

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.10.004

# 姜黄素对乳腺癌细胞 VEGF-C 表达及增殖、侵袭性的影响

何 静,刘安文,蔡 婧,廖 琴

## Effect of Curcumin on VEGF-C Expression, Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cell

HE Jing, LIU An-wen, CAI Jing, LIAO Qin

Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding Author: LIU An-wen, E-mail: 370460307@163.com

**Abstract: Objective** To evaluate the effects of curcumin on proliferation, invasion and VEGF-C expression in human breast cancer cell lines MCF-7. **Methods** Proliferation and invasion of MCF-7 cell inhibited by curcumin were assessed by MTT and Transwell technique. Expression levels of VEGF-C mRNA and protein in MCF-7 cell were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively. **Results** The Curcumin markedly inhibited proliferation capacity of MCF-7 cell ( $P < 0.001$ ). The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was  $37 \mu\text{mol/L}$ . The number of invasion of MCF-7 cell were significantly lower in curcumin group than that in control group ( $P < 0.001$ ). It was also lower in  $40 \mu\text{mol/L}$  group than  $20 \mu\text{mol/L}$  group ( $P < 0.001$ ). VEGF-C mRNA and protein expression were also effectively down regulated in vitro. The relative expression of VEGF-C mRNA and protein were lower in  $40 \mu\text{mol/L}$  group than  $20 \mu\text{mol/L}$  group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The proliferation and invasion ability of MCF-7 cell is effectively inhibited by curcumin. It is possible to inhibit the invasion of MCF-7 cell by down-regulation of VEGF-C expression.

**Key words:** Curcumin; Human breast cancer; VEGF-C; Invasion

**摘要:目的** 探讨姜黄素对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖、侵袭性及 VEGF-C 表达的影响。**方法** MTT 法, Transwell 小室检测姜黄素对 MCF-7 细胞增殖和侵袭性的影响; RT-PCR、Western blot 方法检测姜黄素作用 MCF-7 细胞前后 VEGF-C mRNA 及蛋白水平表达的变化。**结果** 姜黄素能有效抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖, 其  $IC_{50}$  为  $37 \mu\text{mol/L}$ , 随浓度增高其抑制作用增强 ( $P < 0.05$ ), 同时降低乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭性 ( $P < 0.001$ )。不同浓度姜黄素可降低 MCF-7 细胞 VEGF-C mRNA 及蛋白水平的表达 ( $P < 0.05$ ),  $40 \mu\text{mol/L}$  组比  $20 \mu\text{mol/L}$  组下降明显 ( $P < 0.05$ )。**结论** 姜黄素可以抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖及侵袭性, 其机制可能是通过下调 VEGF-C 的表达。

**关键词:** 姜黄素; 乳腺癌; VEGF-C; 侵袭性

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)10-1109-04

## 0 引言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 据统计, 其发病率占全身各种恶性肿瘤的 7%~10%, 死亡率在女性肿瘤中排第二位<sup>[1]</sup>, 我国女性乳腺癌发病率和死亡率都呈迅速上升的态势<sup>[2]</sup>。目前, 由于综合治疗在乳腺癌治疗中的应用, 患者总体生存率有

所提高, 但晚期乳腺癌仍然是乳腺癌治疗方面棘手的问题之一<sup>[3]</sup>。

姜黄素是从姜科植物的根茎中提取的一种传统的中药元素, 研究表明其对乳腺癌的治疗效果明显<sup>[4]</sup>, 具有抗炎、抗氧化、降血脂的作用, 最近其抗肿瘤作用得到证实并受到广泛关注, 其作用的分子机制也有所研究<sup>[5]</sup>, 但具体机制不够明确。VEGF-C 在人类多种肿瘤组织中表达, 与肿瘤细胞的淋巴管扩散有关<sup>[6]</sup>, 可促进肿瘤细胞淋巴转移<sup>[7]</sup>。乳腺癌淋巴转移很常见, 然而姜黄素是否对乳腺癌 VEGF-C 的表达有影响尚无报道。本研究观察了姜黄素对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、体外侵袭性及对

