

姜黄素对膀胱癌细胞的 p300 表达的影响

方武,李文威,高淑华,邓和鸣,李香普

The Effect of Curcumin on Expression of p300 in the Bladder Cancer T24 Cell

FANG Wu, LI Wen-wei, GAO Shu-hua, DENG He-ming, LI Xiang-pu

Department of Urology, First Hospital of Huangshi City, Huangshi 435001, China

Abstract :Objective To investigate the effect of curcumin on express of regulation p300 and mechanism of anticancer in vitro. **Methods** The bladder T24 cell was treated with curcumin in different concentration. The cell growth inhibition was determined with MTT, the level of p300, c-fos, c-jun mRNA were assayed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), and the expression of acetyl histone H3 and H4, p300, c-fos, c-jun protein were evaluated by western blot. **Results** Curcumin could significantly inhibit proliferation of T24 cell in a dose and time-dependent manner. The expression of p300, c-fos, c-jun mRNA and protein was totally decreased with increasing concentrations of curcumin. Curcumin can inhibit the expression of acetyl histone H3 and H4 protein in a dose-dependent manner. **Conclusion** Curcumin can inhibit the expression of p300, which may be its molecular mechanism of anticancer.

Key words: Curcumin; p300; c-fos; c-jun

摘要:目的 了解姜黄素对 p300 表达的影响,探讨其抗膀胱癌的机制。方法 用不同浓度的姜黄素作用膀胱癌细胞 T24, MTT 法检测细胞增殖抑制率, RT-PCR 法检测 p300、c-fos、c-jun 的 mRNA 表达, 蛋白免疫印迹法检测乙酰化组蛋白 H3、H4、c-fos、c-jun、p300 蛋白表达。结果 姜黄素能抑制 T24 细胞增殖,且具有量效关系和时效关系。姜黄素能抑制 p300、c-fos、c-jun mRNA 和蛋白的表达,抑制组蛋白 H3、H4 的乙酰化,也具有量效关系。结论 姜黄素可以抑制 p300 的表达,此可能是姜黄素抗膀胱癌的机制之一。

关键词:姜黄素; p300; c-fos; c-jun

中图分类号:R737.14 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)02-0132-03

0 引言

姜黄素(Curcumin)是从植物姜黄中提取出来的一种酚类色素,具有抗癌作用。姜黄素可以通过多条途径发挥抗癌作用,如下调癌基因的表达,上调抑癌基因的表达,但是其具体机制还不清楚。p300 蛋白具有调节基因表达和细胞增殖的作用。Karanam B 等^[1]报道姜黄素可以抑制 p300/CBP 的表达和活性,调节基因的表达,目前国内尚未见姜黄素对膀胱癌 p300 影响的报道。因此,本实验试图研究姜黄素对膀胱癌细胞 T24 的 p300 表达的影响,及其对乙酰化组蛋白 H3、H4、原癌基因 c-fos、c-jun 的表达影响,从组蛋白乙酰化与基因的表达和调控的角度初步探讨姜黄素抗膀胱癌的机制。

1 材料与方法

1.1 药物 姜黄素(Sigma 公司产品)用 DMSO 稀释成 $1 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$ 置于 -20°C 保存,临用前解冻,

处理细胞时加入到 10% FBS 的 DMEM 培养液中。

1.2 细胞培养及处理 人膀胱癌细胞系 T24,移行细胞癌,购自上海细胞所;用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,在 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度下培养,48h 换液一次。取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT 比色实验 1×10^4 细胞接种于 96 孔培养板中,培养 24h 后,按实验要求分别在 T24 细胞中加入终浓度为 0、15、30、45 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素, 0 $\mu\text{mol/L}$ 即为对照组,每组 3 复孔。分别培养 12、24、48、72h 后,应用 ELX 800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),进行 MTT 检测,波长为 560 nm,根据 MTT 的吸光度(A)值,计算出 MTT 细胞增殖抑制率:

