

# 姜黄素对宫颈癌细胞 HeLa 侵袭及迁移的抑制作用

何涵<sup>1</sup>, 宋梓桐<sup>2</sup>, 史乃元<sup>1</sup>, 张巍<sup>1,2\*</sup>

(1. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133002; 2. 吉林医药学院, 吉林 吉林 132013)

**摘要:** 目的 观察姜黄素对宫颈癌细胞 HeLa 侵袭及迁移的抑制作用, 并探讨 HPVE6 蛋白在此过程中的作用。方法 培养人 HeLa 细胞及敲除 E6 后的 HeLa 细胞 (shHeLa), 分别加入 10、20、50  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素, 继续培养 24 h, Western blot 法检测 E6 表达, CCK-8 法检测细胞增殖情况。以 20  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理 HeLa 及 shHeLa 细胞, 划痕实验检测细胞迁移能力, Transwell 小室法检测细胞侵袭能力, Western blot 法检测细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达。结果 不同浓度姜黄素对 HeLa 细胞均有抑制作用, 并呈剂量依赖性 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 姜黄素可使 HeLa 细胞的平面运动能力下降 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 并对 HeLa 细胞体外的侵袭力具有抑制作用 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 能够使 HeLa 细胞 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), E-cadherin 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 但以上抑制作用在 shHeLa 细胞中均得到缓解。结论 姜黄素可通过调节 E6 的表达抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖并抑制细胞侵袭。

**关键词:** 姜黄素; 宫颈癌; HPVE6; 侵袭; 迁移

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)05-1684-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.05.045

宫颈癌是全球女性第四常见的恶性肿瘤, 在世界范围内感染高危人类乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 作为主要危险因素<sup>[1]</sup>。HPV-DNA 随机整合到宿主基因组中, 导致串联连接的 HPV E6 和 E7 基因组成型表达高风险 HPV E6 和 E7 是维持宫颈癌细胞表型至关重要的病毒癌蛋白<sup>[2-5]</sup>。

姜黄素是从姜黄的根茎中提取的成分, 具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗癌活性。其中, 它通过调节参与癌细胞增殖、侵袭和凋亡过程的信号级联的各种成分发挥抗肿瘤作用<sup>[6-8]</sup>。研究表明, 姜黄素可抑制卵巢癌细胞、乳腺癌、宫颈癌等癌细胞的转移及增殖<sup>[9-12]</sup>。前期研究发现, 姜黄素可以抑制宫颈癌的增殖并诱导其凋亡, 但其机制尚待进一步探索。本研究主要针对 E6 与宫颈癌侵袭与转移的相关性, 及姜黄素对宫颈癌的相关影响与 E6 的关联性做进一步的探究, 以期为其深入研究提供依据。

## 1 材料

HeLa 细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

姜黄素 (美国 Sigma 公司, 纯度 98%); RPMI-1640 培养基、细胞裂解缓冲液 (上海碧云天生物技术股份有限公司); 胎牛血清胰酶 (美国 Gibco 公司); Transwell 小室 (美国 BD 公司); 兔抗人 E6、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、 $\beta$ -actin 抗体 (英国 Abcam 公司)。AE31 倒置生物显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); Bio-Rad550 酶

标仪、Imark 微孔板读数器 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

2.1 细胞培养 HeLa 细胞于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内孵育, 试验前用胰酶消化细胞, 漂洗 2 次。当细胞密度达到 80% 时, 将细胞传代培养 24 h。

2.2 RNA 干扰试验 E6 的 shRNA 干扰质粒 (shE6) 由吉林省新润一生物技术有限公司构建完成。3 对 shRNA 框架序列分别为 E6-shRNA-1 (stem 5'-CCTACAAGCTA CCTGATCT-3', loop 5'-AGTGAAGCCACAGATGTA-3', stem 5'-AGATCAGGTAGCTGTAGG-3')、E6-shRNA-2 (stem 5'-GGAAGTTACAGAGGTATTT-3', loop 5'-AGTGAAGCCACA GATGTA-3', stem 5'-AAATACCTCTGTAAAGTTCC-3')、E6-shRNA-3 (stem 5'-GCAGAGAAACACAAGTATA-3', loop 5'-AGTGAAGCCACAGATGTA-3', stem 5'-TATACTTGTGTTTCT CTGC-3')。并构建稳定的 E6 敲低细胞系, 将 E6 shRNA 转染到 HeLa 细胞中, 0.5  $\text{mg/mL}$  嘌呤霉素筛选稳定敲低的细胞。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖情况 用 0、10、20、50  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理 HeLa 细胞, 以每孔  $1.0 \times 10^4$  个的密度重悬于 100 mL RPMI-1640 培养基中, 接种于 96 孔板。细胞培养 24 h 后, 每孔替换为 100 mL 0.5  $\text{mg/mL}$  CCK-8 试剂, PBS 稀释, 孵育 4 h, 在 540 nm 波长处检测吸光度。

