

文章编号:1001-6880(2014)3-0329-06

姜黄素通过 MAPK 信号通路诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡

李会宣¹, 杨 虹¹, 张红兵¹, 高 健^{2*}¹河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄 050061;²华北制药集团新药研究开发有限责任公司 抗体药物研制国家重点实验室, 石家庄 050015

摘要:本文阐述了姜黄素(Curcumin)对体外培养的人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响,并探讨了其诱导凋亡的信号转导机制。采用 MTT 法和细胞计数法检测不同浓度姜黄素对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖的影响,利用流式细胞术检测姜黄素对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的影响,通过 RT-PCR 及 Western blot 检测姜黄素对人肝癌 SMMC-7721 细胞中凋亡相关蛋白 Caspase-3、Survivin、Bcl-2 和 Bax 表达的影响,最后通过检测 MAPK 的磷酸化水平分析姜黄素诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的信号转导机制,通过 MAPK 抑制剂实验进一步证实诱导凋亡的分子机制。研究结果显示,姜黄素呈时间和剂量依赖性抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖,其中 40 μmol/L 姜黄素可明显诱导 SMMC-7721 细胞的凋亡,并呈时间依赖性上调促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 的表达、下调抗凋亡蛋白 Survivin 和 Bcl-2 的表达,姜黄素对凋亡相关蛋白表达的调节及诱导凋亡可以通过激活 JNK、抑制 ERK 和 p38 MAPK 信号通路实现。表明姜黄素可诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡,其机制与姜黄素激活 JNK、抑制 ERK 和 p38 MAPK 信号通路从而上调 Caspase-3 和 Bax 的表达,下调 Survivin 和 Bcl-2 的表达有关。

关键词:姜黄素;人肝癌细胞;凋亡相关蛋白;MAPK 信号通路

中图分类号:R285.5; R256.49; R735.7

文献标识码:A

Curcumin Induces Apoptosis of Human Hepatoma SMMC-7721 Cells via MAPK Signaling Pathway

LI Hui-xuan¹, YANG Hong¹, ZHANG Hong-bing¹, GAO Jian^{2*}¹College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China;²State Key Laboratory of Antibody Research & Development, NCPC New Drug R&D Co., Ltd, Shijiazhuang 050015, China

Abstract: In this study, the effects of curcumin on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells were investigated. The possible mechanism of apoptosis was further explored. MTT and cell number assays were used to detect the effect of curcumin on human hepatoma SMMC-7721 cells proliferation. The apoptotic SMMC-7721 cells were examined by flow cytometry. The relative apoptotic protein expressions of Caspase-3, Survivin, Bcl-2 and Bax were detected by RT-PCR and western blot. The possible mechanism of apoptosis was investigated by detecting the phosphorylation of MAPK in SMMC-7721 cells treated with curcumin. MAPK inhibitors were used to further confirm the molecular mechanism of curcumin induced SMMC-7721 cells apoptosis. MTT and cell number assays showed that curcumin inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells in a time and dose-dependent manner. Flow cytometry indicated that 40 μmol/L curcumin significantly induced apoptosis of SMMC-7721 cells. RT-PCR and western blot showed that curcumin increased pro-apoptotic protein expression of Caspase-3 and Bax, decreased anti-apoptotic protein expression of Survivin and Bcl-2 in a time-dependent manner. The phosphorylation level of MAPK suggested that curcumin activated JNK and inhibited ERK/P38 MAPK signaling pathways, which mediated modulation of apoptosis-related protein expression and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. Hence, it was concluded that curcumin induced apoptosis through activating JNK and inhibiting ERK/P38 MAPK signaling pathways in human hepatoma SMMC-7721 cells, which involved up-regulating pro-apoptotic protein expression and down-regulating anti-apoptotic protein expression.

