文章编号:1000-5404(2011)02-0111-05

论著

联氨基姜黄素抑制STAT3信号通路对乳腺癌MDA-MB-231细胞侵袭迁移性的影响

王晓飞,郭变琴,张曦文,田文霞,陈婷梅,冯文莉,钟 梁,姜 蓉 (400016 重庆,重庆医科大学检验系临床血液学教研室,临床检验诊断学教育部重点实验室)

【摘要】 **目的** 探讨姜黄素衍生物——联氨基姜黄素(hydrazinocurcumin, HC)通过抑制STAT3(signal transduction and activators of transcription-3)信号通路对乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭迁移性的影响。**方法** 以人乳腺癌细胞株MDA-MB-231为研究对象,分DMSO对照组和HC处理组。采用MTT法检测HC对MDA-MB-231乳腺癌细胞的生长抑制作用,刘氏染色检测细胞形态学改变,Transwell小室检测细胞侵袭能力,细胞划痕试验检测细胞迁移能力,Western blot检测STAT3、p-STAT3、MMP-9及MMP-2的蛋白表达水平。**结果** MTT检测显示,HC处理的细胞生长受到抑制,其抑制率呈时间-剂量依赖关系;刘氏染色发现处理细胞形态发生改变,细胞变圆;Transwell小室检测显示对照组穿膜细胞数为(598.00±21.28)/视野,而10、20 μmol/L HC处理后透膜细胞数分别为(94.00±6.56)/视野和(4.00±1.00)/视野,穿膜细胞数显著低于对照组($P<0.05$);划痕试验表明对照组划痕闭合率约为54%,而10、20 μmol/L HC处理组基本无闭合($P<0.05$);Western blot检测显示,不同浓度HC处理MDA-MB-231细胞后,p-STAT3明显降低,而总STAT3水平无明显差异,MMP-9、MMP-2的表达也有减少。**结论** HC可以通过抑制STAT3的活化(即p-STAT3),降低MMP-9、MMP-2的蛋白表达水平,从而抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231的侵袭迁移性。

【关键词】 姜黄素衍生物;乳腺癌细胞;STAT3;侵袭迁移性
【中图法分类号】 R282.71;R730.23;R737.9 **【文献标志码】** A

Hydrazinocurcumin suppresses invasion and migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells through inhibiting STAT3 signal pathway

Wang Xiaofei, Guo Bianqin, Zhang Xiwen, Tian Wenxia, Chen Tingmei, Feng Wenli, Zhong Liang, Jiang Rong (Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of curcumin derivant (hydrazinocurcumin, HC) on the invasion and migration of human breast cancer of MDA-MB-231 cells through inhibiting STAT3 signal pathway. Methods Human breast cancer MDA-MB-231 cells were divided into 3 groups, control group, 10 and 20 μmol/L HC treatment groups. Growth inhibition was measured with MTT assay. Morphological changes were detected by Liu staining. Cell invasion was measured by Transwell chamber, and migration of the cells was measured with scratch assay. Expressions of STAT3, p-STAT3, MMP-9, and MMP-2 were detected by Western blot analysis. Results After treated with HC, the proliferation of MDA-MB-231 cells was inhibited in a time and dose-depending manner. Liu staining demonstrated that the cell morphology had been changed, and became round in shape. The invasion assay showed the number of treated MDA-MB-231 cells was lower than those of control (94.00±6.56 and 4.00±1.00 *vs* 598.00±21.28, $P<0.05$). Scratch assay also showed the treated cells were inhibited. Western blot analysis demonstrated that the expressions of p-STAT3, MMP-9 and MMP-2 were decreased, while total STAT3 had no significant difference compared with control. Conclusion HC inhibits the invasion and migration of the human breast cancer of MDA-MB-231 cells, probably by inhibiting STAT3 activity, and then reducing MMP-9 and MMP-2 expressions.

