

莪术二酮对乳腺癌 HCC1937 细胞迁移和侵袭的影响及机制

孙学然, 杨克, 吕玲玲, 陈敬贤, 郭元彪, 阮铭, 应海峰, 沈小珩, 郑岚*
(上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200025)

[摘要] **目的:**探讨莪术二酮对人乳腺癌 HCC1937 细胞的迁移和侵袭能力的影响及其作用机制。**方法:**体外培养 HCC1937 细胞,分别以 12.5,25,50,100,200,400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 莪术二酮处理 24,48 h,设空白组,用细胞计数试剂盒法(CCK-8)检测莪术二酮对 HCC1937 细胞活力的影响;设立空白组,莪术二酮 12.5,25,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,细胞黏附实验检测莪术二酮对 HCC1937 细胞黏附力的影响;划痕愈合实验检测莪术二酮对 HCC1937 细胞迁移力的影响;transwell 小室体外迁移和侵袭实验检测莪术二酮对 HCC1937 细胞迁移和侵袭力的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测莪术二酮对 HCC1937 细胞中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和蛋白激酶 B(Akt)信号通路的调节作用以及对基质金属蛋白酶-2(MMP-2),基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达水平的影响;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测莪术二酮对 HCC1937 细胞中 MMP-2, MMP-9 mRNA 表达水平的影响。**结果:**与空白组比较,莪术二酮 12.5,25,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组对 HCC1937 细胞活力无明显影响,莪术二酮 100,200,400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组对 HCC1937 细胞活力有明显的抑制作用($P < 0.05, P < 0.01$),且呈时间-浓度依赖性;与空白组比较,莪术二酮 12.5,25,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能明显降低 HCC1937 细胞的黏附率、迁移率、迁移和侵袭细胞数($P < 0.05, P < 0.01$);与空白组比较,莪术二酮 12.5,25,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能明显下调 MAPK 和 Akt 信号通路上关键蛋白蛋白激酶(ERK),c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 Akt 的磷酸化水平($P < 0.01$),MMP-2, MMP-9 蛋白和 mRNA 表达显著下降($P < 0.01$)。**结论:**莪术二酮能明显抑制人乳腺癌 HCC1937 细胞的迁移和侵袭能力,其机制可能与通过下调 MAPK 和 Akt 信号通路上关键蛋白 ERK, JNK, Akt 的磷酸化水平,进而使 MMP2, MMP-9 表达量下降有关。

[关键词] 莪术二酮; 乳腺癌; 迁移; 侵袭; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK); 蛋白激酶 B(Akt); 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0066-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190326

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.1138.039.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 16:35

Effect and Mechanism of Curdione on Migration and Invasion of Breast Cancer HCC1937 Cells

SUN Xue-ran, YANG Ke, LYU Ling-ling, CHEN Jing-xian, GUO Yuan-biao,
RUAN Ming, YING Hai-feng, SHEN Xiao-heng, ZHENG Lan*

(Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of curdione on the migration and invasion of human breast cancer HCC1937 cells and its mechanism. **Method:** HCC1937 cells were cultured *in vitro* and treated with curdione at various doses (0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24, 48 h, the cell viability was detected by cell counting kit-8 method. curdione groups (12.5, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and blank group were established. The effect of curdione on the adhesion of HCC1937 cells was detected by the cell adhesion assay. The effect of curdione on migration of HCC1937 cells was detected by wound healing assay. The effect of curdione on

[收稿日期] 20180903(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770384);上海市科委基金项目(14401971100,15401932500)

[第一作者] 孙学然,在读硕士,从事中西医结合防治肿瘤研究,E-mail: 578926107@qq.com

[通信作者] *郑岚,硕士,主任医师,硕士生导师,从事中西医结合防治肿瘤临床及研究,Tel: 021-64370045-680502, E-mail: windy9453@126.com

the migration and invasion of HCC1937 cells were detected by transwell chamber assay. The effect of curdione on regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and protein kinase B (Akt) signaling pathways and the protein expressions of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) of HCC1937 cells were detected by the Western blot analysis. Effect of curdione on mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 of HCC1937 cells were detected by Real-time PCR. **Result:** Compared with the blank group, curdione (12.5, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups had no significant effect on cell viability, but a remarkable effect on cell viability HCC1937 cells, and cell viability was gradually decreased with the increase of the concentration of curdione ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in a time and dose-dependent manner. Compared with blank group, curdione groups (12.5, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) had a significant effect on cell adhesion rate, migration rate and invasion rate of HCC1937 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the blank group, curdione groups (12.5, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could down-regulate phosphorylation levels of key proteins extracellular regulated protein kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), Akt on MAPK and Akt signaling pathways ($P < 0.01$), as well as the protein and mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 of HCC1937 cells. **Conclusion:** curdione can inhibit the migration and invasion of human breast cancer HCC1937 cells, and the mechanism may be related to down-regulation of phosphorylation levels of key proteins ERK, JNK, Akt on MAPK and Akt signaling pathways, so as to reduce the expressions of MMP2 and MMP-9.

