

## 姜黄素对人宫颈癌细胞 Caski 侵袭转移的影响

徐 昉<sup>1</sup>, 牟晓玲<sup>2</sup>, 赵 敬<sup>3</sup>

(重庆医科大学 1. 附属第一医院急诊科, 重庆 400016;  
2. 附属第一医院妇产科, 重庆 400016; 3. 基础医学院病理生理教研室, 重庆 400016)

**摘要:**【目的】研究姜黄素对人宫颈癌细胞 Caski 侵袭转移的影响并探讨其可能的机制。【方法】以 10, 25, 50  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理 Caski 细胞 24, 48, 72 h 后, MTT 法检测其对 Caski 细胞的生长抑制作用。应用 Transwell 小室进行人工重组基底膜(Matrigel)侵袭和运动实验, 观察姜黄素对 Caski 细胞侵袭和转移的影响。Western blot 检测细胞中 MMP-2、MT1-MMP 和 NF- $\kappa$ B 蛋白水平变化。【结果】应用姜黄素处理后人宫颈癌细胞生长受到抑制且作用呈时效-量效依赖关系; 同时细胞侵袭和迁移能力明显降低; MMP-2, MT1-MMP 和 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达均明显减弱。【结论】姜黄素能够减弱人宫颈癌细胞 Caski 的侵袭和转移, 其机制可能与降低 MMP-2, MT1-MMP 和 NF- $\kappa$ B 的表达有关。

**关键词:** 宫颈癌; 姜黄素; 侵袭; 转移

中图分类号: R730.23 文献代码: A 文章编号: 1672-3554(2009)01-0092-04

### Effects of Curcumin on Invasion and Metastasis of Human Cervical Cancer Cells Caski

XU Fang<sup>1</sup>, MU Xiao-ling<sup>2</sup>, ZHAO Jing<sup>3</sup>

(1. Department of Emergency and ICU; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of Pathophysiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** 【Objective】To explore the effects of curcumin on invasion and metastasis of the human cervical cancer cells Caski and to investigate the possible mechanism. 【Method】Caski cells were treated with 10, 25, and 50  $\mu\text{mol/L}$  curcumin for 24, 48, and 72 h, respectively. Proliferation of Caski cells was measured with MTT assay. Invasion and metastasis of Caski cells were evaluated with Transwell chamber. The expression of MMP-2, MT1-MMP, and NF- $\kappa$ B were detected by Western blot. 【Result】After being treated with curcumin, the proliferation of Caski cells was inhibited in a time and dose-depending manner. The invasion and metastasis of Caski cells were also inhibited. The expression level of MMP-2, MT1-MMP, and NF- $\kappa$ B were decreased. 【Conclusion】Curcumin could affect the invasion and metastasis of the human cervical cancer cells Caski. It is probably one of its molecular mechanisms to inhibit the expression of MMP-2, MT1-MMP, and NF- $\kappa$ B.

**Key words:** cervical cancer; curcumin; invasion; metastasis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(1):92-95]

姜黄素(curcumin)是从姜科姜黄属植物姜黄(*Curcuma longa*)根茎中提取的一种酚性色素, 由于其色泽稳定且毒性低, 目前已广泛应用于食物添加剂和染料中。已有研究表明其具有抗肿瘤<sup>[1]</sup>、抗氧化<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>、抑制血管生成<sup>[4]</sup>、调节多药耐药基因<sup>[5]</sup>的作用。近年来, 有研究证实姜黄素能够减

少肿瘤细胞体内及体外的侵袭和转移<sup>[6-7]</sup>。但具体的机制仍然不清楚。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可以通过溶解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)从而在肿瘤细胞的侵袭转移中发挥了重要的作用。本研究观察了姜黄素对人宫颈癌细胞 Caski 的侵袭转移的影响, 通过

检测与侵袭转移密切相关的基质金属蛋白酶-2, I型膜基质金属蛋白酶 (membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP) 以及核转录因子 KappaB (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 蛋白表达的变化, 探讨姜黄素影响肿瘤细胞侵袭转移的可能的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

