基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001373

姜黄素通过下调 VEGF 的表达抑制髓母细胞瘤 Daoy细胞增殖的作用研究

高敏娜[1]，张　雄[2]，康清梅[1]，梁　洁[1]，李　昱[1]

（1. 重庆医科大学基础医学院病理教研室，重庆　400016；2. 重庆医科大学神经科学研究中心，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：血管的新生与髓母细胞瘤的生长、侵袭和转移密切相关，本实验旨在观察姜黄素对髓母细胞瘤 Daoy 细胞的生长及其血管生长因子的影响，并探讨可能的机制。**方法**：体外培养髓母细胞瘤 Daoy 细胞，然后经不同浓度（5、10、20、40 μmol/L）的姜黄素作用不同时间（24、48、72 h）后，通过 MTT 法检测姜黄素对 Daoy 细胞生长增殖的影响；ELISA 法检测上清液中血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）的生成水平，Western blot 检测 Daoy 细胞中 Wnt/β-catenin 通路中重要分子 β-catenin 以及 VEGF 蛋白水平的表达。**结果**：MTT 结果示空白对照组、DMSO 组、5 μmol/L 组、10 μmol/L 组、20 μmol/L 组和 40 μmol/L 组作用 24 h 后，细胞的抑制率分别为（4.2 ± 0.3）%、（4.3 ± 0.5）%、（6.1 ± 0.3）%、（6.9 ± 0.7）%、（30.5 ± 1.7）%和（40.9 ± 2.4）%，差异具有统计学意义（$F_{浓度}$=151.997，P=0.000）；当 20、40 μmol/L 的姜黄素作用 48 h 和 72 h 后，Daoy 细胞的增殖抑制率分别为（41.3 ± 2.0）%、（51.2 ± 2.9）%、（48.4 ± 1.6）%和（60.9 ± 3.2）%，相较于作用 24 h，差异也具有统计学意义（$F_{时间}$=281.531，P=0.000；$F_{浓度×时间}$=269.728，P=0.000）。ELISA 结果显示：空白对照组、DMSO 对照组、5 μmol/L 组、10 μmol/L 组、20 μmol/L 组、40 μmol/L 组细胞上清液中 VEGF 的含量分别为（237.5 ± 2.5）、（248.4 ± 3.0）、（235.6 ± 7.1）、（230.8 ± 3.8）、（198.2 ± 9.9）、（150.5 ± 3.6）pg/mL，差异具有统计学意义（$F_{浓度}$=30.921，P=0.000）。当 20 μmol/L 和 40 μmol/L 的姜黄素作用 48 h 和 72 h 后，Daoy 细胞上清液中生成的 VEGF 含量分别为（170.3 ± 2.7）、（124.6 ± 3.1）、（140.1 ± 13.9）和（111.5 ± 11.6）pg/mL，与作用 24 h 比较，差异也具有统计学意义（$F_{时间}$=69.234，P=0.000；$F_{浓度×时间}$=185.173，P=0.000）。Western blot 结果显示，空白对照组、DMSO 组、5 μmol/L 组、10 μmol/L 组、20 μmol/L 组和 40 μmol/L 组 Daoy 细胞内 β-catenin 蛋白水平表达相对吸光度（absorbance，A）值分别为（0.654 ± 0.021）、（0.873 ± 0.034）、（0.869 ± 0.018）、（0.857 ± 0.024）、（0.472 ± 0.035）和（0.351 ± 0.019）（$F_{浓度×时间}$=27.813，P=0.000）；VEGF 蛋白水平的相对 A 值为（0.781 ± 0.027）、（0.801 ± 0.025）、（0.792 ± 0.034）、（0.750 ± 0.024）、（0.324 ± 0.015）和（0.201 ± 0.012）（$F_{浓度}$=74.826，P=0.000）。结果还显示，当姜黄素浓度为 20 μmol/L 时，随着药物作用时间的延长，Daoy 细胞内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达的相对 A 值明显降低，差异具有统计学意义，呈时间依赖性（F=19.156，P=0.001；F=100.282，P=0.000）。**结论**：姜黄素可通过下调 Wnt/β-catenin 通路及下游靶基因 VEGF 的表达进而抑制 Daoy 细胞增殖，这或将为姜黄素治疗髓母细胞瘤提供新的理论依据

【关键词】姜黄素；髓母细胞瘤；Wnt/β-catenin；血管内皮生长因子

【中图分类号】R365　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-12-12

Effects of curcumin on the proliferation of medulloblastoma Daoy cells through down-regulating the expression of VEGF

