

## · 研究简报 ·

## 姜黄素对肝癌细胞 JAK-STAT 信号通路的影响

王伟章<sup>1\*</sup>, 张碧鱼<sup>2</sup>, 袁健<sup>1</sup>, 毛建文<sup>1</sup>, 梅文杰<sup>1</sup>

(1. 广东药学院, 广东 广州 510006; 2. 中山大学珠海校区基础教学中心, 广东 珠海 519082)

关键词: 姜黄素; 肝癌细胞; JAK-STAT 信号通路

中图分类号: R963; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1434-06

## Effect of curcumin on JAK-STAT signaling pathway in hepatoma cell lines

WANG Wei-zhang<sup>1\*</sup>, ZHANG Bi-yu<sup>2</sup>, YUAN Jian<sup>1</sup>, MAO Jian-wen<sup>1</sup>, MEI Wen-jie<sup>1</sup>

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Experimental Center of Foundation Teaching, Zhuhai Campus, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519082, China)

**Abstract:** The effect of curcumin on JAK-STAT signaling pathway was investigated in hepatoma cell lines Huh7 and Hep3B. Curcumin inhibited cell proliferation and induced apoptosis of both cell lines, but Huh7 cells were more sensitive to curcumin than Hep3B cells. Curcumin ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly increased phosphorylations of p38 (T180/Y182) and STAT-1 (S727) in Huh7 and Hep3B cells, and caused relocalization of phosphorylated-STAT-1 (Y701) from cytoplasm to nucleus in Hep3B cells. In addition, curcumin (25 and  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dramatically suppressed the phosphorylation level of STAT-1 (Y701) and resulted in a significant reduction of nuclear phosphorylated-STAT-1 (Y701) in Huh7 cells.

**Key words:** curcumin; hepatoma cell; JAK-STAT signaling pathway

姜黄素 (curcumin) 是植物姜黄 (curcuma) 的主要有效成分, 常用于食物天然色素及调味品, 具有广泛的药理作用。近年来的研究发现, 姜黄素除了具有抗氧化和抗炎等药理作用外, 细胞和动物模型实验结果显示它具有抗肿瘤及预防癌变的药理作用<sup>[1]</sup>。人体的 I 期和 II 期临床实验结果也表明, 姜黄素对肿瘤的防治有较好的活性, 同时肿瘤患者对姜黄素具有很好的耐受性<sup>[2, 3]</sup>。目前美国国立肿瘤研究院已将其列为第三代化学预防药物, 并且正在进行 III 期临床试验, 探讨它在防治转移性结肠癌中的作用。由此可见, 姜黄素在肿瘤预防和治疗中具有良好的应用前景, 有望成为新一代的抗肿瘤药物应用于肿瘤的防治。

Janus 激酶信号转导子与转录激活子 (JAK-

STAT) 信号通路是细胞因子信号由胞膜向核内传递的主要途径, 它广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节、炎症、肿瘤等多种生理病理过程<sup>[4]</sup>。STATs 是这条通路的核心分子, 现已证实 STATs 家族共有 7 个成员: STAT-1、STAT-2、STAT-3、STAT-4、STAT-5a、STAT-5b 和 STAT-6<sup>[5]</sup>。STAT-1 是 STATs 家族发现的第一个成员, 可以被不同的配体包括 IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、EGF、PDGF 和 IL-6 所激活<sup>[4]</sup>。尽管 STAT-1 基因敲除小鼠的研究结果提示 STAT-1 是肿瘤抑制因子<sup>[6, 7]</sup>, 然而, 越来越多的证据却显示 STAT-1 是肿瘤促进因子。首先, 在人类多发性骨髓瘤、乳腺癌和头颈鳞状细胞癌等肿瘤中, 可检测到 STAT-1 高表达<sup>[8-10]</sup>。更重要的是, 在不同组织来源的肿瘤组织中也发现, STAT-1 在肿瘤中的表达要高于其正常组织。其次, STAT-1 的异常活化与肿瘤对放疗和化疗的抗性密切相关<sup>[11-14]</sup>。通过 RNA 干扰的方法抑制 STAT-1 表达可以逆转肿瘤细胞对多烯紫杉醇的耐药性<sup>[15]</sup>。最

