

姜黄素抑制大鼠 C6 胶质瘤生成及机制初步研究

田 刚¹ 雷 宁² 王晓娟³ 樊明新¹ 陈祖容⁴ 韩瑞军¹ 曾庆乐² 夏永勤¹ 李 华^{1△}

(1.兰州军区乌鲁木齐总医院神经外科 新疆 乌鲁木齐 830000 2.成都理工大学材料与化学化工学院

化工与制药系 四川 成都 610059 3.解放军第 23 医院临床部药械科 新疆 乌鲁木齐 830000

4.福建省莆田市涵江区涵江医院神经外科 福建 莆田 351111)

摘要 目的 观察姜黄素对大鼠 C6 胶质瘤的抑制作用。方法 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、姜黄素高、低剂量组。各组动物于移植术后 7 天给予干预,姜黄素组给予姜黄素灌胃,14 天后处死。分离肿瘤测量其体积,realtime RT-PCR 法和 western blot 法检测肿瘤组织中核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)、EGFR mRNA 和蛋白的表达。结果 姜黄素能明显降低肿瘤体积,降低肿瘤组织中 NF- κ B、EGFR mRNA 和蛋白的表达。结论:姜黄素能抑制大鼠 C6 胶质瘤的生长,其机制可能与抑制 NF- κ B、EGFR 表达有关。

关键词 姜黄素 胶质瘤 NF- κ B EGFR

中图分类号:R739.4 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2012)04-635-03

The Inhibitive effect of Curcumine on Implanted C6 Neurogliocytoma in Rats

TIAN Gang¹, LEI Ning², WANG Xiao-juan³, FAN Ming-xin¹, CHEN Zu-rong⁴, HAN Rui-jun¹, ZENG Qing-le², XIA Yong-qin¹, LI Hua^{1△}

(1.Department of neurosurgery of Urumqi General Hospital in Lanzhou Military Area Command, Urumqi 830000 2. Department of Chemical & Pharmaceutical Engineering, College of Material and Chemistry & Chemical Engineering, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059 3. Department of Clinical Drug and Equipment Section, The 23th hospital of Chinese People's Liberation Army, Urumqi 830000 4. Department of Neurosurgery, The Hanjiang Hospital of Putian City, Putian ,351111)

ABSTRACT Objective: To study the effect of curcumine on implanted neurogliocytoma in rats. Methods: Sprague Dawley rats were divided into normal group, sham operated group and three curcumine groups. Contents of NF- κ B and EGFR protein and mRNA were detected by immunohistochemical and real-time PCR methods, respectively. Results: In curcumine groups, Contents of NF- κ B and EGFR protein and mRNA were decreased markedly. Conclusion: Curcumine could inhibit the implanted neurogliocytoma in rats. This maybe be concerned with that it could inhibit the expression of NF- κ B and EGFR in the implanted neurogliocytoma in rats.

Key words: Curcumine ;Neurogliocytoma; NF- κ B; EGFR

Chinese Library Classification(CLC): R739.4 **Document code**: A

Article ID:1673-6273(2012)04-635-03

脑胶质瘤占脑肿瘤总数的 40%~50%,但目前对其缺乏有效的治疗。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)在恶性胶质瘤中常出现扩增、重排、突变和过表达等情况,借助于信号转导使细胞生长失控和转化^[1,2]。核因子 κ B(NF- κ B)所调控的基因可执行细胞增殖、存活、转移、浸润、新生血管形成等功能,因此 NF- κ B 途径的激活是恶性肿瘤的重要特征^[3,4]。本研究拟制备大鼠 C6 胶质瘤模型,观察 C6 胶质瘤中 NF- κ B、EGFR 的表达以及姜黄素对胶质瘤的抑制作用及对二者表达的影响,为姜黄素的临床合理用药提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 药物

姜黄素购于 Sigma 公司。

作者简介:田刚,男,副主任医师,研究方向:脑胶质瘤,E-mail:tiangang71@163.com

△通讯作者 李华

(收稿日期 2011-04-02 接受日期 2011-04-25)

1.2 试剂和细胞

C6 细胞株购于中科院上海细胞生物学研究所细胞库。第一抗体 anti-EGFR、NF- κ B、GAPDH(santa cruz),第二抗体 anti-Rabbit IgG(北京中杉公司)其它试剂为分析纯。逆转录试剂盒、荧光定量 realtime RT-PCR 试剂盒为 TakaRa 公司产品。

1.3 仪器

紫外分光光度计(上海亚研公司),实时荧光定量基因扩增系统(Bio-Rad 公司),电子分析天平(德国 Sarrorius 公司),凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)。3.0T 核磁共振仪 HDMR(High Definition MR,GE 公司),线圈为 GE 公司生产的小动物专用线圈,增强剂为钆喷酸葡胺(广州康臣药业)。