Gao Minna[1]，*Zhang Xiong*[2]，*Kang Qingmei*[1]，*Liang Jie*[1]，*Li Yu*[1]

（*1. Teaching and Research Section of Pathology，College of Basic Medicine，Chongqing Medical Universtiy；2. Institute of Neuroscience，Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To observe the effects of curcumin on the growth and vascular growth factors in Daoy cells，and to explore the potential mechanisms. ***Methods***：Human medulloblastoma Daoy cells were cultured *in vitro*，and treated with different concentrations of curcumin（5，10，20 and 40 μmol/L）for different times（24，48，72 h）. MTT assay was used for detecting the effects of curcumin on the proliferation of Daoy cells. ELISA was applied to detect the changes of VEGF levels in the supernatant，and Western blot was used for determining the expression of β-catenin of Wnt/β-catenin pathway and vascular endothelial growth factor（VEGF）at protein levels. ***Results***：MTT results

作者介绍：高敏娜，Email：gaominna_130@126.com，研究方向：髓母细胞瘤的发病机制研究。

通信作者：李　昱，Email：liyu100@163.com。

基金项目：重庆市卫生局医学科研计划资助项目（编号：2012-2-164）；重庆医科大学附属永川医院 2012 年度院内资助科研课题资助项目（编号：YJQN20120020）；重庆医科大学基础医学院 2013 年中青年师资培养计划资助项目。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170630.1043.036.html（2017-06-30）

showed that curcumin significantly inhibited the proliferation of Daoy cells, and they were in a concentration- and time-dependent manner. ELISA results demonstrated that curcumin could decrease the generation of VEGF and Western blot indicated that curcumin not only reduced the expression of VEGF, but also reduced the expression of β-catenin, they were also in a concentration- and time-dependent manner. ***Conclusion***: Curcumin could inhibit the proliferation of mdulloblastoma Daoy cell, the mechanisms may be related to the inhibitory action of curcumin on Wnt/β-catenin pathway and its downstream VEGF, which will provide a novel theoretical basis for curcumin treating with medulloblastoma.

【Key words】*curcumin; medulloblastom; Wnt/β-catenin; vascular endothelial growth factor*

髓母细胞瘤（medulloblastoma, MB）是小儿脑部最常见的恶性肿瘤之一，具有极强的浸润性、转移性，治愈率低、预后差等特点。尽管，随着神经外科手术技巧及放化疗技术的不断进步，MB 的致残率和死亡率都有明显下降，但仍有很大一部分患者死于肿瘤的复发和转移，因此，寻找新的治疗手段成为研究的热点。

目前，血管生成抑制剂的研究逐渐成为肿瘤研究的热点和肿瘤治疗的新策略，它与传统化疗、放疗的联合使用，将成为肿瘤综合治疗的一个重要组成部分。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factors, VEGF）是一种广泛存在的内皮细胞特异性因子，也是目前已知的体内最强的一种血管生长因子。在肿瘤的生长过程中，VEGF 及其受体产生异常增多，导致结构和功能异常的新生血管形成的加快，参与肿瘤的生长、浸润、转移和复发等过程密切相关[1-2]。

β-链蛋白（β-catenin）广泛存在于各类细胞中，如内皮细胞、成纤维细胞、成骨细胞等，主要位于细胞膜上，在细胞质中有少量存在。作为一种多功能蛋白质，参与细胞的增殖、分化和凋亡等过程。研究发现 β-catenin 和 VEGF 家族成员关系密切，它可明显上调 VEGFR-2 的表达，促进人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein epithelial cells, HUVEC）管状和网状结构的形成，从而促进血管生成[3]。本课题组前期研究结果也证实了在 MB 中高表达 β-catenin 和 VEGF 家族多种成员，且它们呈正相关[4]。因此，寻找以 VEGF 为靶点，且无明显毒副作用的治疗药物将对 MB 的临床治疗提供新的方法，并具有现实意义。