收稿日期: 2009-05-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30871304).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-39352187, E-mail: wvwss@163.com

后, STAT-1 调控多种促生存因子和耐药基因包括 IFITM1、Leu-13、USP18 和 MVP 蛋白等的表达<sup>[16-18]</sup>。在耐药的异种皮移植肿瘤 nu61 中, 研究者也观察到 STAT-1 与 MCL-1、IFITM1、USP18 共表达<sup>[14]</sup>。因此, 阻断 STAT-1 的异常活化有望成为治疗肿瘤的新途径。

以往研究已表明, JAK-STAT 信号通路异常与肝癌的发生发展有密切联系<sup>[19]</sup>。因此, 以 JAK-STAT 信号通路为靶点进行干预有望成为肝癌治疗的新途径。然而, 目前关于姜黄素对肝癌 JAK-STAT 信号通路影响的研究鲜见报道。本研究观察了姜黄素对肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 增殖和凋亡以及 JAK-STAT 信号通路的影响, 从蛋白水平比较此信号通路中转录因子 STAT-1 及其上游调控蛋白 p38 激酶在这两种肝癌细胞表达和活化的情况, 为进一步阐明姜黄素诱导肝癌细胞凋亡的分子机制以及寻求治疗肝癌的临床有效药物提供实验依据。

## 材料与方 法

**材料** Huh7 和 Hep3B 细胞购自中国科学院上海分院细胞库。姜黄素 (Fluka, 批号 28260; TLC $\geq$ 95%) 溶于 DMSO, 配成浓度为 25 mmol·L<sup>-1</sup> 的贮存液, 使用前用培养基稀释为所需浓度。胎牛血清购自 PAA 公司。4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自 Sigma 公司。STAT-1、p-p38 (T180/Y182)、p-STAT-1 (Y701) 和 p-STAT-1 (S727) 单克隆抗体均购自 BD 公司;  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 羊抗小鼠 Alexa-488 购自 Invitrogen 公司; ECL 购自 Pierce 公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自申能博彩生物科技有限公司。

**MTT 检测** 用 0.25% 胰酶消化处于对数生长期的人肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 并接种于 96 孔培养板, 每孔加入  $5 \times 10^3$  个细胞, 200  $\mu$ L 培养液, 每组设 6 个复孔。接种 24 h 细胞贴壁后更换培养液。共分 4 组, 分别以终浓度为 10、20、40 和 80  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的姜黄素处理为实验组, 加入等体积的 DMSO 作为阴性对照。48 h 后, MTT 比色法测定。终止反应前 4 h, 每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 20  $\mu$ L 继续培养 4 h, 小心吸去孔内培养上清液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 置微孔振荡器上振荡 10 min 待紫色结晶完全溶解后, 于 490 nm 测定吸收度 ( $A$ ) 值的变化。计算细胞生长抑制率 (IR): 细胞生长抑制率 (%) =  $(1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。根据各浓度姜黄素的细胞生长抑制率, 采用

IC<sub>50</sub> 计算软件计算姜黄素对 Huh7 细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

**细胞凋亡检测** 终浓度为 25 和 50  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的姜黄素处理 Huh7 和 Hep3B 细胞 0、12、24、36 和 48 h 后参照文献[20]进行细胞凋亡检测。

