

## . 实验研究 .

## 姜黄素对人胶质瘤 SHG44 细胞侵袭、迁移的影响

方 园 樊欣鑫 张世荣 张仕涛 朱 莽 罗 强 王文涛

【摘要】目的 探讨姜黄素对人胶质瘤 SHG44 细胞侵袭和迁移的影响。方法 胶质瘤 SHG44 细胞使用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养,终浓度分别 5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 24、48、72 h;对照组加入等量二甲基亚砜。CCK-8 比色法检测细胞增殖活力;细胞划痕实验检测细胞迁移距离及迁移率;Transwell 实验细胞侵袭能力;免疫印迹法检测胶质瘤 SHG44 细胞基质金属蛋白酶(MMP)2、9 表达。结果 姜黄素对 SHG44 细胞生长具有显著抑制,且呈时间与浓度依赖性( $P<0.05$ );最佳作用浓度在 10~20  $\mu\text{mol/L}$ 。与对照组相比,姜黄素作用后,SHG44 细胞迁移距离、迁移率、侵袭能力明显降低( $P<0.05$ ),SHG44 细胞 MMP2、MMP9 蛋白表达水平显著下降( $P<0.05$ )。结论 姜黄素可抑制胶质瘤 SHG44 细胞的增殖,进而抑制细胞的迁移及侵袭能力,且呈时间及浓度依耐性,其机制可能与下调 MMP2 和 MMP9 蛋白表达有关。

【关键词】胶质瘤;姜黄素;SHG44 细胞;迁移;侵袭

【文章编号】1009-153X(2018)06-0416-03 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

Curcumin inhibits invasion and migration of human glioma cell line SHG44 through downregulation of MMP-2 and MMP-9

FANG Yuan, FAN Xin-xin, ZHANG Shi-rong, ZHANG Shi-tao, ZHU Mang, LUO Qiang, WANG Wen-Tao. Department of Neurosurgery, The Third Hospital of Xi'an City, Xi'an 710018, China

【Abstract】Objective To study the effect of curcumin on invasion and migration of human glioma cell line SHG44 and its mechanism. Methods CCK-8 kit assay was used to assess the effects of curcumin (0, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) on the proliferation of human glioma cell line SHG44 24, 48, 72 hours after the action of curcumin. The cell scratch test and Transwell assay were used to evaluate the effects of curcumin on the invasion and migration of SHG44 cells. Western blotting was used to detect the expressions of matrix metalloproteinase (MMP-2) and MMP-9 in SHG 44 cells. Results CCK-8 kit assay showed that the curcumin significantly inhibited the proliferation of SHG44 with a concentration and time-dependent manner. The invasion and migration of SHG44 cells exposed to curcumin were significantly suppressed compared with the control group ( $P<0.05$ ). The curcumin significantly reduced the expression levels of MMP-2 and MMP-9 in SHG 44 cells compared with the control group ( $P<0.05$ ). Conclusions Curcumin can inhibit the proliferation, invasion and migration of human glioma cell line SHG44 with a concentration and time-dependent manner. The mechanism may involve in the down regulation of MMP-2 and MMP-9 in SHG 44 cells.

【Key words】Glioma; Curcumin; SHG44 cell; Migration; Invasion; MMP-2; MMP-9

胶质母细胞瘤呈浸润性生长,术后易复发,预后差<sup>[1,2]</sup>。研究表明,抑制胶质瘤细胞的侵袭和转移是治疗胶质瘤的重要手段和目标。姜黄素可抑制多种肿瘤细胞的增殖,同时还能抑制肿瘤细胞的发生、发展和转移<sup>[3-7]</sup>。本文探讨姜黄素对胶质瘤 SHG44 细胞迁移及侵袭能力的影响及其作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 细胞培养 胶质瘤 SHG44 细胞使用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养,并取

