

• 药理与临床 •

姜黄素通过调控微管系统干扰 HepG2 细胞周期研究

江金环, 刘 莉, 皮 江, 杨 芬, 蔡继业*

暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632

摘 要: 目的 研究姜黄素对人肝癌 HepG2 细胞周期的影响及微管系统在其中的作用。方法 MTT 法检测姜黄素对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用; 流式细胞仪分析姜黄素对 HepG2 细胞周期分布的影响; 激光共聚焦显微镜观察姜黄素对 HepG2 细胞微管结构变化的影响; Western blotting 检测姜黄素对微管蛋白 α -tubulin 表达的影响; 在离体条件下, 观察姜黄素对微管蛋白聚合和解聚活性的影响。结果 姜黄素对 HepG2 细胞增殖具有抑制作用且与时间和剂量相关; 随着姜黄素浓度的升高, HepG2 细胞阻滞于 G₂/M 期的比例也逐渐增加; 激光共聚焦显微镜观察可见姜黄素明显破坏细胞微管结构, 改变细胞微管蛋白聚合状态的发生; Western blotting 检测发现细胞内 α -tubulin 蛋白表达的减弱与试药浓度相关。姜黄素还可影响微管蛋白聚合和解聚活性。结论 姜黄素通过破坏 HepG2 细胞的微管结构及下调微管蛋白 α -tubulin 的表达, 将 HepG2 细胞阻滞于 G₂/M 期, 从而抑制肝癌 HepG2 细胞的生长。

关键词: 姜黄素; HepG2 细胞; 细胞周期; 微管; 流式细胞仪

中图分类号: R282.710.5; R979.19

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)09-1144-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.015

Interference of curcumin in cycle of HepG2 cells by regulating microtubule system

JIANG Jin-huan, LIU Li, PI Jiang, YANG Fen, CAI Ji-ye

College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To investigate the effect of curcumin (Cur) on cycle in HepG2 cells and the action of microtubule system for it. **Methods** The proliferation inhibition of Cur on HepG2 cells was evaluated by MTT assay; The effect of Cur on the cycle of HepG2 cells was analyzed by flow cytometry; Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to observe the changes of microtubule in HepG2 cells after treated with Cur; Western blotting was performed to determine the expression of α -tubulin; The *in vitro* effects of Cur on tubulin polymerization and depolymerization activities were studied. **Results** Cur inhibited the proliferation of HepG₂ cells in a dose- and time-dependent manner. With Cur concentration increasing, the proportion of HepG2 cells arrested in G₂/M phase was also increased. CLSM showed that Cur could seriously destroy the cell microtubule structure and change the polymerization state of tubulin. Western blotting showed that the decrease of the expression level of α -tubulin was related to Cur concentration. Cur could also interfere the microtubule polymerization and depolymerization activities. **Conclusion** Cur could inhibit the proliferation of HepG2 cells by destroying the microtubule structure and downregulating the expression of α -tubulin, and make HepG2 cells arrested in G₂/M phase.

Key words: curcumin; HepG2 cells; cell cycle; microtubules; flow cytometry

姜黄素是一种酚类色素, 广泛存在于姜黄属植物的根茎中, 是中药姜黄的主要活性成分之一, 有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等作用, 对多种肿瘤细胞,

如胃癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌等细胞的产生、增殖、转移均有抑制作用^[1-7], 能够诱导癌细胞凋亡、阻滞癌细胞周期、损伤癌细胞线粒体以及调控某些

收稿日期: 2012-08-10

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2010CB833603); 海外及港澳学者合作研究基金资助项目(31129002); 暨南大学科研培育与创新基金研究项目(21612601)

