

姜黄素引入酯键增韧基团对膀胱癌 T24 细胞靶向作用的体外研究

肖峰¹, 陈方敏¹, 石家齐^{1*}, 任德帅¹, 毕磊¹, 姜锡男¹, 严波¹, 杨艳², 汤磊², 常傲霜³

(¹ 贵阳医学院附属医院泌尿外科, 贵州 贵阳 550004; ² 贵阳医学院药学院药物化学教研室, ³ 基础医学院电镜室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨姜黄素引入酯键增韧基团成为姜黄素前体化合物后靶向诱导膀胱癌 T24 细胞凋亡, 为膀胱癌靶向治疗提供依据。方法: 取不同浓度姜黄素前体化合物: 叔丁氧羰基-苯丙氨酸酯姜黄素单脂(boc-phenylalanine-curcumin, BPC)及相同浓度的姜黄素对膀胱癌 T24 细胞及人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells, HASMC)作用后, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞抑制率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 透射电镜观察 BPC 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理 T24 细胞后细胞超微结构的改变。结果: 5~40 $\mu\text{mol/L}$ BPC 及姜黄素母体作用于膀胱癌 T24 细胞 6~24 h 后均明显抑制其增殖, 呈时间剂量依赖, 抑制率 BPC: 5.31%~59.34% ($P < 0.05$); 姜黄素: 7.33%~63.59% ($P < 0.05$); 对正常二聚体细胞 HASMC 的抑制作用 BPC 较姜黄素组明显降低(1.41%~12.34% vs 5.34%~36.59%), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 流式细胞仪分析 5~40 $\mu\text{mol/L}$ BPC 及姜黄素作用于膀胱癌 T24 细胞 24 h 后, BPC 诱导凋亡率: 16.97%~47.12% ($P < 0.05$), 姜黄素: 19.21%~48.92% ($P < 0.05$); 而对 HASMC 作用则较姜黄素明显减弱, BPC 诱导凋亡率为: 0.94%~3.27%, 姜黄素组为: 4.69%~11.35%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。透射电镜显示: 经 BPC 作用后, T24 细胞出现典型细胞凋亡的形态学特征。结论: 姜黄素酯前体化合物 BPC 明显抑制膀胱癌 T24 细胞增殖、诱导其凋亡, 而对正常二倍体细胞 HASMC 抑制作用降低, 为姜黄素酯对肿瘤的靶向治疗研究提供新的依据。

[关键词] 膀胱癌; 姜黄素; 前体化合物; 细胞凋亡

[中图分类号] Q813; R737.14

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-645-05

In vitro study of curcumin-containing ester key toughening groups to T24 bladder cancer cells targeted role

XIAO Feng¹, CHEN Fang-min¹, SHI Jia-qi^{1*}, REN De-shuai¹, BI Lei¹, JIANG Xi-nan¹, YAN Bo¹, YANG Yan², TANG Lei², CHANG Ao-shuang³

(¹ Department of Urological Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004; ² Pharmacy Department of Pharmaceutical Chemistry, ³ Basic Medicine Electron Room, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the apoptosis of bladder cancer cells T24 induced by curcumin precursor compounds, which were generated by introducing ester bond toughening groups and to provide a new foundation for treating bladder cancer. **Methods:** T24 bladder cancer cells and human aortic smooth muscle cells (HASMC) were treated with curcumin precursor compounds, boc-phenylalanine-curcumin (BPC), and curcumin, MTT assay was used to determine the cellular inhibition rate and flow cytometry was used to determine the apoptotic rate. Ultrastructural changes of T24 cells treated with 20 and 40 BPC $\mu\text{mol/L}$ were by electronic microscopy. **Results:** BPC and curcumin precursor compounds at 5~40 $\mu\text{mol/L}$ inhibited the proliferation of T24 bladder cancer cells following incubation for 6~24 h in a dose- and time-dependent manner. The inhibition rate of BPC was 5.31%~59.34% ($P < 0.05$), and that of curcumin was 7.33%~63.59% ($P < 0.05$). Inhibition of normal HASMCs was reduced obviously compared with the curcumin group (the BPC group, 1.41%~12.34% vs. the curcumin group, 5.34%~36.59%, $P < 0.05$). There was a statistically significant difference ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that, at 24 h, the apoptotic rate of T24 cells treated with 5~40 $\mu\text{mol/L}$ BPC was 16.97%~47.12% ($P < 0.05$) and that of curcumin-treated cells was 19.21%~48.92% ($P < 0.05$). For HASMCs, the apoptotic rate of T24 cells

