

# 齐墩果酸对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭、转移的影响及其作用机制研究<sup>△</sup>

杜贵强\*, 张永莉, 胡孝辉(同济大学附属第一妇婴保健院妇科, 上海 200126)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)10-1190-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.10.07

**摘要** 目的:探讨齐墩果酸抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭、转移的作用及其机制。方法:采用 CCK-8 法检测不同浓度齐墩果酸(10、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$ )作用 12、24、36、48 h 对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖能力的影响;采用 Transwell 实验观察低、高剂量齐墩果酸(20、40  $\mu\text{mol/L}$ )作用 24 h 对 SKOV3 细胞迁移及侵袭能力的影响;采用 Western Blotting 法检测低、高剂量齐墩果酸对 SKOV3 细胞中核因子 $\kappa\text{B}$  p65 (NF- $\kappa\text{B}$  p65)、肝再生磷酸酶 3(PRL-3)、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6 (IL-6)、上皮钙黏着蛋白 E (E-cadherin)等蛋白表达的影响;运用脂多糖(LPS)诱导和 NF- $\kappa\text{B}$  p65 质粒转染 SKOV3 细胞,采用 Western blotting 法和实时荧光定量 PCR 考察低、高剂量齐墩果酸对 NF- $\kappa\text{B}$ /PRL-3 通路相关蛋白及其 mRNA 表达的影响。结果:随着齐墩果酸给药浓度的增加和作用时间的延长,SKOV3 细胞的增殖能力有随之降低的趋势,各剂量组的细胞存活率均显著低于对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。低、高剂量的齐墩果酸组的迁移和侵袭细胞数均显著减少( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且其 NF- $\kappa\text{B}$  p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白的相对表达量均显著降低,E-cadherin 蛋白的相对表达量均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。经 LPS 刺激后,LPS 模型组细胞中 NF- $\kappa\text{B}$  p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白及其 mRNA 的相对表达量较对照组显著升高,E-cadherin 蛋白及其 mRNA 的相对表达量均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );低、高剂量齐墩果酸组细胞中 NF- $\kappa\text{B}$  p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白及其 mRNA 的相对表达量均显著降低,E-cadherin 蛋白及其 mRNA 的相对表达量均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。在 NF- $\kappa\text{B}$  p65 过表达 SKOV3 细胞中,低、高剂量齐墩果酸同样能够显著下调 NF- $\kappa\text{B}$  p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白的表达,显著上调 E-cadherin 蛋白的表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论:齐墩果酸能够通过调控 NF- $\kappa\text{B}$ /PRL-3 信号通路来抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖、侵袭、转移。

**关键词** 齐墩果酸;卵巢癌;SKOV3 细胞;增殖;侵袭;转移;核因子 $\kappa\text{B}$ ;肝再生磷酸酶 3

## Study on the Effects of Oleanolic Acid on the Proliferation, Invasion and Metastasis of Human Ovarian Cancer SKOV3 Cells and Its Mechanism

