

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.01.0038

· 论 著 ·

姜黄素诱导人肝癌细胞系 Huh7 自噬和凋亡

尹煜鹏, 孙树汉*

海军军医大学(第二军医大学)基础医学院医学遗传学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨姜黄素诱导人肝癌细胞 Huh7 自噬和凋亡的作用, 以及抑制自噬对姜黄素诱导凋亡的影响。**方法** 将姜黄素(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)加入人肝癌细胞系 Huh7 的培养液中, 用 CCK-8 检测细胞增殖水平变化。Huh7 细胞用 5~40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素培养 48 h, 通过蛋白质印迹法检测自噬微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) - II/LC3- I 的比值, 免疫荧光法检测自噬小体的形成, 评估 Huh7 细胞自噬水平的变化。通过流式细胞术检测 Huh7 细胞凋亡情况。加入 5 mmol/L 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素培养 Huh7 细胞, 检测 Huh7 细胞凋亡水平和自噬水平的变化。**结果** CCK-8 检测显示姜黄素能抑制 Huh7 细胞的增殖($P<0.05$, $P<0.01$), 且细胞凋亡率随着姜黄素浓度的升高而上升; 蛋白质印迹检测显示加入姜黄素后 LC3- II/LC3- I 的比值上升($P<0.05$, $P<0.01$), 免疫荧光检测显示加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素后自噬小体增多。与单独使用 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素培养的 Huh7 细胞相比, 姜黄素联用 3-MA 培养的 Huh7 细胞 LC3- II/LC3- I 的比值下降($P<0.01$), 自噬小体减少。流式细胞术检测发现 5~40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素促进了 Huh7 细胞凋亡($P<0.05$, $P<0.01$), 而联用 3-MA 后与单独使用 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素培养相比引起的 Huh7 细胞凋亡减少($P<0.05$)。**结论** 姜黄素能诱导 Huh7 细胞凋亡、抑制细胞增殖并促进细胞自噬, 抑制自噬能减弱姜黄素对 Huh7 细胞的诱导凋亡效应。

[关键词] 肝细胞癌; 姜黄素; 自噬; 细胞凋亡**[中图分类号]** R 735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2019)01-0038-05

Curcumin inducing autophagy and apoptosis of human hepatocarcinoma cell line Huh7

YIN Yu-peng, SUN Shu-han*

Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the role of curcumin in inducing autophagy and apoptosis of human hepatocarcinoma cell line Huh7, and the effect of autophagy inhibition on curcumin-induced apoptosis. **Methods** Human hepatocarcinoma cell line Huh7 was cultured using curcumin (5, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$)-contained medium, and the proliferation ability was detected by CCK-8 kit. After culturing Huh7 cells using 5-40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin-contained medium for 48 h, the expression levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)- II and LC3- I were measured by Western blotting, and the ratio of LC3- II to LC3- I was calculated. The autophagosome was observed under fluorescence microscope. The apoptosis level of Huh7 cells was measured by flow cytometry. Then Huh7 cells were cultured using the medium containing 5 mmol/L autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) and 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, and the apoptotic and autophagic levels were detected. **Results** CCK-8 assay showed that curcumin could significantly inhibit the proliferation of Huh7 cells in a dose dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). Western blotting analysis showed that curcumin significantly increased the ratio of LC3- II to LC3- I ($P<0.05$, $P<0.01$). Immunofluorescence microscopy showed that the number of autophagosome increased after adding 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin. Compared with the Huh7 cells cultured with the medium containing curcumin alone at 20 $\mu\text{mol/L}$, the the ratio of LC3- II to LC3- I was significantly decreased in the Huh7 cells cultured with the medium containing curcumin and 3-MA ($P<0.01$), and the number of autophagosome decreased. Flow cytometry showed that the 5-40 $\mu\text{mol/L}$ curcumin significantly induced the apoptosis of Huh7 cells ($P<0.05$, $P<0.01$), and 3-MA combined with curcumin could significantly decrease the apoptosis of Huh7 cells compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin alone ($P<0.05$). **Conclusion** Curcumin induces the apoptosis of Huh7 cells, inhibits proliferation and increases autophagy

[收稿日期] 2018-08-24 **[接受日期]** 2018-11-23**[基金项目]** 国家自然科学基金(81830085, 8177110318). Supported by National Natural Science Foundation of China (81830085, 8177110318).**[作者简介]** 尹煜鹏, 硕士生. E-mail: yinyupeng163@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871055, E-mail: shsun@vip.sina.com

level, and inhibition of autophagy can attenuate the apoptotic effect of curcumin on Huh7 cells.

