

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.16.001

文章编号: 1005-8982(2017)16-0001-05

基础研究·论著

姜黄素通过上皮 - 间质转化过程对口腔鳞癌细胞株 HN4 侵袭转移的影响*

张佳¹, 黄汉², 张斌², 王志红¹

(1. 锦州医科大学, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州医科大学附属第一医院
口腔颌面外科, 辽宁 锦州 121002)

摘要:目的 旨在探讨姜黄素对口腔鳞癌细胞株 HN4 的增殖、侵袭和凋亡效应及其分子机制。**方法** 0~60 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用于口腔鳞癌细胞株 HN4, 24 h 后应用 MTT 法检测细胞的生长活性; 划痕实验检测细胞迁移作用; Transwell 实验测定对细胞的侵袭作用; 流式细胞仪检测细胞凋亡; Western blot 测定 P53、E-cadherin 和 Snail 蛋白表达水平。**结果** MTT 检测结果显示各浓度姜黄素对癌细胞生长有抑制, 其中, 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素有明显抑制。随着姜黄素浓度的增加, 对细胞凋亡有明显作用。姜黄素处理后细胞周期生长阻滞于 G₀/G₁ 期。Snail 的蛋白表达量随着姜黄素的浓度增加而减少。P53 和 E-cadherin 的表达量随着姜黄素的浓度增加而增加。**结论** 姜黄素能显著抑制口腔鳞癌细胞株 HN4 的体外生长, 上调 P53 蛋白表达诱导细胞凋亡可能是其作用机制之一。

关键词: 姜黄素; 口腔鳞癌; 凋亡

中图分类号: R739.81

文献标识码: A

Effect of curcumin on invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma HN4 cell line by EMT*

Jia Zhang¹, Han Huang², Bin Zhang², Zhi-hong Wang¹

(1. Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121002, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of curcumin on proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma HN4 cell line and the molecular mechanism. **Methods** Oral squamous cell carcinoma HN4 cells were cultured and treated with 0-60 $\mu\text{mol/L}$ curcumin, and MTT was used to assess the cell viability after 24 hours. Wound scratch assay was performed to detect the invasion of the HN4 cells. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. The protein expression levels of p53, E-cadherin and Snail were detected by Western blot. **Results** MTT assay revealed that curcumin significantly inhibited the growth of the cancer cells at the experimental concentrations, the effect was more obvious at the concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$. With the increase of curcumin concentration, the effect on cell apoptosis was getting more significant. The HN4 cells were arrested at G₀/G₁ phase after treatment. With the increase of curcumin concentration, the expression of Snail protein decreased, and the expressions of p53 and E-cadherin increased. **Conclusions** Curcumin can significantly inhibit the growth of oral squamous cell carcinoma HN4 cell line, and the mechanism may be up-regulation of p53 expression.

Keywords: curcumin; oral squamous cell carcinoma; apoptosis

收稿日期: 2016-12-15

* 基金项目: 辽宁省科技厅自然科学基金资助项目 (No: 2015020333)

[通信作者] 黄汉, E-mail: kq2015525@163.com; Tel: 0416-4197262

口腔癌为头颈部最常见的恶性肿瘤,其治疗方法以手术治疗为主,治疗后往往会使患者丧失许多重要的功能,包括面容改变、进食障碍、言语不清和吞咽困难等,极大地危害患者的生活质量^[1]。口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)为最常见的口腔癌,约占口腔恶性肿瘤的 90%,每年大约有 30 万例新增病例报道,近 3 年的报道显示,其 5 年的生存率大约为 50%^[2],使其防治逐渐成为研究热点。

姜黄素(Curcumin)是姜黄的主要有效成分,姜黄是姜科植物的根茎^[3]。作为一种传统中药,有许多方面的药理特性,包括有抗炎、抗凝、抗阿尔茨海默病、抗病毒和抗肿瘤等^[4]。姜黄素的抗肿瘤作用日益引起人们的重视,已成为研究肿瘤防治的研究热点。本文旨在研究讨论姜黄素诱导口腔鳞癌细胞 HN4 的增殖调亡及通过上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程抑制其侵袭作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 口腔鳞癌细胞株 HN4 由锦州医科大学附属第一医院重点实验室提供。

