

姜黄素通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制结肠癌细胞上皮间质转化

陈海滔¹, 徐超², 姚庆华³

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053; 3. 浙江省肿瘤医院 浙江省中西医结合肿瘤重点实验室, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨姜黄素对结肠癌细胞上皮间质转化(EMT)的作用机制。[方法] 通过MTS检测姜黄素对HCT116细胞活性的影响; 运用Western-blot、Real-time qPCR检测不同浓度姜黄素对HCT116细胞Wnt相关基因(β -catenin、TCF4)及EMT相关基因(E-cadherin和Vimentin)的表达情况。[结果] 姜黄素能明显抑制HCT116细胞的增殖活性, 在12h、24h和48h的IC₅₀分别是61.98±2.68 μ mol/L、19.64±1.29 μ mol/L和17.84±1.25 μ mol/L。姜黄素能下调HCT116细胞内 β -catenin和TCF4的表达水平; 同时显著性上调E-cadherin及下调Vimentin表达水平, 且呈剂量依赖性。Wnt信号通路活化剂能上调姜黄素处理后细胞内的 β -catenin表达和下调E-cadherin表达水平。[结论] 姜黄素通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路, 从而抑制肿瘤细胞上皮间质转化。

关键词: 姜黄素; Wnt/ β -catenin 信号通路; 上皮间质转化

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)01-0035-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.01.B007

Curcumin Inhibits Tumor Epithelial-Mesenchymal Transition by Downregulating Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Colon Cancer

CHEN Hai-tao¹, XU Chao², YAO Qing-hua³

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

Abstract: [Objective] To investigate the mechanism of curcumin on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colon cancer cells. [Methods] The effects of curcumin on the activity of HCT116 cells were detected by MTS. The expression of Wnt-related genes(β -catenin and TCF4) and EMT-related genes (E-cadherin and Vimentin) were detected by Western-blot and real-time qPCR assay in HCT116 cells. [Results] Curcumin could significantly inhibit the proliferation of HCT116 cells and the IC₅₀ at 12h, 24h and 48h respectively were 61.98±2.68 μ mol/L, 19.64±1.29 μ mol/L and 17.84±1.25 μ mol/L respectively. Curcumin could also down-regulate the expression of β -catenin and TCF4 in HCT116 cells. At the same time, curcumin could up-regulate the expression of E-cadherin and down-regulate the expression of Vimentin in a dose-dependent manner in HCT116 cells. After treatment with Wnt signaling pathway activator, the expression of β -catenin increased and the expression of E-cadherin decreased in HCT116 cells treated with curcumin. [Conclusion] Curcumin can inhibit the epithelial-mesenchymal transition by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in tumor cells.

Subject words: curcumin; Wnt/ β -catenin signaling pathway; epithelial-mesenchymal transition

据GLOBOCAN于2012年公布的数据显示,在

全球范围内,大肠癌居男性恶性肿瘤发病率第三位,女性恶性肿瘤发病率第二位。在我国,结肠癌的发病率持续上升^[1-4]。研究证明结肠癌的发生发展是一个多阶段、多因素的过程。有效抑制结肠癌的转移发生

基金项目: 国家自然科学基金(81673813)

通讯作者: 姚庆华,主任医师,博士,硕士生导师;浙江省肿瘤医院中西医结合科主任,浙江省杭州市半山山东路1号(310022);E-mail: yaoqh@zjcc.org.cn

收稿日期: 2016-10-10

是临床面临的主要难题。目前发现肿瘤的侵袭转移与上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 密切相关。EMT 是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间质细胞转化的现象^[5]。在肿瘤生长的演变进程中, EMT 主要包括了细胞极性的变化、细胞骨架的重建、细胞间黏附的丧失以及肿瘤基底膜和细胞外基质的破坏^[6], 从而获得高迁移、侵袭、抗凋亡及降解细胞外基质等间质表型特征。Wnt/ β -catenin 信号通路异常激活在结肠癌发生中起着重要作用。Wnt/ β -catenin 信号通路不仅能够上调 Twist1、Snail1、Snail2 等转录因子的表达, 而且 β -catenin/TCF/LEF 还能促进 Fibronectin 和 Vimentin 基因转录水平, 诱导肿瘤细胞 EMT^[7,8]。姜黄素 (curcumin) 是从姜科植物根茎中提取的一种抗氧化剂多酚, 具有药理作用广泛且毒副作用小的优点^[9,10]。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^[11,12]。本研究通过使用姜黄素体外处理结肠癌 HCT116 细胞, 探讨姜黄素抑制结肠癌细胞上皮间质转化的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株: 结肠癌细胞系 HCT116 来自浙江省胃病病学重点实验室。