作者简介: 江金环, 女, 硕士生, 研究方向为纳米技术与生物分析。Tel: (020)85223569 E-mail: jjhuan1116@163.com

*通信作者 蔡继业 Tel/Fax: (020)85223569 E-mail: tjycail@jnu.edu.cn

蛋白的表达^[8-9]。然而,姜黄素对细胞微管骨架系统的影响尚不清晰。微管是细胞骨架的重要组成部分,是由两种微管蛋白的异二聚体聚合而成的管状聚合物,在维持细胞形态、有丝分裂、细胞迁移等过程均起重要作用,因此微管为抗癌药物的靶点之一^[10-13]。本研究观察姜黄素对人肝癌 HepG2 细胞的微管系统的影响,以探讨其抑制肿瘤细胞生长的作用,为进一步阐明姜黄素抗肿瘤机制提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

姜黄素,质量分数>95%,批号 20110110,天津永大化学试剂公司;秋水仙碱、紫杉醇(质量分数 99%),Adamas Reagent 公司;二甲基亚砜(DMSO)、4%多聚甲醛、0.25%胰蛋白酶、MTT 粉末、Triton X-100、牛血清白蛋白(BSA),Sigma 公司;纯化牛脑微管蛋白(相对分子质量 5.5×10^4)、缓冲液(General Tubulin Buffer)、三磷酸鸟苷(GTP),Cytoskeleton 公司;高糖 DMEM 培养基,Gibco 公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程公司;细胞周期检测试剂盒,南京凯基科技发展有限公司;Tubulin-Tracker Red(微管红色荧光探针)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒,碧云天生物技术研究;α-微管蛋白(α-tubulin)鼠抗人单克隆抗体、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG,北京博奥森生物试剂有限公司。其他试剂均为国产分析纯,实验用水为 3 次蒸馏水。

1.2 细胞株

人肝癌 HepG2 细胞株,由暨南大学医学院生物化学教研室提供。

1.3 仪器

CO-150 型 CO₂ 细胞培养箱,美国 NBS 公司;高速多通道连续波长酶标仪,奥地利 Tecan Safire2 公司;FACSCalibur 流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;510 Meta 激光共聚焦显微镜,德国 Carl Zeiss 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞常规复苏后,用含 10%胎牛血清的高糖 DDM 培养液、37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。细胞贴壁生长,每隔 2 d 换液 1 次,以 2~3 d 以 1:3 传代 1 次。取对数生长期细胞,0.25%胰酶消化,细胞计数并用于实验。

2.2 药液制备

姜黄素用 DMSO 溶解为 100 μmol/L 的储存液,

然后用高糖 DMEM 培养基稀释成不同浓度(5、10、20、40、80 μmol/L)。

2.3 MTT 法检测 HepG2 细胞增殖

取对数生长 HepG2 细胞,按每孔 5×10^3 /mL 接种于两块 96 孔细胞培养板,每孔细胞悬液 100 μL,在 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,更换含 5、10、20、40、80 μmol/L 姜黄素的高糖 DMEM 培养基,对照组细胞不加任何药物,空白组不含细胞只加入培养基,每组各 5 个平行孔,一块 96 孔板中细胞培养 24 h,另一块培养 48 h。孵育完全后,每孔加入 MTT 溶液 10 μL,避光孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 150 μL DMSO,室温下振荡 5 min,酶标仪检测 570 nm 波长吸光度(A)值,求出平均值,计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = (A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

2.4 流式细胞术检测 HepG2 细胞周期

HepG2 细胞接种于 6 孔板中,培养 24 h 后每孔分别加入含 0、10、20、40 μmol/L 姜黄素的培养基 2 mL,每个浓度 3 个复孔,继续培养 24 h。收集细胞与培养基于 EP 管内,1 000 r/min 离心 5 min,去除上层液体,底层沉淀加入 PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL 70%冷乙醇,于 4℃下固定过夜,1 000 r/min 离心 5 min,沉淀细胞,吸去上层清液,底层沉淀 PBS 洗涤 2 次、染色,每管样品中分别加入 0.5 mL 缓冲液、25 μL PI 染色液和 10 μL RNaseA,充分混合并重悬细胞沉淀,37℃室温避光孵育 30 min,尼龙网滤过,流式细胞仪检测。