[**Key words**] curdione; breast cancer; migration; invasion; mitogen-activated protein kinase (MAPK); protein kinase B (Akt); matrix metalloproteinases

乳腺癌是我国女性最常见的恶性肿瘤之一,在全球范围内,其发病率和死亡率都位居女性恶性肿瘤首位^[1-3],严重危害女性的生命健康。三阴性乳腺癌(TNBC)是一类雌激素受体(ER),孕激素受体(PR),人表皮生长因子受体 2(HER2)均为阴性的乳腺癌,约占乳腺癌总人群的 10% ~ 16%^[4],具有发病年龄小、侵袭性强、易转移易复发及预后差的特点。手术、放疗和化疗是目前治疗三阴性乳腺癌主要方法,随着诊疗水平的不断提高,患者生存期虽有一定延长,但转移和复发仍会导致 80% 以上的患者死亡^[5]。因此,如何抑制三阴性乳腺癌细胞侵袭和转移是目前亟待解决的临床问题。

肿瘤转移是一个复杂的级联过程,已有研究表明基质金属蛋白酶(MMPs)在很多肿瘤组织中均呈高表达^[6],且与肿瘤迁移和侵袭相关,尤以基质金属蛋白酶-2(MMP-2),基质金属蛋白酶-9(MMP-9)关系最为密切。另外有研究发现,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和蛋白激酶 B(Akt)信号通路可以调节 MMPs 表达^[7]。目前,许多中药复方和中药提取物被证实可通过影响 MMPs 表达,起到抗肿瘤转移的作用^[8-9]。莪术二酮又称姜黄二酮,是中国传统中药莪术的提取物,具有明显抗血小板、抗炎及抗肿瘤作用,临床上已广泛用于肿瘤治疗。近年来多项研究显示,莪术二酮具有广泛和高效的抗肿瘤的作用,可抑制乳腺癌、胃癌、肺癌、肝癌、前列腺癌等多

种肿瘤细胞的生长并诱导其凋亡^[10-12],显示了莪术二酮在抗肿瘤作用方面的广阔前景。然而针对莪术二酮对人乳腺癌 HCC1937 细胞迁移和侵袭能力的影响及机制尚未有研究报道。因此,本研究采用莪术二酮进行体外实验,研究其是否通过影响 MAPK 和 Akt 信号通路,调控 MMP-2 及 MMP-9 表达,从而抑制人三阴性乳腺癌 HCC1937 细胞迁移和侵袭。

1 材料

1.1 细胞株 人乳腺癌细胞株 HCC1937,购自中科院上海细胞库,编号 TCHu148。

1.2 药物与试剂 莪术二酮(上海诗丹德中药技术服务有限公司,批号 ST08300120MG,纯度 $\geq 98\%$);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司,批号 D5879-100ML);RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 SH30809.01);胎牛血清,0.25%胰酶,青霉素-链霉素溶液(美国 Gibco 公司,批号分别为 16000-044,25200072,15140122);细胞增殖检测(CCK-8)试剂盒(日本 Dojindo 公司,批号 CK04);matrigel 基质胶(美国 BD 公司,批号 3533-010-02);transwell 小室(美国 Corning 公司,批号 3422);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),Akt,磷酸化 Akt(p-Akt),蛋白激酶(ERK),磷酸化 ERK(p-ERK)抗体,c-Jun 氨基末端激酶(JNK),磷酸化 JNK(p-JNK),MMP-2 及 MMP-9 抗体(美国 Cell Signal Technology 公司,批号分别为 5174S,4691T,4060T,

4695T, 4370T, 9252T, 4668T, 87809S, 13667T); HRP 标记的羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G 二抗 (美国 Abbkine 公司, 批号 A-08023); 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司, 批号 298-93-1); trizol 试剂, cDNA 逆转录试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司, 批号分别为 15596-0018, 00221108); SYBR Green PCR 试剂盒 (美国 Life 公司, 批号 1507005); RIPA 裂解液 (北京 Solarbio 公司, 批号 R0010); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (中国碧云天公司, 批号 P0010); 化学发光试剂盒 (ECL) 增强型 (美国 National Diagnostics 公司, 批号 SGCL-300)。