DU Guiqiang, ZHANG Yongli, HU Xiaohui (Dept. of Gynecology, the First Affiliated Maternal and Infant Hospital of Tongji University, Shanghai 200126, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To investigate the effects and mechanism of oleanolic acid on inhibiting the proliferation, invasion and metastasis of human ovarian cancer SKOV3 cells. **METHODS:** CCK-8 assay was used to detect the effects of different concentrations of oleanolic acid (10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) on the proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells at 12, 24, 36 and 48 h. The effects of low-dose and high-dose of oleanolic acid (20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) on the metastasis and invasion ability of SKOV3 cells for 24 h were observed in Transwell assay. Western blotting assay was used to detect the effects of low-dose and high-dose of oleanolic acid on the protein expression of NF- $\kappa\text{B}$  p65, PRL-3, TNF- $\alpha$ , IL-6 and E-cadherin in SKOV3 cells. Through LPS induction and NF- $\kappa\text{B}$  p65 plasmid transfection, Western blotting and RT-qPCR assay were used to investigate the effects of low-dose and high-dose oleanolic acid on the expression of NF- $\kappa\text{B}$ /PRL-3 pathway related proteins and their mRNA. **RESULTS:** With the increase of the concentration and action time of oleanolic acid, the proliferation capacity of ovarian cancer SKOV3 cells was decreased, the survival rates of administration groups were significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Low-dose and high-dose of oleanolic acid could significantly reduce the number of migrating and invading cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The protein relative expression of NF- $\kappa\text{B}$  p65, PRL-3, TNF- $\alpha$  and IL-6 in SKOV3 cells were significantly decreased, while the protein relative expression of E-cadherin was significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). After LPS induction, protein and mRNA relative expression of NF- $\kappa\text{B}$  p65, PRL-3, TNF- $\alpha$  and IL-6 were increased significantly in LPS model group, while protein and mRNA relative expression of E-cadherin were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The protein and mRNA relative expression of NF- $\kappa\text{B}$  p65, PRL-3, TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly decreased, and protein and mRNA relative expression of E-cadherin were significantly increased in low-dose and high-dose of oleanolic acid group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). In SKOV3 cells with over-expressed NF- $\kappa\text{B}$  p65, low-dose and high-dose of oleanolic acid could significantly down-regulate the protein

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81871126)

\* 主治医师,博士。研究方向:妇科肿瘤。电话:021-20261059。

E-mail:122821905@qq.com

expression of NF- $\kappa\text{B}$  p65, PRL-3, TNF- $\alpha$  and IL-6, while upregulate the protein relative expression of E-cadherin ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **CONCLUSIONS:** Oleanolic acid can inhibit

卵巢癌是最常见的女性生殖器官恶性肿瘤之一,其致死率在妇科肿瘤中居首位,对女性生命健康造成严重威胁<sup>[1-2]</sup>。卵巢深居盆腔,体积小,卵巢癌早期缺乏典型症状且发展迅速,极易发生侵袭转移<sup>[3]</sup>,超过70%的患者在晚期才被确诊<sup>[4]</sup>,因此临床上卵巢癌治疗效果和患者预后均较差。流行病学调查结果表明,在全球范围内每年新增卵巢癌病例超过22.5万,死亡人数超过14万<sup>[5-6]</sup>,临床在卵巢癌的预防和治疗方面均面临巨大挑战。目前,临床治疗卵巢癌以药物治疗为主,但奥拉帕利等卵巢癌一线治疗药物的长期使用易引发多种不良反应,并导致肿瘤细胞耐药<sup>[7]</sup>,严重影响药物治疗效果及患者预后。因此,寻找安全有效防治卵巢癌的药物对于提升卵巢癌的治疗效果具有重要的意义。

齐墩果酸是一种广泛存在于各种水果和可食用植物中的一种五环三萜类化合物,具有显著的抗炎作用<sup>[8-9]</sup>。越来越多的研究证实,炎症是肿瘤微环境的基本特征,炎症信号通路活化与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[10-11]</sup>。核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路可促进肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(IL-6)等炎症因子的释放,抑制上皮钙黏着蛋白E(E-cadherin)的表达进而促进肿瘤细胞发生上皮间质转化,是肿瘤细胞增殖、侵袭、转移过程中重要的调节通路<sup>[12-13]</sup>。因此,抑制NF- $\kappa$ B信号通路以调节肿瘤细胞炎症微环境,进而抑制细胞增殖、侵袭、转移可作为防治肿瘤的新策略。McQueeney KE等<sup>[14]</sup>的研究表明,肿瘤侵袭转移关键因子肝再生磷酸酶3(PRL-3)在卵巢癌细胞中呈高表达,其通过活化端粒结合蛋白RAP1进而激活NF- $\kappa$ B信号通路以促进肿瘤侵袭、转移;Wang Z等<sup>[15]</sup>的研究表明,NF- $\kappa$ B p65在卵巢癌SKOV3细胞中异常表达,抑制该蛋白的表达则可抑制SKOV3细胞的增殖、侵袭、转移。由此可见,NF- $\kappa$ B/PRL-3信号通路与卵巢癌细胞侵袭、转移密切相关,有望作为卵巢癌防治的新靶标。研究表明,齐墩果酸对宫颈癌、肝癌、肺癌等多种恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移均具有抑制作用<sup>[16-18]</sup>,但其对卵巢癌细胞增殖、侵袭、转移的影响及其机制仍不明确。基于此,本研究以人卵巢癌SKOV3细胞为对象,探讨齐墩果酸对其增殖、侵袭、转移的影响及其机制,以期为该化合物防治卵巢癌提供理论研究基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