2.4 Transwell 侵袭小室试验 用 0、10、20、50  $\mu\text{mol/L}$

收稿日期: 2023-06-15

基金项目: 吉林省科技厅科技发展项目 (20190701062GH); 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目 (JJKH20200453KJ)

作者简介: 何涵 (1996—), 女, 硕士生, 从事抗肿瘤药物研究。Tel: 15144235579, E-mail: 15144235579@163.com

\*通信作者: 张巍 (1972—), 女, 博士, 教授, 从事抗肿瘤药物研究。Tel: (0432) 64560504, E-mail: jlmzczw@163.com

姜黄素处理 HeLa 细胞，以每孔  $2.0 \times 10^5$  个的密度重悬于 200 mL RPMI-1640 培养基中，加入 Transwell 室并插入 24 孔板中，将 700 mL RPMI-1640 培养基添加到 24 孔板中培养 48 h。取出 Transwell 室并擦拭，将小室外的细胞擦拭干净与固定缓冲液和结晶紫孵育。观察染色细胞，并用倒置显微镜进行拍照，采用 Image J 1.8.0 软件进行数据分析。

**2.5 细胞划痕试验** 取处于对数生长期的 HeLa 细胞，以每孔  $2.0 \times 10^5$  个的密度接种于 6 孔板中，当细胞融合度达到 80% 时，用无血清 RPMI-1640 培养基替换，继续培养 24 h。当细胞生长到完全汇合时，使用 10  $\mu$ L 注射器尖端刮擦每个孔的单层细胞。造成划痕后，PBS 冲洗 2 次。沿着划痕的边缘观察并拍照，并以 0、10、20、50  $\mu$ mol/L 姜黄素处理继续培养 24 h，观察刮擦愈合的程度并拍照。计算穿越 0 h 的划痕边界的细胞数和伤口愈合率。

**2.6 Western blot 法检测 E6、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达** 用 0、10、20、50  $\mu$ mol/L 姜黄素处理 24 h，收集 HeLa 细胞用冷 PBS 洗涤 2 次，在 RIPA 缓冲液中裂解。4  $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 20 min，BCA 法检测蛋白浓度，取等质量蛋白进行变性，加入蛋白上样缓冲液后冻存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉中封闭 2 h，分别加入兔抗人 E6、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 抗体，4  $^{\circ}$ C 孵育过夜，次

日二抗室温孵育 2 h，使用化学发光液显影，以  $\beta$ -actin 为内参，通过 Image J 软件计算蛋白相对表达量。

**2.7 统计学分析** 通过 SPSS 软件进行处理，数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 姜黄素对 HeLa E6 表达的影响** 与 0  $\mu$ mol/L 姜黄素组比较，10、20、50  $\mu$ mol/L 姜黄素组 HeLa 细胞 E6 表达降低，见图 1。

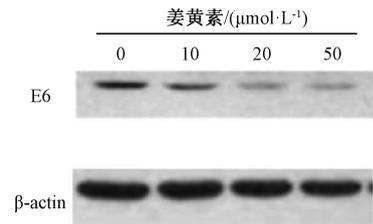
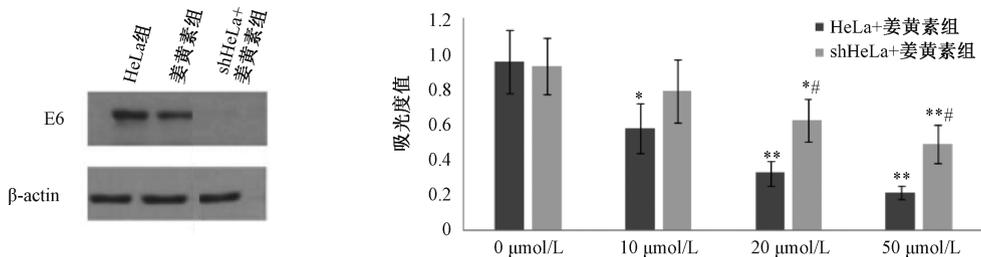


