

姜黄素对 PC-3 前列腺癌细胞株生长抑制的体外实验研究

刘孝东¹⁾, 孔祥明²⁾, 张建华¹⁾, 陈剑珩¹⁾, 申吉泓¹⁾

(1) 昆明医科大学第一附属医院泌尿外科, 云南 昆明 650032; 2) 山东省滕州市中心人民医院小儿外科, 山东 滕州 277500)

[摘要] **目的** 探讨姜黄素对 PC-3 前列腺癌细胞株的生长抑制的作用及其可能机制. **方法** 用 MTT 法检测姜黄素对 PC-3 前列腺癌细胞的生长抑制作用. 流式细胞学 (flow cytometry, FCM) 检测细胞凋亡率. RT-PCR 检测姜黄素对 PC-3 细胞中脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN) mRNA 及 BAX mRNA 表达的影响. **结果** 姜黄素分别作用 24 h 和 48 h 后, PC-3 细胞的生长受到了明显地抑制, 并且具有时间 - 剂量依赖性. 各实验组与对照组相比, 抑制率具有统计学意义 ($P < 0.01$). 姜黄素处理 PC-3 细胞 24 h 组, 凋亡率随浓度的增加而增高, 在姜黄素浓度为 $40 \mu\text{mol/L}$ 时凋亡率最大, 各给药组与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$). 不同浓度姜黄素作用于 PC-3 细胞后 FASN mRNA 的表达明显降低, 随姜黄素的浓度增加而减少; 而 BAX mRNA 的表达明显增高, 随姜黄素的浓度增加而增高. **结论** 姜黄素明显抑制 PC-3 前列腺癌细胞的生长. 抑制 FASN mRNA 的表达, 增加 BAX mRNA 的表达, 诱导细胞凋亡增加可能是其作用机制之一.

[关键词] 脂肪酸合成酶; 姜黄素; 前列腺癌

[中图分类号] R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 05 - 0069 - 05

Growth Inhibition Effect of Curcumin on Prostate Cancer PC-3 Cells in Vitro

LIU Xiao - dong¹⁾, KONG Xiang - ming²⁾, ZHANG Jian - hua¹⁾, CHEN Jian - yan¹⁾, SHEN Ji - hong¹⁾

(1) Dept. of Urology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032;

2) Dept. of Pediatric Surgery, Central People's Hospital of Tengzhou City Shandong Province, Tengzhou Shandong 277500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the growth inhibition effect and mechanism of curcumin on prostate cancer PC-3 cells. **Methods** The growth inhibition effect of curcumin on PC-3 cells was determined using 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl) -2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Apoptosis rate was detected by Flow cytometry (FCM). The expression of fatty acid synthase (FASN) mRNA and BCL2-associated X protein (BAX) mRNA in response to curcumin was inspected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** After 24 and 48 hours, the growth of PC-3 cells was suppressed obviously by curcumin in a time- and dose-dependent manner in vitro. Compared with control group, the inhibition rate of each experimental group was statistically significant ($P < 0.01$). After PC-3 cells were treated with curcumin for 24 hours, apoptosis rate increased with the increase of the concentrations, and achieved maximum when cells were treated at $40 \mu\text{mol/L}$. Compared with control group, the apoptosis rate of each experimental group was statistically significant ($P < 0.01$). After PC-3 cells were treated with different concentrations of curcumin, the expression of FASN mRNA was significant reduced with the increase of the concentrations. However, the expression of BAX mRNA was significant increased with the increase of the concentrations. **Conclusion** Curcumin could significantly inhibit the growth of

[基金项目] 云南省校联合基金资助项目 (2011FB173)

[作者简介] 刘孝东 (1967~), 男, 四川绵阳市人, 医学博士, 副教授, 主要从事泌尿外科临床及研究工作.

[通讯作者] 张建华. E-mail: zjhkm008@126.com

prostate cancer PC-3 cells, suppress the expression of FASN mRNA, and increase the expression of BAX mRNA. Inducing PC-3 cells apoptosis may be one of the mechanisms of curcumin.