收稿日期: 2010-10-25; 修回日期: 2011-04-15

基金项目: 江西省卫生厅中医药科研基金资助项目 (2007A058)

作者单位: 330006 南昌, 南昌大学第二附属医院肿瘤科

通信作者: 刘安文, E-mail: 370460307@163.com

作者简介: 何静 (1985-), 女, 硕士, 主要从事乳腺癌的综合治疗基础研究

VEGF-C 表达水平的影响,旨在探索姜黄素抑制乳腺癌转移的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MCF-7 来源于上海细胞研究所;胎牛血清购于 Hyclone 公司;姜黄素(每瓶 10 g)、MTT 购于 Sigma 公司;Transwell 小室(8  $\mu\text{m}$  孔径)购于 Costar 公司;兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购于北京中杉金桥公司;引物由上海生工公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 姜黄素溶液的配制 以少许二甲亚砜(DMSO)溶解姜黄素粉剂,培养液稀释至 500  $\mu\text{m}$ , 0.2  $\mu\text{m}$  孔径过滤器过滤后,4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存,两周内使用。用时稀释至所需浓度,并使 DMSO 终浓度 <0.1%。为排除 DMSO 的影响,用含 0.1% DMSO 的培养液处理的细胞做阴性对照(0  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素组),只含培养液的为空白对照组。

1.2.2 细胞培养 MCF-7 细胞生长于 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素的 DMEM 培养液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养 每 2~3 天传代一次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 MTT 法检测姜黄素对 MCF-7 细胞增殖能力的影响 将每孔 5 000 细胞接种于 96 孔板中,每孔 200  $\mu\text{l}$ ,24 h 后加不同浓度的姜黄素:0、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ,每组设 5 个复孔,分别于第 1、2、3 天后加 MTT 溶液,继续孵育 4 h,终止孵育,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加 100  $\mu\text{l}$  DMSO,振荡 10 min,酶标仪 490 nm 检测 OD 值。抑制率计算如下:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{加药组细胞平均吸光值}}{\text{对照组细胞平均吸光值}}\right) \times 100\%$$

1.2.4 Transwell 小室检测姜黄素对 MCF-7 细胞侵袭性的影响 Matrigel 胶用无血清培养液 1:1 稀释,每孔 30  $\mu\text{l}$  均匀铺在上室面底部,胶凝固后,每孔加入 50  $\mu\text{l}$  含 10 g/L BSA 的无血清培养液培养过夜。细胞用无血清培养液孵育 24 h,消化后按每孔  $2 \times 10^4$  个细胞接种在上室,下室加入 650  $\mu\text{l}$  含 10% 血清的培养液,培养箱放置 24 h。擦拭未侵袭的细胞,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,400 倍镜下随机计数 5 个视野的穿膜细胞,计算平均数。侵袭

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{对照组侵袭细胞数}}{\text{实验组侵袭细胞数}}\right) \times 100\%$$

1.2.5 RT-PCR 方法检测姜黄素对 MCF-7 细胞中 VEGF-C mRNA 水平的影响 收集细胞分别提取总 RNA,按试剂盒步骤进行反转录,再行 PCR 扩

增,反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min,95 $^{\circ}\text{C}$  40 s,55 $^{\circ}\text{C}$  (VEGF-C)/64 $^{\circ}\text{C}$  (GAPDHA)40s,72 $^{\circ}\text{C}$  1 min 共 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。VEGF-C 基因和 GAPDH 基因引物序列如下:VEGF-C 上游 5'-CAGTTACGGTCTGTGTCCAGT-3', 下游 5'-GGACACACATGAGGTTTAAAGAAG-3';内参 GAPDH 上游 5'-TCCCATCACCATCTTCCAG -3', 下游 5'-AGGAGTGGGTGTCGCTG -3'。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统中进行 VEGF-C 和 GAPDH 条带吸光度的灰度分析。