[基金项目] 国家自然科学基金(30860284); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金[黔省专合字(2007)76号]; 贵州省教育厅自然科学类科研项目(黔教科:2007027)

*通讯作者, E-mail: shijiaqi@yahoo.com.cn

treated with 5~40 $\mu\text{mol/L}$ BPC was 0.94%~3.27%, and that of curcumin-treated cells was 4.69%~11.35%. There was a statistically significant difference ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy showed that T24 cells treated with BPC exhibited morphological features typical of apoptosis. Conclusion: Curcumin ester compounds BPC can inhibit T24 bladder cancer cell proliferation and lead to apoptosis, but with no apparent effect on normal HASMCs. It may provide a new foundation for curcumin-based treatment of tumors.

[Key words] bladder cancer; curcumin; precursor compounds, apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 645-649]

膀胱癌是泌尿外科常见的恶性肿瘤之一。姜黄素是植物姜黄的主要有效成分,是多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种生物学功能^[1],大量的体外研究证实,姜黄素可抑制多种肿瘤细胞的增殖,能诱导包括白血病、淋巴瘤、肺癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌和直肠癌等在内的多种人类肿瘤细胞株发生凋亡^[2],包括膀胱来源的肿瘤细胞系^[3]。美国国立癌症研究所(NCI)已将姜黄素列为第三代癌症化学预防药,于2000年列入美国药典。但是高浓度姜黄素存在一定的细胞毒作用^[4]。如何提高姜黄素抗癌作用的靶向性,减少其不良反应成为众多学者关注的研究方向。本研究利用姜黄素具有抗肿瘤功效,在姜黄素母体基础上链接叔丁氧羰基-苯丙氨酸基团合成姜黄素单酯(boc-phenylalanine-curcumin, BPC),试图增强其对膀胱癌 T24 细胞的靶向性作用,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

T24 细胞株和人主动脉平滑肌细胞(people aortic smooth muscle cells, HASMC)购于中国科学院典型培养物保藏中心昆明细胞库;BPC、姜黄素由贵阳医学院提供;RPMI1640 培养基、四甲苯偶氮唑盐(MTT)试剂购于美国 Sigma 公司;胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。流式细胞仪为美国 Becton Dickson 公司产品;细胞培养箱、恒温培养箱为德国 Heraeus 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 姜黄素前体药物的合成

BPC 由贵阳医学院药理学系合成,合成路线如图1所示。Boc 保护的氨基酸与等当量的姜黄素,以无水四氢呋喃做溶剂,DCC 作为脱水剂,DMAP 为催化剂,氮气保护下反应 18 h 后减压蒸除溶剂,以石油醚:乙酸乙酯=1:1 为洗脱剂,柱层析纯化得到产物。产物经 IR、¹H NMR、元素分析鉴定,为目

