

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.31.003

## 姜黄素抑制多药耐药肝癌细胞 HepG2/ADM 的增殖及其机制研究\*

耿燕娜<sup>1</sup>, 尹元元<sup>1</sup>, 武毅君<sup>2</sup>, 张文鑫<sup>3△</sup>(1. 河南大学淮河医院药学部, 河南开封 475000; 2. 河南大学药学院, 河南开封 475000;  
3. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

**[摘要]** **目的** 观察姜黄素对多药耐药(MDR)的肝癌细胞株 HepG2/ADM 细胞增殖的抑制作用及其机制。**方法** 制备、培养 HepG2/ADM 细胞, 然后用不同浓度的姜黄素(5、10、20、40 mol/L)处理该细胞 24、48、72 h。采用 CCK-8 试剂检测姜黄素对 HepG2/ADM 细胞的增殖活力的影响。流式细胞仪检测细胞内罗丹明 123(Rh-123)的浓度和阿霉素(ADM)的浓度; 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组细胞内 mdr-1 mRNA 的水平变化; 用 Western blot 检测细胞内 P-糖蛋白(P-gp)水平的变化。**结果** 与空白对照组和 DMSO 组相比, 姜黄素对 HepG2/ADM 细胞增殖的抑制作用更加明显( $P < 0.05$ ); 更能够明显抑制细胞内 Rh123 的外排( $P < 0.05$ ); RT-PCR 和 Western blot 结果分别显示, 姜黄素对 HepG2/ADM 细胞内的 mdr-1 mRNA 和 P-gp 水平更有明显的降低( $P < 0.05$ ), 且呈浓度-时间依赖性( $P < 0.05$ )。**结论** 姜黄素可以显著抑制多药耐药 HepG2/ADM 细胞的增殖, 其机制可能与抑制和 MDR 密切相关的 mdr-1 基因及其编码的 P-gp 水平有关。

**[关键词]** 姜黄素; 多药耐药; P-糖蛋白; HepG2/ADM 细胞**[中图分类号]** R962**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)31-4329-03

## Study on effect of curcumin in inhibiting proliferation of multidrug resistant liver cancer HepG2/ADM cells and its mechanism\*

Geng Yanna<sup>1</sup>, Yin Yuanyuan<sup>1</sup>, Wu Yijun<sup>2</sup>, Zhang Wenxin<sup>3△</sup>

(1. Department of Pharmacy, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng, Henan, 475000; 2. College of Pharmacy, Henan University, Kaifeng, Henan, 475000; 3. First Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the inhibitory effect of curcumin on the proliferation of multidrug resistance liver cancer line HepG2/ADM cells and to explore its mechanisms. **Methods** HepG2/ADM cells were prepared and cultured in vitro, and treated by different concentrations (5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) of curcumin for 24, 48, 72 h respectively. The effect of curcumin on proliferation of HepG2/ADM cells was measured by CCK-8 reagent; the concentration of intracellular rhodamine-123 (Rh-123) and adriamycin (ADM) were determined by flow cytometry; the level change of intracellular mdr-1 mRNA in each group was determined by RT-PCR, the P-gp protein level was detected by Western blot. **Results** Compared with the blank control and DMSO group, curcumin had more obvious inhibitory effect on HepG2/ADM cells proliferation ( $P < 0.05$ ), and could more remarkably inhibit the intracellular Rh-123 excretion ( $P < 0.05$ ). The RT-PCR and Western blot results showed that curcumin more significantly decrease the mdr-1 mRNA and P-gp protein levels in dose-time dependent manner ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Curcumin could significantly inhibit the proliferation of multidrug-resistant HepG2/ADM cells, and its mechanism may be related with inhibiting mdr-1 gene expression and its encoded P-gp protein level, which are closely related with MDR.