药材: 姜黄素 (购自 Sigma 公司, 姜黄素粉末用 DMSO 溶解, 配置成原溶液为 100mmol/L); 抗体: β -catenin (购自 Epitomics 公司), TCF4 (购自 CST 公司), E-cadherin 和 Vimentin (购自 Sigma 公司), β -actin (购自 BD 公司); Wnt 信号通路活化剂 (WAY 262611) (购自 Abcam 公司)。 β -catenin 上下游引物 (购自 Invitrogen 公司): 5'-TGCCAAGTGGGTG-GTATAGAGG-3' 和 5'-CGCTGGGTATCCTGATGTGC-3'。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 实验方法

1.2.1 细胞培养

人类 HCT116 结肠癌细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37℃ 和 5% CO₂ 环境下培养。细胞存活率大于 80%。每次传代用 0.025% 胰蛋白酶 (EDTA) 消化 3~5min, 以 1:4~1:6 的比例传代。实验

所用细胞均处于对数生长期。

1.2.2 MTS 实验

先用胰酶消化, 吹打成单细胞悬液。每孔接种 8×10^3 个细胞于 96 孔板中培养, 平行孔每组 5 个。24h 后使用 100 μ l 终浓度分别为 0、5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L 的姜黄素处理细胞。分别培养 12、24、48h 后弃培养液, 加入 100 μ l 的 MTS 液。继续培养 2~4h 显色。最后用 490nm 波长读取各孔吸光度值。

1.2.3 Western blot 检测蛋白

用不同浓度姜黄素 (0、10 μ mol/L、20 μ mol/L) 处理细胞 24h, 提取各组细胞总蛋白。用姜黄素 (10 μ mol/L) 处理 Wnt 信号通路活化剂处理 12h 的 HCT116 细胞 24h, 提取细胞总蛋白。BCA 检测试剂盒测定各组细胞的蛋白浓度。分别取总蛋白 15 μ g 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 4℃ 过夜。与二抗室温孵育 2h 后, ECL 化学发光剂于暗室中曝光和显影。测定蛋白条带的光密度值, 以表示蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.2.4 Real-time qPCR 检测 mRNA

用不同浓度姜黄素 (0、10 μ mol/L、20 μ mol/L) 处理细胞 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。逆转录条件: 25℃ 10min; 37℃ 2h; 85℃ 5min; 最后维持 4℃。再以 cDNA 以模板, 与基因特异性引物, 通过 PCR 扩增 β -catenin。扩增条件为: 预变性 94℃ 2min, 进入循环, 94℃ 30s, 52℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 5s, 40 个循环后 72℃ 4min。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。

1.2.5 激活 Wnt 信号通路, 检测 EMT 相关基因表达

实验分为 3 组, 即空白对照组、Wnt 活化剂+姜黄素组和姜黄素组。Wnt 活化剂+姜黄素组是先用 Wnt 信号通路活化剂 (1 μ mol/L) 作用 HCT116 细胞 12h, 再用姜黄素 (10 μ mol/L) 处理该细胞 24h; 姜黄素组是直接用姜黄素 (10 μ mol/L) 处理细胞 24h。分别检测各组细胞内 β -catenin 和 E-cadherin 的表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组以上比较采用

单因素方差分析,组间比较采用 SNK 方法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 HCT116 结肠癌细胞的增殖活性的影响

用不同浓度姜黄素 ($0.5\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$) 作用细胞 12h、24h 和 48h, 细胞活性受到不同程度的抑制, 且呈浓度依赖性 ($P<0.001$) (Figure 1)。姜黄素对 HCT116 细胞在 12h、24h 和 48h 的 IC_{50} 分别是 $61.98\pm2.68\mu\text{mol/L}$ 、 $19.64\pm1.29\mu\text{mol/L}$ 和 $17.84\pm1.25\mu\text{mol/L}$ 。可见, 姜黄素能明显抑制 HCT116 细胞增殖活性的作用。