3111型CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);xMark型酶标仪、164-5050型电泳仪、170-4156型全

能蛋白转膜仪、TC20型细胞计数器、Gel Doc XR型凝胶成像系统、iQ5型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪等购自美国Bio-Rad公司;M400D型离心机(上海迈皋科学仪器有限公司);ML-T型分析天平(瑞士Mettler Toledo多公司);CKX31型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 药品与试剂

齐墩果酸对照品(批号:O110087,纯度:>98%)、脂多糖(LPS,批号:L118716)均购自上海阿拉丁试剂有限公司;NF- $\kappa$ B p65质粒(北京华越洋生物科技有限公司,批号:VECT76065);Lipofectamine™2000转染试剂(批号:12566014)、TRIzol™RNA提取试剂(批号:12183555)、BCA蛋白定量试剂盒(批号:23227)、ECL超敏化学发光液(批号:34580)、M-PER™哺乳动物蛋白提取试剂(批号:78501)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;胎牛血清(FBS,批号:10099-141)、0.25%胰蛋白酶溶液(批号:25200-056)、青霉素-链霉素双抗(批号:15070063)均购自美国Gibco公司;DMEM培养基(美国HyClone公司,批号:SH30022.01);NF- $\kappa$ B p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6、E-cadherin、GAPDH等编码基因上、下游引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计与合成;荧光定量PCR试剂(上海星汉生物科技有限公司);结晶紫染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1063);CCK-8试剂盒(日本Dojindo公司,批号:CK04);NF- $\kappa$ B p65兔单克隆抗体、PRL-3兔多克隆抗体、TNF- $\alpha$ 兔单克隆抗体、白细胞IL-6兔单克隆抗体、E-cadherin兔单克隆抗体、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)兔单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)二抗均购自美国CST公司(批号分别为8242、6484、11948、12912、3195、4970、7074);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)凝胶快速制备试剂盒(上海联迈生物工程有限公司,批号:LM-048);其余试剂均为实验室常用规格,水为超纯水。

### 1.3 细胞

人卵巢癌SKOV3细胞株(批号:TCHu185)购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

SKOV3细胞用含10%FBS、1%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养基(以下简称“完全培养基”),在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养(培养条件下同),待细胞处于对数生长期时进行后续试验。

## 2.2 齐墩果酸药液配制

精密称取齐墩果酸对照品适量,溶于二甲基亚砜 1 mL 中,配成浓度为  $1 \times 10^5$   $\mu\text{mol/L}$  的母液,于  $-20$   $^{\circ}\text{C}$  保存;用时取上述母液适量,加完全培养基稀释,经  $0.22$   $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过后,即得,备用。

## 2.3 细胞毒性检测

采用 CCK-8 法检测。取对数生长期的 SKOV3 细胞,以 4 000 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 时将细胞随机分为对照组及不同浓度药物组,另设不含细胞只含培养基的空白组,每组设 6 个复孔。各给药组分别加入齐墩果酸终浓度为 10、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$  (浓度设置参考文献[19])的含药完全培养基 100  $\mu\text{L}$ ,对照组和空白组加入完全培养基 100  $\mu\text{L}$ ,分别于培养 12、24、36、48 h 时,加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$ ,继续培养 2 h 后,使用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔吸光度 ( $A$ ),计算细胞存活率:细胞存活率 (%) =  $(A_{\text{试验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。上述试验重复 3 次。

