

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.08.004

姜黄素下调 HIF-1 α /MMP-9 通路抑制人胃癌裸鼠移植瘤生长

何丽琳¹, 沈永祥², 周中银³, 徐禹⁴, 刘梓良¹

Curcumin Inhibits Human Gastric Cancer Growth in Xenograft Murine Model through Downregulation of HIF-1 α /MMP-9 Pathway

HE Lilin¹, SHEN Yongxiang², ZHOU Zhongyin³, XU Yu⁴, LIU Ziliang¹

1. Department of Oncology, Tianmen No. 1 Renmin Hospital, Tianmen 431700, China, 2. Department of Gastroenterology; 3. Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University; 4. Department of Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University

Corresponding Author: LIU Ziliang, E-mail: lilyher1128@163.com

Abstract: Objective To study the mechanism of curcumin inhibition of transplanted tumor growth in gastric cancer xenograft nude mice. **Methods** BGC-823 cells were treated with curcumin at concentration of 0, 1, 5, 10, 20, 50 mg/L for 24 h or 48 h, cells proliferation ability was detected by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and cells invasion ability was detected by transwell assay. Gastric cancer xenograft nude mice model was established to assess the effect of curcumin inhibition on the xenografts. Additionally, Western blot was used to assess HIF-1 α and MMP-9 protein expression levels in the xenografts. Luciferase assay was used to assess the MMP-9 regulation by HIF-1 α , and HIF-1 α regulation by curcumin. **Results** Curcumin inhibited the proliferation of BGC-823 cells, and the effects were dose dependent *in vivo* and *in vitro*. The cells invasion ability was significantly reduced. HIF-1 α and MMP-9 proteins expression were decreased. Curcumin inhibited HIF-1 α and MMP-9 promoter activities on transcriptional level. **Conclusion** Curcumin inhibited human gastric cancer growth *in vivo* and *in vitro* through targeting HIF-1 α /MMP-9 pathway transcription suppression, thereby inhibiting tumor invasion, as an anti-tumor effect.

Key words: Curcumin; Human gastric cancer xenograft; HIF-1 α

摘要:目的 研究姜黄素对人胃癌细胞株 BGC-823 裸鼠皮下移植瘤的生长抑制作用及其机制。**方法** 以 0、1、5、10、20、50 mg/L 的姜黄素处理 BGC-823 细胞 24 或 48 h, 甲基噻唑盐 (MTT) 法及 Transwell 分析细胞增殖和侵袭能力; 荷瘤裸鼠检测姜黄素对肿瘤生长影响, 同时 Western blot 检测瘤体内 HIF-1 α 、MMP-9 蛋白的表达; 荧光素酶报告基因系统检测姜黄素对 HIF-1 α 及 HIF-1 α 对 MMP-9 启动子区域调控。**结果** 姜黄素处理人胃癌细胞 BGC-823 后, 在体内体外的生长均受到抑制且作用呈量效依赖关系; 细胞侵袭能力明显降低; HIF-1 α 、MMP-9 蛋白的表达降低。姜黄素通过转录水平抑制 HIF-1 α 及 MMP-9 的启动子活性。**结论** 姜黄素在体内外均抑制胃癌的生长, 它可以通过降低 HIF-1 α 活性, 下调 MMP-9 水平, 从而抑制肿瘤侵袭, 发挥抗肿瘤作用。

关键词: 姜黄素; 人胃癌移植瘤; HIF-1 α

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率居消化道肿瘤的首位。姜黄素 (Curcumin) 是从姜科黄属植物姜黄根茎中提取的一种植物多酚。有研究发现姜黄素对肺癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、白血病、黑色素瘤、前列腺癌等肿瘤均有一定的治疗效果^[1], 尤其在抗消化系肿瘤方面有很好

收稿日期: 2012-10-15; 修回日期: 2013-02-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81000537)

作者单位: 1. 431700 湖北天门, 天门市第一人民医院肿瘤科; 2. 消化科; 3. 武汉大学人民医院消化内科; 4. 武汉大学中南医院肿瘤科

通信作者: 刘梓良, E-mail: lilyher1128@163.com

作者简介: 何丽琳 (1977-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤化疗的基础及临床研究

的效果。美国国立癌症研究所已将姜黄列为第三代肿瘤化学治疗预防药^[2]。

肿瘤内微环境缺氧已被列为肿瘤的第七特征^[3]。其中缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1),它是调节氧稳态平衡的转录因子^[4],它的活性亚单位 HIF-1 α 不仅在乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、肝癌、前列腺癌、肺癌及胃癌等多种肿瘤组织中高表达^[5];还可以调控血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)等下游靶基因的转录水平,参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭转移等过程^[6-7]。本实验通过体内外实验,观察姜黄素对胃癌细胞侵袭和生长的影响,为开拓姜黄素作为胃癌辅助用药提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