2.2 姜黄素抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的表达

用不同浓度姜黄素 (0 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$) 处理 HCT116 细胞 24h 后, 检测细胞内 β -catenin 和 TCF4 表达水平。运用 Western blot 检测基因蛋白水平 (Figure 2A), 结果发现与对照组 (0.96 ± 0.12) 相比, 在低、高浓度姜黄素作用下细胞内 β -catenin 的相对表达量降低, 分别为 0.76 ± 0.09 和 0.38 ± 0.04 。同时, 与对照组 (0.95 ± 0.09) 相比, 在低、高浓度姜黄素组中 TCF4 的相对表达也显著性下调, 分别为 0.78 ± 0.07 和 0.29 ± 0.03 , 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。运用 RT-qPCR 检测基因 mRNA 表达水平 (Figure 2B), 发现 β -catenin mRNA 的相对表达水平在姜黄素组与对照组 (0.96 ± 0.06) 相比明显降低, 分别为 0.68 ± 0.06 和 0.26 ± 0.03 , 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。表明姜黄素能明显抑制 HCT116 细胞内 Wnt 信号通路的表达。

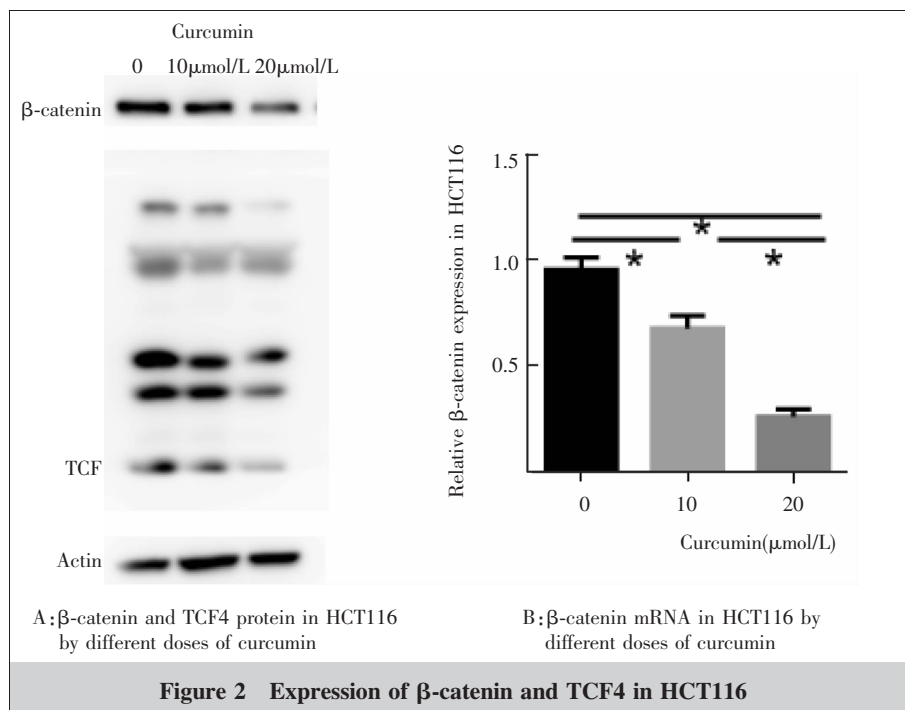
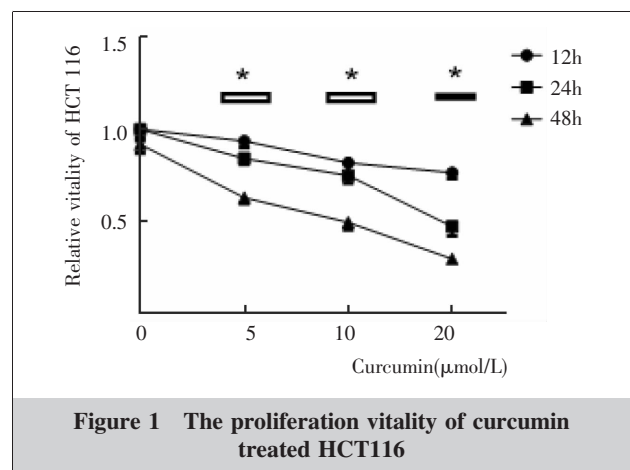
2.3 姜黄素抑制 HCT116 细胞内 EMT 相关基因的表达