1.3 仪器 8000WJ 型 CO₂ 培养箱, CL30R 型高速冷冻离心机, MSC1.2 型生物安全柜 (美国 Thermo Fisher 公司); IX71 型倒置荧光显微镜 (日本 Olmpus 公司); AR224CN 型电子天平 (美国 Ahaus 公司); RT-6100 型多功能酶标仪 (美国 Rayto 公司); PowerPac HV 型垂直电泳仪, Trans-blot SD 型 Western 湿转仪, ChemiDoc XRS + 型化学发光凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); Lightcycler96 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 复苏 HCC1937 细胞, 培养在 RPMI 1640 培养基 (含有 10% 热灭活胎牛血清, 100 U·mL⁻¹ 青霉素及 100 mg·L⁻¹ 链霉素) 中, 于 37 °C 5% CO₂ 含量及饱和湿度的培养箱中培养。隔天换液, 2~3 d 传代 1 次。

2.2 莪术二酮工作液配制 将莪术二酮溶于 DMSO, 配成浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的母液, 用无菌微孔滤膜过滤, -20 °C 冰箱保存, 实验时用 RPMI 1640 培养基稀释至所需的工作浓度。

2.3 CCK-8 检测细胞活力 取对数生长期的 HCC1937 细胞, 制成单细胞悬液, 均匀接种于 96 孔板, 每孔 1 × 10⁴ 个细胞, 周围加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为调零孔。过夜贴壁后, 弃旧培养基, 每孔加入含 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μmol·L⁻¹ 莪术二酮的培养基或正常 RPMI 1640 培养基 (空白组) 100 μL, 每组设 6 个复孔。置 37 °C 5% CO₂ 含量及饱和湿度下培养 24, 48 h 后, 按说明书每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL, 继续培养 2 h。用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度 A, 计算细胞存活率。选取对细胞活力无明显影响的药物浓度进行后面的实验, 以排除莪术二酮对 HCC1937 细胞活力的抑制作用, 对于黏附、迁移和侵袭的影响。细胞存活率 =

$(A_{\text{给药孔}} - A_{\text{调零孔}}) / (A_{\text{空白孔}} - A_{\text{调零孔}}) \times 100\%$ 。

2.4 细胞黏附实验检测细胞黏附力 用 matrigel 包被 96 孔板孔底, 置 37 °C 培养箱 2 h, 成胶后吸弃上清液, 加入 2% BSA 封板 1 h, 以阻断非特异性黏附, 随后用 PBS 洗板 2 次。消化预先用 12.5, 25, 50 μmol·L⁻¹ 莪术二酮处理 24 h 的各组细胞及空白组细胞, 制成单细胞悬液, 常温下静置 30 min; 按每孔加入 5 × 10⁴ 个细胞, 将各组细胞均匀接种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔, 置于培养箱中黏附 1 h。用 PBS 轻轻洗去未黏附细胞, 每孔加入无血清培养基 100 μL, 用 MTT 比色法在酶标仪上测定各孔 A, 计算黏附率。黏附率 = $A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.5 划痕愈合实验检测细胞迁移能力 取对数生长期的细胞, 均匀接种于 6 孔板中, 37 °C 5% CO₂ 含量及饱和湿度下培养, 待细胞单层生长铺满板底时, 用无菌 1 mL 枪头在板孔中心轴处划 1 条均匀直线, 用 PBS 洗去划落的细胞, 加入 12.5, 25, 50 μmol·L⁻¹ 莪术二酮的培养基或正常 RPMI 1640 培养基 (空白组), 在倒置荧光显微镜下拍照并用 Image J 图像处理系统分析记录划痕开始时面积, 继续培养 24, 48 h 后, 再次拍照, 分析记录 24, 48 h 划痕面积, 计算迁移率。迁移率 = $(0 \text{ h 划痕面积} - 24 \text{ h 或 } 48 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积} \times 100\%$ 。

2.6 transwell 小室体外迁移、侵袭实验检测细胞迁移、侵袭能力 迁移实验, 消化预先用 12.5, 25, 50 μmol·L⁻¹ 莪术二酮处理 24 h 的各组细胞及空白组细胞, 用无血清培养基制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5 × 10⁵ 个/mL, 各组小室上室加入细胞悬液 200 μL, 下室加入含 10% 胎牛血清的培养基 800 μL。37 °C 5% CO₂ 含量及饱和湿度下培养 12 h, 用棉签擦去上室细胞, 置小室于甲醇溶液固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min, 在正置显微镜下随机选择 3 个不同视野拍照并计数穿膜细胞, 取平均值, 并计算迁移率。迁移率 = $\text{给药组穿膜细胞数} / \text{空白组穿膜细胞数} \times 100\%$ 。侵袭实验, 先将 matrigel 用无血清 RPMI 1640 培养基按 1:8 体积稀释, 取 50 μL 均匀铺于小室上室, 置于 37 °C 孵育 2 h, 成胶后吸弃上清液, 后续实验同迁移实验。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞 p-Akt, p-ERK, p-JNK, MMP-2, MMP-9 蛋白表达 取对数生长期的 HCC1937 细胞, 均匀接种于 6 孔板中, 过夜贴壁后, 弃去旧培养基, 加入含 12.5, 25, 50 μmol·L⁻¹ 莪术二酮培养基或正常 RPMI 1640 培养基 (空白组), 莪术二酮作用 24 h 后, 提取细胞

