

# 姜黄素抗血管生成和黑色素瘤生长的分子机制探讨

钦建伟\*, 陈琳

(苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006)

**[摘要]** **目的:**探讨姜黄素(curcumin)对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖、迁移和血管生成以及黑色素瘤 B16F10 生长的影响。**方法:**以 HUVECs 细胞, B16F10 细胞和 B16F10 鸡胚尿囊膜移植瘤组织为研究对象, 用不同浓度姜黄素分别作用 HUVECs 细胞, B16F10 细胞和 B16F10 鸡胚尿囊膜移植瘤组织, MTT 法检测姜黄素对 HUVECs 的增殖抑制率; Hoechst 33258 染色法观察 HUVECs 细胞核的形态学变化; Transwell 小室迁移实验考察姜黄素对 HUVECs 迁移能力的影响; 鸡胚尿囊膜 (CAM) 实验考察姜黄素对体内血管生成的抑制作用; 采用 Western blot 法检测姜黄素对 HUVECs 细胞血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGFR-2) 蛋白和 B16F10 细胞基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 蛋白的表达; 采用 B16F10 鸡胚尿囊膜移植瘤模型分析姜黄素对肿瘤生长的影响, 采用免疫组化和 Western blot 分析姜黄素对瘤组织内 VEGFR-2, MMP-2 蛋白表达的作用。**结果:**姜黄素 ( $4 \sim 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 HUVECs 增殖无抑制作用, 但姜黄素  $8, 10, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  能抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 增殖 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); Hoechst 33258 染色结果显示姜黄素抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 增殖不依赖于诱导 HUVECs 凋亡; Transwell 迁移实验显示姜黄素 ( $8, 10, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 能抑制 HUVECs 迁移 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 姜黄素能减少血管数目, 抑制体内血管生成, 并且抑制 HUVECs 细胞 VEGFR-2 蛋白和 B16F10 细胞 MMP-2 蛋白表达, 与空白组比较均具有统计学差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。姜黄素 ( $20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 能抑制黑色素瘤 B16F10 体内生长, 免疫组化和 Western blot 结果显示姜黄素 ( $20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 能抑制瘤组织 VEGFR-2 和 MMP-2 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。**结论:**姜黄素能抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 增殖、迁移及血管生成, 抑制黑色素瘤生长, 其机制为抑制 VEGFR-2, MMP-2 蛋白表达。

**[关键词]** 姜黄素; 人脐静脉内皮细胞; 血管生成; B16F10

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0118-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090118

**Effect and Mechanism of Curcumin on Melanoma Growth and Angiogenesis** QIN Jian-wei\*, CHEN Lin  
(First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of curcumin on the proliferation, migration, angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and the growth of B16F10 melanoma. **Method:** HUVECs were treatment with different concentrations ( $0-15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of curcumin and the proliferation was measured by MTT. The morphological change of apoptotic HUVECs was detecte by using Hoechst 33258. The effect of curcumin on HUVECs migration ability was assayed by Transwell. The anti-angiogenesis action of curcumin was investigated by using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. The expressions of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) in HUVECs and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in B16F10 were measured by Western blot. B16F10 cells were inoculated into CAM and post tumor formation, the impact of curcumin on tumor growth was analyzed. The expressions of VEGFR-2 and MMP-2 in B16F10 tumor tissue were analyzed by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Curcumin ( $4-15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) had no inhibitory effect on the proliferation of HUVECs, but it ( $8, 10, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) could inhibit VEGF-induced proliferation of HUVECs ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Hoechst 33258 staining showed that curcumin inhibited VEGF-induced the HUVECs, which was not dependent on the induction of HUVECs apoptosis ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Transwell migration experiments showed that curcumin ( $8, 10, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) could inhibit HUVECs migration, CAM assay confirmed that curcumin could reduce the number of blood vessels, inhibited angiogenesis *in vivo* ( $P <$