标化合物。

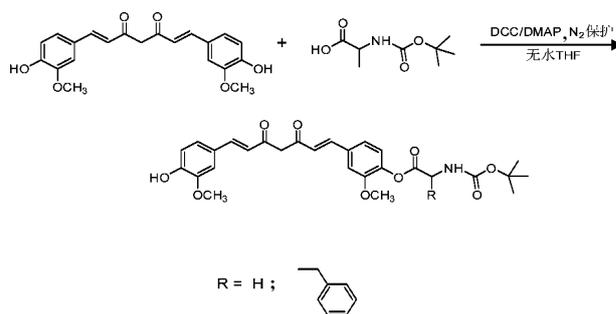


图1 姜黄素前体药物合成路线

Figure 1 The synthesis routine of the curcumin prodrugs

1.2.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37°C、5%CO₂ 条件下常规培养。

1.2.3 MTT 实验

取对数生长期的上述两种细胞,用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^3 个接种于 96 孔培养板。培养板置于 37°C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内培育,使细胞增殖至铺满每孔底部。实验分空白对照组、BPC 和姜黄素作用组(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$),每组设 5 个复孔。分别在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 6、12、18、24 h 后,每孔加入 20 μl MTT(5 g/L),继续在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h。吸尽上清,再加入 DMSO 150 μl ,振荡 10 min,使其充分溶解,在 96 孔酶标仪上测定波长 490 nm 的吸光度,计算细胞生长抑制率,计算公式为:抑制率=[1-(药物组 D (490 nm)/对照组 D (490 nm)] $\times 100\%$ 。实验重复 5 次。

1.2.4 流式细胞仪观察细胞凋亡

按上述分组加药培养 24 h 后,收集 2×10^6 个上述各组细胞,检测前用 PBS 洗涤 2 次,加入 Bind Buffer,5 μl Annexin-V,10 μl 碘化丙啶进行染色,室温避光 15 min,加入 250 μl Bind Buffer 上流式细胞仪检测细胞凋亡比率。所用软件为 CELLQUEST,流式细胞仪变异系数在 3% 以下。

1.2.5 透射电镜观察细胞超微结构

取对数生长期 T24 细胞分别加入 BPC 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h, 收集细胞, 切片染色, 透射电镜观察细胞超微结构。

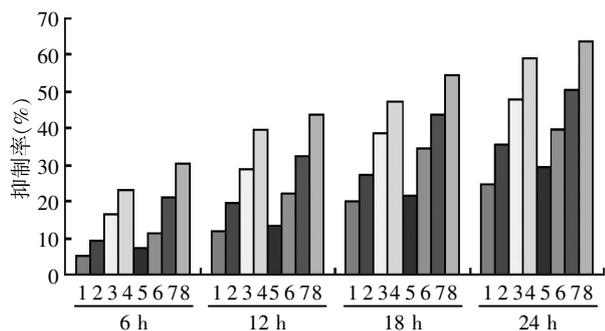
1.3 统计学方法

应用 SPSS11.5 统计软件分析, 组间比较采用 *t* 检验, 多组比较采用多因素的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 实验结果

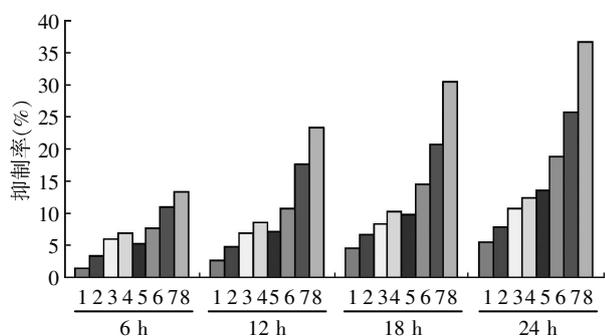
各浓度 BPC 对膀胱癌 T24 细胞作用不同时间后显示出明显抑制增殖的作用, 抑制率 5.31%~59.34%, 呈时间剂量依赖性 ($P < 0.05$, 图 2), 且较姜黄素对照组 (7.33%~63.59%) 略有降低; 而对 HASMC 的抑制作用, BPC 组 (1.41%~12.34%) 则较姜黄素组 (5.34%~36.59%) 明显降低 ($P < 0.05$, 图 3)。



1~4: 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ BPC; 5~8: 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素 ($n = 5$)。

图 2 BPC 组和姜黄素组对膀胱癌 T24 细胞抑制率

Figure 2 The growth inhibition of BPC on bladder cancer cell T24 vs curcumin group



1~4: 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ BPC; 5~8: 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素 ($n = 5$)。