## 2.4 分组、造模与给药

2.4.1 齐墩果酸对 SKOV3 细胞的作用 取 SKOV3 细胞,以  $5 \times 10^6$  个/皿接种于细胞培养皿中培养;待细胞生长融合至 80% 时,将其随机分为对照组和齐墩果酸低、高剂量药物组 (剂量设置参考“2.3”项下结果),每组设 3 个复孔。药物组分别加入低、高剂量齐墩果酸含药完全培养基 5 mL,对照组加入完全培养基 5 mL,培养 24 h。

2.4.2 齐墩果酸对 LPS 诱导 SKOV3 细胞的作用 取 SKOV3 细胞,以  $5 \times 10^6$  个/皿接种于细胞培养皿中培养;待细胞生长融合至 80% 时,将其随机分为对照组、LPS 模型组和齐墩果酸低、高剂量药物组 (剂量设置参考“2.3”项下结果),每组设 3 个复孔。对照组加入完全培养基 5 mL,模型组加入 LPS 终浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  的含药完全培养基 5 mL<sup>[20]</sup>,药物组加入为 100  $\mu\text{g/L}$  LPS 和低、高剂量齐墩果酸含药完全培养基 5 mL,培养 24 h。

2.4.3 齐墩果酸对 NF- $\kappa$ B p65 转染的 SKOV3 细胞的作用 取 SKOV3 细胞,以  $5 \times 10^6$  个/皿接种于细胞培养皿中培养;待细胞生长融合至 80% 时,将其随机分为对照组、NF- $\kappa$ B p65 过表达模型组和齐墩果酸低、高剂量药物组 (剂量设置参考“2.3”项下结果),模型组及药物组加入 NF- $\kappa$ B p65 过表达载体 (Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染试剂 10  $\mu\text{L}$  与 NF- $\kappa$ B p65 质粒 10  $\mu\text{g}$  于室温下孵育 20 min 即得)转染 12 h 后,药物组分别加入低、高剂量齐墩果酸含药完全培养基 5 mL,对照组及模型组给予完全培养基 5 mL,培养 24 h。

## 2.5 Transwell 迁移实验

将 SKOV3 细胞用不含 FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h,使其处于饥饿状态。SKOV3 细胞经胰蛋白酶消化后用 DMEM 培养基制成细胞悬液,以  $1 \times 10^5$  个/孔加入到

Transwell 小室上层中,小室下层加入 DMEM 培养基 (含 10% FBS) 800  $\mu\text{L}$ ,培养 24 h。按“2.4.1”项下方法分组、给药,培养 24 h 后,取出小室,用棉签擦去小室内侧底部未穿膜的细胞,经多聚甲醛固定、结晶紫染色液染色后,在显微镜下选取 5 个不同视野观察,计算各组细胞迁移数目 (迁移细胞被染成紫色)。上述试验重复 3 次。

## 2.6 Transwell 侵袭实验

Matrigel 胶融化后均匀铺于 Transwell 小室底部上层中,37  $^{\circ}\text{C}$  放置致凝固。其余操作同“2.5”项下方法,选取 5 个不同视野在显微镜下观察,计算各组细胞侵袭数目。上述试验重复 3 次。

## 2.7 相关基因 mRNA 表达检测

采用实时荧光定量 PCR 法检测。SKOV3 细胞按“2.4.1”“2.4.2”项下方法分组、给药、培养后,收集细胞,运用 TRIzol<sup>TM</sup> RNA 提取试剂提取细胞 RNA,将其逆转录为 cDNA 后,采用实时荧光定量 PCR 仪检测 NF- $\kappa$ B p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6、E-cadherin 等编码基因 mRNA 的表达水平。PCR 反应体系 (共 20  $\mu\text{L}$ ): cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,荧光定量 PCR 试剂 10  $\mu\text{L}$ ,无酶水 6  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s,共 40 个循环 (引物序列见表 1)。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相关基因 mRNA 的相对表达量。上述试验重复 3 次。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因名称	引物序列	产物长度, bp
GAPDH	正向: 5'-TGTCGTCATGGGTGTGAAC-3'	154
	反向: 5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'	
NF- $\kappa$ B p65	正向: 5'-GCGAGAGGAGCACAGATACC-3'	120
	反向: 5'-GCACAGCATTGAGTCTGATG-3'	
PRL-3	正向: 5'-GGGACTTCTCAGGTCGTGTC-3'	130
	反向: 5'-AGCCCCGTACTTCTTCAGGT-3'	
TNF- $\alpha$	正向: 5'-CCATGCTTCTTCTACCCGAATC-3'	98
	反向: 5'-AGCTGCTCTGTCGGATG-3'	
IL-6	正向: 5'-AAGCAGAGCTGTGCAGATGAGTA-3'	280
	反向: 5'-TGTCCTGCAGCCACTGGTTC-3'	
E-cadherin	正向: 5'-GAACGATTGCCACATACAC-3'	120
	反向: 5'-GAATTCCGGC TTGTTGTCAT-3'	

