

联氨基姜黄素脂质体纳米颗粒对 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响

田文霞, 张曦文, 王晓飞, 唐浩, 党微旗, 罗奕, 孔嵌岬, 陈婷梅*

重庆医科大学 医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室 重庆市重点实验室, 重庆 400016

摘要: **目的** 探讨联氨基姜黄素 (hydrazinocurcumin, HC) 脂质体纳米颗粒 (NPs) 对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响。**方法** 通过薄膜分散-超声法制备联氨基姜黄素脂质体纳米颗粒 (HC-NPs)。用 HC-NPs 处理细胞后, MTT 法检测细胞增殖, 刘氏染色法检测细胞形态学改变, 流式细胞术检测细胞周期与凋亡, Transwell 检测细胞的侵袭和迁移, Western blotting 检测与细胞周期、凋亡、侵袭及迁移相关蛋白分子的变化。**结果** HC-NPs 可抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖, 使细胞形态变圆, 诱导细胞发生 G₂/M 期阻滞, 使细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.01$), 抑制细胞的侵袭和迁移。HC-NPs 可下调磷酸化-信号转导和转录激活因子 (p-STAT3) 以及下游分子 Cyclin D1、Survivin、Bcl-2 及 MMP-9 的表达, 上调 Bax 的表达。**结论** HC-NPs 可能通过抑制 STAT3 的激活, 抑制细胞增殖、侵袭和迁移, 促进细胞凋亡。

关键词: 联氨基姜黄素; 脂质体纳米颗粒; 人乳腺癌; MDA-MB-231; 凋亡; 侵袭; 迁移

中图分类号: R282.710.5; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1773-06

Effects of liposome nanoparticles of hydrazinocurcumin on cell proliferation, apoptosis, invasion, and migration in MDA-MB-231 cells

TIAN Wen-xia, ZHANG Xi-wen, WANG Xiao-fei, TANG Hao, DANG Wei-qi, LUO Yi, KONG Qian-ran, CHEN Ting-mei

Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the effects of liposome nanoparticles of hydrazinocurcumin (HC-NPs) on cells proliferation, apoptosis, invasion, and migration in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** Liposome HC-NPs were prepared by film-sonication method and then were used to treat human breast cancer MDA-MB-231 cells. The treated cell survival was analyzed by MTT; Morphological changes were detected by Liu staining; The cell cycle and apoptosis were investigated by FCM assay; Then invasion and migration of the cells were analyzed by Transwell. Moreover, the expression of proteins correlated to cell cycle arrest, apoptosis, invasion, and migration were detected by Western blotting. **Results** The cell proliferation was inhibited by HC-NPs, the cells became round in shape, and the cells were arrested in G₂/M phase, the ratio of apoptosis was increased ($P < 0.01$), the cells invasion and migration were restrained. The expression of p-STAT3, CyclinD1, Survivin, Bcl-2, and MMP-9 were down-regulated, while the expression of Bax was up-regulated. **Conclusion** The effects of HC-NPs on the suppression of cell proliferation, invasion, and migration, and induction of cells apoptosis may be related to the inhibition of STAT3 activation.

Key words: hydrazinocurcumin (HC); liposome nanoparticles; human breast cancer; MDA-MB-231; apoptosis; invasion; migration

姜黄素 (curcumin) 是从姜科植物根茎中提取的一种有效成分, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和调血脂等作用^[1-4]。但因姜黄素水溶性低、体内吸收少、代谢消除速率快的特点^[5], 导致其生物利用度低, 限制了其作为治疗性药物的应用^[6]。为改善姜黄素

的生物利用度, 更好地发挥其体内药理作用, 很多学者在姜黄素体内载药系统方面做了较多研究^[7]。联氨基姜黄素 (hydrazinocurcumin, HC, 结构式见图 1) 是一种姜黄素衍生物, 与姜黄素比较, 有较高的水溶性、较低的药物有效作用浓度和不良反应。

收稿日期: 2011-04-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NSFC30971131); 重庆市科委自然科学基金资助项目 (2009BB5077)

