

姜黄素与 5-FU 联用对结肠癌 SW480 细胞的生长抑制与凋亡诱导作用的研究

刘 骥¹, 魏 雯¹, 贺 彬¹, 赵 刚^{1,2*}

¹湖北中医药大学基础医学院; ²中药复方与中药资源省部共建教育部重点实验室, 武汉 430065

摘要: 本文应用 MTT 检测法、基于 EB/AO 双染的荧光显微观察法和 FITC/PI 双染的流式细胞检测技术, 从细胞生长、细胞凋亡和细胞周期等方面研究了姜黄素与 5-FU 联用对结肠癌 SW480 细胞的效应。结果显示, 姜黄素 (25 μM) 分别与低剂量 (2.4 μM)、中剂量 (4.8 μM) 5-FU 联合作用能有效地抑制 SW480 细胞的生长, 诱导细胞凋亡并将细胞周期阻滞在 S 期。姜黄素与低剂量 5-FU 联用组的效果好于中剂量 (4.8 μM) 5-FU 单用组 ($P < 0.05$), 而姜黄素与中剂量 5-FU 联用组的效果好于高剂量 (9.6 μM) 5-FU 单用组 ($P < 0.05$), 提示姜黄素能增强 5-FU 抗结肠癌 SW480 细胞的作用或对 5-FU 有协同效应。本研究为临床上应用姜黄素作为 5-FU 治疗结肠癌的辅助用药, 以减少 5-FU 的使用剂量, 从而降低其毒副作用提供了初步的实验依据。

关键词: 姜黄素; 5-FU; SW480 细胞; 生长抑制; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: Q394.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.009

Effects of Curcumin Combined with 5-Fluorouracil on Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Colon Cancer Cell Line SW480

LIU Ji¹, WEI Wen¹, HE Bin¹, ZHAO Gang^{1,2*}

¹School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine; ²Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription (Hubei University of TCM), Ministry of Education, Wuhan 430065, China

Abstract: In this study, by using MTT assay, EB/AO double staining fluorescence microscopy and FITC/PI double staining flow cytometry, we investigated the combined effects of curcumin and 5-FU on growth, apoptosis and proliferation in human colon cancer cell line SW480. The results showed that curcumin (25 μM), combining with low dose (2.4 μM) and middle dose (4.8 μM) of 5-FU, can effectively inhibit growth, induce apoptosis and arrest cell cycle in S phase of SW480 cells. The combined inhibitory effect of curcumin with low-dose 5-FU group was stronger than that of the middle-dose (4.8 μM) 5-FU group ($P < 0.05$); Similarly, the combination of curcumin with middle-dose 5-FU showed better inhibitory effects when comparing to the high-dose (9.6 mol/L) 5-FU group ($P < 0.05$), suggesting that curcumin can enhance the antitumor effect of 5-FU against SW480 cells, or have the synergic effect to 5-FU. Our study provided a preliminary experimental basis for using curcumin as an adjuvant to 5-FU with the benefit of reducing its toxicity in the clinical treatment of colon cancer.

Key words: curcumin; 5-FU; SW480 cell; growth inhibition; apoptosis; cell cycle

结肠癌 (colon cancer) 是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 具有高转移性和高复发率等特点, 近年来, 结肠癌在我国人群中的发病率出现逐年上升的趋势, 已成为死亡率排在第五位的恶性肿瘤^[1,2]。作为临床上治疗结肠癌的常用化疗药物, 氟尿嘧啶 (fluorouracil, 5-FU) 具有疗效显著, 价格低廉等特

点, 但该药可使患者发生较严重的胃肠道反应和骨髓抑制等毒副作用^[3,4], 还会诱发 DNA 损伤和染色体畸变等^[5], 有些患者会因无法耐受 5-FU 的毒副作用而放弃化疗。研究表明^[6], 化疗药物对机体的毒副作用与使用剂量成正比, 如果有 5-FU 的增效剂与 5-FU 联合作用于结肠癌细胞, 便可在保持疗效不变的前提下, 减少 5-FU 的使用剂量从而降低该化疗药的毒副作用。

中药成分姜黄素 (curcumin, Cur) 是一种多酚类化合物, 具有抗氧化、抗衰老、抗诱变和抗肿瘤等多

收稿日期: 2014-09-15 接受日期: 2014-12-11

基金项目: 湖北省自然科学基金 (D2013CFB067)