## 2.8 相关蛋白表达检测

采用 Western blotting 法检测。SKOV3 细胞按“2.4.1”~“2.4.3”项下方法分组、给药、培养后,收集细胞,运用 M-PER<sup>TM</sup> 哺乳动物蛋白提取试剂提取蛋白,后用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。随后将蛋白于 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴中变性 5 min 后即得蛋白样品。取蛋白样品 40  $\mu\text{g}$  在 100 V、80 mA 的电泳条件下进行 SDS-PAGE,在 25 V、1.0 A 条件下转膜至 PVDF 膜 (0.45  $\mu\text{m}$ ) 上,以 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,加入 NF- $\kappa$ B p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6、E-cadherin、 $\beta$ -actin 等一抗 (稀释度均为 1:1 000),在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜, TBST 溶液清洗 10 min  $\times$  3 次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (稀释度

为 1:10 000), 室温孵育 1 h, TBST 溶液清洗 10 min×3 次, 经 ECL 显色后运用凝胶成像分析系统成像, 采用 Image J 1.8.0 图像软件分析。以  $\beta$ -actin 作为内参, 以目标蛋白与内参的灰度值比值作为目标蛋白的相对表达量。上述试验重复 3 次。

## 2.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用  $t$  检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度齐墩果酸对 SKOV3 细胞存活率的影响

随着齐墩果酸浓度的增加和作用时间的延长, SKOV3 细胞的增殖能力有随之减弱的趋势, 齐墩果酸各剂量组细胞存活率均显著低于对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 详见表 2。当齐墩果酸浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ 、作用 24 h 时, SKOV3 细胞的存活率为  $(79.06 \pm 3.24)\%$ , 提示该浓度齐墩果酸对 SKOV3 细胞具有显著的细胞毒性。因此, 选择 20  $\mu\text{mol/L}$  作为齐墩果酸给药的低剂量, 选择 40  $\mu\text{mol/L}$  作为齐墩果酸给药的高剂量, 并选择作用 24 h 作为齐墩果酸的给药条件。

表 2 不同浓度齐墩果酸对 SKOV3 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

Tab 2 Effects of oleanolic acid on the survival rate of SKOV3 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	细胞存活率			
	培养 12 h	培养 24 h	培养 36 h	培养 48 h
对照组	99.04 ± 3.05	98.65 ± 2.97	102.10 ± 6.20	98.85 ± 4.10
齐墩果酸 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	93.18 ± 3.19*	91.25 ± 5.24*	87.18 ± 2.84**	85.32 ± 4.13**
齐墩果酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	89.70 ± 4.78**	79.06 ± 3.24**	77.76 ± 4.02**	76.24 ± 3.95**
齐墩果酸 40 $\mu\text{mol/L}$ 组	83.12 ± 3.33**	75.23 ± 4.38**	72.10 ± 3.32**	68.40 ± 4.57**
齐墩果酸 60 $\mu\text{mol/L}$ 组	74.35 ± 6.40**	68.15 ± 3.51**	62.06 ± 2.90**	58.21 ± 2.40**
齐墩果酸 80 $\mu\text{mol/L}$ 组	72.08 ± 3.47**	59.25 ± 1.91**	51.62 ± 4.02**	46.60 ± 2.34**
齐墩果酸 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	64.52 ± 4.46**	44.20 ± 2.35**	37.48 ± 5.12**	26.20 ± 3.05**