**[收稿日期]** 20140913(017)

**[基金项目]** 江苏省卫生厅医学科研项目(Z201304)

**[通讯作者]** \* 钦建伟, 主管中药师, 从事医院药学研究, Tel: 0512-67780241, E-mail: qinjianwei8@126.com

0.05,  $P < 0.01$ ). Curcumin could inhibit HUVECs VEGFR-2 and B1610 cells MMP-2 protein expressions ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Curcumin ( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) inhibited the growth of melanoma B16F10 *in vivo*, immunohistochemistry and Western blot showed that curcumin ( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) inhibited the VEGFR-2 and MMP-2 protein expressions ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Curcumin inhibited VEGF-induced HUVECs proliferation, migration and angiogenesis, inhibited the growth of melanoma. The mechanism of curcumin may be achieved by inhibiting VEGFR-2, MMP-2 protein expressions.

[**Key words**] curcumin; human umbilical vein endothelial cells; angiogenesis; B16F10

传统医学认为久病必瘀,临床上癌症患者多表现为“瘀相”。现代研究认为肿瘤细胞的生长和转移都伴有血管生成,新生血管为肿瘤提供营养供给,通过阻断肿瘤新生血管生成切断肿瘤营养供给,可以达到抑制和治疗肿瘤的目的<sup>[1]</sup>。肿瘤血管生成是生长出新的微细血管,这个过程主要依赖于脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的增殖、迁移和管腔的形成。肿瘤细胞分泌血管内皮细胞生存和增殖所需要的动力源如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等,VEGF 通过与 HUVECs 上的血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)结合,发挥其促内皮细胞增殖、促血管通透性增加的生物学功能<sup>[2]</sup>。另一方面肿瘤细胞分泌的基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2)与肿瘤的生长、侵袭和转移存在正相关,MMP-2 主要通过降解细胞外基质,促进新生血管的形成来促进肿瘤的转移<sup>[3]</sup>。

活血化瘀是治疗瘀证的重要方法,目前科学研究工作者正致力于从中药中开发出能抑制肿瘤血管生成的药物,从而有效地阻止肿瘤生长和转移<sup>[4]</sup>。姜黄属中药是传统活血化瘀药,用于疾病的治疗已经有悠久的历史,是抗肿瘤复方常用组方,其中的主要有效成分姜黄素已经显现出抗肿瘤功效。近年来随着研究的深入,姜黄素治疗肿瘤及其作用机制的研究已成为国内外研究的热点<sup>[5]</sup>。本文考察姜黄素对 HUVECs 迁移、血管生成以及相关蛋白表达的影响,测定姜黄素对黑色素瘤 B16F10 生长的抑制作用,并探究其中分子机制,为进一步开发姜黄素抗肿瘤治疗提供依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** HUVECs,黑色素瘤细胞 B16F10,均购自中国科学院上海细胞库,批号分别为 Hci002, 7-1048。

**1.2 药物及试剂** 鸡胚购自苏州高新区姚江山生

态鸡养殖。姜黄素(美国 Sigma 公司);胰蛋白酶(批号 1147332),胎牛血清(FBS,批号 8131445)均为美国 Gibco 公司,RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基(美国 Thermo Fisher 公司,批号分别为 MYB0815, MYB0516);DMSO(上海久亿化学试剂有限公司),Hoechst 33258 试剂(中国 Biosharp 生物科技公司,批号 WH201204),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 0790),Transwell 培养小室(美国康宁公司,批号 3422),BCA 试剂盒(美国 Pierce 公司,批号 EF60968),一抗 VEGFR-2 和 MMP-2(美国 Santa Cruz 公司,批号 SC-315,SC-13594),GAPDH(美国 Bioworld 公司,批号 BS60630),羊抗兔二抗(美国 Bioworld 公司,批号 BS13218)。