1.1.2 主要药物 改良型 RPMI-1640 培养基[HyClone, 赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司];胎牛血清(四季青,浙江天杭生物科技有限公司);双抗含 100 μ g/ml 的青霉素和 100 μ g/ml 的链霉素(HyClone, 美国);胰酶(HyClone, 美国);姜黄素(Sigma)。

1.1.3 主要实验设备及仪器 超净工作台(SW-CJ-1F, 北京净化设备厂);二氧化碳 CO₂ 培养箱(Heraeus, 德国);倒置显微镜(Olympus, 日本);低速离心机(BYL-LDS-19A, 北京医用离心机厂);EPICS XL 型流式细胞仪(美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 口腔鳞癌细胞株 HN4 复苏后,在改良型 RPMI-1640 培养基中培养,内含有 10% 小牛血清、100 μ g/ml 的青霉素和 100 μ g/ml 的链霉素。加入 5%CO₂、37℃饱和湿度条件下的培养箱中培养。

1.2.2 MTT 检测细胞活性 取对数生长期的口腔鳞癌细胞 HN4,接种到 96 孔板中,每孔 100 μ l 培养基,将 96 孔板放入培养箱中继续培养 24 h 后换液,各孔加入姜黄素,使其浓度为 0、5、10、20、30 和

60 μ mol/L,设置空白孔,孔内只加 PBS 缓冲液,每组浓度设置 4 个副孔。

1.2.3 划痕实验 先用记号笔在 6 孔板的背面画标志线,细胞铺板,放入培养箱中培养。待第 2 天细胞铺满,划痕。用 PBS 洗细胞 3 次,加入无血清培养基,放入培养箱中继续培养。拍照。Image J 软件进行结果分析。

1.2.4 Transwell 实验 将凝胶铺于培养小室滤膜上,每孔 20 μ l,37℃过夜。在膜的另面涂上纤维黏连蛋白。把约 1×10^5 个/ml 细胞 200 μ l 加入到小室内。培养箱培养 24 h 后,擦去膜上层细胞,将膜取下。封片观察。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞调亡 分别收集对照组、姜黄素组作用 24 h 的 HN4 细胞,离心管内收细胞,离心,1 000 r/min,每次 5 min,弃上清。用 2 ml PBS 清洗 1 次;离心。弃上清,依照调亡试剂盒说明书操作,上机检测。记录所得数据,Flowjo 软件处理分析。

1.2.6 siRNA 转染口腔鳞癌细胞株 HN4 实验分组:空白对照组、20 μ mol/L 姜黄素处理组、P53-siRNA 组、p53-siRNA 和 20 μ mol/L 姜黄素处理组。将口腔鳞癌细胞株 HN4 调至 5×10^4 个,96 孔板中铺板。24 h 细胞长至 80%时,LipofectAMINE 2000 进行转染。36 h 后提蛋白进行 Western blot 实验。

1.2.7 Western blot 用 0、5、10 和 20 μ mol/L 浓度姜黄素处理口腔鳞癌细胞 HN4 24 h 后,提取蛋白,电泳,半干转膜法电转移到 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)上,封闭后顺序加一抗(1:1 000)4℃过夜,二抗(1:5 000)孵育 1 h,进行杂交,ECL 化学发光试剂盒(美国 Millipore 公司)检测杂交信号。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对口腔鳞癌细胞 HN4 增殖的影响

不同浓度的姜黄素作用下口腔鳞癌细胞 HN4 的光密度(OD)值见表 1。随着姜黄素浓度的增加,表现出对口腔鳞癌细胞 HN4 的抑制作用增强。

2.2 不同浓度姜黄素对口腔鳞癌细胞 HN4 细胞的迁移作用

0、5、10 和 20 μ mol/L 浓度的姜黄素对口腔鳞癌

细胞 HN4 的侵袭作用见图 1,24 h 后所得划痕区面积分别为 (3.64 ± 0.37) 、 (4.83 ± 0.47) 、 (5.17 ± 0.63) 和 $(8.02 \pm 0.06) \mu\text{m}^2$,5、10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 浓度姜黄素的划痕区面积与 $0 \mu\text{mol/L}$ 浓度姜黄素划痕区面积比较,差异有统计学意义($F=6.701$ 、 18.491 和 288.873 , $P=0.021$ 、 0.018 和 0.000)。24 h 后姜黄素表现出了抑制细胞侵袭的作用。

