

姜黄素类似物EF25-(GSH)₂抗肝癌作用的研究

叶莉莉¹ 周桃¹ James P. Snyder² 傅海安³ 黄蓓^{1*}

(¹安徽大学生命科学学院, 合肥 230601; ²美国Emory大学化学学院, 亚特兰大 30322, 美国;

³美国Emory大学医学院, 亚特兰大 30322, 美国)

摘要 在细胞及动物个体水平探讨姜黄素类似物EF25-(GSH)₂的抗肝癌作用。用不同浓度的EF25-(GSH)₂处理体外培养的肝癌细胞、正常肝细胞以及HepG2荷瘤裸鼠, MTT法检测细胞存活率, 电镜及激光共聚焦显微镜观察细胞形态, 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测AMPK/Akt/mTOR相关通路蛋白磷酸化水平的变化。结果显示, EF25-(GSH)₂对HepG2作用48 h的IC₅₀为7.2 μmol/L, 对其生长抑制作用明显优于姜黄素及顺铂, 且对正常细胞的杀伤作用较小。形态学观察到细胞中有自噬现象的发生。免疫印迹法结果提示, EF25-(GSH)₂可能通过AMPK/Akt/mTOR的相关通路抑制肿瘤细胞生长。对肝癌模型裸鼠的实验显示, 给药后的肿瘤体积明显缩小。该实验结果证明, EF25-(GSH)₂具有良好的作为肝癌治疗药物的开发前景。

关键词 EF25-(GSH)₂; 肝癌; 细胞自噬

Anti-hepatoma Effect Study of Curcumin Derivative EF25-(GSH)₂

Ye Lili¹, Zhou Tao¹, James P. Snyder², Fu Haian³, Huang Bei^{1*}

(¹College of Life Science, Anhui University, Hefei 230601, China; ²Department of Chemistry, Emory University, Atlanta 30322, USA;

³School of Medicine, Emory University, Atlanta 30322, USA)

Abstract EF25-(GSH)₂ is a curcumin analogue, and in this research we will study its anti-hepatoma effect *in vitro* and *in vivo*. Hepatoma cells, normal liver cells and HepG2 tumor-bearing nude mice were treated with different concentrations of EF25-(GSH)₂. MTT assay was used to check cell viability, and cell morphology was observed with an electron microscope and confocal microscopy. Western blot was used to detect the changes in the phosphorylation level of AMPK/Akt/mTOR pathway related proteins. The results showed that the IC₅₀ of EF25-(GSH)₂ on HepG2 at 48 h was 7.2 μmol/L. EF25-(GSH)₂ significantly inhibited the growth of HepG2 cells, the effect of which was much greater than those of curcumin and cisplatin, with slight toxicity to normal cells. Autophagy was observed with morphological analysis. Western blot results indicated that EF25-(GSH)₂ might inhibit tumor cell growth through AMPK/Akt/mTOR pathway. Liver cancer models in nude mice were established, and tumor volume was reduced after administration of EF25-(GSH)₂. *In vitro* and *in vivo* results demonstrate that EF25-(GSH)₂ has good prospects as a potential anti-hepatoma drug.

Key words EF25-(GSH)₂; HCC; autophagy

姜黄素(curcumin)是来源于姜黄(curcuma)的一种疏水多酚化合物, 研究发现, 姜黄素对多种癌症都

有预防和治疗的作用^[1-2]。姜黄素通过调节它的靶标分子来调节细胞的增殖和凋亡, 这些分子是细胞中

收稿日期: 2014-03-15 接受日期: 2014-05-19

安徽省自然科学基金(批准号: KJ2012A030)和安徽省科技攻关项目(批准号: 1301032140)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0551-5107341, E-mail: beihuang@163.com

Received: March 15, 2014 Accepted: May 19, 2014

This work was supported by the Anhui Provincial Nature Science Foundation (Grant No.KJ2012A030) and the Science and Technology Project of Anhui Province (Grant No.1301032140)

*Corresponding author. Tel: +86-551-5107341, E-mail: beihuang@163.com

网络出版时间: 2014-08-21 10:48 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0078.html>

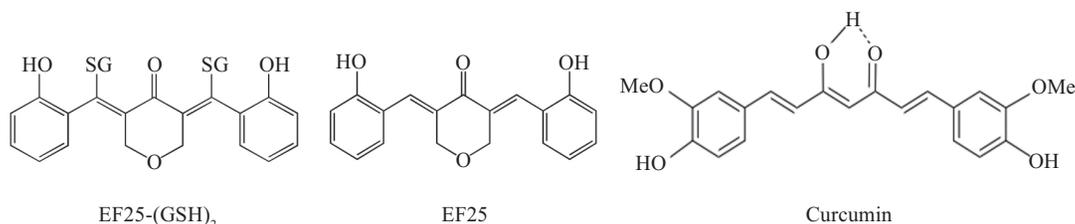


图1 姜黄素、EF25和EF25-(GSH)₂的结构式
Fig.1 Structure of curcumin, EF25 and EF25-(GSH)₂

的转录因子、生长因子及其受体、细胞因子、酶和基因。因此,姜黄素几乎可以抑制所有种类肿瘤细胞的增殖^[3-4]。然而,姜黄素的使用却受限于其较低的体内生物活性。姜黄素的吸收还受到它的疏水性质的影响。另外,由于姜黄素的黄色,其在皮肤疾病中的应用也受到限制^[5-6]。