增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$

1.4 RT-PCR 法检测 p300、c-fos、c-jun 的 mRNA 的表达 用 RNA 提取试剂盒、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒(上海生工)提取 RNA 和反转录为 cDNA,再经 PCR 扩增,进行琼脂糖凝胶电泳,结果用 AlphaImager3400 型凝胶图像分析仪(美国 Alpha Innotech 公司产品)照相并分析。具体操作步骤按试剂盒说明书进行。每个实验重复 3 次。引物序列及反应条件,见表 1。

收稿日期:2006-01-27;修回日期:2006-07-27

作者单位:435001 湖北省黄石市第一医院泌尿外科

作者简介:方武(1973-),男,硕士,主治医师,主要从事泌尿外科研究

表 1 各反应引物的序列和反应条件

| Gene | Upstream (5'→3') | Downstream (3'→5') | Reaction condition | Product size |
|--------|--------------------------------|--------------------------------|--|--------------|
| p300 | CTC TCG GCG TCC GCC AGC GAT | GAG CCC TGC TGA AGA GGC TCA | 94 5m, 94 30s; 58 40s, 72 50s, 30cycle; 72 10m | 613bp |
| c-fos | TGC TGA AGG AGA AGG AAA AA | TGC ATA GAA GGA CCC AGA TA | 94 5m, 94 1m, 56 30s, 72 1m, 35cycle; 72 10m | 344bp |
| c-jun | CAA CAT GCT CAG GGA ACA GG | GGT CCA TGC AGT TCT TGG TC | 94 5m, 95 30s, 55 30s 72 60s; 30cycle; 72 5m | 290bp |
| -actin | GGC ATG GGT CAG AAG GAT TCC | ATG TCA CGC ACG ATT TCC CGC | 94 5m; 95 40s, 56 35s, 72 30s, 36 cycle; 72 8m | 500bp |

1.5 免疫印迹法检测乙酰化组蛋白 H3、H4、p300、c-fos、c-jun 的表达 按实验分组要求收集细胞,加入三去污裂解液进行细胞裂解,于 4 离心 10min,弃除沉淀,BCA 法进行蛋白定量,取 50μg 蛋白加入 4 ×SDS 凝胶加样缓冲液中,100 加热 10min 以使蛋白质变性。用 6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转 PVDF 膜,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白分子量标准位置。5%脱脂牛奶封闭 2h 按 1:200 加入羊抗人乙酰化组蛋白 H3 (Lys9)、H4 (Lys8) 抗体(基因公司)、羊抗人 p300 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),-actin 抗体(Santa Cruz 公司),c-fos 和 c-jun 鼠抗人单克隆抗体(北京中山生物技术公司),室温孵育 2h, TBST 洗 3 次,1:2000 加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊、兔抗鼠二抗,室温孵育 1h, TBST 洗 3 次,用 Western blot 印迹荧光检测试剂盒显示于 X 线片。用 AlphaImager3400 型凝胶图像分析仪(美国 Alpha Innotech 公司)对胶片扫描和分析。每个实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$, 采用 SSPS10.0 进行单向方差分析,组间比较 *t* 检验。

2 结果

2.1 姜黄素对 T24 细胞增殖的影响 不同浓度的姜黄素分别作用 T24 细胞 12、24、48、72h, 均能抑制细胞增殖。且具有量效关系和时效关系。与对照组比较 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 不同浓度的姜黄素作用 T24 细胞 12h 的 p300、c-fos、c-jun 的 mRNA 的表达 15、30、45 μmol/L

