

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201802029

引文格式: 黄岚珍, 杨飞城, 阳晶, 等. 莪术醇诱导人肝癌 HepG2 细胞衰老及其机制研究 [J]. 广西植物, 2018, 38(7): 894-902
HUANG LZ, YANG FC, YANG J, et al. Human hepatocarcinoma HepG2 cell senescence induced by curcumol and underlying mechanisms [J]. *Guihaia*, 2018, 38(7): 894-902

莪术醇诱导人肝癌 HepG2 细胞衰老及其机制研究

黄岚珍^{1,2}, 杨飞城³, 阳晶^{1,2}, 蒋晓山^{1,4*}

(1. 桂林医学院 信号转导实验室, 广西 桂林 541004; 2. 桂林医学院 科学实验中心, 广西 桂林 541004; 3. 桂林医学院 附属医院病理科, 广西 桂林 541004; 4. 桂林医学院 研究生学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 为进一步探讨莪术醇的诱导细胞衰老的机制, 该研究采用荧光定量 PCR 技术对莪术醇处理后细胞中 81 个细胞衰老相关基因差异表达谱进行分析, 结果发现 *TP53* 及其下游基因 *p16Ink4a*、*p21Waf1/Cip1* 和 *p27Kip1* 等的表达水平显著升高, 伴随 *ABL1*、*ALDH1A3*、*CHEK2*、*HRAS*、*PTEN* 等多个衰老信号通路启动与效应关联基因的转录显著增强, 而 *Cyclin A2*、*IGFBP3*、*SIRT1* 以及 *TERT* 等细胞周期进程与衰老信号通路的负性调控基因的表达水平则显著降低。Western 印迹检测结果显示, p53 及其下游周期素依赖性蛋白激酶抑制物 (CKI) 分子 p21WAF1 和 p16INK4 水平升高, Cyclin A2 水平降低, 与 PCR 结果一致, 并伴野生型 p53-诱导的蛋白磷酸酶 1 (Wip1) 水平显著增高, 提示莪术醇可能通过激活 p53 信号通路诱导 HepG2 细胞衰老。该研究进一步发现莪术醇能够诱导 HepG2 细胞发生衰老表型改变, 伴 G0/G1 期周期阻滞。

关键词: 莪术醇, 肿瘤细胞早衰, HepG2 细胞, 肝癌, 细胞周期阻滞

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)07-0894-09

Human hepatocarcinoma HepG2 cell senescence induced by curcumol and underlying mechanisms

HUANG Lanzhen^{1,2}, YANG Feicheng³, YANG Jing^{1,2}, JIANG Xiaoshan^{1,4*}

(1. *Cell Signaling Laboratory, Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi, China*; 2. *Center for Science Research, Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi, China*; 3. *Department of Pathology, Affiliated Hospital, Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi, China*; 4. *Graduate College, Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi, China*)

Abstract: In order to further study the antitumor mechanism of curcumol and its potential clinical application, a SYBR Green real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to analyze the differential expression profiles of 81 human senescence-related genes in human hepatocarcinoma HepG2 cells treated with curcumol. The results showed that the expression of *TP53* and its downstream genes *p16Ink4a*, *p21Waf1 / Cip1* and *p27Kip1* were significantly up-regulated, accompanied by transactivation of other senescence signaling pathway related genes or senescence response genes such as *ABL1*, *ALDH1A3*, *CHEK2*, *HRAS*, *PTEN*, etc., while the expression of *Cyclin A2*, *IGFBP3*, *SIRT1* and *TERT*, the genes which negatively regulated cell cycle progression and senescence signaling, were significantly down-regulated. Western blot-

收稿日期: 2018-04-19

基金项目: 国家自然科学基金 (31660327); 广西医学科学实验中心开放基金 (KFJJ2011-13) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31660327); Medical Science Research Center Open Fund (KFJJ2011-13)]。

作者简介: 黄岚珍 (1968-), 女, 广西桂林人, 实验师, 从事细胞与分子生物学等研究, (E-mail) 953323744@qq.com。

* 通信作者: 蒋晓山, 博士, 研究员/教授, 博士研究生导师, 从事细胞衰老及相关疾病的分子机制等研究, (E-mail) jiangxs@glmc.edu.cn。

ting verified that protein levels of p53 and its downstream CKIs, p21WAF1 and p16INK4 increased while Cyclin A2 decreased, consistent with the findings in PCR results. The level of wild-type p53-induced protein phosphatase 1 (Wip1) was also found significantly increased, suggesting that the induction of senescence in HepG2 cells by curcumol might be through activation of p53 signaling pathway. The present study further demonstrates that curcumol is capable of inducing cellular senescent phenotype in HepG2, accompanying with cell cycle G0 / G1 phase arrest.

Key words: curcumol, premature senescence of tumor cells, HepG2 cells, liver cancer, cell cycle arrest

细胞衰老是指细胞从活跃增殖进入生长停滞状态的不可逆过程。衰老的细胞仍具有基本的代谢活动,但失去了 DNA 合成能力和对有丝分裂原刺激反应,细胞脂褐素沉积增加、体积变大扁平、细胞器变形、膜脆性增加、核膜内陷、表达在 pH6.0 时有高酶活性的 β -半乳糖苷酶。过去,因其无限制增殖的特性,肿瘤细胞被认为失去了衰老的能力。近十多年来,研究发现肿瘤细胞在小剂量的化疗药物处理或射线照射等一定条件下可以被诱导进入衰老状态,这种诱导性衰老有别于复制性衰老,被称为早熟衰老(早衰)(premature/accelerated senescence)(Nardella et al, 2011)。寻找诱导肿瘤细胞进入衰老状态的药物或分子靶点,以恢复与激活肿瘤细胞的衰老通路作为肿瘤治疗新策略的研究日益受到重视(Nardella et al, 2011; Schosserer et al, 2017)。

莪术醇($C_{15}H_{24}O_2$, Curcumol),又名姜黄环奥醇,是自中药莪术中分离得到的单体化合物,对多种人肿瘤细胞增殖具有抑制作用(王耀霞和徐立春, 2009; Lu et al, 2012; Huang et al, 2017)。我们曾经报道,莪术醇能够抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖,并显著影响细胞周期及其相关调控基因的表达(黄岚珍等, 2013)。本研究进一步发现,较低剂量莪术醇能够诱导 HepG2 细胞发生衰老表型改变,并对 81 个细胞衰老相关基因差异表达谱及主要启动调控分子表达水平进行了初步观察,为进一步探讨莪术醇抗肿瘤作用机制及其潜在的临床应用提供了有价值的信息。