【Key words】 curcumin derivant; human breast cancer cells; STAT3; invasion and migration

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971131) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5077). Corresponding author: Chen Tingmei, E-mail: chentingmei@sohu.com; Feng Wenli, E-mail: fengwlcqmu@sina.com

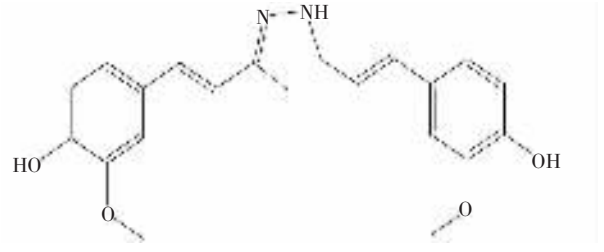
【基金项目】 国家自然科学基金(30971131);重庆市科委自然科学基金(CSTC2009BB5077)
【通信作者】 陈婷梅,E-mail:chentingmei@sohu.com;冯文莉,E-mail:fengwlcqmu@sina.com

姜黄素(curcumin)是从姜科植物中提取的一种植物多酚类物质,具有抗炎、抗氧化、抗凝、降血脂以及抑制肿瘤等作用,可以减少肿瘤细胞体内外的侵袭和转移[1-2]以及新生血管生成[3]等。本研究选用了一种新的姜黄素衍生物——联氨基姜黄素(hydrazinocurcumin,HC),与姜黄素比较,HC较大地提高了姜黄素的水溶性及稳定性,并具有较高的细胞通透性,有效改善了药物的生物利用度,具有更为优越的药理活性[4]。HC在抑制肿瘤新生血管发生方面有较好作用[5],在抗肿瘤侵袭转移等方面鲜有报道。本实验研究HC体外抗肿瘤活性及其机制,为进一步利用有效载药系统体内运输HC发挥靶向抗肿瘤作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HC由加州大学圣迭戈分校(California University of San Diego)Dr. Yanmei Zhang提供,化学式为(364.14)(图1)。乳腺癌MDA-MB-231细胞株由本室提供。MTT购自Sigma公司,STAT3鼠单克隆抗体购自B.D公司,p-STAT3鼠单克隆抗体购自Cell Signaling公司,MMP-9羊多克隆抗体购自北京中杉金桥公司,MMP-2兔多克隆抗体购自Bioworld公司,辣根酶标记山羊抗鼠IgG、兔抗山羊IgG二抗以及鼠抗β-actin抗体均购自中杉金桥公司,Transwell小室购自Milliproe公司,基质胶购自Sigma公司,刘氏染液购自珠海贝索生物技术公司。



4,4′-(1*E*,1′*E*)-2,2′-(1*H*-pyrazole-3,5-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(2-methoxyphenol)

图1 联氨基姜黄素化学式

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 人乳腺癌细胞株MDA-MB-231培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,37 ℃,5%的CO_2,取对数生长期细胞用于实验。依据MTT结果分组,对照组:DMSO处理12 h,实验组:10、20 μmol/L HC处理12 h。

1.2.2 MTT实验 取对数生长期细胞,调整细胞数到4×10^5/ml,将细胞悬液加入96孔板,HC终浓度调整为10、20、30、50 μmol/L。调零孔不加细胞,对照组为单纯细胞悬液,每个浓度设3个复孔,处理细胞12、24、48、72 h后,1 000 r/min离心,弃去培养液。每孔加入180 μl无血清DMEM培养基和20 μl MTT,37 ℃培养4 h,1 000 r/min离心,弃上清,每孔加100 μl DMSO溶解,摇床振荡10 min,酶标仪490 nm波长测定光密度值[*D*(490)]。细胞生存率=[试验组*D*(490)-空白对照*D*(490)]/实验对照组*D*(490)×100%。实验重复3次。

1.2.3 侵袭实验 将Matrigel胶按50 μl/孔均匀铺于Transwell小室中,取不同处理的细胞,用无血清DMEM培养基调整细胞数为1×10^5/ml,每孔小室加入200 μl细胞悬液,分为DMSO处理组,10、20 μmol/L HC处理组,将Transwell小室置于24孔板中,同时在其下层加入500 μl/孔的含20%胎牛血清的DMEM培养基。培养24 h后取出小室,用棉签擦去基质胶,PBS洗3次,并用95%的乙醇固定。自然风干后用0.1%结晶紫染小室底部膜10 min,漂洗3次。结果判定:光镜下(10×10倍),计数5个随机视野的穿膜细胞数,取均值,实验重复3次。