作者简介: 田文霞 (1987—), 女, 硕士, 研究方向为肿瘤微环境。E-mail: twx111@163.com

*通讯作者 陈婷梅 Tel: (023)68485223 E-mail: chentingmei@sohu.com

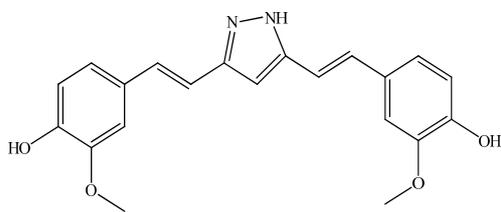


图 1 联氨基姜黄素的结构

Fig. 1 Structure of HC

前期研究发现 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 HC 可明显抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭、迁移并促进其凋亡^[8]。本课题组将 HC 制成脂质体纳米颗粒后, 药物包封率提高 2~3 倍, 本实验对 HC 脂质体纳米颗粒 (HC-MPs) 进行体外抗乳腺癌实验, 以探讨此载药颗粒的抗肿瘤作用机制, 并为其进一步体内研究奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 仪器

RV10 数显型 V 旋转蒸发仪 (德国 IKA 公司); DYCZ-24DN 双向垂直蛋白电泳仪 (北京市六一仪器厂); 微型脂质体挤压式均质仪 (Avanti[®] Polar Lipids, Inc)。

1.2 药品与试剂

HC, 加州大学圣迭戈分校 Zhang Yan-mei 惠赠, 经 HPLC 分析质量分数 >95%; 二油酰基软磷脂 (DOPC)、胆固醇、二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺-N-甲氧基聚乙二醇-2000 (DOPE-PEG), 均购自 Avanti[®] Polar Lipids 公司; MTT (Sigma 公司); DMEM (高糖) 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程和材料研究所); Pro-light HRP 化学发光检测试剂 (美国 Millipore 公司); 小鼠抗信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 单克隆抗体 (BD 公司); 小鼠抗 p-STAT3 单克隆抗体 (Cell Signaling 公司); 兔抗 Bax 多克隆抗体, 小鼠抗 CyclinD1 单克隆抗体, 山羊抗 MMP-9 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司); 兔抗 Survivin 多克隆抗体 (Bioworld 公司); 兔抗 Bcl-2 多克隆抗体 (武汉博士德公司); 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记 II 抗 (北京中杉金桥公司)。

1.3 HC 脂质体纳米颗粒 (HC-NPs) 的制备

精密称取 DOPC、DOPE、DOPE-PEG、HC 置于茄形瓶中, 加入氯仿使脂质完全溶解。将茄形瓶

置旋转蒸发仪上, 40 $^{\circ}\text{C}$ 低压蒸发溶剂, 使脂质溶液形成一层均匀薄膜。加入磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 6.5) 10 mL 水化 6 h, 水化液水浴超声 10 min, 超声破碎仪超声 3 min, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 100 nm 滤膜高压挤出, 得 HC-NPs 混悬液。HC-NPs 混悬液为乳白色半透明胶状液体, 透射电镜下形态表现为 150 nm 左右脂质体颗粒, 粒度分布为单峰, 粒度分布为 (158 \pm 11) nm。荧光显微镜观察 HC-NPs 与 4T1 细胞共孵育 1 h 即能纳入细胞内, 在 4 h 达高峰。

1.4 细胞培养

乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 由本实验室提供。MDA-MB-231 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 根据不同实验目的分别定量接种在 6 孔板以及细胞培养瓶中备用。

1.5 MTT 检测细胞增殖

收集对数生长期细胞, 以 $6 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 设 5 个复孔, 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 分别加体积分数为 10% 的 NPs、HC-NPs, PBS 孵育 24 h, PBS 洗 3 次, 加入 180 μL 无血清培养基、20 μL MTT, 继续培养 4 h, 弃去培养液, 加 100 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪于 490 nm 处, 检测各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值}}$$

1.6 刘氏染色法检测 MDA-MB-231 细胞形态学变化

细胞爬片后, 分别用 PBS (对照组)、10% NPs、10% HC-NPs 处理细胞 24 h, 刘氏染液染色。染色具体步骤按照说明书进行。

1.7 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞周期及凋亡的变化

将各组细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心收集细胞, 每组细胞数 $\geq 1 \times 10^6$, 每组设 3 个复管, 以 70% 乙醇固定, PBS 洗细胞 3 次, 碘化丙啶 (PI) 染色 30 min, 流式细胞术检测。同法收集细胞, 加 1 mL PBS 振荡成单细胞悬液, Annexin V-PE/7-AAD 双染色后, 流式细胞术检测。