**1.3 仪器** CR3i 型冷冻型多功能离心机(美国 Thermo Fisher 公司),SW-CJ-1FD 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),525BR027843 型电泳槽(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 检测内皮细胞增殖抑制率** HUVECs 在完全培养基(含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基),置于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。B16F10 用完全培养基(含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基),于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。取对数生长期 HUVECs,接种于 96 孔板(细胞密度为  $3 \times 10^4$  个/孔),贴壁后各组都加入 VEGF 刺激因子(终质量浓度为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),然后分别加入 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的姜黄素(0, 4, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),其中,加入 0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的姜黄素组为空白组。同时设对照组(不加细胞 HUVECs,操作与其他孔一致),每组设 4 个复孔,培养 24 h 后,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),继续孵育 4 h 后,弃上清,加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解,摇床振荡 15 min,至结晶完全溶解,在酶标仪波长 490 nm 测定吸光度(A),结果以药物对细胞的相对增殖抑制率<sup>[6]</sup>表示。

细胞增殖抑制率 = (空白孔 A - 加药孔 A) / (空白孔 A - 对照孔 A) × 100%

**2.2 检测内皮细胞核形态学变化** 取对数生长期 HUVECs 调整密度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 以每孔 1 mL 接种于 6 孔培养板中, 贴壁后分别加入 1 mL 不同浓度的姜黄素 ( $0, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 培养 24 h 后将培养液吸尽, 加入 4% 的多聚甲醛液固定 20 min。弃固定液, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min。加 Hoechst 33258 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 染色液 1 mL, 室温避光染色 10 min 后, 用 PBS 洗 2 遍后风干, 倒置荧光显微镜观察并拍照。

**2.3 HUVECs 细胞 Transwell 小室迁移实验** 常规培养 HUVECs 细胞, 调整密度为  $2 \times 10^6$  个/mL。取  $90 \mu\text{L}$  细胞悬液加入 Transwell 小室上室中, 同时各孔加入浓度分别为  $0, 80, 100, 150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的姜黄素, 体积  $10 \mu\text{L}$ , 终浓度为  $8, 10, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 空白组加入等体积 PBS。下室每孔加入 VEGF ( $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为刺激剂。培养箱培养 6 h, 拿出小室, 取下滤膜, 5% 戊二醛固定 10 min, 用 0.1% 结晶紫染色 30 min, PBS 漂洗 3 次, 用棉签擦掉膜上层未穿过的细胞, 置于载玻片上, 100 倍镜下观察细胞迁移情况并拍照, 200 倍镜下随机选取 5 个视野, 观察迁移细胞数目<sup>[7]</sup>。

**2.4 鸡胚尿囊膜 (CAM) 实验造模及给药观察** 选择白皮种蛋, 消毒于普通培养箱孵育, 于第 5 天在照卵灯下确定鸡胚绒毛尿囊膜位置, 在气室顶端打 1~2 mm 小孔, 再用牙科钻在蛋壳表面划刻出凹痕, 用眼科镊轻揭凹陷处蛋皮, 撕掉内壳膜, 此时该处鸡胚绒毛尿囊膜 (chick embryo chorioallantoic membranes, CAM) 下陷, 形成假气室。将无菌滤纸小圆块 (直径约 1 cm) 置于不同浓度 ( $8, 10, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 姜黄素药液或对照 PBS 中, 空白组滤纸置于 PBS 中, 使之充分饱和 (姜黄素药液和 PBS 中已经含有终质量浓度为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VEGF), 然后放置于近胚头 1 cm 处两条前卵黄静脉之间的相对无血管区, 用透明胶纸封闭卵壳口,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育。孵育 48 h 后, 撕开透明胶带, 剥离假气室周围的蛋壳, 使尿囊膜暴露并拍照, 记录尿囊膜血管个数<sup>[8]</sup>。

**2.5 检测 HUVECs 细胞 VEGFR2 和 B16F10 细胞 MMP-2 蛋白表达** 取对数生长期 HUVECs 或 B16F10, 调整密度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 以每孔 1 mL 接种于 6 孔培养板中, 细胞贴壁后各组都加入 VEGF 刺激因子 (终质量浓度为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 然后分别加入 1 mL 不同浓度的姜黄素 ( $0, 8, 10, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),

