



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.023
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3769.shtml

· 简要论著 ·

姜黄素对人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 增殖和转移的影响

李勇¹, 肖雅玲¹, 陈朝晖¹, 黎明¹, 李青玲¹, 邹欣¹, 周海燕²

(1. 湖南省儿童医院 普外二科, 湖南 长沙 410007; 2. 中南大学基础医学院 病理学系, 湖南 长沙 410013)

摘要

目的: 探讨姜黄素对人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 体外增殖和侵袭力的影响。

方法: 不同浓度的姜黄素 (10, 20, 30, 40, 50 μmol/L) 处理 HepG2 不同时间 (6, 12, 24, 48, 72 h) 后, 用 MTT 法检测细胞的增殖情况; 用上述浓度的姜黄素作用 HepG2 后, 分别采用细胞黏附人工重组基底膜法检测细胞的黏附能力, 用 Transwell 法检测细胞的趋化能力。

结果: MTT 结果显示, 姜黄素能明显抑制 HepG2 细胞的增殖, 且呈时间与浓度依赖性; 姜黄素能明显抑制 HepG2 细胞的黏附与趋化能力, 并呈一定的浓度依赖性。

结论: 姜黄素能有效抑制人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 体外增殖及侵袭转移能力, 可望作为肝母细胞瘤患者潜在的化疗辅助药物之一。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(1):117-120]

关键词

肝肿瘤; 肝母细胞瘤; 姜黄素; 细胞增殖; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.7

肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB) 是儿童最常见的肝脏恶性肿瘤, 其在腹腔恶性肿瘤中发病率仅次于肾母细胞瘤及神经母细胞瘤而位居第 3 位^[1-2], 寻找安全低毒的化疗药物是目前研究热点之一^[3]。

姜黄素 (curcumin) 是从姜科姜黄属植物姜黄、郁金、莪术的根茎中提取的一种天然酚类色素, 属二苯基更烃类化合物。近年研究发现, 姜黄素抑制多种肿瘤细胞生长^[4-5], 其对白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、食管癌、胰腺癌、结直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌等的作用已在动物或临床试验中得到广泛证实。姜黄素抗肿瘤作用包括抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞凋亡及分化、抗侵袭转移及放疗化疗增敏作用等。关于姜黄素能否对肝母细胞瘤发挥抗肿瘤作用, 国内外目前罕见报道。本研究以体外培养人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 为研究对象, 探讨不同浓度姜黄素对其增殖及侵袭转移的体外作用, 为临床应用姜

黄素治疗肝母细胞瘤提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 购自上海细胞生物所。姜黄素、二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; 杜贝克氏改良依格尔 (DMEM) 高糖培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 胰酶购自美国 HyClone 公司; 基质胶 (matrigel) 购自美国 BD 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自中国武汉博士德生物工程有限公司; Transwell 小室购自美国 Costar 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HepG2 细胞培养及姜黄素的配制 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中。37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度孵箱培养。细胞经 0.25% 胰酶消化传代, 取对数生长期的细胞进行培养。姜黄素先用 DMSO 配成原液, 分装冻存, 临用时再用无血清 DMEM 高糖培养基稀释成所需浓度, DMSO 终浓度为 0.1%。预实验表明, 0.1%

收稿日期: 2013-02-25; 修订日期: 2013-05-27。

作者简介: 李勇, 湖南省儿童医院主治医师, 主要从事小儿肿瘤外科方面的研究。

通信作者: 周海燕, Email: yanhaizhou78@163.com

DMSO 对细胞生长无明显影响。

1.2.2 MTT 比色法 参照博士德公司的 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒说明书进行。调整处于对数期细胞悬液浓度，铺板于 96 孔板（每孔 100 μL ），使待测细胞密度至 3 000/孔；37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 孵育至细胞单层铺满孔底，并加入不同浓度姜黄素（10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$ ）处理不同时间（6, 12, 24, 48, 72 h）；加入 MTT（每孔 10 μL ），37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养 4 h；加入 Formazan 溶解液（每孔 100 μL ），置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解后在酶联免疫检测仪 490 nm 测定吸光度。同时分别设置调零孔和对照孔。每组设 5 个平行孔。癌细胞增殖活性抑制率（%）=（1-实验组平均吸光度 / 对照组平均吸光度） \times 100%。