1 材料

1.1 主要试剂与仪器

试剂:莪术醇(纯度 $\geq 98\%$,上海艾汇生物科技公司,生产批号 P02-03) $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶于无水

乙醇贮存;碘化丙啶(PI)(Sigma);二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma);四氮唑蓝(MTT)(美国 Amresco);兔抗人 p53 多抗及鼠抗人 p16、Wip1、p21 及 β -actin 单抗(美国 Santa Cruz)。仪器:FACSAria III 流式细胞仪(美国 BD);iMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad); CO_2 细胞培养箱(美国 NBS)。

1.2 细胞株与细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院细胞所(上海)细胞库,常规培养于 10% 胎牛血清(美国 HyClone)的 DMEM 培养基(美国 HyClone)含 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中,每 3~4 d 换液传代。

2 方法

2.1 MTT 比色法检测细胞增殖

将人肝癌 HepG2 细胞以每孔 4×10^3 个接种于 96 孔板,培养过夜。更换成含不同浓度莪术醇的培养液[均含等体积乙醇(vehicle)]每孔 100 μL ,于预定时间每孔加入 MTT 10 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,弃上清液,每孔加入 DMSO 200 μL ,避光振荡 20 min,酶标仪测定 OD_{490} 值(A),实验重复 3 次。细胞生长抑制率计算:抑制率(%) = $[1 - (\text{A 实验组} / \text{A 对照组})] \times 100$ 。IC₅₀ 值由 SPSS (version 20.0) 软件计算得出。

2.2 流式细胞术检测细胞周期

HepG2 细胞于无血清 DMEM 培养基培养 5 d,使大部分细胞停留在 G1 期。取经细胞周期同步化的细胞,以每个皿 5×10^5 个接种于 $\Phi 60 \text{ mm}$ 培养皿中,20 h 后更换成含不同浓度莪术醇的培养液(均含等体积乙醇);分别于 16、24、32 h 常规消化收集细胞,70% 乙醇固定,1% RNA 酶处理、PI 染色,流式细胞仪检测细胞周期分布(DNA 含量)情况。实验重复 3 次。

2.3 细胞衰老相关的 β 半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 活性检测

细胞种于 6 孔板, 莪术醇处理 24 h, 分别于第 7 天和第 10 天弃培养液。先用 PBS 洗 1 次, 用 0.2% 戊二醛固定 5 min; 再用 PBS 洗 3 次, 加入 X-gal 染液 [150 mmol · L⁻¹ NaCl, 1 mg · mL⁻¹ X-gal, 5 mmol · L⁻¹ K₃Fe(CN)₆, 2 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 40 mmol · L⁻¹ NaPi, pH 6.0, 5 mmol · L⁻¹ K₄Fe(CN)₆], 37 °C 孵育 6~24 h。在显微镜下, 随机视野计数蓝染的阳性细胞。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测细胞周期调控相关基因的表达

委托美国 Invitrogen (上海) 公司参照 SABiosciences 公司人类细胞衰老相关基因的 PCR 阵列中的 84 个基因名录 (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-050Z.html), 设计、合成基因特异的定量 PCR 引物。实时荧光定量 PCR (SYBR Green 染料法) 检测基因表达水平, 参考杨飞城等 (2015) 的方法, 结果根据标准曲线由软件自动计算后得出, 共 82 个基因获得有效扩增 (基因名称与引物序列见表 1), GAPDH 和 ACTB 基因用于扩增内参及定量标化。

2.5 Western 印迹

收集细胞, RIPA 裂解缓冲液 (0.5% 脱氧胆酸钠, 1.0% NP-40, 150 mmol · L⁻¹ 氯化钠, 0.1% SDS, 50 mmol · L⁻¹ Tris-pH 8.0, 0.2 mg · L⁻¹ 抑肽酶, 1 mmol · L⁻¹ 苯甲基磺酰氟, 0.5 mg · L⁻¹ 亮抑蛋白肽酶) 冰上裂解, 离心取上清; 加入上样缓冲液, 煮沸 5 min, 经 SDS-PAGE 电泳后半干电转法转移至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 过夜孵育, TBS-T 洗 3 次, HRP 标记的相应二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光法检测特异蛋白条带。

2.6 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件, 重复测量资料方差分析, 样本两两比较进行 LSD-t 检验。

3 结果与分析

3.1 莪术醇对 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响

用不同浓度 (0~1 000.0 mg · L⁻¹) 的莪术醇分

别处理人肝癌 HepG2 细胞 48 h 及 72 h, 用 MTT 法检测细胞活力并计算莪术醇的 IC₅₀。如图 1:A 所示, 莪术醇对 HepG2 细胞增殖活性具有显著抑制作用, 呈时间和剂量依赖性, 48 h 及 72 h 的 IC₅₀ 分别为 529.5 mg · L⁻¹ 和 173.5 mg · L⁻¹。为进一步观察莪术醇对 HepG2 细胞增殖的长时间影响, 先以无血清培养液同步化 HepG2 细胞, 然后采用 25 mg · L⁻¹ 莪术醇处理 24 h, 更换不含莪术醇的培养基并于第 3 天细胞长至 80% 融合时稀释 (1:4) 传代。分别收集经莪术醇处理 24、72 及 120 h 的细胞, 乙醇固定、碘化丙啶 (PI) 染色上流式细胞仪检测细胞周期分布情况, 结果见图 1:B 和图 1:C。与对照组相比, 莪术醇处理 24 h 和 72 h 后 G₀/G₁ 期细胞分别由 (62.88 ± 4.71)% 和 (66.13 ± 0.83)% 增加到 (69.17 ± 4.44)% 和 (84.31 ± 2.15)%, 而 S 期和 G₂ 期细胞相应减少, 在处理 120 h 时 G₁/G₀ 期细胞仍高达 (85.74 ± 5.30)%, 对照组为 (65.76 ± 1.52)%, 差异有统计学意义, 提示较低剂量莪术醇能够诱导 HepG2 细胞长时间的 G₀/G₁ 期阻滞。