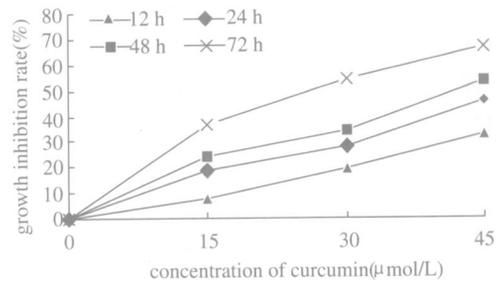


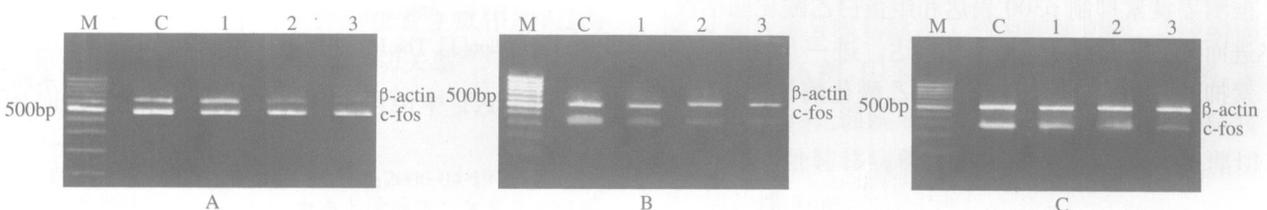
图 1 姜黄素在体外对 T24 细胞的增值抑制作用

姜黄素作用 T24 细胞 12h 后, p300、c-fos、c-jun 的 mRNA 表达明显受到抑制。各组与对照组相比都有显著差异, $P < 0.05$ 。姜黄素对 p300、c-fos、c-jun 的 mRNA 的抑制作用具有浓度依赖性, 见图 2。

2.3 姜黄素对 p300、乙酰化组蛋白 H3、H4、p300、c-fos、c-jun 的蛋白表达的影响 15、30、45 μmol/L 的姜黄素分别作用 T24 细胞 24h 后, 呈浓度依赖性的抑制 p300、乙酰化组蛋白 H3 和 H4、c-fos、c-jun 的蛋白的表达, 与对照组比都有显著差异, $P < 0.05$, 见图 3。

3 讨论

姜黄素的抗癌作用近来受到重视, 资料显示, 姜黄素能抑制实验动物乳腺癌、皮肤癌^[2]的发生, 显著减少肿瘤数目, 缩小瘤体大小。姜黄素可显著降低小鼠膀胱移植癌的成瘤率^[3]。而且姜黄素的毒副作用很小, 是一种有广泛应用前景的抗癌新药。本实验结果表明姜黄素具有浓度依赖性和时间依赖性抑制 T24 细胞增殖的作用。文献报道, 姜黄素可以调



M:Mark; C:对照组; 1、2、3 分别表示 15、30、45 μmol/L 姜黄素组

图 2 RT-PCR 检测不同浓度姜黄素作用 12h 对 p300、c-fos、c-jun 的 mRNA 表达的影响

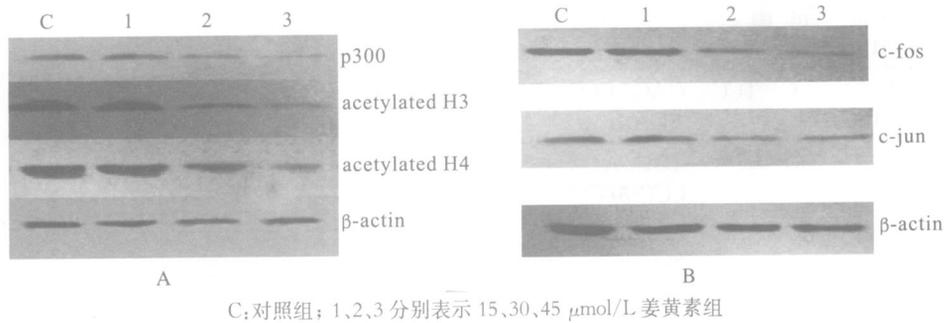


图3 免疫印迹法检测姜黄素对 p300、乙酰化 H3 和 H4、c-fos、c-jun 蛋白表达的影响

控原癌基因和抑癌基因的表达发挥抗癌作用,如下调 NF- κ B、c-myc、c-ras^[4]的表达,上调 p53、bax^[5]表达,但其机制不清楚。Karanam 等^[1]发现姜黄素能抑制 p300/CBP 的表达,同时抑制其组蛋白乙酰化酶活性,从而调节基因的表达。提示 p300/CBP 可能是姜黄素发挥抗癌作用的靶点之一。

