

· 研究论文 ·

姜黄素逆转胃癌细胞赫赛汀耐药机制研究

刘文虎^{1,2#}, 袁江北^{3#}, 杨 兰¹, 常晋霞^{2*}

(川北医学院 1. 药学院, 2. 基础医学院基础医学创新平台, 四川 南充 637100; 3. 重庆大学药学院, 重庆 401331)

摘要: 探讨胃癌细胞 NCI N87 赫赛汀耐药及姜黄素逆转耐药的可能机制。采用 Western blot 检测姜黄素对耐药细胞 IκBα、NF-κBp65、HER-2、caspase-3、Bcl-2 及 Bax 表达的影响; Annexin V-FITC/PI 评价姜黄素对耐药细胞凋亡的影响; 试剂盒检测姜黄素对 caspase-3、8、9 活性的影响。结果显示, NCI N87/R 细胞 IκBα 在胞浆中低表达、NF-κBp65 在核内高表达, NF-κB 通路抑制剂 EVP4593 偏好性抑制 NCI N87/R 细胞增殖, 提示耐药细胞 NF-κB 通路被激活。姜黄素能够降低 NCI N87/R 细胞活力, 抑制 NF-κB 通路, 下调 HER-2、Bcl-2 表达, 上调 Bax 表达, 增加 caspase-3、8、9 活性。表明 NF-κB 通路激活与 NCI N87 赫赛汀耐药有关。姜黄素能够逆转 NCI N87 细胞赫赛汀耐药, 其机制可能与抑制 NF-κB 信号通路、诱导细胞凋亡有关。

关键词: 姜黄素; 胃癌; 赫赛汀耐药; NF-κB 信号通路; 细胞凋亡

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 11-1817-08

Mechanisms of curcumin to reverse herceptin resistance in gastric cancer cells

LIU Wen-hu^{1,2#}, YUAN Jiang-bei^{3#}, YANG Lan¹, CHANG Jin-xia^{2*}

(1. School of Pharmacy, 2. Innovative Platform of Basic Medical Sciences, School of Basic Medical Sciences, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China;

3. School of Pharmaceutical Sciences, Chongqing University, Chongqing 401331, China)

Abstract: This study is aimed to investigate the potential mechanisms of herceptin-acquired resistance and curcumin to reverse resistance in NCI N87/R gastric cancer cells. Western blot was used to evaluate the effect of curcumin on the expression of IκBα, NF-κBp65, HER-2, caspase-3, Bcl-2 and Bax in herceptin resistant cells; Annexin V-FITC/PI was exploited to analyze the effect of curcumin on cell apoptosis; Caspase kit was used to evaluate the effect of curcumin on the enzymatic activity of caspase-3, 8 and 9. The results showed a low expression of IκBα in the cytoplasm and a high expression of NF-κBp65 in the nucleus of NCI N87/R cells. Correspondingly, inhibition of NF-κB pathway by EVP4593, a specific NF-κB inhibitor, preferentially reduced cell viability of NCI N87/R cells, indicating the activation of NF-κB pathway in NCI N87/R cells. Curcumin preferentially reduced cell proliferation and inhibited NF-κB signaling pathway of NCI N87/R cells, downregulated the expression of HER-2 and Bcl-2, upregulated the expression of Bax, increased the activity of caspase-3, 8 and 9. Taken together, our study demonstrates the correlation between herceptin resistance acquisition of NCI N87 cells and the activation of NF-κB pathway. Moreover, curcumin reverses herceptin resistance of NCI N87 cells possibly by inhibiting NF-κB pathway and inducing cell apoptosis.

收稿日期: 2018-07-16; 修回日期: 2018-08-06.

基金项目: 博士科研项目 (CBY17-QD05); 四川省教育厅项目 (17ZB0170).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-817-3352013, E-mail: jinxiachang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0651

Key words: curcumin; gastric cancer; trastuzumab resistance; NF- κ B signaling pathway; apoptosis

胃癌是严重威胁人类健康的消化系统恶性肿瘤,其发病率、死亡率在所有癌症中位居前列。据统计,约 20% 胃癌患者存在受体酪氨酸蛋白激酶 erbB-2 (receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, ErbB2) 基因扩增和 (或) 人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2) 的过度表达^[1]。HER-2 过表达易自发形成同源或异源二聚体,引发胞内激酶区活化,诱发受体自身或交互磷酸化,引起下游 PI3K/AKT 信号通路激活,参与细胞周期的调控^[2,3]。多项研究显示,HER-2 过表达与胃癌增殖、侵袭、转移、耐药及预后不良密切相关^[4,5]。因此,HER-2 已成为胃癌治疗的重要治疗靶标。

赫赛汀 (注射用曲妥珠单抗) 是特异性靶向 HER-2 的单克隆抗体药物,通过拮抗 HER-2 信号转导及抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 发挥抗肿瘤作用。该药于 1998 年首次批准用于 HER-2 过表达 (IHC3⁺ 或 IHC2⁺/FISH⁺) 转移性乳腺癌的二线治疗,2010 年又获批用于 HER-2 过表达转移性胃癌或胃食管交界癌的治疗。尽管赫赛汀抗癌机制明确,疗效可靠,然而随之而来的肿瘤耐药问题,已成为制约其临床有效治疗的科学问题。因此,明确其耐药机制及开展逆转耐药研究已成为当务之急。对乳腺癌研究发现,联合小分子药物来那替尼 (neratinib)、抗体类药物 (帕妥珠单抗) 能够有效延迟或逆转赫赛汀耐药^[6,7],然而由于小分子药物毒副作用大、抗体类药物价格昂贵,导致其临床使用受限,且乳腺癌赫赛汀联合用药方案是否适用于胃癌赫赛汀耐药的治疗,尚无明确定论。由于赫赛汀用于胃癌治疗时间尚短,胃癌赫赛汀耐药机制及其逆转耐药研究尚未广泛开展,因此,研究胃癌赫赛汀耐药及其逆转策略具有重要理论及现实意义。