继续培养 24 h 后, 提蛋白并测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后转膜。将 PVDF 膜以 3% BSA  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  封闭 1.5 h, 再分别用 VEGFR2, MMP-2 和 GAPDH (内参抗体) 兔抗鼠多克隆抗体 ( $1:1\ 000$ )  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1.5 h, 洗膜, 加辣根过氧化物酶标记的二抗 ( $1:1\ 000$ )  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1.5 h。然后进行化学发光显色, 拍照<sup>[9]</sup>。组织 Western blot 用 CAM 移植瘤组织提蛋白, 步骤与细胞 Western blot 一致。

**2.6 CAM 移植瘤造模及给药观察** 建立 B16F10 鸡胚尿囊膜移植瘤模型, 将处于对数生长期的 B16F10 进行消化、计数, 调整细胞为每  $20 \mu\text{L}$  中  $6 \times 10^6$  个细胞接种于已开窗的暴露出鸡胚尿囊膜的相对无血管区, 无菌胶带封闭后继续孵育 6 d, 观察各组鸡胚存活情况及各组存活鸡胚移植瘤。6 d 后将成瘤鸡胚分为姜黄素 ( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 给药组及空白组, 每组 6 只。加药 6 d 后取鸡胚, 观察移植瘤生长情况, 拍照, 称重。瘤标本常规石蜡包埋、切片, HE 染色, 光镜观察<sup>[10]</sup>。

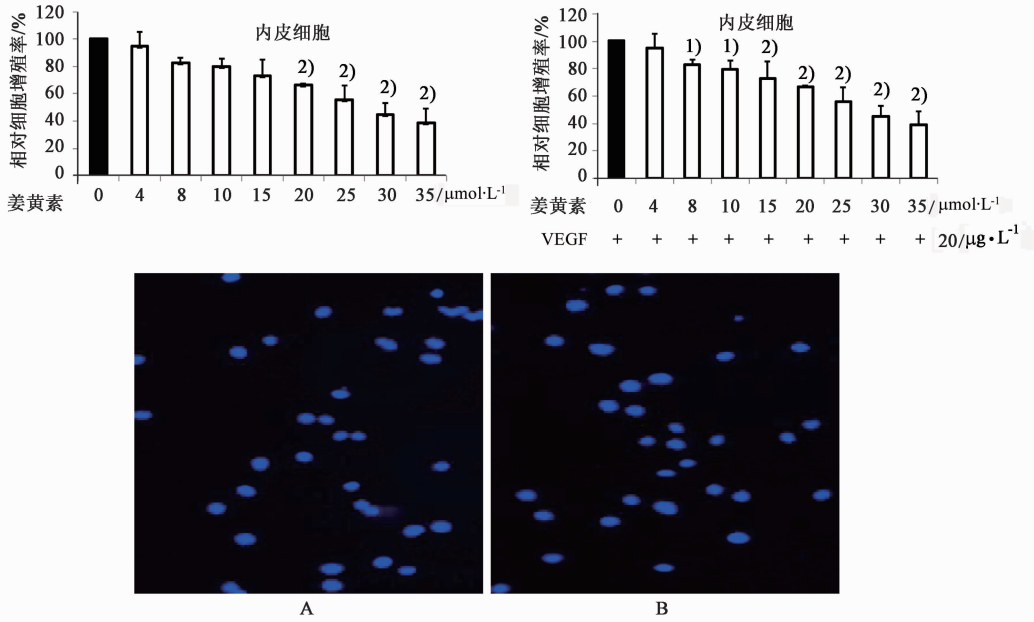
**2.7 瘤组织 HE 染色与免疫组化 SP 法检测 VEGFR2 和 MMP-2** 瘤组织截下后置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 洗去固定液。对瘤组织进行脱水和透明处理。肿瘤组织以石蜡包埋制成  $3 \mu\text{m}$  切片, 脱蜡水化, VEGFR2, MMP-2 抗体工作浓度为  $1:100$ , HE 染色和免疫组化操作严格按照试剂盒说明书进行。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 11.0 统计软件处理数据, 计量资料比较采用单因素方差分析, 以 *t* 检验进行组间统计比较, 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 HUVECs 增殖的抑制作用及核形态学变化的影响** 不同浓度的姜黄素处理 HUVECs 细胞后, 与空白组对比,  $4 \sim 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时内皮细胞生长未受到抑制, 但  $8 \sim 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时能剂量依赖性抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 增殖,  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时差异具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。Hoechst 33258 染色后可见, 空白组与姜黄素处理组 ( $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 细胞核大小一致, 姜黄素组未见细胞出现凋亡, 也未出现凋亡细胞核固缩, 细胞核碎裂成块状、着色深而呈亮蓝色, 未生成凋亡小体。见图 1。