**[Key words]** curcumin; multidrug-resistance; P-gp; HepG2/ADM cells

多药耐药(MDR)是指对一种药物具有耐药性的同时, 对其他结构不同、作用靶点不同的药物也具有耐药性。MDR 通常是导致抗感染药物治疗和抗肿瘤化疗失败的重要原因。通常来说, 细菌的 MDR 主要与内酰胺酶的变异有关, 而肿瘤细胞的 MDR 通常与细胞膜上过度表达外排抗肿瘤药物的蛋白有关, 如: MDR 基因 mdr-1 编码的 P-糖蛋白(P-gp)过度表达是其重要原因之一, P-gp 能够将亲脂类化疗药物泵出细胞外, 从而产生耐药特性<sup>[1]</sup>。

肝癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 由于我国是乙型肝炎病毒(HBV)的高发区, 因此, 受肝癌威胁也最大, 约占全球肝癌病死率的 50%。尽管, 治疗肝癌的手段有了很大的提高, 但由于 MDR 的存在, 使得其化疗的疗效不尽如人意, 因

此寻找新的治疗策略逆转肝癌的 MDR 就显得极其重要。

姜黄素(Curcumin)是从姜科植物姜黄中提取的一种酚类化合物, 具有显著的抗炎<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、抗缺血<sup>[4]</sup>、抗纤维化<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>等生物活性。故本实验用阿霉素(ADM)处理肝癌细胞株 HepG2 制备耐药细胞株 HepG2/ADM, 用姜黄素处理该细胞, 观察其对该细胞的杀伤作用, 并探讨其抗耐药的机制。

**1 材料与方法**

**1.1 试剂** HepG2 肝癌细胞株购置中科院上海生科院细胞资源中心; 姜黄素购自美国 Sigma 公司, 纯度大于 96%, 并用二甲亚砜(DMSO)溶解, 等量分装, 并 -20 °C 保存备用; ADM 购自深圳万乐药业有限公司, 用双蒸水稀释保存。RP-MI-1640 培养液、0.25% 胰酶和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;

\* 基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(201404035)。 作者简介: 耿燕娜(1983-), 副主任药师, 硕士, 研究方向为中药药理与临床药学。 △ 通信作者, E-mail: zhangwenxin1983@163.com。

表 1 姜黄素对肝癌 HepG2/ADM 细胞增殖的抑制作用( $\bar{x}\pm s, \%$ )

时间	空白对照	DMSO 组	姜黄素			
			5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	40 $\mu\text{mol/L}$
24 h	100.0 $\pm$ 3.3	98.5 $\pm$ 2.5	95.4 $\pm$ 7.0	93.1 $\pm$ 3.2	74.9 $\pm$ 4.6*	58.6 $\pm$ 4.81*
48 h	100.0 $\pm$ 4.3	97.2 $\pm$ 3.8	85.1 $\pm$ 5.5* $\Delta$	82.0 $\pm$ 3.3* $\Delta$	62.1 $\pm$ 3.6* $\Delta$	44.4 $\pm$ 2.5* $\Delta$
72 h	100.0 $\pm$ 1.0	95.3 $\pm$ 2.5	74.4 $\pm$ 2.7* $\Delta$	49.7 $\pm$ 2.6* $\Delta$	39.7 $\pm$ 4.2* $\Delta$	30.5 $\pm$ 4.0* $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , 与空白对照组或 DMSO 组比较;  $\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与同组内 24 h 比较

CCK-8 试剂盒购自上海生博生物医药科技有限公司; 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自大连宝生生物工程有限公司, mdr-1 引物由美国 Invitrogen 公司设计并合成。P-gp 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 内参抗体  $\beta$ -actin 购自博鳌森生物有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养和 HepG2/ADM 的制备

