

姜黄素对结肠癌细胞株 NKD2 及 CXCR4 基因表达影响的研究

陈寒露¹, 陈海滔², 徐超², 姚庆华³

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 3. 浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤医院中西医结合重点实验室, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 观察姜黄素对 SW620 细胞及裸鼠 NKD2、CXCR4 表达水平的影响。[方法] 通过 MTS 检测姜黄素对 SW620 细胞活性的影响; 运用 Western blot、Real-time qPCR 检测不同浓度姜黄素对 SW620 细胞及转染 NKD2 siRNA 后 SW620 细胞内 NKD2、CXCR4 蛋白和 mRNA 表达的影响。雄性 BALB/c 裸鼠 8 只, 随机分成对照组与姜黄素组, 每组 4 只。采用皮下接种 SW620 细胞。造模后第 7d 开始给对照组与姜黄素组分别注射对照液和 100mg/kg·d 浓度的姜黄素悬液, 连续用药 14d。给药后检测瘤体体积, 通过 Real-time qPCR 检测瘤体组织内 NKD2 及 CXCR4 表达水平。[结果] 姜黄素能明显抑制 SW620 细胞的增殖活性, 显著性上调 SW620 细胞内 NKD2 表达及下调 CXCR4 的表达, 且呈剂量依赖性。转染后发现能上调姜黄素处理后的肿瘤细胞 CXCR4 的表达水平。体内实验表明姜黄素抑瘤率为 30.69%。通过 qPCR 发现瘤体组织中 NKD2 的表达量增加, CXCR4 的表达量显著性降低。[结论] 姜黄素均能从体内外明显抑制结肠癌细胞 SW620 的生长, 其作用机制可能通过上调抑制基因 NKD2 的表达, 抑制 Wnt 信号通路, 进而下调肿瘤细胞 CXCR4 表达, 从而起到抑制肿瘤侵袭转移的作用。

关键词: 姜黄素; SW620 结肠癌细胞; NKD2; CXCR4

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2016)04-0297-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.04.A011

The Effects of Curcumin on Expression of NKD2 and CXCR4 Gene in SW620 Colon Cancer Cell

CHEN Han-lu¹, CHEN Hai-tao², XU Chao², et al.

(1. First Clinical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of curcumin on the expression of NKD2 and CXCR4 in SW620 cell and mice respectively. [Methods] The effects of curcumin on SW620 cells' activity were detected by MTS assay. The protein and mRNA expression of NKD2 and CXCR4 in the SW620 cells treated with different concentrations of curcumin by Western blot and Real-time qPCR. Eight male BALB/c mice were randomly divided into control group and curcumin group, 4 in each. A mice of SW620 colon cancer was established by subcutaneously inoculating tumor cell suspension. Mice in the control group were intraperitoneally injected control liquid and 100mg/kg·d of curcumin suspension was injected in the curcumin group, both for 14 days. Detecting tumor volume after administration and then detecting the mRNA expression of NKD2 and CXCR4 in tumor tissues by Real-time qPCR. [Results] Curcumin inhibited the activity of SW620 cells significantly. Curcumin could up-regulate the expression of NKD2 and down-regulate the expression of CXCR4 in SW620 cell with a dose-dependent manner. After transfection, the expression level of CXCR4 in SW620 cells treated with curcumin was increased. In vivo experiments, the inhibition rate of curcumin was 30.69%. The expression of NKD2 increased and the expression of CXCR4 significantly decreased in the tumor tissue by Real-time qPCR. [Conclusion] Curcumin can significantly inhibit the growth of SW620 colon cancer cell in vitro and in vivo. Curcumin may inhibit Wnt pathway by up-regulating the expression of NKD2, then inhibit the expression of CXCR4 in tumor cells and inhibit tumor invasion and metastasis eventually.