3.2 莪术醇对 HepG2 细胞的衰老诱导作用

长时间细胞周期阻滞可能是细胞的衰老反应。衰老细胞体积变大扁平, 核膜内陷, 细胞器变形, 衰老相关的 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色阳性。为检测莪术醇处理后 HepG2 细胞是否发生衰老表型改变, 在前述 3.1 细胞周期实验的基础上, 对莪术醇 (25 mg · L⁻¹) 处理后的 HepG2 细胞分别于第 7 天和第 10 天进行 SA- β -gal 染色, 光镜下观察细胞形态并计数蓝染阳性细胞, 见莪术醇处理后细胞呈现大而扁平的改变, 7 d 和 10 d 组蓝染细胞数分别为 (70.03 ± 8.37)% 和 (87.23 ± 6.89)%; 空白对照组细胞形态无明显变化, 细胞 SA- β -gal 检测蓝染率为 (2.28 ± 0.73)% ~ (4.40 ± 1.26)%, 两组间差异检验有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2)。

3.3 莪术醇对 HepG2 细胞衰老相关基因表达谱的影响

为进一步探讨莪术醇诱导细胞衰老的机制, 我们采用 SYBR Green 实时荧光定量 RT-PCR 方法筛查莪术醇处理后 HepG2 细胞中 81 个衰老相关基因差异表达情况并以 ACTB 基因标化定量分析。结果显示, 与对照组 (vehicle 处理) 比较, 25 mg ·