HepG2 肝癌细胞贴壁生长于含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的饱和湿度的培养箱中培养。耐药细胞株的建立采用 AMD 大剂量冲击和剂量递增相结合的方法诱导产生, 具体做法: 测定 AMD 对 HepG2 细胞的最低耐受浓度, 用终浓度为 1 mg/L 的 AMD 与细胞共培养 24 h, 存活细胞用含最低 AMD 耐受浓度的培养液共培养 7~10 d, 待细胞稳定后传代, 再次用含 1 mg/L 的 AMD 的培养液共培养 24 h, 存活细胞接种于含较高浓度的 AMD 中, 以此类推, 直至 HepG2 细胞在含 1 mg/L 的 AMD 下稳定生长和传代, 即建立耐药菌株 HepG2/ADM<sup>[7]</sup>。

### 1.2.2 CCK-8 试剂检测姜黄素对 HepG2/ADM 细胞的杀伤作用

将处于对数生长期的 HepG2/ADM 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔板中, 培养 12 h 细胞贴壁后, 将不同浓度的姜黄素(5、10、20、40 mol/L)加入 HepG2/ADM 培养体系中, 继续培养 24、48、72 h。在培养相应时间点后加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 试剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 于酶标仪上 490 nm 处比色。根据公式计算细胞活力: 细胞活力(%) =  $A_{490\text{处理组}} / A_{490\text{自然生长组}} \times 100\%$ 。

### 1.2.3 R-123 外排实验

将处于对数生长期的处理的 HepG/ADM 细胞以  $2 \times 10^4$ /L 接种于 24 孔板内, 每孔终体积为 1 mL。培养 24 h 后, 弃上清液, 加入 R-123 至终浓度为 5 mg/L, 然后加入姜黄素(20 mol/L), 联合继续培养 0、0.5、1、2 h 后, 收集上清用流式细胞仪上检测(激发波长 560 nm, 发射波长 540~660 nm)R-123 激发的荧光强度值表示细胞内 R-123 浓度。

### 1.2.4 RT-PCR

收集培养的各 HepG2/ADM 细胞, 磷酸盐缓冲液(PBS)充分洗涤后, 参照 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 用 RT-PCR 检测各组细胞中 mdr-1 基因的表达量。mdr-1 上游引物: 5'-GTA CCC ATC ATT GCA ATA GC-3'; 下游引物: 5'-CAA ACT TCT GCT CCT GAG TC-3', 扩增产物大小为 167 bp。内参 GAPDH 上游引物: 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'; 下游引物: 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3', 扩增产物大小为 228 bp。扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶成像扫描。用 Quantity One 灰度分析软件进行吸光度值计算。以目的基因 mdr-1 条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值作为 mdr-1 mRNA 的

表达量, 并重复 3 次。

### 1.2.5 Western blot

收集各组细胞提取总蛋白, 并测定蛋白的浓度为 (2.12  $\pm$  0.24) mg/mL。取蛋白样品 20  $\mu\text{L}$ , 经过 SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白电转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 以 5% 脱脂奶粉 TBST 液封闭后, 加入 P-gp 抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 洗涤后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育 1 h 后, ECL 底物化学发光显色后曝光显影。通过 Chemi DocXRS 化学发光成像系统, 进行曝光分析, 然后计算其比值表示结果, 即: 相对吸光度 = 目的蛋白 P-gp 吸光度 /  $\beta$ -actin 蛋白吸光度。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行处理, 计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 进行独立变量  $t$  检验和单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