* 通讯作者 Tel: 86-013659864933; E-mail: zgcc66@163.com

方面的药理作用^[7-10]。近年来,姜黄素的抗肿瘤作用和对化疗药物增敏作用等方面的研究受到了普遍关注。本研究使用姜黄素联合 5-FU 作用于体外培养的结肠癌 SW480 细胞,观察姜黄素与 5-FU 之间是否存在协同效应,是否可以增强 5-FU 对 SW480 细胞的生长抑制和诱导凋亡的作用,是否较低剂量的 5-FU 在姜黄素的协助下可以到达较高剂量 5-FU 的作用效果,从而为临床上应用姜黄素作为 5-FU 治疗结肠癌时的辅助用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂

姜黄素(curcumin,上海国药试剂有限公司);氟尿嘧啶(5-FU,天津金耀氨基酸有限公司);细胞培养基(RPMI-1640,美国 Hyclone 公司);新生牛血清(武汉三利生物技术公司);胰蛋白酶消化液(碧云天生物技术有限公司);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司);聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100,美国 Amresco 公司);二甲基亚砜(DMSO,美国 Amresco 公司);吖啶橙(AO,美国 Amresco 公司);溴乙锭(EB,美国 Amresco 公司);FITC-Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物技术公司)。

1.1.2 主要仪器

超净工作台(YJ-875 型,苏州净化设备厂);二氧化碳培养箱(MCO-15A 型,日本三洋公司);倒置显微镜(CX-31 型,日本奥林巴斯公司);全自动酶标仪(680 型,美国 BIO-RAD 公司);小型台式离心机(TDL-5 型,上海安亭科学仪器厂);流式细胞仪(BD Accuri C6 型,美国 BD 公司);荧光显微镜(80i 型,日本 Nikon 公司);一次性培养瓶(T25 型,日本 IWAKI 公司);一次性培养板(96 孔,日本 IWAKI 公司)。

1.1.3 细胞株

人结肠癌 SW480 细胞株,由武汉大学生命科学院中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)提供。

1.2 方法

1.2.1 药液配制

姜黄素溶液:称取 18.4 mg 的姜黄素粉剂,溶解于 1 mL DMSO,用生理盐水稀释 100 倍,配制浓度为 500 $\mu\text{Mol/L}$ 的贮存液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存;5-FU 溶液:将 5-FU 注射液用生理盐水稀释成浓度为 192

$\mu\text{Mol/L}$ 的 5-FU 贮存液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存;PI/Triton X-100 混合液:称取 2.5 mg 的 PI 粉剂,溶解于 100 mL PBS 溶液,再加入 0.2 mL 的 Triton X-100 原液,常温避光保存;AO 溶液:称取 1 mg AO 粉剂,溶解于 10 mL PBS(pH 7.0)中,配成 0.1 mg/mL 的 AO 染液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存;EB 溶液:称取 1 mg EB 粉剂溶解于 10 mL PBS(pH 7.0)中,配成 0.1 mg/mL 的 EB 染液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.2.2 细胞培养与实验分组

将人结肠癌细胞 SW480 接种于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中静置培养,当细胞处于对数生长期时进行实验。药物处理时间均为 24 h。实验设为 6 组,姜黄素与中剂量 5-FU 联用组(Cur 25 $\mu\text{Mol/L}$ + 5-FU 4.8 $\mu\text{Mol/L}$)、姜黄素与低剂量 5-FU 联用组(Cur 25 $\mu\text{Mol/L}$ + 5-FU 2.4 $\mu\text{Mol/L}$)、高剂量 5-FU 单用组(5-FU 9.6 $\mu\text{Mol/L}$)、中剂量 5-FU 单用组(5-FU 4.8 $\mu\text{Mol/L}$)、姜黄素单用组(Cur 25 $\mu\text{Mol/L}$)以及空白对照组,每组设 6 个复孔。

