

- miscarriage; a randomized double-blind placebo-controlled trial [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018, 31(3): 388-394.
- [14] 吴 花, 郝乐乐, 李伟莉, 等. 基于古今医案云平台分析中医药治疗免疫性复发性流产用药规律[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(6): 52-55.
- [15] 韩春艳, 孙自学, 宋艳丽. 补肾安胎饮对肾虚型不明原因复发性流产患者的临床疗效[J]. 中成药, 2019, 41(12): 3067-3071.
- [16] 冯晓玲, 赵小莹, 王 磊, 等. 治未病思想指导下针刺结合补肾活血法治疗复发性流产的临床观察[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2183-2187.
- [17] Azizi R, Ahmadi M, Danaii S, *et al.* Cyclosporine A improves pregnancy outcomes in women with recurrent pregnancy loss and elevated Th1/Th2 ratio[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 19039-19047.
- [18] Basimi P, Akbari Asbagh F, Yekaninejad MS, *et al.* Comparing the frequency of CD4⁺ T cells in recurrent spontaneous abortion women with and without anti-thyroid peroxidase (TPO) [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2020, 19(1): 65-73.
- [19] 杨俊英, 米亚英. 正常妊娠与自然流产小鼠模型蜕膜组织和血清中 TNFR1 的表达[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(5): 436-438.
- [20] Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and pregnancy: focus on biologics. An updated and comprehensive review [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2017, 53(1): 40-53.
- [21] Jo E, Jang H J, Yang K E, *et al.* *Cordyceps militaris* induces apoptosis in ovarian cancer cells through TNF- α /TNFR1-mediated inhibition of NF- κ B phosphorylation [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 1.

四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖、凋亡及转移的作用

张 敏¹, 华 桦^{2*}, 曾安琪², 刘 俐², 刘 芳³, 赵军宁^{1,2}

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 四川省中医药科学院转化药理与临床应用研究所, 四川省中医药转化医学中心, 四川省道地药材系统开发工程技术研究中心, 四川省道地药材形成原理与品质评价工程研究中心, 中医药转化医学四川省重点实验室, 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 四川成都 610041; 3. 四川大学, 四川 成都 610041)

摘要: **目的** 探讨四氢姜黄素对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡及转移的作用。**方法** 采用 CCK8 和克隆形成试验测定四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖能力的影响, 流式细胞术检测四氢姜黄素对 MCF-7 细胞凋亡的作用, 细胞划痕试验、Transwell 试验检测四氢姜黄素对 MCF-7 细胞转移、侵袭能力的影响, Western blot 法检测四氢姜黄素对 MCF-7 细胞凋亡 (Bcl-2、Bax)、转移相关蛋白 (MMP2、MMP9) 表达的调控作用。**结果** 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖具有一定的抑制作用, 可升高细胞凋亡率, 降低其转移能力。**结论** 四氢姜黄素作用机制可能是通过下调 Bcl-2/Bax 蛋白表达来诱导肿瘤细胞凋亡, 以及下调基质金属蛋白酶 2 和 9 (MMP2, MMP9) 表达来抑制细胞转移而实现的。

关键词: 四氢姜黄素; MCF-7 细胞; 增殖; 凋亡; 转移

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0942-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.047

乳腺癌是一种发生于乳腺上皮组织的恶性肿瘤, 其发病率逐年上升并愈发年轻化^[1-4]。乳房并非维持生命的重要器官, 但乳腺癌细胞易失去细胞间的黏附能力, 极易增殖扩散, 短时间内迅速转移、生长到其他器官如骨髓、淋巴等, 最后危及患者生命^[5-8]。姜黄素类为中药姜黄的主要有效成

分, 目前已有研究证实姜黄素能抑制膀胱癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤细胞的生长^[9-10]。四氢姜黄素 (tetrahydrocurcumin) 为姜黄素在体内的主要代谢产物, 具有抗肿瘤作用^[11-14], 但其作用机制尚不清楚。本研究探索了四氢姜黄素对 MCF-7 乳腺癌细胞增殖、凋亡、转移的作用及其机制, 为四氢姜