2.3 不同浓度姜黄素口腔鳞癌 HN4 细胞侵袭作用的影响

0 、 5 、 10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素口腔鳞癌 HN4 细胞穿膜细胞数分别为 (166.62 ± 10.05) 、 (125.50 ± 11.90) 、 (90.85 ± 22.02) 和 (63.88 ± 8.90) 个,5、10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 浓度姜黄素的穿膜细胞数与 $0 \mu\text{mol/L}$ 浓度穿膜细胞数比较,差异有统计学意义($F=36.859$ 、 103.142 和 397.808 , $P=0.021$ 、 0.008 和 0.000)。结果显示,姜黄素作用 24 h 后可以明显抑制口腔鳞癌 HN4 细胞侵袭力,并且存在浓度依赖性。

2.4 姜黄素对口腔鳞癌细胞 HN4 周期及凋亡的影响

随着姜黄素浓度的增加,对细胞周期的分布有明显的的作用,剂量 5、10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 的姜黄素组对细胞周期的影响尤为显著。不同浓度的姜黄素作用于口腔鳞癌细胞 HN4,细胞在 G_0/G_1 、S 和 G_2/M 期的

比例见表 2。实验表明,姜黄素处理的细胞可观察到细胞周期生长阻滞于 G_0/G_1 期。

不同浓度的姜黄素对口腔鳞癌细胞 HN4 凋亡的影响见图 2,流式细胞仪分析结果显示,姜黄素处

表 1 不同浓度和不同时间姜黄素 HN4 细胞的 OD 值 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

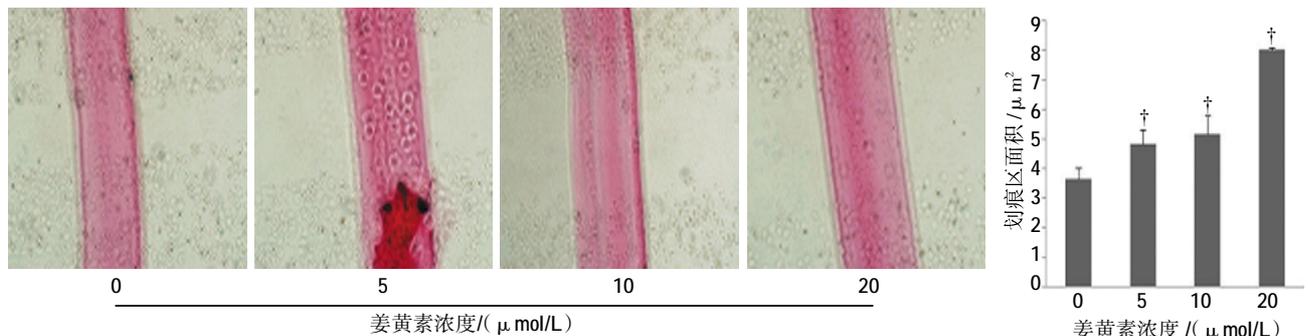
姜黄素	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
$0 \mu\text{mol/L}$	0.414 ± 0.020	0.612 ± 0.029	0.776 ± 0.043
$5 \mu\text{mol/L}$	$0.192 \pm 0.008^\ddagger$	0.191 ± 0.013	0.565 ± 0.019
$10 \mu\text{mol/L}$	$0.176 \pm 0.006^\ddagger$	$0.121 \pm 0.011^\ddagger$	$0.321 \pm 0.015^\ddagger$
$20 \mu\text{mol/L}$	$0.163 \pm 0.010^\ddagger$	$0.065 \pm 0.011^\ddagger$	$0.117 \pm 0.016^\ddagger$
$30 \mu\text{mol/L}$	$0.079 \pm 0.014^\ddagger$	$0.025 \pm 0.007^\ddagger$	$0.035 \pm 0.005^\ddagger$
$60 \mu\text{mol/L}$	$0.024 \pm 0.007^\ddagger$	$0.011 \pm 0.005^\ddagger$	$0.025 \pm 0.006^\ddagger$