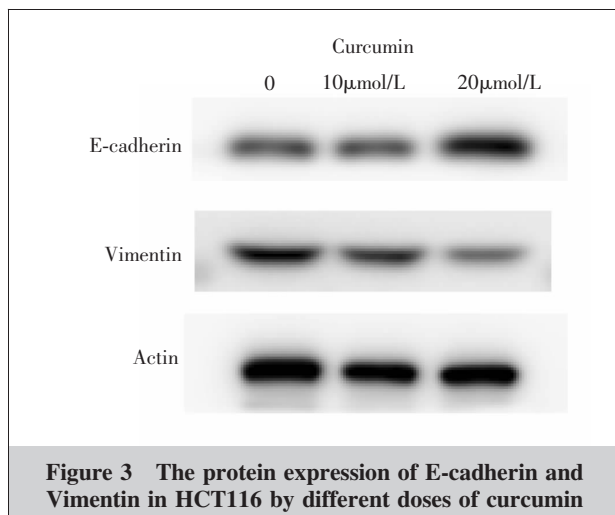
用不同浓度姜黄素 (0 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$) 处理 HCT116 细胞 24h 后, 检测细

胞内 E-cadherin 和 Vimentin 的蛋白表达水平。运用 Western blot 检测基因蛋白水平 (Figure 3), 与对照组 (1.02 ± 0.09) 相比, 在低、高浓度姜黄素组中细胞内 E-cadherin 的相对表达量分别为 1.98 ± 0.12 和 4.59 ± 0.16 。Vimentin 在低、高浓度姜黄素组中的相对表达量分别为 0.79 ± 0.06 和 0.31 ± 0.03 , 明显低于对照组 (0.97 ± 0.09), 组间差异存在统计学意义 ($P<0.05$)。随着姜黄素浓度的增加, 其表达水平改变越明显, 表明姜黄素能抑制 HCT116 细胞的上皮间质转化。