1.4 动物

雄性 SD 大鼠 40 只购于四川大学实验动物中心,体重 250~300g。

1.5 方法

1.5.1 细胞培养 培养基采用 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液,置入温度 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养。在细胞处于指数生长期时,以胰蛋白酶消化,Hanks 液吹打冲洗,调节细胞浓度

为 $2 \sim 5 \times 10^8$ 个/ml。

1.5.2 颅内接种 将麻醉后的大鼠头部固定在脑立体定向仪上,备皮,碘伏消毒后铺洞巾。取内毗连线与头部正中矢状面交点向后纵向切开头皮约 1cm,分离暴露颅骨。根据 Batker 法确定右尾状核靶点,于冠状缝前 1mm,中线右旁开 3mm,以牙科钻在颅骨上钻孔,孔径约 1.2mm,深达硬脑膜表面而不伤及脑组织。25 μ l 微量注射器抽取 C6 细胞悬液 10 μ l,以 1 μ l/min 速度沿骨孔缓慢匀速注射,对照组注射 10 μ l 生理盐水,注射完毕后留针 5min,缓慢退针,骨孔用医用明胶海绵填充,骨蜡封闭。生理盐水冲洗手术区,无菌丝线缝合切口后消毒皮肤,术后加用青霉素抗感染,消毒后放入 SPF 级环境中继续饲养。每天观察裸鼠的生长状态并记录。

1.5.3 实验分组 将 40 只手术后大鼠随机分为假手术组,模型组,姜黄素低、中、高剂量组共 5 组,每组 8 只。于术后 7 天给予药物治疗,其中假手术组和模型组给予生理盐水灌胃,姜黄素低、中、高剂量组分别给予姜黄素 100、200、400mg/kg 灌胃,每天一次,连续 14 天,期间采用 3.0T 核磁共振仪监测成瘤情况。

1.5.4 RNA 的提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应 取 50~100mg 肿瘤组织,总 RNA 提取及逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量聚合酶链反应参见试剂盒说明书。取 1 μ l cDNA 样本作为 PCR 扩增模板,阴性对照扩增模板为去离子水。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;随后 95 $^{\circ}$ C 30s,退火温度下 30s,72 $^{\circ}$ C 20s,共 40 个循环。采用 "primer premier 5.0" 软件设计引物,EGFR 上游 5' CCAAGACAGGCGACGGGTCA 3',EGFR 下游 5' CGCAGCCAGCAGCAG CAGTA 3',扩增产物长度:195bp,退火温度 50.0 $^{\circ}$ C;NF- κ B 上游 5' GCATTCTGAC-CTTGCTATC 3',NF- κ B 下游 5' TTCCAGTCTCCGA GT-GAAGC 3',扩增产物长度:184bp,退火温度 50.0 $^{\circ}$ C;GAPDH 上游 5' CGGCAAGTTCAACGGCACAG 3',GAPDH 下游 5' CGCCAGTAGACTCCA CGACAT 3',扩增产物长度:143bp,退火温度 50.0 $^{\circ}$ C。引物由上海 invitrogen 公司合成。采用双标准曲线法对待测基因丰度相对定量。

1.5.5 各组动物间肿瘤体积的测定 小心分离肿瘤组织,测量肿瘤最大径和与最大径垂直的最宽径。肿瘤体积 $=a \times b^2/2$,a 为肿瘤最大径,b 为最大径垂直的最宽径。

1.5.6 Western blot 肿瘤组织提取蛋白煮沸价额 ushangyang 缓冲液,80V 电压电泳 3h 后 100v 恒压湿转 45min,转膜结束后脱脂奶粉封闭 30 分钟,根据抗体的稀释比将相应的一抗加入牛奶中,用封膜袋封好后放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。TBST 洗膜,3 遍,每次 10min。然后加入二抗,二抗的稀释比一般为 1:2000,方法和加一抗相同,封好口后放室温 30-40min。TBST 洗膜,3 遍,每次 10min。显影液显影,凝胶成像系统捕获图像。

1.5.7 统计学方法 应用 SPSS 13.0 专业统计学软件对数据进行统计学处理,统计学方法采用卡方检验,当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 肿瘤组织中 EGFR、NF- κ B mRNA 的表达比较