[Key words] hepatocellular carcinoma; curcumin; autophagy; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(1): 38-42]

肝细胞癌作为常见恶性肿瘤之一, 在发展中国家有较高的发病率, 严重威胁人类健康。且肝细胞癌起病较隐匿, 大多数患者发现时已处于晚期, 已失去手术治疗的最佳时机^[1]。通过非手术治疗方法治疗晚期肝细胞癌是一种重要的手段, 然而肝细胞癌对常规的放射治疗和化学治疗并不敏感, 因此寻找新的治疗靶点和开发新的药物显得尤为重要。姜黄素作为中药姜黄中的一种化学成分, 具有一定的抗肿瘤作用, 且其对正常细胞毒性低, 是一种潜在的抗肿瘤药^[2]。研究发现, 姜黄素能通过促进肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤作用^[3], 但姜黄素促进肿瘤细胞凋亡的机制不十分明确, 仍需进一步探讨。

自噬是细胞通过吞噬自身胞质蛋白和细胞器实现自我更新的一种方式^[4]。自噬在肿瘤中的作用具有双面性, 既能对肿瘤细胞增殖产生抑制作用, 又能促进肿瘤的发生和发展^[5]。研究发现哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路能够调节自噬的产生, 而姜黄素能通过 mTOR 通路发挥抗肿瘤作用^[3]。有研究表明自噬与凋亡存在相关性, 自噬能够促进细胞凋亡^[6]。本研究旨在验证姜黄素对人肝癌细胞系 Huh7 细胞的抑制增殖和促进凋亡作用, 并观察姜黄素对自噬的影响及自噬在姜黄素抗肿瘤效应中所发挥的作用, 探讨姜黄素对肝细胞癌的抑癌作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂 人肝癌细胞系 Huh7 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院 (目录号: TCHu182), DMEM 细胞培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 青霉素、链霉素、蛋白质印迹分析所需试剂均购自上海博光生物科技有限公司, 姜黄素购自美国 Sigma 公司, 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 购自大连美仑生物技术有限公司, 自噬检测试剂盒购自英国 Abcam 公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 自噬微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)

兔单克隆抗体购自美国 CST 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养及分组 Huh7 细胞用含 10% FBS 和 1% 青霉素、链霉素的 DMEM 培养液于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。将 Huh7 细胞传代等分到 6 孔板中, 培养 24 h 后用于实验; 3-MA 提前 1 h 加入细胞中, 终浓度为 5 mmol/L。细胞分为 7 组: 空白对照组, 5、10、20、40 μmol/L 姜黄素处理组, 3-MA 处理组, 3-MA 和 20 μmol/L 姜黄素联合处理组。给药 48 h 后收集细胞备用。

1.3 CCK-8 检测细胞增殖情况 取对数生长期的 Huh7 细胞, 以每孔 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔板内。细胞完全贴壁后加入含 5、10、20、40 μmol/L 姜黄素的培养液, 同时设置不加姜黄素的对照组, 每组设 5 个复孔, 培养 24、36、48 h 后弃培养液, 加入含 CCK-8 试剂的培养液, 2 h 后用酶标仪检测 450 nm 处的光密度 (D) 值。

