

姜黄素对口腔鳞癌细胞中细胞骨架 及 Rho/ROCK 信号通路的影响

范德生¹, 甄蕾², 郭姜莉²

(1. 上海中医药大学附属曙光医院病理科, 上海 200021; 2. 上海市口腔病防治院口腔内科, 上海 200001)

[摘要] 目的: 探讨姜黄素对口腔鳞癌细胞系 HN13 细胞骨架的影响及其相关的分子机制。方法: 用考马斯亮蓝染色分析法检测不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 的细胞, 观察姜黄素对鳞癌细胞骨架的影响。用免疫组织化学法半定量检测不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后细胞内 F-actin 含量的变化。用 Western 印迹法检测不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后 ROCK2 及 p-ROCK2 蛋白的表达。结果: 在低浓度姜黄素(10 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后细胞骨架结构收缩、染色变淡、稀疏、变细, 排列方式发生变化, 但尚存一部分应力纤维; 随着姜黄素浓度的增加(20 $\mu\text{mol/L}$), 细胞骨架变化更加明显, 表现为细胞骨架含量明显减少, 放射状应力纤维几乎完全消失; 当姜黄素浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞骨架轮廓已不清晰, 染色更淡, 减少更加明显, 并有断裂, 多数细胞变形明显。不同浓度姜黄素干预细胞 24 h 后, 细胞 F-actin 含量减少, 各组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。Western 印迹法检测结果显示不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后细胞内 ROCK2 及 p-ROCK2 蛋白的表达显著下调。结论: 姜黄素可诱导鳞癌细胞骨架改变, 其作用机制与抑制 Rho/ROCK 信号通路的效应分子 ROCK2 及 p-ROCK2 活化有关。

[关键词] Rho/ROCK 信号通路; 姜黄素; 鳞癌; 细胞骨架

[中图分类号] R739.86 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-4979(2013)03-0182-04

doi: 10.3969/j.issn.1005-4979.2013.03.006

Effects of Curcumin on the Cytoskeleton of OSCC Cells by Rho/ROCK Pathway

FAN De-sheng¹, ZHEN Lei², GUO Jiang-li²

(1. Department of Pathology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Shuguang Hospital, Shanghai 200021; 2. Department of Oral Medicine, Shanghai Stomatological Disease Center, Shanghai 200001, China)

[Abstract] Objective: The present article aimed to study whether the effects of curcumin are related to cytoskeleton variation in OSCC cell line HN13 and its mechanism. **Methods:** HN13 cells were treated and exposed with different concentrations of curcumin (0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$). After 24 h, Coomassie blue staining was used to measure the cytoskeleton of HN13 cells. Immunohistochemistry was used to observe the expression of F-actin. The expression of ROCK2 and phosphorylated ROCK2 were detected by Western blot. **Results:** Qualitative morphological evaluation revealed that HN13 cell exposed to curcumin with different concentration became obvious deformation. The cytoskeletal structures shranked, the staining became faded, stress fibers reduced. Immunohistochemistry revealed the staining of F-actin appeared somewhat weaker in HN13 cells which exposed in high concentration of curcumin. When treated for 24 h, the expression of ROCK2 and p-ROCK2 in HN13 cells was decreased. **Conclusion:** Curcumin may trigger alterations of the cytoskeleton of HN13 cell line by inhibiting activity of Rho/ROCK2 pathway.