总蛋白,并用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度。取每孔蛋白样品 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,随后将分离胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,5% BSA 封闭 2 h。加入抗 GAPDH, Akt, p-Akt, ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, MMP-2, MMP-9 (1:1 000) 抗体,4 ℃ 孵育过夜;TBST 洗膜,15 min/次,共 4 次。加入 HRP 标记的二抗 (1:2 000),室温孵育 2 h, TBST 洗膜,15 min/次,共 4 次,ECL 化学发光试剂显影拍照。用 Image J 图像处理系统采集条带灰度值,以 GAPDH 作为内参。

2.8 Real-time PCR 检测细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达 细胞分组及培养同 2.6 项。按试剂盒说明书进行总 RNA 的抽提,逆转录及 PCR 反应。PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 6 min;解链 95 ℃ 10 s,65 ℃ 60 s,97 ℃ 1 s;扩增 95 ℃ 10 s,60 ℃ 10 s,72 ℃ 10 s,共 45 个循环。每组设 3 个复孔。采用 2^{-ΔΔC_t}方法计算待测样本 mRNA 的相对表达量。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
MMP-2	上游 AAGGGGCGTGTCTGGAGATTC	172
	下游 TTTGGAAACTCACACGCCAGA	
MMP-9	上游 CCATCGCCCATCATCAAGTTC	215
	下游 CATCTGGCTTCCGCATGGTC	
GAPDH	上游 CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游 TGAGCTCAATGAAGGGCTCGT	

2.9 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计分析软件进行数据分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 莪术二酮对 HCC1937 细胞活力的影响 与空白组比较,HCC1937 细胞经 12.5,25,50 μmol·L⁻¹莪术二酮处理 24,48 h 后,细胞存活率无明显改变,差异无统计学意义;经 100,200,400 μmol·L⁻¹莪术二酮处理 24,48 h 后,细胞存活率明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),且呈时间和浓度依赖性。见表 2。为排除莪术二酮对 HCC1937 细胞增殖的影响,故选取对细胞活力无明显影响的莪术二酮 (12.5,25,50 μmol·L⁻¹) 进行后续的细胞黏附、迁移和侵袭实验。

表 2 莪术二酮对人乳腺癌 HCC1937 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of curdione on viability rate of HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	24 h	48 h
空白	-	100	100
莪术二酮	12.5	99.84 ± 0.11	99.29 ± 0.67
	25	99.60 ± 0.32	98.70 ± 1.07
	50	99.51 ± 0.39	98.69 ± 1.24
	100	90.88 ± 0.17 ¹⁾	84.94 ± 1.67 ¹⁾
	200	76.13 ± 1.53 ²⁾	66.81 ± 0.84 ²⁾
	400	67.13 ± 2.39 ²⁾	48.47 ± 1.11 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ (表 3~9 同)。

3.2 莪术二酮对 HCC1937 细胞黏附力的影响 划痕愈合实验显示,与空白组比较,莪术二酮 12.5,25,50 μmol·L⁻¹组 HCC1937 细胞黏附率显著降低 ($P < 0.01$),且呈浓度依赖性。见表 3。

表 3 莪术二酮对人乳腺癌 HCC1937 细胞黏附率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of curdione on adhesion rate of HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	细胞黏附率/%
空白	-	100
莪术二酮	12.5	83.43 ± 4.21 ²⁾
	25	74.93 ± 3.36 ²⁾
	50	68.83 ± 2.65 ²⁾