图 1 姜黄素对 HeLa E6 表达的影响

**3.2 姜黄素对 HeLa 及敲除 E6 细胞增殖的影响** 与 HeLa+0  $\mu$ mol/L 姜黄素组比较，10、20、50  $\mu$ mol/L 姜黄素组细胞生存率降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，并呈剂量依赖性；与 HeLa+10  $\mu$ mol/L 姜黄素组比较，shHeLa+20、50  $\mu$ mol/L 姜黄素组细胞生存率升高 ( $P < 0.05$ )，提示敲除 E6 (shHeLa) 后其抑制作用相对减弱，见图 2。

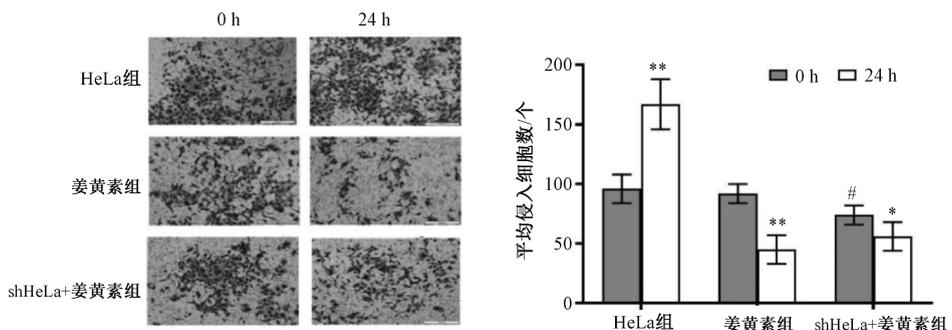


注：与 0  $\mu$ mol/L 姜黄素组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ ；与 HeLa+10  $\mu$ mol/L 姜黄素组比较，#  $P < 0.05$ 。

图 2 姜黄素对 HeLa 及敲除 E6 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

**3.3 姜黄素对 HeLa 细胞侵袭能力的影响** 与 HeLa 组比较，20  $\mu$ mol/L 姜黄素处理 24 h 后 HeLa 细胞的侵袭能力降

低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，见图 3。



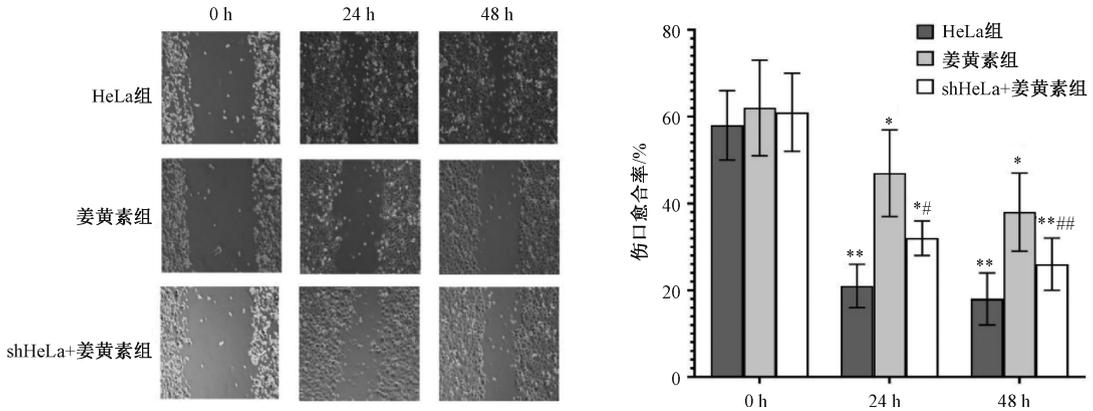
注：与 HeLa 组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ ；与姜黄素组比较，#  $P < 0.05$ 。

图 3 姜黄素对 HeLa 及 shHeLa 胞侵袭能力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 3.4 姜黄素对 HeLa 细胞迁移能力的影响

与 0 h 组比较, 20  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理 24、48 h 后 HeLa 细胞伤口愈合率降

低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 提示表明姜黄素能够抑制 HeLa 细胞的迁移, 见图 4。