采用 realtime RT-PCR 法检测了假手术组脑组织,模型组、姜黄素低、中、高组肝肿瘤组织中 EGFR、NF- κ B mRNA 的表

达。结果如表 1 所示 相对于假手术组,模型组 EGFR、NF- κ B mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。姜黄素能显著降低肿瘤组织中 EGFR、NF- κ B mRNA 的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 1 肿瘤组织中 EGFR、NF- κ B mRNA 的表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 The expression of EGFR and NF- κ B mRNA in tumor tissue

Group	Dose (mg/kg)	NF- κ B / GAPDH	EGFR / GAPDH
Sham operated	0	0.089 $\pm$ 0.014	0.042 $\pm$ 0.0074
Model	0	0.37 $\pm$ 0.064##	0.25 $\pm$ 0.041##
Curcumine	100	0.29 $\pm$ 0.45*	0.19 $\pm$ 0.032*
Curcumine	200	0.19 $\pm$ 0.035**	0.12 $\pm$ 0.019**
Curcumine	400	0.16 $\pm$ 0.025**	0.10 $\pm$ 0.014**

Note: ## $P < 0.01$ vs sham operated group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

2.2 肿瘤组织中 VEGF 蛋白的表达比较

采用 western blot 法检测了假手术组脑组织,模型组、姜黄素低、中、高组肝肿瘤组织中 EGFR、NF- κ B 蛋白的表达。结果如表 2 所示 相对于假手术组,模型组 EGFR、NF- κ B 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。姜黄素能显著降低肿瘤组织中 EGFR、NF- κ B 蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

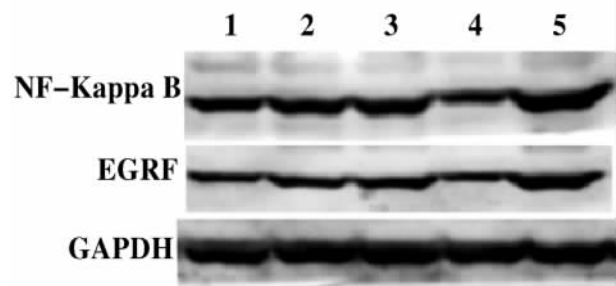


图 1 1 为高剂量组,2 为中剂量组,3 为低剂量组,4 为假手术组,5 为模型组。

Fig. 1 1: curcumine group (100mg/kg) 2: curcumine group (200mg/kg) 3: curcumine group (400mg/kg) 4: sham operated group 5: model group

表 2 肿瘤组织中 EGFR、NF- κ B 蛋白的表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 2 The expression of EGFR and NF- κ B in tumor tissue

Group	Dose (mg/kg)	NF- κ B / GAPDH	EGFR / GAPDH
Sham operated	0	0.12 $\pm$ 0.018	0.085 $\pm$ 0.016
Model	0	1.21 $\pm$ 0.19##	0.91 $\pm$ 0.17##
Curcumine	100	0.49 $\pm$ 0.095**	0.68 $\pm$ 0.12*
Curcumine	200	0.56 $\pm$ 0.12**	0.49 $\pm$ 0.091**
Curcumine	400	0.67 $\pm$ 0.11**	0.43 $\pm$ 0.083**

Note:## $P < 0.01$ vs sham operated group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

2.3 肿瘤大小比较

本实验测量了荷瘤 SD 大鼠肿瘤大小,结果如表 3 所示:姜黄素能显著抑制肿瘤生长,其中低剂量组抑制了 22.92% ($P < 0.05$),中剂量组抑制了 37.5% ($P < 0.01$),高剂量组抑制了

表 3 肿瘤大小比较 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Tab. 3 Gross tumor volume

Group	Dose (mg/kg)	Gross tumor volume (cm ³)
Sham operated	0	0
Model	0	0.48± 0.053##
Curcumine	100	0.37± 0.055*
Curcumine	200	0.30± 0.042**
Curcumine	400	0.27± 0.039**

Note: ## P<0.01 vs sham operated group ; * P<0.05, ** P<0.01 vs model group

44.53% (P<0.01)。

3 讨论

姜黄素是从姜科植物姜黄根茎中提取的一种酚类色素,具有多方面的药理作用^[5],包括抗增殖及诱导肿瘤细胞凋亡的作用,具有抗癌谱广、不良反应小的优点,被专家们认为是一种潜在的第三代抗肿瘤药,已成为目前研究的焦点。