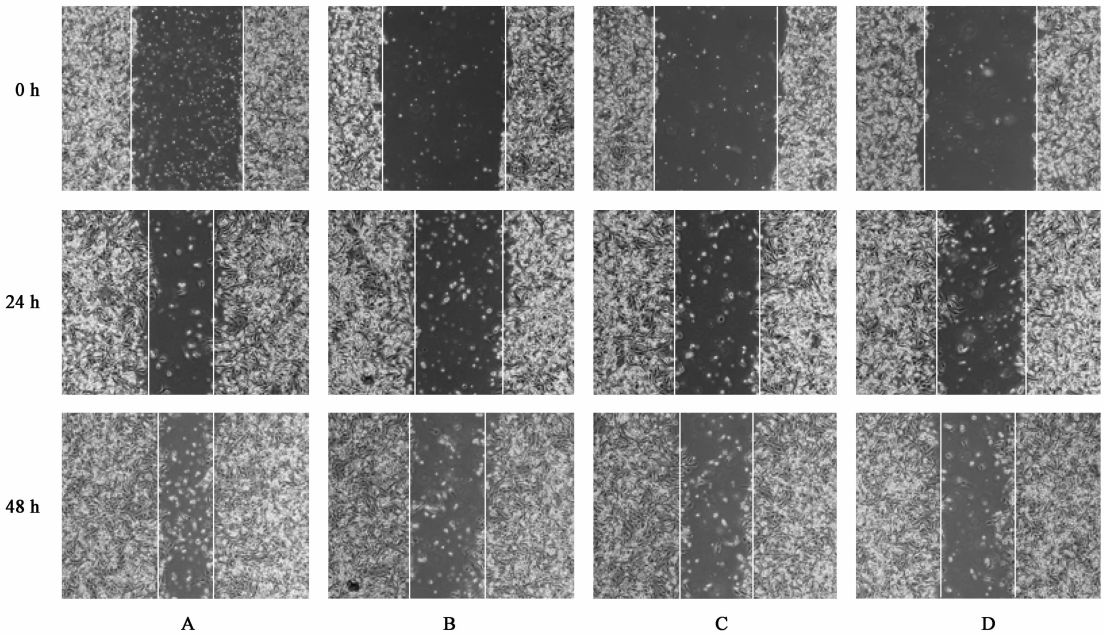
3.3 莪术二酮对 HCC1937 细胞迁移能力的影响 与空白组比较,莪术二酮 12.5,25,50 μmol·L⁻¹组 HCC1937 细胞划痕迁移面积和迁移率明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),且呈浓度依赖性。见图 1,表 4。

表 4 莪术二酮对 HCC1937 细胞迁移率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of curdione on migration rate of HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	24 h	48 h
空白	-	41.78 ± 4.52	68.49 ± 7.83
莪术二酮	12.5	32.68 ± 3.54 ¹⁾	57.71 ± 5.49 ¹⁾
	25	32.23 ± 3.65 ¹⁾	54.11 ± 2.45 ¹⁾
	50	29.82 ± 3.87 ²⁾	50.00 ± 3.55 ²⁾

transwell 小室体外迁移实验结果显示,与空白组比较,莪术二酮 12.5,25,50 μmol·L⁻¹组



A. 空白组; B. 莪术二酮 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. 莪术二酮 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. 莪术二酮 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 2~5 同)

图 1 莪术二酮对 HCC1937 细胞迁移的影响 (倒置显微镜, $\times 40$)

Fig. 1 Effect of curdione on migration rates of HCC1937 cells (inverted microscope, $\times 40$)

HCC1937 细胞的迁移穿膜细胞数明显减少, 细胞迁移率显著降低 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。见图 2, 表 5。

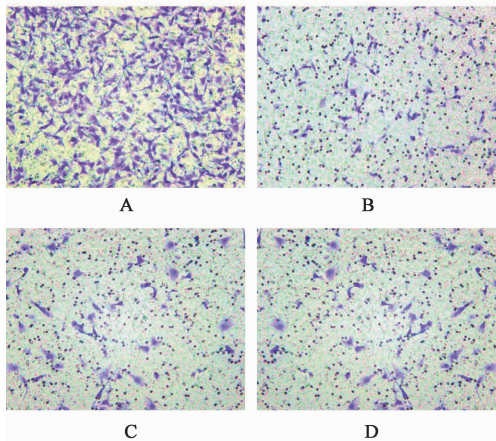


图 2 莪术二酮对 HCC1937 细胞迁移的影响 (结晶紫, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of curdione on migration of HCC1937 cells (crystal violet, $\times 100$)

3.4 莪术二酮对 HCC1937 细胞侵袭能力的影响

与空白组比较, 莪术二酮 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 HCC1937 细胞的侵袭穿膜细胞数明显减少, 细胞侵袭率显著降低 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。见图 3, 表 6。

3.5 莪术二酮对 HCC1937 细胞 p-Akt, p-ERK, p-JNK, MMP-2, MMP-9 蛋白表达的影响 与空白组比较, 莪术二酮 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 HCC1937

表 5 莪术二酮对 HCC1937 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of curdione on migration of HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移细胞数/个	细胞迁移率/%
空白	-	293.67 \pm 7.09	100
莪术二酮	12.5	97.33 \pm 19.50 ²⁾	33.06 \pm 6.03 ²⁾
	25	81.67 \pm 15.50 ²⁾	27.90 \pm 5.96 ²⁾
	50	59.67 \pm 4.04 ²⁾	20.34 \pm 1.80 ²⁾

