姜黄素对结肠癌氟尿嘧啶耐药细胞株中NKD2和TET1的调控作用

孙晓江[1,2],徐　超[1],姚庆华[2,3]

(1. 浙江中医药大学,浙江 杭州 310053;2. 浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022;
3. 浙江省中西医结合肿瘤重点实验室,浙江 杭州 310022)

摘　要:[目的]通过体外实验观察姜黄素对5-Fu耐药细胞株(5FUR)中NKD2、TET1及Caspase-3表达水平的影响。[方法]运用Western blot、Real-time qPCR检测不同浓度姜黄素对5FUR细胞及转染TET1 shRNA后5FUR细胞内NKD2、Caspase-3蛋白和mRNA表达的影响。通过重亚硫酸测序(BSP)的方法,观察姜黄素对*NKD2*基因启动子去甲基化的干预情况。[结果]经过5-Fu培养而得到5FUR的IC_{50}为(86.91±3.61)μg/ml(P<0.001)。HCT-116原代细胞5-Fu的IC_{50}为(12.64±1.52) μg/ml,姜黄素对其增殖的抑制率为38.34%(P<0.001),姜黄素能显著上调5FUR细胞内NKD2、TET1的表达,且呈剂量依赖性。TET1转染敲低后检测发现5FUR细胞中的NKD2及Caspase-3的表达受到明显的抑制。[结论]姜黄素能从体外明显抑制结肠癌细胞5FUR的生长,其作用机制可能通过去甲基化调控蛋白TET1促使抑制基因*NKD2*基因启动子发生去甲基化,从而上调NKD2的表达,最终起到抑制肿瘤生长的作用。

主题词:姜黄素;5-Fu耐药细胞株(5FUR);NKD2; TET1;Caspase-3
中图分类号:R735.3+5　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-170X(2016)11-0928-06
doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2016.11.B012

Role of Curcumin in Up-regulation of NKD2 and TET1 in 5-Fu Resistant Colon Cancer Cells

SUN Xiao-jiang[1,2],XU Chao[1],YAO Qing-hua[2,3]

(1. *Zhejiang Chinese Medical University*,*Hangzhou* 310053,*China*;2. *Zhejiang Cancer Hospital*,*Hangzhou* 310022,*China*;3. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Oncology*,*Hangzhou* 310022,*China*)

Abstract:[Objective] To observe the effects of curcumin on the expression of NKD2,TET1 and Caspase-3 in 5FUR cells. [Methods] The protein and mRNA expression of NKD2,TET1 and Caspase-3 in the 5FUR cells treated with different concentrations of curcuminwere tested by Western blot and Real-time qPCR.The methylation in the promotor of 5FUR treated with different concentrations of curcumin was tested by Bisulfite sequencing PCR. [Results]The IC_{50} of 5FUR cells treated by 5-Fu reach(86.91±3.61)μg/ml(P<0.001),while the HCT-116 cells reach(12.64±1.52)μg/ml.Curcumin triggered massive proliferation in these malignant cells (ratio of 38.34%,P<0.001).Curcumin can upregulate the expression of NKD2,TET1 in a dose-dependent manner in 5FUR cells. When knocking down the TET1,the expression level of NKD2 and Caspase-3 in 5FUR cells was inhibited.Curcumin can reverse this progress. [Conclusion] Curcumin can significantly inhibit the growth of 5FUR cells in vivo.Curcumin may upregulate the expression of TET1 which may demathylate the promotor of NKD2 to enhance the expression and inhibit tumor invasion and metastasis eventually.

Subject words:curcumin;5-Fu resistant colon cancer cells(5FUR);NKD2;TET1;Caspase-3

结肠癌是最常见的消化道肿瘤之一，为全球第三大常见恶性肿瘤。据GLOBOCAN 2012全球统计数据显示全球每年新发的结肠癌病例数达120万例，约占所有恶性肿瘤的10%，在我国每年新发结肠癌病例达25万例，约占全球结肠癌新发病例的1/5[1]。氟尿嘧啶(5-Fu)类药物是治疗进展期结肠癌患者的最主要的药物,然而5-Fu在进展期结肠癌中治疗的有效率只有10%~15%[2]，其中5-Fu化疗耐药是导