细胞系: 人宫颈癌细胞 Caski, 小鼠成纤维细胞 NIH3T3, 均由本室提供。RPMI-1640 干粉培养基: 美国 Gibco 公司。新生牛血清: TBD 公司。重组人工基底膜 Matrigel: 美国 BD 公司。Transwell Chamber (8  $\mu$ m 孔径): 美国 Costar 公司。四甲基偶氮唑盐 (MTT): 美国 Sigma 公司。MMP-2 鼠抗人单克隆抗体、MT1-MMP 鼠抗人单克隆抗体、NF- $\kappa$ B 鼠抗人单克隆抗体以及  $\beta$ -action 鼠抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG: Santa Cruz 公司。RIPA 细胞裂解液: 上海申能博彩生物科技有限公司。BeyoECL, western 荧光检测试剂: 碧云天生物技术研究所。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 将人宫颈癌细胞 Caski 及小鼠成纤维细胞 NIH3T3 常规复苏, 接种于含 100 mL/L 新生牛血清,  $10 \times 10^4$  U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37  $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的孵箱中培养。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期的 Caski 细胞, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  /mL。取 3 块 96 孔培养板每孔接种细胞悬液 200  $\mu$ L, 设未加药细胞组、姜黄素组 (设 10  $\mu$ mol/L、25  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L 3 个浓度; 于细胞 80% 处于融合状态后加药), 每组设 5 个平行孔。置 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度孵箱内培养。分别培养 24、48 和 72 h 后弃上清, 每孔加入 MTT 20 mL (5 mg/mL) 及无血清 RPMI-1640 200  $\mu$ L 继续培养 4 h, 取出后 2 000 r/min ( $r = 15$  cm) 离心 10 min, 弃上清, 每孔加 200  $\mu$ L DMSO 震荡 10 min, 用酶标仪测定波长 570 nm 的吸光值 ( $A$ )。实验重复 3 次, 取平均值。计算药物在不同浓度、不同作用时间对 MDA-MB-231 细胞的抑制率。

细胞生长抑制率 =  $1 - (\text{加药组平均 } A_{570} / \text{未}$

加药组平均  $A_{570}) \times 100\%$

1.2.3 侵袭实验 常规培养 NIH 3T3 细胞, 当细胞生长达 80% 融合状态时用生理盐水洗 3 次, 然后加无血清 RPMI-1640 液继续培养 24 h 后收集上清液, 离心 (2 000 r/min  $\times$  5 min,  $r = 15$  cm), -20  $^{\circ}$ C 保存备用。将 Matrigel 按 40  $\mu$ L/孔均匀的铺在 Transwell Chamber 膜上。取对照组和实验组细胞 (加 50  $\mu$ mol/L 姜黄素处理 72 h), 消化离心后调整细胞密度为  $4 \times 10^5$  个/mL, 分别取 0.2 mL 接种到成胶的 Transwell Chamber, 并将 Transwell Chamber 置于 24 孔板内, 同时在 Transwell 小室下层加入 NIH 3T3 细胞上清液 (趋化因子), 每孔 0.6 mL, 培养 48 h 后取出 Transwell Chamber, 用棉签头擦掉 Matrigel, PBS 液洗 3 次, 950 mL/L 乙醇固定。常规 HE 染色, 揭下 Transwell Chamber 膜反贴在载玻片上。结果判定: 400 倍光镜下, 计数每膜 5 个随机不同视野的穿膜细胞数, 取均值, 每组平行设 3 个小室。实验重复 3 次。

1.2.4 迁移实验 Transwell 小室表面不铺 Matrigel, 其余步骤与侵袭实验相同。

1.2.5 Western blot 检测细胞中 MMP-2、MT1-MMP 和 NF- $\kappa$ B 的表达 常规培养细胞, 细胞进入对数生长期后, 实验组加入姜黄素 (浓度为 50  $\mu$ mol/L) 处理 72 h, 分别收集对照组与实验组细胞约  $5 \times 10^6$  个, 用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白。用 Bradford 法测定蛋白含量。聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜。常规封闭、洗膜后与 1:300 鼠抗人 MMP-2、MT1-MMP 和 NF- $\kappa$ B 抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后加入 1:1 000 羊抗鼠 IgG/HRP 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。ECL 显色。用 Bio-Rad 图象分析系统照相, 用 Quantity One 软件分析, 以相应蛋白条带的灰度值/ $\beta$ -action 蛋白条带的灰度值表示相对蛋白含量。

1.2.6 统计学方法 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验和方差分析, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 姜黄素对 Caski 细胞增殖能力的影响