BALB/c^{nu/nu}裸小鼠,18只,5~6周龄,雄性,体重(20 \pm 2)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(动物合格证号:HNASKJ20121765),饲养于武汉大学 ABSL-III 实验室。人胃癌 BGC-823 细胞株,由武汉大学医学院免疫教研室赠予。pGL3-HIF-1 α -promoter(-541~+1)质粒由 Emmanuel Minet 教授馈赠(Facult s Universitaires de la Paix),pGL3-MMP-9-promoter 质粒由 Douglas D. Boyden 教授馈赠(M. D. Anderson Cancer Center),pCGN-HAM-HIF-1 α 质粒由武汉大学病生教研室馈赠。

RPMI1640 培养液、小牛血清购自 Hyclone 公司。姜黄素、MTT 购自美国 Sigma 公司。HIF-1 α 、MMP-9 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司, β -actin 多抗购自于美国 Santa Cruz 公司。RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。24-well Matrigel-Transwell 小室购自于 Corning 公司。Dual Luciferase 双荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司。脂质体 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司,酶标仪购自奥地利 TECAN 公司,化学发光检测仪 Glomax20/20 购自美国 Promega 公司。

1.2 MTT 法检测细胞增殖水平

将 BGC-823 细胞以 5 \times 10⁴/ml 的浓度接种于 96 孔培养板内,给予不同浓度的姜黄素^[8](1、5、10、20、50 mg/L),每个剂量 6 个平行孔,CO₂箱内培养,药物作用 24、48 h。在各个检测时间前每孔加 5 mg/ml MTT 贮存液 10 μ l,继续于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵

育 4 h,弃上清液,每孔加入二甲基亚砷 100 μ l,用酶标仪在波长 570 nm 处测定每孔吸光度(A)值。计算细胞生长抑制率(inhibition rate, IR),IR = (1 - 实验组 A 值/对照组 A 值) \times 100%。实验重复 3 次。

1.3 Transwell 检测胃癌细胞侵袭能力

将 BGC-823 细胞消化后调整密度至 1 \times 10⁶/ml。将 100 μ l 细胞悬液接种于预先铺有 Matrigel 胶的 Transwell 小室上室,24 h 后加入 10 mg/L 姜黄素于上室。下室加入 500 μ l 含 20% FBS 的 DMEM 培养液,常规培养 24 h。0.1% 结晶紫常温染色 10 min,清水漂净,用棉签拭去上室非侵袭细胞,显微镜下取中间和周边 5 个视野,计算穿透的细胞数。

1.4 Western blot 检测人胃癌移植瘤鼠中瘤组织 HIF-1 α 、MMP-9 蛋白表达水平

取液氮冻存的荷瘤鼠肿瘤组织,用 RIPA 裂解液提取蛋白后,BCA 法蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,转移至 PVDF 膜,用 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。鼠抗人 HIF-1 α 一抗(1:1 000 稀释)、MMP-9 一抗(1:1 000 稀释)和 β -actin 一抗(1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;辣根过氧化物标记的山羊抗鼠二抗(1:4 000 稀释)室温孵育 2 h,ECL 化学发光试剂显色。用 Quantity One 软件(BIO-RAD 公司)分析 HIF-1 α 、MMP-9 和内参 β -actin 的灰度值。

1.5 荧光素酶活性的检测

将 BGC-823 细胞接种于 24 孔板内,培养至融合 70%~80%时,共转染含有 HIF-1 α 启动子的荧光素酶报告基因质粒 pGL3-HIF-1 α -promoter(-541~+1)、内参海肾荧光素酶质粒 pRL-TK(比例为每孔 pGL3-HIF-1 α -promoter:pRL-TK = 200 ng:20 ng)。转染 8 h 后换含 10% FBS 的 DMEM 培养液,同时给予 20 mg/L 的姜黄素作用 16 h 后收获细胞,按照 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)试剂盒说明书,检测转染细胞荧光素酶活性。用 100 μ l 1 \times PLB/孔裂解液裂解细胞后,加 20 μ l 的 LAR II 试剂于 20 μ l 的细胞裂解液中,混匀 10 s 后测报告基因(pGL3 系列质粒)的萤火虫荧光素酶的活性水平。随后加入 20 μ l Stop&Glo 溶液,混匀 10 s 后测内参质粒(pRL-TK)海肾荧光素酶的活性水平。萤火虫荧光素酶的活性与海肾荧光素酶的活性的比值来反映这些重组质粒在胃癌 BGC-823 细胞中的启动活性。在相同条件下重复 3 次实验。