2.5 激光共聚焦显微镜检测 HepG2 细胞微管结构

调整 HepG2 细胞悬液浓度至 1×10^5 /mL,接种于放有灭菌盖玻片的 6 孔板中,细胞贴壁培养 24 h,每孔分别加入含 0、10、20、40 μmol/L 姜黄素的高糖 DMEM 培养基 2 mL,继续培养 24 h,吸去培养基,PBS 缓冲液洗涤 3 次,用 4%的多聚甲醛固定细胞 15 min 后,用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。用含有 1%~5% BSA 和 0.1% Triton X-100 的 PBS、按照 1:250 稀释 Tubulin-Tracker Red,每个玻片滴加 Tubulin-Tracker Red 染色稀释液约 200 μL,室温避光孵育 60 min,最后用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,封片后直接用激光共聚焦显微镜进行观察、拍照。

2.6 Western blotting 检测 α-微管蛋白的量

分别以姜黄素 0、10、20、40 μmol/L 作用 HepG2 细胞 24 h,收集细胞,加入预冷的 RIPA 裂解液提

取细胞总蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度。取蛋白样品 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 以 α -微管蛋白鼠抗人单克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用辣根酶标记山羊抗鼠 IgG 室温孵育 1 h, 最后进行 ECL 化学试剂反应, 暗室中 X 光片曝光, 定影, 显影, 获得清晰条带。

2.7 微管蛋白聚合-解聚动力学实验

用 General Tubulin Buffer 将纯化的牛脑微管蛋白粉末溶解为 10 mg/mL 的储备液, 冰浴, 在冰浴的酶标板上加入已溶解的微管蛋白, 然后加入 GTP 调节微管蛋白浓度至 100 mmol/L , 分别加入紫杉醇、秋水仙碱、姜黄素, 使其终浓度分别为 4、4、20 $\mu\text{mol/L}$ 。酶标仪测量波长调至 350 nm , 温度调到 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温, 将酶标板放入酶标仪后连续记录变化曲线, 当曲线达到平台后, 将酶标仪的温度调至恒温 0 $^{\circ}\text{C}$, 连续记录曲线, 达到平台后停止记录。

2.8 统计学处理

所有实验至少重复 3 次, 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞增殖的影响

姜黄素 5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 分别作用 HepG2 细胞 24、48 h 后, 随着药物浓度的升高、作用时间延长, HepG2 细胞存活率逐渐降低。姜黄素作用 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞存活率从 $(91.10 \pm 3.20)\%$ 降至 $(12.84 \pm 4.00)\%$, IC_{50} 值为 $(25.18 \pm 0.37) \mu\text{mol/L}$; 姜黄素作用 HepG2 细胞 48 h 后, 细胞存活率从 $(82.90 \pm 3.20)\%$ 降至 $(6.34 \pm 2.24)\%$, IC_{50} 值为 $(16.11 \pm 2.13) \mu\text{mol/L}$ 。表明姜黄素能有效地抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖, 且与浓度相关。结果见图 1。

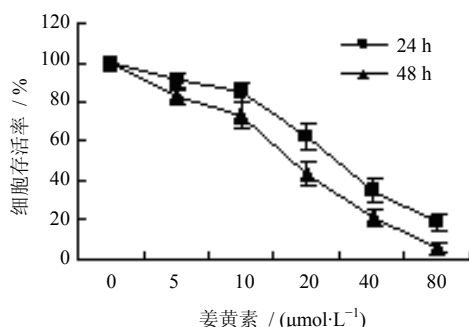


图1 姜黄素对 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of Cur on proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 对 HepG2 细胞周期的影响

姜黄素 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作用于 HepG2 细胞 24 h 后, G_0/G_1 期细胞明显减少, S 期细胞比例无明显变化, 而 G_2/M 期细胞明显增多, 表明姜黄素可将 HepG2 细胞周期阻滞于 G_2/M 期。结果见表 1。