1.2.4 划痕实验 在6孔板中加入细胞悬液,待细胞贴壁形成单层细胞后,用无菌20 μl枪头均匀划3条横线,用PBS洗3次,去除划下细胞。无血清培养48 h,用吉姆萨染色后观察并测定划痕闭合宽度。

1.2.5 细胞刘氏染色 细胞爬片后,分别用DMSO,10、20 μmol/L HC处理12 h后,进行染色。染色具体步骤按照试剂说明书进行。

1.2.6 Western blot检测 分别收集对照组、实验组细胞约5×10^6个,用细胞裂解液裂解细胞后,提取总蛋白,使用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至NC膜上,室温封闭1 h,洗膜后,加一抗1∶1 000,4 ℃过夜,洗膜后,加二抗1∶5 000室温放置1 h,化学发光法显色。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件进行两组间比较的独立样本*t*检验。

2 结果

2.1 HC对MDA-MB-231细胞增殖抑制作用

HC对MDA-MB-231细胞增殖抑制呈时间-剂量依赖(图2),处理12 h后,10、20 μmol/L的细胞生存率分别为(71.35±0.47)%、(54.52±1.45)%。

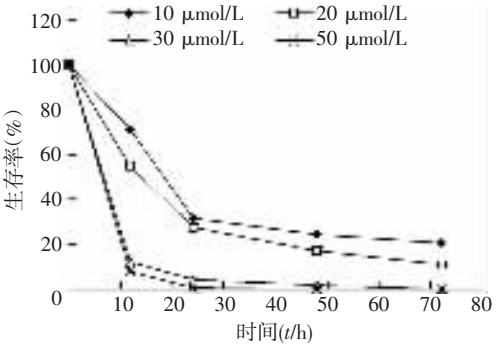


