

姜黄素对肝癌细胞 HepG2 的抗癌作用及 P21WAF1/CIP1 表达的影响

李胜昔¹ 曾斌^{2△} 石巍² 廖爱军² 曹文涛²

(1 娄底市中心医院 湖南 娄底 417000 2 南华大学第一附属医院消化内科 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:探讨姜黄素对肝癌 HepG2 细胞抗癌作用及相关周期蛋白依赖激酶抑制因子 P21^{WAF1/CIP1} 表达的影响。方法:体外培养肝癌 HepG2 细胞,用 MTT 法检测姜黄素对 HepG2 细胞的抑制作用,以 RT-PCR 方法检测 HepG2 细胞中 P21^{WAF1/CIP1} mRNA 的表达,用免疫细胞化学检测其 P21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达。结果:姜黄素呈时间剂量性抑制 HepG2 细胞的生长,并显著上调 HepG2 细胞中 P21^{WAF1/CIP1} mRNA 和蛋白的表达。结论:姜黄素能抑制 HepG2 细胞的生长,并上调其中 P21^{WAF1/CIP1} 的表达。

关键词 姜黄素;肝癌细胞;P21WAF1/CIP1

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)14-2658-03

Effects of Curcumin in Inhibition of Growth of Hepatoma HepG2 Cells and Expression of P21WAF1/CIP1

LI Sheng-xi¹, ZENG Bin^{2△}, SHI Wei², LIAO Ai-jun², CAO Wen-tao²

(1 Loudi Central Hospital, Loudi Hunan, China, 417000;

2 Department of Gastroenterology of The First Affiliated Hospital of Nanhun University, Hengyang Hunan 421001 China)

ABSTRACT Objective: To study the anticancer activities of curcumin on human liver carcinoma cell line HepG2 and the effects of express of P21^{WAF1/CIP1}. **Methods:** Human liver carcinoma HepG2 cell line was cultured in vitro, proliferation inhibitory effect was tested by MTT assay. The express of P21^{WAF1/CIP1} mRNA was determined by RT-PCR and the express of P21^{WAF1/CIP1} protein was measured by immunohistochemistry. **Result:** The proliferation of HepG2 cells was inhibited by curcumin with dose and time-related effects, Curcumin significantly improve the express of P21^{WAF1/CIP1} mRNA and protein. **Conclusion:** Curcumin can inhibit The proliferation of Human liver carcinoma HepG2 cell line and improve the expressION of P21^{WAF1/CIP1} mRNA and protein.

Key words: Curcumin; Liver carcinoma cell; P21^{WAF1/CIP1}

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2658-03

前言

姜黄素为中药姜黄的主要活性成分之一,其药理作用广泛,主要有抗炎、抗氧化、抗凝、降血脂、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗突变等^[1]。近年来其抗肿瘤作用成为国内外研究热点,国外研究所已发现姜黄素是预防结肠癌、乳腺癌、肺癌和前列腺癌最有前途的药物之一^[2-3]。最近我们亦观察不同浓度姜黄素对肝癌 Hep2 细胞的生长抑制和相关周期蛋白依赖激酶抑制因子 P21WAF1/CIP1 的影响,旨在进一步阐明姜黄素的抗肿瘤机制,为其用于肝癌的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品和主要试剂

姜黄素溶液,甲氮甲唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司, RPMI1640 培养基为 GIBCO 公司产品,优质胎牛血清购自天津灏洋。RNA 提取试剂盒、MMLV 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒购自

上海生工生物公司。P21 小鼠单克隆抗体、SP 试剂盒及 DAB 试剂均购自长沙力康生物有限公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞由南华大学肿瘤研究所提供,培养基为含 10%胎牛血清的 RPMI1640,置 37℃5%CO₂ 的孵箱内培养。48 小时传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 比色实验

用 0.25%胰酶消化处于对数生长期的 HepG2 细胞,将其悬液浓度调整为 5×10^6 个/ml,每孔 200μl 接种于 96 孔板,每组设 6 个平行孔,待 24 h 细胞贴壁后更换培养液,分别以终浓度为 25、50 和 100μmol/l 姜黄素的 RPMI1640 培养液 100μl 作用细胞,对照组加 100μl 完全培养基。分别再培养 24、48、72 小时后,加入 MTT(5mg/ml)20μl,放置孵箱内 4 小时后弃上清,加入 10%的十二烷基磺酸钠(SDS)200μl 过夜,震荡 15 分钟,用酶联免疫检测各孔 570nm 处的吸光度值(A 值)。取 6 孔 A 值的均数按公式:抑制率(%)=(A 对照 - A 实验)/(A 对照) × 100%

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测 P21^{WAF1/CIP1} mRNA 的表达

分别用浓度为 25μmol·L, 50μmol·L, 100μmol·L 的姜黄素处理 HepG2 细胞 24 h 后,采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,获得的 RNA 按 MMLA 第一链 cDNA 合成试剂盒说明