姜黄素 (curcumin) 是从姜黄、郁金等植物的根茎中提取得到的多酚类化合物。现代药理证实,姜黄素具有抗癌、抗病毒、抗菌及促进伤口愈合等作用^[8-10]。多项研究显示,姜黄素能够逆转多种肿瘤细胞耐药,包括通过抑制 NF- κ B 通路逆转胃癌 5-氟尿嘧啶耐药^[11];通过调节 CXCR4 趋化因子/NF- κ B 通路逆转直肠癌奥沙利铂耐药^[12];调节上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 逆转结肠癌伊立替康耐药^[13];抑制 NF- κ B 通路下调 Lin28 逆转人肝癌细胞

紫杉醇耐药^[14]。亦有文献^[15]证实,姜黄素通过下调人急性粒细胞白血病细胞耐药基因 MDR1、LRP、ABCG2/BCRP、P-gp 及 MRP-1 的表达逆转肿瘤多药耐药。然而姜黄素可否逆转胃癌细胞赫赛汀耐药,尚未见文献报道。

肿瘤获得性耐药是一个及其复杂的过程,需要启动一系列生物学事件,包括信号通路的活化和生存信号的转变,以及某些调控基因和 (或) 蛋白的异常表达。前期研究表明, mTOR、MAPK/ERK、Wnt/ β -catenin、NF- κ B、IL-2 等多条信号通路在 NCI N87/R 细胞中呈现异常变化 ($P < 0.001$),且已证实 mTOR、MAPK/ERK 和 Wnt/ β -catenin 信号激活与赫赛汀耐药有关^[16-18]。虽然 NF- κ B 信号在赫赛汀耐药细胞中异常改变,但这种变化是否对其耐药具有贡献,尚不明确。本实验以前期研究为基础,以胃癌赫赛汀敏感细胞 NCI N87 和耐药细胞 NCI N87/R 为对象,探究 NF- κ B 通路改变与其耐药的关系,在此基础上初步阐释姜黄素逆转耐药的效果及可能机制。

材料与方法

细胞株及细胞培养 NCI N87 和 NCI N87/R 细胞由军事医学科学院第四研究室施明研究员惠赠。NCI N87/R 细胞的耐药属性在前期研究中已证实^[16-18]。NCI N87 和 NCI N87/R 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养,根据细胞生长状态换液、清洗和传代。为了保持 NCI N87/R 细胞的耐药属性,其培养液中需加入终质量浓度为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 赫赛汀。

药品及主要试剂 赫赛汀 (罗氏制药公司); 胰酶、胎牛血清 (Gibco 公司); DMEM 培养基 (BioInd 公司); 牛血清白蛋白、双抗、caspase-3、8、9 试剂盒 (编号分别为 C1115、C1151 和 C1157)、RIPA 裂解液 (P0013B) (碧云天生物技术公司); CCK-8 试剂盒 (同仁化学研究所); EVP4593 (MedChemExpress 公司, HY-13812)。姜黄素 (国家药品标准物质, LD-1109680, 使用前用 DMSO 配成母液, -20 °C 保存)。所用抗体: I κ B α (sc-203)、NF- κ Bp65 (sc-109)、NF- κ B (sc-109)、Bax (sc-4239)、Alexa Fluor[®] 488 二抗 (sc-3895) (Santa Cruz 公司); HER-2 (Abcam 公司, 16901); caspase-3 (9662)、Bcl-2 (2872)、 β -actin (12620) (Cell Signaling 公司); HRP 标记二抗 (中杉金桥生物技术

有限公司, ZB-2301, ZB-7074)。Bradford 蛋白定量试剂盒及高灵敏化学发光检测试剂(天根生物科技有限公司)。DMSO (Sigma 公司, D2650), Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(上海前生生物科技有限公司, 40302ES60)。

主要仪器 超净工作台、细胞培养箱、超低温离心机、酶标仪 (Thermo 公司); 荧光倒置显微镜 (Leica 公司, DMi8); 倒置显微镜 (Olympus 公司); 垂直电泳仪 (Bio-Rad); 制冰机 (雪花)、优普超纯水制造系统。

CCK-8 检测细胞活力 取对数期生长的 NCI N87 和 NCI N87/R 细胞, 吹打制备单细胞悬液, 按照 5×10^3 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中。培养过夜, 每孔加入新鲜完全培养液 100 μL 。实验设空白组、对照组 (DMSO)、赫赛汀组、姜黄素组、赫赛汀+姜黄素组, 每组设定 3 个复孔。细胞培养 72 h 后弃去培养液, 每孔加入 10% CCK-8 的无血清培养液 100 μL , 避光孵育 3 h, 酶标仪检测 450 nm 吸光度值 (A), 计算细胞活力。细胞活力 (%) = $(A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