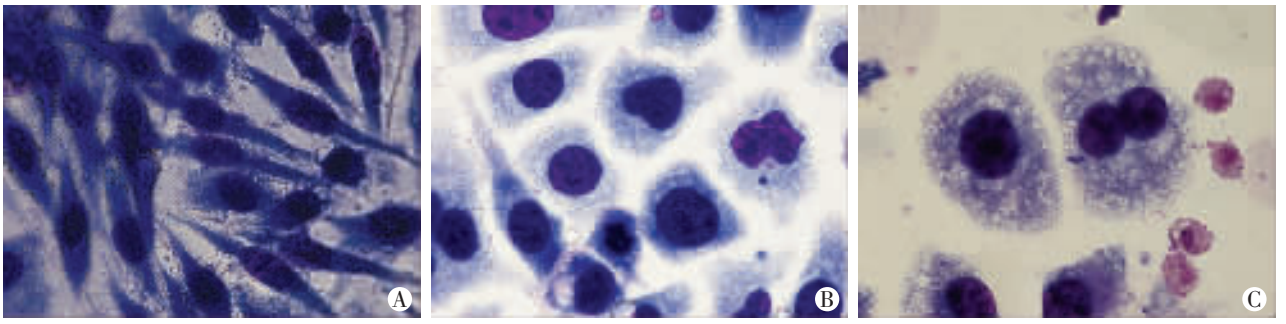
图2 HC对MDA-MB-231细胞增殖抑制作用

2.2 HC对MDA-MB-231细胞形态的影响

DMSO对照组细胞呈梭形生长,细胞狭长;HC处理后,细胞多呈不规则形态,类圆形,少数细胞质内有空泡(图3)。

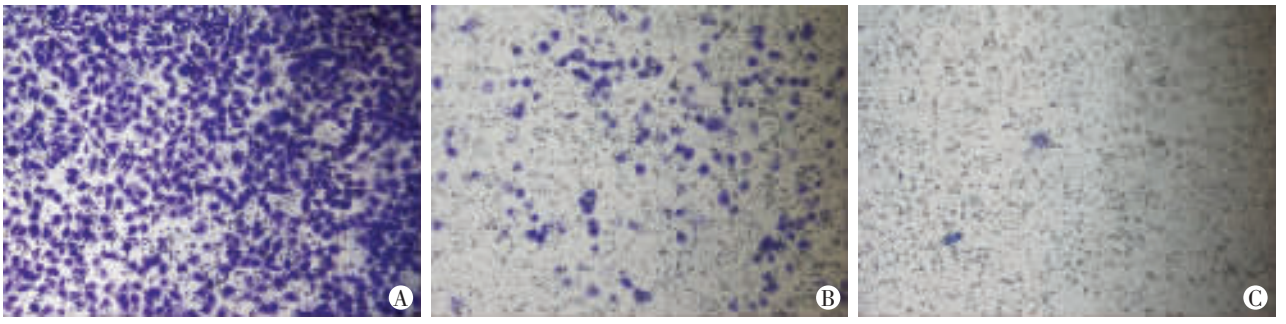
2.3 HC对乳腺癌细胞体外侵袭能力的影响

DMSO对照组透膜细胞数为(598.00±21.28)/视野,10 μmol/L HC处理组透膜细胞数为(94.00±6.56)/视野,20 μmol/L HC处理组透膜细胞数为(4.00±1.00)/视野。DMSO对照组明显高于另外两组($P<0.05$),表明使用HC处理后能明显抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231的侵袭能力。见图4。



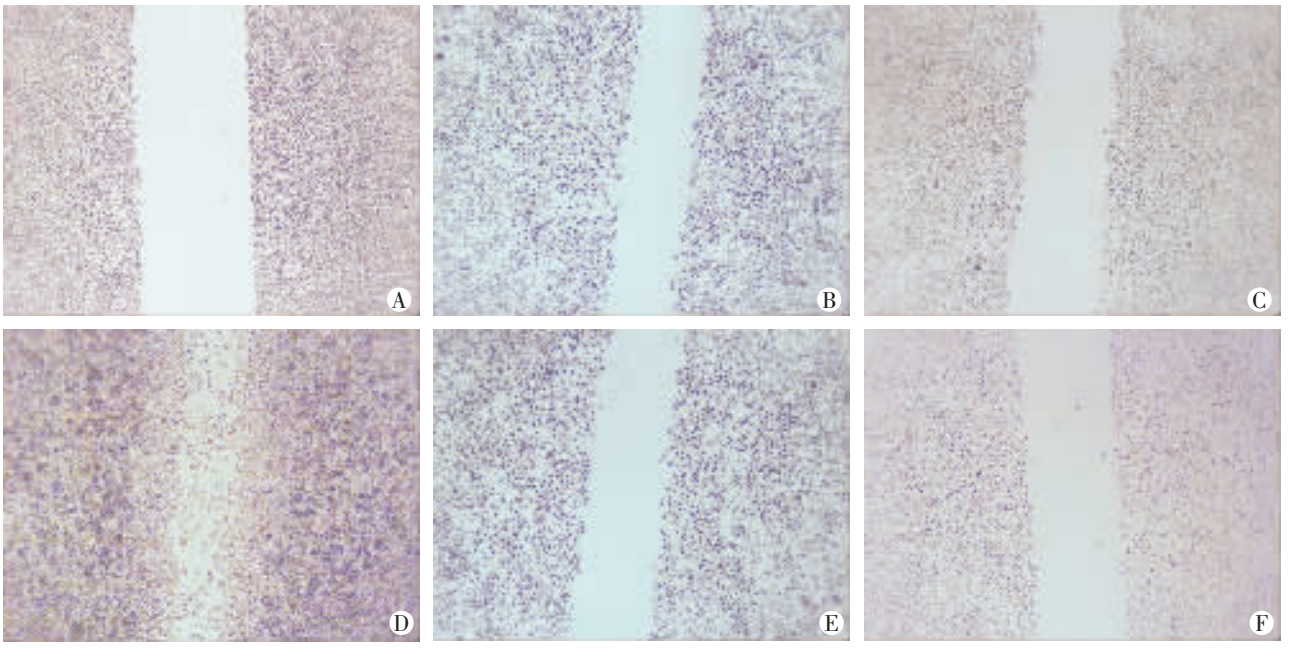
A:DMSO 对照组;B:10 μmol/L HC 处理组;C:20 μmol/L HC 处理组

图 3 HC 对 MDA-MB-231 细胞形态学的影响 (刘氏染色 ×100)