1.6 细胞培养和动物模型的建立

胃癌细胞株 BGC-823 培养于含 10% 标准胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,在 37 °C、5 % CO₂ 的条件下培养,收集对数生长期的细胞并制备成浓度为 1.0 × 10⁷ /ml 的单细胞悬液,将 0.2 ml 单细胞悬液接种于 BALB/c^{nu/nu} 裸鼠右腋下皮下,待 10~14 d 后裸鼠出现直径 >5 mm 的皮下结节,移植瘤模型建立。

1.7 实验动物分组与观测指标

BALB/c^{nu/nu} 裸鼠荷瘤成功后,按随机数字法分为姜黄素治疗组、5-Fu 阳性对照组、荷瘤模型组。每组 6 只,当移植瘤体积约为 100 mm³ 时开始给予治疗。姜黄素治疗组、5-Fu 阳性对照组、荷瘤模型组每 3 日分别给予腹腔注射:姜黄素 12.5 mg/kg^[9]、5-Fu 20 mg/kg^[10]、0.9% 氯化钠溶液 100 μl,连续给药 7 次。实验期间观察小鼠进食、排便、精神状态及活动情况。每次给药前应用游标卡尺(精度为 0.1 mm)测量并记录小鼠皮下瘤结节大小,计算肿瘤体积 $V(\text{mm}^3) = ab^2/2$ (a 为瘤体最长径, b 为最短径),取每组均数,绘制肿瘤生长曲线。于接种后第 21 d,颈椎脱臼法处死裸鼠,剥离皮下瘤,称瘤重。计算肿瘤抑制率,肿瘤抑制率 = (荷瘤模型组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重) / 荷瘤模型组平均瘤重 × 100%。瘤体冻存于液氮中备用。

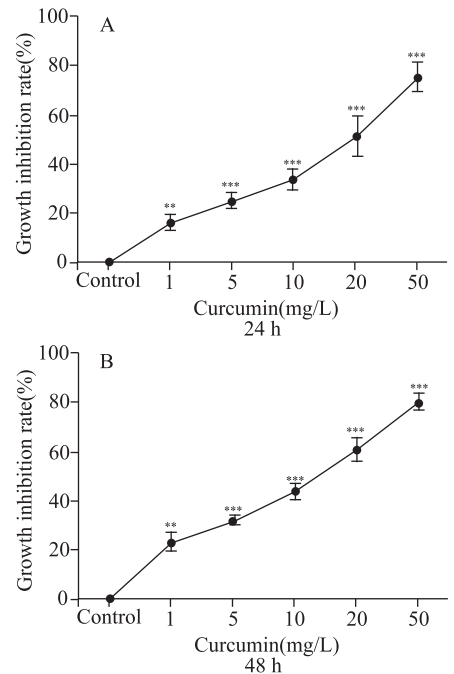
1.8 统计学方法

以上实验至少重复 3 次。采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异使用单因素方差分析 (ANOVA),各实验组与对照组比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测姜黄素对人胃癌 BGC-823 细胞增殖的影响

结果显示,随着姜黄素浓度的递增,570 nm 的吸光度值依次递减,胃癌细胞增殖的抑制率依次增加。当姜黄素的浓度为 10 mg/L 时,对 BGC-823 细胞 24 h 时的增殖抑制率达到 33.51%, 48 h 时达 43.52%,当浓度增加至 20 mg/L 时,24 h 抑制率为 51.19%、48 h 抑制率为 60.19%。当浓度为 50 mg/L 时,24 h 抑制率为 74.91%、48 h 抑制率为 79.58%。不同浓度的姜黄素对细胞增殖能力与对照组比较,差异有统计学意义 (** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$),见图 1A、1B。