1.8 Transwell 检测细胞的侵袭和迁移能力的变化

将对照组、NPs 组、HC-NPs 组细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 洗 1~2 次, 用无血清 DMEM 重悬, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 。将 Matrigel 预先置 4 $^{\circ}\text{C}$ 融化, 用无血清 DMEM 培养基将其稀释至 1:8, 混匀, 以 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加至 Transwell 小室上室的

滤膜上, 整个操作在冰上无菌条件进行, 37 °C 孵育 30 min, Matrigel 凝固。将 Transwell 小室放入每孔加有 500 μL 含 10% 胎牛血清 DMEM 的 24 孔板中, 每个小室加入各组细胞悬液 200 μL, 37 °C、5% CO₂ 孵育 18 h。取出 Transwell 小室, 将其倒置, PBS 洗 2 次, 自然晾干, 结晶紫染色 5 min, 用棉签擦净小室内滤膜上层未侵袭的细胞。正置显微镜下观察小室滤膜底膜下室侧附着的细胞。每组随机选取 5 个 200 倍镜视野, 计数细胞个数, 求得平均值。迁移试验步骤同上, 除外小室内不加 Matrigel, 且小室内加入细胞后孵育 3 h 后染色, 观察结果。

1.9 Western blotting 法检测与细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移相关蛋白的表达

取 30 μL 细胞裂解液 (含蛋白 100 μg) 用 12% 的分离胶电泳分离, 半干转法转到 PVDF 膜上, 于 4 °C、5% 封闭蛋白干粉封闭过夜, 洗膜后加一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, 再洗膜后加二抗 (1 : 2 000) 室温放置 2 h, 化学发光法显色。

1.10 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

处理 24 h 后, 未载药的 NPs 组的细胞存活率为 (93.270 ± 6.915) %; 而 HC-NPs 组的细胞存活率仅为 (62.670 ± 14.017) %, 比 NPs 组显著降低 ($P < 0.05$), 可见 HC-NPs 可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖。结果见图 2。

2.2 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞形态的影响

处理 24 h 后, 对照组和 NPs 组细胞呈梭形生长; HC-NPs 组细胞形态变圆, 少数细胞质内出现空泡。结果见图 3。

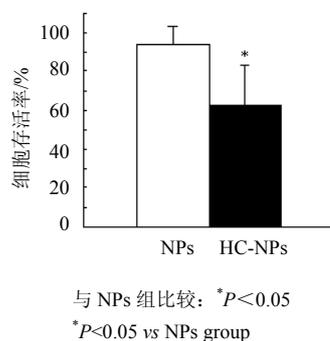


图 2 NC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effects of HC-NPs on cell proliferation of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

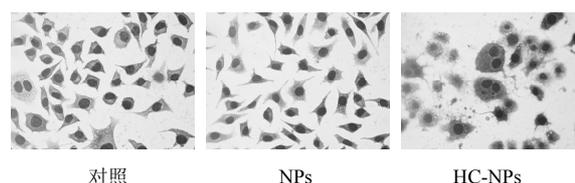


图 3 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞形态的影响

Fig. 3 Effects of HC-NPs on cell morphology of MDA-MB-231 cells

2.3 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

流式细胞术分析显示, HC-NPs 组 G₂ 期细胞比例较对照组和 NPs 组显著增加 ($P < 0.01$); 而 HC-NPs 组 S 期和 G₁ 期细胞比例较其他两组显著降低 ($P < 0.01$); 表明 HC-NPs 可诱导细胞发生 G₂/M 期阻滞。见图 4 和表 1。

2.4 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

AnnexinV-PE/7-AAD 双标记染色流式细胞术检测结果显示, HC-NPs 组细胞凋亡率较对照组和 NPs 组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), 提示 HC-NPs 可明显诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。结果见图 5 和表 1。