[Key words] Rho/ROCK2 pathway; curcumin; oral squamous cell carcinoma; cytoskeleton

收稿日期: 2013-01-23

基金项目: 上海市青年医师培养资助计划(人才-2012-04-03)

作者简介: 范德生(1973—), 男, 河南洛阳人, 主治医师, 硕士。E-mail: hellen4099@126.com

通信作者: 甄蕾, 主治医师。E-mail: zhenleilei123@126.com

细胞骨架(cytoskeleton)是一类横越于细胞核、细胞膜和质膜内侧面的纤维状蛋白基质,包括微管(microtubule, MT)、微丝(microfilament, MF)、中间丝及相关蛋白[如微管蛋白(tubulin)、黏着斑蛋白(vinculin)]等,细胞骨架的异常直接影响细胞的结构和功能。近年来的研究认为,细胞骨架的改变可影响肿瘤细胞的表型,进而影响肿瘤细胞的增殖、黏附、侵袭及转移能力^[1-2]。

姜黄素(curcumin)是从姜科植物姜黄(*curcuma longa*)根茎中提取的一种酚性色素,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抑制血管生成、调节多药耐药基因的作用。近年来,有研究证实姜黄素能够通过改变肿瘤细胞骨架的结构从而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[3-4],但具体机制尚不清楚。本研究通过对不同浓度姜黄素作用于舌鳞癌细胞骨架形态学变化的观察,结合细胞骨架与信号转导通路 Rho/ROCK 中相关信号分子表达的变化,探讨姜黄素影响舌鳞癌细胞骨架改变的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人口腔鳞癌细胞系 HN13 由上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔肿瘤生物学实验室惠赠。RPMI-1640 培养液(Gibco, 美国),新生小牛血清(杭州四季青生物材料工程公司),考马斯亮蓝(上海化学试剂有限公司),鼠抗人 ROCK2 多克隆抗体、鼠抗人 p-ROCK2 多克隆抗体、鼠抗人 F-actin 多克隆抗体(Santa Cruz, 美国),鼠抗人 β -actin 多克隆抗体(北京中杉生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将鳞癌细胞接种于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行试验。

1.2.2 细胞骨架抽提及染色 参考相关文献及预实验结果,收集不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 的细胞,PBS 洗 3 次,每次 5 min。用 1.5% Triton X-100,振荡洗涤 3 次,每次 8 min。用 M-缓冲液振荡洗涤 3 次,每次 4 min。3% 戊二醛固定 10 min。用 M-缓冲液轻洗 3 次,每次 3 min。用考马斯亮蓝液染 40 min,PBS 洗去多余的染液,空气干燥,二甲苯透明,树胶封固。显微镜下观察、摄影。

1.2.3 免疫细胞化学分析 F-actin 蛋白含量 制作

不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 的细胞爬片,免疫细胞化学染色按照 SP 试剂盒说明书进行。所用抗体工作浓度为 1:100,PBS 代替一抗作为空白对照。每组随机计数 100 个细胞,显微镜下观察、摄影。采用图像分析软件 Imagepro 6.0 比较 F-actin 阳性表达的累积吸光度值(IOD 值)。

1.2.4 Western 印迹法检测 ROCK2 及 p-ROCK2 表达 收集不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 的细胞,用预冷的 PBS 洗细胞 2 次,然后加细胞裂解液冰上放置 20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 r/min 离心 20 min,收集上清定量分析。取已定量的总蛋白进行 12%SDS-PAGE 实验,电转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭过夜,用含 0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液(TBST)漂洗 3 次,每次 10 min,加入相应的 ROCK2 抗体(1:1 000)及 p-ROCK2 抗体(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次后加入稀释度 1:4 000 的 HRP 标记 IgG (H+L),室温孵育 90 min;TBS 洗涤后经化学发光试剂孵育,暗室 X 线片曝光显示实验结果,凝胶分析系统分析蛋白的表达。

1.3 统计学处理

数据资料统计采用统计学软件 SPSS 13.0,组间比较选用方差分析, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度姜黄素对鳞癌细胞骨架的影响