**3.2 对 HUVECs 迁移能力的影响** 随着姜黄素浓度的提高, HUVECs 迁移能力呈递减趋势。显微镜观察 HUVECs 细胞迁移情况, VEGF ( $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 单独刺激剂组细胞迁移数目较多, 姜黄素各浓度组处

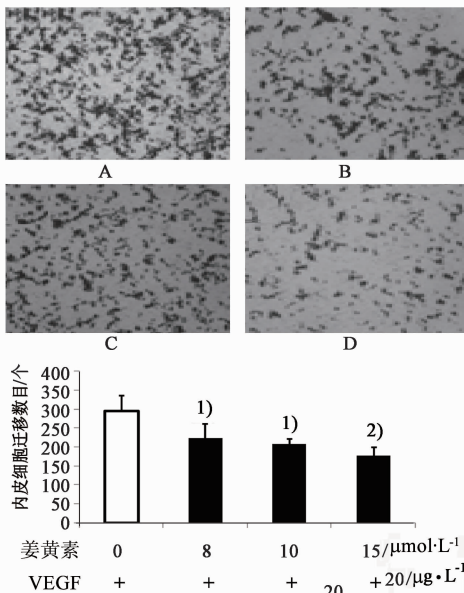


与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$  (图 2~6 同); A. 空白组; B.  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素组

图 1 姜黄素对 HUVECs 增殖和核形态学的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effects of curcumin on HUVECs proliferation and nuclear morphology ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

理 6 h 后, 细胞迁移数目与空白组比较呈降低趋势; 计数细胞迁移的数目发现, 与 VEGF 单独刺激剂组比较,  $8, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素可以抑制 HUVECs 细胞迁移 ( $P < 0.05$ );  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素可以显著抑制 HUVECs 细胞迁移 ( $P < 0.01$ )。见图 2。



A. 空白组; B.  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素组; C.  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素组; D.  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜黄素组 (图 3 同)

图 2 姜黄素对 VEGF 诱导的 HUVECs 迁移的影响 ( $\times 100, \bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 Effects of curcumin on VEGF-induced migration of HUVECs ( $\times 100, \bar{x} \pm s, n = 5$ )

3.3 对 CAM 血管生成的影响 姜黄素 ( $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 VEGF 诱导的血管生成有抑制反应 ( $P < 0.05$ ), 姜黄素 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组观察到部分 CAM 血管明显变细, 小血管生长速度减慢;  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 CAM 血管无树枝状走行, 无明显“血管辐辏现象”, 血管密度明显低于空白组 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