[Key words] FASN; Curcumin; Prostate cancer

我国的前列腺癌发现时大多数为晚期, 虽然内分泌治疗有效, 但在治疗大约 18~24 个月后不可避免的进展为激素抵抗性前列腺癌^[1], 患者一旦进入这个阶段, 中位生存时间仅为 10~12 个月^[2], 内分泌治疗无效, 对这一类患者目前临床缺乏有效的治疗手段. 寻找非内分泌的治疗方法对前列腺癌, 特别是对激素非依赖性前列腺癌的治疗有重要的临床意义. 姜黄素为脂肪酸合成酶抑制剂^[3], 而脂肪酸是肿瘤生长的重要营养因子. 本实验主要是研究姜黄素是否对 PC-3 前列腺癌细胞株体外增殖及凋亡有影响作用及其作用机制, 寻找针对前列腺癌有效的非内分泌治疗方法.

1 材料与方法

1.1 材料来源

人类前列腺癌细胞株 PC-3 购于中国科学院昆明动物研究所细胞库. 1640 培养基、胎牛血清为美国 HyClone 公司. 姜黄素、二甲基亚砷 (DMSO) 购于美国 Sigma 公司. 用于 Total RNA 提取试剂 RNAiso Plus、用于一步 RT-PCR 法的 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 和 DNAMarker 购于大连 TaKaRa 公司. FASN、BAX 和作为内参照的 ACTB 序列引物由大连 TaKaRa 公司合成.

姜黄素用 DMSO 稀释成 80 $\mu\text{mol/L}$, 过滤除菌, 保存于 -20°C , 临用前解冻.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将前列腺癌细胞株 PC-3 培养于含 10% 胎牛血清 1640 培养液的 25 mL 培养瓶中, 置于含 5% CO_2 、 37°C 培养箱中培养. 待细胞长至单层后, 以 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 选取对数生长期细胞用于实验.

1.2.2 细胞增殖抑制实验 用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞浓度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL 继续培养 12 h 后, 实验组分别加入 10、20、30 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理 24 和 48 h, 每种浓度设平行重复 6 孔, 实验重复 3 次. 同时设立不加任何药物的空白对照组. 在设定时间内, 每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 继续 37°C , 培养 4 h. 弃去上清, 加入 DMSO (150 $\mu\text{L}/$ 孔), 终止反应. 混匀 10 min, 在酶标仪上测 570 nm 处吸光度 A 值.

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{1 - \text{实验组 A 值}}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

1.2.3 流式检测细胞凋亡率 用不同浓度姜黄素处理的 PC-3 细胞 24 h 后, 用 0.25% 胰酶消化, 用 4°C 预冷的 PBS 洗 2 次, 加入 500 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 1 μL Annexin V-PE 混匀, 室温、避光、反应 5~15 min, 并在 1 h 内上流式细胞仪观察和检测.

1.2.4 RT-PCR 检测 FASN 和 BAX mRNA 的表达 根据 FASN cDNA 和 BAX cDNA 序列设计引物, 从 Gene-bank 查目的基因全长, 利用 primer designer 软件进行引物序列设计. FASN mRNA 扩增引物序列: 上游 5'-AGCAGGCACACACGATGG-AC-3', 下游 5'-CCTCGGAGTGAATCTGGGTTG-3', 扩增产物 97bp. BAX mRNA 扩增引物序列: 上游 5'-GCGAGTGTCTCAAGCGCATC-3', 下游 5'-CC-AGTTGAAGTTGCCGTCAGAA-3', 扩增产物 143bp. ACTB 作为内参照: 上游 5'-TGGCACCAGCACAATGAA-3', 下游 5'-CTAAGTCATAGTCC-GCCTAGAAGCA-3', 扩增产物 186 bp. 扩增条件为 94°C 5 min. 热循环: 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 共进行 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存. 同时扩增 β -actin 作为内参照, 并设不加逆转录产物的 PCR 体系为阴性对照. 最后用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物.