Key words: curcumin; human hepatoma cells; apoptosis-related protein; MAPK signaling pathway

收稿日期:2013-07-30 接受日期:2013-12-12

基金项目:河北省高等学校教学研究计划(Z2010133)

*通讯作者 Tel:86-311-85993993; E-mail:gaojian3993@aliyun.com

姜黄素(Curcumin)是植物多酚类色素,广泛存

在于姜黄属植物的根茎中,中药姜黄的重要活性成分之一。姜黄素的主要药理作用有抗氧化、抗炎、抗癌、降脂、抗动脉粥样硬化、抗纤维化、清除自由基等作用^[1]。由于姜黄素无明显的毒副作用,其抗肿瘤作用日益引起人们的重视,已成为肿瘤预防和治疗的一个研究热点^[2]。姜黄素对于肝癌的作用,目前的研究多集中于体外抗肿瘤效应^[3],对其分子机制报道较少。本实验对姜黄素抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖并诱导凋亡作用及其可能的作用机制进行初步的研究。通过观察姜黄素对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响,检测姜黄素对 SMMC-7721 细胞中 Caspase-3、Survivin、Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响,揭示姜黄素诱导细胞凋亡的信号通路,以期为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

肝癌细胞 SMMC-7721(华北制药集团新药研究开发有限责任公司惠赠);姜黄素(国药集团化学试剂有限公司)以少量二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成 1 mmol/L 储备溶液;RPMI-1640(Gibco 公司);MTT、胎牛血清、DMSO、ERK 特异性抑制剂 PD98059、p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 及 JNK 特异性抑制剂 SP600125 购自 Sigma 公司;Trizol 试剂及 RT-PCR 反应体系购自 Promega 公司;Survivin、Bcl-2 和 Bax 的 PCR 引物由上海生物工程有限责任公司合成;鼠抗人 Caspase 3、Survivin、Bcl-2、Bax、 β -actin、p-JNK/JNK、p-ERK/ERK 和 p-p38/p38 的单克隆抗体,HRP 联连的兔抗鼠的二抗、化学发光试剂均为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 仪器与设备

垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司),流式细胞仪(BD FACSCalibur),Gel DOC2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),Microplate Reader 450 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),5415D 离心机(基因科技公司),半干转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)和 ID 数码成像分析系统(美国 Kodak 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 MTT 法测定姜黄素对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

取对数生长期的 SMMC-7721 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化分离,重新混悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,调整细胞数为 5×10^4 cell/mL,以每

孔 200 μ L 加入 96 孔培养板中于 CO₂ 培养箱中培养,贴壁 24 h 后分别加入终浓度为 10、20、40 和 80 μ mol/L 的姜黄素,每组设 5 个复孔,并设阴性和空白对照组,分别培养 12、24、48、72 h,每孔分别加入 5 mg/mL MTT 溶液 40 μ L,振荡后于 37.0 ℃ 继续培养 4 h,吸弃孔内上清培养液,于每孔内加入 300 μ L DMSO,使形成的甲月赞(ormazan)充分溶解,放入酶标仪,选择 570 nm,空白孔调零,记录各孔吸光度 OD 值。

1.3.2 细胞计数法测定姜黄素对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

将处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞悬液以 3×10^4 ~ 4×10^4 cell/孔的密度接种于 24 孔板,培养 12 h 后,吸去培养液,随机分组($n=5$),加入正常培养液(不加姜黄素的 Control 组)或终浓度为 10、20、40 和 80 μ mol/L 的姜黄素的培养液,培养一定时间后,用血细胞计数板计数,以时间为横轴、细胞数为纵轴做量效曲线。

1.3.3 流式细胞仪(FCM)检测姜黄素诱导 SMMC-7721 细胞的凋亡

人肝癌 SMMC-7721 细胞常规培养至对数生长期,换无血清培养液培养 12 h 使细胞周期同步化,加入终浓度为 40 μ mol/L 的姜黄素溶液培养,正常对照 Control 组加入等量培养基,再培养 48 h 后,制成单细胞悬液,离心弃上清,沿管壁缓慢加入 700 mL 预冷(-20 ℃)乙醇固定,上机检测前 RNA 酶消化,再加入 PI 染色液,4 ℃ 避光 30 min,FCM 检测凋亡率及细胞周期。