作者简介:李胜昔,男(1975-),湖南娄底人,硕士研究生,主治医师,研究方向:肝癌的发病机制。Email:LSXWMT.616@163.com
△通讯作者:曾斌,男(1969-),医学博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为肝癌的发病机制和防治。
Email:zbss1229@163.com
(收稿日期:2011-03-22 接受日期:2011-04-18)

书合成 CDNA。P21^{WAF1/CIP1} 上游 5' CAGGGGACAGCAGAG-GAAGA3',下游 5'GGGCGGCCAGGGTATGTAC3',反应产物大小 335bp ,反应条件 94℃5 分钟(94℃1 分钟、58℃1 分钟、72℃1 分钟)30 个循环 72℃5 分钟 ;内参照 β -actin:上游 5'GAGAC-CTTCAACACCCAGCCA3 ,下游 5'GGCGTACAGGTCTTG-CGGATG3' ,反应产物大小 513 bp ,PCR 引物序列应用 Primer premier 510 软件自行设计 ,由上海博亚生物技术公司合成 ,扩增产物进行 1.7%琼脂糖凝胶电泳 ,采用凝胶成像系统测定各组 P21^{WAF1/CIP1}/ β -actin 的光密度比值表示 P21^{WAF1/CIP1}m RNA 的相对表达 ,作为半定量指标。

1.2.4 用免疫细胞化学法检测 P21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达

取对数生长期的 HepG2 细胞用 0.25%胰酶消化后稀释为 1x10⁵/ml ,每孔 5 ml 接种于 6 孔培养板 ,每培养孔放置直径 18mm 的无菌盖玻片 ,置 37℃5%CO₂ 及饱和湿度条件下 ,待 24 小时细胞贴壁生长后 ,吸除培养液 ,分别加入终浓度为 25、50、100 μ mol/l 姜黄素的 RPMI1640 培养液 ,继续培养 48 小时后去掉培养液 ,按照 SP 试剂盒说明操作 ,一抗、二抗孵育 ,DAB 显色。对照 :PBS 替代一抗作空白对照。免疫细胞化学检测以细胞

膜呈棕染或者胞浆有棕色颗粒者视为免疫阳性细胞 ,其结果判断 :采用 HPAIS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统计数网格中的阳性细胞数 ,每例计数 10 个网格 ,计算阳性细胞的百分率 ,并根据每张盖玻片阳性细胞着色深浅计分 ,无着色为 0 分(阴性) ,浅黄色为 1 分(弱阳性) ,棕黄色为 2 分(阳性) ,棕褐色为 3 分(强阳性) 。然后根据两者积分的乘积进行统计分析。

1.3 统计学处理

统计学方法 应用 SPSS 12.0 统计软件包。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,组间比较用方差分析和 q 检验,P<0.05 为差异有显著性 ,P<0.01 为差异有非常显著性。

2 结果

2.1 姜黄素对 HepG2 细胞生长的抑制作用 (表 1)

表 1 表明 不同浓度的姜黄素作用于 HepG2 细胞 24h,48h 后 ,姜黄素对 HepG2 细胞的抑制作用时间组之间比较 P<0.01 ,差异有非常显著性 ,各浓度组与对照组及各浓度组两两比较 ,P<0.01 差异也有非常显著性 ,表明姜黄素呈时间剂量依赖性抑制 HepG2 细胞的增值。

表 1 姜黄素对 HepG2 细胞的抑制作用

Tab.1 Proliferation inhibitory effect of curcumin on HepG2 cells

Group	24hA570	Inhibition ratio%	48hA570	Inhibition ratio %
Control	0.472 $\pm$ 0.012		0.478 $\pm$ 0.021 ^c	
Curcumin.(μ mol/l)				
25	0.365 $\pm$ 0.021 ^c	18.98	0.35 $\pm$ 0.022 ^c	26.42
50	0.295 $\pm$ 0.019 ^{cd}	38.55	0.206 $\pm$ 0.021 ^{cd}	56.11
100	0.278 $\pm$ 0.005 ^{cdh}	43.36	0.148 $\pm$ 0.021 ^{cdi}	69.38

注 :cp<0.01 ,姜黄素各浓度组与对照组比较;fp<0.01 ,姜黄素 50,100 μ mol/l 组与 25 μ mol/l 组比较;hp<0.01 ,姜黄素 100 μ mol/l 组与 50 μ mol/l 组比较;ip<0.01,48 小时姜黄素处理组与 24 小时姜黄素处理组比较

Note: cp<0.01 ,Curcumin compared with the control fp<0.01 ,Curcumin at 25 μ mol/l compared with50,100 μ mol/l fp<0.01 ,Curcumin at 50 μ mol/l compared with100 μ mol/l ip<0.01 ,48h group compared with 24h group