注:‡与 $0 \mu\text{mol/L}$ 组相比, $P<0.05$

表 2 不同浓度姜黄素对口腔鳞癌细胞株 HN4 周期的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

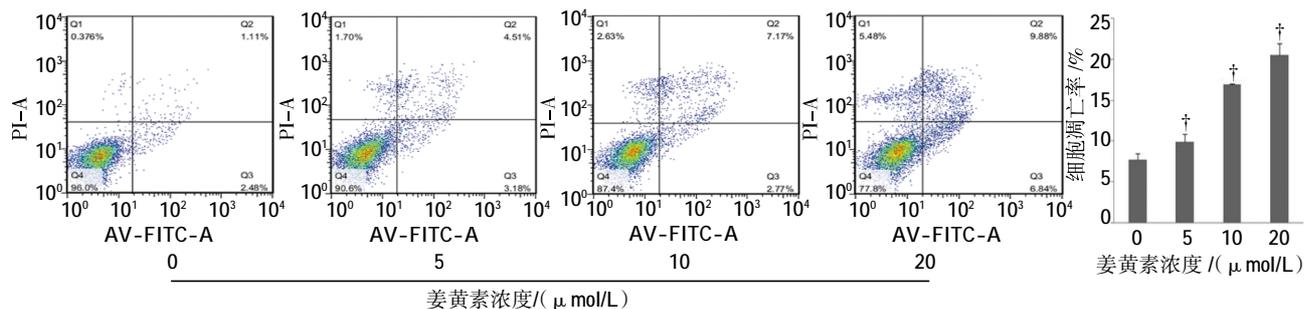
姜黄素	G_0/G_1	S	G_2/M
$0 \mu\text{mol/L}$	41.78 ± 2.13	48.41 ± 2.98	9.81 ± 0.51
$5 \mu\text{mol/L}$	$46.10 \pm 3.77^\ddagger$	42.90 ± 1.27	$11.00 \pm 1.29^\ddagger$
$10 \mu\text{mol/L}$	$51.04 \pm 2.58^\ddagger$	$39.06 \pm 3.15^\ddagger$	9.90 ± 0.74
$20 \mu\text{mol/L}$	$61.97 \pm 1.67^\ddagger$	$31.89 \pm 1.09^\ddagger$	$6.14 \pm 1.49^\ddagger$

注:‡ $0 \mu\text{mol/L}$ 组相比, $P<0.05$



‡与对照组相比, $P<0.05$; $n=3$

图 1 不同浓度姜黄素对口腔鳞癌细胞 HN4 迁移的影响



‡与 $0 \mu\text{mol/L}$ 组相比, $P<0.05$; $n=3$

图 2 不同浓度姜黄素对口腔鳞癌细胞株 HN4 凋亡的影响

理细胞 24 h 后,随着姜黄素浓度的增加,口腔鳞癌细胞 HN4 的凋亡比例明显增加。

2.5 姜黄素对 P53、E-cadherin、Snail 和 β -actin 表达量的影响

按照 0、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度给药后 24 h, Western blot 结果表明, P53 和 E-cadherin 的蛋白表达量随着姜黄素的浓度增加而增加, Snail 蛋白的表达量逐渐减少。见图 3。

2.6 P53-siRNA 转染口腔鳞状细胞 HN4 对 P53、E-cadherin 和 Snail 蛋白表达的影响

结果显示,姜黄素组与空白对照组比较 E-cadherin 表达是增加的,与以上实验相符。P53-siRNA 转染细胞中 P53 表达降低,而加入姜黄素后, E-cadherin 的表达反而减少。见图 4。