表1 姜黄素对 HepG2 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Cur on cycle of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞分布 / %		
		G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照	—	72.3 ± 2.6	12.5 ± 2.5	15.2 ± 1.9
姜黄素	10	71.5 ± 1.2	13.6 ± 3.6	14.4 ± 2.4*
	20	53.9 ± 4.1	16.9 ± 3.9	25.5 ± 3.1*
	40	19.6 ± 2.3	18.5 ± 2.2	51.5 ± 2.6**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.3 对 HepG2 细胞微管系统的影响

由图 2 所示, 对照组 HepG2 细胞呈三角形且微管结构呈现网络状, 微管纤维为清晰的丝状, 并且由细胞中心沿着细胞长轴向四周辐射分布, 其细胞核(箭头所示)圆润饱满。经 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, HepG2 细胞为典型的长梭形, 细胞微管与对照组相比变化不大, 微管纤维仍表现为丝状, 但部分出现轻微的紊乱; 经 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理后, HepG2 细胞形态发生很大改变, 细胞变圆, 与对照组相比细胞核不再圆润、饱满, 细胞核周围的微管解聚, 微管结构完全紊乱、模糊, 向细胞的一侧聚合; 姜黄素浓度增至 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞完全皱缩变圆, 细胞核形态破坏, 微管浓缩且分布于整个细胞。表明姜黄素可使细胞微管的稳定状态发生改变。

3.4 对 HepG2 细胞 α -微管蛋白表达的影响

姜黄素 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 HepG2 细胞 24 h, α -微管蛋白表达随药物浓度的增加逐渐减弱, 呈现浓度相关性, 当姜黄素浓度达 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, α -微管蛋白几乎不再表达。表明姜黄素作用后影响细胞微管蛋白的表达, 从而破坏微管聚合与解聚的动态平衡。结果见图 3。

3.5 对微管蛋白聚合-解聚活性的影响

由图 4 可见, 微管蛋白在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下聚合 (0~30 min); 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下解聚 (30~50 min), 该图平台期 (20~30 min) 反映了在聚合条件下聚合-解聚间的动态平衡。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下, 秋水仙碱 4 $\mu\text{mol/L}$ 抑制微管蛋白聚合, 这与其能结合于微管蛋白端部,

