

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.017

槲皮素、姜黄素对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡作用的比较

Quercetin and curcumin: a comparison of effects on proliferation and apoptosis of hepatocarcinoma HepG2 cells

周进¹, 方丽², 姚文秀¹, 赵新¹, 魏阳¹, 周行¹, 谢华¹, 王理扬¹ (1. 四川省肿瘤医院 内科二病区, 四川 成都 610041; 2. 成都医学院 第一附属医院 消化内科, 四川 成都 610500)

[摘要] 目的: 探讨槲皮素和姜黄素对人肝癌 HepG2 细胞株增殖及凋亡的作用。方法: 不同质量浓度的槲皮素(0、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$)和姜黄素(0、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)分别作用 HepG2 细胞 24、48、72 h, 以 As_2O_3 (0、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)为阳性对照, MTT 法检测 HepG2 细胞的增殖, 流式细胞术检测 HepG2 细胞的凋亡。结果: 槲皮素、姜黄素及 As_2O_3 作用后, HepG2 细胞形态发生变化, 生长速率变慢, HepG2 增殖率随着时间和药物浓度的增加逐渐减低, 72 h 时 3 种药物高浓度组 HepG2 细胞增殖率分别为 $(31 \pm 5.8)\%$ 、 $(51 \pm 4.6)\%$ 、 $(54 \pm 5.8)\%$ 。槲皮素和姜黄素均有明显的促凋亡作用, 并呈时间和浓度依赖性; 高浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)槲皮素作用最强, 相同浓度下的姜黄素与 As_2O_3 作用相当。结论: 槲皮素和姜黄素能明显抑制 HepG2 细胞增殖, 促进其凋亡, 并且这种作用强于 As_2O_3 。

[关键词] 槲皮素; 姜黄素; 肝癌; HepG2 细胞; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0324-03

恶性肿瘤的发生、发展是一个多因素多步骤的过程, 其治疗已从单一的外科、放疗、化疗逐步过渡到综合治疗。紫杉类药物的出现使肺、乳腺、妇科恶性肿瘤的治疗取得了一定的进展, 也让人们对植物来源小分子物质的潜在抗肿瘤作用充满期待^[1]。黄酮类小分子槲皮素和姜黄素来源广泛, 价格相对低廉, 毒性作用轻微, 是目前肿瘤研究的热点之一。肝癌是常见的恶性肿瘤, 发病率高, 预后极差, 其早期诊断困难、手术机会低、对放射及化疗均不敏感, 迫切需要寻求新的治疗方法。既往研究^[2-3]发现, 槲皮素与姜黄素对人肝癌细胞均有明显抑制作用。三氧化二砷(As_2O_3)是目前临床治疗肝癌的常用药物, 作用确切。本研究以 As_2O_3 为对照^[4-5], 对槲皮素和姜黄素的促 HepG2 细胞凋亡和抑制增殖的作用进行比较, 考察它们在肝癌治疗中的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

槲皮素购自 Sigma 公司, 批号为 No. 051K1225。姜黄素购自成都思科华试剂公司, 纯度 >98%, 批号为 No. 0823-9802, 使用时溶解于 DMSO, 由 DMEM 培养基稀释成所需浓度(DMSO 终浓度小于 0.1%)。DMEM 培养基、FBS 购自美国 Gibco 公司, 胰蛋白酶(Tyrosine)购自 Sigma 公司。肝癌细胞株 HepG2 购自 ATCC 公司。

1.2 MTT 法检测槲皮素、姜黄素对 HepG2 细胞增殖的作用

实验分为槲皮素、姜黄素、 As_2O_3 和空白对照组 4 组。槲皮素组浓度分别为 10、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$, 姜黄素组浓度为 2、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$, As_2O_3 组浓度分别为 2、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 。调整 HepG2 细胞密度至 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 。取 96 孔板, 每孔加入 200 μl 细胞悬液, 培养 24 h 后弃去培养液, 每孔体积 200 μl 。加入各组对应的药物, 分别培养 24、48、72 h 后加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl , 37 $^\circ\text{C}$ 继续孵育 4 h 后终止培养, 弃上清, 每孔加入 100 μl DMSO, 摇床振荡 10 min, 全自动酶标仪(490 nm)测定各孔的光密度值(D), 计算细胞增殖率。细胞增殖率(%) = 药物组 D / 空白对照组 $D \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.3 流式细胞术检测槲皮素、姜黄素对 HepG2 细胞凋亡的作用

取对数生长期的 HepG2 细胞, 培养 24 h 后去上清, 分别加入不同浓度槲皮素、姜黄素后, 继续培养 24、48、72 h, 胰酶消化, PBS 洗涤细胞 2 次, 离心 10 min, 弃上清。70% 乙醇 4 $^\circ\text{C}$ 固定过夜, 碘化丙啶避光染色 30 min。流式细胞仪上机检测, Listmode 软件分析 HepG2 细胞凋亡。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 软件, 单因素方差分析比较各组间差异, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表