1.2.3 细胞黏附实验 参照文献^[6]方法进行。96 孔板预铺 matrigel（每孔 10 μL ，1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ），室温干燥。加入牛血清清蛋白（每孔 2 μL ，2%），于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 孵育 1 h 后，磷酸盐缓冲液（PBS）液洗 2 次，待用。用 DMEM 高糖培养基将处于对数生长期的 HepG2 细胞调整为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ ，将细胞悬液接种于预包被 matrigel 的 96 孔培养板中（每孔 100 μL ），同时加入不同浓度姜黄素（10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$ ），并设对照组（溶剂对照）。于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 孵育 1 h 后，弃培养液，PBS 轻轻吹洗 3 次除去未黏附的细胞。弃去 PBS，加入无血清 DMEM 高糖培养基（每孔 100 μL ）和 MTT（每孔 10 μL ），于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 孵育 4 h。加入 Formazan 溶解液（每孔 100 μL ），置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 测定吸光度。每组设 5 个平行孔。

细胞黏附率（%）=（实验组平均吸光度 - 空白对照组平均吸光度）/ 细胞对照组平均吸光度 \times 100%，抑制率（%）=（1-实验组细胞黏附率 / 对照组细胞黏附率） \times 100%。

1.2.4 细胞趋化实验（Transwell 法） 参照文献^[7]方法进行。在 Transwell 下室（24 孔培养板内）每孔加入 600 μL DMEM 高糖培养基。用该培养基将处于对数生长期的 HepG2 细胞调整为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ，将细胞悬液加入 Transwell 下室中（每孔 100 μL ），同时在小室内加入不同浓度姜黄素（10~50 $\mu\text{mol/L}$ ），并设对照组（溶剂对照）。将小室置于已加培养基的 24 孔培养板中。

37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 孵育 24 h。将 Transwell 小室取出后用粘有生理盐水的棉签擦净 Transwell 小室上表面未穿过膜的细胞；于 0.1% 结晶紫中浸泡染色 30 min，PBS 漂净。显微镜下照相计数侵袭细胞数；每室计数上下左右中 5 个不同视野透过的细胞数，计算平均值。每组平行设 3 个小室。抑制率（%）=（对照组侵袭细胞数 - 实验组侵袭细胞数）/ 对照组侵袭细胞数 \times 100%。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件包对数据进行统计分析。所有数据均以均数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。组间均数两两比较采用单因素方差分析，两样本均数间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 HepG2 细胞增殖的影响

对照组 HepG2 细胞体外生长活跃。不同浓度姜黄素（10~50 $\mu\text{mol/L}$ ）处理不同时间（6, 12, 24, 48, 72 h）之后，HepG2 细胞生长均不同程度地受到抑制，并呈时间和浓度依赖性趋势，统计分析显示，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）（图 1）。

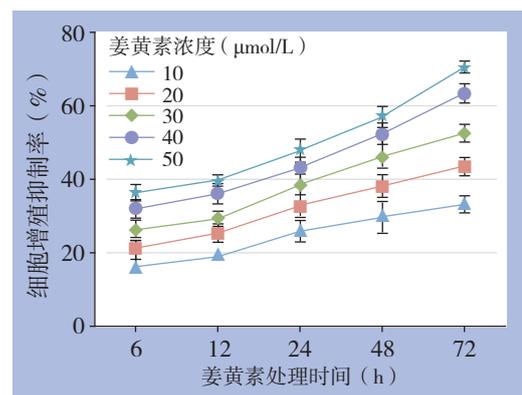


图 1 姜黄素对人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 细胞增殖的抑制作用

2.2 姜黄素对 HepG2 细胞黏附能力的影响

不同浓度姜黄素（10~50 $\mu\text{mol/L}$ ）对 HepG2 细胞黏附能力的抑制率分别为：（15.64 \pm 1.64）%，（26.43 \pm 2.13）%，（32.53 \pm 2.76）%，（40.06 \pm 2.54）% 及（49.65 \pm 3.12）%，与对照组（4.67 \pm 0.98）% 比较，均有统计学差异（其 t 值

分别为: 12.84, 20.75, 22.39, 29.07, 34.34, 均 $P < 0.0001$); 并在 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈现浓度依赖趋势 (均 $P < 0.01$) (图 2)。