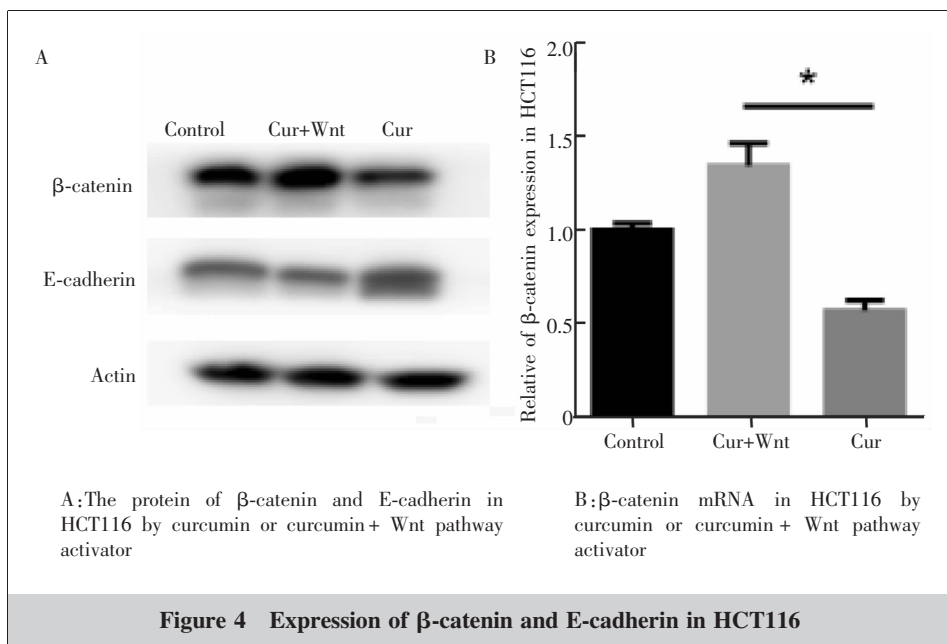
2.4 激活 Wnt 信号通路, 逆转姜黄素对 EMT 相关基因的抑制作用

与空白对照组 (1.03 ± 0.10) 相比, Wnt 活化剂+姜





黄素组 β -catenin 的相对表达量为 3.92 ± 0.15 , 单纯姜黄素组的相对表达量为 0.68 ± 0.05 ; 此外, 与空白对照组 (0.99 ± 0.07) 相比, E-cadherin 在 Wnt 活化剂+姜黄素组的相对表达为 0.78 ± 0.06 , 在姜黄素组的相对表达为 2.02 ± 0.13 (Figure 4A), 其各组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 检测基因 mRNA 表达水平发现, 与空白对照组 (1.00 ± 0.04) 相比, β -catenin mRNA 相对表达量在 Wnt 活化剂+姜黄素组为 1.34 ± 0.12 , 在姜黄素组的相对表达量为 0.57 ± 0.05 , 且 Wnt 活化剂+姜黄素组与单用姜黄素组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (Figure 4B)。表明 Wnt 活化剂能逆转姜黄素对 Wnt 信号通路和 EMT 的影响。



3 讨论

研究发现, 上皮间质转化 (EMT) 是肿瘤演变进程中的重要生物学过程, 通过 EMT, 肿瘤细胞逐渐由上皮细胞表型向转换间质表型转变, 并获得增强的迁移和侵袭能力。该过程通常是由多种生长因子 (如 TGF- β 、EGF 等) 诱导活化 Wnt、SMAD 等信号转导途径的级联反应, 进而通过一系列表观遗传调控反应事件, 活化转录调控因子 Snail、Slug 等, 下调上皮标记物的表达, 导致肿瘤起始细胞的抗凋亡和浸润侵袭等能力增强, 最终促进肿瘤发生发展^[13-17]。因此, Wnt 信号通路作为 EMT 的重要途径之一, 不仅可以通过转导经典 Wnt 途径来决定细胞的命运, 也可以与非经典 Wnt 途径控制组织极性和细胞运动^[18]。研究证实 Wnt 信号通路可通过经典和非经典的途径分别激活 MMP 家族的相关基因, 而 MMPs 又可以通过降解基底膜和细胞外基质, 改变上皮细胞的微环境, 使 E-cadherin 表达下降, Vimentin 表达上调, 促进 EMT 的进程。此外, Wnt 信号通路还可通过诱发 TGF- β 、内皮素、CD44、AP-1 等多种因子促进肿瘤 EMT^[19]。因此, 通过调节 Wnt 信号的活性, 进而有效抑制肿瘤细胞 EMT 介导的侵袭转移是目前临床上亟待解决的问题。

在临床上, 以姜黄素为主要成分的中药 (如郁金、姜黄) 广泛运用于抗肿瘤治疗, 能减少肿瘤复发风险, 延长患者的生存期。Sharma 等^[20]用一种胶囊式的标准的姜黄提取物 (包含姜黄素 36~180mg) 治疗 15 例标准化疗的晚期结肠癌患者, 发现其耐受性较好, 无剂量限制性毒性, 同时能使诱导型 PGE2 降低。同时, 在胰腺癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、乳腺癌等肿瘤患者中均有一定的抗肿瘤作用^[21]。此外, 姜黄素已被证明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、乳腺癌和前列腺癌均有抗侵袭和抗转移的功效^[22,23]。研究还发现在骨肉瘤、非小细胞肺癌中姜黄素可通过抑制 Wnt 信号通路从而抑制细胞侵袭转移及生长^[21,24]。我们研究了姜黄素抗结肠癌细胞侵袭转移的具体机制。在当前研究中,我们发现姜黄素能显著性抑制 HCT116 结肠癌细胞的增殖活性。同时,姜黄素通过下调 Wnt 信号通路的关键基因 β -catenin 及下游转录因子 TCF4 的表达,抑制 Wnt 信号通路。与此同时,姜黄素还能促进上皮标志物 E-cadherin 表达,减少间质标志物 Vimentin 的表达水平,抑制 HCT116 结肠癌细胞 EMT 的进程。为明确姜黄素是否通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路从而影响结肠癌的 EMT,本实验还运用 Wnt 通路活化剂处理 HCT116 结肠癌细胞,发现 Wnt 活化剂能逆转姜黄素对 Wnt 信号通路以及 EMT 的影响。