美国Emory大学的研究人员通过化学合成的方法,获得了一系列以姜黄素的核心结构为引导的类似物(图1)。通过高通量筛选,找到其中具有较高生物活性的类似物进行进一步研究。前期研究结果显示,EF24、EF25和EF25-(GSH)₂有较好的抗肝癌细胞系增殖的活性^[7-11]。EF25-(GSH)₂因为与谷胱甘肽联合而具有水溶性,改造后的EF25-(GSH)₂由EF25的黄色粉末变成白色粉末,溶解后为无色溶液,这些特性使得EF25-(GSH)₂具有更好的应用前景^[7]。

自噬是存在于真核生物中一种高度保守的代谢过程,参与调节细胞物质的合成和代谢平衡。自噬过程中,自噬体与溶酶体结合形成自噬溶酶体,降解细胞中多余或受损的大分子和细胞器,循环利用降解所产生的能量,维持细胞内环境的稳态^[12]。过度上调的自噬可以引起细胞死亡,即II型程序性细胞死亡,这种形式的细胞死亡与凋亡的生物学特征有所不同,其表现为细胞中出现大量包裹着细胞质和细胞器的空泡结构及溶酶体对空泡内成分的降解。自噬可在细胞无法继续维持自身生存时诱导细胞的主动性死亡。研究发现,在某些肿瘤细胞中的自噬性死亡可能是肿瘤细胞死亡的重要方式^[13],如三氧化二砷(As₂O₃)可以通过上调Beclin1的表达诱导细胞自噬性死亡,缓解淋巴细胞性白血病的病情^[14],替莫唑胺等促自噬类药物可以选择性地杀灭具有凋亡抗性的恶性胶质瘤细胞^[15]。以上证据表明,我们可以通过诱导肿瘤细胞过度自噬来开发抗肿瘤新药。

腺苷酸活化蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]被认为是真

核生物的细胞能量调节器,受AMP/ATP比值的调节。研究发现,AMPK能以不同的方式调控一种称为Vps34激酶家族不同的复合物。一些Vps34酶参与了正常细胞的囊泡运输(细胞中一种重要的分子运输),还有一些Vps34复合物则参与了细胞自噬^[16]。AMPK- α 亚基上存在一个特殊的苏氨酸残基(Thr-172),该位点可被LKB1磷酸化。在代谢压力存在的情况下,激活LKB1-AMPK通路可使P²⁷过量表达,诱导细胞自噬以逃避不良环境的压力。TSC2也是AMPK的直接作用底物,通过抑制mTOR的表达,降低转录因子S6K活性,协同P²⁷-Thr198被磷酸化对细胞周期的抑制作用,抑制细胞增殖,促进自噬过程的进行^[17-18]。

在癌细胞中,通常可以发现PI3K/Akt/mTOR信号通路不正常,甚至是组成性的活化,从而促进肿瘤细胞不断生长、增殖^[19-21]。在生长因子和营养物质充足的情况下,会引起Akt和mTOR的活化,最终导致细胞自噬功能受到抑制。Akt抑制剂(如perifostine和API-2)、mTOR抑制剂(如rapamycin)等都可以通过破坏PI3K/Akt/mTOR信号通路,启动细胞自噬通路,引起癌细胞死亡^[22-24]。

本研究以人肝癌细胞株(HepG2细胞)及其荷瘤裸鼠作为研究对象,探讨EF25-(GSH)₂的抗肝癌作用及其对AMPK/Akt/mTOR细胞信号传导通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

姜黄素购自美国Sigma公司;姜黄素类似物EF25-(GSH)₂由美国Emory大学医学院傅海安教授馈赠,溶于纯水备用;顺铂化学对照品购自中国药品生物制品检定所;人肝癌细胞株HepG2购自ATCC;SMMC-7721、BEL-7402由中国科技大学吴缅教授馈赠;HL-7702由中国军事医学科学院钟辉研究员馈赠;裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公

司; mTOR抗体、p-mTOR(Ser2448)抗体、AMPK抗体、p-AMPK α (Thr172)抗体、Akt抗体、p-Akt(Ser473)抗体、LC3B抗体、 β -actin抗体购自Cell Signaling公司; mCherry-GFP-LC3B质粒由中国科技大学吴缅教授馈赠。

1.2 试剂及仪器

DMEM培养基和1640培养基由Gibco公司生产的干粉配制而成; 优级胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶-EDTA以及青链霉素混合液(100 \times)购自合肥博美生物科技有限责任公司; MTT(噻唑兰)、渥曼青霉素(Wortmannin)购自Sigma公司; 其他试剂均为国产分析纯。

细胞培养瓶、细胞培养板、冻存管购自CORNING公司; 透射电镜(JEM-2000, JEOL Ltd.); 激光共聚焦显微镜(FV1000, Olympus)。

1.3 方法

1.3.1 MTT法 先用纯水将EF25-(GSH)₂配置成10 mmol/L的母液, 然后按实验要求再用DMEM培养液稀释成一定的浓度。将 3×10^4 /mL的细胞接种于96孔板中, 每孔100 μ L, 加不同浓度的EF25-(GSH)₂溶液, 静止培养48 h后加入10 μ L MTT溶液(5 mg/mL, 用PBS配制, pH7.5)。继续孵育4 h后, 每孔加入150 μ L DMSO, 使MTT完全溶解; 选择在490 nm波长处, 用酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值。按下公式计算细胞存活率: 细胞存活率=(加药组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值) \times 100%

1.3.2 电镜观察细胞 用胰酶消化不同药物处理的细胞, 收集细胞并用PBS冲洗2~3次, 然后加入预冷的含有3%戊二醛的二甲砷酸盐缓冲液(0.1 mol/L)固定细胞, 4 $^{\circ}$ C过夜。次日用四氧化锇将细胞固定包埋在环氧树脂中, 超薄的部分用醋酸铀和柠檬酸铅双染, 用JEM-2000透射电镜观察。