Western blot 检测相关蛋白的表达 待细胞融合度达 80% 时, 收割细胞, 细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次, 加入 4 倍体积细胞沉淀的 RIPA 裂解液和 1% 蛋白酶抑制剂, 振荡混匀, 冰上裂解 5 min, 12 000 $\times g$ 离心 15 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 取上清, Bradford 法测蛋白浓度。取等量蛋白 (20~30 μg), 每个样品加入上样缓冲液 10 μL , 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min, 上样, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入相应抗体 (I κ B α 、NF- κ Bp65、NF- κ B、HER-2、caspase-3、Bax、Bcl-2、 β -actin, 按照商家推荐倍数稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBS-T 漂洗 5 次, 每次 5 min, 加入相应二抗 (稀释倍数 1:3 000~1:5 000), 室温孵育 0.5 h, TBS-T 漂洗 5 次, 每次 5 min, 加入化学发光检测试剂, 暗室曝光, 冲洗胶片, 扫描图像, Image J 进行灰度值分析。

免疫荧光染色 单细胞悬液分别种植于 12 孔板中, 含细胞数为 1×10^4 个/孔。待细胞融合至 30%~40% 时, PBS 浸洗细胞 3 次, 每次 3 min, 10% 甲醛固定细胞 20 min, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min, 0.5% Triton X-100 透化 20 min, PBS 清洗 3 次, 每次 3 min。用无菌棉球吸干 PBS, 加入 5% BSA, 室温封闭 1 h, 加入抗体 NF- κ Bp65 (稀释倍数 1:100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS-T 浸洗细胞 3 次, 每次 3 min, 加入 Alexa Fluor[®] 488 二抗 (稀释倍数 1:500), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, PBS-T 漂洗细胞 3 次, 每次 3 min, 加入 DAPI (1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 避光孵育 2 min, PBS-T 清洗 4 次, 每次 3 min, 加入

PBS, 荧光显微镜观察图像并拍照。

平板集落形成实验 对数期生长的 NCI N87 和 NCI N87/R 细胞分别接种于 6 孔板中, 按实验方法分为对照组和药物组 (赫赛汀组、姜黄素组、赫赛汀+姜黄素组), 用不同浓度药物分别处理细胞 48 h 后, 终止培养。重悬细胞后计数, 取对照组和药物处理组细胞, 按照 5×10^3 个/孔接种于 12 孔板中, 每组设定 3 个重复, 加入新鲜完全培养液, 培养细胞 14 天。胰酶消化, 终止培养, 弃去上清, PBS 清洗细胞 2 次。10% 甲醛常温固定 20 min, 结晶紫染色 10 min, PBS 漂洗染液, 自然风干, 倒置显微镜拍照并计数分析。

细胞凋亡检测 取对数期生长的 NCI N87 和 NCI N87/R 细胞, 分别接种于 96 孔板中, 每孔含细胞数约为 5×10^3 个, 细胞培养 24 h。按上述方法分组, 每组设定 3 个复孔, 加入相应药物 (对照组加入 DMSO), 继续培养 24 h, 收集细胞, PBS 清洗 2 次, 重悬制成单细胞悬液, 加入 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Annexin V-FITC 和 PI 试剂各 5 μL , 常规培养 1 h, 流式细胞术检测每组中细胞凋亡。

Caspase 相关酶活性检测 按照上述方法分组, 每组设定 3 个复孔。依据试剂盒使用说明检测 caspase-3、8 和 9 活性, 酶标仪检测每孔 405 nm 处的吸光度值, 计算酶活性变化。

统计学方法 数据分析采用 SPSS21.0 软件进行分析, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 多组均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义, $P < 0.001$ 为差异极具显著统计学意义。

结果

1 NCI N87/R 细胞 NF- κ B 信号通路呈激活状态

为了进一步证实 NCI N87 细胞赫赛汀耐药与 NF- κ B 通路激活有关, 采用 Western blot 检测了 NF- κ B 通路标志性蛋白 I κ B α 及核转录因子 NF- κ Bp65 在细胞质和细胞核中的表达。结果显示, I κ B α 在 NCI N87/R 细胞质下调 (图 1A), NF- κ Bp65 在核内上调 (图 1B), 胞浆中 NF- κ Bp65 的表达差异无统计学意义 (图 1C)。免疫荧光实验表明, 敏感细胞 NF- κ Bp65 偶联的绿色荧光弥散分布在胞浆, 而耐药细胞中荧光向核内集聚 (图 1D), 提示耐药细胞 NF- κ Bp65 发生了核易位。进一步采用 NF- κ B 通路特异性抑制剂 EVP4593 共培养敏感和耐药细胞各 72 h, 发现 EVP4593 能够剂量依赖性抑制细胞增殖, 且对耐药细胞表现为偏好性