1.2.3 MTT 法检测 SW480 细胞的生长抑制情况

将对数生长期细胞悬液接种于 96 孔培养板,200 μL /孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养 24 h;按实验设计对细胞进行加药处理,将加药后的细胞放回培养箱继续培养 24 h。药物处理结束后每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,轻轻混匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 再培养 4 h;去除上清,每孔加入 DMSO 100 μL ,置于全自动酶标仪中,设定参数(波长 490 nm、中等强度震荡 10 min),检测各孔的光密度值(OD 值),按下列公式计算细胞生长抑制率:抑制率(%) = (1 - 实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) \times 100%。

1.2.4 AO/EB 双染法观察 SW480 细胞形态改变

将无菌盖玻片分别放入 6 孔培养板的各孔中,将对数生长期细胞接种于 6 孔培养板,每孔 2 mL 细胞悬液,置于培养箱中静置培养 24 h。所用药物浓度与 MTT 实验一致,每组设 3 个复孔,加药后继续培养 24 h。药物的诱导处理结束后,用镊子小心取出盖玻片进行染色。在干净的载玻片中央滴加 AO/EB 混合染液 10 μL ,将盖玻片的细胞面朝下,小心盖到荧光染液上,完成制片。将标本片置于荧光显微镜下观察,镜下可见,活细胞经荧光染料染色后呈现较为均匀的荧光,而凋亡细胞可呈现块状或颗粒状荧光。根据染色形态和颜色判断早期和晚期凋

亡细胞,每组计数 1000 个细胞,观察早晚期凋亡细胞数,凋亡率以千分率表示。

凋亡率 = (早期和晚期凋亡细胞数/观察的所有细胞数) × 1000‰

1.2.5 FITC-Annexin V/PI 双染法检测 SW480 细胞凋亡的情况

将对数期细胞接种于 6 孔培养板,2 mL/孔,置于培养箱中静置培养 24 h。所用药物浓度与 MTT 实验的药物浓度一致,每组设 3 个复孔,加药后继续培养 24 h。将 6 孔板中所有细胞收集并转入离心管中离心,吸去上清液,预冷的 PBS 液洗涤 2 次,加入 AnnexinV-FITC 和 PI 染液,置 4 °C 避光染色 30 min,上流式细胞仪进行检测,记录检测结果。

1.2.6 PI 单染法检测 SW480 细胞周期的情况

将对数期细胞接种于 6 孔培养板,2 mL/孔,置于培养箱中静置培养 24 h。所用药物浓度与 MTT 实验的药物浓度一致,每组设 3 个复孔,加药后继续培养 24 h 后,胰蛋白酶消化并收集所有细胞,取细胞悬液离心,吸去上清液,用预冷的 PBS 液洗涤 2 次,末次离心后弃去上清,轻弹管底使沉淀离散;离心管中加入 PI 和 Triton X-100 混合液 1 mL 并混匀,

表 1 姜黄素与 5-FU 联用对 SW480 细胞生长的抑制作用

Table 1 The inhibitory effect of curcumin combined with 5-FU on growth of SW480 cells

组别 Group	OD 值 OD value (n = 6)	抑制率 Inhibitory rate (%)
姜黄素 + 中剂量 5-FU Cur + Middle dose 5-FU group	0.131 ± 0.008	62.68
姜黄素 + 低剂量 5-FU Cur + Low dose 5-FU group	0.163 ± 0.007	53.56
高剂量 5-FU 单用组 High dose 5-FU group	0.183 ± 0.012	47.86
中剂量 5-FU 单用组 Middle dose 5-FU group	0.198 ± 0.005	43.59
姜黄素单用组 Cur group	0.232 ± 0.011	33.90
空白对照组 Control group	0.351 ± 0.013	0

注:各药物处理组与空白对照组相比, $P < 0.05$ 。

Note: Each experiment group was compared to the control group, $P < 0.05$.

2.2 姜黄素与 5-FU 联用诱导 SW 480 细胞凋亡的荧光显微观察结果

荧光显微镜下观察发现,阴性对照组 SW480 细胞结构完整,细胞质被 AO 染色后呈现绿色荧光;细胞核呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀,绿色荧光较浓。各实验组 SW480 细胞经药物处理 24 h 后,部分细胞出现染色质浓缩、细胞核碎裂成若干团块以及出现凋亡小体等典型的细胞凋亡特征(图 1)。凋亡细胞计数结果显示,姜黄素 + 中剂量 5-FU 联用组、姜黄素 + 低剂量 5-FU 联用组、高剂量 5-FU 单用