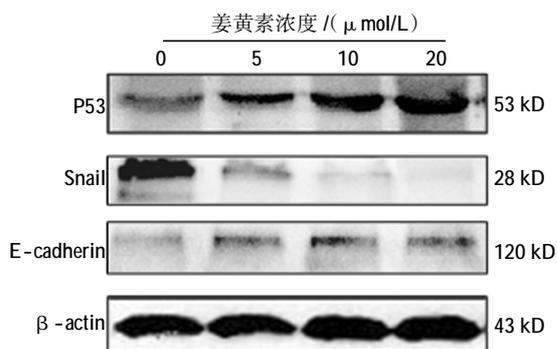


图 3 姜黄素处理后的口腔鳞癌细胞 HN4 细胞中 P53、E-cadherin 和 Snail 蛋白表达情况

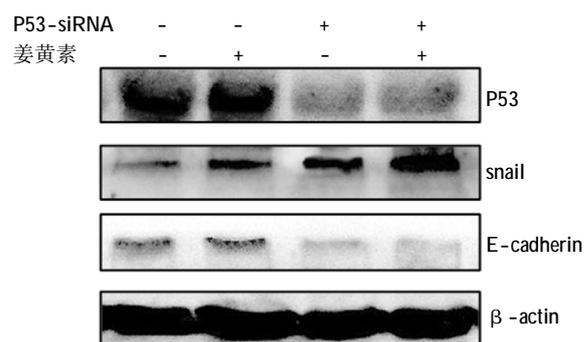


图 4 siRNA 转染口腔鳞癌细胞 HN4 细胞中 P53、E-cadherin 和 Snail 蛋白表达情况

3 讨论

口腔鳞状细胞癌是口腔常见恶性肿瘤之一,手术切除后易复发及转移。在我国,姜黄素广泛应用于不同的临床治疗中,也有大量文献表明姜黄素通过不同的机制参与抑制多种肿瘤细胞的增殖与转移,影响细胞周期,从而促进细胞凋亡,减少肿瘤细胞的

数目。本文研究表明:姜黄素能降低口腔鳞癌细胞株 HN4 的生长,并且此作用与姜黄素的剂量以及作用时间相关。姜黄素抑制口腔鳞癌细胞株 HN4 的生长与 E-cadherin 和 P53 蛋白的上调以及 Snail 蛋白的表达量减小相关,为今后进一步探讨姜黄素抗口腔鳞癌细胞的增值与侵袭的机制研究提供实验依据。

本实验研究表明,姜黄素处理的细胞可观察到,随着姜黄素浓度的增加, G_0/G_1 期细胞比例不过上升,而 G_2/M 期细胞不过减少, S 期细胞变化不大,说明细胞周期生长停滞于 G_0/G_1 期。这一结果与其他研究相符,都显示姜黄素对细胞周期的影响,表现为不一致的阻滞作用。陈教文等^[9]研究表明姜黄素抑制口腔舌癌细胞 SCC-4 的增殖和转移,其机制可能是使 *cdc27*、*EGFR substrate15*、*PPAR-alpha* 和 *H2A histone* 基因表达水平降低,从而使细胞停留在细胞周期的 M 期,达到抗口腔鳞癌细胞增殖的作用。

P53 是一种肿瘤抑制蛋白,调节各种各样的基因的表达,参与细胞凋亡、生长抑制、抑制细胞周期进程、分化和加速 DNA 修复、基因毒性和细胞应急后的衰老。有研究表明姜黄素诱导 MCF-7 细胞的凋亡伴随着 P53 基因表达的上调,并进一步应用 P53 基因缺陷型 MDAH041 细胞以及 P53 低表达及高表达 TR9-7 细胞进行研究,提出姜黄素诱导乳腺癌细胞凋亡依赖于 P53 基因相关途径^[6]。提出姜黄素诱导基底细胞癌凋亡与 P53 相关信号途径有关。