1.2.6 Western blot 方法检测姜黄素对 MCF-7 细胞中 VEGF-C 蛋白水平的影响 将姜黄素处理好的细胞用胰酶消化制成悬液,PBS 洗涤 2 次,按蛋白抽提试剂盒说明书步骤提取蛋白,测蛋白浓度,以每孔 50  $\mu\text{g}$  蛋白进行聚丙烯酰胺电泳,转膜,封闭,一抗按 1:1 000 稀释后孵育过夜,二抗 1:5 000 稀释后孵育 2 h,TBST 洗膜后暗室里曝光,对 VEGF-C 和  $\beta$ -actin 条带进行分析。

### 1.3 统计学方法

用 SPSS13.0 进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析,组间比较用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 姜黄素对 MCF-7 细胞增殖能力的影响

镜下可见对照组细胞活力旺盛,轮廓清晰,实验组随着姜黄素浓度增加,细胞逐渐固缩、变圆、稀释。从生长曲线可以看出,不同浓度的姜黄素(10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )处理 MCF-7 细胞后,对细胞的生长有显著的抑制作用( $P < 0.001$ ),并随着浓度的升高,抑制作用更明显( $P < 0.05$ ), $IC_{50} = 37 \mu\text{mol/L}$ ,见图 1。

### 2.2 姜黄素对 MCF-7 细胞侵袭力的影响

姜黄素作用 48 h 后可以明显减少体外穿过基底膜的细胞数,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素组少于 20  $\mu\text{mol/L}$  组, $P < 0.001$ ,空白对照组跟阴性对照组相比,差异无统计学意义, $P > 0.05$ ,见表 1。

表 1 姜黄素对 MCF-7 细胞侵袭力的影响

Table 1 The effects of curcumin on the invasion of MCF-7 cell *in vitro*

Groups	Invasion cell	Invasion inhibition ratio(%)
None	69.67 $\pm$ 5.22	-
0 $\mu\text{mol/L}$ Curcumin	68.73 $\pm$ 4.88	-
20 $\mu\text{mol/L}$ Curcumin	26.40 $\pm$ 3.31	61.59
40 $\mu\text{mol/L}$ Curcumin	8.60 $\pm$ 2.80	87.49

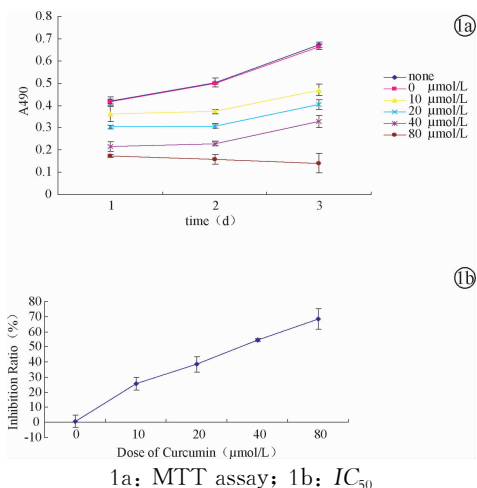


图 1 不同浓度姜黄素对 MCF-7 细胞生长的影响  
Figure 1 The effects of curcumin on proliferation of MCF-7 cells

### 2.3 姜黄素对 MCF-7 细胞中 VEGF-C mRNA 水平的影响

空白对照组 VEGF-C mRNA 表达相对值为 (0.34 ± 0.07), 阴性对照组为 (0.36 ± 0.07), 20 μmol/L、40 μmol/L 姜黄素作用 48 h 后表达相对量分别为 (0.23 ± 0.05)、(0.09 ± 0.03), 姜黄素处理组 VEGF-C mRNA 水平明显下降,  $F = 15.23, P = 0.001$ , 40 μmol/L 姜黄素组表达低于 20 μmol/L 组,  $P = 0.012$ 。空白对照组与阴性对照相比差异无统计学意义,  $P = 0.78$ , 见图 2。