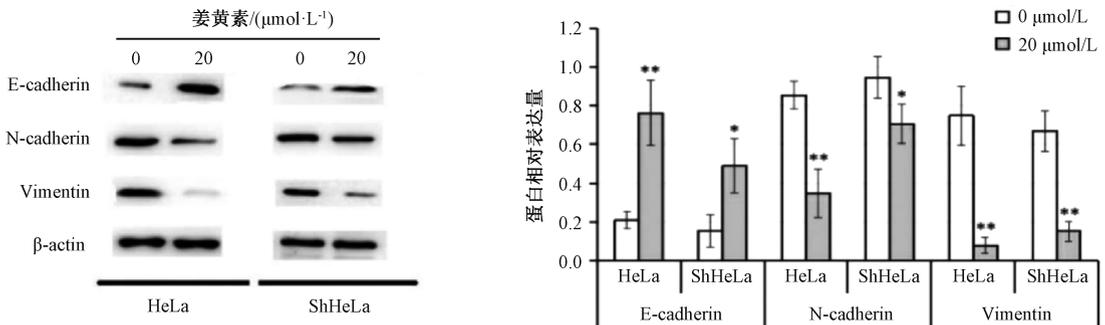
注: 与 HeLa 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与姜黄素组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

图 4 姜黄素对 HeLa 及 shHeLa 细胞迁移能力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 3.5 姜黄素对 HeLa 细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响

与 0  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素组比较, 20  $\mu\text{mol/L}$

姜黄素组 HeLa 细胞 E-cadherin 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ ), N-cadherin、Vimentin 表达降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 5。



注: 与 0  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 5 姜黄素对 HeLa 及 shHeLa 细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 3.6 姜黄素通过调节 E6 抑制 HeLa 的侵袭及迁移

E6 是高度保守且必不可少的有丝分裂调节剂, 其主要参与磷酸化信号转导<sup>[13-16]</sup>, 还某些导致癌症的发生例如血管生成, 细胞增殖和肿瘤转移相关连<sup>[17]</sup>。为了探究 E6 的表达与姜黄素对 HeLa 细胞侵袭及迁移的影响, 本实验先筛选有效的敲低 E6 的小 RNA (图 2A)。转入 E6 shRNA 慢病毒有效敲低 E6 水平, 并建立稳转细胞系。与未转染细胞比较, E6 敲低的细胞中的增殖、侵袭、迁移均得以缓解, 见图 3~5。

## 4 讨论

宫颈癌作为全球女性中最常见的癌症之一, 为了降低宫颈癌的发病率和死亡率, 其治疗研究一直备受关注。肿瘤转移被认为是大多数癌症患者死亡的主要因素, 因此, 寻找抑制癌症转移的有效靶点成为治疗关键。

姜黄素是一种多酚类化合物, 因其抗癌特性而受到越来越多的关注。研究表明, 姜黄素具有抑制包括宫颈癌在内的癌细胞增殖的能力<sup>[6-8]</sup>, 姜黄素可能成为宫颈癌治疗的可靠化疗药物。

本研究首先通过 CCK-8 法测定, 不同浓度的姜黄素可抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖, 且具有剂量依赖性。为进一

步明晰姜黄素对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭及迁移能力的影响及机制, 本实验还对姜黄素对 HeLa 细胞的细胞生存率及侵袭能力的影响进行了研究。在癌细胞的迁移和侵袭过程中, EMT 是重要的过程, 在癌症进展的 EMT 期间, 源自上皮细胞的癌细胞同时表现出间充质和上皮特征, 即在称为部分 EMT 的过程中的混合 E/M 表型。癌细胞中的部分 EMT 被认为可增强其侵袭性, 产生循环肿瘤细胞和癌症干细胞, 并促进对抗癌药物的耐药性。在此过程中, 上皮标志物 E-cadherin 逐渐减少, 间质标志物 N-cadherin 逐渐增加<sup>[18-21]</sup>。姜黄素可使 HeLa 细胞的 E-cadherin 表达升高, 同时降低 N-cadherin、Vimentin 表达, 这进一步证明姜黄素抑制了宫颈癌细胞迁移和侵袭的能力。