1.4 蛋白质印迹法检测细胞中 LC3-II 和 LC3-I 的表达 将 Huh7 细胞用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 2 次后加入 RIPA 蛋白裂解液 200 μL 和蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 2 μL, 冰上放置 5 min 后刮下细胞, 4 °C 摇床放置 10 min。收集细胞悬液, 4 °C 17 000 × g 离心 8 min, 取上清用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。调整蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液后 100 °C 变性 5 min。经 12.5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 200 mA 恒流转膜, 室温封闭 10 min, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, 放入 TBST 缓冲液中摇床 3 次, 每次 10 min; 随后加入二抗室温避光孵育 1 h, 用 TBST 缓冲液洗 3 次。使用 Odessey 红外荧光扫描成像系统检测蛋白荧光强度。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 各组 Huh7 细胞处理 48 h 后, 弃培养液, 用 PBS 洗 1 次后加胰酶消化。终止消化后吹打成细胞悬液, 1 000 × g 离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS 洗 1 次, 1 000 × g 离心 5 min, 弃上清后加 195 μL Annexin

V-FITC 结合液重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶染色液,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.6 细胞自噬小泡检测 制作细胞爬片,48 h 后弃培养液,用 PBS 洗 2 次,再用检测缓冲液洗 2 次后,加入 100 μL 荧光检测试剂,覆盖玻片,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 30 min,用检测缓冲液洗 1 次,加入 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min 后用检测缓冲液洗 3 次。用抗荧光淬灭封片液封片后,通过荧光显微镜观察细胞自噬小体形成情况。

1.7 统计学处理 应用 GraphPad Prism 6 软件进行数据分析和制图,分别采用两样本 t 检验、单因素方差分析和多因素方差分析比较组间差异,检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 姜黄素对 Huh7 细胞增殖的影响 CCK-8 检测结果显示 5~40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素能抑制 Huh7 细胞的增殖 ($P<0.05$, $P<0.01$; 图 1)。

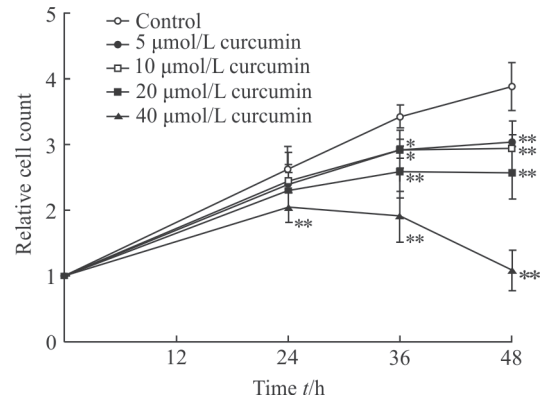


图 1 CCK-8 检测经姜黄素处理后 Huh7 细胞的增殖能力

Fig 1 Proliferation ability of Huh7 cells treated with curcumin measured by CCK-8 assay

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group. $n=5$, $\bar{x}\pm s$

2.2 姜黄素对 Huh7 细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示,加入 5~40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素后, Huh7 细胞的凋亡率增加 ($P<0.05$, $P<0.01$),且细胞凋亡率随着姜黄素浓度的升高而上升 (图 2),说明姜黄素能促进 Huh7 细胞凋亡。