A:DMSO 对照组;B:10 μmol/L HC 处理组;C:20 μmol/L HC 处理组

图 4 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外侵袭能力的改变 (结晶紫染色 ×100)



A、D:DMSO 处理 0、48 h;B、E:10 μmol/L HC 处理 0、48 h;C、F:20 μmol/L HC 处理 0、48 h

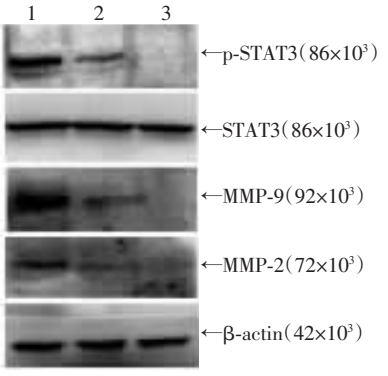
图 5 HC 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移能力的影响 (吉姆萨染色 ×40)

2.4 HC 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移能力的影响

DMSO 对照组划痕闭合率约为 54%,而两种浓度 HC 处理组基本无闭合,DMSO 对照组显著高于另外两组($P<0.05$),可见 HC 处理后可明显降低乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移。见图 5。

2.5 Western blot 检测 STAT3、p-STAT3、MMP-9 及 MMP-2 的表达

10 μmol/L HC 处理组 p-STAT3,MMP-9,MMP-2 蛋白水平较之于 DMSO 对照组明显减少,20 μmol/L HC 处理组则完全抑制其表达,而总 STAT3 蛋白水平无明显差异。见图 6。



1:DMSO 对照组 2:10 μmol/L HC 处理组 3:20 μmol/L HC 处理组

图6 HC 对 MDA-MB-231 细胞中 p-STAT3、STAT3、MMP-9、MMP-2 蛋白水平的影响

3 讨论

STAT3(signal transduction and activators of transcription-3)属于转录因子 STATs 家族成员,是多种致癌信号通路的汇聚点。当细胞因子或生长因子激活 STAT3 上游的 JAK 或 SRC 酪氨酸激酶后,使 STAT3 活化形成 p-STAT3,p-STAT3 再形成二聚体转入细胞核,调节多种与肿瘤细胞转化、增殖、侵袭转移等相关的靶基因转录活性[6-7]。近年来姜黄素抗肿瘤作用已受到国内外的广泛关注,它主要通过调节众多与肿瘤细胞恶性转化相关的转录因子、生长因子、细胞因子和酶类等,发挥抑制肿瘤效应[8-9],而姜黄素通过抑制 STAT3 信号通路而影响肿瘤细胞恶性生物学功能已有报道。如姜黄素在多发性骨髓瘤细胞株中,通过抑制 JAK-2 的磷酸化而进一步阻止诱导性和组成性的 STAT3 的活化,以及其核转位过程[10],同时也可以抑制多发性骨髓瘤和胰腺癌患者的外周血单核细胞中的 STAT3 的组成性活化[11]。在 T 细胞白血病中,姜黄素可以通过抑制 STAT3 上游的 JAK 激酶的活性,从而阻止 STAT3 的组成性磷酸化[12]。在 H-RS 细胞株中,姜黄素可以通过抑制 JAK2 的磷酸化而阻断 STAT3 的磷酸化[13]。在头颈部鳞状细胞癌细胞株中,姜黄素可以抑制组成性和 IL-6 诱导的 STAT3 的磷酸化[14]。本实验使用了一种姜黄素衍生物——联氨基姜黄素处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231 后,发现细胞增殖抑制与 HC 呈时间剂量依赖性,其中 10 μmol/L 和 20 μmol/L 处理 12 h,细胞存活率均大于 50%,故我们选用此两种浓度处理细胞,观察药物作用后细胞的生物学功能变化情况。Western blot 检测显示 p-STAT3 有明显减弱,而 STAT3 则基本无变化,且 HC 相比于姜黄素显示出更强的量效关系[15]。