1.3.4 RT-PCR 检测 Survivin、Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 的表达

取对数生长期 SMMC-7721 细胞,加入 40 μ mol/L 的姜黄素作用不同后采用 Trizol 一步法提取总 RNA,取 1 μ L 总 RNA 以 10 μ L 体系逆转录,制备 cDNA 并进行反转录 PCR。使用引物如下:Survivin (GenBank: U75285. 1) 上游引物 5'-CCACCG-CATCTCTACATTC-3',下游引物 5'-CTTTC TTTC-GAGTTTCCTC-3',产物长度 344 bp; Bcl-2 (GenBank: M13995. 1) 上游引物 5'-ATGGCGCACCGCTGG-GAGAA-3',下游引物 5'-CGGTAGCGGCCGG-GAGAAC-3',产物长度 326 bp; Bax (GenBank: AY217036. 1) 上游引物 5'-ACCAAGAAGCT-GAGCGAGTGTCTC-3',下游引物 5'-CCC ACCCCTC-CCAGAAAAAT-3',产物长度 480 bp; β -actin (GenBank: DQ407611. 1) 上游引物 5'-AGTGTGACGTG-

GACATCCGCA-3', 下游引物 5'-ATCCACATCTGCTG-GAAGGTGGAC-3', 产物长度 220 bp。循环条件: 预变性 94 °C 5 min, 变性 94 °C 40 s, 退火 58 °C 40 s, 延伸 72 °C 50 s, 循环 30 次, 终延伸 10 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 应用凝胶成像系统进行扫描。

1.3.5 Western blot 检测 Bcl-2、Survivin、Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达

1.3.5.1 细胞总蛋白提取

取对数生长期的 SMMC-7721 细胞, 加入 40 μmol/L 姜黄素处理一定时间后, 收集细胞, PBS 洗涤两次, 加入细胞裂解液 100 μL, 4 °C 14000 rpm 离心 10 min, 将上清按需分装, 保存于 -70 °C, 蛋白浓度以改良 Lowry 法进行蛋白定量。

1.3.5.2 Western blot 检测

各组取等量蛋白提取液, 经 SDS-PAGE 泳分离, 电转移至 PVDF 膜上; 取膜并用 5% 脱脂奶粉封闭后, 与鼠抗人 Bcl-2、Survivin、Bax 或 Caspase 3 的单克隆抗体 (1:300) 于 4 °C 反应过夜, 洗膜后再与 HRP 标记的相应二抗 (1:10000) 室温反应 2 h, 洗膜后利用增强性化学发光试剂盒 (ECL) 检测特异性蛋白条带, 采用成像分析系统分析结果。

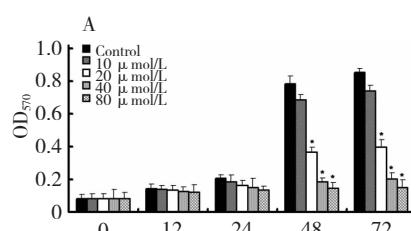


图 1 姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的影响

Fig. 1 Effect of curcumin on proliferation of SMMC-7721 cells

注: A. MTT 检测, B. 细胞计数法检测; 与同时段对照组 Control 比较, * P < 0.05。

Note: A. MTT assay, B. Cell number assay; Compared with Control at the same time group, * P < 0.05.

2.2 姜黄素可诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡

流式细胞术检测发现, 40 μmol/L 的姜黄素作用于人肝癌细胞 48 h 后, 与正常对照组 Control 相

表 1 姜黄素对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响 (n = 6, means ± SD)

Table 1 Effect of curcumin on apoptosis of SMMC-7721 cells (n = 6, means ± SD)

分组 Group	凋亡率 Apoptosis (%)	细胞周期 Cell cycle (%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
正常对照 Control	1.89 ± 0.42	75.41 ± 1.13	19.70 ± 0.73	4.89 ± 0.44
姜黄素 (40 μmol/L)	32.59 ± 2.55 *	73.34 ± 0.93	22.85 ± 0.47	3.81 ± 0.49

注: 与正常对照组比较, * P < 0.05。

Note: Compared with control group, * P < 0.05.