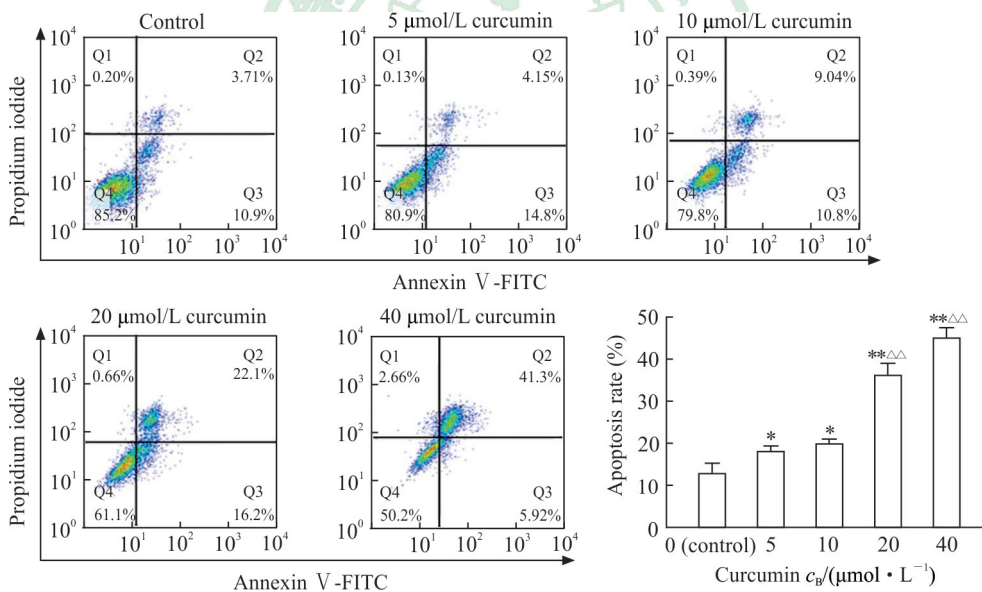


图 2 流式细胞术检测经姜黄素处理后 Huh7 细胞凋亡情况

Fig 2 Apoptosis level of Huh7 cells treated with curcumin detected by flow cytometry

FITC: Fluorescein isothiocyanate. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs 5 $\mu\text{mol/L}$ or 10 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.3 姜黄素对 Huh7 细胞自噬的影响 蛋白质印迹检测结果显示,各姜黄素处理组 LC3-II/LC3-I 比值上升 ($P<0.05$, $P<0.01$; 图 3),说明姜黄素促进了细胞自噬蛋白的产生。荧光显微镜检测 Huh7 细胞内的自噬小体,发现 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理组绿色荧光强度强于对照组,说明 Huh7 细胞内的自噬小体增多 (图 4)。上述结果表明姜黄素能促进 Huh7 细胞的自噬。

2.4 抑制自噬对姜黄素诱导 Huh7 细胞凋亡的

影响 与只含 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组相比,3-MA 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素联合使用组 LC3-II/LC3-I 比值降低 ($P<0.01$, 图 5)、自噬小体减少 (图 6),说明 3-MA 减弱了姜黄素对 Huh7 细胞的促进自噬作用。同时流式细胞术检测结果显示 3-MA 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素联合使用组 Huh7 细胞凋亡率下降,与只加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$, 图 7),说明自噬抑制剂 3-MA 能抑制姜黄素诱导的促 Huh7 细胞凋亡作用。

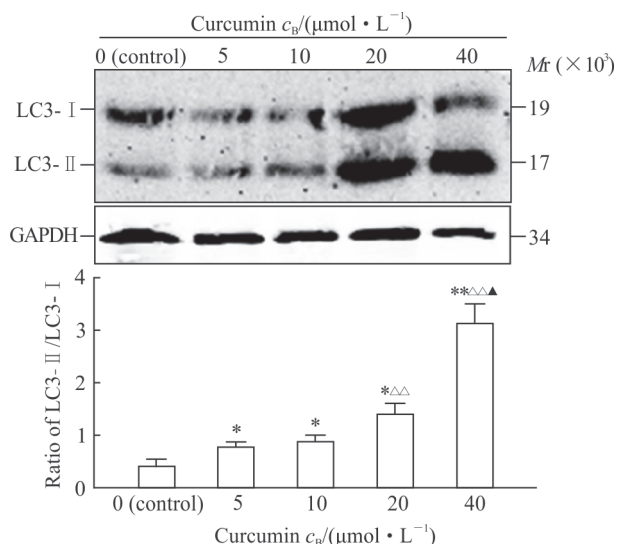


图 3 蛋白质印迹法检测经姜黄素处理后 Huh7 细胞自噬相关蛋白的表达

Fig 3 Autophagy-related protein expression in Huh7 cells treated with curcumin by Western blotting

LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group; $\Delta P < 0.05$ vs 10 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