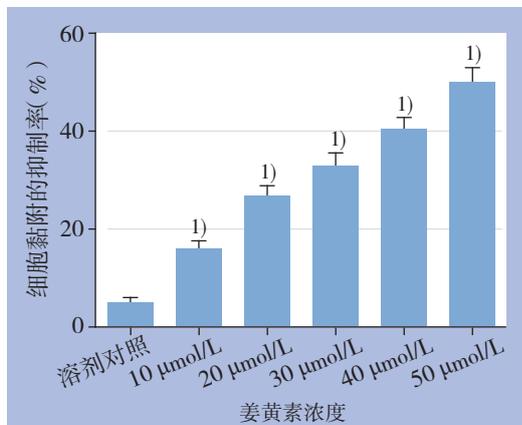


图 2 姜黄素对 HepG2 细胞株黏附的抑制作用
1) 与对照组比较, $P < 0.05$

2.3 姜黄素对 HepG2 细胞趋化能力的影响

不同浓度姜黄素 (10~50 $\mu\text{mol/L}$) 对 HepG2 细胞趋化能力的抑制率依次为 (11.05 \pm 17.38)%, (18.77 \pm 16.72)%, (31.40 \pm 11.70)%, (34.56 \pm 14.34)% 及 (45.43 \pm 11.22)%, 与对照组 (12.98 \pm 13.25)% 相比, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理组有统计学差异 (其 t 值依次为: 4.035, 4.280 和 7.237, 均 $P < 0.01$) (图 3)。

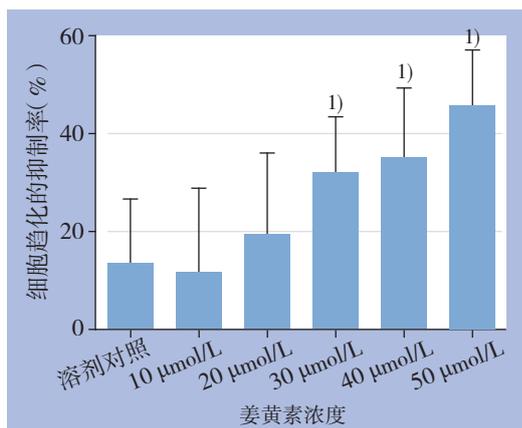


图 3 姜黄素对 HepG2 细胞趋化的抑制作用
1) 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

肝母细胞瘤是儿童时期最常见的肝脏恶性实体肿瘤, 其恶性程度高, 瘤体生长迅速, 且易广泛浸润和转移, 就诊时多数病例已不能完整切除肿

瘤, 且放疗效果及应用也很有限, 因此术前术后全身性化疗是一项重要的辅助治疗措施^[1-3]。目前用于肝母细胞瘤的常规化疗药物 (顺铂、环磷酰胺、长春新碱以及放线菌素 D 等) 一般都有较为严重的毒副作用, 在杀死肿瘤细胞的同时也对患儿正常细胞产生细胞毒作用, 影响组织器官功能, 往往难以坚持治疗; 且小儿全身化疗的毒副反应本身比成人更为多见和严重, 化疗药物对长期生存患儿的远期影响亦未明确^[3]。因此, 寻找安全低毒药理作用广泛的天然药物成为该领域研究热点之一。

姜黄素在自然界广泛存在且易于提取, 原料成本低廉, 安全低毒, 是一种具有良好发展前景的天然抗癌药物。目前姜黄素抗肿瘤已成为研究热点, 其抗多种恶性肿瘤的作用已在动物或临床试验得到广泛证实, 并已深入至分子机制^[8-11]。姜黄素通过各种机制抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导其凋亡、分化, 抑制肿瘤血管新生及侵袭转移等。近年来认为姜黄素主要通过以下分子机制发挥抗肿瘤作用: 下调细胞表面肿瘤发生发展相关受体, 包括表皮生长因子受体 1 (EGFR/erbB1), 表皮生长因子受体 2 (HER2/erbB2), 钙黏蛋白 β (β -catenin) 等的表达水平, 从而影响其与下游效应分子的相互作用; 同时, 姜黄素亦能下调细胞内信号转导分子, 包括信号转导及转录激活因子 (STATs), 转录因子 c-jun 和活化蛋白 -1 (c-jun/AP-1), 磷脂酰肌醇 3 激酶/Akt (PI3K/Akt), 核因子 κ B (NF- κ B) 及其众多下游靶基因如白介素 6 (IL-6)、环氧合酶 2 (COX-2)、基质金属蛋白酶 (MMPs) 等的表达水平^[8-11]。另外, 许多临床前期试验研究^[12-14]表明, 姜黄素单药或与其他药物联合使用均有显著的预防和治疗肿瘤的作用。而且, 姜黄素对许多耐药的恶性肿瘤也有明显的治疗作用^[15-16]。总之, 许多临床试验证明了姜黄素对多种恶性肿瘤具有潜在的应用价值。