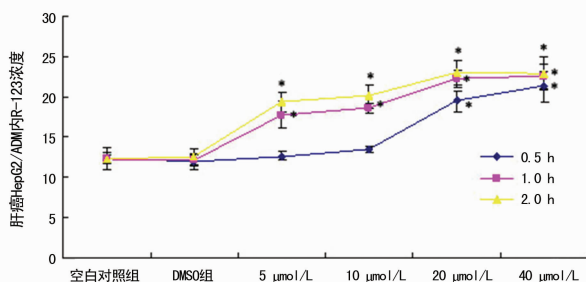
## 2 结果

### 2.1 姜黄素抑制 HepG2/ADM 细胞的增殖

与空白对照组和 DMSO 组比较, 当姜黄素浓度为 5、10 mol/L 作用 24 h 时, 对 HepG2/ADM 细胞的增殖活力无明显影响 ( $P > 0.05$ ); 而当姜黄素浓度增加至 20、40 mol/L 时, 其对肝癌细胞的增殖活力有明显的抑制作用, 呈剂量-依赖性 ( $P < 0.05$ )。进一步发现, 随着作用时间的逐渐延长, 不同浓度的姜黄素对 HepG2/ADM 细胞的增殖活力都有显著的抑制作用, 呈时间-依赖性 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 姜黄素对肝癌 HepG2/ADM 内 R-123 浓度的影响

流式细胞结果如图 1 显示: 与空白对照组和 DMSO 组比较, 当姜黄素浓度为 5、10 mol/L 时, 在每一个时间点, 姜黄素对 HepG2/ADM 细胞内的 R-123 的外排无明显抑制作用, 而当浓度增加至 20、40 mol/L 时, 在每一个时间点, 姜黄素都能够明显地抑制细胞内 R-123 的外排, 即: 增加了细胞内 ADM 的药物浓度。



\*:  $P < 0.05$ , 与空白对照组或 DMSO 组比较

图 1 姜黄素对肝癌 HepG2/ADM 内 R-123 浓度的影响

### 2.3 姜黄素抑制了耐药肝癌 HepG2/ADM 细胞内 mdr-1 mRNA 及其编码的 P-gp 的表达

PCR 和 Western blot 结果显示, 与空白对照组或 DMSO 组比较, 当姜黄素浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时, HepG2/ADM 细胞内 mdr-1 mRNA 及其编码的 P-

gp 的表达水平无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 当姜黄素浓度增加至  $20 \mu\text{mol/L}$  时, *mdr-1* mRNA 和 P-gp 水平表达的相对 OD 值都有显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 具有浓度依赖性 (图 2A 和 C)。进一步结果还显示, 当姜黄素浓度为  $20 \mu\text{mol/L}$  时, 随着药物作用时间的延长, HepG2/ADM 胞内 *mdr-1* mRNA 和 P-gp 水平的相对 OD 值都逐渐降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 呈时间依赖性 (见图 2B 和 D)。

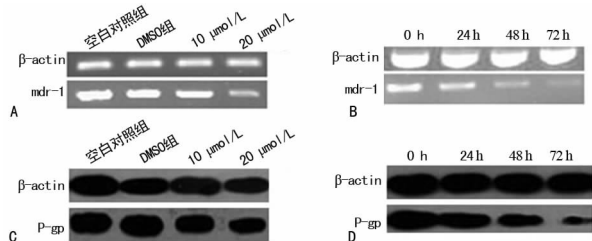


图 2 姜黄素对耐药肝癌 HepG2/ADM 细胞内 *mdr-1* mRNA 和 P-gp 蛋白表达的影响和比较

### 3 讨论

MDR 不仅是肿瘤治疗过程中常见的问题之一, 也是其面临的巨大挑战。耐药的肿瘤细胞能够有效地从细胞内部防止抗癌药物的积聚, 从而降低肿瘤细胞对抗癌药物的敏感度<sup>[8]</sup>。MDR 形成的原因多样, 如 P-gp 的过度表达<sup>[1]</sup>, 上游通路 (NF- $\kappa$ B 和 PI3K) 活性的异常等<sup>[9]</sup>。其中, *mdr-1* 基因及其编码的 P-gp 在多种恶性肿瘤细胞中的过度表达是形成 MDR 的重要机制, 也是肿瘤患者化疗效果差、预后差、复发率高的重要原因。