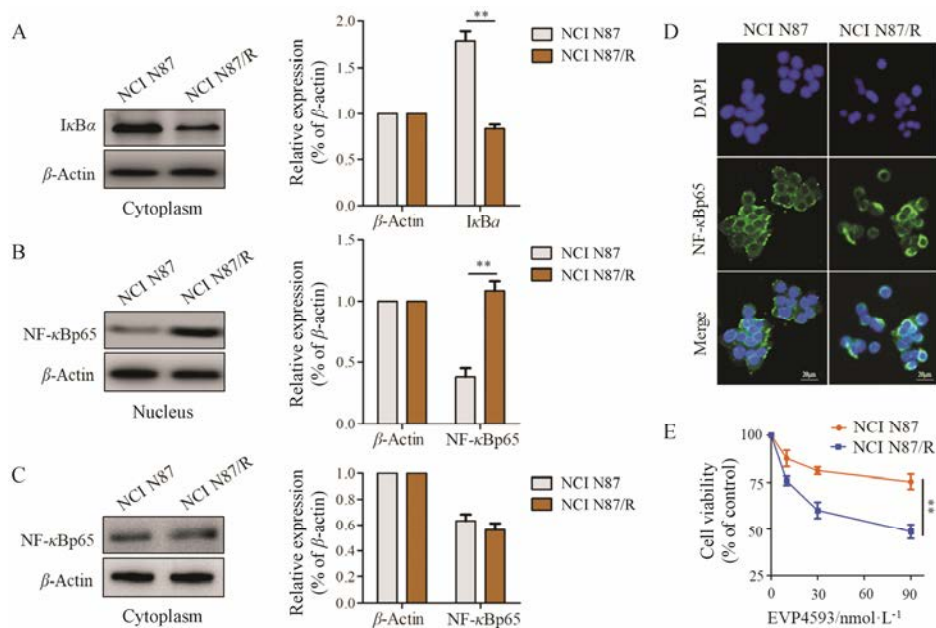


Figure 1 NF-κB signaling pathway was activated in NCI N87/R cells. A–C: The expression of IκBα and NF-κBp65 were detected in the cytoplasm and nucleus of NCI N87 and NCI N87/R cells, and β-actin was used as a loading control; D: The localization of NF-κBp65 was analyzed in NCI N87 and NCI N87/R cells by immunofluorescence assay; E: Cell viability was detected by CCK-8 in NCI N87 and NCI N87/R cells after treatment with different concentrations of EVP4593 (0, 10, 30, 90 nmol·L⁻¹). n=3, mean±SEM. **P<0.01

抑制作用 (图 1E), 表明抑制 NF-κB 通路能够降低 NCI N87/R 细胞活力, 提示 NF-κB 通路激活与赫赛汀耐药有关。

2 姜黄素逆转 NCI N87/R 细胞赫赛汀耐药

采用 CCK-8 检测了不同浓度的姜黄素 (0、10、20、40、60 和 80 μmol·L⁻¹) 和赫赛汀 (0、2.5、5、10、20 和 40 μg·mL⁻¹) 单独或联合使用对细胞增殖的影响。结果显示, 赫赛汀、姜黄素单独或联合处理细胞 72 h 后, 细胞活力呈现不同程度降低, 且具有剂量依赖性 (耐药细胞赫赛汀组除外)。当姜黄素浓度达 80 μmol·L⁻¹ 时, NCI N87 细胞活力为 63.64%, 与高剂量赫赛汀组 (40 μg·mL⁻¹) 相比差异无统计学意义 (P=0.13), 与姜黄素联合赫赛汀组相比, 差异具有统计学意义 (P=0.01) (图 2A); 对于 NCI N87/R 细胞, 姜黄素浓度达 80 μmol·L⁻¹ 时, 细胞活力为 48.86%,

与高剂量赫赛汀组 (40 μg·mL⁻¹) 相比, 差异极具统计学意义 (P=0.003), 与姜黄素联合赫赛汀组相比, 差异具有统计学意义 (P=0.02) (图 2B)。表明姜黄素对 NCI N87/R 细胞的增殖具有偏好性抑制作用, 联合使用姜黄素能够提高 NCI N87/R 细胞对赫赛汀的敏感性。

3 姜黄素偏好性抑制了 NCI N87/R 细胞集落形成

细胞集落形成实验直观反映细胞群体依赖性和增殖潜能, 肿瘤细胞的集落形成直接反映了其增殖能力和恶性程度。结果显示, 实验剂量下, 姜黄素单独使用对 NCI N87 和 NCI N87/R 细胞的集落形成具有抑制作用, 且呈剂量依赖性, 但对耐药细胞的抑制效果更加显著 (P<0.01, P<0.001), 姜黄素联合赫赛汀进一步增强其抑制效果, 提示姜黄素能够偏好性抑制 NCI N87/R 细胞的增殖 (图 3)。

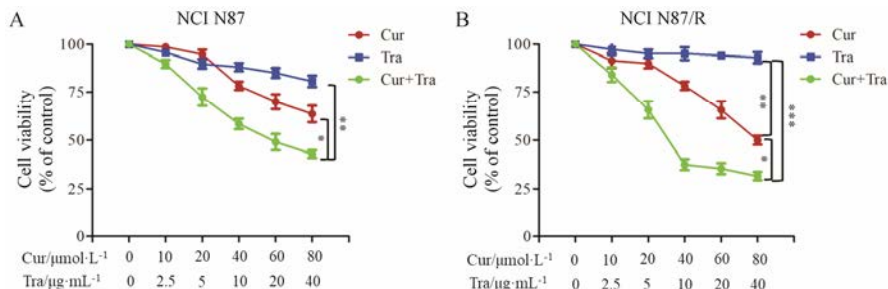


Figure 2 Inhibition of curcumin (Cur), trastuzumab (Tra), curcumin in combination with trastuzumab (Cur+Tra) on the proliferation of NCI N87 and NCI N87/R cells. n=3, mean±SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