Key words: curcumin; SW620 colon cancer cell; NKD2; CXCR4

随着人们生活方式和饮食结构及习惯的改变,

结肠癌的发生率不断升高^[1-3]。结肠癌作为消化道常见的恶性肿瘤, 严重危害着人们的健康。肿瘤转移作为结肠癌恶化的特征之一, 也是结肠癌患者死亡的

收稿日期: 2015-10-24; 修回日期: 2015-12-28

基金项目: 浙江省医学卫生平台计划(2015DTA005)

通讯作者: 姚庆华, E-mail: yaoqh@zjcc.org.cn

主要原因。因此,如何有效地抑制结肠癌的转移是临床面临的主要难题。同时,研究发现肿瘤的侵袭转移与趋化因子密切相关。CXCR4 作为趋化因子 CXCL12 的惟一受体,参与多种病理和生理的过程。目前研究表明,CXCL12/CXCR4 构成的生物轴介导恶性肿瘤浸润转移中起着非常重要的作用^[4-7]。CXCR4 作为肿瘤细胞中最常见的趋化因子受体,在胃癌、结肠癌、软组织肉瘤等多种肿瘤细胞中表达均明显增加。

姜黄素 (Curcumin, Cur) 是从姜科植物 *Curcuma Longa* 的根茎姜黄中提取的一种植物多酚类物质,具有抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、抗衰老、消除自由基等作用^[8]。近年来,国内外对于姜黄素的抗肿瘤作用及其机制做了大量的研究,发现姜黄素对多种肿瘤的侵袭转移具有明显的抑制效果^[9,10]。有报道姜黄素能显著性降低 β -catenin 基因表达水平,从而抑制 Wnt 信号通路,起到抗肿瘤的作用^[11,12]。目前有研究发现 NKD2 作为 Wnt 通路的抑制因子,具有调控 Wnt 信号通路的作用^[13]。因此,本实验以姜黄素作为干预药物,通过体外内实验,分别检测结肠癌 SW620 细胞及肿瘤组织内 NKD2 和 CXCR4 的表达水平情况,来探讨姜黄素的抑瘤作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

抗体 NKD2(购自 NOVUS 公司),CXCR4(购自 Thermo 公司), β -actin(购自 BD 公司),姜黄素(购自 Sigma 公司)。NKD2 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成(NKD2-homo-962 序列,正义链:5'-CA-GAUACACAUGCCGUACATT-3',反义链:5'-UGU-ACGGCAUGUGUAUCUGTT-3';NKD2-homo-480 序列,正义链:5'-CACGCUCUAUGACUUUGACTT-3',反义链:5'-GUCAAAGUCAUAGAGCGUGTT-3')。NKD2 引物和 CXCR4 引物由上海铂尚生物合成(NKD2 引物,上游引物:5'-ATGCCTCGGTCAACCACTCC-3',下游引物:5'-TCTGCCAGTTCACCTCCATC-3',其产物长度为 151bp;CXCR4 引物,上游引物:5'-CCGTGGCAAACCTGGTACTTT-3',下游引物:5'-GAC-GCCAACATAGACCACCT-3',其产物长度为 188bp)。人类结肠癌细胞株 SW620 来自浙江省重点实验室,

所需的相关仪器和设备由浙江大学邵逸夫实验室提供。

1.2 动物

实验动物为 BALB/c 裸鼠 8 只,3~4 周龄,体重 15~18g,由浙江中医药大学实验动物中心提供,SPF 实验室饲养,实验动物使用许可证号 SCXK(沪)2008-0016。由浙江中医药大学实验动物中心饲养,饲养温度 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$,适应环境 5d,适应期间所有动物均自由摄食和饮水。

1.3 药物

姜黄素用 DMA:EL:NS 以 1:4:15 的比例配置成浓度为 100mg/kg 的悬液;对照组为 DMA:EL:NS 以 1:4:15 的比例配置液体; 4°C 冰箱保存,临用前室温放置 40min,防止颗粒析出。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养和转染

人类 SW620 结肠癌细胞在 37°C 和 5% CO_2 条件下,用含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。细胞存活率大于 80%,使用 0.025%胰蛋白酶(EDTA)消化 3~5min,以 1:3~1:4 的比例传代。实验所用细胞均处于对数生长期。当细胞密度达到 30%~50%左右时,按照 Lipo 2000 转染试剂盒说明书使 siRNA 转入到细胞内,培养细胞 48h,丢弃原先的培养液,再进行其他实验,最后提取细胞蛋白或 RNA。