对数生长期细胞进行传代实验。

1.2 CCK-8 比色法检测细胞增殖活力 消化 SHG44 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/ml 密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,换成含不同浓度姜黄素培养基,终浓度分别 5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ;作用 24、48、72 h。对照组加入等量二甲基亚砜。每浓度设 6 个复孔,以空白孔调零;每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8(美国 MCE 公司)溶液继续培养 2 h,通过酶标仪读取 450 nm 处光密度值(optical density, OD)。抑制率(%)=(对照组 OD-实验组 OD)/对照组 OD $\times 100\%$ 。

1.3 划痕实验检测细胞迁移能力 将细胞接种于 6 孔板,每孔加入  $5 \times 10^5$  个细胞,等细胞贴壁密度融合为 85% 左右。用直尺和 10  $\mu\text{l}$  无菌枪头尖在孔中划线,每隔 0.5~1 cm 划一条线竖穿过孔,形成细胞划痕区,每孔至少划 3 条线,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱继续培养。0、24、48 h 倒置显微镜下观察并拍照,采用 Image J 软件

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.06.011

基金项目:陕西省科技计划基金资助项目(2009k12-02)

作者单位:710018,西安市第三医院神经外科(方 园、樊欣鑫、张世荣、张仕涛、朱 莽、罗 强、王文涛)

通讯作者:樊欣鑫, E-mail:neurosurgery-fxx@yahoo.co.jp

测量细胞划痕间距,并计算迁移率= $\frac{24\text{ h或}48\text{ h边缘距离}-0\text{ h边缘距离}}{0\text{ h边缘距离}}\times 100\%$ 。重复3次,取平均值。

1.4 Transwell实验检测细胞侵袭能力 取200  $\mu\text{l}$ 无血清DMEM平衡小室基底膜1~2 min;将小室移至24孔板内,每孔取100  $\mu\text{l}$  Matrigel胶均匀加入小室,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵箱静置1 h待凝固,给小室底部(24孔板底部)加入500  $\mu\text{l}$ 完全培养基,以 $1\times 10^5$ 个/ml密度将细胞接种于凝固的基质胶上培养24 h;用PBS冲洗小室2遍,4%多聚甲醛固定30 min;0.1%结晶紫500  $\mu\text{l}$ 染色30 min。200倍显微镜下随机选取5个视野区域进行细胞计数。计算侵袭率:侵袭率= $[1-(\text{对照组侵袭细胞数}-\text{处理组侵袭细胞数})/\text{对照组侵袭细胞数}]\times 100\%$ 。重复3次,取平均值。

1.5 免疫印迹法检测基质金属蛋白酶(matrix matalloproteinases, MMP)2、9表达 接种对数期细胞,姜黄素(10、20  $\mu\text{mol/L}$ )作用48 h后,提取总蛋白,BCA法蛋白浓度检测,制备蛋白样品。配置10% SDS-PAGE凝胶电泳,湿转至聚偏二氟乙烯膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,稀释一抗(MMP2、MMP9、 $\beta$ -actin),4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。然后二抗室温孵育1 h,用辣根过氧化物酶反应液,暗室显色,洗片、拍照,使用Image J软件分析蛋白条带灰度值。

1.6 统计学处理 采用SPSS16.0进行数据处理,定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 $t$ 检验, $P<0.05$ 时具有统计学差异。

2 结果

2.1 CCK-8实验筛选合适的姜黄素药物浓度 5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用SHG44细胞24、48、72 h后,SHG44细胞增殖均有不同程度被抑制,同时具有时间和浓度依赖性(表1)。作用24、48、72 h药物半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC50)分别为( $21.27\pm 2.34$ ) $\mu\text{mol/L}$ 、( $14.1\pm 1.69$ ) $\mu\text{mol/L}$ 和( $10.25\pm 2.48$ ) $\mu\text{mol/L}$ 。姜黄素 $<20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,可抑制细胞活性;当作用浓度为40  $\mu\text{mol/L}$ 时,短时间内药物显著抑制细胞活性状态,随药物作用时间延长,大量细胞出现死亡。因此,为了选择一个有效抑制细胞活性而不影响细胞生存的药物浓度,我们选择10~20  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素浓度作为实验的药物浓度。