1.3.3 质粒转染 在6孔板中接种HepG2细胞培养过夜, 按照试剂说明使用Lipofectamine 2000将mCherry-GFP-LC3对HepG2进行转染, 转染后6 h用含药物的无抗生素培养基替换原培养基, 继续培养24 h, 用绿色(GFP)和红色(mCherry)荧光在激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达 接种细胞密度为 3×10^4 /mL的细胞于6孔板中, 加入不同浓度的药物培养设定的时间, 收集细胞, 离心加入上样缓冲液; 煮沸10 min后上样。以 β -actin为内参, SDS-PAGE电

泳分离, 电转至PVDF膜上。PVDF膜经封闭液封闭2 h后, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C过夜。用辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h, TBST缓冲液洗涤后, ECL发光法检测蛋白表达。

1.3.5 荷瘤裸鼠体内药物作用实验 严格无菌条件下饲养裸鼠, 待裸鼠背部皮下的肿瘤体积达到200 mm³时, 将所有裸鼠编号分组, 并记录每只裸鼠的体重及肿瘤块的长径和短径, 按各自体重计算每只所需药量, 通过腹腔注射的方式给药。每天在相同时间, 以相同次序给药。在给药期间, 每3 d记录一次每只裸鼠的体重, 并用游标卡尺测量肿瘤块的长径a和短径b, 肿瘤体积按 $V = b^2 \times a / 2$ 计算, 拍照以记录裸鼠及肿瘤形态, 观察并记录裸鼠健康状况。

1.3.6 统计学方法 采用SPSS 17.0软件处理收据, 数据采用mean \pm S.D., 用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。实验数据均重复3次以上。

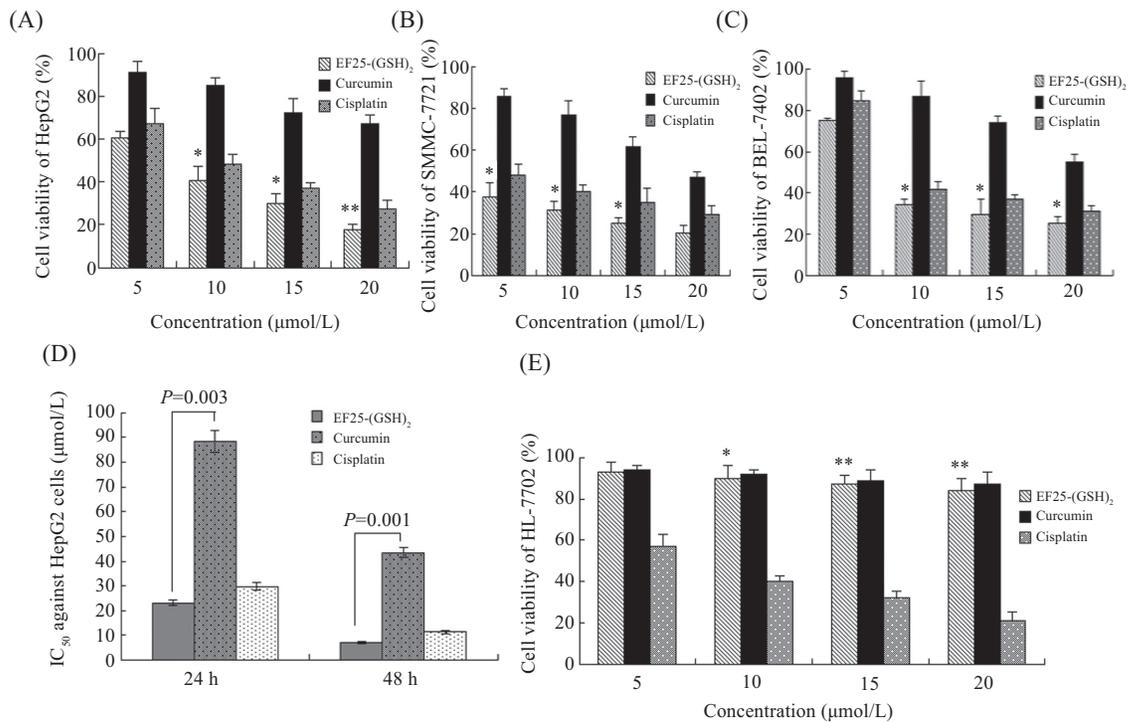
2 结果

2.1 EF25-(GSH)₂抑制肝癌细胞的增殖

用不同浓度的EF25-(GSH)₂、姜黄素(curcumin)和顺铂(cisplatin)分别处理肝癌细胞HepG2、SMMC-7721、BEL-7402细胞以及正常肝细胞HL-7702, 24 h及48 h后用MTT法检测细胞存活率(图2)。由图2A~图2C可以观察到, 随着EF25-(GSH)₂浓度的升高, 细胞存活率明显下降, 而姜黄素对照组的细胞存活率在同等浓度下则明显高于EF25-(GSH)₂组。从图2D中可以看出, EF25-(GSH)₂对于HepG2细胞的IC₅₀值(48 h为7.2 μ mol/L)要明显小于姜黄素, 甚至略低于顺铂(48 h为9.1 μ mol/L), 在20 μ mol/L的作用浓度下, EF25-(GSH)₂对HepG-2细胞的抑制率达到80%以上, 而对HL7702细胞的增殖几乎没有抑制作用(图2E)。这说明, EF25-(GSH)₂对正常肝细胞几乎没有毒性, 对肝癌细胞的增殖具有选择性抑制作用。