姜黄素（curcumin）是姜科草本植物姜黄根茎的主要成分。大量研究已经证实了姜黄素对多种上皮来源的恶性肿瘤，如乳腺癌[5]、肺癌[6]、结肠癌[7]等，均有强烈的杀伤作用。研究发现，姜黄素对多种上皮来源的恶性肿瘤具有抑制 VEGF 的表达进而抗肿瘤血管生成的功能[8-9]，但对 MB 是否也有抗血管生成的作用及其机制的研究却未见报道。因此，本实验以人 MB 细胞 Daoy 为研究对象，观察姜黄素对 Daoy 细胞增殖的影响，并检测姜黄素对细胞 VEGF 生成水平的影响，并探讨其可能的机制，为阐明姜黄素抗 MB 提供更加充分的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人髓母细胞瘤 Daoy 细胞由第三军医大学卞修武教授惠赠。MEM 培养基、胎牛血清、0.1%胰蛋白酶消化液、青霉素/链霉素均购置美国 Hyclone 公司；二甲基亚砜（DMSO）、姜黄素购置美国 Sigma 公司；MTT、蛋白提取试剂盒、浓度检测试剂盒、SDS-PAGE 胶配置试剂盒等均购自碧云天生物技术研究所；兔抗人多克隆抗体 β-catenin、VEGF、内参兔抗 β-actin、HP 标记的山羊抗兔二抗和 ELISA 试剂盒购自博鳌森生物技术有限公司；PVDF 膜和 ECL 发光试剂盒购自 Bio-rad 公司。

1.2 姜黄素溶液的配置

称取 10 mg 姜黄素，以 10 mL DMSO 溶解，待完全溶解后过滤并置-20 ℃保存。

1.3 细胞培养

人髓母细胞瘤 Daoy 细胞贴壁生长于含 10%胎牛血清、5%的青霉素/链霉素的 MEM 培养液中，置 37 ℃、5%CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 MTT

将对数生长期的 Daoy 细胞消化离心后，加入 2 mL 培养液充分吹打混匀，按每孔 10^4 个细胞接种于 96 孔板，置 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，待细胞贴壁 24 h 后，加入 5、10、20、40 μmol/L 不同浓度的姜黄素（5 μmol/L 组、10 μmol/L 组、20 μmol/L 组和 40 μmol/L 组），分别作用 24、48、72 h，并设空白对照组和 DMSO 组（DMSO 浓度为 0.1%），每组设 6 个复孔。于不同作用时间点，加入 20 μL 浓度为 5 g/L 的 MTT，培养 4 h；弃培养液，加入 DMSO，150 μL/孔，振荡 10 min，上酶标仪检测 490 nm 处吸光度（absorbance, A）值，并按下式

计算细胞增殖抑制率(%)。试验重复 4 次。

细胞增殖抑制率(%)=(1-试验组 $A_{490\ nm}$/空白对照组 $A_{490\ nm}$)×100%

1.5 ELISA 检测

将 Daoy 细胞按照 105 个/孔接种于 24 孔板，待完全贴壁后换用含不同浓度姜黄素的 MEM 培养液继续作用 24 h，并设空白对照组和 DMSO 组(DMSO 浓度为 0.1%)。收集不同组别的细胞，使用人 VEGF 的 ELISA 试剂盒测定 VEGF 的浓度，操作按照试剂盒说明进行：每孔添加 100 μL 样品和标准品，37 ℃反应 90 min，然后添加 100 μL 生物素标记抗体，37 ℃反应 60 min；0.01 mol/L TBS 洗涤 3 次；每孔添加 100 μL ABC，37 ℃反应 30 min；0.01 mol/L TBS 洗涤 5 次；TMB 37 ℃避光反应 30 min 以内；加入 TMB 终止液，读取 $A_{570\ nm}$ 值。每个实验孔设 3 个复孔，实验重复 3 次。

1.6 Western blot

收集各组 Daoy 细胞，根据细胞计数总量加入 0.5~1.0 mL 蛋白裂解液，充分裂解后于 4 ℃，13 000 r/min 离心 15 min 后，用 Bradford 法测定每组蛋白样品浓度并分装保存。配置 8%~10%的 Page 胶，上样 50 μg 后电泳，电转至 PVDF 膜上，用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，然后与 1:200 的兔抗人的 β-catenin、VEGF 和 β-actin 抗体 4 ℃孵育过夜；充分洗涤后加入 1:5 000 的 HP 标记的羊抗兔二抗，室温孵育 2 h，最后用ECL 发光试剂盒行曝光显影，经 Bio-rad Chemical Dox XRS 凝胶成像系统进行条带的分析。各目的蛋白与 β-actin 条带的灰度值的比值为各蛋白的相对表达量。重复试验 3次。