** : $P < 0.01$ vs. control; *** : $P < 0.001$ vs. control

图 1 姜黄素抑制人胃癌 BGC-823 细胞增殖

Figure 1 Inhibition of BGC-823 cells proliferation by curcumin treatment

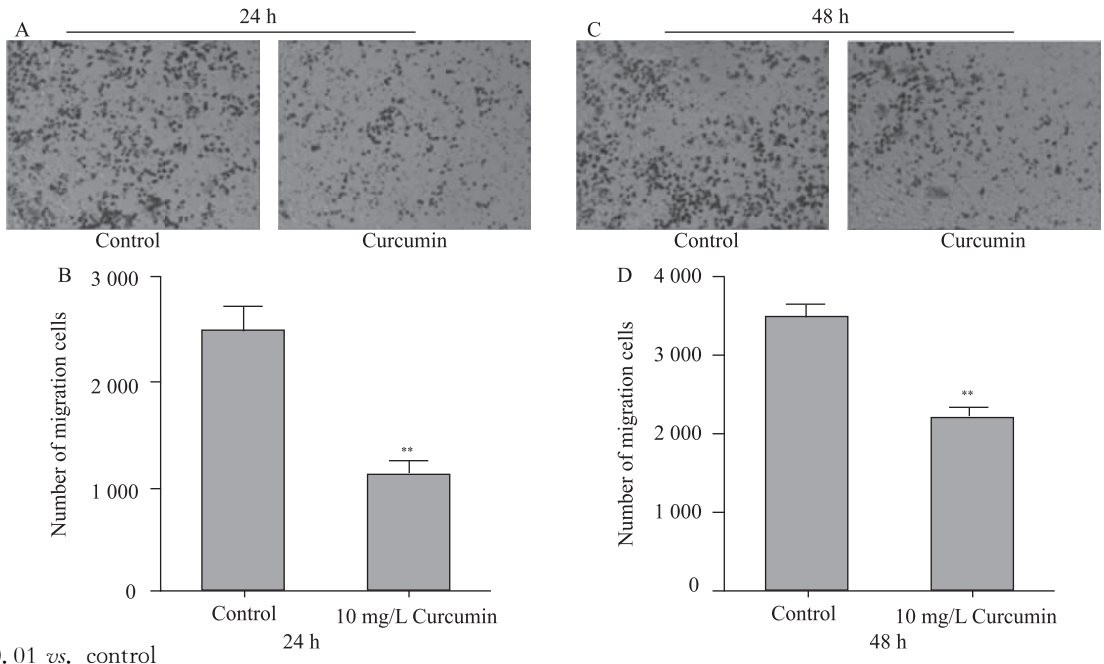
2.2 Transwell 实验检测胃癌 BGC-823 细胞的侵袭能力

结果发现,24 h 时 10 mg/L 姜黄素组细胞穿膜数为 (1 116.33 ± 115.01); 对照组 BGC-823 细胞穿膜数为 (2 471.67 ± 222.62), 见图 2A、2B。48 h 时 10 mg/L 姜黄素组细胞穿膜数为 (2 188.36 ± 123.38); 对照组 BGC-823 细胞穿膜数为 (3 461.30 ± 165.24)。姜黄素组细胞穿膜数均显著低于对照组 ($P < 0.01$), 见图 2C、2D。各组的细胞穿膜数都随着时间的增加而增加,但在相同的时间点上,姜黄素组细胞侵袭数均显著低于对照组 ($P < 0.01$)。

2.3 姜黄素抑制人胃癌移植瘤鼠肿瘤生长的作用

接种肿瘤细胞后每日观察裸鼠植瘤部位:接种 7 d 后可见瘤体局部稍肿胀,随后则逐渐增大。当瘤体体积约为 100 mm³ 时,可以给予药物治疗。随着肿瘤生长,瘤块呈圆形或椭圆形,质硬。荷瘤裸鼠的饮食及活动情况无明显改变。个别瘤体较大时,裸鼠都呈现出消瘦状态。

移植瘤病理改变:移植瘤呈实性、圆形或椭圆形;对照组部分瘤体呈不规则的椭圆形,但与周围组织界限清楚,容易剥离。肿瘤组织呈灰白色鱼肉样、质硬。部分组移植瘤表面或内部均有不同程度的坏死。大体尸检未见有腹水或其他器官的转移,见图 3A、3B。