2.2 EF25-(GSH)₂引起肝癌细胞HepG2自噬

为了进一步研究EF25-(GSH)₂的抗肝癌作用, 我们选取HepG2作为代表, 用不同浓度的EF25-(GSH)₂处理, 观察其形态变化。我们发现, 在10 μ mol/L以上的浓度下细胞大量空泡化(图3A)。使用透射电镜进一步观察, 可以很清楚地看到, 在20 μ mol/L的浓度作用下, 细胞质内产生大量自噬泡继而发生空泡化, 但细胞凋亡现象不明显(图3C), 推断EF25-(GSH)₂可

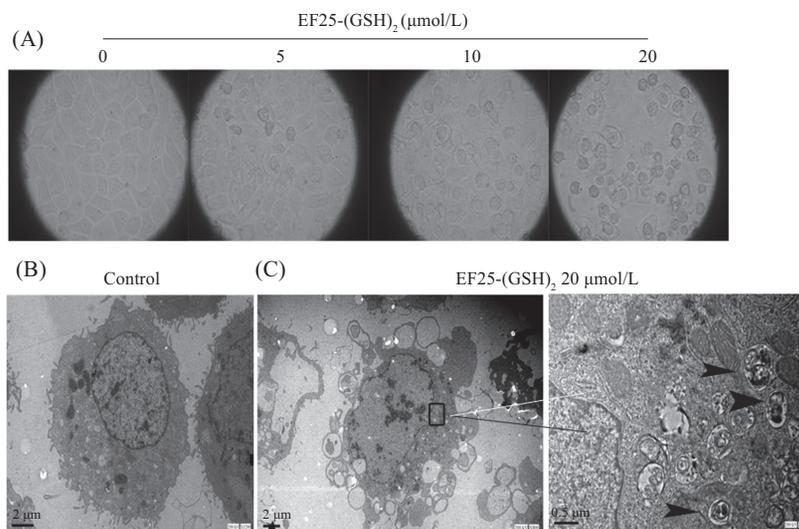


A: 48 h HepG2细胞的存活率; B: 48 h SMMC-7721细胞的存活率; C: 48 h BEL-7402细胞的存活率; D: 24 h和48 h HepG2细胞的IC₅₀值; E: 48 h HL-7702细胞的存活率。A、B、C中, **P*<0.05, ***P*<0.01, EF25-(GSH)₂组与姜黄素组相比较; E中, **P*<0.05, ***P*<0.01, EF25-(GSH)₂组与顺铂组相比较。

A: cell viability of HepG2 at 48 h; B: cell viability of SMMC-7721 at 48 h; C: cell viability of BEL-7402 at 48 h; D: IC₅₀ against HepG2 cells at 24 h and 48 h; E: cell viability of HL-7702 at 48 h. **P*<0.05, ***P*<0.01 in A, B, C are the differences between EF25-(GSH)₂ and curcumin; **P*<0.05, ***P*<0.01 in E are the differences between EF25-(GSH)₂ and cisplatin.

图2 EF25-(GSH)₂、姜黄素以及顺铂对细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of EF25-(GSH)₂, curcumin or cisplatin on the livability of cell line



A: 24 h光镜下不同浓度EF25-(GSH)₂处理的HepG2的形态学变化, 400×; B: 正常HepG2电镜对照; C: 电镜下EF25-(GSH)₂ 20 μmol/L处理24 h的HepG2, 箭头所指为正在发生自噬的自噬泡。

A: HepG2 cells treated with increasing concentrations of EF25-(GSH)₂ for 24 h were observed under a light microscope and representative images were visualized, 400×; B: a representative transmission electron microscopy (TEM) image of untreated HepG2 cells; C: representative TEM image of cells treated with 20 μmol/L EF25-(GSH)₂ for 24 h. Arrows showed autophagic vacuoles.

图3 不同浓度的EF25-(GSH)₂作用24 h后HepG2的形态变化

Fig.3 Morphological appearance in HepG2 treated with different concentrations of EF25-(GSH)₂ after 24 h

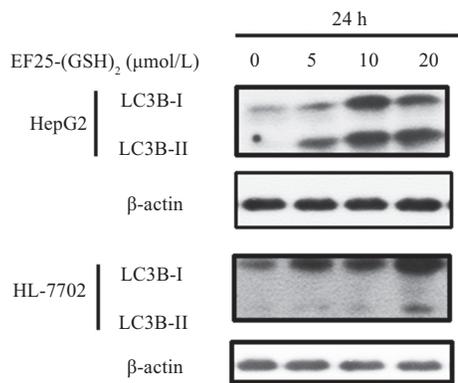


图4 不同浓度EF25-(GSH)₂引起HepG2及HL-7702细胞自噬相关LC3B蛋白检测(24 h)

Fig.4 Detection of autophagy-related protein LC3B in HepG2 and HL-7702 cell lines treated with different concentrations of EF25-(GSH)₂ (24 h)

能是通过诱导细胞内与能量代谢调节的相关蛋白产生效应,使细胞产生自噬使大量细胞器降解,从而继发引起胞质的空泡化,细胞内营养物质流失,细胞代谢功能异常使细胞死亡。

同时,我们利用LC3B作为检测肝癌细胞HepG2和正常肝细胞HL-7702自噬的分子标志。LC3B有两种类型,分别为LC3B-I和LC3B-II,自噬发生时

LC3B-I降解为LC3B-II。图4是用Western blot方法检测LC3B的活性变化的结果,其显示在5~20 μmol/L的EF25-(GSH)₂范围内,随着浓度的增加,HepG2细胞内LC3B-I型降解成LC3B-II型的比例增加,而在相对应的药物浓度下HL-7702发生自噬的程度较微弱,在10 μmol/L以上的药物处理时才会有明显自噬情况的发生,这也与细胞增殖实验的结果相吻合。