表 1 qRT-PCR 检测的基因名称及引物序列

Table 1 Gene names and primer sequences used for qRT-PCR

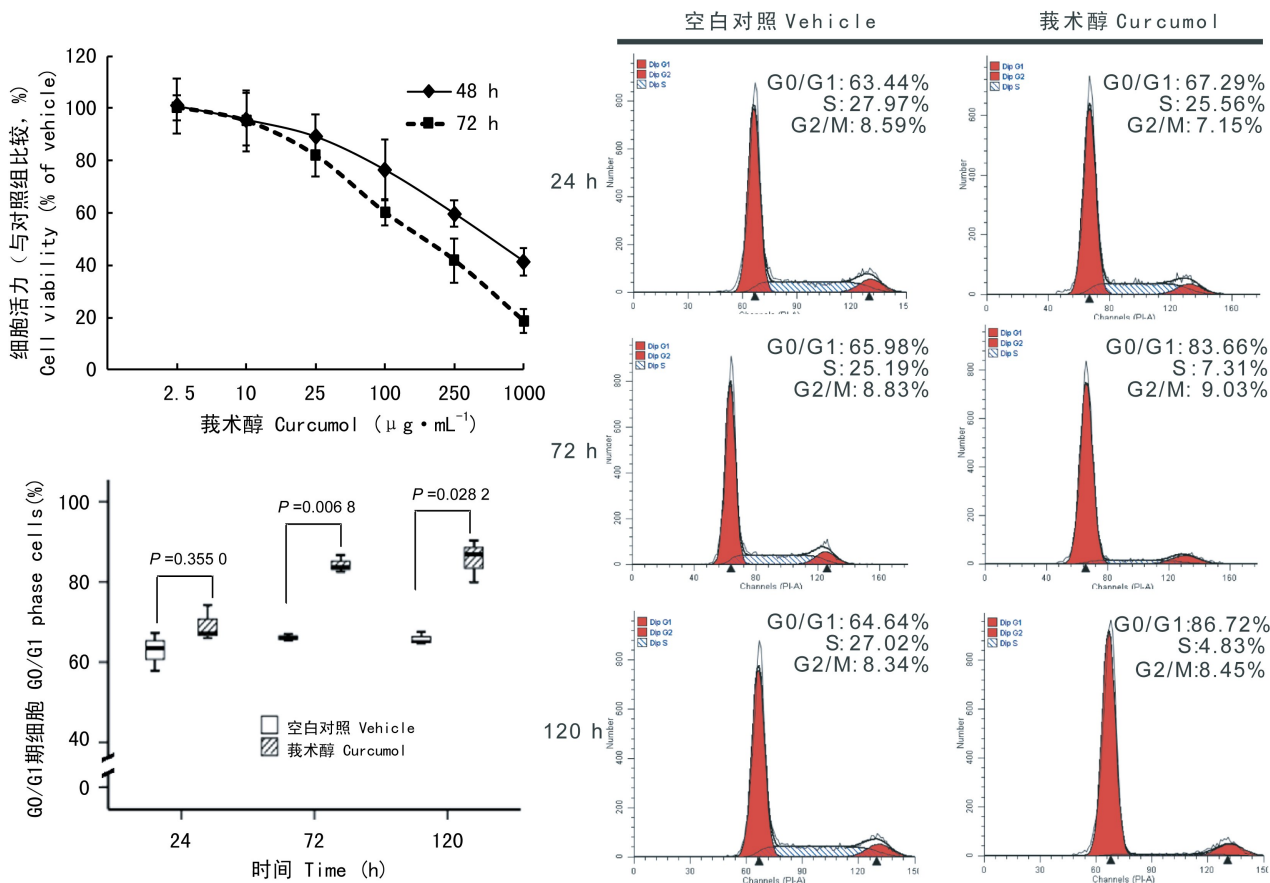
编号 No.	基因 Gene	基因库号 GenBank ID	功能分组 Functional gene grouping	上游序列 (5'-3') Forward sequence (5'-3')	下游序列 (5'-3') Reverse sequence (5'-3')
1	<i>ACTB</i>	NM_001101	—	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTCACCTCCACCGTTCC
2	<i>ABL1</i>	NM_005157	SI/p53-pRb signaling	AAGCCGCTCGTTGGAAGTC	AGACCCGGAGCTTTTCACCT
3	<i>AKT1</i>	NM_001014431	SI/p53-pRb signaling	TCCTCCTCAAGAAATGATGGCA	GTGCGTTCGATGACAGTGGT
4	<i>ALDH1A3</i>	NM_000693	SI/p53-pRb signaling	TGAATGGCACGAATCCAAGAG	CACGTCGGGCTTATCTCCT
5	<i>ATM</i>	NM_000051	Senescence pathway	ATCTGCTGCCGTCAACTAGAA	GATCTCGAATCAGGCGCTTAAA
6	<i>B2M</i>	NM_004048	Other	GCTACATGTCCATGTTTGACC	TCGGTAGGAAGTTGTTTCATC
7	<i>BMI1</i>	NM_005180	Senescence pathway	CCACCTGATGTGTGTGCTTTG	TTCAGTAGTGGTCTGGTCTTGT
8	<i>CALR</i>	NM_004343	SR/p21 effectors	CCTGCCGTCTACTTCAAGGAG	GAAC TTGCCGGAAGT GAGAAC
9	<i>Cyclin A2</i>	NM_001237	SI/p53-pRb signaling	CGCTGGCGGTAAGTCAAGTC	GAGGAACGCTGACATGCTCAT
10	<i>Cyclin B1</i>	NM_031966	SI/p53-pRb signaling	AATAAGGCGAAGATCAACATGGC	TTTGTACCAATGTCCCAAGAG
11	<i>Cyclin D1</i>	NM_053056	Senescence pathway	GCTCGAAAGTGGAAACCATC	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA
12	<i>Cyclin E1</i>	NM_001238	Senescence pathway	AAGGAGCGGGACACCATGA	ACGGTCACGTTTGCCTTCC
13	<i>CD44</i>	NM_001001392	SR/Cell adhesion	CTGCCGCTTTCGACGGTGA	CATGTGGGCAAGGTGCTATT
14	<i>CDC25C</i>	NM_022809	SI/p53-pRb signaling	TCTACGGAACTCTTCTCATCCAC	TCCAGGAGCAGGTTTAAACATTTT
15	<i>CDK2</i>	NM_001798	Senescence pathway	CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA	TTCATCCAGGGGAGGTACAAC
16	<i>CDK4</i>	NM_000075	Senescence pathway	ATGGCTACCTCTCGATATGAGC	CATGGGGACTCTCACACTCT
17	<i>CDK6</i>	NM_001145306	Senescence pathway	GCTGACCAGCAGTACGAATG	GCACACATCAAACAACCTGACC
18	<i>p21, CIP1</i>	NM_078467	Senescence pathway	TGTCCGTCAGAACCCATGC	AAAGTCAAGTTCCATCGCTC
19	<i>p27, KIP1</i>	NM_004064	SI/INF related	AACGTGCGAGTGTCTAACGG	CCCTCTAGGGGTTGTGATTCT
20	<i>p57, KIP2</i>	NM_001122630	SI/p53-pRb signaling	GCGCGCATCAAGAAGCTGT	GCTTGGCGAAGAAATCGGAGA
21	<i>p16, INK4</i>	NM_000077	Senescence pathway	ATGGAGCCTTCGGCTGACT	GTAAC TATTCGGT CGGTTGGG
22	<i>p15, INK4b</i>	NM_004936	SI/p53-pRb signaling	CGAGGAGAAGAAGGGCAT	CATCATTACCTGGATCCG
23	<i>p18, INK4</i>	NM_001262	SI/p53-pRb signaling	GGGACCTAGAGCAACTTACT	CAGCGCAGTCTTCCAAT
24	<i>p19, INK4</i>	NM_079421	Senescence pathway	AGTCCAGTCCATGACGCAG	ATCAGGCACGTTGACATCAGC
25	<i>CHEK1</i>	NM_001274	Senescence pathway	ATATGAAGCGTGCCGTAGACT	TGCTATGTCTGGCTCTATTCTG
26	<i>CHEK2</i>	NM_001005735	Senescence pathway	TCTCGGAGTTCGGATGTTGAG	CCTGAGTGGACACTGTCTCTAA
27	<i>CITED2</i>	NM_006079	SI/p53-pRb signaling	CCTAATGGCGGAGCACATACA	GGGGTAGGGGTGATGGTTGA
28	<i>COL1A1</i>	NM_000088	SR/Cell adhesion	GAGGGCCAAGACGAAGACATC	CAGATCACGTCATCGCACAAC
29	<i>COL3A1</i>	NM_000090	SR/Cell adhesion	GGAGCTGGCTACTTCTCGC	GGGAACATCCTCCTTCAACAG
30	<i>CREG1</i>	NM_003851	SI/p53-pRb signaling	GGCGTGCCTATTCTTACCTG	CAAAGTCATGGTCAGTGTAGCAT
31	<i>E2F1</i>	NM_005225	Senescence pathway	ACGCTATGAGACCTCACTGAA	TCCTGGGTCAACCCCTCAAG
32	<i>E2F3</i>	NM_001949	Senescence pathway	AGAAAGCGGTCATCAGTACCT	TGGACTTCGTAGTCAGCTCT
33	<i>EGR1</i>	NM_001964	SI/INF related	GGTCAGTGGCCTAGTGAAGC	GTGCCGCTGAGTAAATGGGA
34	<i>ETS1</i>	NM_001143820	Senescence pathway	GATAGTTGTGATGCCCTCACC	GTCTCTGAGTCGAAGCTGTC
35	<i>ETS2</i>	NM_001256295	Senescence pathway	CAGTCTGGTGAACGTGAATCTG	CGGAGGTGAGGTGTGAATTTT
36	<i>FN1</i>	NM_212482	SR/Cytoskeleton	CGGTGGCTGTCTAGTCAAAG	AAACCTCGGCTTCTCCATAA
37	<i>Gadd45a</i>	NM_001924	SI/DNA damage	GAGAGCAGAAGACCGAAAGGA	CACAACACCACGTTATCGGG
38	<i>GLB1</i>	NM_000404	SR/Other	TATACTGGCTGCCTAGATCACTG	GGCAAAATTTGGTCCCACCTATAA
39	<i>GSK3B</i>	NM_002093	SI/p53-pRb signaling	GGCAGCATGAAAGTTAGCAGA	GGCGACCAGTTCTCCTGAATC
40	<i>HPRT1</i>	NM_000194	Senescence pathway	GGACTTGAATCATGTTTGTG	CAGATGTTTCCAAACTCAAC
41	<i>HRAS</i>	NM_005343	SI/MAPK signaling	ATGACGGAATATAAGCTGGTGGT	GGCAGCTCCTCCATCAATG
42	<i>ID1</i>	NM_181353	SI/p53-pRb signaling	CTGCTCTACGACATGAACGG	GAAGGTCCCTGATGTAGTCGAT