侵袭转移是肿瘤细胞重要的病理生理过程,直接关系到肿瘤患者的预后和转归,基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinase,MMPs)是侵袭转移相关过程中的重要因素,其中 MMP-9 和 MMP-2 是 STAT3 下游的重要靶基因。由此我们进一步通过 Western blot 检测 MMP-9 和 MMP-2 的表达发现,HC 处理后这两种蛋白的表达同样明显减弱。而且通过细胞形态染色,细胞划痕试验和 Transwell 小室细胞侵袭试验,观察到细胞形态在 HC 处理后发生较明显改变,且处理组细胞的侵袭迁移能力明显低于对照组($P<0.05$)。近来研究发现,人乳腺癌标本中 MMP-9 的表达与 STAT3 活性密切相关,且由 STAT3 持续激活质粒转化的乳腺癌上皮细胞中 MMP-9 的活性明显增高,认为 STAT3 可能通过对 MMP-9 的调控促进了乳腺癌的进展[15]。另有研究证实 MMP-2 可能是 STAT3 的下游靶基因,STAT3 磷酸化进入细胞核,可以与 MMP-2 启动子结合,调控 MMP-2 基因的表达[16-17]。人乳腺癌细胞组成性 STAT3 激活可上调 MMP-9、MMP-2 表达,从而高效降解细胞外基质和基底膜,促进肿瘤细胞侵袭转移[18]。基于本实验结果以及相关文献报道,我们认为 HC 可抑制 STAT3 的活化,进而调节 MMP-9,MMP-2 的表达,最终抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭和迁移。

本研究表明 HC 能有效发挥抗肿瘤效应,但是由于细胞的侵袭迁移性所涉及的环节较为复杂,而 HC 的作用靶点以及 STAT3 的下游分子又众多,故还需进一步研究证实在 HC 抑制乳腺癌细胞侵袭是否还存在其他机制,为 HC 治疗肿瘤的临床应用提供更好的参考和依据。

参考文献:

[1] Goel A, Aggarwal B B. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs[J]. Nutr Cancer, 2010, 62(7):919-930.

[2] Chen H W, Yu S L, Chen J J, *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.

[3] 杨鹰,谢荣凯,阎萍,等. 姜黄素对卵巢癌微血管内皮细胞生长及乙酰肝素酶表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18):1872-1875.

[4] Rathore R, Jain J P, Srivastava A, *et al*. Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies:HPLC method development and validation [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 46(2):374-380.

[5] Shim J S, Kim D H, Jung H J, *et al*. Hydrazinocurcumin, a novel synthetic curcumin derivative, is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation [J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10(9):2987-2992.

[6] Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, *et al*. Targeting Stat3 in the myeloid compartment drastically improves the *in vivo* antitumor functions of adoptively transferred T cells[J]. Cancer Res, 2010, 70

(19):7455 – 7464.
[7] Spano J P, Milano G, Rixe C, *et al*. JAK/STAT signalling pathway in colorectal cancer: a new biological target with therapeutic implications [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(16):2668 – 2670.
[8] Heng M C. Curcumin targeted signaling pathways: basis for anti-photoaging and anti-carcinogenic therapy [J]. Int J Dermatol, 2010, 49(6):608 – 622.
[9] 吴晓健, 吴凯南. 姜黄素对人乳腺癌 MCF-7 细胞抗增殖作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(18):1870 – 1872.
[10] Bharti A C, Donato N, Aggarwal B B. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells [J]. J Immunol, 2003, 171(7):3863 – 3871.
[11] Dhillon N, Aggarwal B B, Newman R A, *et al*. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(14):4491 – 4499.
[12] Rajasingh J, Raikwar H P, Muthian G, *et al*. Curcumin induces growth-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active JAK-STAT pathway in T cell leukemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(2):359 – 368.
[13] Mackenzie G G, Queisser N, Wolfson M L, *et al*. Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells [J]. Int J Cancer, 2008, 123(1):56 – 65.
[14] Chakravarti N, Myers J N, Aggarwal B B. Targeting constitutive and interleukin-6-inducible signal transducers and activators of transcription 3 pathway in head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin (diferuloylmethane) [J]. Int J Cancer, 2006, 119(6):1268 – 1275.
[15] Lin L, Hutzen B, Ball S, *et al*. New curcumin analogues exhibit enhanced growth-suppressive activity and inhibit AKT and signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation in breast and prostate cancer cells [J]. Cancer Sci, 2009, 100(9):1719 – 1727.
[16] Dechow T N, Pedranzini L, Leitch A, *et al*. Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(29):10602 – 10607.
[17] Xie T X, Wei D, Liu M, *et al*. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis [J]. Oncogene, 2004, 23(20):3550 – 3560.
[18] Xie T X, Huang F J, Aldape K D, *et al*. Activation of Stat3 in human melanoma promotes brain metastasis [J]. Cancer Res, 2006, 66(6):3188 – 3196.