哺乳动物 p300 蛋白是一种转录共激活因子,调控基因表达和信号传递,具有调节细胞增殖、分化和凋亡的作用。其机制可能是 p300 蛋白具有组蛋白乙酰化酶的活性,通过乙酰化组蛋白使染色体呈开放状态,基因的启动子暴露,便于基因的转录^[6]。p300 不仅能使组蛋白乙酰化,而且也可以使非组蛋白乙酰化,如 p53、E2F-1、E2F-2、E2F-3、MYB 等,调节其活性。p300 还可以作为支架,将转录活性因子连接到转录装置上,形成转录复合物,调节基因的转录。p300 可能是肿瘤和 HIV 的基因治疗中的一个重要的靶点。本实验表明 15、30、45 μ mol/L 姜黄素能抑制 T24 细胞的 p300 mRNA 和蛋白的表达,且具有浓度依赖性,同时下调组蛋白 H3、H4 的乙酰化。

肿瘤的发生与癌基因的活化和抑癌基因的失活密切相关。c-fos 和 c-jun 是核内癌基因,属于即刻早期基因,其蛋白形成 c-fos / c-jun (AP-1) 或 c-jun / c-jun 二聚体,启动一系列信号转导通路,使细胞增殖。c-fos 和 c-jun 基因的转录活化需要组蛋白 H3 的乙酰化^[7]。本实验显示,姜黄素可以抑制 c-fos 和 c-jun 在 mRNA 和蛋白水平表达,并与其下调 p300 的表达和组蛋白 H3 的乙酰化作用一致。推测姜黄素抑制 p300 表达和组蛋白乙酰化酶活性,进而抑制 c-fos 和 c-jun 的表达。进一步研究姜黄素抑制 p300 的表达和组蛋白乙酰化酶活性的作用

对于研究姜黄素的抗癌作用有重要意义。

组蛋白的乙酰化和去乙酰化是一个动态的可逆过程,组蛋白乙酰转移酶(HAT)和组蛋白去乙酰化酶(HADC)催化并调控这一过程。目前发现的真核转录相关 HAT 有 Gcn5、p300/CBP、TAF 250、MYST、PCAF 等,姜黄素对 H3、H4 乙酰化的抑制作用是否还和 Gcn5、TAF 250、MYST、PCAF 有关值得研究。另外,姜黄素对 c-ras、bax 等基因的调节是否和其抑制 p300 的途径有关,也有待研究。

参考文献:

- [1] Karanam B, Radhika A. V, Mohammed A, et al. Curcumin, a Novel p300/CREB-binding Protein-specific Inhibitor of Acetyltransferase, Represses the Acetylation of Histone/Nonhistone Proteins and Histone Acetyltransferase-dependent Chromatin Transcription [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(12):51163-51171.
- [2] Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong, et al. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice [J]. *Cancer Lett*, 1997, 116(2):197-203.
- [3] Sindhvani P, Hampton J A, Baig M M, et al. Curcumin prevents intravesical tumor implantation of the MBT-2 tumor cell line in C3H mice [J]. *J Urol*, 2001, 166(4):1498-1501.
- [4] Limtrakul P P, Anuchapreeda S, Lipigorngoson S, et al. Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos proto-oncogenes expression by dietary curcumin [J]. *BMC Cancer*, 2001, 1(1):1.
- [5] Choudhuri T, Pal S, Agwarwal M L, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction [J]. *FEBS Lett*, 2002, 512(1-3):334.
- [6] Demarest SJ, Martinez Yamout M, Chungk, et al. Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators [J]. *Nature*, 2002, 41(5):549-553.
- [7] Alison L, Clayton, Sally Rose, et al. Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation [J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(14):3714-3726.

[编辑:周永红]