1.3.6 Western blot 检测姜黄素对 JNK、ERK 和 p38 MAPK 信号通路的影响

Western blot 检测 JNK、ERK 和 p38 MAPK 蛋白及磷酸化水平, 一抗使用 p-JNK/JNK、p-ERK/ERK 和 p-p38/p38 MAPK 的单克隆抗体, 方法同 1.3.5。

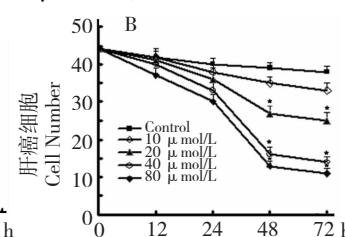
1.3.7 统计学处理

所有数据用 means ± SD 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理, 两组以上数据间比较用方差分析, 两组间比较用 t 检验, 以 P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 姜黄素可抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖

以 10、20、40 和 80 μmol/L 四种浓度的姜黄素分别处理人肝癌 SMMC-7721 细胞不同时间, 检测细胞增殖情况。结果如图 1 所示, MTT 法检测结果表明 (图 1A): 与正常对照组相比, 20、40 和 80 μmol/L 的姜黄素明显抑制 SMMC-7721 的增殖, 且随浓度的增大和时间的增加效果愈明显。利用细胞计数法得到了同样的结果, 如图 1B 所示。为了防止药物的细胞毒性作用, 后续试验姜黄素的浓度宜采用 40 μmol/L, 处理时间 48 h。



比, 在实相图上出现典型性细胞亚二倍体凋亡峰, 细胞凋亡率为 32.59%, 明显高于对照组的凋亡率 1.89%, 结果见表 1 和图 2。

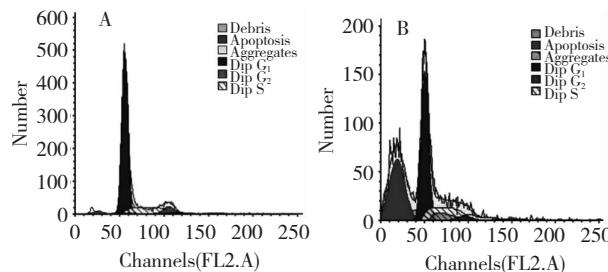


图 2 姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of curcumin on apoptosis of SMMC-7721 cells
注:A. 正常对照组, B. 姜黄素 ($40 \mu\text{mol/L}$) ; 与正常对照组比较, $* P < 0.05$ 。

Note: A. Control, B. Curcumin ($40 \mu\text{mol/L}$) ; Compared with control group, $* P < 0.05$.

2.3 姜黄素可抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Survivin 的表达,诱导促凋亡蛋白 Bax 的表达

为了明确姜黄素诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的机制,用 $40 \mu\text{mol/L}$ 的姜黄素分别处理细胞 12 h、24 h、48 h、72 h 后提取总 RNA 和蛋白,检测 SMMC-7721 中凋亡相关蛋白基因的表达。RT-PCR 检测结果显示随着姜黄素作用时间的延长 SMMC-7721 细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Survivin 的表达量逐渐减少;而促凋亡蛋白 Bax 的表达逐渐增加,如图 3A 所示,Western blot 检测结果与 RT-PCR 一致,如图 3B 所示。表明,姜黄素诱导 SMMC-7721 细胞凋亡可能与上调 Bax 的表达、下调 Bcl-2 和 Survivin 的表达有关。

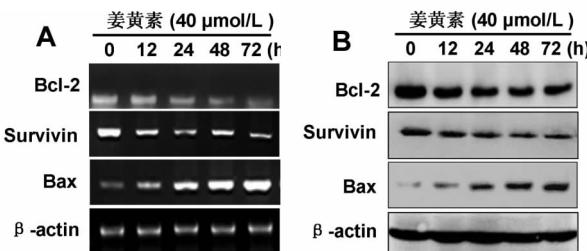


图 3 姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞中 Bcl-2、Survivin 和 Bax 表达的影响

Fig. 3 Effect of curcumin on expression of Bcl-2, Survivin and Bax in SMMC-7721 cells

A: RT-PCR 检测; B: Western blot 检测

A: RT-PCR analysis; B: Western blot analysis

2.4 姜黄素可诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 中 Caspase-3 活性增强

用 $40 \mu\text{mol/L}$ 的姜黄素分别处理细胞 12、24、

48、72 h 后,Western blot 检测促凋亡蛋白 Caspase 3 的表达及活性的变化。随着姜黄素作用时间的延长,24 h 后 Caspase 3 蛋白的表达量显著提高,而其剪切后的活化型 Caspase 3 (p17 亚基) 的表达量 48 h 后显著上升,结果见图 4。提示,姜黄素诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡可能与增强 Caspase 3 活性增强有关。