收稿日期: 2020-12-06

基金项目: 重大新药创制“科技重大专项项目 (2018ZX090201018-029); 四川省科技厅重点研发项目 (2018SZ0056); 四川省省级科研院所基本科研业务 (A-2019N-16, A-2019N-30)

作者简介: 张 敏 (1995—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。Tel: 18745128367, E-mail: 1129703233@qq.com

***通信作者:** 华 桦 (1982—), 女, 副研究员, 研究方向为中药药理学。Tel: 86-28-85226120, E-mail: 905701276qq.com

网络出版日期: 2021-03-30

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210329.1706.004.html>

黄素后续开发奠定实验基础。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌细胞(MCF-7)由上海中国科学院干细胞库提供,目录号TCHu74。

1.2 试剂与药物 四氢姜黄素由四川省中医药科学院药学研究所提供,批号2018090,纯度 $\geq 98\%$ 。二甲基亚砜(DMSO)(批号EZ6688D182)购自美国Sigma-Aldrich公司;磷酸缓冲盐溶液(PBS)(批号8119244)购自美国Gibco公司;胎牛血清(批号1909505)购自杭州四季青生物工程材料有限公司;胰酶(批号14J22C67)购自美国HyClone公司;细胞增殖毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK8, 批号14I07A60)、HRP-羊抗兔IgG(批号BST14KBL54)、HRP-羊抗小鼠IgG(批号BST14J0A50)均购自武汉博士德生物工程有限公司;结晶紫染色液(批号C0121)购自上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号20200624)购自江苏凯基生物技术股份有限公司; β -肌动蛋白(β -Actin)(批号HL0305)购自杭州华安生物技术有限公司;基质金属蛋白酶9(MMP-9)(批号GR3204084-11)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)(批号GR3244972-1)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)(批号GR3219584-4)、BCL-2-Associated X的蛋白质(Bax)(批号GR380247-20)均购自英国Abcam公司。

1.3 仪器 BSC-1304 II A₂细胞生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);美国311水套式二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);1820型酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);ME204/02电子天平[梅特勒-托利多仪器有限公司];YM100 A灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司);DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);C2500低温离心机(湖南湘仪实验仪器厂);090-135008倒置显微镜(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 四氢姜黄素对MCF-7细胞增殖的影响

2.1.1 CCK8实验 将对数生长期的MCF-7细胞用完全培养液配成细胞悬液,以每孔8 000、6 000、4 000个细胞接种于3块96孔板中,放置于5% CO₂、37℃培养箱中培养24 h,待细胞贴壁至80%~90%时,加入不同浓度(0、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)四氢姜黄素药液进行干预,每孔100 μL 。分别培养24、48、72 h,弃去旧培养基,每孔加入新鲜培养基100 μL 后,再避光加入10 μL CCK8溶液,37℃孵育1 h,酶标仪检测450 nm波长处吸光度(A)值。根据公式计算细胞增殖抑制率,Graphpad计算半数抑制浓度(IC₅₀)。细胞增殖存活率 = $[(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

2.1.2 克隆形成实验 取对数生长期细胞,完全培养基重悬后计数,细胞以500/mL密度分别加入6孔板中,放置于5% CO₂、37℃培养箱培养24 h后,加入浓度为0、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 四氢姜黄素药液,每3天换1次药液至第10天。实验结束时弃去旧培养基,加入1 mL

甲醇固定15 min后弃去甲醇,再加入2 mL结晶紫避光固定30 min,结晶紫回收后PBS清洗孔板2次后晾干拍照。

2.2 四氢姜黄素对MCF-7细胞凋亡的影响

2.2.1 MCF-7细胞形态变化 取对数生长期细胞计数后,按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于6孔板,放置于5% CO₂、37℃培养箱培养24 h后,弃去培养基,加入浓度为0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 四氢姜黄素药液,分别于0、48 h在200倍显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.2.2 流式细胞术检测MCF-7细胞凋亡情况 用不含EDTA胰酶消化收集细胞,PBS洗涤细胞2次,500 μL 预冷Binding Buffer悬浮细胞,加入5 μL Annexin V-FITC混匀后,再加入5 μL Propidium Iodide混匀,室温避光反应15 min,检测细胞凋亡情况。