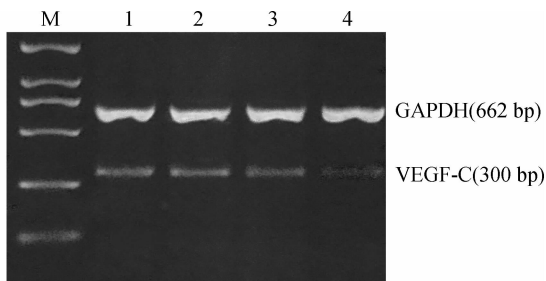
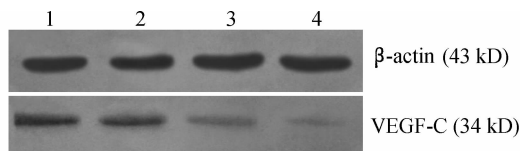


图 2 姜黄素对 MCF-7 细胞中 VEGF-C mRNA 水平的影响  
Figure 2 The effects of curcumin on the expression of VEGF-C mRNA in MCF-7 cell

### 2.4 姜黄素对 MCF-7 细胞中 VEGF-C 蛋白水平的影响

空白对照组 VEGF-C 蛋白表达相对值为 (0.67 ± 0.06), 阴性对照组为 (0.71 ± 0.09), 20 μmol/L、40 μmol/L 姜黄素作用 48 h 后表达相对量分别为 (0.45 ± 0.07)、(0.20 ± 0.03), 姜黄素处理组 VEGF-C 蛋白水平明显下降  $F = 40.61, P < 0.001$ , 40 μmol/L 姜黄素组表达低于 20 μmol/L 组,  $P = 0.002$ , 空白对照组与阴性对照相比差异无统计学意

义,  $P = 0.56$ , 见图 3。



1: none; 2: 0 μmol/L Curcumin for 48 h;  
3: 20 μmol/L Curcumin for 48 h;  
4: 40 μmol/L Curcumin for 48 h  
图 3 姜黄素对 MCF-7 细胞中 VEGF-C 蛋白水平的影响  
Figure 3 The effects of curcumin on the expression of VEGF-C protein in MCF-7 cells

### 3 讨论

VEGF-C 是血管内皮生长因子家族的一员, 家族中还包括 VEGF-A(或 VEGF)、VEGF-B、VEGF-D、VEGF-E 及胎盘生长因子(PIGF)等, 它们都与血管生成有关。近年最新研究显示, VEGF-C 是目前为止发现的最强的促淋巴生成因子, 它主要作用于 VEGFR-2 和 VEGFR-3(也叫做 Flt-4)<sup>[8]</sup>。其中, VEGF-C/ VEGFR-3 在肿瘤进展中发挥重要生物学功能。而且通过不同的信号通路, 调控不同的细胞功能<sup>[9]</sup>, 有文献报道其对恶性间皮瘤细胞的增殖发挥重要作用<sup>[10]</sup>。但是还有些报道显示, VEGFR-3 特异性抗体作用于 LNM35 肺癌细胞<sup>[11]</sup>, VEGF-C 特异性小 RNA 干扰片段作用于 C166 乳腺癌细胞都未能改变肿瘤的增殖率<sup>[12]</sup>。有研究报道, 姜黄素能抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖, 诱导其凋亡<sup>[13-14]</sup>。本研究通过 MTT 验证了姜黄素明显抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的生长, 并伴有 VEGF-C 表达下降, 说明姜黄素可下调 VEGF-C 表达, 从而抑制 MCF-7 细胞增殖。