** : $P < 0.01$ vs. control

图 2 姜黄素抑制胃癌 BGC-823 细胞侵袭能力

Figure 2 Inhibition of invasion ability of BGC-823 cells by curcumin treatment

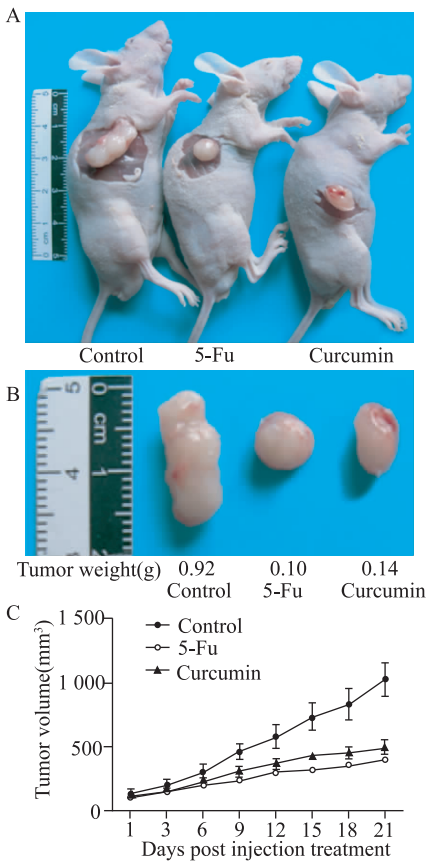


图 3 姜黄素对人胃癌移植瘤鼠肿瘤生长的抑制情况

Figure 3 Inhibition of human gastric cancer xenograft growth by curcumin treatment

当荷瘤裸鼠开始给予治疗时,每 3 d 测量一次瘤体积大小。当治疗至第 15 d 时,姜黄素组、5-Fu 组与对照组相比移植瘤的生长均表现出明显减慢的趋势,

治疗第 15、18、21 d 时姜黄素组瘤体体积大小的平均值分别为 431.02 mm³、451.67 mm³、495.76 mm³,而对对照组瘤体体积大小的平均值在这对应的几天分别为 733.12 mm³、829.47 mm³、1 025.31 mm³;在随后的治疗中这两组的瘤体体积增长速度始终小于对照组,各组与对照相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 见图 3C。治疗至 21 d 时裸鼠状态变差,随即终止实验,此时姜黄素组裸鼠皮下移植瘤重量平均为 0.14 g,5-Fu 组皮下移植瘤重量平均为 0.10 g,对照组平均 0.92 g,各组与对照相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。姜黄素组及 5-Fu 组抑瘤率分别为 84.25%、88.74%,各组与 0.9% 氯化钠溶液组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但姜黄素治疗组和 5-Fu 阳性对照组的抑瘤率相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 姜黄素抑制裸鼠胃癌 BGC-823 细胞皮下移植瘤体重量
Table 1 Inhibitory effect of curcumin on the tumor weight of BGC-823 xenograft mice

Groups		Tumor weight (g)	Tumor inhibition rate (%)
Treatment	Dosages (mg/kg)		
Control	0	0.918 4 ± 0.065 43	—
5-Fu	20	0.103 4 ± 0.017 96**	88.74
Curcumin	12.5	0.144 6 ± 0.024 76*	84.25

Note: 18 BALB/c^{nu/nu} nude mice were randomly divided into 3 groups (6 of each). Values are expressed as $\bar{x} \pm s$. The control group received a subcutaneous injection of vehicle solution (0.9% NaCl). Tumor weight was measured when the tumor-bearing mice were sacrificed. *: $P < 0.05$ vs. control; **: $P < 0.01$ vs. control; —: not detected

2.4 Western blot 检测移植瘤内 HIF-1 α 及 MMP-9 蛋白的表达情况

以 β -actin 为内参照, Western blot 检测结果显示, 与对照组相比, 给予姜黄素治疗后, 移植瘤内 HIF-1 α 、MMP-9 蛋白表达明显被抑制。然而给予 5-Fu 治疗后移植瘤内 HIF-1 α 、MMP-9 蛋白的表达水平也下降。研究显示 12.5 mg/kg 的姜黄素治疗人胃癌荷瘤鼠 21 d 后, 瘤体内 HIF-1 α 及 MMP-9 蛋白显著被抑制, 见图 4。