1.4.2 Western blot 检测蛋白变化

通过 Western blot 检测各组细胞内 β -actin、NKD2 和 CXCR4 蛋白的表达量。用不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 24h,提取各组细胞总蛋白。姜黄素处理 NKD2 siRNA 转染后 72h 的 SW620 细胞 24h,提取各组细胞总蛋白。BCA 检测试剂盒测定各组细胞的蛋白浓度。分别取总蛋白 20 μg 上样,经 12% 分离胶及 5% 浓缩胶 SDS-PAGE 凝胶电泳后湿转法转 PVDF 膜。加入特异性一抗(兔抗人 NKD2 多克隆抗体,稀释度为 1:1000;兔抗人 CXCR4 多克隆抗体,稀释度为 1:1500;内参 β -actin 抗体,稀释度 1:2000) 4°C 过夜。与二抗(羊抗兔单克隆抗体,稀释度 1:1000)室温孵育 2h 后,ECL 化学发光剂于暗室中曝光和显影。实验重复 3 次。

1.4.3 Real-time qPCR 检测 mRNA 变化

通过 Real-time qPCR 检测各组细胞 NKD2、CXCR4 mRNA 的表达水平。不同浓度姜黄素(0、5、

10、20 $\mu\text{mol/l}$)处理细胞 24h,提取各组细胞总 RNA,电泳鉴定其完整性。用姜黄素处理 NKD2 siRNA 转染后 72h 的 SW620 细胞 24h,提取各组细胞总 RNA,电泳鉴定其完整性。cDNA Archieve 试剂盒逆转录总 RNA,得到 cDNA,用 ddH₂O 稀释。再以 cDNA 以模板,与基因特异性引物,通过 PCR 扩增 CXCR4 和 NKD2。对解离曲线进行分析,确保只有单一产物被扩增。最终进行测定分析。实验重复 3 次。

1.4.4 体内实验

动物造模:培养 SW620 结肠癌细胞,当细胞融合度达到 95%时弃掉培养液,采用胰酶消化细胞,将细胞吹打脱壁后吸入离心管离心,用无血清培养液稀释,确保每只裸鼠右腋下接种细胞数量 6×10^6 ,每只 0.2ml,观察其皮肤表面移植瘤成功率。

分组及给药:8 只裸鼠随机分成姜黄素组和对照组,每组 4 只(编号 1~4 是对照组,编号 5~8 是姜黄素组)。于接种后第 4d 后开始成瘤,第 7d 开始给药。姜黄素组给予姜黄素悬液按 100mg/kg·d 的比例给药,约 0.2ml/只腹腔注射,1 天 1 次,连续用药 14d,常规饲养;对照组给予用 DMA:EL:NS 以 1:4:15 的比例配置的溶液给药,0.2ml/只腹腔注射,1 天 1 次,连续 14d,常规饲养。

标本采集:给药后,用游标卡尺测量荷瘤裸鼠肿瘤的最长径(a)和最小径(b),按 $V=0.5a(b^2)$ 计算肿瘤体积,隔天测量 1 次,同时测量裸鼠重量。停药后脱颈处死,剥取移植瘤,再次测量肿瘤体积,计算抑瘤率。抑瘤率=(对照组瘤体积-实验组瘤体积)/对照组瘤体积 $\times 100\%$ 。取得的肿瘤组织一部分保存在-80℃冰箱,以待提取组织 RNA。

Western blot 方法检测组织蛋白表达:每例标本取肿瘤组织约 50mg,加入细胞裂解液、研磨、离心,BCA 法测定总蛋白浓度。取总蛋白 20 μl ,电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭,加入一抗、二抗孵育,,ECL 化学发光剂于暗室中曝光和显影。分别检测组织中的 NKD2 及 CXCR4 蛋白表达水平。实验重复 3 次。

Real-time qPCR 方法检测组织 mRNA 表达:每例标本取肿瘤组织约 50mg,通过研磨、加入 TRIZOL 试剂等对其进行 RNA 提取,测定总 RNA 浓度。再通过 cDNA Archieve 试剂盒逆转录总 RNA,得到 cDNA,用 ddH₂O 稀释。再以 cDNA 以模板,与基因特异性引物,通过 PCR 扩增 CXCR4 和 NKD2。对解离曲