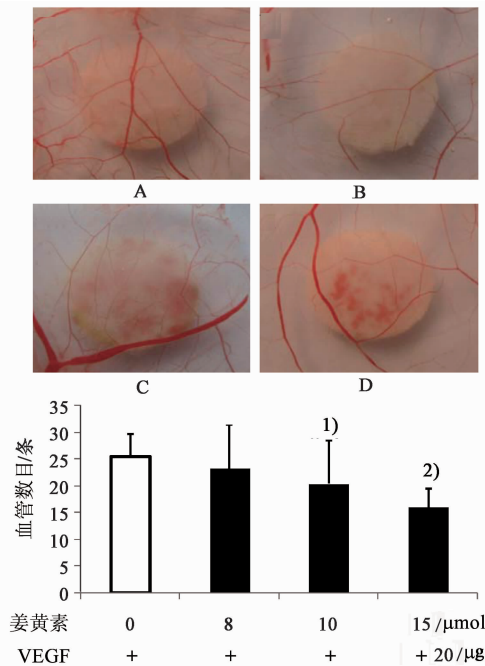


图 3 姜黄素对血管生成的影响 ( $\times 200, \bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effects of curcumin on angiogenesis ( $\times 200, \bar{x} \pm s, n = 6$ )

**3.4 对 endothelial 细胞 VEGFR2 和 MMP-2 表达的影响** 与 VEGF ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 诱导组比较, 给予姜黄素后, VEGFR2, MMP-2 的表达量明显下降, 随着姜黄素作用浓度的增高, VEGFR2, MMP-2 蛋白的表达逐渐减低, 当姜黄素浓度达到  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 能够显著抑制 VEGFR2, MMP-2 蛋白的表达。见图 4。

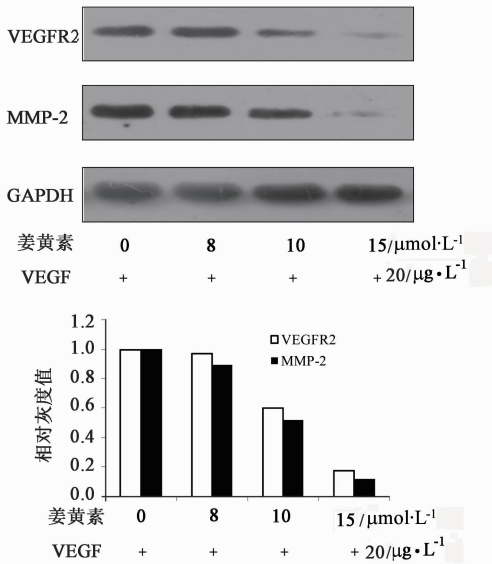


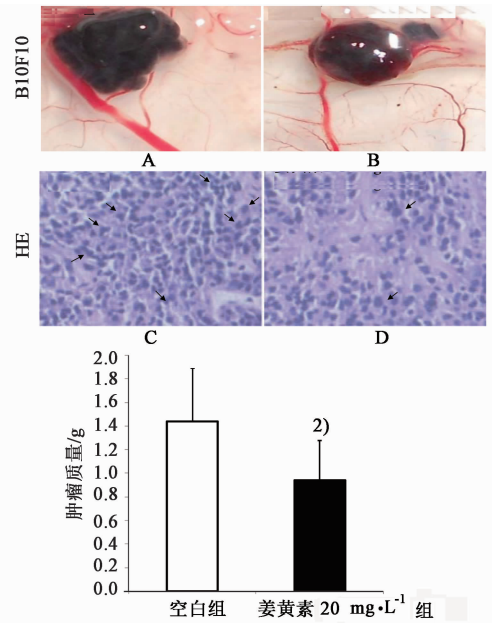
图 4 姜黄素对 VEGFR2 和 MMP-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 4 Effects of curcumin on expression of VEGFR2 and MMP-2 protein ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.5 对 CAM 移植瘤生长的影响** 在 CAM 接种 B16F10 细胞孵育 6 d 后, 筛选出成瘤 CAM 分组, 并每天瘤内注射给予生理盐水或姜黄素 ( $20 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 连续给药 6 d, 空白组瘤质量平均达 1.44 g, 姜黄素给药后瘤重只有 0.94 g, 能抑制黑色素瘤 B16F10 生长。光学显微镜下观察可见空白组 B16F10 细胞数目明显多于姜黄素给药组。见图 5。