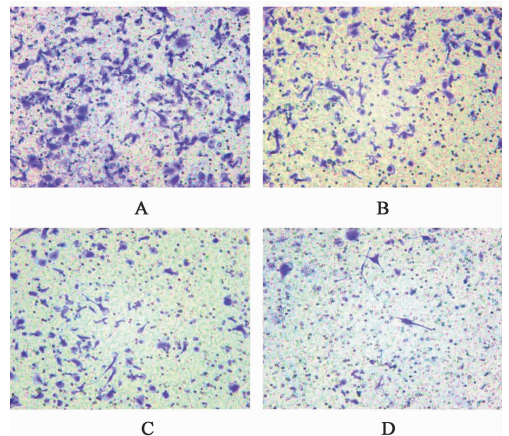


图 3 莪术二酮对 HCC1937 细胞侵袭的影响 (结晶紫, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of curdione on invasion of HCC1937 cells (crystal violet, $\times 100$)

细胞 Akt, ERK, JNK 蛋白表达量无明显变化, 差异无统计学意义; p-Akt, p-ERK, p-JNK, MMP-2 和 MMP-9

表 6 莪术二酮对 HCC1937 细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of curdione on invasion of HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	侵袭细胞数/个	细胞侵袭率/%
空白	-	174.33 \pm 11.15	100
莪术二酮	12.5	108.33 \pm 11.02 ²⁾	62.05 \pm 2.31 ²⁾
	25	77.67 \pm 10.07 ²⁾	44.45 \pm 3.54 ²⁾
	50	42.67 \pm 19.40 ²⁾	24.82 \pm 12.42 ²⁾

蛋白表达量均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。见图 4, 5, 表 7, 8。

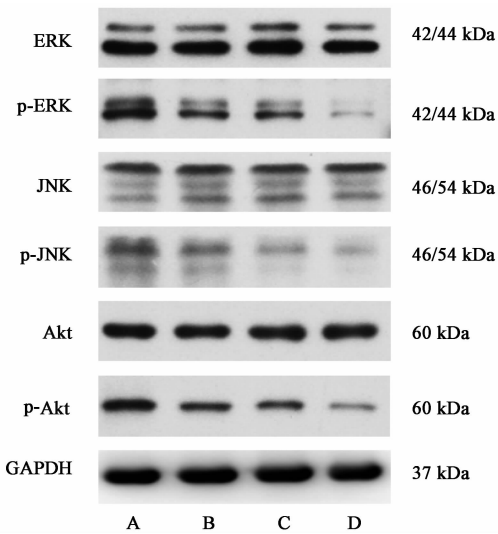


图 4 莪术二酮对人乳腺癌 HCC1937 细胞 p-ERK, p-JNK, p-Akt 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of curdione on protein expressions of p-ERK, p-JNK and p-Akt in HCC1937 cells

表 7 莪术二酮对 HCC1937 细胞 ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, Akt, p-Akt 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of curdione on protein expressions of ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, Akt and p-Akt in HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ERK /GAPDH	p-ERK /GAPDH	JNK /GAPDH	p-JNK /GAPDH	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH
空白	-	1.10 \pm 0.09	0.86 \pm 0.08	1.16 \pm 0.05	0.61 \pm 0.03	0.74 \pm 0.06	0.63 \pm 0.05
莪术二酮	12.5	1.09 \pm 0.01	0.56 \pm 0.02 ¹⁾	1.18 \pm 0.02	0.47 \pm 0.06 ²⁾	0.74 \pm 0.03	0.43 \pm 0.05 ²⁾
	25	1.08 \pm 0.04	0.50 \pm 0.03 ¹⁾	1.14 \pm 0.04	0.39 \pm 0.03 ²⁾	0.75 \pm 0.03	0.34 \pm 0.02 ²⁾
	50	1.03 \pm 0.05	0.25 \pm 0.02 ¹⁾	1.12 \pm 0.10	0.31 \pm 0.01 ²⁾	0.76 \pm 0.05	0.28 \pm 0.01 ²⁾

腺癌 LNCaP 细胞的增殖, 其作用机制可能与其促进肿瘤细胞凋亡相关^[10-12], 提示莪术二酮具有明显的抗肿瘤作用, 但关于其对肿瘤迁移和侵袭的作用却未见报道。本研究从抑制三阴性乳腺癌 HCC1937 细胞迁移和侵袭方面进一步探讨莪术二酮在抗肿瘤方面的作用。

转移和侵袭是恶性肿瘤主要特征之一。细胞的

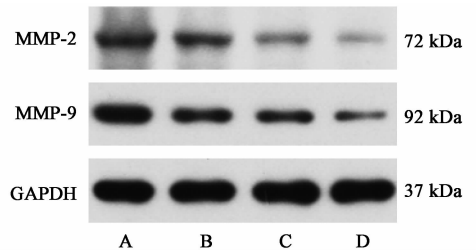


图 5 莪术二酮对 HCC1937 细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of curdione on protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in HCC1937 cells

3.6 莪术二酮对 HCC1937 细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达水平的影响 与空白组比较, 莪术二酮 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 HCC1937 细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。见表 9。