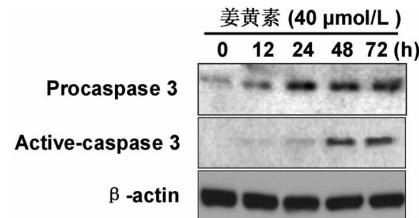


图 4 姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞中 Caspase 3 表达的影响

Fig. 4 Effect of curcumin on the expression of Caspase 3 in SMMC-7721 cells

2.5 姜黄素激活人肝癌细胞 SMMC-7721 中 JNK,抑制 ERK 和 p38 MAPK 信号通路

为了考察姜黄素诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的信号通路,用姜黄素处理培养的 SMMC-7721 细胞,观察 MAPK 信号通路三个主要成员,即 ERK1/2、JNK、p38 MAPK 的变化。用 Western blot 的方法检测姜黄素处理后三个信号转导蛋白的磷酸化水平变化。结果显示,当 $40 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用于 SMMC-7721 细胞 24 h 后,JNK 的磷酸化开始升高,48 h 后明显升高。ERK 和 p38 MAPK 的磷酸化水平 48 h 后降低明显,见图 5。表明,姜黄素可以激活人肝癌细胞 SMMC-7721 中的 JNK 信号通路、抑制 ERK 和 p38 MAPK 信号通路。

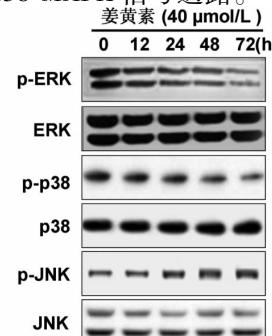


图 5 姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞中 MAPK 信号通路的影响

Fig. 5 Effect of curcumin on MAPK pathway activity in SMMC-7721 cells

2.6 姜黄素通过 JNK,ERK 和 p38 MAPK 信号通路影响人肝癌细胞 SMMC-7721 中 Bax、Caspase 3、Bcl-2 和 Survivin 的表达

为了验证姜黄素激活 SMMC-7721 细胞中 JNK、抑制 ERK 和 p38 MAPK 信号通路与上调 Bax 和 Caspase 3 的表达、下调 Bcl-2 和 Survivin 的表达有关, 分别检测用 JNK、ERK、p38 MAPK 信号通路抑制剂 SP600125、PD98059 和 SB203580 对姜黄素处理 SMMC-7721 细胞后上述蛋白的表达。结果显示, 加

入抑制 PD98059 和 SB203580 后, 进一步上调了 Bax 的表达、下调了 Bcl-2 和 Survivin 的表达(图 6A、B), 其中, 两种抑制剂引起的不同效应是 PD98059 的加入并没有显著提升 Caspase 3 的活性。加入抑制剂 SP600125 后, 下调了姜黄素诱导的 Bax 和 Caspase 3 的表达、上调了姜黄素抑制的 Bcl-2 和 Survivin 的表达(图 6C)。结果提示, JNK、ERK 和 p38 MAPK 均可介导姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 中 Bax、Caspase 3、Bcl-2 和 Survivin 的表达。

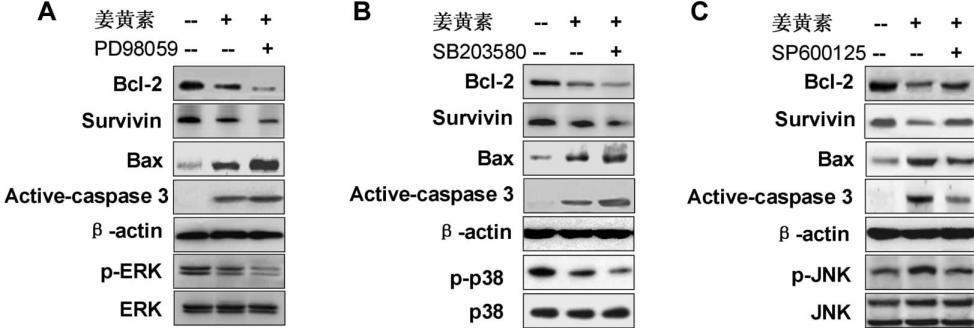


图 6 MAPK 抑制剂在姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞中 Bcl-2、Survivin、Bax 和活性 Caspase 3 表达的影响