MTT 实验结果表明, 姜黄素对 Caski 细胞增殖有抑制作用, 并随时间延长和药物浓度加大而增强, 即呈时效-量效依赖关系 (图 1)。

### 2.2 姜黄素对 Caski 细胞侵袭迁移能力的影响

由表 1 可见, 姜黄素处理后, Caski 细胞的侵

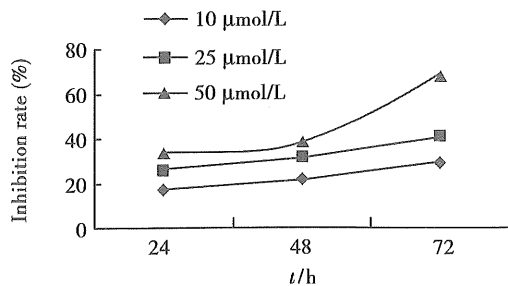


图 1 姜黄素对 Caski 细胞的生长抑制作用

Fig.1 Inhibition of curcumin on the growth of Caski cells

侵袭能力均下降。侵袭实验中,姜黄素处理后 Caski 细胞侵袭穿过 Matrigel 成胶 Transwell Chamber 重组人工基底膜的侵袭细胞数减少,与对照组侵袭细胞数比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。迁移实验中,姜黄素处理后 Caski 细胞穿过未经 Matrigel 成胶的人工基底膜的迁移细胞数减少,与对照组迁移细胞数比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 姜黄素对 Caski 细胞侵袭与迁移能力的影响

Table 1 Influence of curcumin on invasion and immigration of Caski cells

(n = 9,  $\bar{x} \pm s$ , %/field)

Group	Cell count of invasion	Cell count of immigration
Control	96 ± 4	109 ± 7
Curcumin	45 ± 6 <sup>1)</sup>	69 ± 7 <sup>1)</sup>

1)  $P < 0.05$ , vs. Control group

### 2.3 Western-blot 结果

由图 2, 表 2 可见, 50 μmol/L 姜黄素作用 Caski 细胞 72 h 后可见 MMP-2、MT1-MMP 和 NF-κB 蛋白表达均减弱 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

姜黄素的抗肿瘤特性已经得到广泛的研究。已有的研究表明姜黄素能够抑制多种肿瘤细胞的增殖并可以通过多种途径诱导肿瘤细胞的凋亡。在我们以往的研究中已经证实在体内外实验中姜黄素均可抑制人宫颈癌细胞生长<sup>[8-9]</sup>。本研究同样观察到姜黄素对人宫颈癌细胞 Caski 的生长有明显抑制作用且呈时间-浓度依赖性;同时我们发现姜黄素对 Caski 细胞的侵袭和转移有明显的抑制

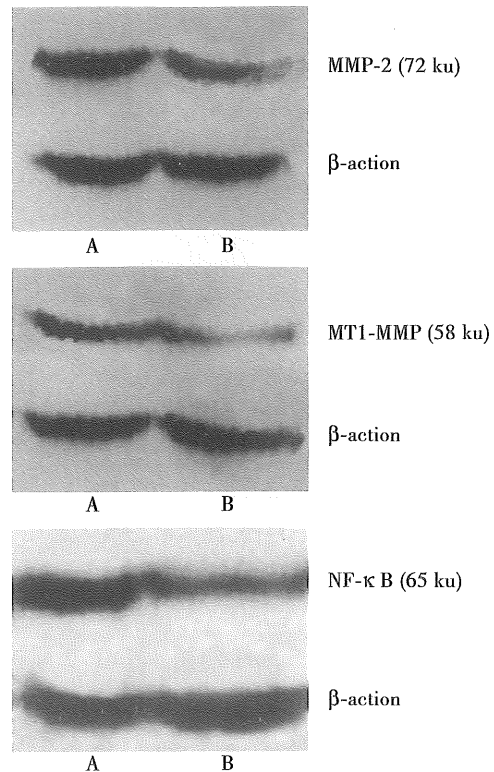


图 2 Caski 细胞中 MMP-2、MT1-MMP 和 NF-κB 蛋白的表达

Fig.2 Expression of MMP-2, MT1-MMP, and NF-κB in Caski cells

A: Control; B: Curcumin

表 2 姜黄素对 Caski 细胞的 MMP-2、MT1-MMP 和 NF-κB 蛋白表达的影响

Table 2 Influence of curcumin on expression of MMP-2, MT1-MMP, and NF-κB in Caski cells ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

Group	MMP-2/ β-action	MT1-MMP/ β-action	NF-κB / β-action
Control	0.989 ± 0.013	0.865 ± 0.031	0.987 ± 0.014
Curcumin treated	0.676 ± 0.033 <sup>1)</sup>	0.471 ± 0.038 <sup>1)</sup>	0.516 ± 0.112 <sup>1)</sup>