1.2.5 RT-PCR 结果分析 利用 Quantity One 软件系统对 FASN、BAX 及内参的扩增片段电泳条带进行光密度值分析.

1.3 统计学方法

用 SPSS 软件处理系统进行统计学分析, 根据各数据特点采用不同的统计学分析检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 姜黄素对 PC-3 细胞增殖的影响

10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素分别作用 24 和 48 h 后, PC-3 细胞的生长受到了不同程度的抑制, 细胞存活率与药物浓度呈负相关, 并且具有明显的剂量-时间依赖性. 各实验组与对照组相比, 抑制率具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1、表 1. 显微镜下可观察到不同浓度姜黄素作用 PC-3

细胞 24 h 后生长受到明显抑制, 见图 2.

2.2 不同浓度姜黄素对 PC-3 细胞凋亡率的变化

如表 2 及图 3 所示不同浓度的姜黄素处理 PC-3 细胞 24 h 后, 凋亡率随浓度的增加而增高, 在姜黄素浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡率最大, 各给药组与对照组相比, $P < 0.01$, 有统计学意义.

2.3 姜黄素对 PC-3 细胞中 FASN mRNA 及 BAX

表 1 不同浓度姜黄素对 PC-3 细胞作用不同时间的吸光度值 (A) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The absorbance value (A) of PC-3 cells treated with different concentrations of curcumin at different time ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | n | 24 h | 48 h |
|------------------------|---|-----------------------|-----------------------|
| 对照组 | 6 | 0.306 \pm 0.001 3 | 0.426 \pm 0.001 7 |
| 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 6 | 0.266 \pm 0.004 9** | 0.342 \pm 0.001 4** |
| 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 6 | 0.251 \pm 0.001 6** | 0.312 \pm 0.002 8** |
| 30 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 6 | 0.233 \pm 0.001 7** | 0.275 \pm 0.002 2** |
| 40 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 6 | 0.213 \pm 0.001 9** | 0.251 \pm 0.002 2** |

每组 24 h, 48 h 差异, 行 t 检验, ** $P < 0.01$; 24 h 各組间差异, 因方差不齐, 行秩和检验 ** $P < 0.01$; 48 h 各組间差异, 行 q 检验 ** $P < 0.01$.

mRNA 表达的影响

在转录水平检测姜黄素对 PC-3 细胞中 FASN 及 BAX 基因表达的影响. 如图 4 所示, 不同浓度姜黄素作用于 PC-3 细胞后 FASN mRNA 的表达明显降低, 随姜黄素的浓度增加而减少; 而 BAX mRNA 的表达明显增高, 随姜黄素的浓度增加而增高.

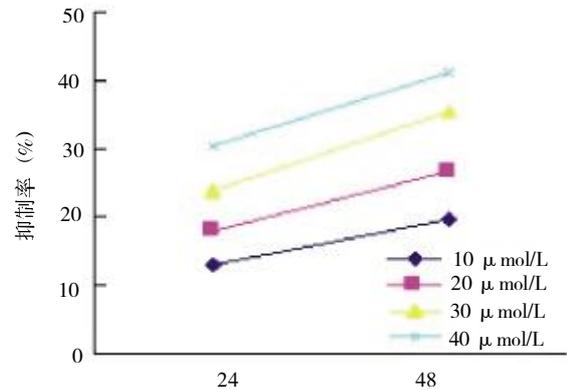
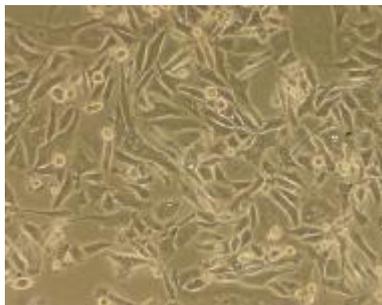
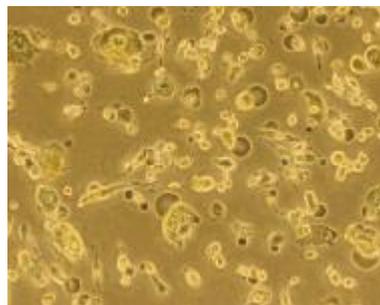