4 讨论

乳腺癌转移和浸润严重影响患者预后, 而三阴性乳腺癌是一种特殊的亚型, 具有高复发率、高侵袭率及高病死率的特点, 病情进展快, 生存期短并缺乏有效治疗手段。基于三阴性乳腺癌现状, 如何降低防治其复发和转移, 降低病死率是目前研究的热点^[13-15]。故此, 本实验选取高转移和高侵袭性的三阴性乳腺癌 HCC1937 细胞, 作为体外实验的细胞模型。

莪术具有消肿止痛、行气破血、消食化积功效, 临床上已广泛用于抗肿瘤治疗。莪术二酮是莪术的主要有效成分之一, 现代药理研究发现莪术二酮可以抑制人乳腺癌 MCF-7, MDA-MA-231 细胞, 胃癌 AGS 细胞, 肺癌 A549 细胞, 肝癌 HepG2 细胞, 前列

黏附力、迁移能力和侵袭能力是肿瘤细胞迁移和侵袭的主要因素, 也是评价迁移和侵袭水平的主要指标。本研究应用细胞黏附实验, 划痕愈合实验, transwell 小室体外迁移和侵袭实验来观察莪术二酮对 HCC1937 细胞的黏附力、迁移力和侵袭力的影响。为排除莪术二酮对 HCC1937 细胞迁移和侵袭的影响是由抑制细胞增殖引起, 故采用对细胞增殖

表 8 莪术二酮对 HCC1937 细胞 MMP-2, MMP-9 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of curdione on protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
空白	-	0.54 ± 0.05	0.76 ± 0.03
莪术二酮	12.5	0.42 ± 0.02 ²⁾	0.53 ± 0.02 ²⁾
	25	0.26 ± 0.05 ²⁾	0.42 ± 0.03 ²⁾
	50	0.16 ± 0.01 ²⁾	0.23 ± 0.02 ²⁾

表 9 莪术二酮对人乳腺癌 HCC1937 细胞 MMP-2, MMP-9 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of curdione on mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 in HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MMP-2	MMP-9
空白	-	1	1
莪术二酮	12.5	0.80 ± 0.03 ²⁾	0.47 ± 0.03 ²⁾
	25	0.59 ± 0.06 ²⁾	0.40 ± 0.02 ²⁾
	50	0.47 ± 0.01 ²⁾	0.18 ± 0.01 ²⁾

无影响的药物浓度进行上述实验。结果发现,莪术二酮可以明显降低 HCC1937 细胞黏附率、迁移率和侵袭率。说明莪术二酮在不影响 HCC1937 细胞增殖活力的浓度下,能明显抑制其迁移和侵袭能力。

细胞外基质(ECM)能够连接并支撑组织结构,调节细胞的生理活动和组织生长^[16]。MMPs 作为细胞外基质蛋白酶的主要组成成分,对 ECM 重塑和降解有很大影响^[17]。肿瘤细胞从原发部位脱离,分泌 MMPs,尤其是 MMP-2, MMP-9 来降解周围基质,侵入血液及淋巴循环,黏附于内皮细胞壁或被微血管捕获,并向远处迁移,形成新发转移灶。在转移过程中, MMPs 是主要调控因子,也是肿瘤侵袭和转移的开始^[18], MMP-2, MMP-9 作为肿瘤侵袭和转移的相关因子^[19],在这一过程中起关键的作用。黄晓曦等^[20]研究发现, MMP-2, MMP-9 在乳腺癌患者中表达明显升高。本研究中,空白组 HCC137 细胞 MMP-2, MMP-9 蛋白和 mRNA 水平均呈高表达,与前期研究相符。本研究 Western blot 和 Real-time PCR 结果分析显示,莪术二酮能明显降低 MMP-2, MMP-9 蛋白和 mRNA 水平表达,说明莪术二酮抑制 HCC1937 细胞迁移和侵袭的能力可能与其抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达有关。

MAPK 是一组能被不同的细胞外刺激而激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,包括 ERK, JNK, p38 MAPK,可以调节 MMPs 的表达^[6]。有研究发现,

通过 MAPK 磷酸化水平激活,可以促进肿瘤转移相关蛋白的表达,促进三阴性乳腺癌细胞的侵袭和迁移^[21-22]。另外, Akt 信号通路调节细胞的生长、增殖和凋亡,且与乳腺癌侵袭和转移密切相关,可以调控 MMPs 的表达^[23-24]。本研究 Western blot 结果显示,莪术二酮可抑制 ERK, JNK 和 Akt 磷酸化水平。以上结果提示,经过莪术二酮能抑制三阴性乳腺癌 HCC1937 细胞侵袭和迁移的能力,使 MMP-2, MMP-9 表达下调,可能是通过下调 ERK, JNK, Akt 的蛋白磷酸化水平实现的。

综上,莪术二酮可抑制三阴性乳腺癌 HCC1937 细胞体外的迁移和侵袭能力,这种作用可能是通过下调 MAPK 和 Akt 信号通路上关键蛋白 ERK, JNK, Akt 的磷酸化水平,从而下调肿瘤细胞转移相关蛋白 MMP-2, MMP-9 的表达,实现抑制三阴性乳腺癌 HCC1937 细胞侵袭和迁移的能力。为莪术二酮应用于三阴性乳腺癌的临床治疗提供了新的实验依据。

[参考文献]

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(1):7-30.