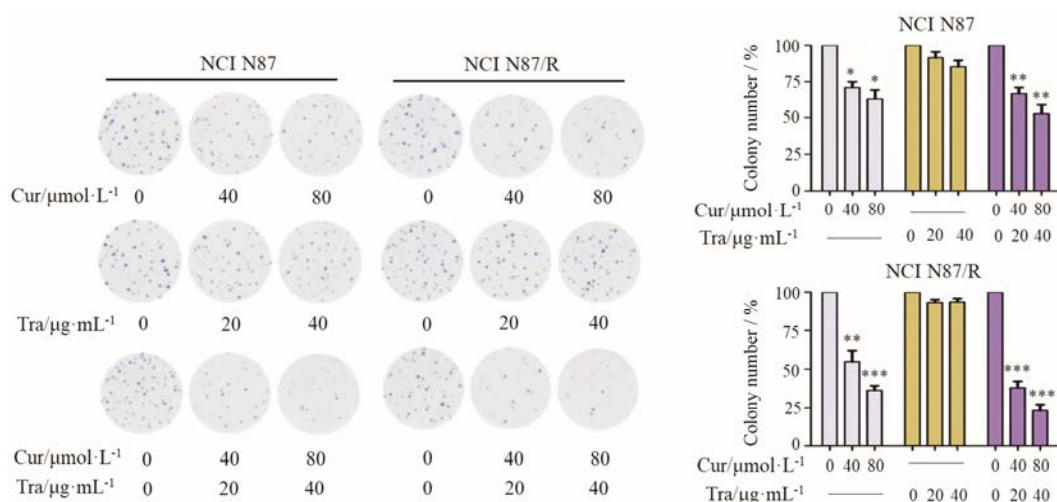


Figure 3 Effect of Cur, Tra, Cur+Tra on the colony formation of NCI N87 and NCI N87/R cells. $n=3$, mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control

4 姜黄素抑制了耐药细胞 NF- κ B 信号通路

采用不同浓度的姜黄素 (0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 NCI N87/R 细胞 24 h, 分别提取胞浆及核蛋白, 利用 Western blot 检测姜黄素处理后 I κ B α 、NF- κ B 和 NF- κ Bp65 表达的变化。结果表明, 随姜黄素浓度增加, 胞浆中 I κ B α 的表达呈现浓度依赖性上调, 当姜黄素达 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 达 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 差异具有显著统计学意义 ($P<0.01$) (图 4A)。核内 NF- κ B 和 NF- κ Bp65 表达随姜黄素浓度增加呈剂量依赖性下调, 与对照组相比, 差异具有统计学或显著统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$) (图 4B)。表明姜黄素能够剂量依耐性抑制 NCI N87/R 细胞活化的 NF- κ B 信号通路。

5 姜黄素下调 HER-2 的表达

为了进一步明确姜黄素是否抑制 HER-2 的表达,

基于 Western blot 检测了不同浓度的姜黄素 (0、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 分别作用于 NCI N87 和 NCI N87/R 细胞 24 h 后 HER-2 的表达。结果表明, 不论 NCI N87 还是 NCI N87/R 细胞, 姜黄素均能够下调 HER-2 的表达, 然而在实验条件下, HER-2 的变化与姜黄素浓度并没有明显的剂量依赖关系 (图 5)。

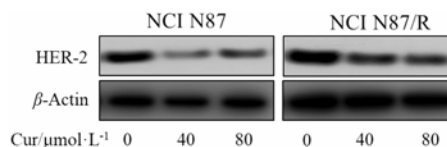


Figure 5 Cur inhibited HER-2 expression in both NCI N87 and NCI N87/R cells

6 姜黄素抑制 NCI N87/R 细胞 NF- κ B 通路, 上调了 caspase-3、Bax 和下调了 Bcl-2

采用流式细胞术检测了姜黄素、姜黄素联合 EVP4593、赫赛汀、姜黄素联合赫赛汀作用细胞 24 h 后其凋亡率的变化。结果显示, 与对照组相比, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素使 NCI N87/R 的凋亡率增加了 3.6 倍 ($P<0.01$), 而姜黄素联合 EVP4593 (90 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较姜黄素组降低了 47.7% ($P<0.05$), 姜黄素联合赫赛汀较姜黄素组增加了 60% ($P<0.05$), 较赫赛汀组增加了 2.8 倍 ($P<0.01$) (图 6A)。对于 NCI N87 细胞, 与对照组相比, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素使其凋亡率增加了 40% ($P=0.1$, 图 6B)。进一步采用 Western blot 检测了药物作用 NCI N87/R 细胞 24 h 后凋亡相关蛋白 caspase-3、Bax 及 Bcl-2 的表达变化, 与对照组相比, cleaved caspase-3 (p17 亚基) 及 Bax 在姜黄素组、姜黄素+赫赛汀组上调, 而 Bcl-2 下调 (图 6C、D)。与姜黄素组相比, EVP4593 联合姜黄素组中 cleaved

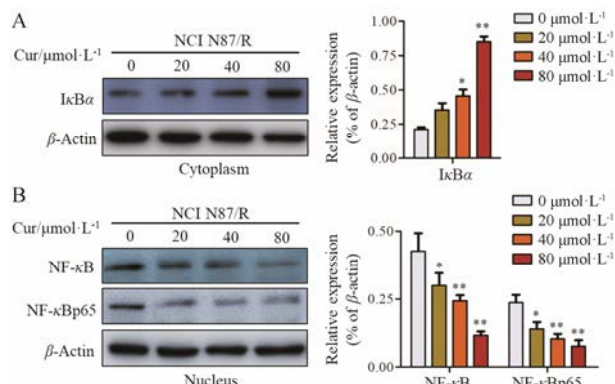


Figure 4 Inhibitory effect of Cur on NF- κ B signaling pathway in NCI N87/R cells. A, B: The expression of I κ B α , NF- κ B and NF- κ Bp65 in the cytoplasm and nucleus were detected in NCI N87/R cells after treatment with different concentrations of curcumin (0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$). β -Actin was used as a loading control. $n=3$, mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control

caspase-3 (p17 亚基)、Bax 和 Bcl-2 的表达发生不同程度转归 (图 6C、E), 提示姜黄素诱导 NCI N87/R 细胞凋亡与抑制 NF- κ B 通路、激活 caspase-3、上调 Bax 和下调 Bcl-2 有关。