**Western blotting 分析** 终浓度为 25 和 50  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的姜黄素处理 Huh7 和 Hep3B 细胞 2、4 和 8 h 后, 收集细胞并提取蛋白, 通过 BCA 试剂盒测定各组的蛋白浓度。0.2% DMSO 处理的样品作为溶剂对照组。样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 湿电转移至硝酸纤维素膜, 膜在室温下用封闭液封闭 2 h, 加入 1% BSA 稀释的 STAT-1、p-p38 (T180/Y182)、p-STAT-1 (Y701)、p-STAT-1 (S727) 和  $\beta$ -actin 抗体 (1 : 1 000), 4  $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜后加入封闭液稀释的二抗稀释液 (1 : 5 000), 室温 2 h。用 ECL solution 显色, 最后进行显影, 定影。用 Banksan 软件进行灰度分析, 分析目标基因的表达水平时用  $\beta$ -actin 为内源对照。

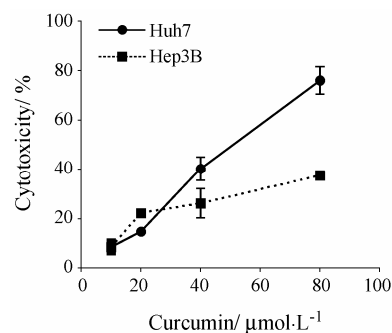
**免疫荧光实验** 终浓度为 25 和 50  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的姜黄素处理 Huh7 和 Hep3B 细胞 4 h 后, 参照文献[20]进行 p-STAT-1 (Y701) 抗体的免疫荧光染色, 荧光显微镜拍照。