Fig. 6 Effect of MAPK inhibitor on the expression of Bcl-2, Survivin and Bax in SMMC-7721 cells with curcumin

A:ERK 抑制剂 PD98059(20 μM); B:p38 MAPK 抑制剂 SB203580(20 μM); C:JNK 抑制剂 SP600125 (20 μM)

A:ERK inhibitor PD98059 (20 μM); B:p38 MAPK inhibitor SB203580 (20 μM); C:JNK inhibitor SP600125 (20 μM)

2.7 姜黄素通过 JNK,ERK 和 p38 MAPK 信号通路影响人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡

为了证明姜黄素激活 JNK、抑制 ERK 和 p38 MAPK 信号通路与人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡有关, 用信号通路抑制剂 SP600125、PD98059 和 SB203580 处理细胞后流式细胞仪检测细胞的凋亡。如图 7 所示, 阻断 ERK 和 p38 MAPK 信号通路后,

与单纯姜黄素诱导条件下相比(图 7B), 细胞的凋亡率进一步上升(图 7C,D)。阻断 JNK 信号通路后, 细胞的凋亡率比单纯姜黄素诱导条件下有所下降(图 7E)。柱形图显示各组的凋亡率。以上结果表明, JNK、ERK 和 p38 MAPK 信号通路参与介导了姜黄素诱导的人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡。

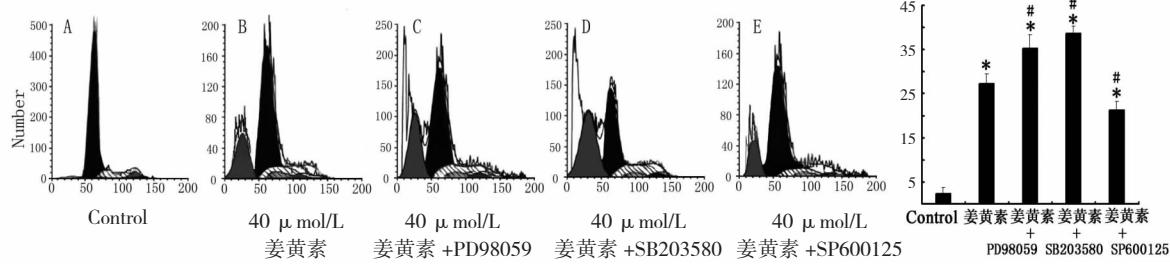


图 7 MAPK 抑制剂在姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effect of MAPK inhibitor on SMMC-7721 cells apoptosis with curcumin

3 讨论

姜黄素可以抑制多种癌细胞的增殖并诱导凋亡, 其机制多与姜黄素多与增强 Caspase 的活性, 干

扰肿瘤细胞的细胞周期, 调节凋亡相关蛋白的表达以诱导细胞凋亡有关。而姜黄素对于人肝癌细胞 SMMC-7721 的作用, 以往的研究表明姜黄素可以抑制增殖并诱导凋亡, 已发现机制为姜黄素作用于肝