7 姜黄素增加 NCI N87/R 细胞 caspase-3、8 和 9 的活性

为了明确姜黄素对 NCI N87/R 细胞 caspase 凋亡相关酶活性的影响, 采用凋亡试剂盒检测了药物单独或联合作用细胞 24 h 后 caspase-3、8 和 9 活性的改变。结果表明, 与对照组相比, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素使 NCI N87/R 细胞 caspase-3、8 和 9 的酶活性分别增加了 2.71、1.19 和 0.95 倍。与姜黄素组相比, 姜黄素联合 EVP4593 (90 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 使酶活性分别降低了 54.6% (caspase-3)、44.1% (caspase-8) 和 40.2% (caspase-9); 姜黄素联合赫赛汀组较姜黄素组分别增加了 3.10 (caspase-3)、1.42 (caspase-8) 和 0.87 倍 (caspase-9) (图 7)。表明姜黄素诱导 NCI N87/R 细胞

凋亡与抑制 NF- κ B 通路和激活 caspase 途径有关。

讨论

姜黄素可通过多种途径抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、逆转肿瘤耐药^[11-14]。然而, 姜黄素可否逆转胃癌 NCI N87 细胞赫赛汀耐药, 尚不明确。本实验证实, NF- κ B 通路激活是胃癌 NCI N87 细胞赫赛汀获得性耐药的重要机制, 姜黄素能够抑制 NCI N87/R 细胞的增殖, 并诱导其凋亡, 其机制可能与抑制 NF- κ B 通路、激活 caspase 途径、上调 Bax、下调 Bcl-2、增加 Bax/Bcl-2 比例, 进而诱导细胞凋亡有关, 提示抑制 NF- κ B 通路, 激活 caspase 途径, 诱导细胞凋亡可能是姜黄素逆转 NCI N87/R 细胞赫赛汀耐药的重要机制。

NF- κ B 通路在维持肿瘤细胞增殖、分化及凋亡中发挥重要调节作用^[19]。通常情况下, NF- κ B (p50/p65) 与抑制性蛋白 I κ B 结合成三聚体, 以“静息状态”存

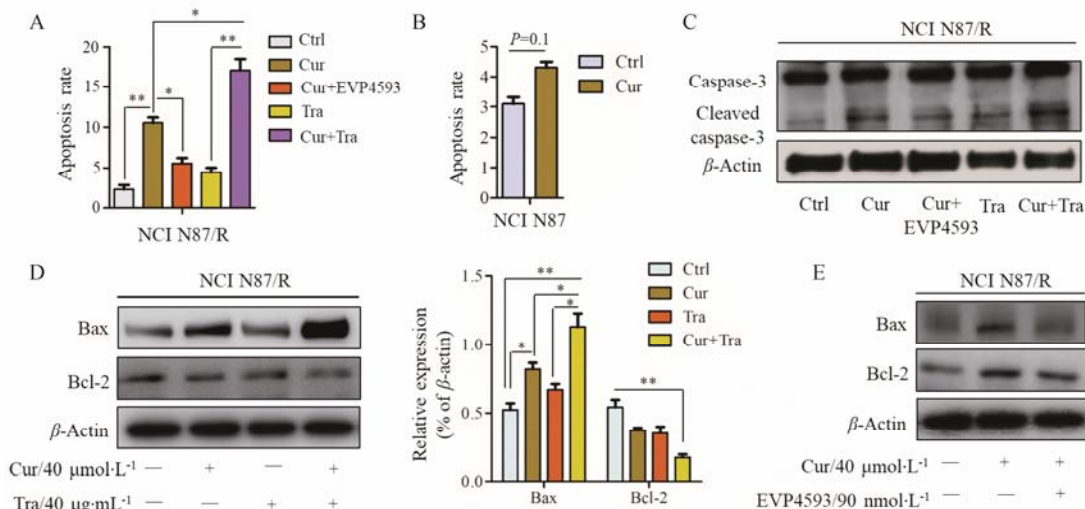


Figure 6 Cur induced apoptosis of NCI N87/R cells *via* upregulation of caspase-3, Bax and downregulation of Bcl-2. A: The apoptosis rate of NCI N87/R cells after 24 h' treatment with Cur, Tra, Cur+EVP4593 or Cur+Tra, respectively; B: The apoptosis rate of NCI N87 cells after 24 h' treatment with Cur; C: The expression of caspase-3 and cleaved caspase-3 in NCI N87/R cells after treatment with Cur, Cur+EVP4593, Tra or Cur+Tra, respectively; D: The expression of Bax and Bcl-2 in NCI N87/R cells after treatment with Cur, Tra, or Cur+Tra, respectively; E: The expression of Bax and Bcl-2 in NCI N87/R cells after treatment with Cur or Cur+EVP4593. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