在细胞发生自噬时,形成的自噬体表面上的LC3B会从胞浆转移到自噬体的表面膜上。用GFP融合表达的LC3B质粒转染细胞后,正常细胞GFP弥散分布在细胞内,如果有自噬体的形成,将形成点状或围绕自噬体呈环状荧光。其中,GFP(绿色)对酸性敏感,在自噬溶酶体中被降解,只有mCherry的红色荧光,未与溶酶体融合的自噬泡呈中性,既有绿光也有红光。从图5中可以观察到,随着EF25-(GSH)₂浓度的提高,细胞质中点状荧光增强,说明细胞自噬程度提高。

2.3 EF25-(GSH)₂对AMPK/Akt/mTOR通路的影响

AMPK/Akt/mTOR通路为细胞能量代谢的重要调控通路,为了研究EF25-(GSH)₂对AMPK/Akt/mTOR通路的影响,我们用不同浓度的姜黄素以及

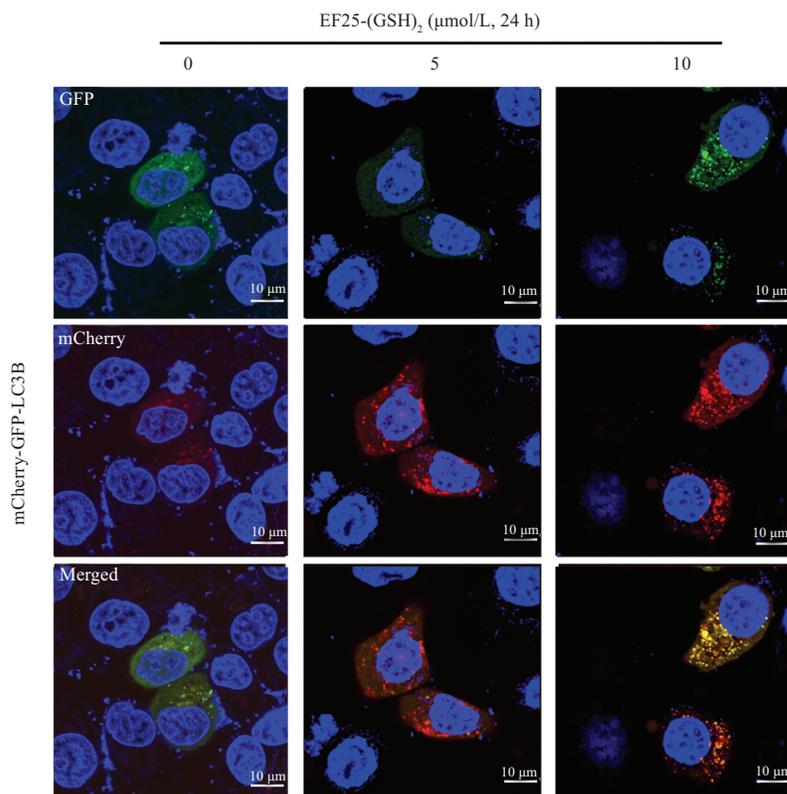


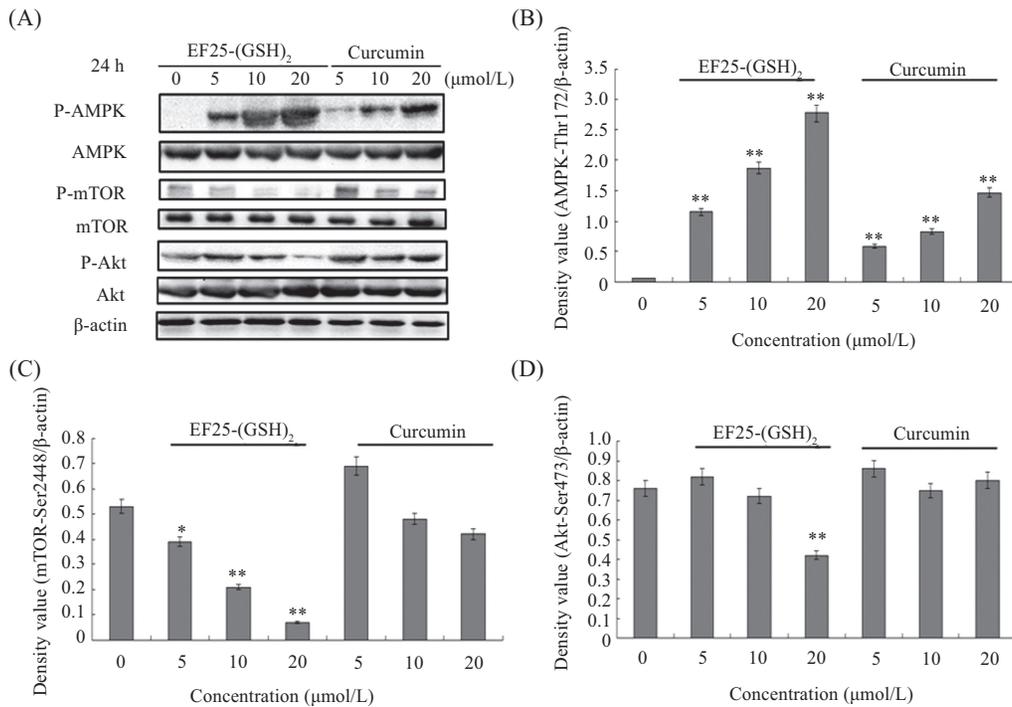
图5 mCherry-GFP-LC3B在不同药物浓度处理的HepG2细胞中的分布