图 3 BPC 组和姜黄素组对 HASMC 抑制率

Figure 3 The growth inhibition of BPC on HASMC vs curcumin group

2.2 流式细胞术结果

各浓度 BPC 作用 T24 细胞 24 h 后, 凋亡率检测如图 4 所示。BPC 组诱导凋亡率为 16.97%~47.12% ($P < 0.05$), 姜黄素组为 19.21%~48.92% ($P < 0.05$); 作用 HASMC 细胞 24 h 后, BPC 组诱导凋亡率为 0.94%~3.27%, 姜黄素组为 4.69%~11.35%, 对 HASMC 的作用, BPC 较同浓度姜黄素组明显降低 ($P < 0.05$)。

2.3 透射电子显微镜观察

电镜下正常 T24 细胞大小不等, 外形不规则, 核大, 圆形、椭圆形不均, 核质比例高, 核仁大, 常染色质丰富, 异染色质均匀。BPC 作用后, T24 细胞出现大量细胞间连接和微绒毛减少或消失, 细胞体积缩小, 胞质凝缩, 有大量空泡出现, 核糖体和线粒体等细胞器聚集, 核染色质聚集于核膜内侧呈团块状或新月状, 细胞核固缩, 部分断裂成碎块, 细胞膜多保持完整, 可见部分有膜包裹细胞器的小体 (凋亡小体), 这些变化符合典型的细胞凋亡的形态学特征 (图 5)。

3 讨 论

较多研究表明姜黄素具有明显抗肿瘤作用, 主要是通过: 抑制肿瘤血管生成、上调 caspases 蛋白酶诱导凋亡、抑制核转录因子的表达、调节凋亡抑制基因的表达、诱导细胞周期阻滞等多种机制诱导肿瘤细胞凋亡^[5-7]。体外实验表明姜黄素高浓度、短时间作用于膀胱癌细胞可以通过诱导凋亡起到致命打击, 作为膀胱灌注剂有效地抑制了鼠膀胱肿瘤的种植和生长^[8]。值得注意的是: 虽然姜黄素具有较高安全性, 但当姜黄素浓度超过 60 $\mu\text{mol/L}$, 仍会导致对正常细胞的明显细胞毒作用^[9-10]。如何提高姜黄素对于肿瘤细胞的靶向性, 并减少对正常组织细胞的不良反应成为本研究的重点。

肿瘤细胞代谢旺盛, 较正常细胞富集更高浓度的磷酸酶、酯酶, 可利用这些差异, 如将抗癌药加以修饰, 引入保护性增韧基团, 用酯键链接, 在酯酶富集的肿瘤细胞内被催化, 释放抗癌药物, 很可能提高抗癌药物对肿瘤细胞的靶向性。修饰抗癌药物结构, 可提高抗癌活性, 具备羟基结构的小分子化合物如果引入增韧基团 N-马来酰-L-氨基酸, 可以增加自身的稳定性并通过相应固化剂经酯键与大分子核酸链的 5'磷酸基团末端稳定偶联。由于姜黄素首尾两端均具有羟基结构, 本研究在姜黄素母体基础上加上叔丁氧羰基-苯丙氨酸基团通过脂键连