2.3 四氢姜黄素对MCF-7细胞转移的影响

2.3.1 划痕实验 取对数生长期细胞,将细胞悬液密度调为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 后接种于6孔板,放置于5% CO₂、37℃培养箱培养24 h后进行划痕;将0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 四氢姜黄素药液(含2%血清的培养基配制)依次加入孔板中,每孔2 mL,放入放置于5% CO₂、37℃培养箱孵育48 h后弃去旧液,用PBS清洗2次,再加入600 μL PBS,40倍显微镜下观察拍照。Image J软件分析细胞迁移距离。

2.3.2 Transwell实验 在对数生长期细胞中加入无血清培养基计数后调整密度为 $4 \times 10^4/\mu\text{L}$;用无血清培养基分别配置0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 四氢姜黄素药液,每孔加入50 μL 药液和50 μL 细胞悬液;将5个Transwell小室放入6孔板中,小室下加入600 μL 含血清培养基,小室中加入50 μL 无血清药液和50 μL 无血清细胞培养基,放置于5% CO₂、37℃培养箱孵育48 h后,弃小室下方培养基,用棉签轻轻旋转擦拭小室,1 mL甲醇固定后,每孔加入1 mL结晶紫染色液染色,用PBS清洗3次后用棉签轻轻旋转擦拭小室中液体,于通风橱中晾干,将小室底部圆片取出放在滴有中性树胶(滴载玻片中心)的载玻片上,盖上盖玻片,于100倍显微镜下拍照。

2.4 蛋白质印迹(Western blot)实验 将细胞接种于培养皿中,待贴壁后加入相应浓度的四氢姜黄素药液(0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$),48 h后用刮刀将各组细胞收集于离心管中,加入RIPA细胞裂解液,冰浴30 min后,加入等量4 $\times$ SDS Loading buffer,进行凝胶电泳后,置于转膜仪转膜后,加封闭液封闭1 h,用一抗(Bcl-2、Bax、MMP2、MMP9)孵育(4℃)过夜,放置于摇床用TBST清洗4次,15 min更换1次TBST,二抗孵育(37℃)1 h,发光液曝光10 min,显影,进行Bcl-2、Bax、MMP-2、MMP-9蛋白表达分析。