癌细胞后产生 H_2O_2 , H_2O_2 损伤细胞线粒体并与膜电位降低有关,从而通过线粒体途径诱导细胞凋亡^[4]。姜黄素诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡还与调节表达的 Bax/bcl-2 蛋白比例有关^[5]。最近研究表明 MAPK 的活化也是诸多抗癌药引起肿瘤细胞凋亡必需的,ERK MAPK 由生长因子所活化,对细胞的增殖和存活起着关键作用,抑制 ERK 的活性可以下调细胞中 c-myc 的表达而促进细胞凋亡。目前普遍认为 p38 MAPK 可以通过增强 c-myc、Bax、Fas、Caspase 3 等蛋白的表达、磷酸化 p53、参与 Fas/FasL 介导的凋亡、激活 c-jun 和 c-fos、诱导 Bax 转位等途径导致细胞发生凋亡。而 JNK MAPK 促进凋亡的机制与增强 Fas 表达、调控 Bcl-2 的表达、改变细胞内 Ca^{2+} 环境和激活 Caspase 家族有关。以上表明,ERK、p38 和 JNK 三组 MAPK 家族与癌细胞的凋亡密切相关^[6]。本研究考察姜黄素作用于人肝癌细胞 SMMC-7721 后 MAPK 信号通路在细胞凋亡中的作用。研究发现,姜黄素作用于人肝癌细胞 SMMC-7721 后,细胞的增殖受到抑制,细胞出现明显的凋亡,Bax、Caspase 3 的表达明显增加而 Bcl-2 和 Survivin 的表达明显减少。研究中还发现,姜黄素可以激活人肝癌细胞 SMMC-7721 的 JNK 信号通路、抑制 ERK 和 p38 MAPK 信号通路,阻断这些信号通路后 Bax、Caspase 3、Bcl-2 和 Survivin 的表达发生变化。表明通过 MAPK 信号通路上调 Bax、Caspase 3 的表达和下调 Survivin、Bcl-2 的表达是姜黄素诱导肝癌细胞凋亡的重要机制之一。

本文的研究中发现,与以前的报道相似的是姜黄素的作用并没有明显改变人肝癌细胞 SMMC-7721 的细胞周期,也没有引起细胞周期阻滞作用^[7]。至于姜黄素是具有作用于其他肿瘤细胞,能够增强肿瘤细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)的表达并抑制 p21、p27 和 p53 等的表达的功能^[8],有待于进一步考察。

在不同类型的细胞凋亡过程中,Caspase-3 是细胞色素 C 下游的靶标激活物,激活 Caspase-3 是线粒体-细胞色素 C-细胞凋亡途径中的关键步骤^[9]。本实验中还发现,JNK 和 p38 MAPK 信号通路与 Caspase-3 的活化有关,而 ERK 信号通路的阻断没

有引起 Caspase 3 活性的明显变化。推测可能是 JNK 和 p38 MAPK 信号通路与线粒体途径有着共同的通路最终导致凋亡的发生。本实验显示姜黄素可以通过 MAPK 信号通路发挥诱导肝癌细胞凋亡的作用,在治疗肝癌方面表现出良好的应用前景,这为姜黄素的临床应用提供了更多的理论依据。

参考文献

- 1 Wang HS(王华森), Huai QY(怀其勇). Preparation and antimicrobial activities of curcumin derivatives. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:237-240.
- 2 Chen LM(陈莉敏), Kang JJ(康建军), Liu Y(刘洋), et al. Synthesis and *in vitro* antioxidant activity of curcumin analogs. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23:722-725.
- 3 Phillips J, Sonavane K, Moore-Medlin T, et al. Curcumin inhibits UV radiation-induced skin cancer *in vivo*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012, 147:56-56.
- 4 Hu H(胡辉), Jing XB(荆绪斌), Cai XB(蔡先彬), et al. Curcumin induced apoptosis of hepatocellular carcinoma by oxidative damaged mitochondria. *Chongqing Med* (重庆医学), 2012, 41:269-270.
- 5 Yu J, Zhou X, He X, et al. Curcumin induces apoptosis involving bax/bcl-2 in human hepatoma SMMC-7721 cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12:1925-1929.
- 6 Wang WZ, Li L, Liu MY, et al. Curcumin induces FasL-related apoptosis through p38 activation in human hepatocellular carcinoma Huh7 cells. *Life Sci*, 2013, 92:352-358.
- 7 Zhao YH(赵毅辉), Li DJ(李德俊), Wang SJ(王顺金). Effects of curcumin on proliferation, cell cycle status and apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *Exp Lab Med* (实验与检验医学), 2010, 28:130-133.
- 8 Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, et al. Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*, 2002, 21: 8852-8861.
- 9 Lin TK, Cheng CH, Chen SD, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress promote apoptotic cell death in the striatum via cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following chronic rotenone intoxication in rats. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 8722-8739.