**统计学处理** 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验进行差异显著性分析。

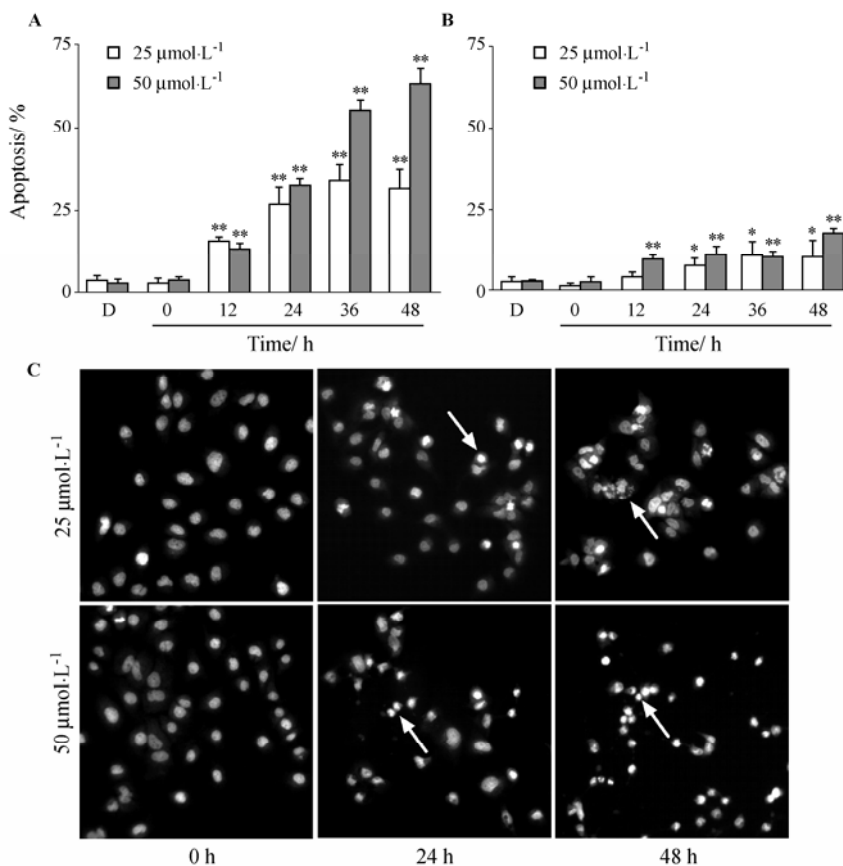
## 结 果

### 1 姜黄素对肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 增殖和凋亡的影响

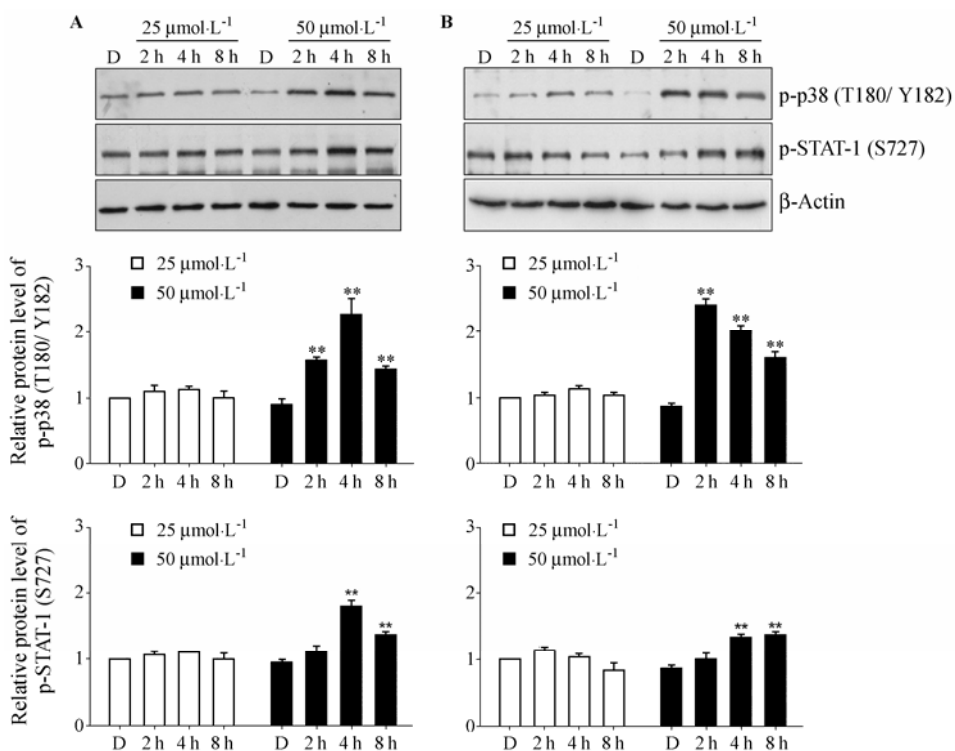
细胞增殖实验结果表明: 姜黄素呈浓度依赖抑制 Huh7 和 Hep3B 细胞的生长, 但其对 Huh7 细胞增殖的抑制作用明显强于 Hep3B 细胞 (图 1)。其中, 姜黄素对 Huh7 细胞的 IC<sub>50</sub> 为  $(49.4 \pm 4.8) \mu$ mol·L<sup>-1</sup>。因此, 以下实验选取 25 和 50  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 为实验浓度。



**Figure 1** Effect of curcumin on cell proliferation of Huh7 and Hep3B cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$



**Figure 2** Effect of curcumin on apoptosis of Huh7 (A) and Hep3B (B) cells. Representative images show apoptotic nuclei ((indicated by arrows) for Huh7 cells (C).  $n = 3, \bar{x} \pm s.$  \* $P < 0.05,$  \*\* $P < 0.01$  vs D (control) group



**Figure 3** Effect of curcumin on the phosphorylations of p38 (T180/Y182) and STAT-1 (S727) levels in Hep3B (A) and Huh7 (B) cells. The intensity for each band was densitometrically quantified and then normalized by the intensity of  $\beta$ -actin in each lane. The normalized intensity in the first lane was set as relative expression level of 1.  $n = 3, \bar{x} \pm s.$  \*\* $P < 0.01$  vs D (control) group

细胞凋亡实验结果表明: 随着姜黄素处理浓度的升高以及处理时间的延长, Huh7 和 Hep3B 细胞的凋亡率均显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 但 Hep3B 细胞的凋亡率远低于经过相同处理后 Huh7 细胞的凋亡率 (图 2A、2B)。