**3.6 对 CAM 瘤组织内 VEGFR2 和 MMP2 蛋白表达的影响** 从免疫组化实验图片可见空白组 VEGF 和 MMP2 蛋白表达呈弥散性分布, 颜色较深, 成深棕褐色。姜黄素给药 ( $20 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 后 VEGFR2 和 MMP2 表达明显低于空白组, 颜色稍浅; 同时 Western blot 实验结果显示姜黄素能明显降低瘤组织内 VEGFR2 和 MMP-2 蛋白表达量。见图 6。

#### 4 讨论

肿瘤是导致人类死亡较高的重大疾病, 寻找安全有效的抗肿瘤药物是肿瘤治疗研究工作者的重点课题。目前临床一线抗肿瘤药物多位化疗药或抗体靶向制剂, 其副作用是引发患者用药中断甚至死亡的不可忽视的问题。肿瘤新生血管生成是肿瘤生



A. 空白组; B. 姜黄素  $20 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组; C. 空白组; D. 姜黄素  $20 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组 (图 6 同)  
图 5 姜黄素对 CAM 移植瘤生长的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Fig. 5 Effects of curcumin on transplantation tumor growth of CAM ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

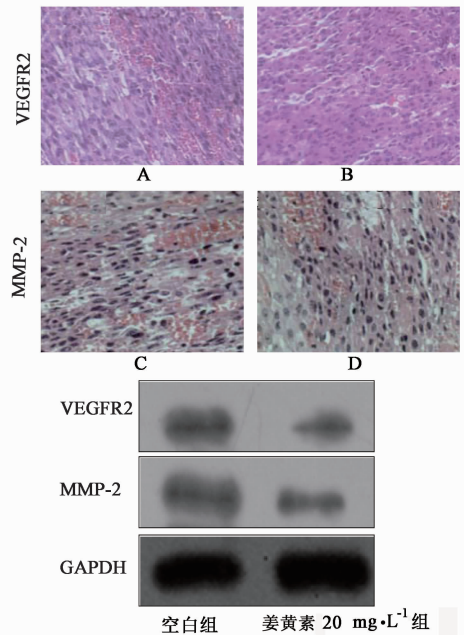


图 6 姜黄素对瘤组织 VEGFR2 和 MMP-2 蛋白表达的影响  
Fig. 6 Effects of curcumin on tumor tissue expression of VEGFR2 and MMP-2 Protein

长、浸润和转移过程中不可缺少的生物过程, 抑制肿瘤血管的新生会切断肿瘤生长和转移所依赖的命脉, 抗血管生成已成为当前抗肿瘤治疗的重要策略。

近年来对血管生成的研究已取得重大进展, 发现了一系列血管生成关键性调控因子。血管新生在

体内受到一系列因子调节,其中以血管内皮生长因子 VEGF 最为重要,它是肿瘤扩增和维持血管功能的关键因子,一方面它能诱导内皮细胞增殖、迁徙甚至改变其基因表达<sup>[11]</sup>;另一方面它能增加血管的通透性,使血浆蛋白渗出血管外,改变局部的细胞外基质以适应血管生成。肿瘤组织中 VEGF 的表达水平及血清中 VEGF 的含量与肿瘤微血管密度,恶性程度和转移情况呈高度正相关,而与患者的预后则呈显著负相关。VEGF 不同的生物学功能必须由不同的受体介导,目前已经发现有 4 种 VEGF 受体,其中最重要的 VEGFR2 存在于血管和淋巴管内皮等处,与 VEGF-C、VEGF-D 结合,调节血管内皮细胞增殖迁移,以及肿瘤细胞生长,促进血管的生成。VEGF 作用于 VEGFR,启动 VEGFR 信号通路,触发了 MMP-2 信号,从而促进血管内皮细胞迁移<sup>[12]</sup>。