基金项目:国家自然科学基金项目(81673813)
通讯作者:姚庆华,副主任医师,硕士生导师,博士;浙江省肿瘤医院中西医结合科,浙江省杭州市拱墅区半山东路1号(310022);E-mail:yaoqh@zjcc.org.cn
收稿日期:2016-10-12;**修回日期**:2016-11-02

致患者化疗失败的重要原因。因其机制复杂,目前尚未得到有效解决。因此,探索新的逆转 5-Fu 化疗耐药的方法具有重要临床意义。

肿瘤化疗耐药与众多因素相关，抑癌基因启动子的高甲基化促使抑癌基因的沉默是其中重要的原因。研究发现,从植物药物姜黄中提取的主要活性成分姜黄素已经被证实具有良好的抗肿瘤作用，肿瘤的作用体现在对 Wnt、MAPK、EGFR 等通路的调控作用,诱导肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤转移,同时姜黄素能够通过调控 miRNA 来逆转 5-Fu 化疗耐药。在我们前期的研究中发现，姜黄素通过促进 *NKD2* 基因的表达来抑制肠癌 EMT 进程而抑制其侵袭转移[3~5],而作为 Wnt 上游的抑制因子,NKD2 使得 Dvl 蛋白家族泛素化降解,抑制了 Wnt 下游靶基因的转录，从而抑制由 Wnt 信号介导的肿瘤侵袭作用[6,7]。在临床研究中发现,*NKD2* 基因在结肠癌及乳腺癌中存在启动子高甲基化的状态[3~5],在现有的甲基化与去甲基化等表观遗传学调控中,TET1 蛋白发挥了重要的作用,TET1 能够促使 Wnt 信号中相关基因的去甲基化,从而抑制 Wnt 信号。因此,本实验以姜黄素作为干预药物，通过体外实验检测 5FUR 细胞内 NKD2、TET1 及 Caspase-3 的表达水平情况,同时检测姜黄素干预后 NKD2 启动子甲基化的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

NKD2(购自 NOVUS 公司),TET1(购自 Abcam 公司),Caspase-3(购自 Abcam 公司),姜黄素(购自 Shgma 公司)，氟尿嘧啶（购自浙江省肿瘤医院),TET1 shRNA（购自 Santa Cruz 公司)(5′-ACACAACTTGCTTCGATAATT-3′,shRNA1),(5′-TTGTGCCTCTGGAGGTTATAA-3′,shRNA2)。NKD2、TET1 及 Caspase-3 引物由上海铂尚生物合成。人类结肠癌细胞株 HCT-116 来自浙江省胃肠病学重点实验室。5-Fu 耐药的结肠癌细胞株 5FUR 由课题组浙江省中西医结合重点实验室通过 HCT-116 细胞自行培养而成(Figure 1)。所需的相关仪器和设备由浙江大学邵逸夫实验室和浙江省肿瘤医院中西医结合重点实验室提供。

1.2 药 物

姜黄素 36.8mg 溶于 1ml DMSO,配得 100mmol/L 浓度；4℃冰箱保存,临用前室温放置 40min,防止颗粒析出。氟尿嘧啶以 1:20~1:200 的浓度稀释。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和转染

人类 HCT-116 结肠癌细胞及 5FUR 在 37℃和 5%的 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 1:2~1:3 的比例传代,加药培养时 DMSO 浓度<0.1%。实验所用数据均处于对数生长期。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 shRNA 转入到细胞内,培养细胞 48 h,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。

1.3.2 Western blot 检测蛋白变化情况

通过 Western blot 检测各组细胞内 Caspase-3、NKD2 和 TET1 蛋白的表达量。用不同浓度姜黄素(0、10、20μmol/L)处理细胞 24h,提取各组细胞总蛋白。姜黄素处理 TET1shRNA 转染后 72h 的 5FUR 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 20μg 上样,经 12% 分离胶及 5% 浓缩胶 SDSPAGE 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 1:800;兔抗人 Caspase-3 多克隆抗体,稀释度为 1:1 500;兔抗人 TET1 多克隆抗体,稀释度为 1:500；内参 β-actin 抗体稀释度 1:2 000) 4℃过夜。与二抗(羊抗兔单克隆抗体,稀释度 1:1 000) 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。