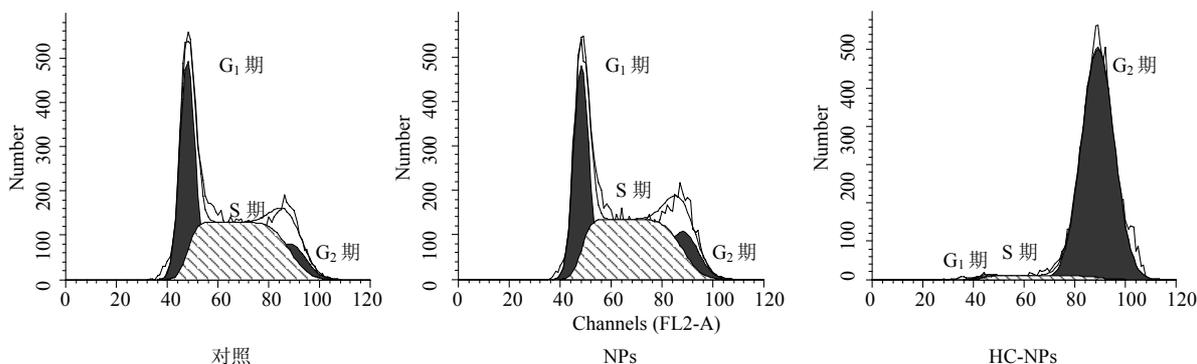


图 4 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

Fig. 4 Effects of HC-NPs on cell cycle of MDA-MB-231 cells

2.5 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞侵袭力的影响

Transwell 细胞侵袭试验结果显示, 对照组和 NPs 组 MDA-MB-231 细胞数分别为 (198±22)、

(195±11) 个; HC-NPs 组细胞数为 (115±8) 个, 较其他两组显著降低 ($P<0.01$)。表明 HC-NPs 可抑制细胞侵袭。见图 6。

表 1 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞凋亡率及细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of HC-NPs on cell apoptosis rate and cell cycle distribution in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 凋亡率/% | G ₁ 期/% | G ₂ 期/% | S 期/% |
|--------|----------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 对照 | 8.750±0.268 | 35.570±0.960 | 11.453±0.452 | 52.977±1.188 |
| NPs | 8.490±0.324 | 35.267±1.111 | 11.957±2.742 | 52.777±1.639 |
| HC-NPs | 15.387±0.566** | 0.550±0.061** | 94.670±0.538 | 4.780±0.599** |

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

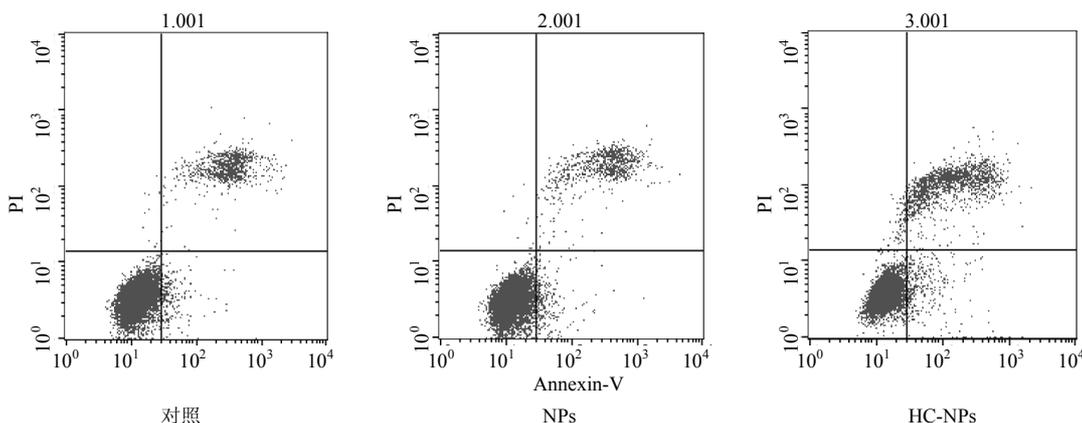
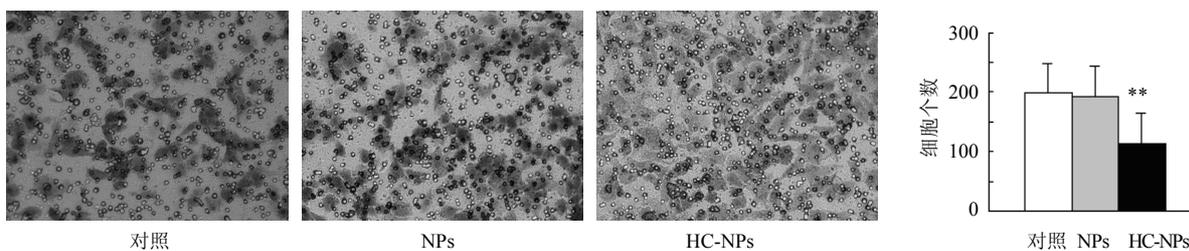