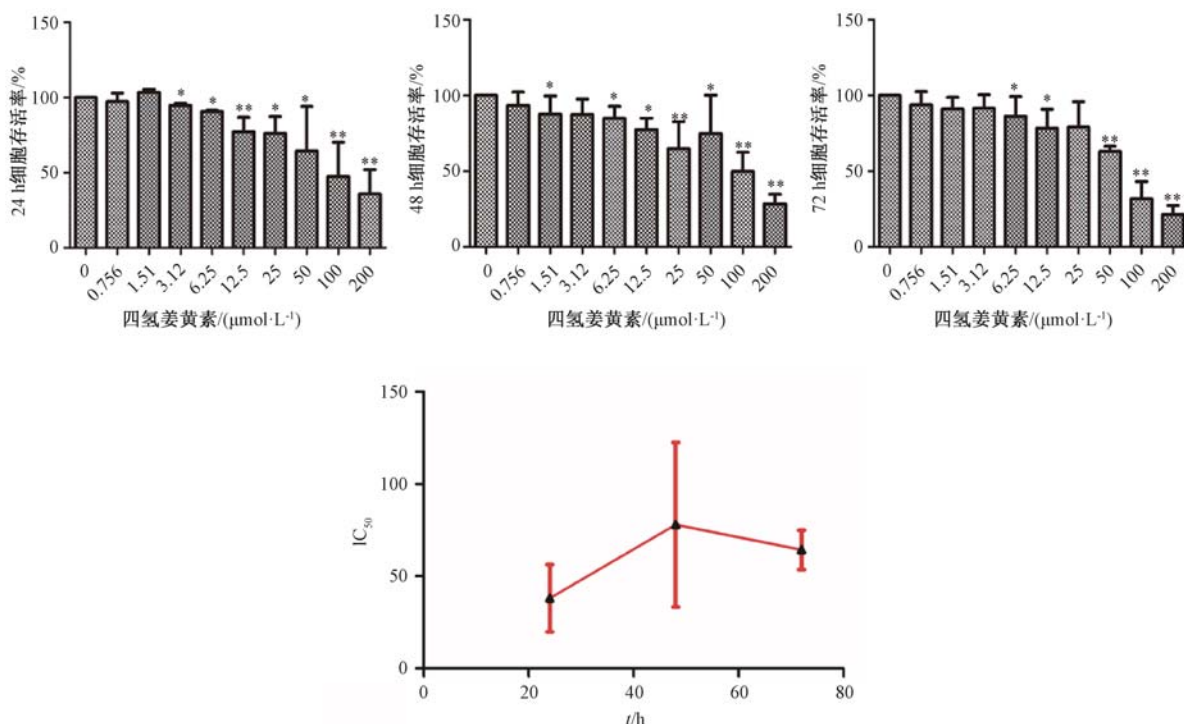
2.5 统计学分析 通过SPSS 21.0、Image J、Graphpad Prism 5.0软件进行数据分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布,进行单因素方差分析,不符合则进行K-W非参数检验;单因素方差分析时,如方差齐性,采用LSD检验,如方差不齐,采用Tamhane's T2检验。 $P < 0.05$ 表示差

具有统计学意义。

3 结果

3.1 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖的影响

3.1.1 CCK8 实验 如图 1 所示, 实验各时间点四氢姜黄

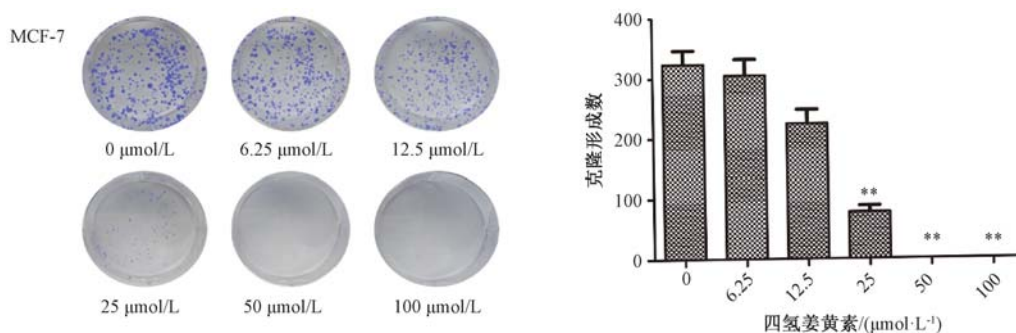


注: 与空白对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.1.2 克隆形成实验 如图 2 所示, 与空白对照组比较, 四氢姜黄素 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组 MCF-7 细胞克隆形

成数减少 ($P<0.01$), 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞具有抑制作用。



注: 与空白对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 组比较, ** $P<0.01$ 。

图 2 四氢姜黄素对 MCF-7 克隆形成的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞凋亡的影响

3.2.1 细胞形态 如图 3 所示, 与空白对照组比较, 四氢姜黄素作用 48 h 后细胞生长缓慢, 细胞数量减少, 细胞形态发生改变, 胞内出现空泡, 大量细胞碎片漂浮于培养液表面。

3.2.2 流式细胞术实验 如图 4 所示, 与空白对照组比较, 四氢姜黄素 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组 MCF-7 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 四氢姜黄素能促进 MCF-7 细胞凋亡。