1.3.3 Real-time qPCR 检测 mRNA 变化情况

通过 Real-time qPCR 检测各组细胞 *NKD2*、*TET1* mRNA 的表达水平。不同浓度姜黄素(0、10、20μmol/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 TET1shRNA 转染后 72h 的 5FUR 细胞 24h,提取各组细胞总 RNA,电泳鉴定其完整性。cDNAArchieve 试剂盒逆转录总 RNA,得到 cDNA,用 ddH_2O 稀释。再以 cDNA 以模板,与基因特异性引物,通过 PCR 扩增 *Caspase-3* 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。

1.3.4 重亚硫酸测序检测 *NKD2* 基因启动子去甲基化情况

提取姜黄素干预前后的 5FUR 细胞中的 DNA，使用 QiagenEpiTect Bisulfite Kit 试剂盒进行甲基化处理，首先用亚硫酸处理所提取的 DNA，洗涤甲基化后的 DNA，再通过 PCR 扩增后进行测序。NKD2 相关序列：

NKD2-F1：gTagTaTTtgaTYGTTTTTaTaggtgg

NKD2-R1：ctcaaatacaaaactaaattctaaa

NKD2-R2：cataaaccraaaacaaactaaaatac

NKD2-F2：TaggtggTyGggTyGggtTTtTatyGTtgg

NKD2-R3：aaataccrataaaaaataaaaaaaaataactcc

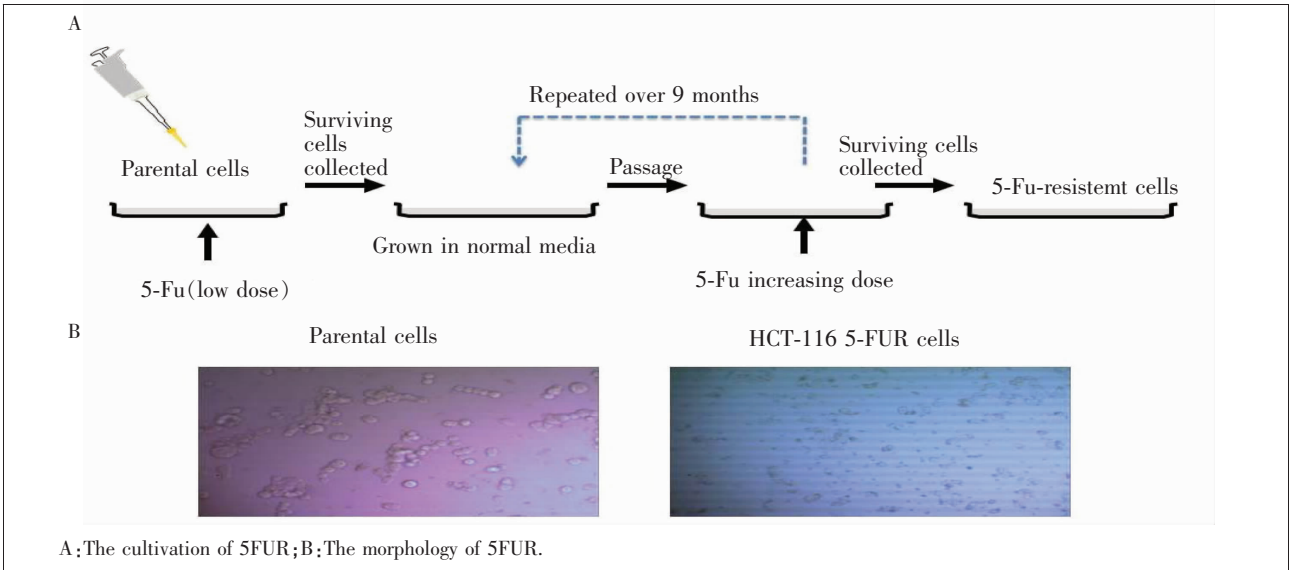
1.4 统计学处理

计量资料以均数±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 统计软件建立数据。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5FUR 细胞系的建立及姜黄素对 5FUR 增殖的抑制作用

5-Fu 耐药的 5FUR 细胞株由 HCT-116 培养而来，将原代细胞通过低剂量 5-Fu 干预，收集存活生长的细胞于新的培养基，逐步增加 5-Fu 的干预剂量，重复该过程 9 个月，剩余存活的细胞具有对 5-Fu 药物的耐药性。细胞形态有原代细胞的颗粒状向梭状改变。原代细胞 HCT-116 以 25μg/ml 浓度 5-Fu 进行首次干预，后逐渐以 5μg/ml 呈梯度样增加，最后所获得 5-Fu 处理 5FUR 的 IC_{50} 为(86.91±3.61)μg/ml ($P<0.001$)(Figure 2)。同时应用 MTS 方法检测姜黄



A：The cultivation of 5FUR；B：The morphology of 5FUR.

