

姜黄素联合雷帕霉素诱导去势难治性前列腺癌 Pten-CaP8 细胞自噬及凋亡研究

孙绍瑛, 牛建昭

北京中医药大学基础医学院 细胞生物化学实验室, 北京 100029

摘要: **目的** 探讨姜黄素联合雷帕霉素对去势难治性前列腺癌 (CRPC) Pten-CaP8 细胞增殖、自噬及凋亡的影响。**方法** 将不同浓度的姜黄素单独或与雷帕霉素共同处理 Pten-CaP8 细胞 24 h 后, MTT 法检测细胞增殖, 光镜下观察细胞形态, Western blotting 法检测相关蛋白表达。**结果** 姜黄素联合雷帕霉素可显著抑制 Pten-CaP8 细胞增殖 ($P < 0.05$), 上调 LC3-II/LC3-I 表达, 诱导 PARP 裂解, 还可下调 p-AKT (S473)、p-S6 (S240/244)、AR (N-20) 和 Cyclin D1 蛋白表达水平, 使 Pten-CaP8 细胞形态变短且胞浆内出现空泡改变。**结论** 姜黄素联合雷帕霉素可共同诱导 Pten-CaP8 细胞自噬及凋亡且效果显著, 两者协同抗癌机制与其拮抗 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关。

关键词: 姜黄素; 雷帕霉素; 去势难治性前列腺癌 (CRPC); Pten-CaP8 细胞; 细胞自噬; 细胞凋亡

中图分类号: R282.710.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0520-04

Autophagy and apoptosis of Pten-CaP8 cells in castration refractory prostate cancer induced by curcumin combined with Rapamycin

SUN Zhao-ying, NIU Jian-zhao

Laboratory of Cell Biology and Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of curcumin combined with Rapamycin on cell proliferation, autophagy, and apoptosis in Pten-CaP8 cells of castration refractory prostate cancer (CRPC). **Methods** Cells were treated by different concentrations of curcumin with or without Rapamycin for 24 h. Cell proliferation was analyzed by MTT. Cell morphology was detected by light microscopy. Expression of cell protein was evaluated by Western blotting. **Results** Curcumin combined with Rapamycin could significantly inhibit the Pten-CaP8 cell proliferation ($P < 0.05$), up-regulate LC3-II/LC3-I, induce PARP cleavage, and down-regulate the protein expression levels of p-AKT (S473), p-S6 (S240/244), AR (N-20), and Cyclin D1. Treated cells became short and changed to cytoplasmic vacuoles. **Conclusion** Through the induction of autophagy and apoptosis simultaneously, curcumin combined with Rapamycin exerts synergistic antitumor activities correlated to the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathways.

Key words: curcumin; Rapamycin; castration refractory prostate cancer (CRPC); Pten-CaP8 cell; autophagy; apoptosis

去势难治性前列腺癌 (castration refractory prostate cancer, CRPC) 是当前国际医学界面临的难题, 其原因不仅是对缺乏有效的治疗手段, 更重要的是缺乏可供研究的全面代表疾病特点及进程的组织细胞样品^[1]。细胞自噬是当前国际学术界的研究热点^[2], 细胞自噬通路有可能成为有效治疗 CRPC 的突破手段。雷帕霉素及其类似物是目前极具潜力的抗癌制剂, 然而在临床试验中频繁出现的耐药及复发严重限制了其临床应用^[3], 因此雷帕霉

素的临床疗效不佳是亟待解决的问题。姜黄素是一种天然酚类色素, 广泛存在于姜科植物姜黄、莪术、郁金等的根茎中^[4-5], 具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒等多种药理活性^[6-7]。临床研究已证实姜黄素对多种癌症如结肠癌、胰腺癌等具显著疗效^[8], 但目前缺乏其对 CRPC 影响的报道。本实验探讨姜黄素联合雷帕霉素对 CRPC Pten-CaP8 细胞增殖、自噬及凋亡的影响。Pten 基因敲除技术在国内还缺乏研究和应用, 本实验采用的 Pten-CaP8 细胞是从条件性

收稿日期: 2011-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672757)