[作者简介] 周进(1979 -)男, 四川省眉山市人, 主治医师, 硕士, 主要从事肿瘤的临床及基础研究。E-mail: fangzjt521@163.com

[通信作者] 方丽(FANG Li, corresponding author), E-mail: zhoujt521@163.com

示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素、姜黄素对 HepG2 细胞形态的影响

正常 HepG2 细胞贴壁紧密,生长迅速,胞质饱满;加入槲皮素、姜黄素和 As_2O_3 后,HepG2 细胞形态和增殖速率均发生较明显的变化。细胞内出现空泡,逐渐变圆,脱壁,细胞间间隙增大,增殖变慢,周

围碎片增多。且随着槲皮素、姜黄素作用时间和浓度的增加,上述变化愈加明显。

2.2 槲皮素和姜黄素抑制 HepG2 细胞的增殖

槲皮素和姜黄素均能明显抑制 HepG2 细胞的增殖,且具有剂量和时间依赖性(表 1)。在高浓度药物作用下,槲皮素抑制效果更强,姜黄素和 As_2O_3 抑制力相当。槲皮素和姜黄素的半数抑制浓度 (IC_{50})分别为 50、20 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 槲皮素和姜黄素抑制 HepG2 细胞的增殖(%)

药 物	时 间	0 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$
槲皮素	24 h	98 \pm 0.8	94 \pm 1.8	82 \pm 2.6	78 \pm 3.1*	72 \pm 3.6*
	48 h	96 \pm 1.2	88 \pm 2.3	75 \pm 3.6*	49 \pm 2.9**	48 \pm 4.1**
	72 h	88 \pm 1.8	81 \pm 3.5	61 \pm 4.9*	46 \pm 5.7**	31 \pm 5.8**
药 物	时 间	0 $\mu\text{mol/L}$	2 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$
姜黄素	24 h	99 \pm 0.4	96 \pm 0.6	91 \pm 1.3	85 \pm 1.6	79 \pm 2.9*
	48 h	94 \pm 1.1	91 \pm 2.1	86 \pm 2.1	75 \pm 3.1*	65 \pm 2.1**
	72h	86 \pm 2.1	86 \pm 3.9	78 \pm 4.2	63 \pm 5.4*	51 \pm 4.6**
药 物	时 间	0 $\mu\text{mol/L}$	2 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$
三氧化二砷	24 h	99 \pm 0.3	97 \pm 1.1	93 \pm 2.0	81 \pm 1.9*	76 \pm 2.1*
	48 h	95 \pm 1.4	89 \pm 1.8	84 \pm 4.1	76 \pm 3.2*	61 \pm 3.9**
	72 h	89 \pm 2.2	85 \pm 3.8	72 \pm 5.7*	66 \pm 4.6**	54 \pm 5.8**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$

2.3 槲皮素、姜黄素促进 HepG2 细胞的凋亡

流式细胞术检测结果(图 1)显示,槲皮素、姜黄素和 As_2O_3 均明显促进 HepG2 细胞凋亡。随着各组药物浓度增加,HepG2 细胞凋亡率逐渐增加。在中低浓度组,姜黄素和 As_2O_3 诱导凋亡能力强于槲皮素,但无明显统计学差异。而有效浓度支持下(50 $\mu\text{mol/L}$),48 h 时槲皮素促凋亡作用相对于 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度姜黄素和 As_2O_3 有明显提高($P = 0.021$ 和 $P = 0.043$)。

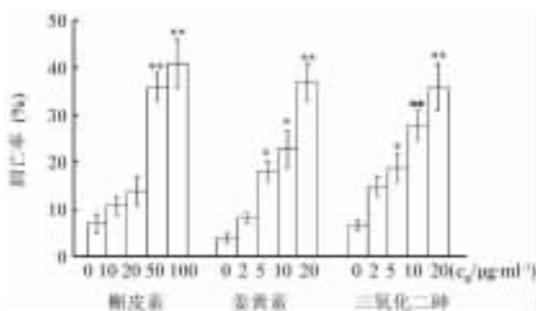


图 1 槲皮素、姜黄素作用 HepG2 细胞 48 h 凋亡率的比较

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$

3 讨论

植物来源小分子药物的抗肿瘤作用受到研究者的广泛关注,黄酮类物质槲皮素和姜黄素是其中的典型代表。槲皮素具有多种生物学活性,广泛存在于蔬菜、饮料、水果及 100 多种中草药中^[6]。体外及动物实验研究^[7]表明,槲皮素能抑制子宫内膜癌、前列腺癌、结肠癌、鼻咽癌、肺癌等多种肿瘤细胞的增殖。姜黄是一种常用中药,被广泛用于食品上色和佐味剂,姜黄素是其药用的主要有效成分。姜黄素可降低肿瘤的发生,抑制乳腺癌、肺癌、白血病等多种肿瘤细胞的增殖,并诱导细胞凋亡,具有明显的遏制肿瘤发生、发展的功效^[8-10]。