本研究制备了 C6 胶质瘤动物模型,发现在胶质瘤中 NF- κ B、EGFR 的表达明显高于假手术组,说明在胶质瘤中,二者的表达显著升高。表皮生长因子受体 (EGFR) 是原癌基因 *cerbB1* (HER1) 的表达产物,在许多恶性肿瘤中过表达^[6]。表皮生长因子受体 (EGFR) 信号转导通路在细胞的生长、增殖和分化中起着重要的作用,与绝大多数肿瘤的发生和发展密切相关。该通路的失调可能产生细胞的无限繁殖而导致肿瘤的发生^[7]。通过干预 EGFR 受体酪氨酸激酶信号转导进行肿瘤治疗,已成为近年来肿瘤治疗研究和抗肿瘤药物筛选的一个新的靶点和热点^[8]。NF- κ B 作为可诱导并普遍存在的转录因子,对众多基因发挥中心性转录调节作用,从而在免疫、炎症、细胞的生存、增殖分化和凋亡等方面起到广泛而重要的作用^[9]。多数恶性程度较高的癌细胞系都有比较高的 NF- κ B 水平,如甲状腺癌、多发骨髓瘤、淋巴瘤、结肠癌等。研究发现,NF- κ B 可通过诱导细胞周期蛋白 D1、依赖细胞周期蛋白的蛋白激酶等来调控细胞周期,通过诱导基质金属蛋白酶等而促进肿瘤组织的浸润和转移,很多细胞因子和黏附因子的表达也受 NF- κ B 调控^[10],NF- κ B 还能干扰 P53 调节损伤细胞诱导凋亡的功能^[11]。此外,NF- κ B 还是癌细胞化疗耐药和外放疗耐受的重要机制,联合 NF- κ B 抑制剂可明显增加化疗和放疗敏感性^[12]。

姜黄素的抗肿瘤作用日益受到重视,有关其抗肿瘤的药理作用机制研究较多,但其在胶质瘤中对 NF- κ B、EGFR 的表达调控尚未见报道,本研究研究发现,其对大鼠胶质瘤中 NF- κ B、EGFR 的表达有明显调控作用,可显著降低二者的表达,

其抑制大鼠胶质瘤的生长可能与其抑制 NF- κ B、EGFR 的表达有关。

参考文献 (References)

- [1] Canon J, Bryant R, Roudier M, et al. Inhibition of RANKL increases the anti-tumor effect of the EGFR inhibitor panitumumab in a murine model of bone metastasis[J]. Bone, 2010, 46(6): 1613-1619
- [2] Kareem H, Sandstrom K, Elia R, et al. Blocking EGFR in the liver improves the tumor-to-liver uptake ratio of radiolabeled EGF [J]. Tumour-Biol, 2010, 31(2): 79-87
- [3] Gallardo Perez JC, Espinosa M, Ceballos Cancino G, et al. NF-kappa B is required for the development of tumor spheroids [J]. J Cell Biochem, 2009, 108(1): 169-180
- [4] Chen F, Beezhold K, Castranova V, et al. Tumor promoting or tumor suppressing of NF-kappa B, a matter of cell context dependency[J]. Int Rev Immunol, 2008, 27(4): 183-204
- [5] 张立, 张淑芳, 邹维. 姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡机制研究进展[J]. 吉林医学, 2010, 31(13): 1909-1910.
Zhang Li, Zhang Shu-fang, Zou Wei. Research Advances on Curcumin-induced Apoptosis in Tumor Cells [J]. Jilin Medical Journal, 2010, 31(13): 1909-1910.
- [6] Mogk U, Goekkurt E, Stoehlmacher J, et al. The EGFR pathway as an example for genotype: phenotype correlation in tumor genes [J]. Methods Mol Biol, 2010, 576: 341-350
- [7] Bhuvaneswari R, Gan YY, Soo KC, et al. Targeting EGFR with photodynamic therapy in combination with Erbitux enhances in vivo bladder tumor response[J]. Mol Cancer, 2009, 8: 94
- [8] Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, et al. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development[J]. Cell, 2010, 140(2): 268-279
- [9] Robinson CM, Hale PT, Carlin JM, et al. NF-kappa B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha[J]. Cytokine, 2006, 35(1-2): 53-61
- [10] Laskov R, Berger N, Horwitz MS, et al. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and CD40L on NF-kappa B inhibitory proteins I kappa B alpha, beta and epsilon and on the induction of the Jun amino-terminal kinase pathway in Ramos Burkitt lymphoma cells[J]. Eur Cytokine Netw, 2005, 16(4): 267-276
- [11] Mathieu J, Besancon F. Clinically tolerable concentrations of arsenic trioxide induce p53-independent cell death and repress NF-kappa B activation in Ewing sarcoma cells [J]. Int J Cancer, 2006, 119(7): 1723-1727
- [12] Armstrong MB, Bian X, Liu Y, et al. Signaling from p53 to NF-kappa B determines the chemotherapy responsiveness of neuroblastoma[J]. Neoplasia, 2006, 8(11): 964-974