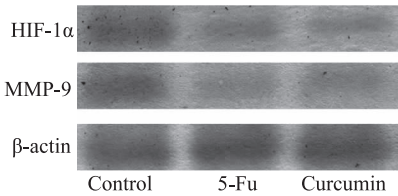
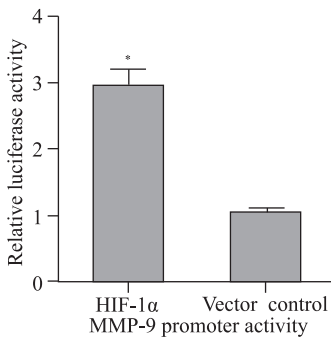


图 4 人胃癌移植瘤鼠中瘤组织内 HIF-1 α 及 MMP-9 蛋白表达水平

Figure 4 Expression of HIF-1 α and MMP-9 proteins in human gastric cancer xenograft tissues

2.5 HIF-1 α 上调 MMP-9 启动子的活性

我们采用荧光素酶报告基因的方法, 在胃癌细胞 BGC-823 中共转染 pCGN-HAM-HIF-1 α 和 pGL3-MMP-9-promoter 质粒, 同时每孔均转染 pRL-TK 作为内参照, 24 h 后收获细胞, 测定荧光素酶活性。结果显示, 与对照组相比, 转染 HIF-1 α 后, MMP-9 的启动子活性较空载对照组相比上调约 3 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5。



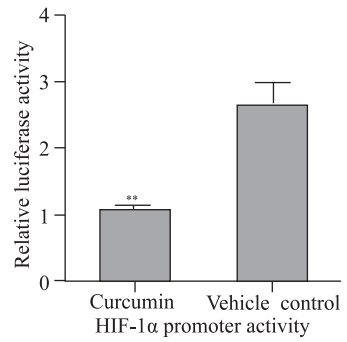
*: $P < 0.05$, HIF-1 α vs. vector control

图 5 转染 HIF-1 α 质粒对 MMP-9 启动子调控的荧光素酶活性分析

Figure 5 Relative luciferase activity of MMP-9 promoter after transfection with pCGN-HAM-HIF-1 α

2.6 姜黄素对 HIF-1 α 启动子活性的调控

结果显示在经姜黄素处理的 BGC-823 细胞的 HIF-1 α 启动子活性明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 6。



** : $P < 0.01$, Curcumin vs. vehicle control

图 6 姜黄素对 HIF-1 α 启动子调控的荧光素酶活性分析

Figure 6 Relative luciferase activity of HIF-1 α promoter after treatment with curcumin

3 讨论

姜黄素的抗肿瘤特性已经得到广泛研究^[11-12]。其抗肿瘤机制可以通过细胞毒作用、诱发肿瘤细胞凋亡、抑制血管生成阻断肿瘤细胞生长信号通路等方面来实现。国内外对姜黄素抗肿瘤的研究大多集中在诱导肿瘤细胞凋亡的机制方面, 但其对细胞侵袭转移的机制研究甚少。本研究通过体内体外实验观察姜黄素对胃癌细胞侵袭及生长的影响, 旨在探索其抗肿瘤机制。

恶性肿瘤的侵袭能力在其恶性转化的早期即可获得, 也有部分肿瘤的侵袭能力随病情进展增强, 肿瘤细胞的黏附和侵袭能力增加了恶性肿瘤的增殖和转移能力^[13]。本实验通过建立人胃癌细胞 BGC-823 荷瘤裸鼠模型, 我们发现 12.5 mg/kg 姜黄素可以在体内抑制肿瘤的生长; 同时, 体外研究也显示 1~50 mg/L 的姜黄素可抑制人胃癌 BGC-823 细胞增殖; 此外, Transwell 结果显示 10 mg/L 姜黄素能明显抑制 BGC-823 细胞的侵袭能力。然而, 体内实验也表明姜黄素可以抑制 BGC-823 细胞裸鼠皮下移植瘤的生长。同时, 我们在荷瘤鼠瘤体内检测到, 姜黄素治疗后, 瘤体内 MMP-9 蛋白表达明显低于对照组。这提示我们, 姜黄素可能通过抑制 MMP-9 蛋白的表达来减弱肿瘤细胞与细胞外基质的黏附能力, 降低肿瘤细胞的侵袭转移潜能。

MMP-9 是基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 家族中主要成员之一, 它在肿瘤细胞突破基底膜屏障及浸润转移中, 主要降解细胞外基质成份中的 IV 型胶原^[14]。也有文献报道 HIF-1 α 在头颈肿瘤、乳腺癌、结肠癌等肿瘤中均具有促进侵袭转移的能力^[15-17]。Choi 等^[7] 最近的研究也表明, 在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, 缺氧环境下