4 °C 避光染色 30 min,上流式细胞仪进行检测,获得各组细胞有关增殖周期时相的数据。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行实验数据的统计学分析,所有数据均采用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 实验结果

2.1 姜黄素与 5-FU 联用对 SW480 细胞的生长抑制的 MTT 检测结果

结果显示,姜黄素单用或与不同浓度的 5-FU 联用对 SW480 细胞的生长抑制作用,与对照组相比,均具有显著差异 ($P < 0.05$);姜黄素与低剂量 5-FU、中剂量 5-FU 联用组的细胞生长抑制率分别与中剂量 5-FU 和高剂量 5-FU 单用组的相比较,各组之间均具有显著差异 ($P < 0.05$),且联用组的细胞生长抑制率要显著高于单用组,说明姜黄素与 5-FU 联用组的效果要显著优于 5-FU 单用组的;此外,两药单用或联用均呈剂量依赖关系见表 1。

组、中剂量 5-FU 单用组、姜黄素单用组和空白对照组的凋亡率分别为 351‰、281‰、251‰、218‰、201‰和 98‰。

2.3 姜黄素与 5-FU 联用对 SW480 细胞凋亡影响的流式检测结果

从流式细胞检测结果的二维点图中可见,早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞分别位于右下象限的 (LR) 和右上象限 (UR),见图 2。每组样品计数 5000 个细胞,统计早期与晚期凋亡细胞数,按下式计算细胞凋亡率。凋亡率 = (早期与晚期凋亡细胞

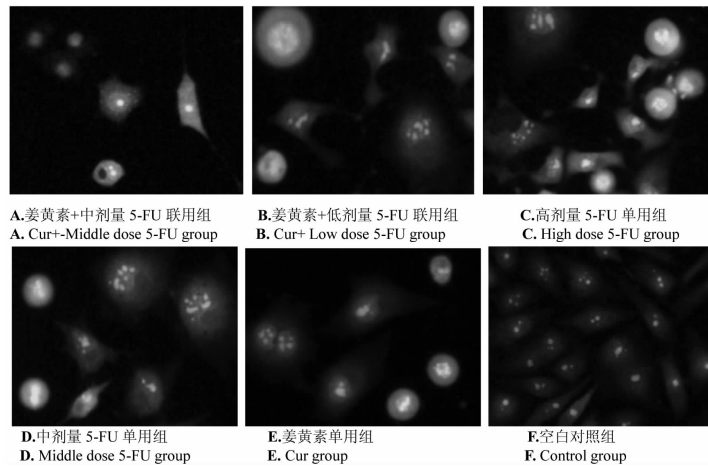


图 1 姜黄素与 5-FU 联用对 SW480 细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of curcumin combined with 5-FU on morphology of SW480 cells

数之和/5000) × 100%。结果显示,姜黄素 + 中剂量 5-FU 联用组、姜黄素 + 低剂量 5-FU 联用组、高剂量 5-FU 单用组、中剂量 5-FU 单用组、姜黄素单用组、