续表1

编号 No.	基因 Gene	基因库号 GenBank ID	功能分组 Functional gene grouping	上游序列 (5'-3') Forward sequence (5'-3')	下游序列 (5'-3') Reverse sequence (5'-3')
43	<i>IFNG</i>	NM_000619	SI/INF related	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA	TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC
44	<i>IGF1R</i>	NM_000875	SI/p53-pRb signaling	TCGACATCCGCAACGACTATC	CCAGGGCGTAGTTGTAGAAGAG
45	<i>IGFBP3</i>	NM_001013398	SI/p53-pRb signaling	AGAGCACAGATACCCAGAACT	GGTGATTCAGTGTGTCTTCCATT
46	<i>IGFBP7</i>	NM_001253835	SI/INF related	CGAGCAAGGTCCCTTCCATAGT	GGTGTCCGGATTCCGATGAC
47	<i>ING1</i>	NM_005537	SI/p53-pRb signaling	AACAACGAGAACCGTGAGAAC	TGTTGCACAGACAGTACCTG
48	<i>MAP2K1</i>	NM_002755	SI/MAPK signaling	CAATGGCGGTGTGGTGTTC	GATTGCGGGTTTGATCTCCAG
49	<i>MAP2K3</i>	NM_002756	SI/MAPK signaling	GACTCCCGGACCTTCATCAC	GGCCAGTCTGAGATGGT
50	<i>MAP2K6</i>	NM_002758	SI/p53-pRb signaling	GAAGCATTGAACAACCTCAGAC	CCTGGCTATTTACTGTGGCTC
51	<i>MAPK14</i>	NM_139013	SI/MAPK signaling	CCCAGCGTTACCAGAACC	TCGCATGAATGATGGACTGAAAT
52	<i>MDM2</i>	NM_002392	Senescence pathway	GAATCATCGGACTCAGGTACATC	TCTGTCTACTAATTGCTCTCCT
53	<i>MORC3</i>	NM_015358	SI/p53-pRb signaling	TCCTGATGTGAACGCTAAACAAA	GAACCCGACTTGAAGCCATTC
54	<i>MYC</i>	NM_002467	SI/p53-pRb signaling	GGCTCCTGGCAAAGGTCA	CTGCGTAGTTGTCTGATGT
55	<i>NBN</i>	NM_002485	SI/DNA damage	GACTGGCGTTGACTACCTTGT	TGATTTCCGCTGATCGACTGA
56	<i>NFKB1</i>	NM_003998	SI/INF related	AACAGAGAGGATTTCTGTTCCG	TTTACCTGAGGGTAAAGACTTCT
57	<i>PCNA</i>	NM_002592	SI/p53-pRb signaling	CCTGCTGGGATATTAGCTCCA	CAGCGGTAGGTGTGAAGC
58	<i>PIK3CA</i>	NM_006218	SI/p53-pRb signaling	CCACGACCATCATCAGGTGAA	CCTCACGGAGGCATTTCTAAAGT
59	<i>PLAU</i>	NM_001145031	SI/p53-pRb signaling	GCTTGTCGAAGAGTGCATGGT	CAGGGCTGGTTCTCGATGG
60	<i>PRLP1</i>	NM_001002	Senescence pathway	CTTCCCACGAAGCTAAGGCCGC	AGAGGTTTACTCAAAAAGACCA
61	<i>PTEN</i>	NM_000314	SR/Other	TGGATTCGACTTAGACTTGACCT	GGTGGGTTATGGTCTTCAAAAAG
62	<i>RB1</i>	NM_000321	Senescence pathway	TTGGATCACAGCGATACAAACTT	AGCGCACGCCAATAAAGACAT
63	<i>RBL1</i>	NM_002895	SI/p53-pRb signaling	CTGGACGACTTFACTGCCATC	TCCAACCGTGGGAATAATGCT
64	<i>RBL2</i>	NM_005611	Senescence pathway	CCACCCCTCAGATCCAGCA	CGTGTAGCTTTCGCTCATGC
65	<i>SERPINB2</i>	NM_001143818	SI/p53-pRb signaling	CAGCACCGAAGACCAGATGG	CCTGCAAAATCGCATCAGGATAA
66	<i>SERPINE1</i>	NM_001165413	SI/p53-pRb signaling	ACCGCAACGTGGTTTTCTCA	TTGAATCCCATAGCTGCTTGAAT
67	<i>SIRT1</i>	NM_001142498	SI/p53-pRb signaling	TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGGA	ACAGCTTCACAGTCAACTTTGT
68	<i>SPARC</i>	NM_003118	SI/p53-pRb signaling	TGAGGTATCTGTGGGAGCTAATC	CCTTGCCGTGTTTGCAGTG
69	<i>TBX2</i>	NM_005994	SR/p16 effectors	GCTGACGATTGCCGTATAAG	CCCCTTCAAGGTGCGAGTC
70	<i>TBX3</i>	NM_005996	SR/p16 effectors	GGACCTCTGATGAGTCTCTCCA	TCGCTGGGACATAAATCTTTGAG
71	<i>TERF2</i>	NM_005652	SI/DNA damage	CAGTGTCTGTCCGGATTGAA	CATTGATAGCTGATTCCAGTGGT
72	<i>TERT</i>	NM_001193376	SI/DNA damage	CCGATTGTGAACATGACTACG	CACGCTGAACAGTGCCTTC
73	<i>TGFB1</i>	NM_000660	SI/p53-pRb signaling	GGCCAGATCCTGTCCAAGC	GTGGGTTTCCACCATTAGCAC
74	<i>TGFB1I1</i>	NM_015927	SR/Cell adhesion	TACAGCACGGTATGCAAGCC	GCAACCGATCTAGCTCACAGAG
75	<i>THBS1</i>	NM_003246	SR/Cell adhesion	AGACTCCGCATCGCAAAGG	TCACCACGTTGTTGTCAAGGG
76	<i>TP53</i>	NM_001126118	Senescence pathway	CAGCACATGACGGAGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
77	<i>TP53BP1</i>	NM_001141980	SI/DNA damage	ATGACCCTACTGGAAGTCAG	TTTCTTTGTGCGTCTGGAGATT
78	<i>TP63</i>	NM_001114978	Senescence pathway	GGACCAGCAGATTCAGAACGG	AGGACACGTCGAAACTGTGC
79	<i>TP73</i>	NM_001204187	Senescence pathway	GACGAGGACACGTAACCTT	CTGCCGATAGGAGTCCACCA
80	<i>TWIST1</i>	NM_000474	Senescence pathway	GTCCGCACTTACGAGGAG	GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT
81	<i>VIM</i>	NM_003380	SR/Cytoskeleton	AGTCCACTGACTACGGAGAC	CATTTACGCATCTGGCGTTC
82	<i>GAPDH</i>	NM_001256799	—	GGAGCGAGATCCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

注: **SI**. 衰老引发因子; **SR**. 衰老信号反应。

Note: **SI**. Senescence initiators; **SR**. Senescence responses.