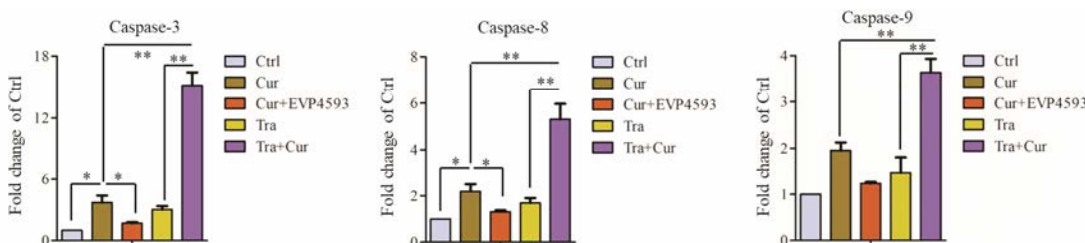


Figure 7 Effect of Cur, Tra, Cur+EVP4594, Cur+Tra on the enzymatic activity of caspase-3, 8, 9 in NCI N87/R cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

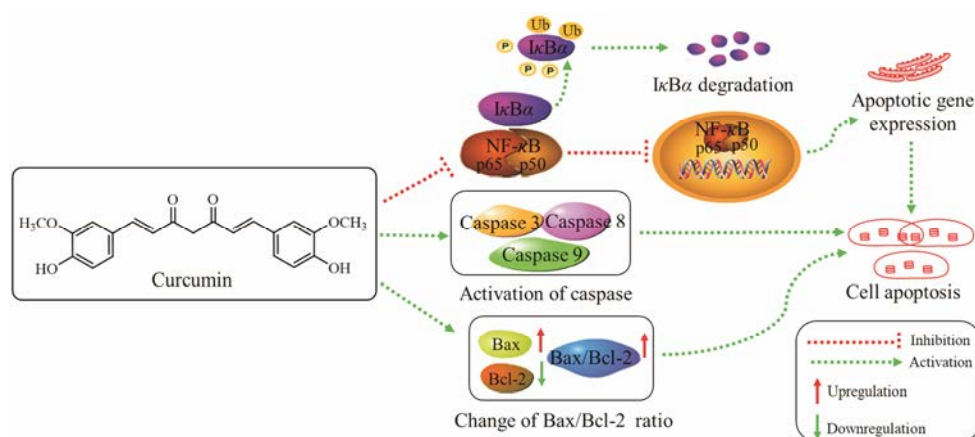


Figure 8 Potential mechanisms of Cur on sensitivity enhancement of NCI N87/R cells to Tra

在于胞浆,当细胞受到某种刺激后(如 IL-1、TNF- α 、药物等),受体迅速寡聚化,招募形成蛋白复合体I,从而激活 I κ B 激酶 (IKK) 复合物,导致 I κ B α 磷酸化,经泛素化在 26S 蛋白水解酶作用下降解,使游离的 NF- κ B (p50/p65) 释放入核,与基因组 κ B 位点特异性结合,参与细胞功能调节(图 8)。作为炎症反应的关键信号因子, NF- κ B 通路在肿瘤炎症发展阶段发挥了重要作用,既可通过诱导炎症因子 (TNF- α 、IL-1、IL-6)、趋化因子、黏附分子 (ICAM-1、VCAM-1) 的表达放大炎症反应,又可以促进肿瘤增殖、抑制肿瘤凋亡、增强肿瘤转移及诱导肿瘤耐药^[20-23]。NF- κ B 信号异常活化可诱导抗凋亡基因的表达,导致肿瘤细胞抗凋亡能力增强。因此,抑制其信号能够启动肿瘤细胞的凋亡机制^[24]。

在乳腺癌研究中发现,姜黄素通过抑制 HER-2 的磷酸化,导致 HER-2 与其分子伴侣 GRP94 解离,导致 HER-2 消耗增加,引起下游 AKT 去磷酸化,造成 MAPK/AKT 及 PI3K/AKT 通路被抑制。AKT 去磷酸化还可以抑制 IKK 激酶的活性,从而间接降低 NF- κ B 活性,促使细胞凋亡^[25,26]。本研究结果显示,姜黄素对敏感和耐药细胞 HER-2 的表达都能够降低,但没有明显的剂量依赖关系,这种作用是否与抑制 NF- κ B 通路有关,尚需进一步证实。

众所周知, caspase 家族成员在细胞凋亡过程中发挥了重要调控作用,是细胞凋亡的直接参与者和执行者。caspase-3 作为 caspase 级联反应下游的主要效应分子,其激活对诱导细胞凋亡起关键作用。经典的细胞凋亡包括胞外途径和线粒体途径。在胞外途径,死亡配体和相应的受体结合形成死亡信号,继而与 caspase-8 结合,形成死亡诱导复合物,激活 caspase-8,引起 caspase-8 和 caspase-3 直接作用,诱导细胞凋亡。在线粒体途径,凋亡刺激因子与凋亡蛋白酶激活因

子结合形成复合物,然后在胞浆与 caspase-9 前体结合,促使 caspase-9 活化,激活 caspase-3,引起下游级联反应,诱导细胞凋亡^[27]。Western blot 及酶活性检测表明,姜黄素既可以激活 caspase-3,导致 cleaved caspase 3 表达上调,又可以增加 caspase-3、8 和 9 的活性,提示姜黄素逆转赫赛汀耐药可能与 caspase 参与调控的胞外途径和线粒体途径有关,进而诱导耐药细胞凋亡(图 8)。