无姜黄素作用时细胞大致呈卵圆形,中间染色较深的为细胞核;细胞质内蛋白呈蓝色丝状结构(主要显示中间纤维和部分微丝、微管),近核区域较致密,细胞骨架相对丰富,呈丝状交错排列,在胞质内分布不均匀,相邻细胞之间可见骨架束彼此穿行(图 1A)。在低浓度姜黄素(10 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后细胞骨架结构收缩、染色变淡、稀疏、变细,排列方式发生变化,但尚存一部分应力纤维(图 1B);随着姜黄素浓度的增加(20 $\mu\text{mol/L}$),细胞骨架变化更加明显,表现为细胞骨架含量明显减少,放射状应力纤维几乎完全消失(图 1C);当姜黄素浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞骨架轮廓已不清晰,染色更淡,减少更加明显,并有断裂,由于细胞失去细胞骨架的支持、固定作用,多数细胞变形明显(图 1D)。

2.2 不同浓度姜黄素对 F-actin 蛋白表达的影响

免疫细胞化学结果显示,经不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)处理后,随姜黄素浓度升高,鳞

癌细胞中 F-actin 表达量逐渐减弱($P<0.01$), 见表 1。

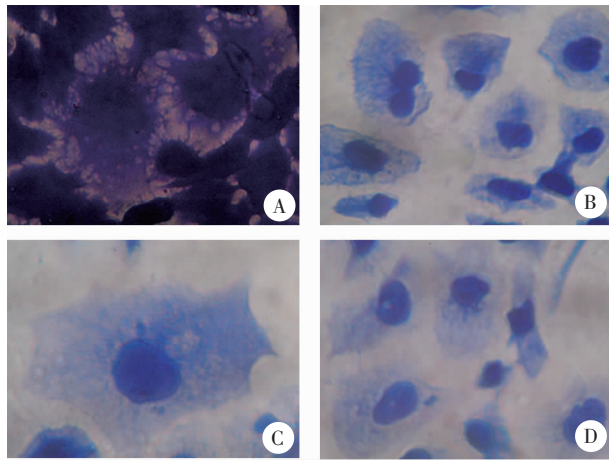


图 1 不同浓度姜黄素处理后的鳞癌细胞骨架(考马斯亮蓝 R-250, $\times 800$)

A: 0 $\mu\text{mol/L}$; B: 10 $\mu\text{mol/L}$; C: 20 $\mu\text{mol/L}$; D: 40 $\mu\text{mol/L}$

Figure 1 Qualitative morphology of cytoskeleton of HN13 cell line treated by various concentration of Curcumin (CB, $\times 800$)

A: 0 $\mu\text{mol/L}$; B: 10 $\mu\text{mol/L}$; C: 20 $\mu\text{mol/L}$; D: 40 $\mu\text{mol/L}$

表 1 不同浓度姜黄素对鳞癌细胞 F-actin 蛋白表达的影响

Table 1 Effect of curcumin on F-actin expression of HN13 cell line

姜黄素浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	IOD 值
0	75.10 \pm 1.01
10	63.64 \pm 0.63
20	52.09 \pm 1.55
40	25.27 \pm 1.86

注: 各组间比较, $P<0.01$ 。

2.3 不同浓度姜黄素对 ROCK2 及 p-ROCK2 表达的影响

采用免疫印迹法(Western 印迹法)分析不同浓度姜黄素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)作用下 ROCK2 及 p-ROCK2 蛋白的表达。结果显示, 经不同浓度姜黄素干预 24 h 后, 与未处理组相比, 各浓度组均能明显降低细胞的 ROCK2 及 p-ROCK2 表达水平(图2)。

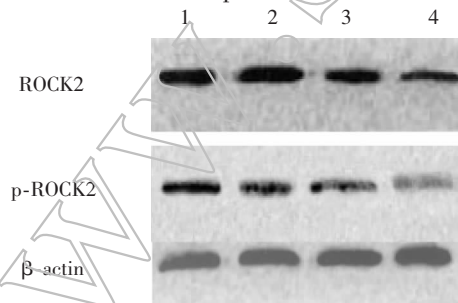


图 2 不同浓度姜黄素作用 24 h 后 ROCK2 及 p-ROCK2 蛋白表达 (1、2、3、4: 分别表示 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素)