3.3 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞转移的影响

3.3.1 划痕实验 如图 5 所示, 与空白对照组比较, 四氢姜黄素 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组细胞迁移率降低 ($P<0.01$)。

3.3.2 Transwell 实验 如图 6 所示, 与空白对照组比较, 四氢姜黄素 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组穿透小室隔膜到达上层小室的底面的细胞数减少 ($P<0.01$)。

3.4 Western blot 实验 如图 7 所示, 与空白对照组比较, 四氢姜黄素 100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组 MCF-7 细胞中 Bcl-2 蛋白表

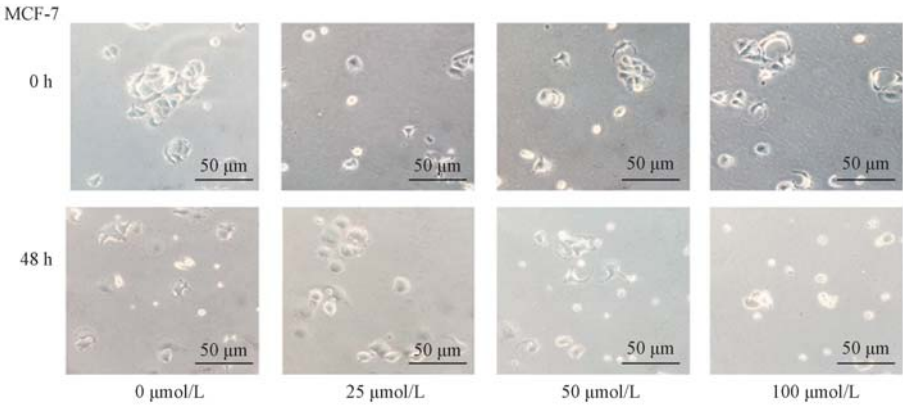
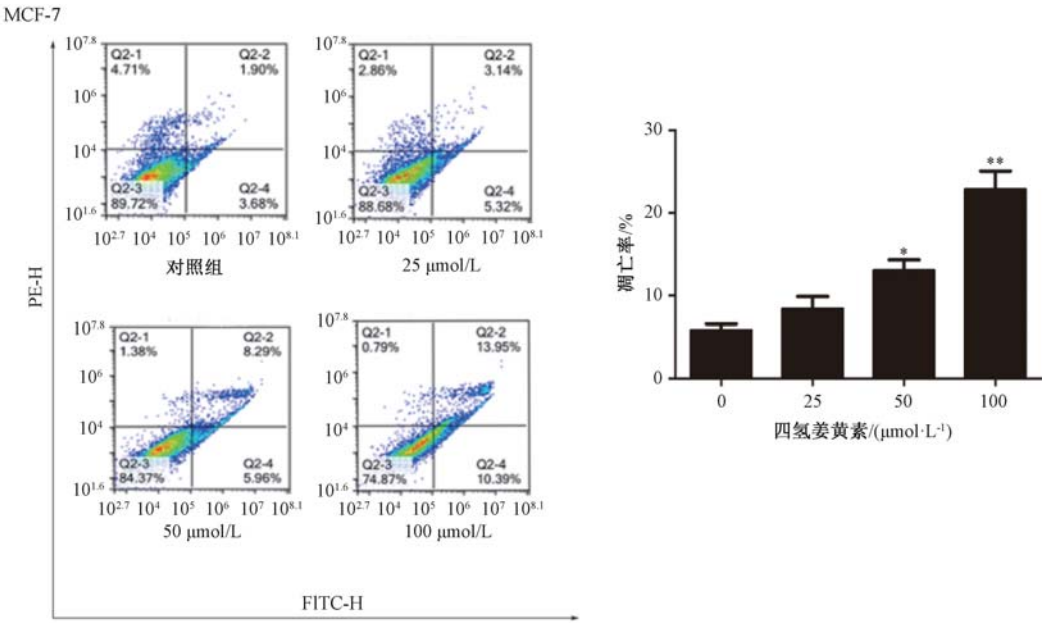
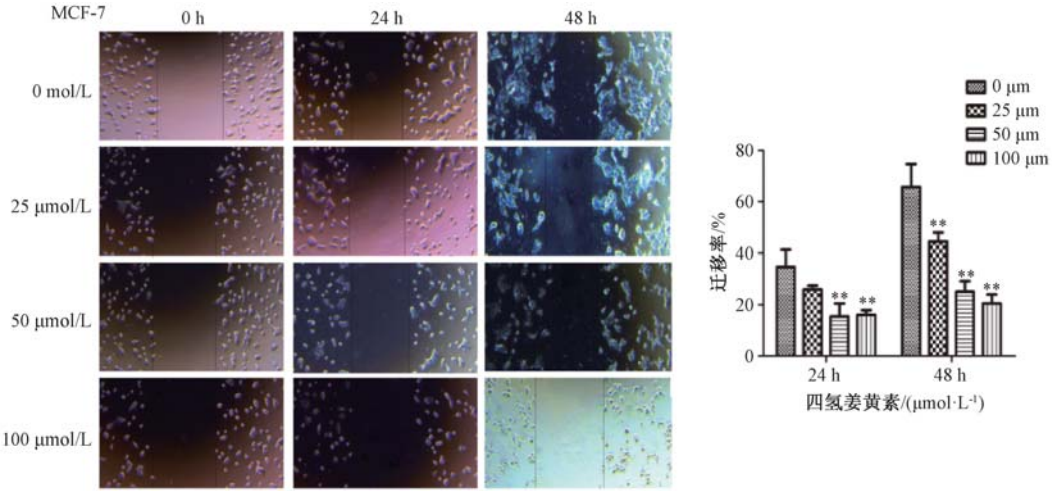