空白对照组的凋亡率分别为 22.46%、20.58%、15.06%、9.96%、8.34% 和 6.30% (见图 3)。

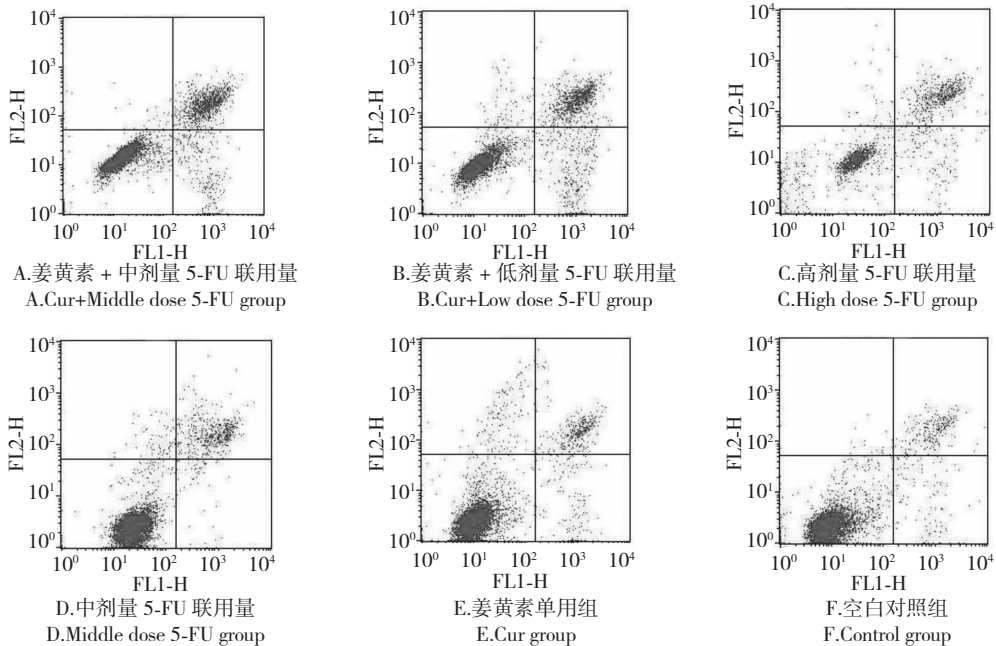


图 2 姜黄素与 5-FU 联用对 SW480 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of curcumin combined with 5-FU on apoptosis of SW480 cells

2.4 姜黄素与 5-FU 联用对 SW480 细胞周期影响的流式检测结果

结果显示,与对照组相比,姜黄素单用组和 5-FU 单用均可引起 SW-480 细胞在 S 期阻滞 ($P < 0.05$);姜黄素与低剂量 5-FU 联用组和中剂量 5-FU 单用组相比,处于 S 期细胞的比例由 32.96% 增加

到 47.19%。姜黄素与中剂量 5-FU 联用组和高浓度 5-FU 单用组相比,处于 S 期细胞比例由 43.56% 增加到 51.56%,提示姜黄素与 5-FU 联用可使更多的 SW480 细胞阻滞于 S 期,两药联用抑制 SW480 细胞增殖的效果显著优于 5-FU 单用的效果(见图 4、图 5)。

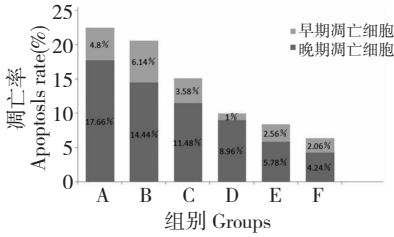


图3 姜黄素与5-FU联用对SW480细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of curcumin combined with 5-FU on apoptosis of SW480 cells

注:A.姜黄素+中剂量5-FU联用组;B.姜黄素+低剂量5-FU联用组;C.高剂量5-FU单用组;D.中剂量5-FU单用组;E.姜黄素单用组;F.空白对照组。

Note:A. Cur + Middle dose 5-FU group; B. Cur + Low dose 5-FU group; C. High dose 5-FU group; D. Middle dose 5-FU group; E. Cur group; F. Control group.