2.2 姜黄素抑制胶质瘤SHG44细胞迁移能力 与对照组相比,姜黄素组细胞迁移距离与迁移率均明显低于对照组( $P<0.05$ ,表2)。

2.3 姜黄素抑制胶质瘤SHG44细胞侵袭能力 20  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组细胞侵袭率[( $0.927\pm 0.339$ )%] $\text{明显高于}10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组[( $0.614\pm 0.113$ )%; $P<0.05$ ],而10  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组细胞侵袭率又明显高于对照组[( $0.082\pm 0.063$ )%; $P<0.05$ ]。

2.4 姜黄素抑制SHG44细胞MMP2和MMP9蛋白表达 与对照组相比,10、20  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组细胞MMP2和MMP9蛋白表达明显低于对照组( $P<0.05$ ;图1、表3)。

表1 姜黄素对胶质瘤SHG44细胞增殖的影响

作用浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	作用时间 (h)		
	24	48	72
对照组	0.083 $\pm$ 0.031	0.089 $\pm$ 0.032	1.304 $\pm$ 0.058
5	9.102 $\pm$ 1.191*	13.081 $\pm$ 1.312* $\Delta$	25.424 $\pm$ 2.147* $\Delta$ ☆
10	26.557 $\pm$ 2.015**	37.242 $\pm$ 1.143** $\Delta$	48.789 $\pm$ 1.072** $\Delta$ ☆
20	47.023 $\pm$ 1.244**\$	68.984 $\pm$ 2.182**\$ $\Delta$	81.474 $\pm$ 1.281**\$ $\Delta$ ☆
40	78.214 $\pm$ 1.253**\$&	86.751 $\pm$ 1.527**\$& $\Delta$	93.029 $\pm$ 1.264**\$& $\Delta$ ☆

注:与对照组相应值比,\* $P<0.05$ ;与5  $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度相应值比,# $P<0.05$ ;与10  $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度相应值,\$ $P<0.05$ ;与20  $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度相应值比,& $P<0.05$ ;与作用24 h相应值比, $\Delta$   $P<0.05$ ;与作用48 h相应值比,☆  $P<0.05$

表2 姜黄素对SHG44细胞迁移距离及迁移率的影响

组别	迁移距离 (mm)			迁移率	
	0 h	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	1.291 $\pm$ 0.087	0.888 $\pm$ 0.038	0.198 $\pm$ 0.009	0.415 $\pm$ 0.042	0.486 $\pm$ 0.034
姜黄素组	1.361 $\pm$ 0.018	1.156 $\pm$ 0.036**	0.808 $\pm$ 0.082**	0.289 $\pm$ 0.026*	0.228 $\pm$ 0.051*

注:与0 h相应值比,\* $P<0.05$ ;与对照组相应值比,# $P<0.05$

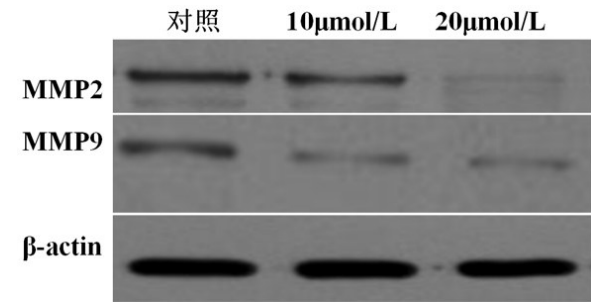


图 1 姜黄素作用胶质瘤 SHG44 细胞后 MMP2 和 MMP9 电泳图

MMP. 基质金属蛋白酶

表 3 姜黄素作用胶质瘤 SHG44 细胞后 MMP2 和 MMP9 电泳图灰度值比较

分组	MMP2	MMP9
对照组	1.889±0.121	0.8324±0.186
10 μmol/L 姜黄素	1.192±0.107*	0.552±0.059*
20 μmol/L 姜黄素	0.316±0.021**	0.451±0.034**