作者简介: 孙绍瑛 (1978—), 女, 博士, 研究方向为中医药防治重大疾病。E-mail: zhaoyingsun88@yahoo.com

Pten 基因敲除小鼠模型分离的^[9],具有近似人前列腺癌和 CRPC 病理及病程的特点等多种优势。

1 材料和方法

1.1 仪器

尼康荧光显微摄影系统,日本尼康公司;凝胶成像系统、垂直电泳仪和半干法转膜仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 药品与试剂

姜黄素, LKT 公司,批号 C8069,质量分数 $\geq 98\%$;雷帕霉素, Selleck 公司,批号 S1039。两药均用二甲基亚砜(DMSO)溶解并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。DMEM 培养基, Gibco 公司;活性炭处理牛血清, HyClone 公司;牛脑垂体蛋白质粗提液, Invitrogen 公司;牛胰岛素、重组人上皮生长因子, Sigma 公司。抗体: LC3、Cleaved-PARP、Cyclin D1、p-AKT (S473)、AKT、p-S6 (S240/244)、S6, 均购自 Cell Signaling 公司; AR (N-20), Santa Cruz 公司; β -actin (A5441), Sigma 公司;辣根过氧化物酶标二抗 NA931、NA934, 增强化学发光(ECL)显色液(RPN2232), 均购自 GE Healthcare 公司。

1.3 细胞培养

Pten-CaP8 细胞株由美国加州大学洛杉矶分校 WU Hong 教授惠赠。细胞置于含 10% 活性炭处理牛血清的 DMEM 培养基, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 条件下培养, 并加入牛脑垂体蛋白质粗提液 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、牛胰岛素 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和重组人上皮生长因子 6 ng/mL 。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期细胞, 以 $1\times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板 ($100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$), 分别加入不同浓度 (10、 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$) 的姜黄素或雷帕霉素 (0.1、 1.0 nmol/L) 或两药同时加入, 每种给药方式设 5 个复孔, 孵育 24 h, PBS 漂洗 3 次后加入 MTT 继续孵育 4 h, 酶标仪检测 570 nm 波长下的吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率。

1.5 光镜检测细胞形态

按照“1.4”项下方法用不同浓度的姜黄素或雷帕霉素或两药共同处理并培养细胞 24 h 后, 光镜下观察细胞形态的变化。

1.6 Western blotting 法检测相关蛋白表达

按照“1.4”项下方法用不同浓度的姜黄素或雷帕霉素或两药共同处理并培养细胞 24 h 后, 加入蛋白裂解液冰浴裂解 30 min 并离心, 取 $50\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 半干法转至 PVDF 膜上, 5%

蛋白封闭液在室温下封闭 1 h, 洗膜后加入一抗 ($1:1\ 000$) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 再洗膜后加入二抗 ($1:5\ 000$) 室温下孵育 1 h, ECL 显色。利用 Image J 图像分析软件对蛋白表达结果进行图像分析。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 对细胞增殖的影响

姜黄素与雷帕霉素联合给药组 Pten-CaP8 细胞存活率均降低, 尤其是姜黄素 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 与雷帕霉素 1.0 nmol/L 联合给药组与两药单用组及对照组的效果比较, 具有显著差异 ($P<0.05$)。结果见图 1。

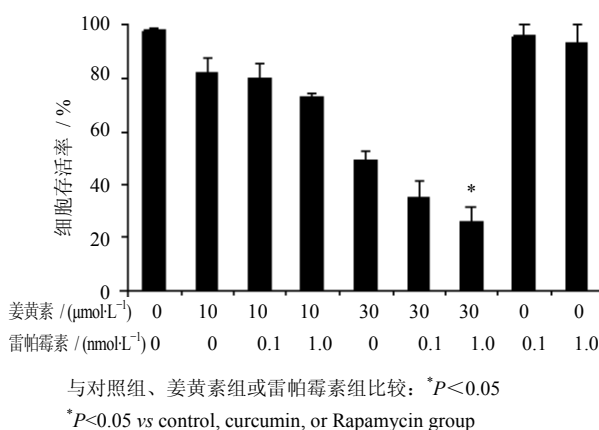


图1 姜黄素与雷帕霉素联合给药对 Pten-CaP8 细胞增殖的影响 ($n=5$)