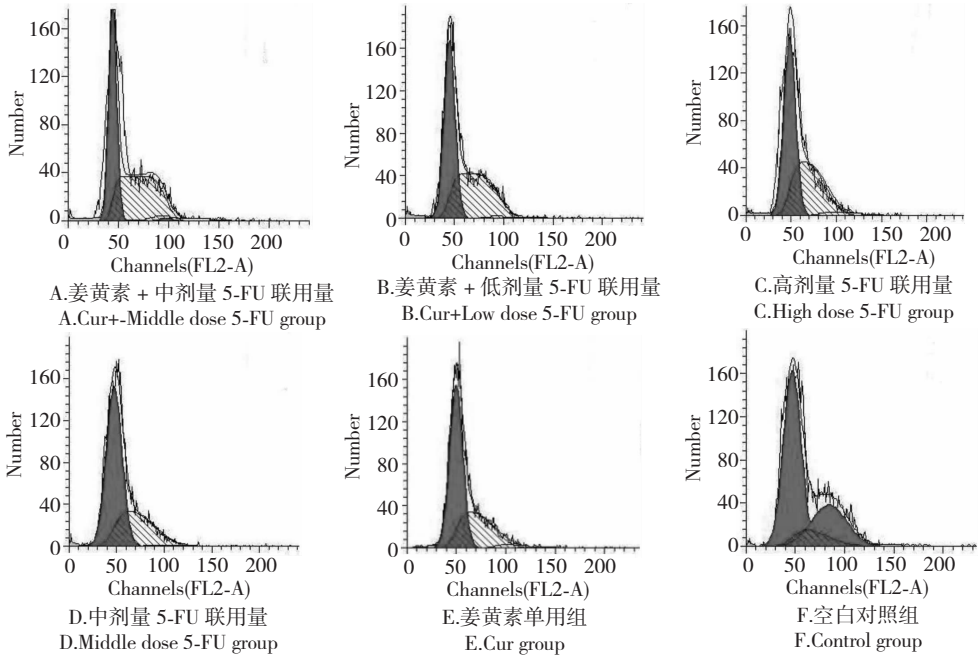


图4 姜黄素与5-FU联用对SW480细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of curcumin combined with 5-FU on cell cycle of SW480 cells

HCT116细胞的抑制作用及其机理,发现姜黄素与5-FU联用可以显著减少结肠癌细胞的存活率,将HCT116细胞阻滞在细胞周期的S期并诱导该细胞发生凋亡。姜黄素可通过抑制NF- κ B和Src蛋白激酶信号通路来增强5-FU对结肠癌细胞的化疗效果^[14]。

在本研究中,我们应用基于全自动酶标仪的MTT方法、基于EB/AO双染色的荧光显微镜观察方法、基于FITC-Annexin V/PI荧光双染以及PI单

3 讨论

目前临床上结肠癌的化疗方案中,5-FU是最常用的药物之一,该药疗效肯定,作用机理清楚,且价格低廉,但毒副作用明显,严重影响患者的生活质量^[11]。鉴于5-FU的毒副作用与其剂量呈正相关的特点,从理论上讲,将具有增效作用且本身无毒副作用的中药成分与5-FU联用,便可在维持抗癌作用不变的前提下,减少5-FU的使用剂量从而降低该药的毒副作用。姜黄素作为一种具有良好临床应用前景的中药成分,其抗肿瘤作用以及对化疗药物的减毒增效作用近年来成为国际上一个重要的研究领域^[12,13]。Mehdi等人运用细胞增殖实验、DAPI荧光染色、透射电镜、细胞周期分析和免疫印迹等技术研究了姜黄素与5-FU联用对体外培养的人结肠癌

染的流式细胞检测技术,从细胞生长、细胞凋亡和细胞周期等三个方面对姜黄素联合5-FU作用于结肠癌SW480细胞的效应进行了研究。MTT检测结果显示,姜黄素与低剂量5-FU联用组和姜黄素与中剂量5-FU联用组对SW480细胞的生长抑制率显著高于中剂量5-FU单用组和高剂量5-FU单用组($P < 0.05$),提示姜黄素与5-FU这两种药物对SW480细胞的抑制作用具有协同效应,姜黄素能增强5-FU抑制SW480细胞的作用;荧光显微检测结果显示,

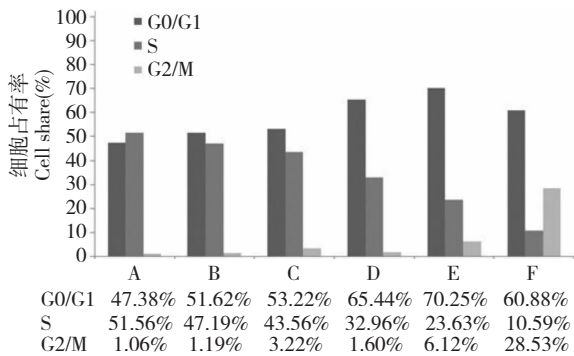


图 5 姜黄素与 5-FU 联用对 SW 480 细胞周期的影响

Fig. 5 Effect of curcumin combined with 5-FU on cell cycle of SW480 cells

注: A. 姜黄素 + 中剂量 5-FU 联用组; B. 姜黄素 + 低剂量 5-FU 联用组; C. 高剂量 5-FU 单用组; D. 中剂量 5-FU 单用组; E. 姜黄素单用组; F. 空白对照组。

Note: A. Cur + Middle dose 5-FU group; B. Cur + Low dose 5-FU group; C. High dose 5-FU group; D. Middle dose 5-FU group; E. Cur group; F. Control group.