图 1 不同浓度不同时间姜黄素对 PC-3 细胞生长抑制的作用

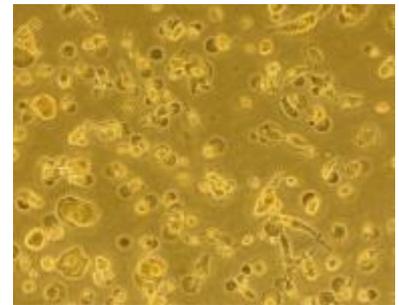
Fig. 1 The growth inhibition effect of curcumin on PC-3 cells at different concentrations and times



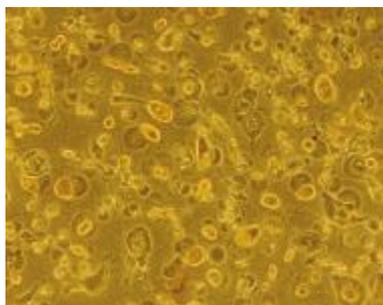
A



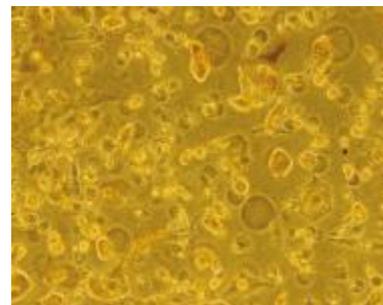
B



C



D



E

图 2 不同浓度姜黄素对 PC-3 前列腺癌细胞生长的影响 (20 \times 10 倍镜下观察, 作用时间 24 h)

Fig. 2 The influence of curcumin on PC-3 cells growth at different concentrations (microscope with 10 \times 10; treated for 24h)

A:对照组; B:10 $\mu\text{mol/L}$ 组; C:20 $\mu\text{mol/L}$ 组; D:30 $\mu\text{mol/L}$ 组; E:40 $\mu\text{mol/L}$ 组.

表 2 不同浓度姜黄素作用 PC-3 细胞 24h 后细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 The apoptosis rate of PC-3 cells after treated with curcumin at different concentrations for 24 h ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 凋亡率 |
|-------------|---|----------------|
| 对照组 | 4 | 1.33 ± 0.07 |
| 10 μmol/L 组 | 4 | 2.85 ± 0.04** |
| 20 μmol/L 组 | 4 | 17.03 ± 0.07** |
| 30 μmol/L 组 | 4 | 39.83 ± 0.12** |
| 40 μmol/L 组 | 4 | 50.28 ± 0.24** |

与对照组相比, ** $P < 0.01$.

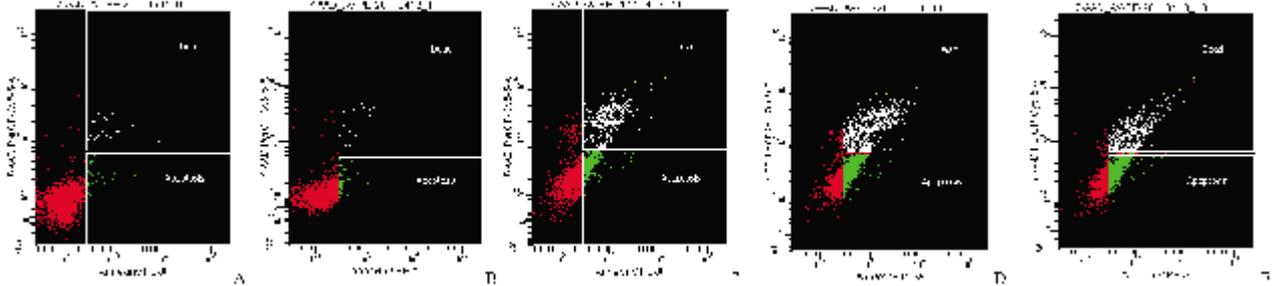


图 3 FCM 检测不同浓度姜黄素组 PC-3 细胞的凋亡

Fig. 3 The apoptosis of PC-3 cells detected by FCM in different concentrations of curcumin (24 h)

A: 对照组; B: 10 μmol/L 组; C: 20 μmol/L 组; D: 30 μmol/L 组; E: 40 μmol/L 组.