Fig.5 The distribution of mCherry-GFP-LC3B in HepG2 treated with drug of different concentrations

EF25-(GSH)₂处理HepG2后,在24 h收集细胞,Western blot检测AMPK-T172、Akt-Ser473及mTOR-Ser2448磷酸化水平的变化,发现EF25-(GSH)₂处理使AMPK-Thr172位点磷酸化水平上升而Akt-Ser473、mTOR-Ser2448下降,且随着浓度的增加效果增强(图6),从而激活AMPK,抑制Akt/mTOR,提示EF25-(GSH)₂可能通过激活AMPK/Akt/mTOR的能量代谢调控通路,从而抑制细胞的增殖,促进细胞自噬使细胞死亡。

而在同等作用浓度下,姜黄素作用后蛋白的磷酸化趋势与EF25-(GSH)₂基本一致,但作用效果要远低于EF25-(GSH)₂。

为进一步探讨EF25-(GSH)₂处理后所引起的对AMPK/Akt/mTOR通路的影响是否特异,本研究在用EF25-(GSH)₂处理的同时加入100 nmol/L的PI3K/Akt,特异性抑制剂渥曼青霉素后检测细胞存活率及LC3B活性的变化(图7)。结果显示:在EF25-(GSH)₂

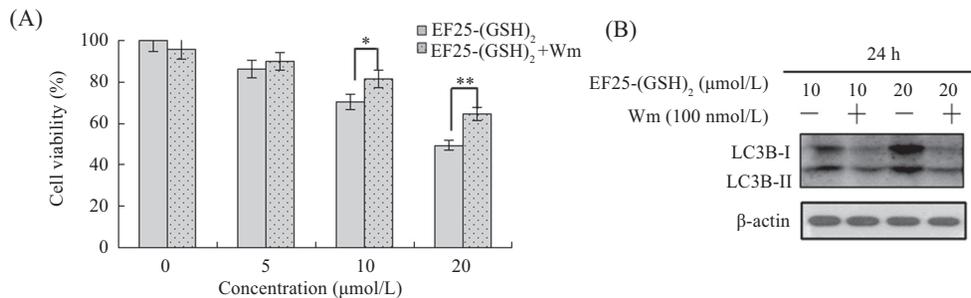


A: AMPK、mTOR、Akt磷酸化水平的检测(蛋白免疫印迹法); B、C、D: 分别为AMPK、mTOR、Akt灰度值(磷酸化蛋白/β-肌动蛋白)。实验进行3次独立性的重复。*P<0.05, **P<0.01, 与0 μmol/L组比较。

A: the phosphorylation levels of AMPK, mTOR and Akt were detected by Western blot; B, C and D: the density value of AMPK, mTOR and Akt (phosphorylated protein/β-actin) respectively. Experiments were repeated three times independently. *P<0.05, **P<0.01 compared with the 0 μmol/L group.

图6 EF25-(GSH)₂对AMPK/Akt/mTOR信号传导通路关键蛋白的影响

Fig.6 Effect of EF25-(GSH)₂ on the key protein of AMPK/Akt/mTOR signaling pathway

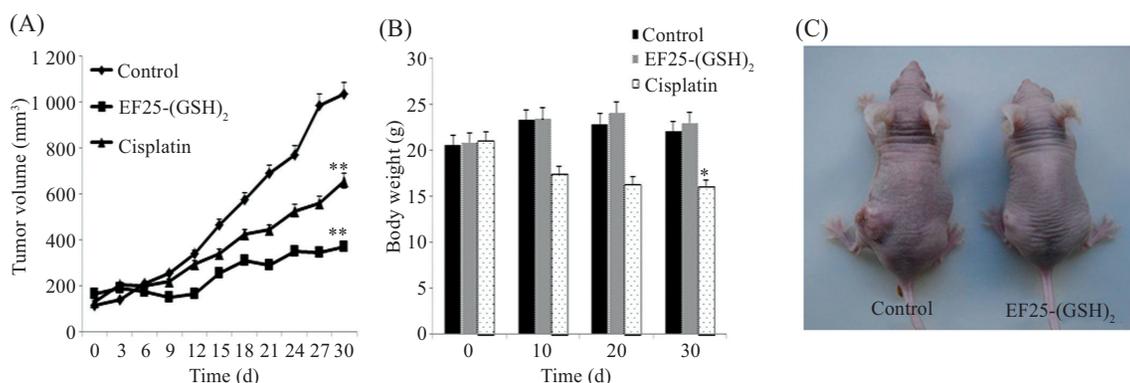


A: 24 h HepG2细胞的存活率, *P<0.05, **P<0.01; B: LC3B蛋白表达量的检测。Wm: 渥曼青霉素。

A: cell viability of HepG2 at 24 h, *P<0.05, **P<0.01; B: the expression levels of LC3B were detected by Western blot. Wm: wortmannin.

图7 EF25-(GSH)₂联合渥曼青霉素对HepG2细胞存活率及自噬相关蛋白LC3B表达量的影响

Fig.7 Effect of EF25-(GSH)₂ with or without wortmannin on the viability and expression level of autophagy-related protein LC3B of HepG2 cell line



A: 肿瘤体积的变化曲线($n=6$), $**P<0.01$, EF25-(GSH)₂组及顺铂组分别与空白对照组比较; B: 给药过程中不同组间小鼠体重的比较($n=6$), $*P<0.05$, 顺铂组与EF25-(GSH)₂组比较; C: EF25-(GSH)₂抑制裸鼠体内肝肿瘤的生长。

A: the tumor growth curve ($n=6$); B: comparison of body weight ($n=6$); C: EF25-(GSH)₂ suppressed the growth of human hepatoma tumor in nude mouse. $**P<0.01$ in A is the differences between EF25-(GSH)₂, cisplatin and control; $*P<0.05$ in B is the difference between EF25-(GSH)₂ and cisplatin.