图 3 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞形态的影响 (×200)



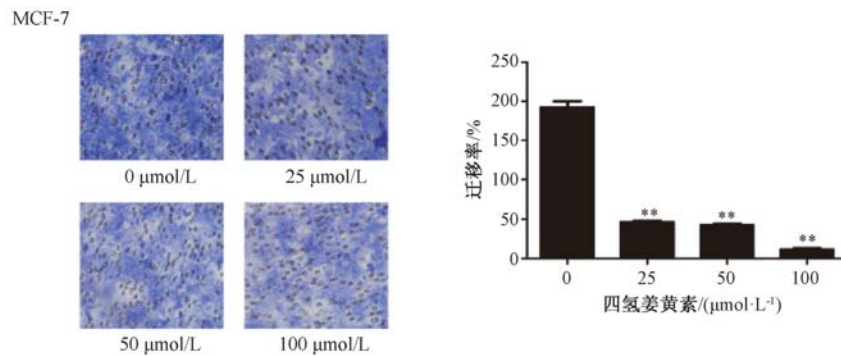
注：与空白对照组 (0 μmol/L) 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



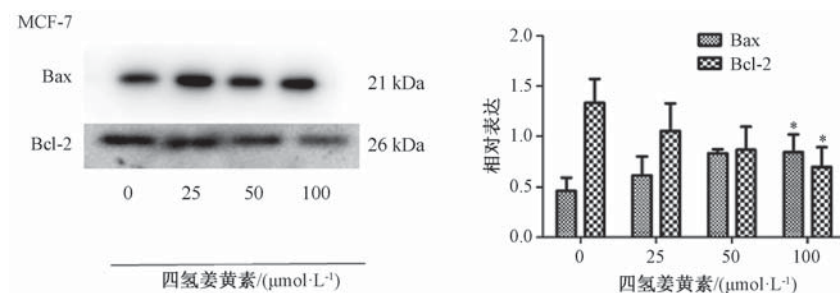
注：与空白对照组 (0 μmol/L) 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 5 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞迁移的影响 (×40) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与空白对照组（0 $\mu\text{mol/L}$ ）组比较，** $P < 0.01$ 。