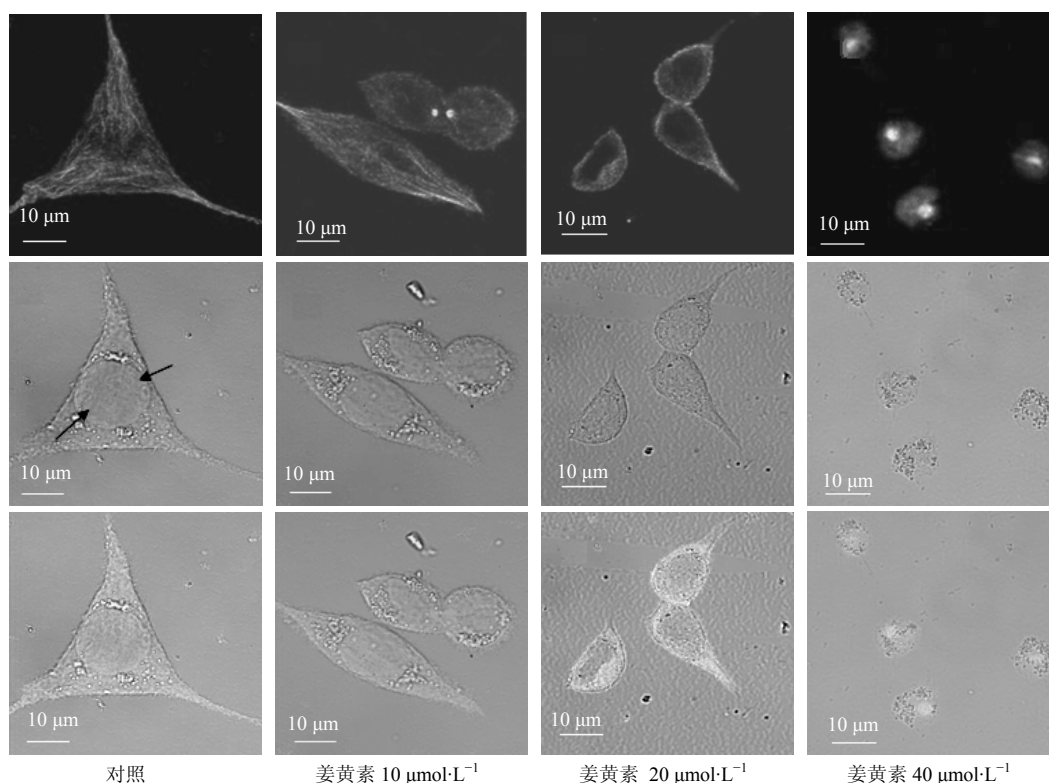


图 2 姜黄素对 HepG2 细胞微管骨架的影响

Fig. 2 Effect of Cur on microtubule cytoskeleton of HepG2 cells

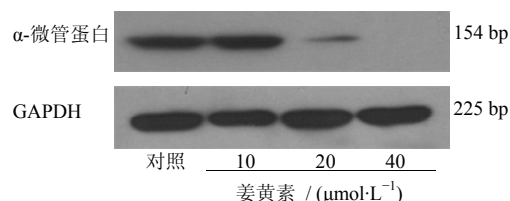


图 3 姜黄素对 α -微管蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Cur on expression of α -tubulin

从而抑制微管蛋白聚合的作用机制相符。紫杉醇 4 $\mu\text{mol/L}$ 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下促进微管蛋白聚合, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下抑制其解聚, 使其始终保持在聚合的稳定状态, 这与其促使微管蛋白迅速聚集成微管并结合到微管上, 抑制微管的解聚的机制相符。姜黄素 20 $\mu\text{mol/L}$ 对微管蛋白的聚合有明显抑制作用, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 聚合条件下能降低 A 值, 其对微管蛋白作用有别于紫杉醇, 而与秋水仙碱相似, 因此姜黄素可能是一种潜在的抑制微管蛋白聚合的药物。

4 讨论

无论是正常细胞还是肿瘤细胞的增殖都依赖于细胞周期的正常运行, 大多数以微管为作用靶点的抗癌药物, 如紫杉醇、长春新碱等可诱导有丝分裂

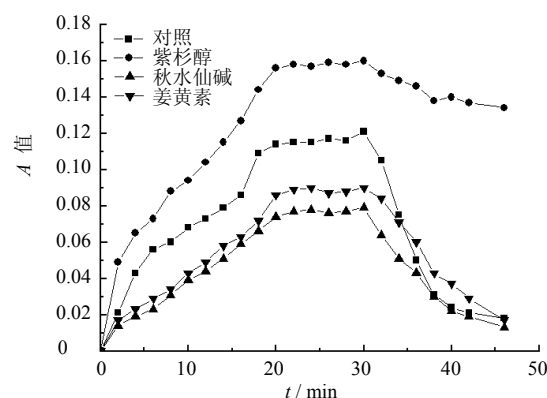


图 4 姜黄素、紫杉醇、秋水仙碱对微管蛋白聚合的影响

Fig. 4 Effect of Cur, taxol, and colchicine on tubulin polymerization

阻滞, 使细胞生长停滞于 G_2/M 期^[14-15]。微管参与许多生物学过程, 为细胞运输营养物质以及在有丝分裂过程中形成纺锤体, 进而参与细胞的增殖, 对细胞形状的维持、细胞信号转导、细胞分裂均具有重要意义。肿瘤细胞若无法形成纺锤体而进行有丝分裂, 则也无法增殖, 将失去生存和扩散转移的能力^[16-17]。因此, 肿瘤细胞周期与细胞微管关系密切。