图8 EF25-(GSH)₂荷瘤裸鼠体内实验结果

Fig.8 The tumor-bearing nude mice experimental results which treated by EF25-(GSH)₂

为10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 时与单独加药组相比, 渥曼青霉素组细胞存活率分别升高了11%、18%左右, 呈现显著性差异、极显著性差异(图7A); 另一方面, 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 的EF25-(GSH)₂加渥曼青霉素处理组的LC3B-I降解成LC3B-II的比例减少(图7B)。实验结果说明, 当渥曼青霉素抑制自噬后, 细胞存活率增加, 提示在本实验中, EF25-(GSH)₂对HepG2细胞处理极大可能是通过调节AMPK/Akt/mTOR通路引起细胞自噬从而使细胞死亡。

2.4 EF25-(GSH)₂抑制荷瘤鼠肿瘤生长

为了检测EF25-(GSH)₂是否具有抑制肝肿瘤生长的活性, 我们将HepG2细胞植入裸鼠背部皮下并让其增殖形成200 mm³的皮下肿瘤块。对建模成功的模型鼠进行分组, 顺铂及EF25-(GSH)₂处理组的裸鼠每天进行1 mol/kg的腹腔给药注射($n=6$), 空白组的裸鼠($n=6$)进行相同体积PBS的腹腔注射, 给药周期为30 d。结果显示, EF25-(GSH)₂处理组的裸鼠所荷肿瘤生长缓慢, 与空白对照组差异显著, 其抑瘤效果甚至优于顺铂(图8)。为了检测EF25-(GSH)₂的腹腔注射是否影响正常小鼠的生理特征和健康状况, 我们同时给未荷瘤的裸鼠腹腔注射相同剂量的EF25-(GSH)₂, 结果小鼠健康状况良好, 检测脾重、肝重和体重都未见明显变化, 提示EF25-(GSH)₂的腹腔注射对正常小鼠没有明显毒性。

3 讨论

本研究发现, 姜黄素类似物EF25-(GSH)₂对肝癌

细胞系的增殖有显著的抑制作用。细胞增殖检测的结果证明, EF25-(GSH)₂对肝癌细胞有选择性杀伤作用, 在显著抑制肝癌细胞系增殖的同时, 对正常肝细胞系保持相对较低的抑制率, 其对正常细胞系的毒性虽略大于姜黄素, 但对肝癌细胞系的半数抑制率却远远低于姜黄素, 其抑制效果甚至超过了目前肝癌的常用化疗药物顺铂, 因此只要选择合适的药物作用浓度, 即可达到杀伤肿瘤细胞而不损伤正常细胞的理想效果。实验结果显示, EF25-(GSH)₂对肝癌细胞系的抑制效果呈现剂量依赖性和时间依赖性, 随着药物作用时间延长至48 h, EF25-(GSH)₂的浓度在20 $\mu\text{mol/L}$ 左右时, 其正常细胞系毒性极低, 但对肝癌细胞系的抑制率已经达到80%左右。体内实验结果证明, EF25-(GSH)₂在动物体内亦可发挥很好的生物活性, 而且与体外实验结果一致, EF25-(GSH)₂治疗后没有引起肝癌模型鼠的体重下降, 用EF25-(GSH)₂对正常鼠给药后也未观察到明显的体重变化和脏器的病变, 这些结果证明EF25-(GSH)₂是一种低毒性的药物。

对EF25-(GSH)₂的作用机理的探讨也取得了一些值得深入研究的实验结果。首先, 从对肿瘤细胞形态变化的观察结果来看, 在电镜下细胞有大量自噬泡和空泡化现象的产生, 并随着浓度和时间的增加而增强。Western blot检测LC3B表达以及LC3B质粒转染实验也说明了细胞自噬的产生。我们还发现, EF25-(GSH)₂处理细胞后引起了AMPK磷酸化量的增加以及mTOR和Akt磷酸化的降低, 与许多

文献报道的姜黄素对肿瘤细胞相关蛋白磷酸化的作用相似^[25-26],但效果更加明显。目前已经有大量报道证明,AMPK/Akt/mTOR通路与肿瘤有密切关系,肿瘤细胞有不同于正常细胞的代谢特征,细胞内AMP/ATP含量的下降会导致AMPK的活化^[27-29]。实验证实,通过细胞内AMPK的激活降低mTOR和Akt信号蛋白的表达,EF25-(GSH)₂在HepG2细胞中引发了自噬进程,而其中间过程仍需要进一步的实验来证明。与文献报道的其他姜黄素类似物比较,我们推测EF25-(GSH)₂之所以延长作用时间后抑制效果大大增加,并且对正常细胞毒性较小,可能是谷胱甘肽(GSH)联合能清除肿瘤细胞死亡过程中产生的自由基等有害物质并对正常细胞起到了一定保护作用的效果^[30]。EF25-(GSH)₂使细胞质中迅速产生大量的空泡而细胞核形态变化缓慢,也说明了EF25-(GSH)₂可能对细胞核内遗传物质的损伤较小而通过能量代谢的调节使肿瘤细胞死亡,可能成为一种新型安全的抗癌药物。