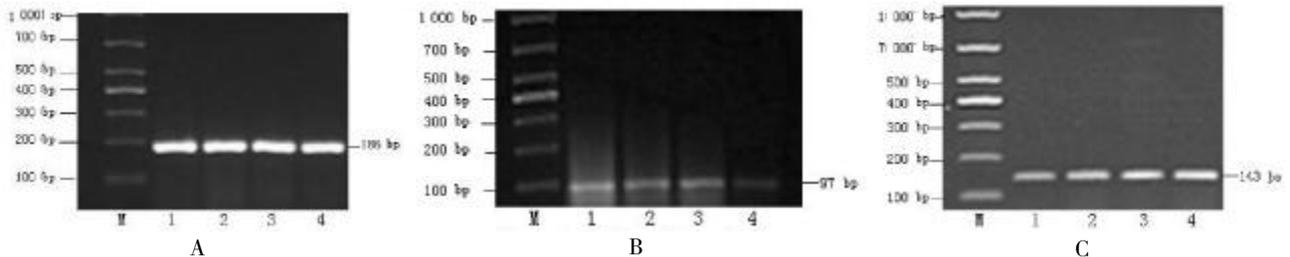


图 4 不同浓度姜黄素作用 PC-3 细胞 24 h 后 FASN、BAX mRNA 的表达

Fig. 4 The expression of FASN and BAX mRNA in PC-3 cell treated with curcumin at different concentrations for 24 h

A: 内参; B: FASN; C: BAX (M: Mark 1: 0 μmol/L 2: 10 μmol/L 3: 20 μmol/L 4: 40 μmol/L) .

3 讨论

在许多肿瘤的研究报道中, 脂肪酸是肿瘤生长的重要营养因子^[4,5]. 高水平的脂肪酸合成代谢是恶性肿瘤重要的生化特征. 本实验选择 PC-3 前列腺癌细胞株, 为激素非依赖性细胞株. 实验结果将会对临床激素非依赖性前列腺癌的治疗方法的选择提供借鉴.

通过 MTT 方法检测, 在姜黄素作用后, PC-3 细胞的生长受到了不同程度的抑制. 从图 1 笔者可以看到细胞存活率与姜黄素的浓度呈负相关, 并且具有明显的剂量-时间依赖性. 那么其可能

的作用机制是什么呢, 笔者行 Annexin V-PE 检测细胞的凋亡率, 如表 2 及图 3, 笔者发现 PC-3 细胞的凋亡率随着姜黄素浓度的增加而增高, 呈一定的量效关系. 在姜黄素浓度为 40 μmol/L 时凋亡率最大. 因此, 笔者推断姜黄素对 PC-3 前列腺癌细胞的生长存在明显的抑制作用, 并且这种抑制作用主要是通过增加其细胞凋亡来实现的.

Bax 基因是 Bcl-2 家族中最重要的一个促凋亡因子, 当它从胞液迁移到线粒体, 通过 BH3 区域识别位于线粒体膜上的 Bcl-2 蛋白并与其结合形成 Bax-Bcl-2 异二聚体, 抑制 Bcl-2 的抗凋亡作用; 游离的 Bax 可直接在线粒体膜上形成 Bax-Bax 同二

聚体, 改变线粒体膜的渗透性, 使细胞色素 C 由线粒体释放到胞浆, 进一步激活下游的 caspase3 协同细胞凋亡. Bcl-2 家族对细胞凋亡的调控是各成员共同参与的、复杂的、动态的过程. 研究^[6,7]认为抗凋亡与促凋亡蛋白的比例 (Bcl-2/Bax) 是决定细胞生存还是死亡的关键. Uddin S 等^[8]人选择脂肪酸合成酶抑制剂 C-75, 研究其在甲状腺腺癌细胞株中的作用机制, 将 C-75 作用细胞株一定时间后, 通过 DNA 碎片分析、免疫组织化学剂蛋白免疫印迹等方法发现, C-75 明显抑制所有细胞株的生长, 引起 FASN 的下调及灭活蛋白激酶 B 信号途径, 通过线粒体通路包括 BAX 及蛋白酶激活作用、下调抗凋亡蛋白来诱导凋亡.

脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN) 是脂肪酸生物合成过程中将小分子碳单位聚合成脂肪酸的关键酶, 在合成长链饱和脂肪酸的过程中, 脂肪酸合酶起关键的作用^[9,10]. 在正常细胞中, 脂肪酸合酶的表达比较低是由于大量的食用油脂的存在^[10]. 在许多肿瘤的研究报道中, 例如乳腺癌、卵巢癌、以及胃癌, 脂肪酸合酶主要为其给予成长和生存的优势, 而不是作为一种合成代谢功能储能通路起作用^[4,5]. 本实验笔者通过 RT-PCR 检测得出, PC-3 细胞有明显的 FASN 表达, 在加入姜黄素培养 24 h 后, FASN 的表达明显降低, 并随浓度的增加而表达减少. 笔者可以确信姜黄素是一种脂肪酸合成酶抑制剂, 通过抑制脂肪酸合酶的作用, 减少脂肪酸的合成, 达到抑制 PC-3 细胞的生长. 在对凋亡基因 BAX 的表达分析得出, PC-3 细胞中 BAX 的表达随姜黄素浓度的增加而增加, 由此我们推测, 姜黄素引起 PC-3 前列腺癌细胞株中 BAX 表达的升高, 进而诱导细胞的凋亡.

本实验结果表明: 姜黄素可以抑制 PC-3 前列腺癌细胞株的生长, 并具有明显的剂量 - 时间依赖性. 姜黄素主要是通过抑制 PC-3 前列腺癌细胞株中 FASN 的表达并促进 BAX 表达的增加从而导致细胞的凋亡, 达到抑制肿瘤生长的作用. 因为 PC-3 前列腺癌细胞株为激素抵抗性前列腺癌细胞株, 本结果为雄激素非依赖性前列腺癌的治疗提供

了理论基础.

[参考文献]

- [1] CRAWFORD E D, EISENBERGER M A, MCLEOD D G, et al. A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1989, 321(7):419 - 424.
- [2] RAGHAVAN D, BRANDES LJ, KLAPP K, et al. Phase II trial of tesmilifene plus mitoxantrone and prednisone for hormone refractory prostate cancer: High subjective and objective response in patients with symptomatic metastases [J]. *J Urol*, 2005, 174:1 808 - 1 813.
- [3] ZHAO J, SUN X B, YE F, et al. Suppression of fatty acid synthase, differentiation and lipid accumulation in adipocytes by curcumin [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1-2):19 - 28.
- [4] ALOPL, VISCA P, FRAMARINO M L, et al. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7:1 383 - 1 388.
- [5] MILGRAUM L Z, WITTERS L A, PASTERNAK G R, et al. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3:2 115 - 2 120.
- [6] HUANG S, OKUMURA K, SINICROPE F A. BH3 mimetic obatoclax enhances TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(1):150 - 159.
- [7] RISTORCELLI E, BERAUD E, VERRANDO P, et al. Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. *FASEB J*, 2008, 22(9):3 358 - 3 369.
- [8] UDDIN S, SIRAJ AK, AL-RASHEED M, et al. Fatty acid synthase and AKT pathway signaling in a subset of papillary thyroid cancers [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(10):4 088 - 4 097.
- [9] MENENDEZ J A, LUPU R. Fatty acid synthase and lipogenic phenotype in cancer pathogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7:763 - 777.
- [10] KUHAJDA F P. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 66: 5 977 - 5 980.

(2013 - 02 - 21 收稿)