姜黄素与低剂量 5-FU 联用组和姜黄素与中剂量 5-FU 联用组 SW480 细胞的凋亡率显著高于中剂量与高剂量 5-FU 单用组的,说明姜黄素与 5-FU 在诱导 SW480 细胞凋亡方面也存在协调作用;细胞周期的流式检测结果表明,姜黄素与 5-FU 联用组与其它处理组相比,可使更多的 SW480 细胞阻滞在细胞增殖周期的 DNA 合成期(S 期),影响细胞 DNA 的复制,导致 SW480 细胞分裂增殖受阻。而 FITC-Annexin V/PI 双染的流式检测结果显示,姜黄素与 5-FU 两个剂量的联用组的 SW480 细胞的凋亡率显著高于 5-FU 两个剂量的单用组,进一步证明了姜黄素和 5-FU 联用诱导结肠癌 SW480 细胞发生凋亡的作用具有协同效应。在细胞水平上看,姜黄素联合 5-FU 对结肠癌细胞 SW480 抑制作用的机理可能表现在两个方面,一是联合用药通过 S 期阻滞干扰细胞周期的运行,进而抑制癌细胞的增殖;二是诱导癌细胞发生凋亡。

综上所述,姜黄素与 5-FU 联用对体外培养的结肠癌 SW480 细胞能产生显著的生长抑制作用和诱导凋亡的作用,在有姜黄素协助的条件下,低剂量与中剂量的 5-FU 抑制 SW480 细胞的作用能达到中剂量或高剂量 5-FU 单用的效果,这样临床上便可在维持结肠癌患者疗效不变的前提下,通过姜黄素的辅助,减少化疗药 5-FU 的使用剂量,从而减少 5-FU 对机体产生的毒副作用。在我国,姜黄素的资源丰富,价格低

廉,是一种具有良好临床应用前景的中药成分。本研究为姜黄素应用于结肠癌的临床作为化疗药物 5-FU 的增效剂或辅助用药提供了初步的实验依据。

参考文献

- 1 Wang JZ (王家智). The influence of curcumin combined with irinotecan to the growth of colorectal cancer Lovo cells and their synergy mechanism *in vitro*. Guangdong: Southern Medical University (南方医科大学), PhD. 2010.
- 2 Scheper GI, Schroeijs AB, Izquierdo MA, *et al*. Lung resistance-related Protein/major vault protein and vaults in multi-drug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol*, 2012, 12: 550-556.
- 3 Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BN. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer theraph. *Cancer*, 2010, 73: 2013-2026.
- 4 Dharmalingam S, Sivapriya P, Prabhu R, *et al*. Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating notch signaling. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30590, 1-11.
- 5 Zorofchian MS, Abdul KH, Hassandarvish P, *et al*. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 186864, 1-12.
- 6 Panahi Y, Rahimnia AR, Sharafi M, *et al*. Curcuminoid treatment for knee osteoarthritis: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Phytother Res*, 2014, 28: 1625-1631.
- 7 Kalani A, Kamat PK, Kalani K, *et al*. Epigenetic impact of curcumin on stroke prevention. *Metab Brain Dis*, Accepted.
- 8 Zeng Y (曾燕), Liu J (刘杰), Huang Z (黄征), *et al*. Effect of curcumin on antioxidant function in the mice with acute alcoholic liver injury. *J Hygiene Res (卫生研究)*, 2014, 43: 282-285.
- 9 Zhang S, Liu T, Shi J, *et al*. Curcumin: a promising agent targeting cancer stem cells. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14: 787-792.
- 10 Qin HB (秦海波), Wei L (魏丽), Zhang JW (张建伟), *et al*. Study on functions and mechanism of curcumin in inducing gastric carcinoma BGC apoptosis. *Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2011, 27: 1227-1230.
- 11 Zhou X (周香), You T (游涛), Wang WM (王维明), *et al*. Curcumin combined FOLFOX induced cell apoptosis of gastric cancer and its mechanism research. *Chin J Integr Med (中国中西医结合杂志)*, 2013, 3: 810-813.
- 12 Victor MD, Eugene H, Mysore SV, *et al*. Curcumin enhances the effect of cisplatin in suppression of head and neck squamous cell carcinoma via inhibition of IKK β protein of the nuclear factor κ B pathway. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9: 2665-2675.