研究发现, E6 癌蛋白是一种源自人乳头瘤病毒的蛋白质, 可通过蛋白质-蛋白质相互作用在功能上使各种细胞抗肿瘤蛋白失活, 与宫颈癌的侵袭及迁移相关<sup>[2-5]</sup>, 因此猜测姜黄素抑制 HeLa 细胞的此种作用是否与 E6 有关。本实验通过敲除 E6 试验证实, E6 表达降低后可导致姜黄素对侵袭及迁移的抑制有所缓解。

综上所述, 姜黄素可抑制 HeLa 细胞的增殖、侵袭及迁

移,其机制可能通过下调 E6 表达来发挥作用。

参考文献:

- [ 1 ] Regauer S, Reich O. The origin of human papillomavirus (HPV) - induced cervical squamous cancer[J]. *Curr Opin Virol*, 2021, 51: 111-118.
- [ 2 ] Mutch D G, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(3): 401-404.
- [ 3 ] Costantino S, Paneni F, Luscher T F, et al. E6 inhibitor Juglone prevents diabetic vascular dysfunction [ J ]. *Int J Cardiol*, 2016, 203: 702-707.
- [ 4 ] 王 跃, 高 慧, 刘玉兰, 等. 子宫颈高危型人乳头瘤病毒感染 的 中 西 医 治 疗 研 究 进 展 [ J / O L ]. 世 界 中 医 药 : 1-8 (2024-01-26) [2024-03-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.R.20240124.1759.040.html>.
- [ 5 ] Wu X, Li M J, Chen S Q, et al. E6 facilitates isoproterenol-induced cardiac fibrosis and collagen deposition by promoting oxidative stress and activating the MEK1/2-ERK1/2 signal transduction pathway in rats[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1573-1583.
- [ 6 ] Xie L G, Ji X L, Zhang Q, et al. Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112567.
- [ 7 ] Tiwari A, Jain S K. Curcumin based drug delivery systems for cancer therapy [ J ]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26 ( 42 ) : 5430-5440.
- [ 8 ] Tan B L, Norhaizan M E. Curcumin combination chemotherapy: The implication and efficacy in cancer[J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2527.
- [ 9 ] Ghaderi S, Babaei E, Hussien B M, et al. Gemini curcumin suppresses proliferation of ovarian cancer OVCAR-3 cells via induction of apoptosis[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21(6): 775-781.
- [ 10 ] Li M J, Guo T T, Lin J Y, et al. Curcumin inhibits the invasion and metastasis of triple negative breast cancer via Hedgehog/Gli1 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114689.
- [ 11 ] Song X Q, Zhang M, Dai E Q, et al. Molecular targets of curcumin in breast cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 23-29.
- [ 12 ] Wang T, Wu X, Al Rudaisat M, et al. Curcumin induces G2/M arrest and triggers autophagy, ROS generation and cell senescence in cervical cancer cells[J]. *J Cancer*, 2020, 11(22): 6704-6715.
- [ 13 ] Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and cancer [ J ]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2376.
- [ 14 ] Ruan L, Torres C M, Qian J, et al. Pin1 prolyl isomerase regulates endothelial nitric oxide synthase [ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(2): 392-398.
- [ 15 ] Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The cervical cancer hallmarks and targets for therapy [ J ]. *Front Microbiol*, 2020, 10: 3116.
- [ 16 ] Chiasson V L, Munshi N, Young K J, et al. Inhibition of the prolyl isomerase E6 increases eNOS Ser116 phosphorylation, endothelial dysfunction, and blood pressure [ J ]. *Hypertension*, 2009, 54(4): E95.
- [ 17 ] Liao X H, Zhang A L, Zheng M, et al. Chemical or genetic Pin1 inhibition exerts potent anticancer activity against hepatocellular carcinoma by blocking multiple cancer-driving pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43639.
- [ 18 ] Liu Y M, Gao S J, Zhu J, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer via inhibition of the hedgehog signaling pathway[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(11): 5704-5715.
- [ 19 ] Zou J, Ma Q, Sun R, et al. Dihydroartemisinin inhibits HepG2.2.15 proliferation by inducing cellular senescence and autophagy[J]. *BMB Rep*, 2019, 52(8): 520-524.
- [ 20 ] Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian cancer: an integrated review [ J ]. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35 ( 2 ) : 151-156.
- [ 21 ] Brabletz S, Schuhwerk H, Brabletz T, et al. Dynamic EMT; a multi-tool for tumor progression [ J ]. *EMBO J*, 2021, 40(18): e108647.