EMT 是指上皮性的细胞,包括正常上皮和肿瘤上皮,表现出间质细胞的特性,获得了迁徙、运动能力,在胚胎发育和器官纤维化过程中有重要作用^[7]。大量的研究发现,在肿瘤 EMT 过程中,上皮标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)等表达下调,间质标志物波形蛋白、N 型钙黏蛋白(N-cadherin)等表达上调,表现为上皮源性的肿瘤细胞失去细胞极性,细胞间的连接变得疏松,胞内骨架蛋白发生重组。这一系列的改变导致肿瘤细胞的黏附能力下降,迁移运动能力增加,使得肿瘤细胞更易于离开原有位置,发生转移,最终导致肿瘤患者死亡^[8]。近年来的研究表明,姜黄素能够抑制多种恶性肿瘤的增殖,迁移和浸润,包括头颈部肿瘤^[9-10]。大量实验表明,EMT 过程表现为上皮源性的肿瘤细胞肿瘤细胞的黏附能力下降,迁移运动能力增加,通过调节 Twist 和 Snail 的表达水平实现的。本次研究发现姜黄素能够诱导 E-cadherin 的表达调解 EMT 过程,抑制肿瘤的侵袭作用。

在姜黄素处理的 HN4 细胞中,E-cadherin 和 P53 具有相同的变化趋势。在 P53-siRNA 转染实验结果显示,姜黄素组与空白对照组比较 E-cadherin 表达是增加的,P53-siRNA 转染细胞中 P53 表达降低,而加入姜黄素后,E-cadherin 的表达反而减小。说明 P53 与 E-cadherin 的表达相关,P53 可能在肿瘤细胞 EMT 过程中起到重要作用。KIM^[11]和 WU 等^[12]的研究表明,P53 不仅在肿瘤细胞的侵袭和转移过程中起着关键作用,同时参与调解 EMT 重要过程。

在口腔肿瘤方向的众多研究中表明,姜黄素抗癌机制不仅表现于抑制肿瘤细胞的增殖,还包括抗肿瘤周围血管新生、抗氧化等作用^[13]。口腔鳞癌的发生、发展过程较为复杂,包括了多种基因参与调控。姜黄素抑制肿瘤细胞增殖及转移的作用较明确,机制较为复杂,值得广泛研究,为口腔鳞癌的临床治疗及药物研究提供参考。

参 考 文 献:

- [1] ZEIGHAMIAN V, DARABI M, AKBARZADEH A, et al. PNI-PAAm-MAA nanoparticles as delivery vehicles for curcumin against MCF-7 breast cancer cells[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44(2): 735-742.
- [2] CARRERAS T C, GAY E C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2015, 20(3): 305-315.
- [3] 严梅娣, 岑雪英. 姜黄素对甲状腺癌细胞 SW579 增殖和凋亡的影响[J]. *中华全科医学*, 2015, 13(3): 396-401.
- [4] 刘红艳, 王海燕, 叶松, 等. 姜黄素药理作用及其机制研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2012(6): 48-51.
- [5] 陈教文, 汤亚玲, 刘红, 等. 姜黄素对口腔舌癌细胞增殖与转移能力影响的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2011(1): 83-86.
- [6] CHOUDHURI T, PAL S, AGWARWAL M L, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction[J]. *FEBS Lett*, 2002, 512(1/3): 334-340.
- [7] LEI Z, DE S F. Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6438-6446.
- [8] FAN C C, WANG T Y, CHENG Y A, et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(10): 1735-1744.
- [9] WILKEN R, VEENA M S, WANG M B, et al. Curcumin: a review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2011(10): 12.
- [10] GAO W, CHAN J Y, WEI W I, et al. Anti-cancer effects of curcumin on head and neck cancers[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(9): 1110-1116.
- [11] KIM N H, KIM H S, LI X Y, et al. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Cell Biol*, 2011(195): 417-433.
- [12] WU D W, LEE M C, WANG J, et al. DDX3 loss by p53 inactivation promotes tumor malignancy via the MDM2/Slug/E-cadherin pathway and poor patient outcome in non-small-cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(12): 1515-1526.
- [13] BAHARUDDIN P, SATAR N, FAKIRUDDIN K S, et al. Curcumin improves the efficacy of cisplatin by targeting cancer stem-like cells through p21 and cyclin D1-mediated tumour cell inhibition in non-small cell lung cancer cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 13-25.

(张西倩 编辑)