Figure 1 The cultivation of 5-Fu resistant colon cancer cells(5FUR)

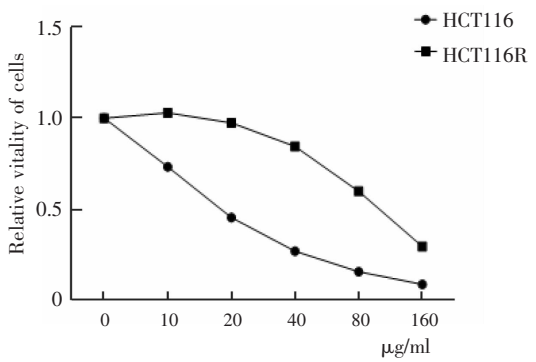


Figure 2 The IC_{50} results of 5FUR

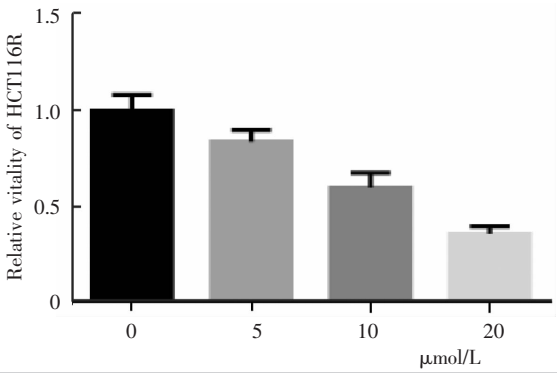
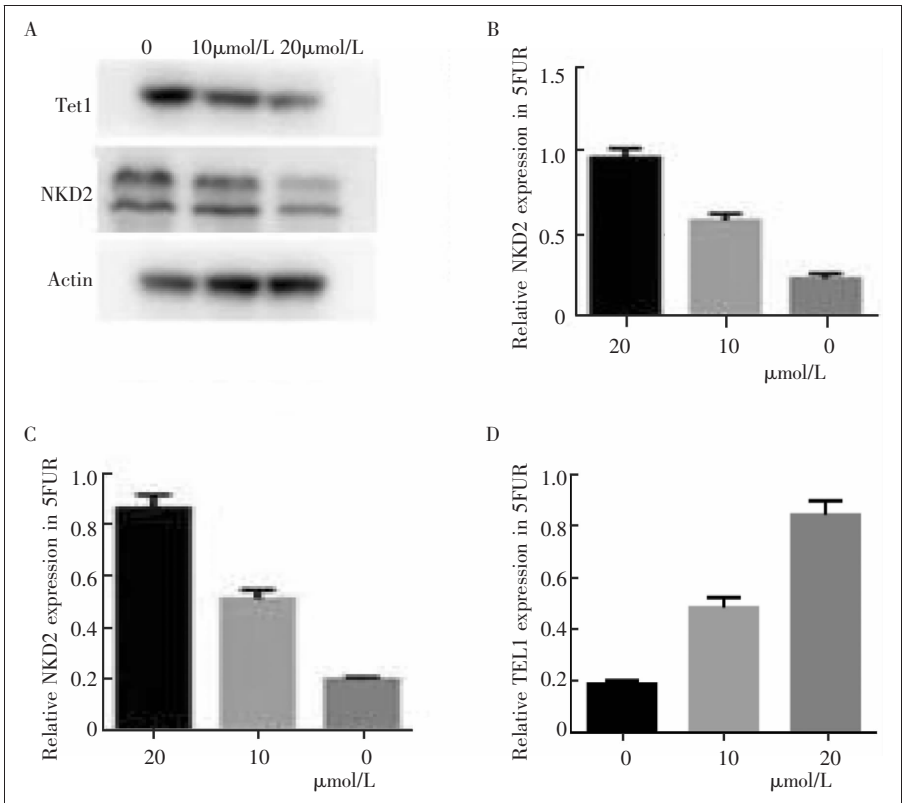


