内未穿膜的细胞后进行结晶紫染色, 显微镜下随机选取每个膜上的 5 个视野计数。

1.5 划痕实验检测胃癌细胞迁移能力 用姜黄素处理(0、25、35 μmol/L) 胃癌细胞 24 h 后, 将细胞接种于细胞板, 每组设置 3 个复孔, 培养一段时间。然后采用小枪头在孔底做划线处理, 弃去培养基, 用 PBS 清洗被划下的细胞, 加入新的培养基置于恒温

培养箱中继续培养 24 h 后进行拍照。

1.6 细胞总 RNA 的提取及 cDNA 合成 姜黄素处理胃癌细胞 24 h 后, 将 1 ml TRIzol 加入每孔细胞中进行裂解, 将裂解液转移至 EP 管, 向每管加入 200 μl 氯仿并摇匀, 室温放置 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。吸取上层水相至新的 EP 管, 加入 500 μl 异丙醇, 室温放置一段时间后, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 所得白色沉淀即为 RNA。用 75% 乙醇洗涤 RNA 2 次, 自然晾干后将 RNA 溶解于 DEPC 水中。cDNA 合成使用 TAKARA 的 One Step PrimeScript cDNA Synthesis Kit, 按照说明书指示进行逆转录操作。

1.7 实时荧光定量 PCR 实验 实时荧光定量 PCR 实验在 ABI 7300 Real-Time PCR System 仪器上按照 One Step SYBR ® PrimeScript™ RT-PCR Kit(TAKARA) 说明书进行操作, 反应程序为: 95 °C、30 s, 40 个循环的 95 °C、5 s 及 60 °C、30 s。GAPDH 作为内参, 实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。相关引物序列及产物大小见表 1。

表 1 qPCR 引物列表

基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
HSP90	F: CTCTTCCTCCGCTCTTG	163
	R: GTCTAGTTGACCGTCCGCA	
JAK2	F: GGGTGGAGACAACGTGACG	178
	R: GAAGTGGCGACCGAACA	
STAT3	F: CATCCTGAAGCTGACCCAGG	187
	R: TCCTCACATGGGGAGGTAG	

1.8 Western blot 实验 姜黄素处理胃癌细胞 24 h 后, 每孔中加入 200 μl 蛋白裂解液, 冰上裂解 30 min, 将裂解液转入 EP 管中。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 BCA 法测定总蛋白浓度。每组取等量蛋白样品加入适量 SDS 上样缓冲液, 混匀后置于 100 °C 水浴锅中加热 5 min, 变性失活。然后进行凝胶电泳, 湿转法将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉中室温孵育 2 h, 封闭完成后孵育一抗(稀释比为 1 : 1 000), 4 °C 过夜。次日在室温下孵育二抗 1 h, TBST 洗涤 3 次, 用 ECL 化学发光显色液显色, 凝胶成像设备进行结果观察并拍照, Image J 软件进行条带灰度值分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖活性

姜黄素对胃癌细胞 SGC-7901 增殖活性的抑制效果见图 1。结果显示: 测试浓度(15 ~ 35 $\mu\text{mol/L}$) 下的姜黄素作用 24 h 和 48 h 均能显著抑制胃癌细胞株 SGC-7901 的增殖水平($P < 0.05$), 并呈现出明显的浓度依赖性, 即随着姜黄素浓度增大, 抑制效果增强。