本实验通过体外培养人肝母细胞瘤细胞株 HepG2, 采用 MTT 法检测不同浓度姜黄素对 HepG2 细胞增殖的影响, 发现姜黄素显著抑制肝母细胞瘤的增殖; 以细胞黏附人工重组基底膜实验检测不同浓度姜黄素对 HepG2 细胞黏附能力的影响, 采用 Transwell 法检测姜黄素对 HepG2 细胞趋化运动能力的影响, 结果表明, 姜黄素显著抑制肝母细胞瘤的侵袭转移。本实验表明姜黄素能对

肝母细胞瘤发挥抗肿瘤的药理学效应，这为临床应用姜黄素治疗肝母细胞瘤提供了初步实验依据。但关于姜黄素对肝母细胞瘤发挥抗肿瘤效应的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ries LAG, Smith A, Gurney JG, et al. Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975–1995[M]. Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER Program; 1999. NIH publication 99–4649.
- [2] Roebuck DJ, Perilongo G. Hepatoblastoma: an oncological review[J]. *Pediatr Radiol*, 2006, 36(3):183–186.
- [3] Trobaugh-Lotrario AD, Katzenstein HM. Chemotherapeutic approaches for newly diagnosed hepatoblastoma: past, present, and future strategies[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012, 59(5):809–812.
- [4] Kuttan G, Kumar KB, Guruvayoorappan C, et al. Antitumor, antiinvasion, and antimetastatic effects of curcumin[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595:173–184.
- [5] Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(11):1631–1652.
- [6] Li L, Ahmed B, Mehta K, et al. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4):1276–1282.
- [7] Wolanin K, Magalska A, Mosieniak G, et al. Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(7):457–469.
- [8] Zambre AP, Kulkarni VM, Padhye S, et al. Novel curcumin analogs targeting TNF-induced NF-kappaB activation and proliferation in human leukemic KBM-5 cells[J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(21):7196–7204.
- [9] Bharti AC, Donato N, Singh S, et al. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and I-kappaB kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis[J]. *Blood*, 2003, 101(3):1053–1062.
- [10] Aoki H, Takada Y, Kondo S, et al. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways[J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(1):29–39.
- [11] Kunnumakkara AB, Guha S, Krishnan S, et al. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8):3853–3861.
- [12] Slusarz A, Shenouda NS, Sakla MS, et al. Common botanical compounds inhibit the hedgehog signaling pathway in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(8):3382–3390.
- [13] Barve A, Khor TO, Hao X, et al. Murine prostate cancer inhibition by dietary phytochemicals – curcumin and phenethylisothiocyanate[J]. *Pharm Res*, 2008, 25(9):2181–2189.
- [14] Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, et al. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11(6):535–540.
- [15] Labbozzetta M, Notarbartolo M, Poma P, et al. Curcumin as a possible lead compound against hormone-independent, multidrug-resistant breast cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155:278–283.
- [16] Zhang J, Zhang T, Ti X, et al. Curcumin promotes apoptosis in A549/DDP multidrug-resistant human lung adenocarcinoma cells through an miRNA signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(1):1–6.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式：李勇，肖雅玲，陈朝晖，等. 姜黄素对人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 增殖和转移的影响 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1):117–120. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.023
Cite this article as: LI Y, XIAO YL, CHEN ZH, et al. Effects of Curcumin on proliferation and metastasis of human hepatoblastoma cell line HepG2 in vitro [J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(1):117-120. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.023