Figure 2 Protein expression of cell markers ROCK2 and p-ROCK2 upon culture of HN13 cells with curcumin (Lane 1, 2, 3 and 4: treatment with 0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin)

3 讨论

早在 1928 年, Kozoff 就提出了细胞骨架的概念, 但直到 1963 年, 研究人员采用戊二醛固定的方法发现微管后, 才真正确定了细胞骨架的存在, 细胞骨架是由简单的复合物组成的复杂结构。狭义的细胞骨架系统是指细胞质内的一种纤维状蛋白基质, 包括微丝、微管、中间纤维等, 除了维持细胞的形态外, 细胞骨架参与细胞运动、分裂分化、细胞内物质运输以及跨膜信号传导等多种功能, 与细胞的生命活动密切相关。在肿瘤细胞, 微丝、微管与其无限生长及恶性生物学行为(如黏附、迁移和浸润)密切相关, 肿瘤细胞在黏附、降解基底膜的过程中, 细胞骨架^[5]起着非常重要的作用。

目前, 针对癌细胞细胞骨架的分析已成为肿瘤治疗及肿瘤药物研究的重要指标之一^[6-7]。由于正常真核细胞骨架完整、修复快, 抗肿瘤药物最终不会对其造成损伤, 而肿瘤细胞的骨架不完整, 组装程度差, 经药物作用后不能及时有效修复, 从而影响与其相关的各种功能。本实验观察到, 在 10~40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 姜黄素在作用 24 h 后均可诱导鳞癌细胞形态和细胞骨架的改变, 并随浓度的增加其细胞骨架呈现降低的趋势, 显示了姜黄素可以呈剂量依赖性引起鳞癌细胞骨架的变化, 提示姜黄素可抑制鳞癌细胞骨架(微管、微丝、中间纤维)的合成。

肌动蛋白(actin)是组成微丝的基本成分, 它又分为单体肌动蛋白(G-actin)与聚合态肌动蛋白(F-actin)。正常细胞中, G-actin 与 F-actin 之间不断转换, 达到平衡。当细胞受到一定物理或化学刺激后, 细胞内游离的 G-actin 彼此结合形成 F-actin, 进而通过自身螺旋形成微丝, 此过程即细胞骨架重排。因此, F-actin 具有更为明显的生物学功能, 它在维持细胞形态、参与细胞分裂、细胞运动以及细胞内物质转运与信号转导等多种功能密切相关。本实验免疫细胞化学结果显示细胞中 F-actin 蛋白的表达随姜黄素浓度增高逐渐减弱, 各组间差异有统计学意义($P<0.01$), 因此姜黄素可能通过影响 F-actin 的重排进而使细胞骨架结构受到破坏后, 细胞的正常形态不能维持, 诸多正常的生命活动被迫终止, 不可避免地走向死亡。

目前, Ras/Rho/ROCK2 信号通路在细胞骨架中的调节作用日益受到关注。Ras 是 Rho 上游的诱导

因子, 其诱导的 RhoA 激活与肿瘤的侵袭和转移有关。Ras 转染后, 癌细胞的 F-actin 染色增强, 迁移能力增加, 二者强度与 Rho 激酶活性成正相关。因此, Ras 和(或)RhoA 可以调节细胞骨架作用促进肿瘤侵袭^[8]。ROCK2 是 Rho 下游的重要效应分子 Rho 激酶的异构体之一, 与实体肿瘤侵袭和转移关系密切。研究发现, ROCK2 在进展期癌细胞的边缘呈现高表达。在正常细胞中, ROCK2 定位于肌动蛋白细胞骨架, 但在癌细胞中, ROCK2 则聚集于细胞边缘, ROCK2 聚集与侵袭伪足的分布相一致。ROCK2 有促进细胞阿米巴样运动的作用, 并且可能受局部理化环境的影响。在沉默 ROCK2 基因后, MMP-2 和 MMP-13 活性显著降低并导致肿瘤侵袭性下降。因此有理由认为, 在肿瘤细胞内 ROCK2 有调节细胞骨架重塑和蛋白水解酶分泌并协同完成侵袭过程的功能^[9]。p-ROCK2 即磷酸化的 ROCK2。ROCK2 接受 Rho 传递的活化信号, 发生多个氨基酸位点的磷酸化而激活, 从而介导其下游一系列磷酸化/脱磷酸化反应。本实验证实姜黄素可剂量依赖性地抑制 Rho/ROCK 信号通路的效应分子 ROCK2 及 p-ROCK2 蛋白活性。