(收稿:2010-08-09 修回:2010-10-11)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2011)02-0115-01

个案与短篇

17α-羟化酶缺陷假两性畸形 1 例

刘云涛[1,2],陈 兵[1],姜友昭[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科[1];443001 湖北 宜昌,三峡大学仁和医院内分泌科[2])

【关键词】 假两性畸形;肾上腺增生;17α-羟化酶
【中图法分类号】 R586 【文献标志码】 B

先天性肾上腺皮质增生症是一组肾上腺皮质激素生物合成酶系中某一或几种酶的先天性缺陷,而使皮质醇等激素水平改变所致的一组疾病。最常见的酶缺陷为 21-羟化酶缺陷,其次为 11β-羟化酶缺陷。17α-羟化酶缺陷非常罕见[1]。本科 2010 年 7 月收治 1 例,现报告如下。

1 临床资料

患者社会性别女性,19 岁,因反复头昏 2 个月余,加重伴心慌、四肢麻木 1 d 入院。入院前曾在当地医院测血压 220/150 mmHg,给予静滴硝普钠注射液治疗后血压无明显下降,转我院。入院体检:心率 121/min,血压 188/136 mmHg。神清,身高 172 cm,体质量 60 kg,皮肤色素深,乳腺未发育。无腋毛,双下肢无水肿。四肢及躯干骨骼、肌肉较同龄女孩粗壮。双侧腹股沟未触及睾丸。外生殖器检查见:无阴毛生长,外阴发育似女性,尿道外口正常,阴道发育可。余查体无特殊。月经史:无月经初潮。患者家族中无类似疾病患者。辅助检查:性激素:孕酮 21.43 ng/ml(0.31 ~ 18.50 ng/ml),促卵泡激素 62.45 mIU/ml(1.79 ~ 22.50 mIU/ml),E2 2 pg/ml(27 ~ 433 pg/ml),T 0.01 ng/ml(0.10 ~ 0.75 ng/ml),血钾 2.78 mmol/l。皮质醇节律:8am 29.60 ng/ml(50 ~ 280 ng/ml),4pm 35.40 ng/ml,0am 22.03 ng/ml,次日 8am 32.95 ng/ml。17α-羟孕酮 1.07 nmol/L(1.22 ~ 3.09 nmol/L),ACTH 396 pg/ml(0 ~ 46 pg/ml),脱氢表雄酮 < 0.407 μmol/L(0.950 ~ 11.670 μmol/L),雄烯二酮 < 1.05 nmol/L(1.00 ~ 12.20 nmol/L)。血管紧张素Ⅱ测定结果 33.15 ng/L(55.30 ~ 115.30 ng/L)。肾上腺 CT 增强示双肾上腺明显增生。头颅磁共振未见明显异常。骨龄测定:手骨相当于骨龄 11.2 岁。子宫附件超声示:未见子宫及双侧卵巢影像。染色体为 46, XY。骨密度测定提示重度骨质疏松。入院后考虑先天性肾上腺皮质增生 17α-羟化酶缺陷,给予持续静滴硝普钠注射液,降血压,血压维持于 190/110 mmHg 左右。完善相关检查,诊断明确后给予醋酸泼尼松片 5 mg 8am 口服,2.5 mg 4pm 口服,4 d 后停硝普钠,给予硝苯地平控释片 30 mg 口服 2 次/d 降血压,血压维持于 160/100 mmHg 左右,患者头痛、心慌消失。血压平稳后转外科腹腔镜腹腔探查,于腹腔内找到两侧睾丸组织,送病检。病理检查结果:双侧睾丸组织轻度慢性炎。见图 1、2。

【通信作者】 陈 兵,E-mail:Chenbing3@medmail.com.cn

(下转 123 页)