线进行分析,确保只有单一产物被扩增。最终进行测定分析。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

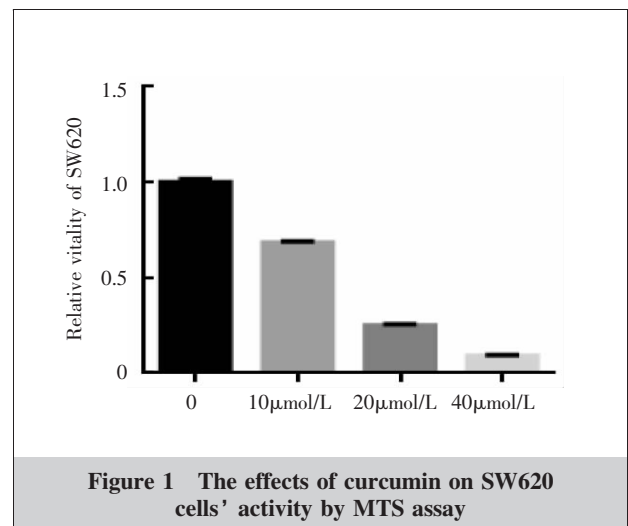
计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验、单因素方差分析,所有数据均以 SPSS19.0 统计软件分析数据。

2 结 果

2.1 体外实验结果

2.1.1 姜黄素对结肠癌细胞 SW620 增殖活性的影响

不同浓度(0~40 $\mu\text{mol/l}$)的姜黄素作用细胞 24h 后,结肠癌细胞的生长受到不同程度的抑制,且呈浓度依赖性(Figure 1)。



2.1.2 不同浓度姜黄素处理后对细胞内 NKD2 和 CXCR4 蛋白和 mRNA 表达的影响

不同的姜黄素浓度 (0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 对 SW620 细胞作用 24h,观察 NKD2 和 CXCR4 蛋白及 mRNA 表达水平。Western 印迹(Figure 2A)显示,姜黄素组与阴性对照组相比,NKD2 蛋白的表达水平显著性增加,CXCR4 蛋白表达水平显著性下降 ($P < 0.05$)。值得注意的是,随着姜黄素浓度的增加,其蛋白表达水平改变越明显。Real-time qPCR(Figure 2B、C)显示,姜黄素组与阴性对照组相比,NKD2 mRNA 表达水平显著性增加,CXCR4 mRNA 表达水平显著性下降 ($P < 0.01$)。随着姜黄素浓度的增加,其 CXCR4mRNA 表达水平改变也越明显。

2.1.3 转染 NKD2 siRNA 处理肿瘤细胞 SW620 后, 姜黄素对 CXCR4 蛋白和 mRNA 表达的影响
Western 印迹 (Figure 3A) 显示, CXCR4 蛋白的

表达水平在 NKD2 siRNA 转染组与阴性对照组相比显著性增加 ($P < 0.05$)。Real-time qPCR (Figure 3B) 显示, CXCR4 mRNA 的表达水平在 NKD2 siRNA 组与阴性

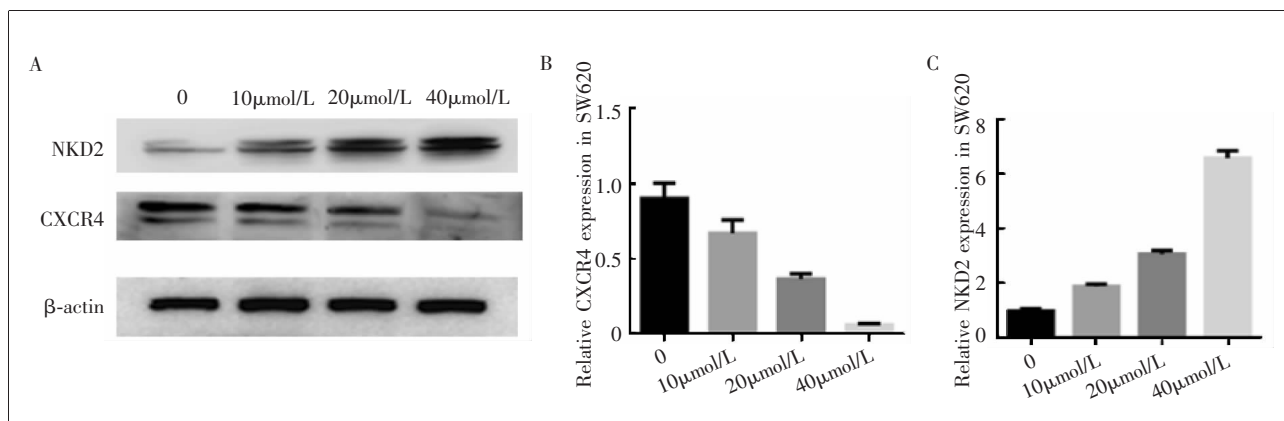


Figure 2 The protein and mRNA expression of NKD2 and CXCR4 in the SW620 cells treated with curcumin