黄酮类物质有着相似的抗肿瘤机制:(1)干扰肿瘤基因表达。槲皮素可上调抑癌基因 $P21$ 、 $P53$ 表达,抑制 $AKT-1$ 、 Bcr 和 Ras 基因,减少突变型 $P53$ 表达^[11]。而姜黄素则通过抑制原癌基因 $MDM2$ 、 API 等抑制肿瘤细胞增殖^[12]。(2)抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、调节细胞周期分布。槲皮素对细胞周期的影响可能是通过与 $cyclin D2$ 基因

相互作用实现的^[13]。(3)抗肿瘤血管生成作用。VEGF是最重要的新生血管形成促进因子,能特异性地促进内皮细胞分裂,增加血管通透性。槲皮素和姜黄素通过与VEGF相互作用调节新生血管形成^[14-15]。(4)抗氧化作用。许多理化因素及氧化剂直接作用于嘌呤和嘧啶,使细胞DNA链断裂而诱发癌变。槲皮素、姜黄素均是强烈的抗氧化剂^[16-17]。(5)抗肿瘤转移。姜黄素能显著抑制B16F10小鼠高转移性黑素瘤细胞中的基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和局部连接酶的表达,与其抗肿瘤转移作用相关^[18]。近期研究^[19]发现,槲皮素可通过干扰HepG2细胞内黏附迁移相关基因的表达,发挥抗转移作用。

肝细胞癌是我国常见恶性肿瘤,并且由于发现晚、手术机会低、对放疗及化疗不敏感,如何对其采取更为有效的治疗是困扰临床工作者的难题之一。As₂O₃是目前治疗肝细胞癌的常用药物,然而由于其本身也是一种剧毒药物,不可避免在治疗同时伴随一些严重的毒性反应,如骨髓抑制、胃肠反应、肝肾功能损害等,限制了部分患者难以坚持完成治疗周期,从而未获得最大疗效。

本研究比较了槲皮素和姜黄素对HepG2细胞增殖和凋亡的作用,发现在足量浓度下,槲皮素对肝癌细胞的增殖抑制和凋亡促进效果均最为明显。而在同等浓度下,姜黄素与As₂O₃的抑制效果大体相当。由于黄酮类物质的天然低毒特性,槲皮素和姜黄素对肝脏恶性肿瘤治疗的潜在应用价值值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Henderson C, Berry DA, Demetri GD, et al. Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(6): 976-983.
- [2] Ana Belén GS, María AM, Laura B, et al. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2) [J]. *J Nutr*, 2006, 136(11): 2715-2721.
- [3] Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, et al. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(7): 875-896.
- [4] Hua H, Qin S, Rui J, et al. Pharmacokinetics of arsenic trioxide (As₂O₃) in chinese primary hepatocarcinoma patients [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(1): 61-65.
- [5] Chen C, Zhang Y, Wang Y, et al. Synergic effect of 3'-azido-3'-deoxythymidine and arsenic trioxide in suppressing hepatoma cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2011, 22(5): 435-443.
- [6] Löf D, Schillén K, Nilsson L. Flavonoids: Precipitation kinetics and interaction with surfactant micelles [J]. *J Food Sci*, 2011, 76(3): 35-39.
- [7] Ong CS, Tran E, Nguyen TT, et al. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions [J]. *Oncol Rep*, 2004, 11(3): 727-733.
- [8] Sen S, Sharma H, Singh N. Curcumin enhances vinorelbine mediated apoptosis in NSCLC cells by the mitochondrial pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4): 1245-1252.
- [9] 霍红梅, 张利元, 江家贵, 等. 姜黄素抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及其相关的氧化应激机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(5): 490-493.
- [10] 李剑明, 杨和平, 白中红, 等. 姜黄素可溶性制剂对小鼠结肠癌 C26 细胞在体诱导血管生成的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(1): 56-59.
- [11] Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors [J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(3): 438-442.
- [12] Li M, Zhang Z, Hill DL, et al. Curcumin, a dietary component, has anticancer, chemosensitization, and radiosensitization effects by down-regulating the MDM2 oncogene through the PI3K/mTOR/ETS2 pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 1988-1996.
- [13] 周进, 方丽, 高茜, 等. 槲皮素对 HepG2 细胞增殖及 cyclin D2 基因表达的观察 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(1): 6-9.
- [14] Tan W, Lin L, Li M, et al. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 459(3): 255-262.
- [15] Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, et al. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(4): 934-942.
- [16] Alía M, Ramos S, Mateos R, et al. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 212(2): 110-118.
- [17] Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, et al. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35(5): 475-484.
- [18] Banerji A, Chakrabarti J, Mitra A, et al. Effect of curcumin on gelatinase A (MMP-2) activity in B16F10 melanoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2004, 211(2): 235-242.
- [19] Zhou J, Liang SF, Fang L, et al. Quantitative proteomic analysis of HepG2 cells treated with quercetin suggests IQGAPI involved in quercetin-induced regulation of cell proliferation and migration [J]. *OMICS*, 2009, 13(2): 93-103.

[收稿日期] 2011-03-12

[修回日期] 2011-05-10

[本文编辑] 王莹