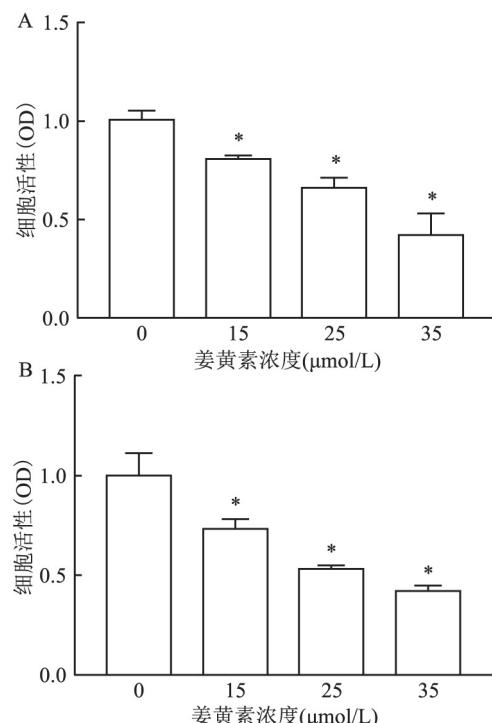


图 1 姜黄素对胃癌细胞 SGC-7901 细胞增殖活性的影响
A: 24 h; B: 48 h; 与对照细胞(0 $\mu\text{mol/L}$)比较: * $P < 0.05$

2.2 姜黄素抑制胃癌细胞 SGC-7901 的侵袭和迁移 姜黄素影响胃癌细胞 SGC-7901 侵袭和迁移的实验结果见图 2。结果显示, 测试浓度(25、35 $\mu\text{mol/L}$)下的姜黄素均能显著抑制胃癌细胞 SGC-7901 的侵袭和迁移能力($P < 0.05$)。

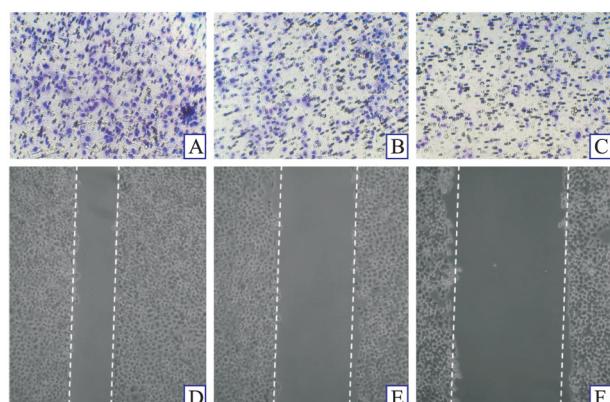


图 2 姜黄素对胃癌细胞 SGC-7901 侵袭与迁移能力的影响

A ~ C: 结晶紫染色 $\times 200$, 浓度依次为 0、25、35 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素对 SGC-7901 细胞的 Trans-well 小室实验; D ~ F: $\times 200$, 浓度依次为 0、25、35 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素对 SGC-7901 细胞的划痕实验

$\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素对受试胃癌细胞的侵袭和迁移均产生了明显抑制作用,且随着姜黄素浓度增大,其抑制效果增强($P < 0.05$)。

2.3 姜黄素处理抑制胃癌细胞增殖相关热休克蛋白 90 (heat shock proteins, HSP90)、贾纳斯激酶 2 (janus kinase JAK2) 和信号转导因子和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 基因的表达 胃癌细胞 SGC-7901 经姜黄素处理后,HSP90 mRNA、JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 的转录水平均显著下降($P < 0.05$),且具有明显的浓度依赖性,即随着姜黄素处理浓度的增大,其对细胞中增殖相关基因表达的抑制效果越明显。见图 3。