Figure 3 The proliferation vitality of 5FUR treated by Curcumin by MTS

素对 5FUR 的增殖活性作用。运用不同浓度(0~20μmol/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懒性(Figure 3)。

2.2 不同浓度姜黄素处理后对 5FUR 细胞内 NKD2 和 TET1 蛋白和 mRNA 表达的影响

不同浓度的姜黄素 (0、10、20μmol/L)对 5FUR 细胞作用 24 h,观察 NKD2 和 TET1 蛋白及 mRNA 表达水平。Western 印迹(Figure 4A)显示,NKD2、TET1 蛋白在不同浓度实验组与阴性对照组相比表达水平显著增加，蛋白表达水平显著下降，差异有统计学意义($P<0.05$)。同时，随着姜黄素浓度的增加，其蛋白表达水平也呈显著上升趋势。Real-time qPCR(Figure 4B、C、D) 显示，*NKD2*、*TET1* mRNA 的表达水平在实验组与阴性对照组相比显著增加，差异有统计学意义($P<0.01$)。其 mRNA 表达水平改变也越明显。通过 shRNA 技术敲低耐药细胞中 TET1 的表达,发现 NKD2 以及凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达显著下调,同时 TET1 shRNA 和 20μmol 联合干预后，细胞中上述蛋白表达水平显著($P<0.01$)(Figure 5)。



Note:A:Western blot results of NKD2,TET1 in 5FUR;B、C、D:The mRNA and protein of NKD2, TET1 in 5FUR treated by different doses of Curcumin.

Figure 4 Expressions of NKD2,TET1 in 5FUR

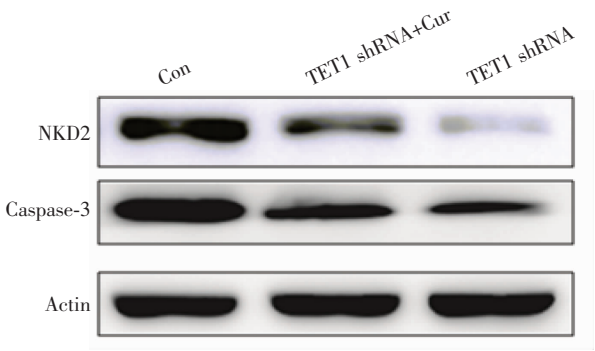


Figure 5 The expression of NKD2,Caspase-3 in 5FUR after transfection of TET1 shRNA

2.3 姜黄素调控 5FUR 细胞中 *NKD2* 基因启动子的去甲基化

为了表明姜黄素是否通过调控 *NKD2* 基因的去甲基化来增加其表达，通过姜黄素 20μmol/L 处理 5FUR 细胞 24h 后，发现细胞中 *NKD2* 基因启动子区域甲基化程度减弱,发生明显的去甲基化现象。而对照组中 *NKD2* 启动子区域存在高度甲基化(Figure 6)(注:红色区域为未甲基化位点,蓝色为甲基化位点,白色区域为未知位点)。