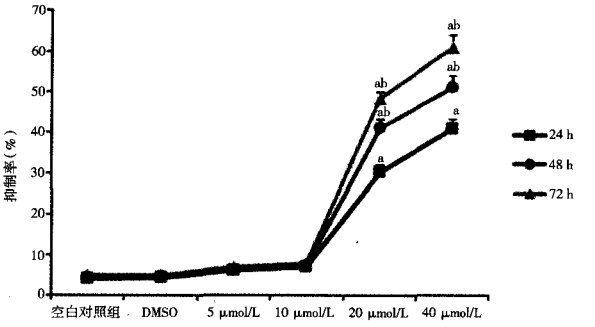
1.7 统计学分析

应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析，所有实验计量资料均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间数据比较采用单因素方差分析；含时间因素的多组比较采用重复测量方差分析，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 姜黄素抑制人髓母细胞瘤细胞 Daoy 的增殖

MTT 结果显示，空白对照组、DMSO 组、5 μmol/L 组、10 μmol/L 组、20 μmol/L 组和 40 μmol/L 组作用 24 h 后，细胞的抑制率分别为(4.2±0.3)%、(4.3±0.5)%、(6.1±0.3)%、(6.9±0.7)%、(30.5±1.7)%和(40.9±2.4)%，随着姜黄素浓度的增加，对 Daoy 细胞的增殖有明显的抑制作用，呈浓度依赖性($F_{浓度}$=151.997，$P_{浓度}$=0.000)。另当 20、40 μmol/L 的姜黄素作用48 h 和 72 h 后，Daoy 细胞的增殖抑制率分别为(41.3±2.0)%、(51.2±2.9)%、(48.4±1.6)%和(60.9±3.2)%，相较于作用 24 h，差异也具有统计学意义($F_{时间}$=281.531，$P_{时间}$=0.000)，呈时间依赖性(图 1，表 1)，也就是说不同浓度的姜黄素作用不同时间后对 Daoy 细胞的增殖都有明显的抑制作用，呈浓度-时间依赖性($F_{交互}$=269.728，$P_{交互}$=0.000)。



a:与空白对照组比较，P<0.01；b:与作用 24 h 比较，P<0.01

图 1 不同浓度的姜黄素作用 Daoy 细胞不同时间后对细胞增殖抑制率的影响

Fig.1 Effects of inhibitory rates on Daoy cells after treatment with curcumin at different concentrations for different time points

表 1 不同浓度的姜黄素作用 Daoy 细胞不同时间后对细胞增殖抑制率(%)

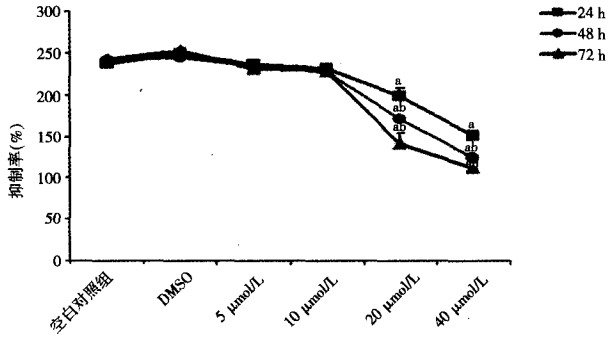
Tab.1 Effects of inhibitory rates on Daoy cells after treatment with curcumin at different concentrations for different time points (%)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	4.2±0.3	4.3±0.2	4.9±0.5
DMSO组	4.3±0.5	4.6±0.9	5.0±0.3
5 μmol/L	6.1±0.3	6.3±0.5	6.9±0.4
10 μmol/L	6.9±0.7	7.2±0.9	7.8±0.4
20 μmol/L	30.5±1.7[a]	41.3±2.0[ab]	48.4±1.6[ab]
40 μmol/L	40.9±2.4[a]	51.2±2.9[ab]	60.9±3.2[ab]
F值	151.997(浓度)	281.531(时间)	269.728(交互)
P值	0.000(浓度)	0.000(时间)	0.000(交互)