HIF-1 α 与 p300 形成转录符合体反式激活 MMP-9 的启动子。我们通过生物信息学 Genomatrix 软件预测发现,在 MMP-9 基因 5' UTR 上游-3659 ~ -3643 区域存在有 HIF-1 α 的结合位点,因此我们在 BGC-823 细胞中共转染 HIF-1 α 过表达质粒和 MMP-9 启动子质粒,通过荧光素酶报告基因检测 MMP-9 的启动子活性,我们发现 HIF-1 α 可以上调 MMP-9 的启动子活性,这就证明 HIF-1 α 通过转录水平调控 MMP-9 的表达。然而,我们将 HIF-1 α 的启动子质粒转染至 BGC-823 细胞中,同时加入姜黄素,荧光素酶报告基因结果显示,姜黄素可以从转录水平抑制 HIF-1 α 的表达。此外,姜黄素治疗后的荷瘤鼠瘤体内 HIF-1 α 蛋白表达明显降低。因此,我们认为,姜黄素对 MMP-9 的抑制作用可能是通过抑制 HIF-1 α 的转录水平导致蛋白表达减少来实现的。

综上所述,姜黄素能够从体内外抑制胃癌细胞 BGC-823 的侵袭和生长,下调 HIF-1 α 、MMP-9 蛋白的表达是其可能的机制之一。同时我们认为姜黄素对 MMP-9 表达的抑制作用可能是通过下调 HIF-1 α 蛋白表达来实现的。

参考文献:

- [1] Liu YZ, Chen SL, Ma P, *et al.* Ways to find new anticancer drugs from Chinese herbal medicines[J]. *Xian Dai Yao Wu Yu Lin Chuang*, 2012, 27(4): 323-37. [刘延泽, 陈士林, 马培, 等. 中草药中发现新抗癌药物的途径[J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(4): 323-37.]
- [2] Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(2A): 873-8.
- [3] Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis[J]. *Nature*, 2009, 457(7225): 36-7.
- [4] Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(1): 47-53.
- [5] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5830-5.
- [6] Mizukami Y, Li J, Zhang X, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1765-72.
- [7] Choi JY, Jang YS, Min SY, *et al.* Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions[J]. *J Breast Cancer*, 2011, 14(2): 88-95.
- [8] Qin HB, Wei L, Zhang JW, *et al.* Tang Junmin. Study on functions and mechanism of curcumin in inducing gastric carcinoma BGC apoptosis[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2011, 27(11): 1227-30. [覃红斌, 魏蕾, 张京伟, 等. 姜黄素诱导胃癌 BGC 细胞凋亡的作用及机制研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(11): 1227-30.]
- [9] Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, *et al.* Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(1): 226-34.
- [10] Tan XW, Xia H, Xu JH, *et al.* Inhibition of growth of human liver carcinoma xenograft tumor by 6,8-ditrifluoromethyl-7-acetochrysin in nude mice[J]. *Zhongguo Yi Yao Dao Bao*, 2011, 8(32): 5-6, 25, cover 3. [谭翔文, 夏红, 许金华, 等. 6,8-二-三氟甲基-7-乙酰氧基白杨素抑制人肝癌裸鼠移植瘤生长[J]. *中国医药导报*, 2011, 8(32): 5-6, 25, 封 3.]
- [11] Deeb D, Xu YX, Jiang H, *et al.* Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(1): 95-103.
- [12] Wu MH, Deng YP, Huang XW, *et al.* Inhibition of curcumin solid dispersion on H22 cell proliferation and experimental pulmonary metastasis[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2012, 39(9): 1146-8. [吴梅花, 邓艳平, 黄秀旺, 等. 姜黄素固体分散体对小鼠肝癌 H22 细胞增殖与实验性肺转移的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(9): 1146-8.]
- [13] Jee SH, Shen SC, Tseng CR, *et al.* Curcumin induces a p53-dependent apoptosis in human basal cell carcinoma cells[J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 111(4): 656-61.
- [14] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-74.
- [15] Mendez O, Zavadi J, Esencay M, *et al.* Knock down of HIF-1 α in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 133.
- [16] Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, *et al.* Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(5): 1138-43.
- [17] Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(39): 16369-74.

[编辑:周永红;校对:黄园玲]