3 讨 论

结肠癌 5-Fu 化疗耐药一直是困扰着临床的难题,于此同时严重影响患者的预后。肿瘤对 5-Fu 产生耐药与多种因素有关，其中最主要的原因是由于

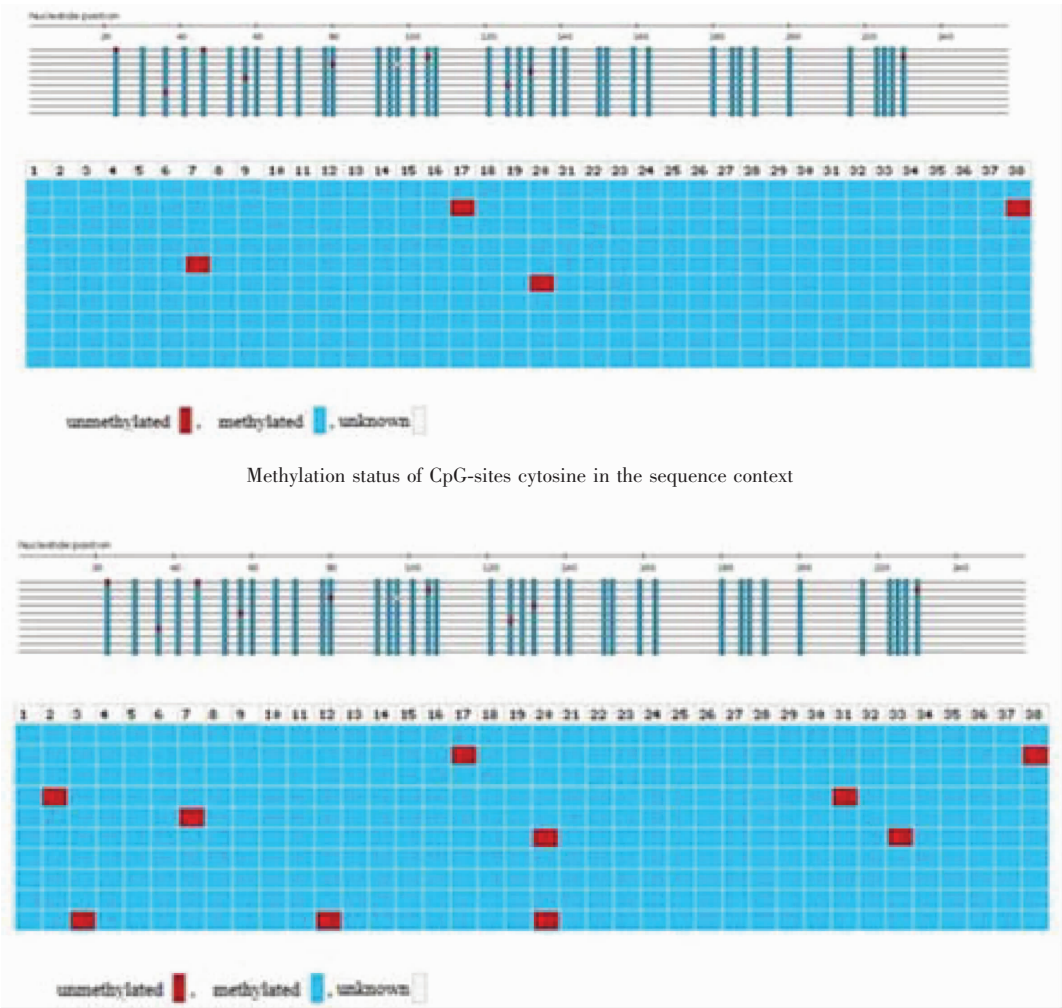


Figure 6　The analysis of the methylation of the promotor in *NKD2* treated by Curcumin

细胞内药物浓度降低，致使药物抗肿瘤代谢作用减弱甚至消失，致使其无法发挥作用。同时，参与凋亡过程调控的基因表达失控，导致肿瘤细胞对广谱抗肿瘤药物的细胞毒性作用产生耐药性[8]，已有众多的研究探索 5-Fu 耐药的机制，本研究结合了前期姜黄素调控 NKD2 抑制结肠癌侵袭转移中的作用，而 *NKD2* 基因通过抑制 Wnt 信号而参与调控结肠癌的上皮间质转化介导的侵袭转移[9]。本研究深入探索了姜黄素抑制 5-FUR 细胞的机制，与前期研究结果相似，发现姜黄素能够上调 5-FUR 细胞中 NKD2 的表达，同时调控了 *NKD2* 基因启动子的去甲基化。

为了进一步探索姜黄素调控 *NKD2* 基因的去甲基化机制，研究发现了参与去甲基化调控的蛋白 TET1(ten eleven translocation 1)在结肠癌 5-Fu 耐药细胞中受到了姜黄素的调控，不同浓度姜黄素干预后，TET1 的表达显著上升。TET1 参与调控去甲基化的机制在于其使 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine，5mc) 羟化后生成 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine，5hmc)，5hmC 可进一步在脱氨基酶 AID(activation-induced deaminase)催化下生成 5 -羟甲基尿嘧啶(5-hydroxymethyluracil，5hmU)。基于 TET1 的去甲基化作用，其也作为一个重要的结肠癌的抑癌因子，已逐渐从各个研究中脱颖而出[7,10]。已有的研究证实，结肠癌中 Wnt 通路的活跃源于其上游抑制因子的基因启动子的高甲基化而沉默，DKK 就是其中之一。而 TET1 结合能与 DKK 启动子结合，促进其去甲基化从而达到负向调控 Wnt 通路的目的[11]。本研究证实了 TET1 能够正向调控 *NKD2* 基因，同时