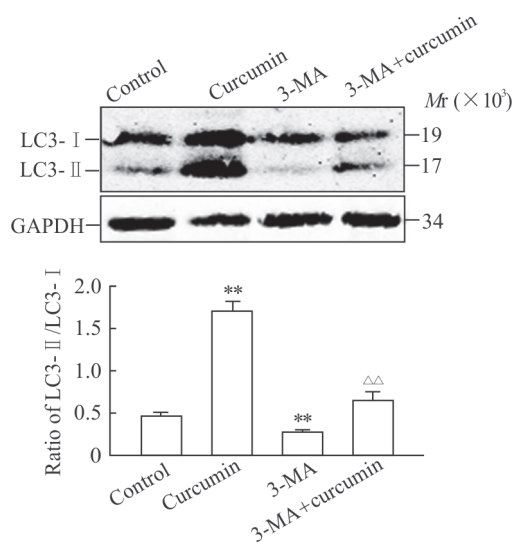


图 5 经 3-MA 和姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 联合处理后 Huh7 细胞自噬相关蛋白表达的变化

Fig 5 Autophagy-related protein expression in Huh7 cells treated with 3-MA and curcumin (20 $\mu\text{mol/L}$)

3-MA: 3-Methyladenine; LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs curcumin group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

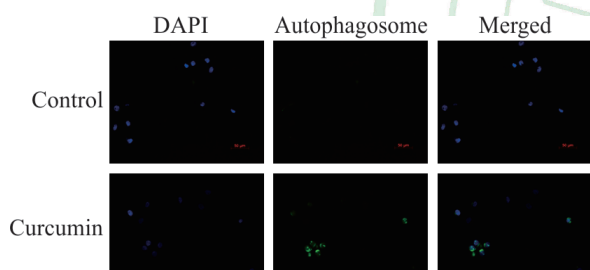


图 4 荧光显微镜观察经姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理后 Huh7 细胞自噬小体的形成

Fig 4 Autophagosome in Huh7 cells treated with curcumin (20 $\mu\text{mol/L}$) under fluorescence microscope

DAPI: 4', 6-Diamidino-2-phenylindole. Original magnification: $\times 200$

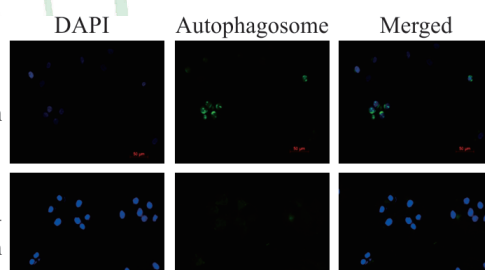


图 6 荧光显微镜下观察经 3-MA 和姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 联合处理后 Huh7 细胞自噬小体的形成

Fig 6 Autophagosome in Huh7 cells treated with 3-MA and curcumin (20 $\mu\text{mol/L}$) under fluorescence microscope

3-MA: 3-Methyladenine; DAPI: 4', 6-Diamidino-2-phenylindole. Original magnification: $\times 200$

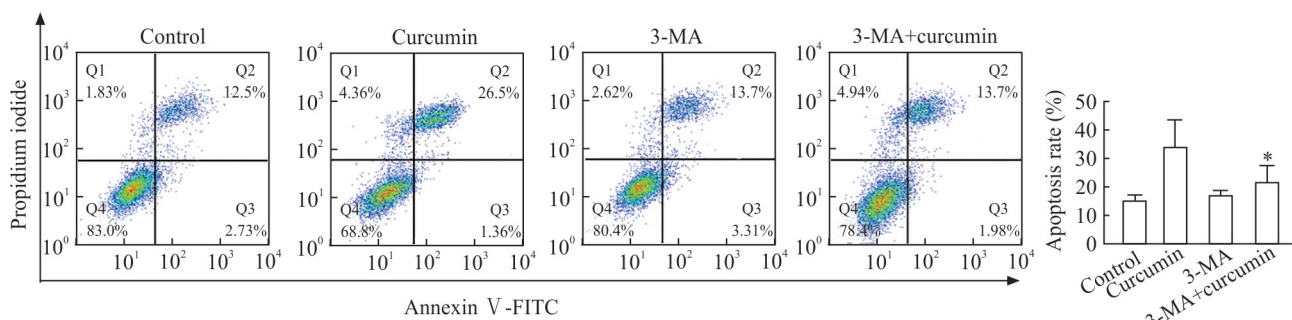


图 7 流式细胞术检测经 3-MA 和姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 联合处理后 Huh7 细胞的凋亡情况