本实验结果表明, 姜黄素能够显著抑制 HepG2

细胞增殖,且呈时间和剂量相关关系,其作用24 h后, G_0/G_1 期细胞明显减少,而 G_2/M 期细胞随姜黄素浓度的升高而增多,表明姜黄素将HepG2细胞周期阻滞于 G_2/M 期。在 G_2/M 期,细胞进行有丝分裂,而在细胞有丝分裂过程中微管起着关键性作用。本实验发现,经姜黄素处理后HepG2细胞微管结构开始向细胞边缘呈缩聚状分布, α -微管蛋白的表达下调,微管蛋白的聚合受到抑制。上述结果表明,姜黄素能够发挥显著的抗肿瘤作用,与其对肿瘤细胞微管结构的影响有很大关系的,即其以微管为靶点,通过对微管结构的破坏进而干扰纺锤体的形成,阻断HepG2细胞的有丝分裂,最终诱导其细胞周期阻滞于 G_2/M 期。姜黄素对HepG2细胞微管相关蛋白分子表达的影响还需进一步的深入探讨。

参考文献

- [1] Barzegar A, Moosavi-Movahedi A A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(10): 26012.
- [2] Kim D C, Lee W, Bae J S. Vascular anti-inflammatory effects of curcumin on HMGB1-mediated responses *in vitro* [J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(12): 1161-1168.
- [3] Shehzad A, Wahid F, Lee Y S. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials [J]. *Arch Pharm*, 2010, 343(9): 489-499.
- [4] Koo J Y, Kim H J, Jung K O, *et al.* Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells *in vitro* and shows synergism with 5-fluorouracil [J]. *J Med Food*, 2004, 7(2): 117-121.
- [5] Qian H, Yang Y, Wang X. Curcumin enhanced adriamycin-induced human liver-derived Hepatoma G2 cell death through activation of mitochondria-mediated apoptosis and autophagy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(3): 125-131.
- [6] Zhou Q M, Wang X F, Liu X J, *et al.* Curcumin enhanced antiproliferative effect of mitomycin C in human breast cancer MCF-7 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(11): 1402-1410.
- [7] Choi H Y, Lim J E, Hong J H. Curcumin interrupts the interaction between the androgen receptor and Wnt/[beta]-catenin signaling pathway in LNCaP prostate cancer cells [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2010, 13(4): 343-349.
- [8] 罗廷顺, 李洪文, 刘正文, 等. 姜黄素的提取分离与药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(2): 102-107.
- [9] 琚 辉, 郝存江, 尹 飞, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(6): 420-426.
- [10] Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(3): 194-204.
- [11] Pasquier E, Kavallaris M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy [J]. *IUBMB Life*, 2008, 60(3): 165-170.
- [12] Banerjee M, Singh P, Panda D. Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells [J]. *FEBS J*, 2010, 277(16): 3437-3448.
- [13] Chakraborti S, Das L, Kapoor N, *et al.* Curcumin recognizes a unique binding site of tubulin [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(18): 6183-6196.
- [14] AbouEl Hassan M A, Braam S R, Kruijff F A. Paclitaxel and vincristine potentiate adenoviral oncolysis that is associated with cell cycle and apoptosis modulation, whereas they differentially affect the viral life cycle in non-small-cell lung cancer cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(12): 1105-1114.
- [15] Ang E S, Pavlos N J, Chim S M, *et al.* Paclitaxel inhibits osteoclast formation and bone resorption via influencing mitotic cell cycle arrest and RANKL-induced activation of NF-kappaB and ERK [J]. *J Cell Biol*, 2012, 113(3): 946-955.
- [16] Janke C, Bulinski J C. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(12): 773-786.
- [17] Nakaseko Y, Yanagida M. Cell biology. Cytoskeleton in the cell cycle [J]. *Nature*, 2001, 412(6844): 291-292.