2.2 RT-PCR 检测肝癌 HepG2 细胞 P21^{WAF1/CIP1}m RNA 的表达 (图 1 表 2)

图 1 表 2 表示肝癌 HepG2 细胞经 25、50、100 μ mol/l Curcumin 处理 24h 后各浓度组 p21/ β -actin mRNA Ratio 与 control 组比较 P<0.01 ;各浓度组两两比较 P<0.01 ,表明肝癌 HepG2 细胞经姜黄素处理后 ,其 P21 mRNA 表达量随着药物浓度的增加逐步上升。

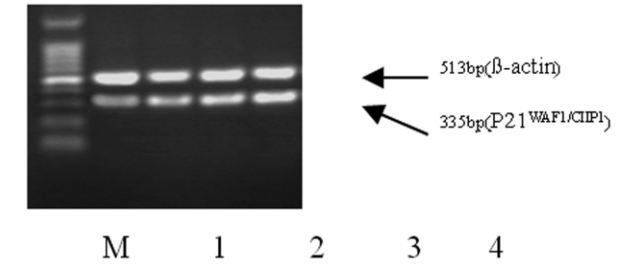


图 1 姜黄素对肝癌 HepG2 细胞 P21^{WAF1/CIP1}m RNA 的表达影响
M:标准参照物 1 对照组 2 25 μ mol/l 姜黄素 3 50 μ mol/l 姜黄素 4 :100 μ mol/l 姜黄素

Fig.1 RT-PCR analysis of P21^{WAF1/CIP1}m RNA expression in HepG2 cells treated with Curcumin M:marker 1 control 2 25 μ mol/l Curcumin 3 50 μ mol/l Curcumin 4 :100 μ mol/l Curcumin

表 2 姜黄素对肝癌 HepG2 细胞 P21^{WAF1/CIP1}m RNA 的表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 P21^{WAF1/CIP1}m RNA expression in HepG2 cells treated with Curcumin

Group	p21/ β -actin mRNA Ratio
Control	0.31 $\pm$ 0.18
25 μ mol/lCurcumin	0.62 $\pm$ 0.05#
50 μ mol/lCurcumin	0.81 $\pm$ 0.02#a
100 μ mol/lCurcumin	0.92 $\pm$ 0.03#ab

注 P#<0.01, 与对照组比较 ;Pa <0.01 ,姜黄素 50,100 μ mol/l 组与 25 μ mol/l 组比较; Pb<0.01 姜黄素 100 μ mol/l 组与 50 μ mol/l 组比较

Note: P#<0.01 ,Curcumin compared with the control; Pa <0.01 ,Curcumin at 25 μ mol/l compared with50,100 μ mol/l Pb <0.01 ,Curcumin at 50 μ mol/l compared with100 μ mol/l

2.3 免疫细胞化学检测 HepG2 细胞 P21 蛋白表达变化(图 2)

图 2 免疫组化图片结果显示 ,对照组 HepG2 细胞经 P21 抗体染色后 ,细胞膜和胞浆棕染较浅 ,其阳性积分为 10.15 $\pm$ 2.30 ;而经 25、50、100 μ mol/l 姜黄素处理 HepG2 细胞 48 小时后 ,细胞棕染较深 ,其阳性积分分别为 16.02 $\pm$ 2.75、21.05 $\pm$

3.65、27.12± 9.45 ,各组与对照组比较 $P<0.01$,各组两两比较, 物浓度的增加逐步上升。
 $P<0.01$,表明细胞经姜黄素处理后 ,其 P21 蛋白表达量随着药

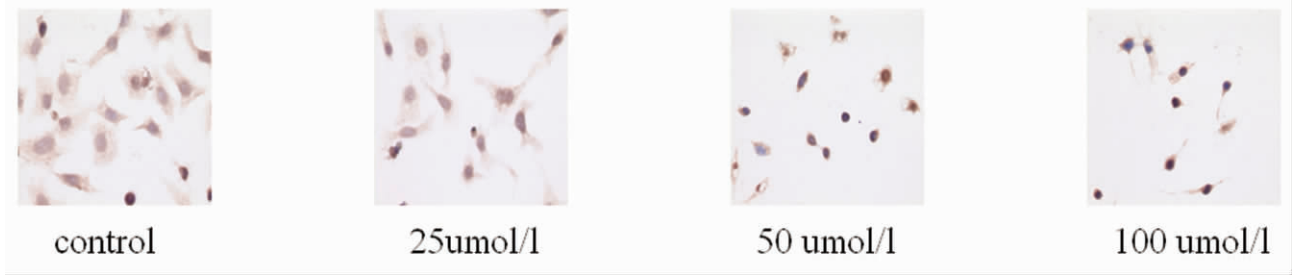


图 2 姜黄素对肝癌 HepG2 细胞蛋白表达的影响(sp × 400)