注：a,与空白对照组比较，P<0.01；b:与作用 24 h 比较，P<0.01

2.2 姜黄素抑制人髓母细胞瘤细胞 Daoy 上清液中 VEGF 的含量

如图 2 所示：空白对照组、DMSO 对照组、5 μmol/L 组、10 μmol/L 组、20 μmol/L 组、40 μmol/L 组细胞上清液中 VEGF 的含量分别为(237.5±2.5)、(248.4±3.0)、(235.6±7.1)、(230.8±3.8)、(198.2±9.9)、(150.5±3.6) pg/mL，随着姜黄素浓度的增加，对 Daoy 细胞上清液中 VEGF 的含量有显著的抑制作用，呈浓度-依赖性($F_{浓度}$=30.921，$P_{浓度}$=0.000)。当姜黄素浓度变为 20 μmol/L 和 40 μmol/L 作用 48 h 和 72 h 后，Daoy 细胞上清液中生成的 VEGF 含量分别为(170.3±2.7)、(124.6±3.1)、(140.1±13.9)、(111.5±11.6) pg/mL，与作用24 h 比较，差异也具有统计学意义($F_{时间}$=69.234，$P_{时间}$=0.000)，呈时间依赖性。也就是说，姜黄素对 Daoy 细胞上清液中 VEGF 的含量的抑制作用呈浓度-时间依赖性($F_{交互}$=185.173，$P_{交互}$=0.000)，见表 2。



a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与作用 24 h 比较，$P<0.01$

图 2　不同浓度的姜黄素作用 Daoy 细胞不同时间后对细胞内 VEGF产生的影响

Fig.2　Effects of curcumin on the generation of VEGF in Dao cells at different concentrations for different time points

表 2　不同浓度的姜黄素作用 Daoy 细胞不同时间后对 VEGF 生产的影响（pg/mL）

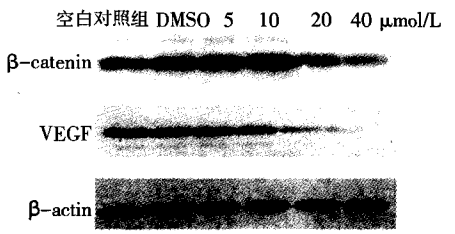
Tab.2　Effects of curcumin on the generation of VEGF in Daoy cells at different concentrations for different time points（pg/mL）

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	237.5 ± 2.5	240.9 ± 2.3	242.3 ± 2.6
DMSO组	248.4 ± 3.0	244.7 ± 8.9	251.7 ± 3.9
5 μmol/L	235.6 ± 7.1	233.9 ± 5.8	230.4 ± 1.9
10 μmol/L	230.8 ± 3.8	227.4 ± 2.5	228.6 ± 2.8
20 μmol/L	198.2 ± 9.9[a]	170.3 ± 2.7[ab]	140.1 ± 13.9[ab]
40 μmol/L	150.5 ± 3.6[a]	124.6 ± 3.1[ab]	111.5 ± 11.6[ab]
F 值	30.921(浓度)	69.234(时间)	185.173(交互)
P 值	0.000(浓度)	0.000(时间)	0.000(交互)

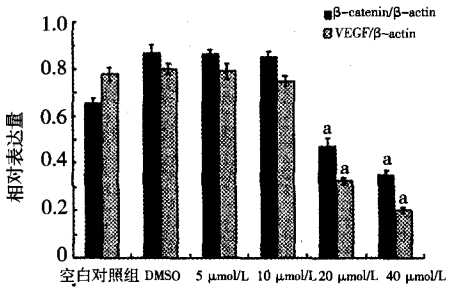
注：a，与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与作用 24 h 比较，$P<0.01$

2.3　姜黄素抑制人髓母细胞瘤 Daoy 细胞中 β-catenin 和 VEGF 蛋白的表达

Western blot 结果显示，空白对照组、DMSO 组、5 μmol/L 组、10 μmol/L 组、20 μmol/L 组和 40 μmol/L 组 Daoy 细胞内 β-catenin 蛋白水平表达相对 A 值分别为 0.654 ± 0.021、0.873 ± 0.034、0.869 ± 0.018、0.857 ± 0.024、0.472 ± 0.035 和 0.351 ± 0.019，差异具有统计学意义（$F_{浓度}=27.813$，$P_{浓度}=0.000$）；VEGF 蛋白水平的相对 A 值为 0.781 ± 0.027、0.801 ± 0.025、0.792 ± 0.034、0.750 ± 0.024、0.324 ± 0.015 和 0.201 ± 0.012，差异也具有统计学意义（$F_{浓度}=74.826$，$P_{浓度}=0.000$）（图 3，表3），呈浓度依赖性。结果还显示，当姜黄素浓度为 20 μmol/L 时，随着药物作用时间的延长，Daoy 细胞内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达的相对 A 值明显降低，差异具有统计学意义，呈时间依赖性（$F_{时间}=19.156$，$P_{时间}=0.001$；$F_{时间}=100.282$，$P_{时间}=0.000$）（图 4，表 4）。