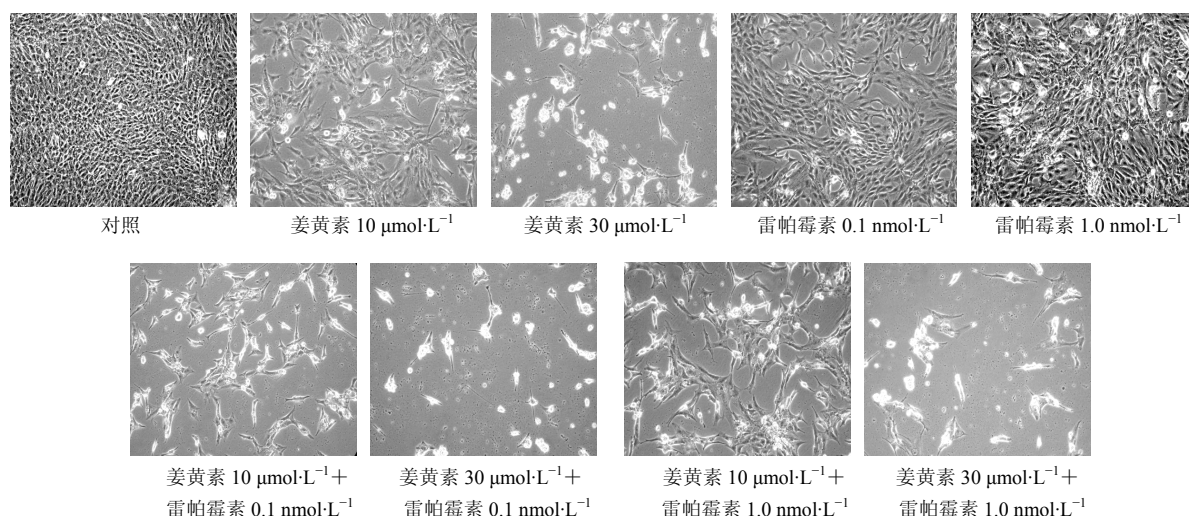
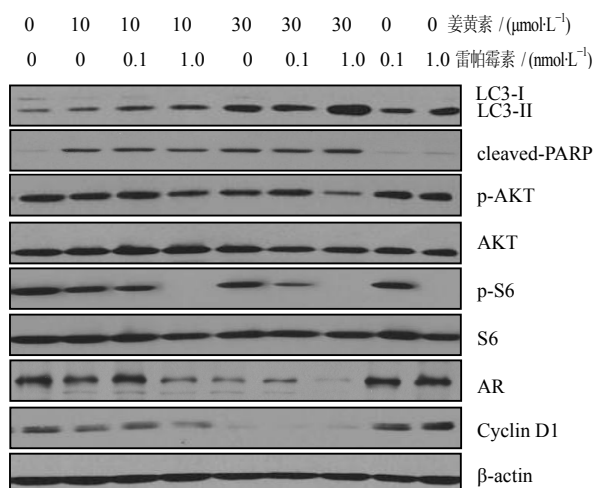
Fig. 1 Effects of curcumin combined with Rapamycin on Pten-CaP8 cell proliferation ($n=5$)

2.2 对细胞形态的影响

对照组 Pten-CaP8 细胞呈长梭形; 雷帕霉素单用组 Pten-CaP8 细胞无明显改变; 姜黄素与雷帕霉素联合给药组均可诱导细胞变短, 甚至呈圆形, 尤其是姜黄素 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 与雷帕霉素 1.0 nmol/L 联合给药组大量细胞质内出现空泡改变。结果见图 2。

2.3 对细胞相关蛋白表达的影响

姜黄素与雷帕霉素联合给药组均可诱导 LC3-II 与 LC3-I 的比值增加和 PARP 的裂解, 还可下调 p-AKT (S473)、p-S6 (S240/244)、AR (N-20) 和 Cyclin D1 蛋白的表达, 尤其是姜黄素 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 与雷帕霉素 1.0 nmol/L 联合给药组的效果与两药单用及对照组比较, 具有显著差异 ($P<0.05$)。结果见图 3。