最近研究发现, VEGF-C 不仅具有诱导新生血管生成的作用, 而且在淋巴管发育中起重要调节作用<sup>[15]</sup>。新生血管和淋巴管是肿瘤进展的重要步骤, 与血管新生相似, 淋巴系统也能扩大自己的网络, 与周边的淋巴管连接。临床与病理研究发现, 在很多肿瘤中, 肿瘤细胞早期扩散大多数是经过淋巴系统的。动物模型中, 通过激活 VEGF-C/VEGFR-3 可诱导淋巴管生成, 进而增加淋巴转移。大量研究证实, 多种肿瘤细胞分泌的 VEGF-C 会增加肿瘤的侵袭性<sup>[16]</sup>, 进而促进肿瘤转移, 其中包括肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肠癌<sup>[9]</sup>。Lin 等<sup>[17]</sup>通过实验表明姜黄素通过抑制 MMP-2、MMP-9、VEGF 等降低肿瘤侵袭和转移。本研究通过 Transwell 侵袭实验证实, 姜黄素在下调 MCF-7 细胞 VEGF-C 表达的同时, 侵袭性也明显被抑制, 并呈剂量依赖性, 说明姜黄素

降低 MCF-7 细胞的侵袭性,也可能是通过抑制 VEGF-C 实现的。

姜黄素的抗肿瘤作用已经得到证实,本实验发现它可降低 MCF-7 细胞的增殖能力,并能抑制其侵袭性,降低 VEGF-C 的表达,提示其抑制作用可能是通过降低 VEGF-C 的表达来实现的,这为传统中药姜黄素在抗乳腺癌的临床使用中提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] Ziegler RG, Anderson WF, Gail MH. Increasing breast cancer incidence in China the numbers add up[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(19): 1339-1341.
- [3] 郭小毛,梅欣,章倩. 局部晚期乳腺癌的治疗进展[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(6): 409-416.
- [4] Narasimhan M, Ammanamanchi S. Curcumin blocks RON tyrosine kinase-mediated invasion of breast carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5185-5192.
- [5] Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies[J]. Br J Nutr, 2010, 103(11): 1545-1557.
- [6] Sun JG, Wang Y, Chen ZT, et al. Detection of lymphangiogenesis in non-small cell lung cancer and its prognostic value[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 21.
- [7] Gu Y, Qi X, Guo S. Lymphangiogenesis induced by VEGF-C and VEGF-D promotes metastasis and a poor outcome in breast carcinoma: a retrospective study of 61 cases[J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(7): 717-725.
- [8] Li JL, Harris AL. Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications[J]. Front Biosci, 2009, 14: 3094-3110.
- [9] Su JL, Yen CJ, Chen PS, et al. The role of the VEGF-C/VEGF-FR-3 axis in cancer progression[J]. Br J Cancer, 2007, 96(4): 541-545.
- [10] Masood R, Kundra A, Zhu S, et al. Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops[J]. Int J Cancer, 2003, 104(5): 603-610.
- [11] He Y, Kozaki K, Karpanen T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(11): 819-825.
- [12] Chen Z, Varney ML, Backora MW, et al. Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival[J]. Cancer Res, 2005, 65(19): 9004-9011.
- [13] Issa A, Le TX, Shoushtari AN, et al. Vascular Endothelial Growth Factor-C and C-C Chemokine Receptor 7 in Tumor Cell-Lymphatic Cross-talk Promote Invasive Phenotype [J]. Cancer Res, 2009, 69(1): 349-357.
- [14] Prasad CP, Rath G, Mathur S, et al. Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/beta-catenin signaling [J]. Chem Biol Interact, 2009, 181(2): 263-271.
- [15] 孔雁,姜达,张敏. 沙利度胺对人乳腺癌细胞血管内皮生长因子-C 及其受体表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(12): 921-923.
- [16] Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction[J]. FEBS Lett, 2002, 512(1-3): 334-340.
- [17] Lin SS, Lai KC, Hsu SC, et al. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase -2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [J]. Cancer Lett, 2009, 285(2): 127-133.

[编辑校对:刘红武]