作为 Bcl-2 家族重要成员,抗凋亡基因 Bcl-2 与促凋亡基因 Bax 在维持细胞生存、调控细胞凋亡中发挥关键性作用。因此,抑制 Bcl-2 和促进 Bax 表达成为诱导肿瘤细胞凋亡的有效途径^[28,29]。在细胞凋亡阶段, Bax 被激活移位至线粒体膜,形成多聚体从而影响线粒体膜的完整性,使线粒体通道开放, caspase 活化因子释放增多,启动线粒体依赖的凋亡信号,增强 caspase 家族凋亡蛋白表达,加速细胞凋亡进程^[30]。Bcl-2 作为抗凋亡蛋白,其表达下调能够诱导肿瘤细胞凋亡,发挥协同促凋亡作用。结果表明,姜黄素能够上调 Bax、下调 Bcl-2,导致 Bax/Bcl-2 比率增加,这可能是姜黄素诱导 NCI N87/R 细胞凋亡的另一个重要机制(图 8)。

综上所述, NF- κ B 通路激活是胃癌赫赛汀耐药的重要机制。姜黄素逆转 NCI N87/R 细胞赫赛汀耐药可能与抑制 NF- κ B 信号、激活 caspase 途径、上调 Bax 和下调 Bcl-2 表达、诱导细胞凋亡有关。

References

- [1] Gravalos C, Jimeno A. HER-2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19: 1523-1529.
- [2] Appert-Collin A, Hubert P, Crémel G, et al. Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion [J]. *Front*

- Pharmacol, 2015, 6: 283.
- [3] Sukawa Y, Yamamoto H, Noshio K, et al. HER-2 expression and PI3K-AKT pathway alterations in gastric cancer [J]. *Digestion*, 2014, 89: 12–17.
- [4] Boku N. HER2-positive gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2014, 17: 1–12.
- [5] Pazo Cid RA, Antón A. Advanced HER2-positive gastric cancer: current and future targeted therapies [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013, 85: 350–362.
- [6] Canonici A, Gijzen M, Mullooly M, et al. Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER-2 amplified breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2013, 4: 1592–1605.
- [7] Li B, Meng Y, Zheng L, et al. Bispecific antibody to ErbB2 overcomes trastuzumab resistance through comprehensive blockade of ErbB2 heterodimerization [J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 6471–6483.
- [8] Vallianou NG, Evangelopoulos A, Schizas N, et al. Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35: 645–651.
- [9] Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 186864.
- [10] Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, et al. Curcumin as a wound healing agent [J]. *Life Sci*, 2014, 116: 1–7.
- [11] Kang Y, Hu W, Bai E, et al. Curcumin sensitizes human gastric cancer cells to 5-fluorouracil through inhibition of the NF- κ B survival-signaling pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 7373–7384.
- [12] Ruiz de Porras V, Bystrup S, Martínez-Cardús A, et al. Curcumin mediates oxaliplatin-acquired resistance reversion in colorectal cancer cell lines through modulation of CXCL12 chemokine/NF- κ B signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24675.
- [13] Zhang C, Xu Y, Wang H, et al. Curcumin reverses irinotecan resistance in colon cancer cell by regulation of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Anticancer Drugs*, 2018, 29: 334–340.
- [14] Zhou M, Li Z, Han Z, et al. Paclitaxel-sensitization enhanced by curcumin involves down-regulation of nuclear factor- κ B and Lin28 in Hep3B cells [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35: 618–625.
- [15] Shah K, Mirza S, Desai U, et al. Synergism of curcumin and cytarabine in the down regulation of multi-drug resistance genes in acute myeloid leukemia [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016, 16: 128–135.
- [16] Liu WH, Chang JX, Liu MW, et al. Quantitative proteomics profiling reveals activation of mTOR pathway in trastuzumab resistance [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 45793–45806.
- [17] Liu WH, Wang Y, Li SM, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of acquired herceptin resistance in gastric cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 553–560.
- [18] Liu WH, Yuan JB, Liu ZZ, et al. Label-free quantitative proteomics combined with biological validation reveals activation of Wnt/ β -catenin pathway contributing to trastuzumab resistance in gastric cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1981.
- [19] Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 121–132.
- [20] Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF- κ B signaling pathways in neurological inflammation: a mini review [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 77.
- [21] Erstad DJ, Cusack JC Jr. Targeting the NF- κ B pathway in cancer therapy [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2013, 22: 705–746.
- [22] Galvani E, Sun J, Leon LG, et al. NF- κ B drives acquired resistance to a novel mutant-selective EGFR inhibitor [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 42717–42732.
- [23] Li Q, Yang G, Feng M, et al. NF- κ B in pancreatic cancer: its key role in chemoresistance [J]. *Cancer Lett*, 2018, 421: 127–134.
- [24] Bailey ST, Miron PL, Choi YJ, et al. NF- κ B activation-induced anti-apoptosis renders HER2-positive cells drug resistant and accelerates tumor growth [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12: 408–420.
- [25] Lai HW, Chien SY, Kuo SJ, et al. The potential utility of curcumin in the treatment of HER-2-overexpressed breast cancer: an *in vitro* and *in vivo* comparison study with herceptin [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 486568.
- [26] Hong RL, Spohn WH, Hung MC. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185^{neu} and also depletes p185^{neu} and also depletes p185^{neu} [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 1884–1891.
- [27] Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24: 1380–1389.
- [28] Li C, Xu HL, Liu M, et al. Progress of marine anticancer agents targeting cellular proapoptotic molecules [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1394–1400.
- [29] Campbell KJ, Tait SWG. Targeting Bcl-2 regulated apoptosis in cancer [J]. *Open Biol*, 2018, 8: 180002.
- [30] Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115: 632–640.