图 2 姜黄素与雷帕霉素联合给药对 Pten-CaP8 细胞形态的影响 ($n=5$)Fig. 2 Effects of curcumin combined with Rapamycin on Pten-CaP8 cell morphology ($n=5$)图 3 姜黄素与雷帕霉素联合给药对 Pten-CaP8 细胞相关蛋白表达的影响 ($n=5$)Fig. 3 Effects of curcumin combined with Rapamycin on Pten-CaP8 cells related protein expression ($n=5$)

3 讨论

前列腺癌是男性最常见的恶性肿瘤之一，而且是导致西方国家癌症男性患者死亡的第 2 位原因^[10]。CRPC 是在实施消融术后 12~18 个月内演变而成的雄激素非依赖性前列腺癌，两年的致死率极高，已成为提高患者生存率、改善生活质量的主要障碍^[11]。

本实验采用 Pten-CaP8 细胞探讨 CRPC 形成机制和进行药效评价的主要原因有：一是目前常用的细胞株如 LNCaP 和 PC3 带有对激素阻断治疗产生的适应性，不能作为原发性前列腺癌的代表；二是从未经消融治疗的前列腺癌患者中分离细胞株是相当困难的；三是从未经消融治疗的 Pten 基因敲除小

鼠模型中分离的 Pten-CaP8 细胞是研究 CRPC 的理想工具，细胞的锚定非依赖性生长能力增强，在重症联合免疫缺陷小鼠内具有明显的致瘤性，且染色体无明显的结构或数目性变化^[12]。细胞自噬是一种经严格调控的高度进化保守过程，可通过自噬体与溶酶体的融合介导胞浆内成分降解^[13]。目前已发现多种疾病与细胞自噬功能失调密切相关，尤其是肿瘤。虽然自噬具有一定的保护作用，但持续且过度的自噬通路活化可导致“自噬性细胞死亡”^[14]，尤其是当 CRPC 等肿瘤具有凋亡缺陷或凋亡抵抗时，通过自噬途径诱导细胞死亡是一种极具价值的“备用死亡”机制^[15]。

本研究结果表明，单独使用雷帕霉素不能有效地抑制 Pten-CaP8 细胞中 p-Akt 的表达，可能与胰岛素受体底物 1 介导的负性反馈环路相关^[16]。姜黄素与雷帕霉素的联合给药可有效抑制 p-Akt、AR 和 Cyclin D1 等一系列蛋白的表达，以最大限度地发挥 PI3K/Akt 通路抑制剂的抗癌疗效，提示靶向自噬通路极有可能成为治疗 CRPC 有效途径的突破点。

参考文献

- [1] Landis S H, Murray T, Bolden S. Cancer statistics [J]. *Cancer J Clin*, 1999, 45(49): 8-31.
- [2] Tooze S A, Yoshimori T. The origin of autophagosomal membrane [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2): 831-835.
- [3] Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2): 3065-3074.

- [4] 余美荣, 蒋福升, 丁志山, 等. 姜黄素的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 828-831.
- [5] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 18-附 21.
- [6] 王笑晴. 基于 DPPH 自由基清除能力的姜黄提取物抗氧化活性评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 360-363.
- [7] 罗廷顺, 李洪文, 刘正文, 等. 姜黄素的提取分离与药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 102-107.
- [8] Marie-Hélène T. Curcumin—the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment [J]. *Toxins*, 2010, 47(2): 128-162.
- [9] Wang S, Gao J, Lei Q, *et al.* Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(3): 209-221.
- [10] Jemal A, Murray T, Samuels A, *et al.* Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2003, 53(2): 15-26.
- [11] So A, Gleave M, Hurtado-Col A, *et al.* Mechanisms of the development of androgen independence in prostate cancer [J]. *World J Urol*, 2005, 23(7): 1-9.
- [12] Jiao J, Wang S, Qiao R, *et al.* Murine cell lines derived from Pten null prostate cancer show the critical role of PTEN in hormone refractory prostate cancer development [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6083-6091.
- [13] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(8): 453-458.
- [14] Shimizu S. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(3): 1221-1228.
- [15] Yu L. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8 [J]. *Science*, 2004, 304(3): 1500-1502.
- [16] Um S H, Frigerio F, Watanabe M. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity [J]. *Nature*, 2004, 431(2): 200-205.