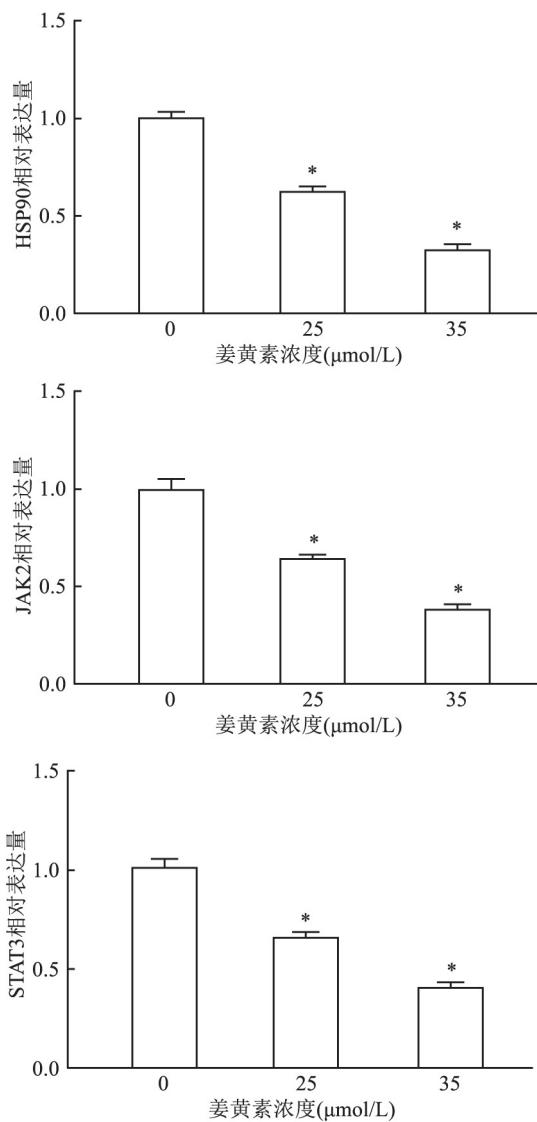


图 3 姜黄素对胃癌细胞 SGC-7901 中相关基因表达的影响
与对照细胞(0 $\mu\text{mol/L}$)比较: * $P < 0.05$

2.4 姜黄素处理抑制胃癌细胞增殖相关蛋白 HSP90、JAK2 和 STAT3 的表达/激活 各浓度姜黄素均未显著影响胃癌细胞 JAK2 与 STAT3 表达水平(图 4 统计图中未展示)。25 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理对胃癌细胞中 HSP90 表达、JAK2 和 STAT3 的表达与激活(p-JAK2 和 p-STAT3) 水平没有显著影响。而 35 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素可导致胃癌细胞中 HSP90 表达水平、JAK2 和 STAT3 激活水平的显著下调($P < 0.01$)。见图 4。

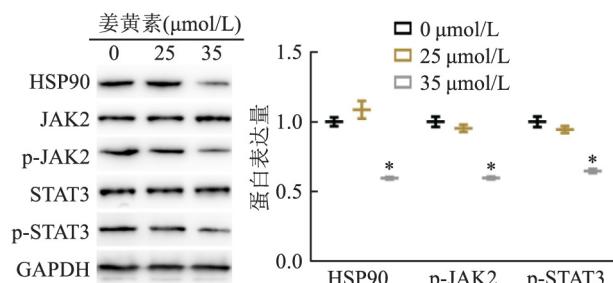


图 4 姜黄素对胃癌细胞 SGC-7901 中相关蛋白表达的影响

3 讨论

控制癌细胞转移是决定患者预后状况的重要因素^[5]。阻断胃癌细胞的转移成为目前医学及生命科学领域急需解决的问题。研究^[6]显示,植物中的某些活性化合物,如紫衫烷、姜黄素在肿瘤治疗方面发挥着相关作用。如在结肠癌细胞中,姜黄素衍生物降低了癌细胞的增殖迁移,促进了癌细胞凋亡^[7]。本实验检测了不同浓度姜黄素对胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响。结果表明,姜黄素显著抑制了癌细胞的增殖,且浓度增加,抑制效果越强。Transwell 和划痕试验结果显示,姜黄素也对受试胃癌细胞的侵袭和迁移具有显著抑制作用,且呈现浓度依赖性。这与之前的报道相一致^[7-8]。

癌症的发生发展是多因素参与的复杂过程。其中,癌细胞中增殖相关信号通路的异常激活发挥着重要作用,而其显著特点是关键蛋白表达与激活水平的升高^[1-2]。JAK2/STAT3 信号通路在多种肿瘤中都有激活。STAT3 经磷酸化的方式活化后进入胞核参与调控多种基因的表达,介导肿瘤细胞的增殖、侵袭和血管生成等。抑制 JAK 活性可抑制 STAT3 核转位与肿瘤形成。本研究显示,姜黄素处理组(特别是 35 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组)的胃癌细胞内,无论在 mRNA 水平还是蛋白水平,STAT3 及其上游调控蛋白 JAK 的激活均显著下调,并且这些基因表达与蛋白激活水平的变化也伴随着细胞增殖与侵袭迁移能