图 5 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effects of HC-NPs on cell apoptosis of MDA-MB-231 cells



与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

图 6 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响

Fig. 6 Effects of HC-NPs on invasion of MDA-MB-231 cells

2.6 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞迁移力的影响

Transwell 细胞迁移试验结果显示, HC-NPs 组迁移细胞数为 (111±6) 个, 明显低于对照组 [(315±8) 个] 和 NPs 组迁移细胞数 [(307±22) 个] ($P<0.01$), 表明 HC-NPs 可抑制细胞的迁移能力。结果见图 7。

2.7 HC-NPs 对 STAT3 及与细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移相关蛋白的影响

与对照组和 NPs 组比较, HC-NPs 组 p-STAT3、

Cyclin D1、MMP-9、Bcl-2、Survivin 蛋白表达显著降低, Bax 表达明显增加, 总 STAT3 水平无明显差异。结果见图 8。

3 讨论

STAT3 是多种致癌性信号通路的关键分子, 其下游调控着许多与肿瘤细胞生长、凋亡以及血管生成和转移有关的关键分子, 如 CyclinD1、Survivin、Bcl-2、VEGF、MMP-2、MMP-9 等。STAT3 不仅在

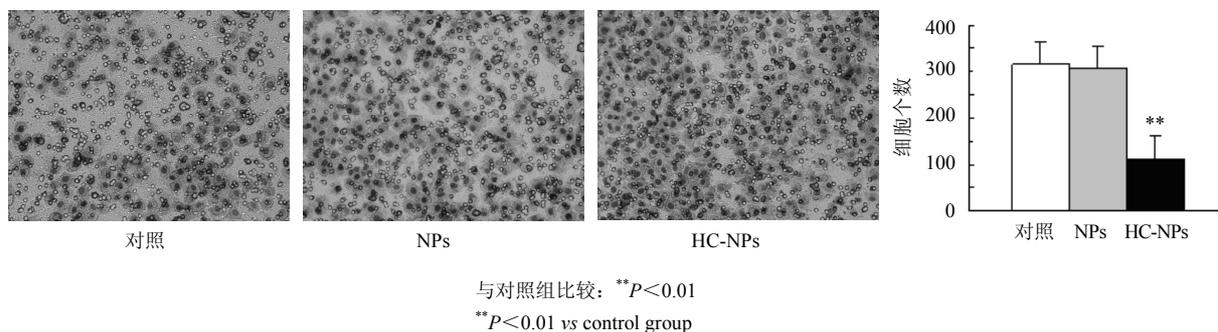


图 7 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响

Fig. 7 Effects of HC-NPs on migration of MDA-MB-231 cells

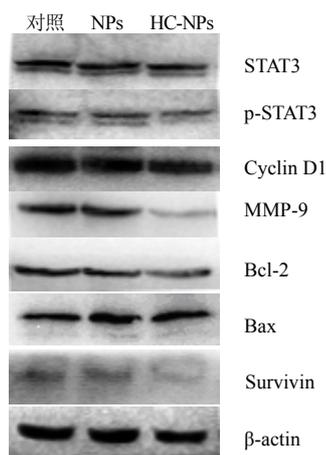


图 8 HC-NPs 对 MDA-MB-231 细胞 STAT3、p-STAT3、Bcl-2、Bax、Survivin、CyclinD1、MMP-9 蛋白表达的影响

Fig. 8 Effects of HC-NPs on STAT3, p-STAT3, Bcl-2, Bax, Survivin, CyclinD1, and MMP-9 proteins in MDA-MB-231 cells