A. 不同浓度姜黄素作用 24 h 后对细胞内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达水平的影响

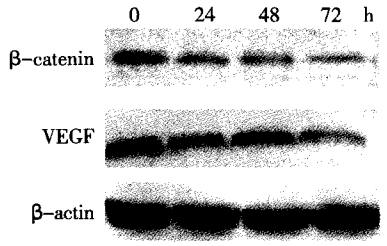


a：与空白对照组或 DMSO 组比较，$P<0.01$

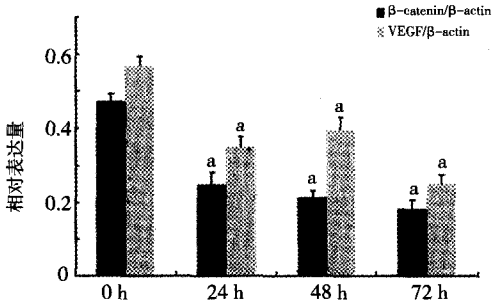
B. 不同浓度姜黄素作用 24 h 后对细胞内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达水平的比较

图 3　不同浓度姜黄素对 Daoy 细胞内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达水平的影响

Fig.3　Effects of different concentration of curcumin on the expression of β-catenin and VEGF at protein levels in Daoy cells



A. 20 μmol/L 的姜黄素作用不同时间后对 Daoy 细胞内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达水平的影响



a：与作用 0 h 比较，$P<0.05$

B. 20 μmol/L 的姜黄素作用不同时间后对 Daoy 细胞内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达水平影响的比较

图 4　姜黄素作用不同时间后对 Daoy 细胞内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达水平的影响

Fig.4　Effects of curcumin on the expression of β-catenin and VEGF at protein levels in Daoy cells at different time points

表 3 不同浓度的姜黄素作用 24 h 后对 Daoy 内 β-catenin 和 VEGF蛋白表达的影响

Tab.3 Effects of curcumin on the expression of β-catenin and VEGF in Daoy cells at different concentrations for 24 h

组别	β-catenin	VEGF
空白对照组	0.654 ± 0.021	0.781 ± 0.027
DMSO组	0.873 ± 0.034	0.801 ± 0.025
5 μmol/L	0.869 ± 0.018	0.792 ± 0.034
10 μmol/L	0.857 ± 0.024	0.750 ± 0.024
20 μmol/L	0.472 ± 0.035[a]	0.324 ± 0.015[a]
40 μmol/L	0.351 ± 0.019[a]	0.201 ± 0.012[a]
F 值	27.813	74.826
P 值	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.01$

表 4 20 μmol/L 的 Curcumin 作用不同时间后对 Daoy 内 β-catenin 和 VEGF 蛋白表达的影响

Tab.4 Effects of 20 μmol/L curcumin at on the expression of β-catenin and VEGF in Daoy cells for different time points

组别	β-catenin	VEGF
0 h	0.471 ± 0.022	0.568 ± 0.027
24 h	0.248 ± 0.034[a]	0.351 ± 0.023[a]
48 h	0.215 ± 0.018[a]	0.385 ± 0.031[a]
72 h	0.184 ± 0.022[a]	0.252 ± 0.015[a]
F 值	19.156	100.282
P 值	0.001	0.000

注：a，与作用 0 h 组比较，$P<0.01$

3 讨 论

众所周知，丰富的血供是恶性肿瘤赖以生存、侵袭、转移的重要条件。新生的毛细血管不仅对原发肿瘤细胞本身的增殖和生长必不可少，而且也是肿瘤侵袭转移的必要条件。多数研究表明，肿瘤血管生成参数可作为判断肿瘤患者预后的较好的指标[10]，因此，血管生成抑制剂的研究成为肿瘤治疗的研究方向和热点。一方面，血管生成抑制剂可提高传统化疗、放疗的疗效；另一方面，传统治疗之后处于肿瘤消退期的患者应用血管生成抑制剂有可能使微小转移处于静息状态，从而控制肿瘤的转移和复发。

肿瘤细胞和宿主的内皮细胞、上皮细胞、间皮细胞及白细胞均可分泌释放多种活性因子，如 VEGF、血小板衍生生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子、表皮生长因子等，诱导肿瘤血管生成。其中，VEGF 是研究最多、最深入的，作用最强、最直接的血管生成因子。因此，寻找以 VEGF 为靶点，且无明显毒副作用的治疗药物将对 MB 的临床治疗提供新的方法，并具有现实意义。