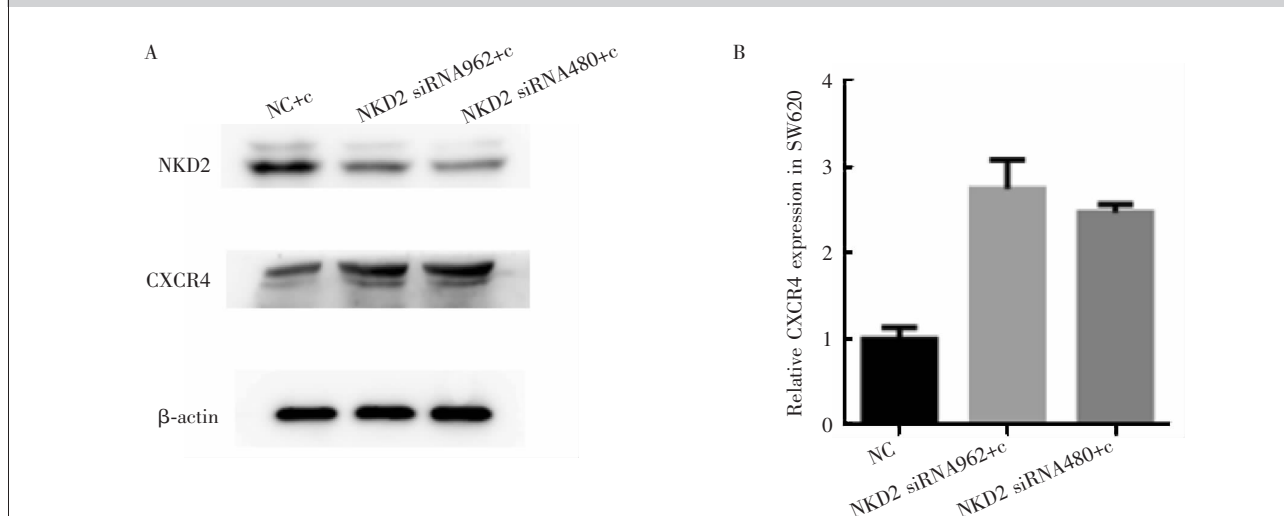
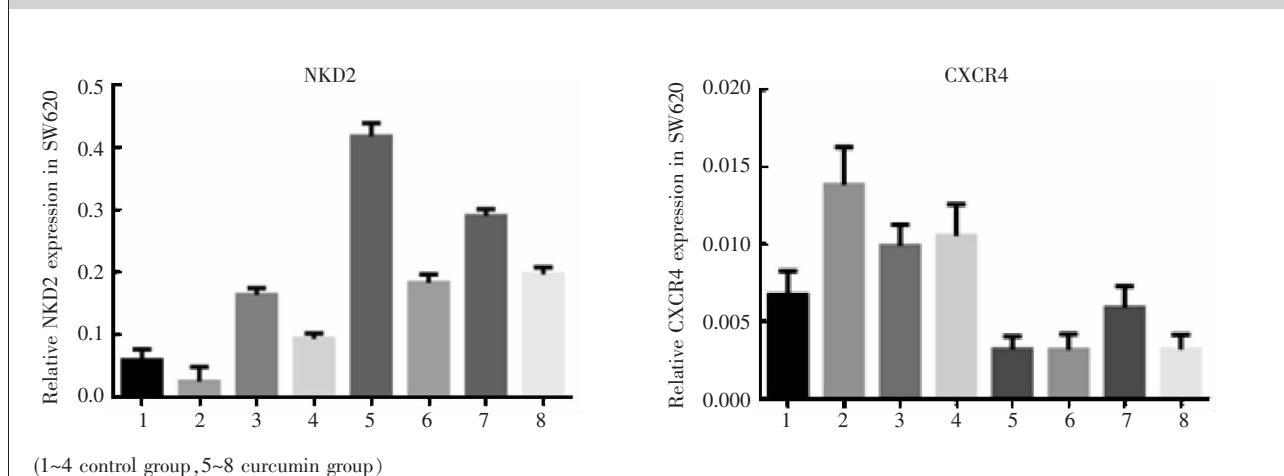