[2] Dimitrakopoulos F I, Kottorou A, Antonacopoulou A G, et al. Early-stage breast cancer in the elderly: confronting an old clinical problem [J]. J Breast Cancer, 2015,18(3):207-217.

[3] Dianatinasab M, Mohammadianpanah M, Daneshi N, et al. Socioeconomic factors, health behavior, and late-stage diagnosis of breast cancer: considering the impact of delay in diagnosis[J]. Clin Breast Cancer, 2017,18(3):239-245.

[4] Rakha E A, El-Sayed M E, Green A R, et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer[J]. Cancer, 2006,109(1):25-32.

[5] Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013,110(27):11091-11096.

[6] YANG H L, KUO Y H, Tsai C T, et al. Anti-metastatic activities of *Antrodia camphorata* against human breast cancer cells mediated through suppression of the MAPK signaling pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2011,49(1):290-298.

[7] Lee S J, Park S S, Lee U S, et al. Signaling pathway for TNF-alpha-induced MMP-9 expression: mediation through p38 MAP kinase, and inhibition by anti-cancer

- molecule magnolol in human urinary bladder cancer 5637 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(13/14): 1821-1826.
- [8] 朱玲玲, 张洋, 窦勤玲, 等. 槲皮素对 U937 细胞迁移和侵袭能力及 MMP-2, MMP-9 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(16): 146-151.
- [9] 倪腾洋, 李丹, 王海波, 等. 华蟾素通过调控基质金属蛋白酶抑制人胃腺癌细胞 MGC-803 侵袭与迁移[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 106-111.
- [10] LI J, BIAN W H, WAN J, et al. Curdione inhibits proliferation of MCF-7 cells by inducing apoptosis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(22): 9997-10001.
- [11] KONG Q, SUN F, CHEN X. Impact of fixed-dose combination of germacrone, curdione, and furanodiene on breast cancer cell proliferation[J]. *Cell J*, 2013, 15(2): 160-165.
- [12] 杨长福, 李亚东, 牛建昭, 等. 莪术油对肺腺癌 A549 细胞周期及组织蛋白酶 K 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(8): 113-116.
- [13] LI Q, LI Q, ZHANG P, et al. A phase II study of capecitabine plus cisplatin in metastatic triple-negative breast cancer patients pretreated with anthracyclines and taxanes [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16 (12): 1746-1753.
- [14] FAN Y, XU B H, YUAN P, et al. Docetaxel-cisplatin might be superior to docetaxel-capecitabine in the first-line treatment of metastatic triple-negative breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2011, 23(9): 587-600.
- [15] 尹海庆, 程真, 张剑. 术后首发内脏转移三阴性乳腺癌患者的临床特点及预后分析[J]. *肿瘤*, 2017, 37(4): 372-378.
- [16] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003, 92(8): 827-839.
- [17] LIU X, SU P, MENG S, et al. Role of matrix metalloproteinase-2/9 (MMP2/9) in lead-induced changes in an *in vitro* blood-brain barrier model[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(11): 1351-1360.
- [18] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis [J]. *Science*, 2011, 331 (6024): 1559-1564.
- [19] Giganti M G, Tresoldi I, Sorge R, et al. Physical exercise modulates the level of serum MMP-2 and MMP-9 in patients with breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 2119-2126.
- [20] 黄晓曦, 许东坡, 王力群, 等. MMP-2/MMP-9 在乳腺癌组织中的表达及其生物学意义[J]. *癌症*, 2001(11): 1251-1255.
- [21] WANG X F, ZHOU Q M, DU J, et al. Baicalin suppresses migration, invasion and metastasis of breast cancer via p38 MAPK signaling pathway[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(6): 923-931.
- [22] MENG X, CAI C, WU J, et al. TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway[J]. *Cancer Lett*, 2013, 333(1): 96-102.
- [23] SUN L C, LUO J, Mackey L V, et al. A conjugate of camptothecin and a somatostatin analog against prostate cancer cell invasion via a possible signaling pathway involving PI3K/Akt, alphaVbeta3/alphaVbeta5 and MMP-2/-9 [J]. *Cancer Lett*, 2007, 246 (1/2): 157-166.
- [24] YU P, ZHOU L, KE W, et al. Clinical significance of pAkt and CD44v6 overexpression with breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136 (8): 1283-1292.

[责任编辑 张丰丰]