Fig 7 Apoptosis level of Huh7 cells treated with 3-MA and curcumin (20 $\mu\text{mol/L}$) by flow cytometry

3-MA: 3-Methyladenine; FITC: Fluorescein isothiocyanate. * $P < 0.05$ vs curcumin group. $n = 4, \bar{x} \pm s$

3 讨论

姜黄素是从姜黄根茎中提取的一种酚性色素,具有广谱抗肿瘤作用,能够诱导肿瘤细胞凋亡^[7]。文献报道姜黄素及其衍生物能诱导肿瘤细胞自噬^[8],但自噬在姜黄素诱导人肝癌细胞 Huh7 凋亡中起何种作用尚未得到清楚阐释。本研究发现,姜黄素能抑制人肝癌细胞系 Huh7 细胞的增殖并诱导其凋亡,随着姜黄素浓度的升高其作用效果越明显。姜黄素加入细胞 48 h 之后细胞自噬小泡增加,LC3- II/LC3- I 比值增加,这都提示姜黄素能诱导 Huh7 细胞自噬;自噬抑制剂 3-MA 本身对 Huh7 细胞凋亡无明显影响,但能抑制姜黄素对 Huh7 细胞的诱导凋亡作用。

本研究结果表明姜黄素可能通过诱导细胞自噬促进 Huh7 细胞的凋亡,但其机制仍待进一步研究。目前认为自噬促进细胞凋亡可能的机制有以下几个方面:(1)自噬能选择性降低细胞凋亡中抑制分子的表达(如 caveolin-1 和 Fap-1),从而促进细胞凋亡^[6,9];(2)自噬产物能形成类似于支架的结构,为细胞凋亡反应提供场所^[10];(3)自噬相关分子的切割产物促进凋亡的发生,比如细胞凋亡与钙蛋白酶介导的 Atg5 切割相关,而 Atg 的切割产物能阻碍抗凋亡分子 Bcl-x_L 发挥功能,从而触发细胞凋亡^[11]。下一步我们将从分子水平探讨姜黄素诱导 Huh7 细胞自噬促进细胞凋亡的相关机制。

[参考文献]

- [1] ATTWA M H, EL-ETREBY S A. Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7: 1632-1651.
- [2] BOSE S, PANDA A K, MUKHERJEE S, SA G.

Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system[J/OL]. *Cell Div*, 2015, 10: 6. doi: 10.1186/s13008-015-0012-z.

- [3] LIU F, GAO S, YANG Y, ZHAO X, FAN Y, MA W, et al. Antitumor activity of curcumin by modulation of apoptosis and autophagy in human lung cancer A549 cells through inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39: 1523-1531.
- [4] WHITE E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 401-410.
- [5] XU D W, ZHANG G Q, WANG Z W, XU X Y, LIU T X. Autophagy in tumorigenesis and cancer treatment[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16: 2167-2175.
- [6] DOHERTY J, BAEHRECKE E H. Life, death and autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 1110-1117.
- [7] KIM W K, PYEE Y, CHUNG H J, PARK H J, HONG J Y, SON K H, et al. Antitumor activity of spicatoside A by modulation of autophagy and apoptosis in human colorectal cancer cells[J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 1097-1104.
- [8] XIE W Y, ZHOU X D, YANG J, CHEN L X, RAN D H. Inhibition of autophagy enhances heat-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells through ER stress pathways[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 607: 55-66.
- [9] GUMP J M, STASKIEWICZ L, MORGAN M J, BAMBERG A, RICHES D W, et al. Autophagy variation within a cell population determines cell fate through selective degradation of Fap-1[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 47-54.
- [10] YOUNG M M, TAKAHASHI Y, KHAN O, PARK S, HORI T, YUN J, et al. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 12455-12468.
- [11] YOUSEFI S, PEROZZO R, SCHMID I, ZIEMIECKI A, SCHAFFNER T, SCAPOZZA L, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 1124-1132.

[本文编辑] 尹 荼