力的下降。说明姜黄素可能是通过改变胃癌细胞 JAK/STAT3 信号通路的激活来调控胃癌细胞的增殖、侵袭迁移。在胃癌细胞中, p-JAK 及 p-STAT3 可能是持续高表达的,这对于胃癌的发生、癌细胞的浸润与迁移具有重要的辅助作用^[9]。而本研究用 35 μmol/L 姜黄素处理胃癌细胞 24 h 后,才出现对 p-JAK 及 p-STAT3 的显著抑制效果(但仍然具有较高表达水平),这可能是由于胃癌细胞对药物具有较强抵抗性。

分子伴侣 HSP90 在包括胃癌在内的多种恶性实体肿瘤中高表达,参与肿瘤的发生、发展,并与其耐药和不良预后密切相关^[10-11]。缺氧诱导因子-1α 在多种上皮细胞癌中高表达,参与多种靶基因的转录激活,其中多数蛋白产物可促进血管形成并诱导肿瘤细胞对缺氧的适应,最终促进其转移与侵袭^[12]。而 HSP90 对维持 HIF 的正确构象或募集其他辅助因子必不可少^[13]。HSP90 表达也可促进 STAT3 磷酸化激活,而 p-STAT3 可促进热休克因子作用于 HSP90 基因靶点上,从而促进 HSP90 基因的转录^[14]。本研究表明,姜黄素显著抑制了胃癌细胞 HSP90 的 mRNA 转录以及蛋白表达水平,说明姜黄素能够通过下调胃癌细胞 HSP90 来发挥抗肿瘤功效。

本研究揭示了姜黄素可通过抑制胃癌细胞 Hsp90-JAK/STAT3 信号通路激活来限制其侵袭和迁移,对于胃癌的临床治疗具有一定借鉴意义。但其临床应用效果及安全性等有待进一步研究。

参考文献

- [1] 弓艳霞,唐艳萍,郭丽,等.地区差异对胃癌疾病特征的影响[J].世界华人消化杂志,2016,24(7):1092-7.
- [2] 沈卫东.胃炎样早期胃癌 26 例分析[J].实用临床医学(江西),2004,5(1):55-6.
- [3] Deeb D,Xu Y X,Jiang H ,et al. Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in Lncap prostate cancer cells [J]. Mol Cancer Ther 2003,2(1):95-103.
- [4] 许刚,黄文,张亚历.姜黄素防治肿瘤的机制研究进展[J].国外医学:生理病理科学与临床分册,2003,23(2):152-4.
- [5] 甘涛,夏涛,李威,等.产甲胎蛋白胃癌的临床病理及预后分析[J].华中科技大学学报:医学版,2012,41(4):481-4.
- [6] Berkovich L,Ron I,Earon G ,et al. The role of medicinal herbs with anti-inflammatory properties in prevention and treatment of cancer[J]. Harefuah,2012,151(11):629-32,654.
- [7] 何利兵,王险峰,王红胜,等.姜黄素衍生物体外抑制结肠癌细胞增殖侵袭作用[J].中国癌症杂志,2013,23(1):17-25.
- [8] 徐昉,牟晓玲,赵敬.姜黄素对人宫颈癌细胞 Caski 侵袭转移的影响[J].中山大学学报:医学科学版,2009,30(1):92-5.
- [9] 乔燕燕.JAK,p-STAT3 和 Bcl-2 在胃癌中的表达及意义[D].地区:内蒙古医学院,2008:1-41.
- [10] Lee K H,Lee J H,Han S W ,et al. Antitumor activity of NVP-AUY922, a novel heat shock protein 90 inhibitor in human gastric cancer cells is mediated through proteasomal degradation of client proteins[J]. Cancer Sci,2011,102(7):1388-95.
- [11] Lee H,Saini N,Parris A B ,et al. Ganetespib induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer cells through targeting of receptor tyrosine kinase signaling [J]. Int J oncol,2017,51(3):967-74.
- [12] Pennacchietti S,Michieli P,Galluzzo M ,et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene[J]. Cancer Cell,2003,3(4):347-61.
- [13] Hur E,Kim H H,Choi S M ,et al. Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1alpha/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol [J]. Mol Pharmacol,2002,62(5):975-82.
- [14] 陈雪松.STAT1 和 STAT3 在 hsp90α 基因表达调控中的作用[D].北京:中国协和医科大学基础医学院,1998:1-99.