中医药在抗肿瘤血管生成治疗中具有良好的应用前景,目前中药对肿瘤血管生成作用的研究还主要限于证明其具有抑制血管生成作用及抑制血管生成机制的初步研究,尚需更深入的研究。近年国内外对姜黄素抗癌作用的研究较多,但多数集中于其有细胞毒作用,认为姜黄素可诱发肿瘤细胞的凋亡、阻断肿瘤细胞生长信号通路等<sup>[13]</sup>,尚少见姜黄素抗肿瘤血管生成作用的有关报道。本实验以 HUVECs 为模型,探讨姜黄素对血管生成的作用及抑制肿瘤生长的可能机制。通过观察不同浓度的姜黄素处理 HUVECs 24 h 后的细胞生长状态,MTT 实验表明,姜黄素(8~15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )能够明显抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 生长,而且随着浓度的增高抑制率明显增高,呈显著的浓度依赖关系,但姜黄素抑制 HUVECs 生长的作用不依赖于诱导内皮细胞凋亡。姜黄素(8,10,15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )能抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 迁移数目,减少血管数目,抑制体内血管生成,并且抑制 HUVECs 细胞 VEGFR-2, B1610 细胞 MMP-2 蛋白表达。同时,在 CAM 移植瘤模型中,姜黄素(15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )能抑制黑色素瘤 B16F10 体内生长,下调瘤组织中 VEGFR-2 和 MMP-2 蛋白表达。

综上所述,姜黄素能抑制体内血管生成,抑制黑色素瘤 B16F10 生长,其机制为阻断 VEGF 诱导的 HUVECs 细胞增殖、迁移,降低 VEGFR2 和 MMP-2 蛋白表达。

[参考文献]

[1] Ramse Wak R S, DeWitt D L, Nair M G, et al.

Cytotoxicity antioxi-dant and anti-inflammatory activities of curcumins I-II from curcuma longa [J]. *Phytomedicine*, 2000, 7 (4):303-306.

[2] 唐春兰,杨和平,李剑明,等. 姜黄素抑制 A549 裸小鼠移植瘤生长及其血管生成的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26 (21):1950-1954.

[3] 许刚,黄文,张亚历. 姜黄素防治肿瘤的机制研究进展[J]. 国外医学:生理、病理科学与临床分册, 2003, 23 (2):152-155.

[4] Sadick, Naim R, Gossler U, et al. Angiogenesis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: VEGF165 plasma concentration incorre-lation to the VEGF expression and microvessel density [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 15 (1):15-18.

[5] Emoto M, Ishiguro M, Iwasaki, et al. Effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on the growth, blood flow, and microvessel density in xenografts of human uterine carcinosarcoma in nude mice [J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 89 (1):88-92.

[6] 田凡清,胡菁. 姜黄素对白血病耐药细胞 HL-60/ADR 的抑制及抗肿瘤作用的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15 (17):2588-2592.

[7] Franco C, Ho B, Mulholland D, et al. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices [J]. *Am J Pathol*, 2006, 16 (8):169-172.

[8] 贺龙刚,周丽,黄枚,等. 丹参注射液含药血浆及血清对 CAM 血管生成的影响[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18 (1):28-32.

[9] 唐春兰,杨和平,李剑明,等. 姜黄素对 A549 裸鼠移植瘤 VEGF 蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27 (9):831-834.

[10] 刘飞德,陈凛,李丽,等. 人胃癌鸡胚移植模型的建立及其肿瘤生物学研究[J]. 消化外科, 2004, 3 (2):114-116.

[11] McColl B K, Stacker S A, Achen M G. Molecular regulation of the VEGF family inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *APMIS*, 2004, 112 (7/8):463-466.

[12] Bachelder R E, Crago A, Chung J, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (12):5736-5739.

[13] 田德增,朱辉,梁永杰. 姜黄素对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响及其机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 15 (1):8-12.

[责任编辑 周冰冰]