1)  $P < 0.05$  vs. control group

作用。我们进一步探讨了可能的机制。

基质金属蛋白酶是属于锌依赖性内肽酶家族,可降解细胞外基质(ECM)<sup>[10-11]</sup>帮助肿瘤细胞从血管或淋巴道迁移到其他组织器官。MMP-2(也称为明胶酶 A)是一种 72 kDa IV 型胶原酶,能够降解多种细胞外基质成分如明胶,胶原和弹性蛋白。已有的研究表明当 MMP-2 的表达或活性降低时,高转移特性的细胞的侵袭性会明显减弱<sup>[12-13]</sup>。Shao 等<sup>[14]</sup>证实姜黄素能够降低多种乳腺癌细胞株的 MMP-2 的表达并认为这是姜黄素抑

制肿瘤细胞侵袭转移的机制之一。在我们的实验中也检测到姜黄素能够明显降低人宫颈癌细胞株 Caski 的 MMP-2 蛋白的表达。

因为 MMP-2 在肿瘤细胞表面通过一种独有的途径激活,即在  $\alpha v\beta 3$  整合素受体的帮助下形成由 I 型膜基质金属蛋白酶,基质金属蛋白酶-2 组织抑制因子以及前基质金属蛋白酶-2 组成的“激活复合物”。而 MT1-MMPs 在参与降解细胞外基质和激活 MMP-2 的过程中起着非常关键的作用。我们认为姜黄素下 MT1-MMP 蛋白的表达是降低 MMP-2 活性的重要原因之一。NF- $\kappa$ B 是一类转录因子,它能够调控诸多正常的细胞生理过程如炎症和免疫反应,细胞生长和凋亡等<sup>[15]</sup>。NF- $\kappa$ B 同时能诱导 MMPs 的表达和活化,在细胞外基质的降解和细胞的迁移过程中起到重要的促进作用<sup>[16]</sup>。有大量的研究证实姜黄素能够抑制 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[17]</sup>。在我们的研究中也观察到姜黄素明显抑制 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达。

综上所述,姜黄素能够抑制人宫颈癌细胞 Caski 的侵袭和转移。下调 MMP-2 and MT1-MMP 蛋白的表达是其可能的机制之一。同时我们认为姜黄素对 MMPs 表达的抑制作用可能是通过下调 NF- $\kappa$ B 蛋白表达来实现的。

#### 参考文献:

- [1] Balasubramanian S, Eckert RL. Keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis-differential mechanisms of regulation by curcumin, EGCG and apigenin [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007,224(3): 214-219.
- [2] Zhao J, Zhao Y, Zheng W, et al. Neuroprotective effect of curcumin on transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2008,1229(7):224-232.
- [3] Guo LY, Cai XF, Lee JJ, et al. Comparison of suppressive effects of demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on expressions of inflammatory mediators in vitro and in vivo [J]. *Arch Pharm Res*, 2008,31(4):490-496.
- [4] Bhandarkar SS, Arbiser JL. Curcumin as an inhibitor of angiogenesis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007,595(5):185-195.
- [5] Choi BH, Kim CG, Lim Y, et al. Curcumin down-regulates the multidrug-resistance mdr1b gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Cancer Lett*, 2008,259(1):111-118.
- [6] Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin [J]. *Cancer Lett*, 1999,141(2):159-165.
- [7] Chen HW, Yu SL, Chen JJ, et al. Anti-invasive gene expression profile of curcumin in lung adenocarcinoma based on a high throughput microarray analysis [J]. *Mol Pharmacol*, 2004,65(5):99-110.
- [8] Zhao J, Zhao Y. Effects of curcumin on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma hela cells in vitro [J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2004,16(3):225-228.
- [9] Zhao J, Zhao Y, Zhang Y, et al. Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma Hela cells in vitro and in vivo [J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2007,19(1):32-36.
- [10] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumour invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation [J]. *Cancer Res*, 1991,51(5):5054-5059.
- [11] Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001,17(8):463-516.
- [12] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002,2(1):161-174.
- [13] Hofmann UB, Westphal JR, van Muijen GNP, et al. Matrix metalloproteinases in human melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2000,115(5):337-344.
- [14] Shao ZM, Shen ZZ, Liu CH, et al. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2002,98(5):234-240.
- [15] Beg A, Baltimore D. An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$  induced cell death [J]. *Science*, 1996,274(4):782-784.
- [16] Han Y-P, Tuan T-L, Wu H, et al. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa) B mediated induction of MT1-MMP [J]. *J Cell Sci*, 2000,114(5):131-139.
- [17] Brennan P, O'Neill LA. Inhibition of nuclear factor kappa B by direct modification in whole cells—mechanism of action of nordihydroguaiaritic acid, curcumin and thiol modifiers [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998,55(7):965-973.

(编辑 张恩健)