注: A. MTT 法检测莪术醇对 HepG2 细胞增殖的抑制作用; B. 流式细胞术检测莪术醇阻滞 HepG2 细胞于 G0/G1 期; C. 三次独立流式细胞术检测的 G0/G1 期细胞百分数的均值 \pm 标准差的统计学分析。

Note: A. Inhibitory effect of curcumol on HepG2 cell proliferation detected by MTT assay; B. Curcumol-induced G0/G1 phase cell cycle arrest determined by flow cytometry; C. Percentage of G0/G1 phase cells was represented as the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments.

图 1 莪术醇对 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响

Fig. 1 Effects of curcumol on cell proliferation and cell cycle progression in HepG2 cells

L¹莪术醇处理 24 h 后, HepG2 细胞中 20 个基因: *ABL1*、*ALDH1A3*、*ATM*、*B2M*、*CALR*、*Cyclin D1*、*CD44*、*CDK2*、*p21-Cip1*、*p27-Kip1*、*p16-Ink4a*、*p19-Ink4D*、*TP53*、*COL3A1*、*ETS1*、*HRAS*、*IFNG*、*PRLP0*、*PTEN*, 表达水平显著上调; 8 个基因: *Cyclin A2*、*GADD45A*、*HPRT1*、*IGFBP3*、*MORC3*、*SIRT1*、*TERT*、*THBS1*, 表达水平显著下调(图 3, 表 2)。

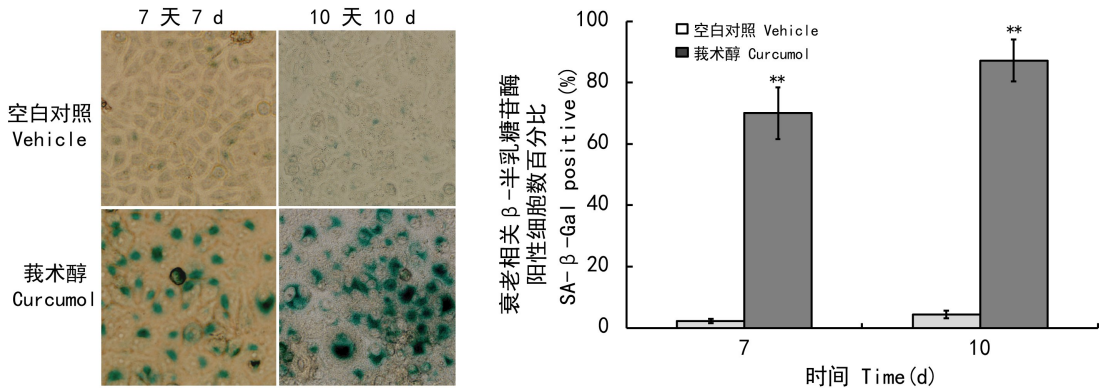
3.4 Western 印迹检测 p53 蛋白功能

采用 Western 印迹技术对 p53 及其下游主要周期素依赖性蛋白激酶抑制物(CKIs)分子的表达水平进行验证。结果显示, 经莪术醇处理, HepG2 细胞的 p53、p21WAF1 和 p16INK4 蛋白水平较对照组显著升高, Cyclin A2 水平显著降低, 与前述

PCR 实验检测该基因 mRNA 水平下调的结果一致。此外, 检测发现野生型 p53-诱导的蛋白磷酸酶 1(Wip1)水平显著增高, 结合 p21WAF1 的转录激活, 表明 p53 功能被激活, (图 4)。

4 讨论与结论

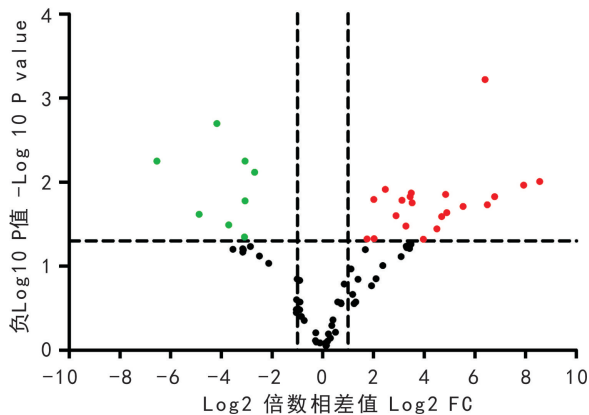
莪术醇是从中药莪术中分离得到的单体化合物, 广西是我国莪术的主产区之一。体外细胞培养和动物实验表明, 莪术醇能够抑制肝癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、鼻咽癌等多种肿瘤细胞的增殖与生长, 其作用机理可能涉及诱导细胞周期阻滞与凋亡、抑制细胞核酸代谢、抑制肿瘤血管生成、促进



注: A. 莪术醇处理 HepG2 细胞后第 7 天和第 10 天分别行衰老相关-β-半乳糖苷酶 (SA-β-gal) 染色, 光镜下观察细胞形态变化及胞浆蓝染 (×400); B. 三次独立 SA-β-gal 染色实验蓝染阳性细胞百分数的均值±标准差的统计学分析。* * $P < 0.001$ (与空白对照组比较)。

Note: A. Morphology of control cells (vehicle) and curcumol-treated cells were examined following SA-β-gal staining under microscopy (×400); B. Percentage of positively staining cells was represented as the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. (* * $P < 0.001$ vs. vehicle).

图 2 衰老相关-β-半乳糖苷酶染色检测莪术醇对 HepG2 细胞衰老的诱导作用
Fig.2 Determination of cell senescence by SA-β-gal staining in curcumol-treated HepG2 cells



注: 莪术醇处理 24 h, HepG2 细胞 81 个衰老相关基因差异表达谱分析; 以 *ACTB* 基因标化, 红色圆点分别代表 20 个表达上调大于 2 倍且 $P < 0.05$ 的基因, 绿色圆点分别为 8 个表达下调 2 倍以上且 $P < 0.05$ 的基因。FC. 倍数相差值。

Note: Analysis of 81 senescence-related gene differential expression profile in HepG2 cells 24 h after curcumol treatment; based normalization with *ACTB* gene, the red dots represent 20 genes whose expression were up-regulated over 2-fold and $P < 0.05$, and the green dots are eight genes whose expression were down-regulated more than 2-fold and $P < 0.05$, respectively. FC. Fold change.