综上所述, Rho/ROCK 信号通路参与细胞骨架纤维的形成和细胞形态的维持, 姜黄素可诱导鳞癌细胞骨架改变, 其作用机制可能与抑制 Rho/ROCK 信号通路的效应分子 ROCK2 及 p-ROCK2 活化有关。

参考文献:

[1] Oliva IB, Coelho RM, Barcellos GG, et al. Effect of

RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos [J]. *Toxicol*, 2007, 50 (8) : 1053-1063.

[2] Rosel D, Brabek J, Tolde O, et al. Up-regulation of Rho / ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6 (9):1410-1420.

[3] 熊晖, 姚运红, 孙宁, 等. 姜黄素对入鼻咽癌细胞 CNE-2Z 细胞骨架的影响[J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2009, 30 (3):365-368.

[4] 陈方园, 陈清勇, 吴丽君. 姜黄素对人肺癌 A549 细胞凋亡及细胞微丝骨架改变影响的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(2):96-99.

[5] Rathinam R, Berrier A, Alahari SK. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression[J]. *Front Biosci*, 2011, 16:2561-2571.

[6] 王华, 周滨, 郭星, 等. 人参皂苷 Rh2 对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖和细胞骨架的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(6):1226-1229.

[7] 刘柳, 沈志忠, 朴仲贤, 等. 以鼠腹腔微环境研究三氧化二砷对食管癌 EC109 细胞骨架的影响 [J]. *汕头大学学报: 自然科学版*, 2012, 27(4):37-45.

[8] Chang HR, Huang HP, Kao YL, et al. The suppressive effect of Rho kinase inhibitor, Y-27632, on oncogenic Ras /RhoA induced invasion /migration of human bladder cancer TSGH cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 183(1) : 172-180.

[9] Vishnubhotla R, Sun S, Huq J, et al. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging[J]. *Lab Invest*, 2007, 87(11) : 1149-1158.

第十一次全国口腔医学计算机应用学术会议通知

由中华口腔医学会口腔医学计算机专委会主办, 上海交通大学医学院附属第九人民医院承办的第十一次全国口腔医学计算机应用学术会议, 将于 2013 年 8 月 15 日在上海光大会展中心光韵 3 号厅召开。参会者可获得学会级 I 类学分 2 分。

会议主要内容: 口腔修复 CAD/CAM 系统标准专题研讨。标准的制定对口腔行业的研究、开发、临床应用、国有化 CAD/CAM 系统、用户选型等诸多方面将产生较大的影响, 届时将邀请国家标准委、中国医疗器械行业协会和口腔医疗器械材料标准委员会的相关专家, 介绍标准制定的有关规定、要求与编制流程。并邀请 CAD/CAM 主要厂商代表介绍各自的企业标准现状。

会议注册费: 中华口腔医学会(CSA)会员 800 元, 非会员 900 元, 学生/护士 400 元。

您若身为专委会委员(含青年委员)请务必参会, 请于 2 周内回复专委会工作秘书赵建江老师。

E-mail: j.j.zhao@263.net. 电话: 010-62188981. 地址: 北京市海淀区中关村南大街 22 号, 北京大学口腔医学院科研楼 5009.

中华口腔医学会口腔医学计算机专委会