图6 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞迁移的影响 ($\times 100$) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

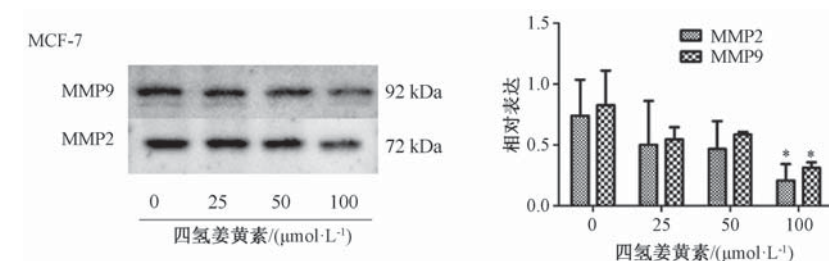


注：与空白对照组（0 $\mu\text{mol/L}$ ）组比较，* $P < 0.05$ 。

图7 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

达降低 ($P < 0.05$)，Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)，提示四氢姜黄素能促进 MCF-7 的凋亡。如图 8 所示，四氢姜黄素 100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组 MCF-7 细胞 MMP2、MMP-9 蛋白表达均

降低 ($P < 0.05$)，表示四氢姜黄素能抑制 MCF-7 细胞的转移。



注：与空白对照组（0 $\mu\text{mol/L}$ ）组比较，* $P < 0.05$ 。

图8 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞 MMP2、MMP9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

乳腺癌是女性中常见的恶性肿瘤之一，发病率和致死率高，具有起病隐匿、发展快、早期诊断率低等特征，严重危害女性健康。肿瘤的转移依靠癌细胞的迁移和侵袭两大关键途径，阻断这些途径是抗肿瘤治疗的重要方法，因此，抑制细胞转移及增殖是预防和治疗恶性肿瘤的重要研究方向^[11]。近年来，中医药在肿瘤的治疗中通过稳定瘤灶、减轻化疗副作用及改善患者预后等多种方式起到良好抗肿瘤效果^[15]。肿瘤的迁移与侵袭是肿瘤向远端转移和增殖的第一步，肿瘤细胞必须要穿透细胞外基质、基底膜组成的组织屏障才能完成转移^[16-17]。MMP-9 以酶原的形式分泌，被激活后形成 IV 型胶原酶，通过降解、破坏靠近肿瘤

表面的细胞外基质中的 IV 型、V 型胶原和明胶，然后肿瘤细胞沿着缺失的基底膜向周围组织浸润，最终导致肿瘤的侵袭和转移^[18-20]。MMP-2 是金属蛋白酶家族中与肿瘤关系最为密切的因子之一。MMP-2 是一种锌离子依赖的蛋白水解酶，由肿瘤细胞和间质细胞以酶原形式分泌，经水解后激活，能特异地降解基底膜的主要成分—IV 型胶原，还可降解 V、VI、X 型胶原、FN 和明胶，同时通过对细胞外基质的改建，促进肿瘤新生血管的形成，促进肿瘤的侵袭和转移，从而影响预后^[18-23]。

本研究中，CCK8 与克隆实验结果显示四氢姜黄素对 MCF-7 细胞的增殖具有抑制作用；流式细胞术实验及 Western blot 实验结果显示，四氢姜黄素能诱导细胞凋亡；

划痕实验、Transwell 实验及 Western blot 实验结果表明四氢姜黄素能抑制细胞的迁移。综上所述,四氢姜黄素对 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖、转移具有一定的抑制作用,可促进 MCF-7 乳腺癌细胞的凋亡,其作用机制可能是通过抑制细胞 MMP2、MMP9 的表达从而抑制 MCF-7 细胞迁移。本研究为四氢姜黄素在预防和/或治疗乳腺癌转移提供了实验依据,具有进一步研究的价值。

参考文献:

- [1] Chen W. Cancer statistics; updated cancer burden in China[J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 1.
- [2] Wörmann B. Breast cancer; basics, screening, diagnostics and treatment[J]. *Med Monatsschr Pharm*, 2017, 40(2): 55-64.
- [3] 李莉,李娇. 年轻女性乳腺癌的研究进展[J]. 继续医学教育, 2020, 34(7): 77-79.
- [4] Al-Hilli Z, Boughey J C. The timing of breast and axillary surgery after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer[J]. *Chin Clin Oncol*, 2016, 5(3): 37.
- [5] Liu N, Johnson K J, Ma C X. Male breast cancer; an updated surveillance, epidemiology, and end results data analysis[J]. *Clin Breast Cancer*, 2018, 18(5): e997-e1002.
- [6] Anastasiadi Z, Lianos G D, Ignatiadou E, et al. Breast cancer in young women; an overview[J]. *Updates Surg*, 2017, 69(3): 313-317.
- [7] DeSantis C E, Ma J, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(6): 439-448.
- [8] Wang J J, Lei K F, Han F. Tumor microenvironment; recent advances in various cancer treatments[J]. *Eur Review Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(12): 3855-3864.
- [9] 白宏,刘利兵,别蓓蓓,等. 姜黄素抗肿瘤机制及其应用的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(1): 149-153.
- [10] Hu S, Xu Y C, Meng L W, et al. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells[J]. *Exper Therapeutic Med*, 2018, 16(2): 1266-1272.
- [11] Lai C S, Ho C T, Pan M H. The cancer chemopreventive and therapeutic potential of tetrahydrocurcumin[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 831.
- [12] 廖利,华桦,赵军宁. 四氢姜黄素的研究进展[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2014, 16(12): 2708-2712.
- [13] Park C H, Song J H, Kim S N, et al. Neuroprotective effects of tetrahydrocurcumin against glutamate-induced oxidative stress in hippocampal HT22 cells[J]. *Molecules*, 2019, 25(1): 144.
- [14] Kim J, Kim H, Chung B, et al. Tetrahydrocurcumin ameliorates skin inflammation and oxidative stress and induces autophagy in mice fed a high-fat diet[J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(7): S40.
- [15] 裴晓华,彭艳梅. 中医药治疗恶性肿瘤 70 年[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2019, 11(5): 305-308.
- [16] 高应鸿,王曙光. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与恶性肿瘤侵袭和转移关系的研究进展[J]. 新医学, 2011, 42(5): 341-343.
- [17] 马林玲,孟照辉. 基质金属蛋白酶抑制剂的研究进展[J]. 临床医学, 2018, 38(7): 119-122.
- [18] Qorri B, Kalaydina R V, Velickovic A, et al. Agonist-biased signaling via matrix metalloproteinase-9 promotes extracellular matrix remodeling[J]. *Cells*, 2018, 7(9): 117.
- [19] Cancemi P, Buttacavoli M, Roz E, et al. Expression of α -enolase (ENO1), Myc promoter-binding protein-1 (MBP-1) and matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) reflect the nature and aggressiveness of breast tumors[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 3952.
- [20] 刘炳辉,潘冰. 胃癌组织中细胞外基质金属蛋白酶诱导因子、基质金属蛋白酶 9、人表皮生长因子受体 2 表达与患者临床特征及预后的相关性研究[J]. 中国基层医药, 2019, 26(22): 2694-2698.
- [21] Wu Z Q, Wang T, Fang M, et al. MFAP5 promotes tumor progression and bone metastasis by regulating ERK/MMP signaling pathways in breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 495-501.
- [22] Urrutia G, Laurito S, Campoy E, et al. PAX6 promoter methylation correlates with MDA-MB-231 cell migration, and expression of MMP2 and MMP9[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(10): 2859-2866.
- [23] 高瑞林,陈祥荣,李毅宁,等. 盐酸小檗碱通过 P13K/AKT 信号通路抑制 MMP2 和 MMP9 的表达影响膀胱癌 T24 细胞侵袭性[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2015, 36(6): 472-476.