Effect of curcumin on the proliferation,migration and Hsp90/JAK/STAT3 pathway of gastric carcinoma cells

Li Lei,Chen Zhiwu

(Dept of Pharmacology Basic Medical College of Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of curcumin on the proliferation and invasion/migration of gastric carcinoma cells and its potential action mechanism, and to provide a new way for the treatment of gastric cancer.

Methods CCK8 proliferation assay was conducted to compare the proliferation of SGC-7901 cell in curcumin treatment groups and control group. Wound healing assay and *in vitro* invasion assay were used to investigate the

(下转第 457 页)

- and cytotoxicity of some new 5-aminopyrazole and pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives [J]. *Sci Pharm*, 2015, 83(1): 27–39.
- [12] Choi E J, Cho B J, Lee D J, et al. Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 17.
- [13] Li X, Wu C, Chen N, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 33440–50.

Study on antitumor screening and mechanism of pyrazolo[4,3-d]pyrimidine derivatives

Chen Ran, Wang Baoshi, Liu Mingming, et al

(School of Pharmacy Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To evaluate the *in vitro* anti-proliferative activity of a series of pyrazolo[4,3-d]pyrimidine derivatives, and to study the preliminary antitumor mechanism of compound 9, which exhibits the strongest activities among synthesized compounds in glioma U87-MG cells. **Methods** MTT assay was used to observe the effect of compound 1–10 on the proliferation of four tumor cells (human liver cancer SMMC-7721 cells, human gastric cancer SGC-7901 cells, human gastric cancer MGC-803 cells and human glioma U87-MG cells). Annexin-V/PI double staining was used to detect the cell apoptosis induced by compound 9, and the expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax and the related pathway proteins p-Akt, Akt, p-mTOR and mTOR were detected by Western blot. **Results** MTT results showed that compounds 4, 5, 8 and 9 had inhibitory effects on the proliferation of four tumor cell lines. Among them, compound 9 had the strongest ability to inhibit the proliferation of glioma U87-MG cells in a time-and dose-dependent manner; Flow cytometry results showed that the apoptosis rate of U87-MG cells increased with the increase of compound 9 concentration, showing a dose-dependent manner. Western blot results showed that as the concentration of compound 9 increased, the expression of Bcl-2 protein was down-regulated and the expression of Bax protein was up-regulated. Meanwhile, the expression of Akt and mTOR protein remained basically unchanged, and the expression of p-Akt and p-mTOR protein was down-regulated. **Conclusion**

Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine derivative 9 significantly inhibits the proliferation of glioma U87-MG cells and induces apoptosis, and its possible mechanism of inducing apoptosis is achieved through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway.

Key words glioblastoma; pyrazolo[4,3-d]pyrimidine; Akt; mTOR

(上接第451页)

invasion and migration activities of gastric carcinoma cells after the administration of curcumin. The gene transcription and protein expression of Hsp90, JAK2 and STAT3 were determined by RT-qPCR and Western blot. **Results** Curcumin resulted in significant decrease in proliferation of SGC-7901 cells ($P < 0.01$). The invasion and migration of tested cells was also significantly inhibited ($P < 0.01$) by the curcumin treatment. Moreover, the Hsp90 expression and activation of JAK2 and STAT3 were decreased ($P < 0.01$) by the curcumin administration. All tested indexes showed obviously dose-dependent. **Conclusion** Curcumin could significantly reduce the proliferation ability of gastric cancer cell and inhibit its invasion and migration, which might be related to its inhibition of the activation of Hsp90-JAK/STAT3 signaling pathway. Curcumin may play an important role in the treatment of gastric cancer.

Key words curcumin; gastric carcinoma cells; proliferation; invasion and migration; Hsp90-JAK/STAT3