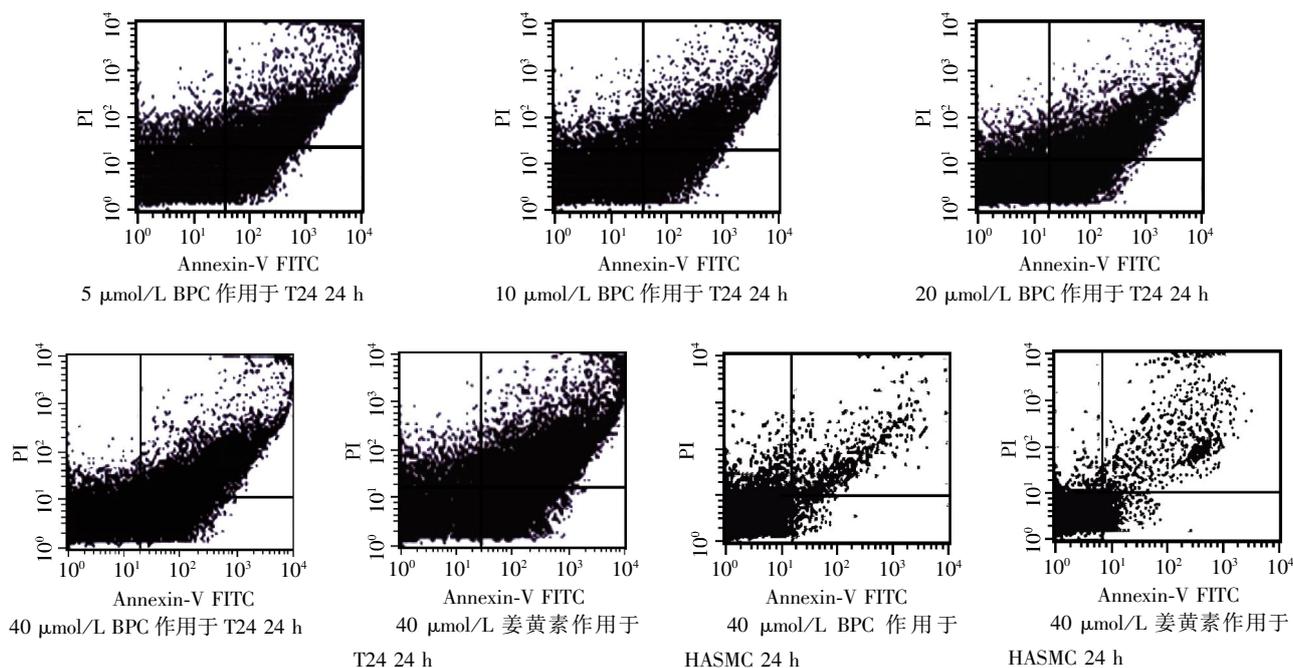


图 4 流式细胞仪对细胞凋亡率的检测

Figure 4 Cell apoptosis and its rates detected by flow cytometry

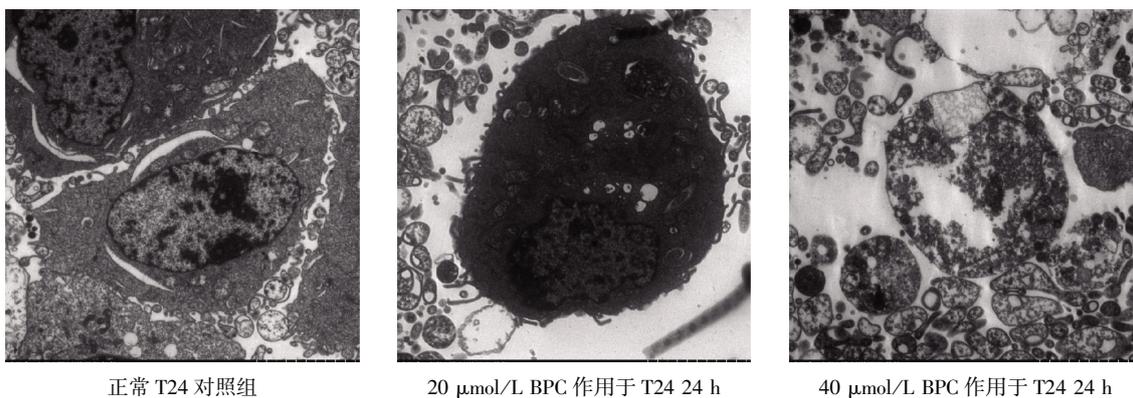


图 5 电子显微镜观察细胞超微结构变化($\times 16\ 000$)

Figure 5 Cellular ultrastructure changes observed by electronic microscopy($\times 16\ 000$)

接,使其对膀胱癌 T24 细胞具有靶向性作用。从 MTT 结果来看,40 $\mu\text{mol/L}$ 的 BPC 对 T24 细胞 24 h 抑制率即可达 59.34%,具有明显的抑制作用。促凋亡基因活性受抑制和抗凋亡基因被激活是导致肿瘤细胞凋亡被抑制而长期存活的主要原因^[11-12],而姜黄素抗肿瘤的其中一个很重要的机制是诱导肿瘤细胞凋亡^[13]。流式细胞仪结果显示,40 $\mu\text{mol/L}$ 的 BPC 24 h 诱导膀胱癌 T24 细胞凋亡达 47.12%,提示 BPC 有明显地诱导 T24 细胞凋亡的作用。细胞超微结构的改变是检验细胞凋亡的一重要依据,透视电镜观察了几种药物浓度下 T24 细胞超微结构的变化,结果显示,BPC 作用后 T24 细胞出现典型的