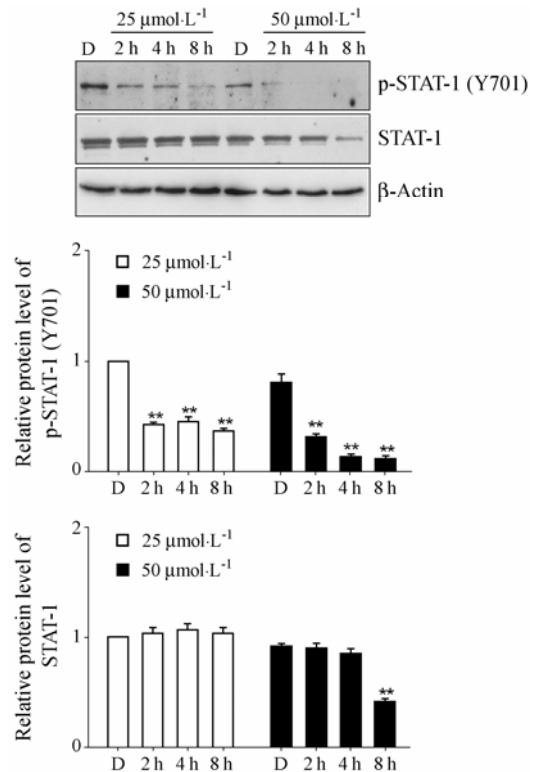
## 2 姜黄素对 p38 (T180/Y182) 和 STAT-1 (S727) 蛋白磷酸化的影响

JAK-STAT 信号通路是细胞对外界刺激的应急通路, 其活化十分迅速, 因此检测了姜黄素短时间处理 Huh7 和 Hep3B 细胞对 p38 (T180/Y182) 和 STAT-1 (S727) 蛋白磷酸化的影响。Western blotting 结果显示, 与对照组相比,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素处理 Huh7 和 Hep3B 细胞不同时间后, p38 (T180/Y182) 和 STAT-1 (S727) 蛋白的磷酸化水平明显升高 ( $P < 0.01$ );  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素对 p38 和 STAT-1 的磷酸化水平并无显著影响 (图 3)。