Figure 3 The protein and mRNA expression of CXCR4 in the SW620 cells treated with curcumin after NKD2 siRNA transfection



(1~4 control group, 5~8 curcumin group)

Figure 4 The mRNA expression of NKD2 and CXCR4 in tumor tissue by Real-time qPCR

对照组相比增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 体内实验结果

2.2.1 一般情况及抑瘤情况

皮下接种后第4d各组裸鼠腋下皮肤表面开始出现高粱米粒大小的移植瘤,成瘤率为100%。4d后瘤体生长加快,7d各组裸鼠瘤体的a和b平均达4mm和4mm左右。第7d开始给药,两组肿瘤体积均不断增加。连续用药14d后,姜黄素组肿瘤体积达 $1406.346 \pm 382.320 \text{ mm}^3$,对照组肿瘤体积达 $2029.196 \pm 540.503 \text{ mm}^3$ ($P<0.05$)。姜黄素组瘤质比(肿瘤体积/裸鼠质量)为 67.58 ± 22.87 ,对照组瘤质比为 104.02 ± 24.17 ($P<0.05$)。

2.2.2 肿瘤组织内NKD2及CXCR4的mRNA表达水平

Real-time qPCR(Figure 4A)显示,姜黄素组与对照组相比,NKD2 mRNA的表达水平明显增加,而CXCR4 mRNA的表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

转移作为结肠癌恶化的特征,也是晚期结肠癌患者死亡的主要因素,多见于肝、肺、腹膜转移。目前,研究表明上皮间质转化(EMT)在肿瘤转移中发挥关键的作用。上皮间质转化(EMT)具有降低细胞与细胞之间的粘附力,使细胞极性消失,从而增加细胞的迁移和侵袭能力^[14]。因此,结肠癌转移的发生与EMT密切相关。Wnt信号通路作为EMT的重要途径,在人类疾病包括癌症和胚胎发育中发挥重要的作用。目前Deng等^[15]报道,在结肠癌患者中塞来考昔能抑制Wnt信号通路,起到抑制肿瘤生长的作用。此外,在肿瘤的发生发展过程中,趋化因子起着非常重要的作用。Hu等^[16]研究发现,在结直肠癌患者中CXCR4能促进CRC的进展和EMT。Wang等^[17]观察到CXCR4在人类卵巢癌细胞的转移中通过调控Wnt/ β -catenin的信号途径发挥关键的作用。

姜黄素是从姜科植物根茎中提取的一种抗氧化剂多酚,其药理作用广泛且毒副作用小。近年来大量研究表明姜黄素能够抑制致癌物质的活化和血管生成,具有调节细胞存活和凋亡的作用,对肺癌、乳腺癌和前列腺癌等均有抗侵袭和抗转移的功效^[18,19],

其抗肿瘤的分子机制成为研究热点。但其抗肿瘤机制较为复杂,抑瘤的分子机制尚未完全阐明。本研究结果显示,姜黄素在体外能明显抑制结肠癌细胞的增殖活性,具有抑制肿瘤细胞生长的作用。同时,实验结果表明姜黄素在体外对内对Wnt信号通路中的抑制基因NKD2具有明显上调作用,对趋化因子CXCR4具有明显的抑制作用。此外,NKD2作为Wnt信号通路的上游基因,同时也是该通路的抑制基因,很可能姜黄素通过上调抑制因子NKD2的表达从而抑制Wnt信号通路,进而抑制结肠癌细胞侵袭转移。因此,本实验再通过转染NKD2 siRNA后,发现能显著性上调姜黄素处理后细胞内CXCR4的表达水平,该结果说明姜黄素对CXCR4的调控作用受到NKD2表达水平的影响,从而起到抑制肿瘤侵袭转移的能力。