Fig.2 Expression of P21 protein in HepG2 cells treated with Curcumin(sp × 400)

3 讨论(Discuss)

肝癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,随着慢性肝炎、肝硬化发生率的提高,其发病率也不断上升,且确诊时常常已到晚期,预后差,严重威胁着人类健康。目前肝癌的病因及发病机制尚不完全清楚。对肝癌治疗的放、化疗方案又都伴有明显的不良反应,患者往往因无法忍受这些不良反应而中途放弃治疗,而中医药提取物象白藜芦醇、联苯双酯等以其低毒性、低不良反应、成为肿瘤综合治疗的重要组成部分^[4-10]。

我们在实验中观察到姜黄素能明显抑制 HepG2 细胞的生长,而且抑制率在一定范围内与时间剂量成正相关。

P21^{WAF1/CIP1} 为细胞周期负调节因子,为抑癌基因,其基因启动子区富含嘧啶-鸟嘌呤-二磷酸核苷,启动子区的组蛋白去乙酰化可能是其抑癌的重要调节机制。一方面其能够广泛结合并抑制各种 cyclin /CDK 复合物的磷酸化活性,减少转录因子 E2F 的释放,最终使 DNA 合成受到抑制,导致细胞不能进入 S 期,停滞在 G1 期,从而抑制肿瘤细胞的生长;另一方面,它与 PCNA 结合,抑制 PCNA 复制 DNA 的活性^[11-15]。

本实验通过免疫细胞化学和半定量 RT-PCR 发现姜黄素作用后实验组 P21^{WAF1/CIP1} 的基因和蛋白水平较对照组明显升高 ($P<0.01$),提示姜黄素能激活抑癌基因 P21^{WAF1/CIP1} 的转录,增加 P21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达^[16]。

因此,姜黄素诱导抑癌基因 P21^{WAF1/CIP1} 的表达,可能是其明显抑制 HepG2 细胞生长的重要机制之一,而且由于其结构明确、低毒、高效,预示着在肝癌临床治疗应用中的广阔前景,但对其作用及作用机理仍需进行深入研究探讨。

参考文献(References)

- [1] 于冬青,邓华聪.姜黄素的药理研究进展[J].山东医药,2005,45 (2):72
- [2] Bhsrtia C, Shishodia S, Reuben JM, et al. Nuclear factor- κ B and STAT3 are constitutively active in CD138 + cells derived from multiple myeloma patients and suppression of these transcription factors leads to apoptosis[J]. Blood, 2004;103(8):3175-3184
- [3] Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far[J]. Eur J Cancer, 2005,41(13):1955-1968
- [4] Reddy ACP, Lokesh BR. Effects of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats[J]. Toxicology, 1996, 107(1):39
- [5] Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of

resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. Science, 1997, 275(5297): 218-220

- [6] 李鹏,李祺福等.肿瘤治疗的新途径:中药有效成分诱导恶性肿瘤细胞分化[J].生物学通报,2008,37(3):8-11
- [7] 刘志毅,刘耕陶,联苯双酯对人肝癌细胞株的诱导分化作用[J].中华医学杂志,2005,75(11):676-678
- [8] Lee Y, Lim J W, Kim YM, et al. Induction of alpha1 - acid glycoprotein mRNA by cyto-kines and differentiation in human colon carcinoma cell [J]. MolCells, 2005,11(2):164-166
- [9] Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Involvement of the retinoblastoma (pRb) 2E2F /DP path-way during-antiproliferative effects of resveratrol in human epidermoid carcinoma(A431) cells[J]. BiochemBiophys Res Commun, 2006, 288 (3): 579 - 585
- [10] Park JW, Xhoi YJ, Jang MA, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells [J]. Cancer Lett, 2004, (1):43-49
- [11] Zhang H, Ciong Y, Beach D. Proliferation cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes [J]. Mol Biol Cell, 2003, 4 (9): 897-906
- [12] Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, et al. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G (1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A 431 cells [J]. Clin Cancer Res, 2003,7(5):1466-1473
- [13] Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Involvement of the retinoblastoma (pRb)-E2F/DP pathway during antiproliferative effects of Resveratrol in human epidermoid carcinoma (A431) cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,288(3):579-585
- [14] Liang YC, Tsai SH, Chen L, et al. Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34 CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cell[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(7):1053-1060
- [15] Kotha A, Sekharam M, Cilenti L, et al. Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein [J]. Mol Cancer Ther, 2006,5(3):621-629
- [16] Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Involvement of the retinoblastoma (pRb) 2E2F /DP pathway during antiproliferative effects of curcumin in human epidermoid carcinoma (A431) cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 288 (3): 579 - 585