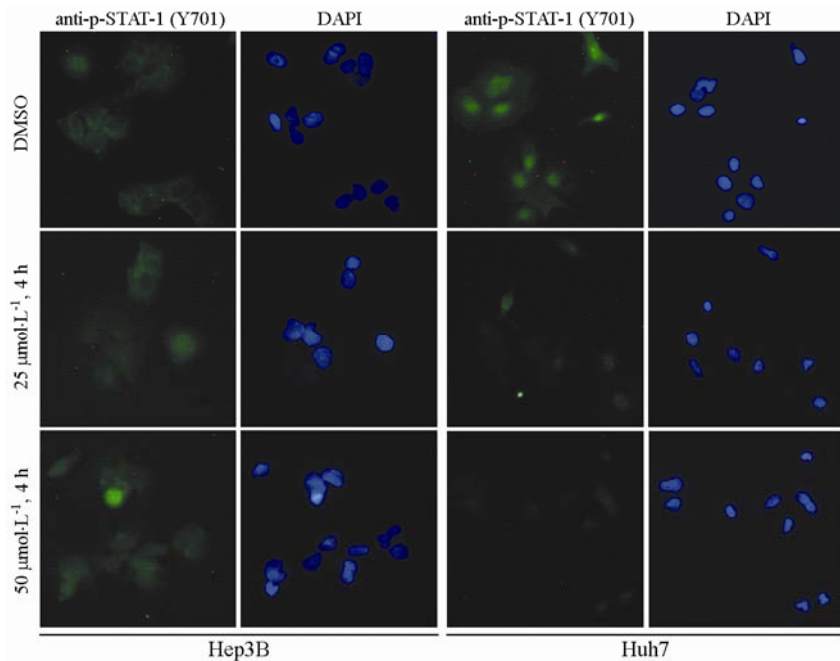
## 3 姜黄素对磷酸化 STAT-1 (Y701) 蛋白胞内定位的影响

免疫荧光实验结果显示 (图 4): 在 Hep3B 细胞中, 对照组磷酸化的 STAT-1 (Y701) 蛋白主要分布在胞浆中, 而姜黄素 ( $25$  和  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理后, 磷酸化的 STAT-1 (Y701) 蛋白在细胞核和胞浆中均有表达。在 Huh7 细胞的对照组中, 磷酸化 STAT-1 (Y701) 蛋白在细胞核中的染色较深, 在胞浆中的染色较浅; 姜黄素 ( $25$  和  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 Huh7 细胞后, 磷酸

化 STAT-1 (Y701) 蛋白在细胞核中的染色明显减弱。与免疫荧光染色结果一致, Western blotting 的结果也显示 (图 5), 姜黄素 ( $25$  和  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 Huh7 细



**Figure 5** Effect of curcumin on the phosphorylation of STAT-1 (Y701) in Huh7 cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs D (control) group



**Figure 4** Effect of curcumin on the cellular localization of phosphorylated-STAT-1 (Y701) in Huh7 and Hep3B cells (magnification, 200×). Nuclei were visualized by DAPI staining

胞不同时间后, STAT-1 (Y701) 蛋白的磷酸化水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), 同时 STAT-1 总蛋白在  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素处理 8 h 后也明显减少 ( $P < 0.01$ )。

## 讨论

肿瘤细胞对药物敏感性的差异机制包括药物靶点调控的改变、凋亡通路的受阻、DNA 修复能力的增强等, 而肿瘤细胞本身所具有的不同基因突变导致的信号通路异常是其中最重要的机制之一。因此, 研究药物如何调控各种信号通路, 提高肿瘤细胞对药物的敏感性, 是目前肿瘤治疗研究的关键。大量的研究已经证实, 姜黄素可通过调控多条信号通路发挥其抗肿瘤作用<sup>[21]</sup>。例如, Rajasingh 等<sup>[22]</sup>发现姜黄素在诱导白血病 T 细胞发生周期阻滞和凋亡时 JAK 和 STAT 蛋白磷酸化水平明显降低, JAK-STAT 信号通路被阻断。因此, 抑制 JAK-STAT 信号通路可能是姜黄素发挥抗肿瘤作用的新机制。

激酶磷酸化修饰是调控 STAT-1 分子活性的重要机制。细胞因子与细胞表面的受体结合, 使得与受体偶联的 JAK 蛋白激活, 活化的 JAK 使 STAT-1 蛋白 701 位 Tyr 残基发生磷酸化并形成二聚体以及核转移, 最后启动细胞因子应答基因转录<sup>[23]</sup>。而 p38 激酶磷酸化 STAT-1 蛋白 727 位丝氨酸位点可以使 IFN $\gamma$  应答元件的表达达到最高水平<sup>[24]</sup>。本研究发现, 尽管姜黄素能抑制肝癌细胞 Huh7 和 Hep3B 的增殖并诱导其发生凋亡, 但是 Huh7 细胞对姜黄素的敏感性明显高于 Hep3B 细胞。因此, 通过观察姜黄素处理后 JAK-STAT 信号通路在这两种细胞中的差异, 探讨其产生这种差异的分子机制。在姜黄素耐药的肝癌细胞 Hep3B 中,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素明显上调 p38 (T180/ Y182) 和 STAT-1 (S727) 蛋白的磷酸化水平, 同时也使得磷酸化 STAT-1 (Y701) 蛋白从胞浆转移至细胞核中。而在姜黄素敏感细胞 Huh7 中,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素同样能够明显上调 p38 (T180/ Y182) 和 STAT (S727) 蛋白的磷酸化水平。姜黄素 ( $25$  和  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能显著抑制 STAT-1 (Y701) 蛋白的磷酸化水平。同时, 免疫荧光的结果也发现, 磷酸化 STAT-1 (Y701) 蛋白在未处理细胞中主要表达于细胞核中, 而姜黄素处理后核中的磷酸化 STAT-1 蛋白 (Y701) 表达明显减弱。以往的研究也发现, 姜黄素能够抑制 IFN 诱导白血病 K562 细胞核中 STAT-1 (Y701) 的磷酸化, 同时, cyclin D1 和 v-src 基因的表达也受到抑制<sup>[25]</sup>。这些结果提示, 姜黄素在敏感细