肝癌是消化系统最为常见的恶性肿瘤之一, 因 P-gp 高表达引发 MDR 从而导致肝癌病死率居高不下, 因此寻找有效的 MDR 逆转剂一直是肝癌防治研究的热点。目前越来越多的研究表明, 许多植物提取物, 如: 绿茶<sup>[10]</sup>、白藜芦醇<sup>[11]</sup>等, 因其广泛的药理特性和低毒性, 在肝癌的治疗和预防中有广阔的应用前景, 但这些提取物对 MDR 的肝癌的治疗作用及其机制却鲜有研究。

姜黄素是一种多酚类植物提取物, 因其良好的抗突变和抗癌作用, 使其成为一种很有应用前景的抗癌药物。本研究利用姜黄素处理 MDR 的肝癌细胞株 HepG2/ADM, 观察姜黄素对该细胞株的增殖作用的影响, 并探讨其机制。研究表明, 姜黄素能够明显地抑制耐药肝癌细胞的增殖, 且这种抑制作用呈明显的浓度-时间依赖性 ( $P < 0.01$ )。流式细胞术检测了姜黄素对 R-123 的影响, 结果发现姜黄素也能够明显抑制细胞内 R-123 的外排, 也就是说姜黄素可以明显增加细胞内 ADM 的药物浓度, 使其增强抗肝癌的作用。进一步的研究结果表明, 姜黄素能够明显抑制与 MDR 密切相关的 *mdr-1* mRNA 及其编码的 P-gp 的表达水平, 也呈浓度-时间依赖性。

总之, 本研究显示姜黄素能够逆转人肝癌耐药细胞株 HepG2/ADM 的耐药作用, 其机制可能与抑制 *mdr-1* 及其编

码的 P-gp 的表达有关系, 这或为治疗耐药肝癌指出了新的方向, 也提供了一定理论依据, 但其逆转耐药的确切机制仍有待深入研究。

### 参考文献

- [1] Liu Z, Duan ZJ, Chang JY, et al. Sinomenine sensitizes multidrug-resistant colon cancer cells (Caco-2) to doxorubicin by downregulation of MDR-1 expression [J]. PLoS One, 2014, 9(6):98560.
- [2] Machova Urdzikova L, Karova K, Ruzicka J, et al. The anti-inflammatory compound curcumin enhances locomotor and sensory recovery after spinal cord injury in rats by immunomodulation [J]. Int J Mol Sci, 2015, 17(1):E49.
- [3] Xiong ZE, Dong WG, Wang BY, et al. Curcumin attenuates chronic ethanol-induced liver injury by inhibition of oxidative stress via mitogen-activated protein kinase/nuclear factor E2-related factor 2 pathway in mice [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11(44):707-715.
- [4] Shah FA, Gim SA, Sung JH, et al. Identification of proteins regulated by curcumin in cerebral ischemia [J]. J Surg Res, 2016, 201(1):141-148.
- [5] Liu PY. Curcumin: another potential translational candidate for anti-fibrosis on heart failure? [J]. Acta Cardiol Sin, 2014, 30(5):483-484.
- [6] Pan Z, Chen C, Zhou Y, et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of monocarbonyl analogs of curcumin as potential anti-tumor agents [J]. Drug Dev Res, 2016, 77(1):43-49.
- [7] Zhai BJ, Shao ZY, Zhao CL, et al. Development of characterization of multidrug resistant human hepatocarcinoma cell line in nude mice [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(41):6614-6619.
- [8] Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, et al. ABC transporter in cancer: more than just drug efflux pumps [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(2):147-156.
- [9] Fey SJ, Wrzesinski K. Determination of drug toxicity using 3D spheroids constructed from an immortal human hepatocyte cell line [J]. Toxicol Sci, 2012, 127(2):403-411.
- [10] Zhang Y, Duan W, Owusu L, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma LM6 cells but not non-cancerous liver cells [J]. Int J Mol Med, 2015, 35(1):117-124.
- [11] Lombardi G, Vannini S, Blasi F, et al. In vitro safety/protection assessment of resveratrol and pterostilbene in a human hepatoma cell line (HepG2) [J]. Nat Prod Commun, 2015, 10(8):1403-1408.