细胞凋亡的形态学特征。与杨海波^[14]、王威^[15]、黄秀榕^[16]等分别用姜黄素处理永生化人 HaCaT 细胞、人肝癌细胞株 HepG2 细胞、牛晶状体上皮 JEC 细胞时观察到的超微结构一致。结果证实,BPC 对 T24 细胞的体外抑制作用明显,呈量效和时效关系,而与姜黄素比较,对正常细胞系 HASMC 却无明显抑制作用,说明在姜黄素母体上链接叔丁氧羰基-苯丙氨酸脂基团修饰后,其抗肿瘤更具有靶向性。

综上所述,本研究得出初步结论:BPC 能有效杀伤膀胱癌细胞且较姜黄素具有明显靶向作用,其原因可能为肿瘤细胞较正常二聚体细胞中存在大量的酯酶,能将含酯键的 BPC 水解成为姜黄素单体

发挥作用,而正常细胞对姜黄素脂前体化合物活化受限,作用降低,因而不良反应减少,增强靶向性,应用前景广泛,为肿瘤的靶向分子化疗提供重要的参考。

[参考文献]

- [1] Katsuyama Y, Kita T, Horinouchi S, et al. Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb *Curcuma longa* [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(17): 2799-2803
- [2] Karunakaran D, Rashmi R, Kumar T R, et al. Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5(2): 117-129
- [3] Sindhwani P, Hampton JA, Baig MM, 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] Aggarwal BB. Prostate cancer and curcumin: add spice to your life [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(9): 1436-1440
- [5] Milacic V, Banerjee S, Landis-Piwowar KR, et al. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cell *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(18): 7283-7292
- [6] Xie CY, Zhu QF, Wu BH, et al. Effective mechanism of curcumin on abnormal cell cycle and apoptosis of serum-deprived PC12 cell induced by β -amyloid peptide (25-35) [J]. *Chin Pharmacol Bul*, 2009, 25(2): 217-221
- [7] Karmakar S, Banik NL, Ray SK, et al. Curcumin suppressed anti-apoptotic signals and activated cysteine proteases for apoptosis in human malignant glioblastoma U87MG cell [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(12): 2235-2242
- [8] Sindhwani P. Curcumin: a food spice with cytotoxic activity against urinary bladder cancer [J]. *Am Coll Surg*, 2000, 191(1): 94-95
- [9] Zheng L, Tong Q, Wu C, et al. Growth-inhibitory effects of curcumin on ovary cancer cells and its mechanisms [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2004, 24(1): 55-58
- [10] 吴丽贤, 许建华, 吴国华, 等. 姜黄素对 K562 细胞增殖的影响及其与 P210(bcr/abl) 激活的 Ras 信号途径的关系 [J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(1): 33-37
- [11] Suzuki O, Abe M. Cell surface N-glycosylation and sialylation Regulate galectin-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma [J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(3): 743-748
- [12] Takai N, Ueda T, Nishida M, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human esophageal carcinoma cells [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(1): 109-115
- [13] 厉红元, 车 艺, 汤为学, 等. 姜黄素对人肝癌增殖和凋亡的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10(6): 449-451
- [14] 杨海波, 李祺福, 石松林, 等. 姜黄素诱导永生化人 Ha-CaT 细胞凋亡 [J]. *解剖学报*, 2009, 40(2): 223-227
- [15] 王 威, 贺红光, 范 丽, 等. 姜黄素对人肝癌细胞株 HepG-2 生长及超微结构的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2005, 34(3): 323-325
- [16] 黄秀榕, 祁明信, 康可人, 等. 姜黄素诱导牛晶状体上皮细胞凋亡的机制 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(7): 649-653

[收稿日期] 2012-01-09

欢迎投稿 欢迎订閱