中药的抗肿瘤活性已经被人们越来越多地认识并认可。本文中研究的姜黄素是姜科草本植物姜黄根茎的主要成分，是一类多酚类的植物化合物。大量研究已经明确证明了姜黄素具有抗肿瘤活性，且无毒副作用，是一种比较理想的抗肿瘤药物，甚至在某些肿瘤的治疗上已经进入了Ⅲ、Ⅳ期临床应用[11-12]。体内外研究都已经证实，姜黄素对髓母细胞瘤细胞或瘤体有抑制作用，但其机制不完全清楚，主要包括：①诱导瘤细胞的凋亡[13]；②抑制一些重要信号通路的转导，如 Wnt/β-catenin 通路[14]、Hedgehog 通路[15]、NF-κB 通路[16]等。而 Wolff 等[17]用包括姜黄素在内的多种药物治疗髓母细胞瘤患者，并检测了 VEGF 等多种指标的含量，发现 VEGF 含量降低；但他们并没有单独将姜黄素和 VEGF 作为研究的重点，而姜黄素为什么抑制 VEGF 的机制也未阐述。而本研究 MTT 结果显示，姜黄素对人髓母细胞瘤 Daoy 细胞具有明显的抑制增殖的作用，增殖的抑制率随着姜黄素浓度的增加和作用时间的延长而逐渐升高，具有统计学意义。本课题组前期研究发现，VEGF-A、VEGF-C 及其受体 VEGFR-2 在髓母细胞瘤组织中表达异常，明显高于正常的脑组织[4]。本研究中，ELISA 结果显示：未经姜黄素处理前，上清液中由 Daoy 细胞分泌的 VEGF 含量是较多的；而姜黄素处理后，上清液中 VEGF 的含量和细胞中 VEGF 的蛋白表达水平也随着姜黄素浓度的增加和作用时间的延长而明显降低，这说明姜黄素对髓母细胞瘤中的 VEGF 具有显著的抑制作用，但具体的机制需要探索。

髓母细胞瘤的发病机制不清，但涉及多因素和多通道的障碍，如 SHH 信号通路[18]和 Wnt/beta-catenin 信号通路[19]。Wnt/β-catenin 信号通路参与调控胚胎正常发育和细胞增殖与分化等重要生理过程。其中，β-catenin 处于中心地位，其在细胞内的数量和状态对该通路有决定性影响。现已证实该通路的过度激活与多种人类肿瘤的发生有密切的联系，尤其是上皮来源的恶性肿瘤，如大肠癌[20]、乳腺癌[21]等。研究发现，VEGF 是 β-catenin 信号通路的靶基因，激活 Wnt/β-catenin 通路可明显上调 VEGF[22-23]。

在前期的研究中发现，Wnt/β-catenin 信号通路中的关键分子 GSK-3β、β-catenin 和下游靶基因PPAR-gamma 的在髓母细胞瘤中表达异常[24]；且VEGF-A、VEGF-C 及其受体 VEGFR-2 在髓母细胞瘤中也表达异常，与 β-catenin 呈正相关[4]。在本实验中发现，未经姜黄素处理的 Daoy 细胞内 β-catenin 含量是较多的；而姜黄素作用后，能够抑制 Daoy 细胞内 β-catenin 蛋白水平的表达，呈浓度-时间依赖性。

因此，结合先前研究结果，本实验表明姜黄素可通过阻断 Wnt/β-catenin 信号通路，从而抑制 VEGF 的生成和表达，进而抑制髓母细胞瘤细胞的增殖，但还需要体内实验来进一步证实。

参 考 文 献

[1] Wheler JJ, Janku F, Naing A, et al. TP53 alterations correlate with response to VEGF/VEGFR inhibitor: implications for targeted therapeutics[J]. Mol Cancer Ther, 2016, 15(10): 2475-2485.

[2] Petrovic N. Targeting angiogenesis in cancer treatments: where do we stand?[J]. J Pharm Pharm Sci, 2016, 19(2): 226-238.

[3] Skurk C, Maatz H, Rocnik E. Glycogen-synthase kinase 3 beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis though activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells[J]. Cir Res, 2005, 96(3): 308-318.

[4] Zhang HM, Zhang X, Li Y, et al. Relationship between expression of beta-catenin and VEGFs (VEGF-A, VEGF-C), VEGF receptor-2 (VEGFR-2) in medulloblastoma[J]. Chin J Cancer Res, 2008, 20(1): 44-48.