综上所述,姜黄素在体内外均能显著性上调NKD2的表达及下调CXCR4的表达水平。同时姜黄素抗肿瘤生长及转移的作用机制可能通过上调NKD2的表达,抑制Wnt信号通路,进而抑制肿瘤细胞CXCR4的表达。但其姜黄素抑制肿瘤的作用机制是否与其影响的Wnt信号通路和EMT密切相关尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Noreen F, Rööslä M, Gaj P, et al. Modulation of age-and-cancer-associated DNA methylation change in the healthy-colon by aspirin and lifestyle [J]. J Natl Cancer Inst, 2014 Jun 28; 106(7).
- [2] Pelsers C, Arem H, Pfeiffer RM, et al. Prediagnostic lifestyle factors and survival after colon and rectal cancer diagnosis in the National Institutes of Health (NIH)-AARP Diet and Health Study[J]. Cancer, 2014, 120(10): 1540-1547.
- [3] Winkels RM, Heine-Bröring RC, van Zutphen M, et al. The COLON study: colorectal cancer: longitudinal, observational study on nutritional and lifestyle factors that may influence colorectal tumour recurrence, survival and quality of life[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 374.
- [4] Hu XM, Liu YN, Zhang HL, et al. CXCL12/CXCR4 chemokine signaling in spinal glia induces pain hypersensitivity through MAPKs-mediated neuroinflammation in bone cancer rats[J]. J Neurochem, 2015, 132(4): 452-463.
- [5] Batsi O, Giannopoulou I, Nesseris I, et al. Immunohistochemical evaluation of CXCL12-CXCR4 axis and VEG-

- FR3 expression in primary urothelial cancer and its recurrence[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(7):3537–3542.
- [6] Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, et al. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6:1347–1361.
- [7] Zhang Z, Ni C, Chen W, et al. Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:49.
- [8] Sahebkar A. Dual effect of curcumin in preventing atherosclerosis: the potential role of pro-oxidant-antioxidant mechanisms[J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(6):491–492.
- [9] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review[J]. *Life Sci*, 2006, 78(18):2081–2087.
- [10] Zhang X, Chen Q, Wang Y, et al. Effects of curcumin on ion channels and transporters[J]. *Front Physiol*, 2014, 5:94.
- [11] Chen J, Xu L, Hu X, et al. Curcumin regulates VSMC phenotype transition via modulation of Notch and Wnt signaling pathways[J]. *Drug Dev Res*, 2013, 74:252–258.
- [12] Kim HJ, Park SY, Park OJ, et al. Curcumin suppresses migration and proliferation of Hep3B hepatocarcinoma cells through inhibition of the Wnt signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(1):282–286.
- [13] Van Raay TJ, Coffey RJ, Solnica Krezel L. Zebrafish Naked1 and Naked2 antagonize both canonical and non-canonical Wnt signaling[J]. *Dev Biol*, 2007, 309(2):151–168.
- [14] Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(3):194–207.
- [15] Deng Y, Su Q, Mo J, et al. Celecoxib downregulates CD133 expression through inhibition of the Wnt signaling pathway in colon cancer cells [J]. *Cancer Invest*, 2013, 31(2):97–102.
- [16] Hu TH, Yao Y, Yu S, et al. SDF 1/CXCR4 promotes epithelial-mesenchymal transition and progression of colorectal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2014, 354(2):417–426.
- [17] Wang J, Cai J, Han F, et al. Silencing of CXCR4 blocks progression of ovarian cancer and depresses canonical Wnt signaling pathway [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(6):981–987.
- [18] Jagtap S, Meganathan K, Wagh V, et al. Chemoprotective mechanism of the natural compounds, epigallocatechin-3-O-gallate, quercetin and curcumin against cancer and cardiovascular diseases [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(12):1451–1462.
- [19] Chen QY, Jiao DM, Wang LF, et al. Curcumin inhibits proliferation-migration of NSCLC by steering crosstalk between a Wnt signaling pathway and an adherens junction via EGR-1[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(3):859–868.

《中国肿瘤》关于提交“作者投稿无学术不端行为承诺书”的申明

本刊已开通网上在线投稿系统(<http://www.chinaoncology.cn>), 作者登录网站后, 请在左上角选择《中国肿瘤》, 选中后进入首页, 首次投稿作者请先注册, 在完成稿件上传、作者信息填写等程序后, 请您在网站首页(<http://www.chinaoncology.cn>)“下载中心”栏中下载《中国肿瘤》的“作者投稿无学术不端行为承诺书文档”, 填写后1周内连同单位介绍信、基金证明复印件快递寄至本刊编辑部, 本刊确认收到上述材料后, 该文稿才能进入审稿编辑流程。