在敲低 TET1 的活性后,NKD2 受到抑制，而参与凋亡调控的 *Caspase-3* 基因也受到 TET1 的敲低而低表达。姜黄素能够恢复敲低 TET1 的 5FUR 细胞中 NKD2 和 Caspase-3 的表达,由此证明了姜黄素能够通过调控 *TET1* 基因促使 *NKD2* 基因在 5FUR 细胞中的表达,同时促进耐药细胞的凋亡。

作为从姜科植物根茎中提取的一种抗氧化剂多酚,姜黄素具有药理作用广泛且毒副作用小的优点[12,13]。姜黄素作为植物中药的单体成分,其被广泛应用于抗肿瘤研究中。本研究从植物单体的精准治疗出发,针对精准靶基因,从而逆转耐药和抑制肿瘤生长的作用。姜黄素促使 *NKD2* 和 *TET1* 基因在 5FUR 细胞中的表达,但其是否通过调控 TET1 而参与 Wnt 信号轴的调控尚不明确,亟待本研究的深入而获得结论。

参考文献:

[1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115–132.

[2] Elez E,Hendlisz A,Delaunoit T,et al. Phase Ⅱ study of necitumumab plus modified FOLFOX6 as first-line treatment in patients with locally advanced or metastatic colorectal cancer[J].Br J Cancer,2016,114(4):372–380.

[3] Gonçalves Vde P,Ortega AA,Guimarães MR,et al. Chemopreventive activity of systemically administered curcumin on oral cancer in the 4-nitroquinoline 1-oxide model[J]. J Cell Biochem,2015,116(5):787–796.

[4] Rajitha B,Belalcazar A,Nagaraju GP,et al. Inhibition of NF-κB translocation by curcumin analogs induces G0/G1 arrest and downregulatesthymidylate synthase in colorectal cancer[J]. Cancer Lett,2016,373(2):227–233.

[5] Toden S,Okugawa Y,Jascur T,et al. Curcumin mediates chemosensitization to 5-fluorouracil through miRNA-induced suppression of epithelial-to-mesenchymal transition in chemoresistant colorectal cancer [J].Carcinogenesis,2015,36(3):355–367.

[6] Esteller M. Epigenetics in cancer [J]. N Engl J Med,2008,358:1148–1159.

[7] Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes,TDG and the dynamics of DNA demethylation[J]. Nature,2013,502(7472):472–479.

[8] Sui H,Zhou S,Wang Y,et al.COX-2 contributes to P-glycoproteinmediated-multidrug resistance via phosphorylation of c-Jun atSer63/73 in colorectal cancer[J].Carcinogenesis,2011,32(5):667–675.

[9] Zhang Z,Chen H,Xu C,et al.Curcumin inhibits tumor epithelial mesenchymal transition by downregulating the Wnt signaling pathway and upregulating NKD2 expression in colon cancer cells[J]. Oncol Rep,2016 ,35(5):2615–2623.

[10] Neri F,Dettori D,Incarnato D,et al.TET1 is a tumour suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway[J]. Oncogene,2015,34(32):4168–4176.

[11] Ito S,D'Alessio AC,Taranova OV,et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmCconversion,ES-cell self-renewal and inner cell mass specification[J]. Nature,2010,466(7310):1129–1133.

[12] Zhou X,Wang W,Li P,et al. Curcumin Enhances the effects of 5-Fluorouracil and oxaliplatin in inducing gastric cancer cell apoptosis both in vitro and in vivo [J]. Oncol Res,2016,23(1):29–34.

[13] Jiang GM,Xie WY,Wang HS,et al. Curcumin combined with FAPαc vaccine elicits effective antitumor response by targeting indolamine-2,3-dioxygenase and inhibiting EMT induced by TNF-α in melanoma [J].Oncotarget,2015,6(28):25932–25942.