图 3 莪术醇处理对 81 个衰老相关基因表达谱影响的火山图分析

Fig. 3 Volcano plot of 81 senescence-related gene expression in HepG2 cells (curcumol-treated versus-untreated)

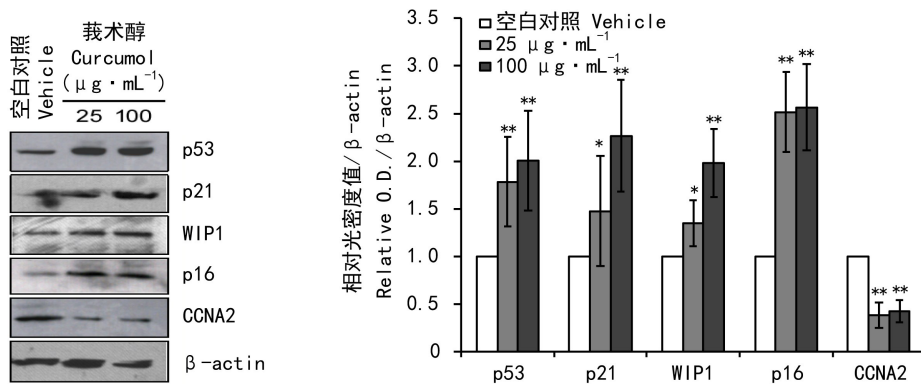
细胞分化等诸多方面 (王耀霞和徐立春, 2009; Tang et al, 2015), 目前对于莪术醇抗肿瘤的作用机理还缺乏深入研究。我们曾经报道, 莪术醇对人肝癌 HepG2 细胞的增殖具有明显的抑制作用, 该效应呈时间和剂量依赖性, 与激活 p53/pRB 通路, 抑制 *Cyclin A* 基因表达和上调 *p21WAF1*、*p27KIP1*、*CDK8* 等基因水平有关 (黄岚珍等, 2013)。此外, 莪术醇还能够通过激活 p73-PUMA 信号通路, 诱导 p53 突变型三阴性乳腺癌 MDA-MB 231 细胞凋亡 (Huang et al, 2017)。在本研究中, 我们发现较低剂量 ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 莪术醇处理 HepG2 细胞, 诱导 G0/G1 期周期阻滞, 伴细胞体积变大扁平、表达在 pH6.0 时有高酶活性的 β-半乳糖苷酶等细胞衰老表型改变, 表明莪术醇具有诱导 HepG2 细胞早衰的生物学效应。

衰老细胞表现为不可逆地细胞周期停滞特征。在哺乳动物中, 细胞周期进程存在 G1/S 期、G2/M 期及纺锤体装配期 3 个检查点 (check point), 受到周期素 (cyclins)、周期素依赖性蛋白激酶 (CDK) 和周期素依赖性蛋白激酶抑制物 (CKI) 的严格调控。CDK 通过与相应 Cyclin 形成复合物而被激活, 驱动细胞周期进程。如 Cyclin A1 可与 CDK2 结合形成复合物, 敲除 Cyclin A1 基

表 2 莪术醇处理后 HepG2 细胞中衰老相关基因的差异表达

Table 2 Differentially expressed senescence-related genes in curcumol-treated HepG2 cells

编号 No.	基因 Gene	相差倍数 Fold change	P 值 P value	编号 No.	基因 Gene	相差倍数 Fold change	P 值 P value
1	<i>ACTB</i>	2.04±0.66	—	16	<i>COL3A1</i>	7.58±0.70	0.019 4
2	<i>ABL1</i>	4.51±0.38	0.012 2	17	<i>ETS1</i>	6.74±0.67	0.046 8
3	<i>ALDH1A3</i>	10.60±0.86	0.009 8	18	<i>HRAS</i>	5.53±0.14	0.013 4
4	<i>ATM</i>	6.54±0.91	0.036 0	19	<i>IFNG</i>	6.89±0.41	0.014 0
5	<i>B2M</i>	6.93±0.65	0.023 0	20	<i>PRLP0</i>	4.94±0.10	0.025 0
6	<i>CALR</i>	5.49±0.18	0.014 8	21	<i>PTEN</i>	3.79±0.11	0.047 2
7	<i>Cyclin D1</i>	8.82±0.80	0.014 8	22	<i>Cyclin A2</i>	-1.02±0.12	0.016 6
8	<i>CD44</i>	8.53±0.96	0.018 6	23	<i>GADD45A</i>	-2.13±0.31	0.002 0
9	<i>CDK2</i>	5.57±0.27	0.017 6	24	<i>HPRT1</i>	-2.83±0.31	0.024 0
10	<i>p16, INK4A</i>	5.17±0.14	0.016 4	25	<i>IGFBP3</i>	-1.67±0.54	0.032 2
11	<i>p19, INK4D</i>	5.32±0.45	0.033 2	26	<i>MORC3</i>	-0.64±0.32	0.032 2
12	<i>p21, CIP1</i>	6.01±0.97	0.047 6	27	<i>SIRT1</i>	-1.04±0.53	0.044 8
13	<i>p27, KIP1</i>	9.97±0.80	0.010 8	28	<i>TERT</i>	-4.50±0.29	0.005 6
14	<i>TP53</i>	4.07±0.24	0.016 0	29	<i>THBS1</i>	-1.02±0.34	0.005 6
15	<i>CHEK2</i>	4.07±0.24	0.046 8				



注: A. 莪术醇处理 24 h, Western 印迹检测 HepG2 细胞中 p53, p21, p16, WIP1 和 Cyclin A2 蛋白水平, β -actin 为空白对照; B. 三次独立 Western 印迹蛋白信号条带灰度定量的均值±标准差的统计学分析, β -actin 标化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (与空白对照组比较)。

Note: A. Twenty-four hours after curcumol treatment, protein levels of p53, p21, p16, WIP1 and Cyclin A2 were determined by Western blotting with correspondent antibodies, β -actin is shown as a loading control; B. Quantitative data of the protein levels of interest.