[5] Guzzarlamudi S, Singh PK, Pawar VK, et al. Synergistic chemotherapeutic activity of curcumin bearing methoxypolythylene glycol-g-linoleic acid based micelles on breast cancer cells[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2016, 16(4): 4180-4190.

[6] Ye H, Wei X, Wang Z, et al. A novel double carbonyl analog of curcumin induces the apoptosis of human lung cancer H460 cells via the activation of the endoplasmic reticulum stress signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 36(3): 1640-1648.

[7] Ruiz de Porras V, Bystrup S, Martínez-Cardús A, et al. Curcumin mediates oxaliplatin-acquired resistance reversion in colorectal cancer cell lines though modulation of CXC-Chemokine/NF-κB signaling pathway[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24675.

[8] Jiao D, Wang J, Lu W, et al. Curcumin inhibited HGF-induced MET and angiogenesis though regulating c-Met dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in lung cancer[J]. Mol Ther Oncolytics, 2016, 3: 16018.

[9] Wang F, He Z, Dai W, et al. The role of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor axis mediated angiogenesis in curcumin-loaded nanostructured lipid carriers induce human HepG2 cells apoptosis[j]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(3): 597-605.

[10] Dai L, Cui X, Zhang X, et al. SARI inhibitor angiogenesis and tumor growth of human colon cancer though directly targeting ceruloplasmin[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11996.

[11] Mahammedi H, Planchat E, Pouget M, et al. The new combination docetaxel, prednisone and curcumin in patients with castration-resistance prostate cancer: a pilot phase II study[J]. Oncology, 2016, 90(2): 69-78.

[12] James MI, Iwuji C, Irving G, et al. Curcumin inhibits cancer stem cell phenotypes in ex vivo models of colorectal liver metastases, and is clinically safe and tolerable in combination with FOLFOX chemotherapy[J]. Cancer Lett, 2015, 364(2): 135-141.

[13] Lee SJ, Langhans SA. Anaphase-promoting complex/cyclosome protein Cdc27 is a target for curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 44.

[14] He M, Li Y, Zhang L, et al. Curcumin suppresses cell proliferation though inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in medulloblastoma[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1): 173-180.

[15] Elamin MH, Shinwari Z, Hendrayani SF, et al. Curcumin inhibits the Sonic Hedgehog signaling pathway and triggers apoptosis in medulloblastoma cells[J]. Mol Cancing, 2010, 49(3): 302-314.

[16] Spiller SE, Logsdon NJ, Deckard LA, et al. Inhibition of nuclear factor kappa-B signaling reduces growth in medulloblastoma in vivo[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 136.

[17] Wolff JE, Brown RE, Buryanek J, et al. Preliminary experience with personalized and targeted therapy for pediatric brain tumors[J]. Pediatr Blood Cancer, 2012, 59(1): 27-33.

[18] Mangum R, Varga E, Boue DR, et al. SHH desmoplastic/nodular medulloblastoma and Gorlin syndrome in the setting of Down syndrome: case report, molecular profiling, and review of the literature[J]. Childs Nerv Syst, 2016, 32(12): 2439-2446.

[19] Bassani B, Bartolini D, Pagani A, et al. Fenretinide (4HPR) targets caspase-9, ERK1/2 and the Wnt3a/beta-catenin pathway in medulloblastoma cells and medulloblastoma cell spheroids[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0154111

[20] Pai P, Rachagani S, Dhawan P, et al. MUC4 is negative regulated though the Wnt/beta-catenin pathway via the Notch effector Hath 1 in colorectal cancer[J]. Genes Cancer, 2016, 7(5-6): 154-168.

[21] Si W, Li Y, Shao H, et al. MiR-34a inhibits breast cancer proliferation and progression by targeting Wnt 1 and Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Am J Med Sci, 2016, 352(2): 191-199.

[22] Wang Y, Sang A, Zhu M, et al. Tissue factor induces VEGF expression via activation on the Wnt/beta-catenin signaling pathway in ARPE-19 cells[J]. Mol Vis, 2016, 22: 886-897.

[23] Kang JI, Yoo ES, Hyun JW, et al. Promotion effect of Apo-9-fucoxanthinone from Sargassum muticum on hair growth via the activation of Wnt/betanin and VEGFR[J]. Biol Pharm Bull, 2016, 39(8): 1273-1283.

[24] Zhang X, Lu S, Li Y, et al. Expression of GSK-3beta, Beta-catenin, and PPAR-gamma in medulloblastoma[J]. Chin J Cancer Res, 2009, 21(3): 235-239.

（责任编辑：冉明会）