胞 Huh7 中抑制 STAT-1 的活性, 进而抑制 STAT-1 转录促生长因子的表达, 从而使 Huh7 细胞对姜黄素的凋亡诱导十分敏感; 而在凋亡抗性细胞 Hep3B 中, 姜黄素能够促进 STAT-1 入核调控促生长因子的表达, 从而使 Hep3B 细胞对姜黄素不敏感。但是, 关于 STAT-1 在姜黄素诱导肝癌细胞凋亡中的确切作用仍有待深入的研究。

综上所述, STAT-1 在姜黄素刺激后的活性状态可能与肝癌细胞对姜黄素凋亡诱导作用的敏感性相关, 深入研究 STAT-1 调控哪些促生存基因的表达, 将为克服肝癌对姜黄素的凋亡抗性以及阐明姜黄素诱导肝癌细胞凋亡的分子机制提供实验依据。

## References

- [1] Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 1631-1652.
- [2] Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21: 2895-2900.
- [3] Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 4491-4499.
- [4] Heim MH. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 1999, 19: 75-120.
- [5] Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice [J]. *Stem Cells*, 1999, 17: 138-146.
- [6] Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, et al. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease [J]. *Cell*, 1996, 84: 443-450.
- [7] Meraz MA, White JM, Sheehan KC, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway [J]. *Cell*, 1996, 84: 431-442.
- [8] Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 945-954.
- [9] Lin TS, Mahajan S, Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 2496-2504.
- [10] Huang E, Cheng SH, Dressman H, et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes [J]. *Lancet*, 2003, 361: 1590-1596.
- [11] Thomas M, Finnegan CE, Rogers KM, et al. STAT1: a

- modulator of chemotherapy-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 8357–8364.
- [12] Roberts D, Schick J, Conway S, et al. Identification of genes associated with platinum drug sensitivity and resistance in human ovarian cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92: 1149–1158.
- [13] Fryknas M, Dhar S, Oberg F, et al. STAT1 signaling is associated with acquired crossresistance to doxorubicin and radiation in myeloma cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120: 189–195.
- [14] Khodarev NN, Beckett M, Labay E, et al. STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 1714–1719.
- [15] Patterson SG, Wei S, Chen X, et al. Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 6113–6122.
- [16] Kita K, Sugaya S, Zhai L, et al. Involvement of LEU13 in interferon-induced refractoriness of human RSa cells to cell killing by X rays [J]. *Radiat Res*, 2003, 160: 302–308.
- [17] Steiner E, Holzmann K, Pirker C, et al. The major vault protein is responsive to and interferes with interferon-gamma-mediated STAT1 signals [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119: 459–469.
- [18] Malakhova OA, Yan M, Malakhov MP, et al. Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway [J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 455–460.
- [19] Calvisi DF, Pascale RM, Feo F. Dissection of signal transduction pathways as a tool for the development of targeted therapies of hepatocellular carcinoma [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2007, 2: 217–236.
- [20] Wang WZ, Cheng J, Luo J, et al. Abrogation of G2/M arrest sensitizes curcumin-resistant hepatoma cells to apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582: 2689–2695.
- [21] Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269: 199–225.
- [22] Rajasingh J, Raikwar HP, Muthian G, et al. Curcumin induces growth-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active JAK-STAT pathway in T cell leukemia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340: 359–368.
- [23] Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, et al. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs [J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19: 222–227.
- [24] Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation [J]. *Cell*, 1995, 82: 241–250.
- [25] Blasius R, Reuter S, Henry E, et al. Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72: 1547–1554.