注:与对照组相应值比,\* $P<0.05$ ;与 10 μmol/L 作用浓度相应值比,# $P<0.05$ ;MMP. 基质金属蛋白酶

3 讨论

研究表明姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗感染等作用;还能够抑制多种肿瘤细胞的增殖<sup>[9,10]</sup>。恶性肿瘤细胞的转移与侵袭是导致临床治疗失败的核心因素,而肿瘤细胞的调控机制复杂且不明确<sup>[11]</sup>,是一个具有多因素、多基因相互调控的复杂过程<sup>[12]</sup>。由于胶质瘤呈浸润性生长,手术很难根治。MMP 在肿瘤细胞的侵袭和转移中发挥着重要的作用<sup>[13,14]</sup>,其中 MMP2、MMP9 是 MMP 家族中最重要的成员。胶质瘤细胞 MMP 活性受抑制时,将会降低胶质瘤细胞侵袭与迁移活性。本研究结果证实,姜黄素能明显抑制胶质瘤 SHG44 细胞增殖活性,对 SHG44 细胞的迁移和侵袭能力也具有抑制作用;同时,姜黄素降低 SHG44 细胞 MMP2 和 MMP9 表达水平。这提示姜黄素抑制 SHG44 细胞侵袭和转移与抑制细胞 MMP2 和 MMP9 蛋白表达密切相关。

【参考文献】

[1] Feng X, Zhou Q, Liu C, *et al.* Drug screening study using glioma stem-like cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(5): 1117-1120.

[2] Wesseling P, Kros JM, Jeuken JWM. The pathological diagnosis of diffuse gliomas: towards a smart synthesis of microscopic and molecular information in a multidisciplinary

nary context [J]. *Diagn Histopathol*, 2011, 17(11): 486-494.

[3] Shen F, Cai WS, Li JL, *et al.* Ynergism from the combination of ulinastatin and curcumin offers greater inhibition against colorectal cancer liver metastases via modulating matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression [J]. *Oncotargets Ther*, 2014, 7(1): 305-314.

[4] Abuelba H, Cotrutz CE, Stoica BA, *et al.* In vitro evaluation of curcumin effects on breast adenocarcinoma 2D and 3D cell cultures [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2015, 56: 71-76.

[5] Liao H, Wang Z, Deng Z, *et al.* Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1-MMP/MMP-2 pathway [J]. *IntJ Clin Exp Med*, 2015, 8(6): 8948-8957.

[6] 夏叶舟,谭小武. 姜黄素抑制肿瘤细胞侵袭转移的机制研究进展[J]. *中国现代医药杂志*, 2015, 17(9): 101-104.

[7] 方俊杰,杨卫忠,陈春美. ERK 介导姜黄素抑制人脑胶质瘤细胞 U251 侵袭性[J]. *中国现代应用药理学杂志*, 2009, 26(13): 1101-1104.

[8] Li Z, Ding Q, Ling LP, *et al.* Metformin attenuates motility, contraction, and fibrogenic response of hepatic stellate cells in vivo and in vitro by activating AMP-activated protein kinase [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(7): 819-832.

[9] Wilken R, Veena MS, Wang MB, *et al.* Curcumin: a review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head neck squamous cell carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10(1): 12-30.

[10] Perry M C, Demeule M, Regina A, *et al.* Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(8): 1192-1201.

[12] Wang L, Ye X, Cai X, *et al.* Curcumin suppresses cell growth and invasion and induces apoptosis by down-regulation of Skp2 pathway in glioma cells [J]. *Oncotarget* 2015, 6(20): 18027-18037.

[13] Kim YJ, Stolarska MA, Othmer HG. The role of the micro-environment in tumor growth and invasion [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2011, 106(2): 353-379.

[14] Lindroos J, Husa J, Mitterer G, *et al.* Human but not mouse adipogenesis is critically dependent on LMO3 [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 62-74.

[15] Kessen brock K, Placks V, Werb Z. Matrix metalloproteases: regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 147(2): 275-292.

(2018-01-17 收稿, 2018-03-27 修回)