在本研究中,我们首次通过体外实验和体内实验验证了姜黄素类似物EF25-(GSH)₂的抗肝癌效果,并同时证明了它对正常细胞毒性较小。我们还对EF25-(GSH)₂抗肝癌的作用机理进行了初步探讨。研究结果不仅为EF25-(GSH)₂作为肝癌化疗药物的临床应用提供了重要的实验基础,还为继续开发姜黄素类似物提供了一定的理论依据。

参考文献 (References)

- 1 余美荣, 蒋福升, 丁志山. 姜黄素的研究进展. 中草药(Yu Meirong, Jiang Fusheng, Ding Zhishan. Advances in studies on curcumin. Chinese Traditional and Herbal Drugs) 2009; 40(5): 828-30.
- 2 罗廷顺, 李洪文, 刘光明. 姜黄素的提取分离与药理作用研究进展. 现代药物与临床(Luo Tingshun, Li Hongwen, Liu Guangming. Advances in studies on extraction, separation, and pharmacological action of curcumin. Drugs & Clinic) 2011; 26(2): 102-7.
- 3 赵秀玲. 姜黄的化学成分药理作用及其资源开发的研究进展. 中国调味品(Zhao Xiuling. Research progress in chemical constituents, biological activities and exploration utilization of Curcuma longa L. China Condiment) 2001; 17(2): 95-7.
- 4 Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: How many ways can curry kill tumor cells selectively. AAPS J 2009; 11(3): 495-510.
- 5 Mohanty C, Das M, Sahoo SK. Emerging role of nanocarriers to increase the solubility and bioavailability of curcumin. Expert Opin Drug Deliv 2012; 9(11): 1347-64.
- 6 Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. Biochem Pharmacol 2008; 76(11): 1590-611.
- 7 Steward WP, Gescher AJ. Curcumin in cancer management: Recent results of analogue design and clinical studies and desirable future research. Mol Nutr Food Res 2008; 52(9): 1005-9.
- 8 Adams BK, Cai J, Armstrong J, Herold M, Lu YJ, Sun A, et al. EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. Anticancer Drugs 2005; 16(3): 263-75.
- 9 Thomas SL, Zhong D, Zhou W, Malik S, Liotta D, Snyder JP, et al. EF24, a novel curcumin analog, disrupts the microtubule cytoskeleton and inhibits HIF-1. Cell Cycle 2008; 7(15): 2409-17.
- 10 Kasinski AL, Du Y, Thomas SL, Zhao J, Sun SY, Khuri FR, et al. Inhibition of IκB kinase-nuclear factor-κB signaling pathway by 3,5-bis (2-fluorobenzylidene) piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. Mol Pharmacol 2008; 74(3): 654-61.
- 11 Thomas SL, Zhao J, Li Z, Lou B, Du Y, Purcell J, et al. Activation of the p38 pathway by a novel monoketone curcumin analog, EF24, suggests a potential combination strategy. Biochem Pharmacol. 2010; 80(9): 1309-16.
- 12 Yang Z, Klionsky DJ. Eat or be eaten: A history of macroautophagy. Nat Cell Biol 2010; 12(9): 814-22.
- 13 石峰, 王明荣. 细胞自噬及其与肿瘤关系的研究进展. 中国细胞生物学学报(Shi Feng, Wang Mingrong. Progress in studies on the relationship between autophagy and cancer. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(12): 1366-73.
- 14 Qian W, Liu J, Jin J, Ni W, Xu W. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. Leuk Res 2007; 31(3): 329-39.
- 15 Lefranc F, Facchini V, Kiss R. Proautophagic drugs: A novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. Oncologist 2007; 12(12): 1395-403.
- 16 Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. Cell 2013; 152(1/2): 290-303.
- 17 Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, Depinho RA, et al. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. Cancer Cell 2004; 6(1): 91-9.
- 18 Nakada D, Saunders TL, Morrison SJ. Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature 2010; 468(7324): 654-8.
- 19 Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature 2001; 411(6835): 355-65.
- 20 Markman B, Dienstmann R, Taberero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway—beyond rapalogs. Oncotarget 2010; 1(7): 530-43.
- 21 LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. Drug Resist Updat 2008; 11(1/2): 32-50.
- 22 Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. Biochim Biophys Acta 2009; 1793(9): 1516-23.
- 23 Crazzolara R, Bradstock KF, Bendall LJ. RAD001 (everolimus) induces autophagy in acute lymphoblastic leukemia. Autophagy 2009; 5(5): 727-8.
- 24 Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishi-

- da T, *et al.* Rapamycin induces autophagy in islets: Relevance in islet transplantation. *Transplant Proc.* 2009; 41(1): 334-8.
- 25 Kim T, Davis J, Zhang AJ, He X, Mathews ST. Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388(2): 377-82.
- 26 Wong TF, Takeda T, Li B, Tsujii K, Kitamura M, Kondo A, *et al.* Curcumin disrupts uterine leiomyosarcoma cells through AKT-mTOR pathway inhibition. *Gynecol Oncol* 2011; 122(1): 141-8.
- 27 Fay JR, Steele V, Crowell JA. Energy homeostasis and cancer prevention: the AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2(4): 301-9.
- 28 Frederich M, O'Rourke MR, Furey NB, Jost JA. AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: An early indicator of temperature stress. *J Exp Biol* 2009; 212(5): 722-30.
- 29 Wang W, Guan KL. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 196(1): 55-63.
- 30 刘丘岗, 张华茹, 谭于飞. 还原型谷胱甘肽治疗抗结核药物性肝损害38例临床观察. *中国医疗前沿*(Liu Qiugang, Zhang Huayu, Tan Yufei. Clinical observation of reduced glutathione in treating 38 case s of liver injury caused by antitubercular agents. *National Medical Frontiers of China*) 2011; 6(4): 47-8.