多种肿瘤细胞中高表达，而且也在处于肿瘤微环境中的各种细胞持续高表达。因此，抑制肿瘤细胞及其微环境中各种基质细胞 STAT3 常被作为肿瘤治疗的靶点^[9]。

已有研究证实姜黄素对多种肿瘤细胞 STAT3 具有抑制作用，它通过抑制 STAT3 磷酸化、干扰 STAT3 二聚体的形成、抑制二聚体与 DNA 结合等多种机制发挥拮抗 STAT3 的作用^[10-12]。姜黄素可作为一种新型 JAK2/STAT3 抑制剂，但其生物利用度差^[5]，在体内稳定性不好，如何选择合适的药物载体将其安全、高效、靶向导入肿瘤组织，是目前姜黄素用于临床的研究重点和难点。因此本课题组探讨脂质体纳米颗粒转运体 (liposome-based nanoparticle delivery system) 作为姜黄素运载系统。纳米脂质体具有与生物膜性质类似的一种磷脂双分

子层，无毒、无免疫原型，在体内滞留时间较长，具有较高的载药量和药物包封率^[13]，生物利用度可达 49%，使肿瘤细胞内积聚的药物提高 87 倍^[14]。更为优越的是，纳米脂质体载体能进行表面修饰而实现靶向性^[15]，并已成功运载抗肿瘤药物进行靶向治疗^[16-17]。

本实验用薄膜-分散-挤出法包裹 HC 形成 150 nm 左右的 HC-NPs 颗粒作用于乳腺癌细胞 MDA-MB-231，探讨其抗乳腺癌的作用机制。结果显示，HC-NPs 可抑制乳腺癌细胞株的增殖、侵袭和迁移，促进细胞凋亡，其作用机制与抑制 STAT3 活化，下调 STAT3 下游与细胞增殖、凋亡和侵袭相关的靶分子有关，说明体外合成的 HC-NPs 能携带 HC 进入细胞，并能在细胞内释放 HC，发挥抗肿瘤作用。由此可见 HC-NPs 有可能成为一种新型抗肿瘤药物，具有良好的研究和临床应用前景。

参考文献

- [1] 韩 婷, 宓鹤鸣. 姜黄的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 解放军药学学报, 2001, 17(2): 95-97.
- [2] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 18-附 21.
- [3] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素防治大鼠高脂性脂肪肝的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1322-1326.
- [4] Bengmark S, 刘 青. 植物源保护剂姜黄素的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 22-31.
- [5] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 807-818.
- [6] Lin L, Deangelis S, Foust E, et al. A novel small molecule inhibits STAT3 phosphorylation and DNA binding activity and exhibits potent growth suppressive activity in human cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 217.
- [7] 琚 辉, 郝存江, 尹 飞, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒

- 的制备及表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 420-426.
- [8] 王晓飞, 郭变琴, 张曦文, 等. 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 [J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 111-115.
- [9] Hua Y, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(1): 41-51.
- [10] Bharti A C, Donato N, Aggarwal B B. Curcumin inhibits constitutive and IL-6-inducible stat3 phosphorylation in human multiple myeloma cells [J]. *J Immunol*, 2003, 171(7): 3863-3871.
- [11] Hong J H, Ahn K S, Bae E, *et al.* The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2006, 9(2): 147-152.
- [12] Cao J, Jia L, Zhou H, *et al.* Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G₂ cells [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91(2): 476-483.
- [13] Pinto R C, Neufeld R J, Ribeiro A J, *et al.* Nano-encapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery system [J]. *Nanomedicine*, 2006(2): 53-65.
- [14] Laginha K M, Verwoert S, Charrois G J, *et al.* Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19): 6944-6949.
- [15] Wagner E. Programmed drug delivery: nanosystems for tumor targeting [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7(5): 587-593.
- [16] Eric A M, Bharat K M, Leo A B, *et al.* Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis [J]. *PANS*, 2008, 105(27): 9343-9348.
- [17] Schiffelers R M, Koning G A, ten Hagen T L, *et al.* Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin [J]. *J Controlled Release*, 2003, 91(1/2): 115-122.

郑重声明

天津中草药杂志社（出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊）未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议，凡是以天津中草药杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动，均严重侵害了天津中草药杂志社的合法权益，天津中草药杂志社将保留对其采取法律行动的权利，特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津中草药杂志社门户网站“www.中草药杂志社.中国或 www.tiprpress.com”，切勿上当受骗；若发现假冒天津中草药杂志社及所属期刊的情况，请检举揭发。

Tel: (022)27474913 E-mail: zcy@tiprpress.com

天津中草药杂志社