因此,基于以上实验表明姜黄素通过先抑制 Wnt 信号通路,从而抑制肿瘤细胞上皮间质转化,起到抗肿瘤细胞侵袭转移的作用。本研究为姜黄素抑制结肠癌侵袭转移机制提供了新的思路,也为姜黄素作为潜在的结肠癌治疗手段提供了实验基础。

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] Noreen F,Röösli 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, 2014,106(7):1-9.
- [3] Pelser 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.
- [4] 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):1-8.
- [5] Huang W,Liu Z,Zhou G,et al. Magnetic goldnanoparticle-mediated small interference RNA silencing bag-1 gene for colon cancer therapy[J]. Oncol Rep,2016,35(2):978-984.
- [6] Hay ED. The mesenchymal cell,its role in the embryo and the remarkable signaling mechanisms that create it[J]. Dev Dyn,2005,233(3):706-720.
- [7] Zhu ZJ,Ruan JS,Li R,et al. Research progress of epithelial-mesenchymal transition of tumor cells induced by Wnt signaling pathway [J]. Chinese Pharmacological Bulletin,2012,28(7):904-907.[朱智杰,阮君山,李尧,等. Wnt 信号通路诱导肿瘤细胞上皮间质转化的研究进展[J].中国药理学通报,2012,28(7):904-907.]
- [8] Lee SY,Jeon HM,Ju MK,et al. Wnt/Snail signaling regulates cytochrome-c oxidase and glucose metabolism [J]. Cancer Res,2012,72(14):3607-3617.
- [9] 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(1-2):29-34.
- [10] Jiang GM,Xie WY,Wang HS,et al. Curcumin combined with FAP α c 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.
- [11] Maheshwari RK,Singh AK,Gaddipati J,et al. Multiple biological activities of curcumin;a short review[J]. Life Sci, 2006,78(18):2081-2087.
- [12] Zhang X,Chen Q,Wang Y,et al. Effects of curcumin on ion channels and transporters [J]. Front Physiol,2014,5 (94):1-6.
- [13] Wang Y,Shi J,Chai K,et al. The role of Snail in EMT and tumorigenesis[J]. Current Cancer Drug Targets,2013, 13(9):963-972.
- [14] Reinacher-Schick A,Baldus SE,Romdhana B,et al. Loss of smad4 correlates with loss of the invasion suppressor E-cadherin in advanced colorectal carcinomas [J]. J Pathol, 2004,202(4):412-420.
- [15] Wu CY,Tsai YP,Wu MZ,et al. Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial-mesenchymal transition [J]. Trends Genet,2012,28 (9): 454-463.
- [16] Frisch SM,Schaller M,Cieply B. Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis[J]. J Cell Sci,2013,126(Pt 1):21-92.
- [17] Krausova M,Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer[J]. Cell Signal,2014,26(3):570-579.
- [18] 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.
- [19] Zhao JH,Jiang YG,Luo Y. The function of Wnt/ β -catenin signaling pathway in epithelial mesenchymal transition[J]. International Journal of Urology and Nephrology,2008,28 (2):190-194. [赵佳晖,姜永光,罗勇. Wnt/ β -catenin 信号通路在肿瘤 EMT 现象中的作用研究进展[J].国际泌尿系统杂志,2008,28(2):190-194.]
- [20] Sharma RA,McLelland HR,Hill KA,et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extrat on patients with colorectal cancer [J].Clin Cancer Res, 2001,7(7):1894-1900.
- [21] Shishodia S,Chaturvedi MM,Aggarwal BB. Role of curcumin incancer therapy [J]. Curr Probl Cancer,2007,31 (4):243-305.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Leow PC,Bahety P,Boon CP,et al. Functionalized curcumin analogs as potent modulators of the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Eur J Med Chem,2014,71: 67-80.