Each bar represents the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle).

图 4 Western 印迹检测 p53 蛋白及其调控基因的表达

Fig. 4 Expression of p53 protein and its regulatory genes in Western blot

因导致 G1 期细胞周期阻滞, Cyclin A2 则可以在 S 期结合 CDK1 或 CDK2 参与 G2/M 期转换的调控 (Pagano et al, 1992)。Wu et al (2009) 研究发现, 植物娃儿藤提取物 Tylophorine 通过抑制 Cyclin A2

基因水平诱导 HepG2 细胞 G0/G1 期周期阻滞, 而 Cyclin A2 基因过表达则能够逆转 Tylophorine 诱导的这一周期阻滞效应。另一方面, Cyclin-CDK 复合物的作用受 CKI 直接控制。CKI 分为 INK4 和

CIP / KIP 家族两类。前者主要通过隔离 CDK, 阻止 CDK 与 Cyclin 形成复合物; 后者则可以直接与 Cyclin-CDK 复合物结合, 通过抑制 CDK 的活性对细胞周期进程负向调节。本研究采用高通量荧光定量 PCR 技术对莪术醇处理后的 HepG2 细胞中 81 个衰老相关基因进行了差异表达谱分析, 结果表明 *TP53* 及其下游基因 *p16 Ink4a*、*p21 Waf1/Cip1* 和 *p27 Kip1* 等的表达水平显著升高, 伴随 *ABL1*、*ALDH1A3*、*CHEK2*、*HRAS*、*PTEN* 等衰老信号通路启动与效应关联基因的转录显著增强, 而 *Cyclin A2*、*IGFBP3*、*SIRT1* 以及 *TERT* 等细胞周期进程与衰老信号通路的负性调控基因的表达水平则显著降低。通常认为, 当细胞内 DNA 受损时, *p53* 即被激活, 通过 *p21* 或/和 *p27* 抑制 *CDK2* 和 *CDK3* 活性, 或激活 *p16* 以阻断 *CDK4* 和 *CDK6* 与 Cyclin 的结合, 抑制 RB 信号通路, 阻滞细胞周期于 G1/G0 期或 G2/M 期 (Terzi et al, 2016; Gire & Dulic, 2015)。衰老相关基因表达谱筛查结果发现共计 20 个基因 mRNA 水平上调, 8 个基因水平下调, 提示莪术醇诱导细胞衰老涉及复杂的信号传导机制。本研究中 Western blot 检测结果除证实细胞 *p16* 水平升高和 *Cyclin A2* 水平降低以外, 还显示 *p53* 蛋白及其转录激活靶分子 *p21WAF1* 和野生型 *p53*-诱导的蛋白磷酸酶 1 (*Wip1*) 的水平显著增高, 提示 *p53* 激活可能是莪术醇诱导 HepG2 细胞衰老的重要原因, 值得探讨。

本研究表明, 莪术醇能够在体外诱导肝癌 HepG2 细胞早衰, 其机制可能是通过活化抑癌基因 *p53*, 上调 *p21WAF1*、*p16INK4* 等 CKI 分子及 *PTEN* 的表达水平, 一系列涉及衰老通路关联分子参与, 从而诱导细胞周期 G0/G1 期阻滞来实现的。本研究为进一步探讨莪术醇的抗肿瘤作用机制及其潜在的临床应用提供了有价值的信息。

参考文献:

GIRE V, DULIC V, 2015. Senescence from G2 arrest, revisited [J]. *Cell Cycle*, 14(3):297-304.

- HUANG LZ, WANG J, LU FT, et al, 2013. Mechanism study on anti-proliferative effects of curcumin in human hepatocarcinoma HepG2 cells [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 38(11): 1812-1815. [黄岚珍, 王娟, 卢菲婷, 等, 2013. 莪术醇抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的机制 [J]. *中国中药杂志*, 38(11): 1812-1815.]
- HUANG LZ, LI A, LIAO GZ, et al, 2017. Curcumin triggers apoptosis of p53 mutant triple-negative human breast cancer MDA-MB 231 cells via activation of p73 and PUMA [J]. *Oncol Lett*, 14(1):1080-1088.
- LU JJ, DANG YY, HUANG M, et al, 2012. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma curcumae*—A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 143(2):406-411.
- NARDELLA C, CLOHESSY JG, ALIMONTI A, et al, 2011. Pro-senescence therapy for cancer treatment [J]. *Nat Rev Canc*, 11(7):503-511.
- PAGANO M, PEPPERKOK R, VERDE F, et al, 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle [J]. *Embo J*, 11(3):961-971.
- RUFINI A, TUCCI P, CELARDO I, et al, 2013. Senescence and aging: the critical roles of p53 [J]. *Oncogene*, 32(43): 5129-5143.
- SCHOSSENER M, GRILLARI J, BREITENBACHM, 2017. The dual role of cellular senescence in developing tumors and their response to cancer therapy [J]. *Front Oncol*, 7:278.
- TANG QL, GUO JQ, WANG QY, et al, 2015. Curcumin induces apoptosis in SPCA1 human lung adenocarcinoma cells and displays antineoplastic effects in tumor bearing mice [J]. *Asian Pac J Cance Prev*, 16(6): 23072312.
- TERZI MY, IZMIRLI M, GOGEBAKANB, 2016. The cell fate: senescence or quiescence [J]. *Mol Biol Rep*, 43(11): 1213-1220.
- WANG Y, XU L, 2009. Advances in the researches of curcumin against tumor [J]. *Med Rec*, 15(22):3483-3486. [王耀霞, 徐立春, 2009. 莪术醇抗肿瘤研究进展 [J]. *医学综述*, 15(22):3483-3486.]
- WU CM, YANG CW, LEE YZ, et al, 2009. Tylophorine arrests carcinoma cells at G1 phase by downregulating cyclin A2 expression [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 386(1): 140-145.
- YANG F, HUANG L, YANG J, et al, 2015. Cisplatin-induced senescence and senescence-related gene expression profiles in human nasopharyngeal carcinoma cells CNE2 [J]. *Canc Res Prev Treat*, 42(1): 4-8. [杨飞城, 黄岚珍, 阳晶, 等, 2015. 顺铂诱导人鼻咽癌 CNE2 细胞衰老及其相关基因表达谱的研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 42(1): 4-8.]