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3.2 齐墩果酸对 SKOV3 细胞迁移和侵袭的影响

与对照组比较, 齐墩果酸低、高剂量组迁移和侵袭的细胞数均显著减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 详见图 1、图 2、表 3。

### 3.3 齐墩果酸对 SKOV3 细胞增殖、侵袭、转移相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 齐墩果酸低、高剂量组 NF- $\kappa$ B p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的相对表达量均显著降低, E-cadherin 蛋白的相对表达量均显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 详见图 3、表 4。

### 3.4 齐墩果酸对 LPS 诱导的 SKOV3 细胞 NF- $\kappa$ B/PRL-3 通路相关蛋白及其 mRNA 表达的影响

与对照组比较, LPS 模型组细胞中 NF- $\kappa$ B p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白及其 mRNA 的相对表达量均显

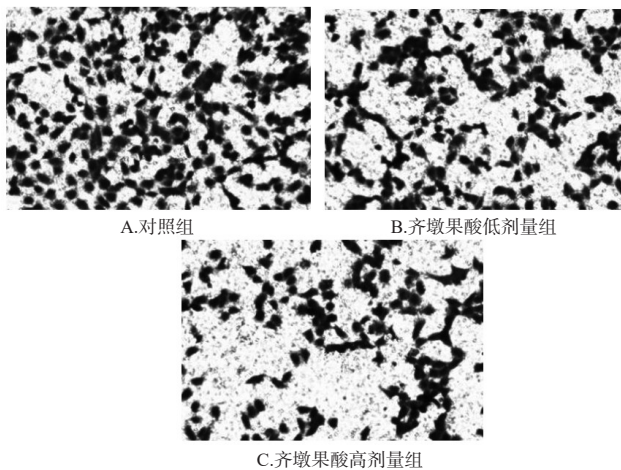


图 1 齐墩果酸对 SKOV3 细胞迁移能力影响的显微图 (结晶紫染色, ×200)

Fig 1 Micrographs of the effects of oleanolic acid on migration ability of SKOV3 cells (crystal violet staining, ×200)

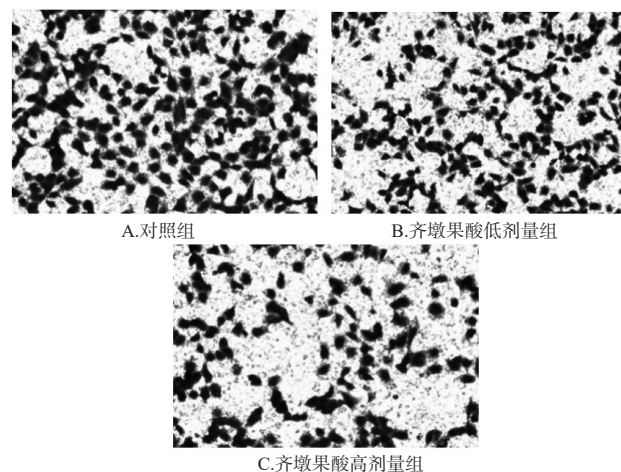


图 2 齐墩果酸对 SKOV3 细胞侵袭能力影响的显微图 (结晶紫染色, ×200)

Fig 2 Micrographs of the effects of oleanolic acid on invasion ability of SKOV3 cells (crystal violet staining, ×200)

表 3 齐墩果酸对 SKOV3 细胞迁移及侵袭能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3, \text{个}$ )

Tab 3 Effects of oleanolic acid on migration and invasion ability of SKOV3 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3, \text{cell}$ )

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
对照组	399.5 ± 41.4	374.3 ± 37.6
齐墩果酸低剂量组	305.8 ± 42.5*	287.3 ± 22.0*
齐墩果酸高剂量组	177.0 ± 13.7**	169.5 ± 16.7**

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

著升高, E-cadherin 蛋白及其 mRNA 的相对表达量均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS 模型组比较, 齐墩果酸低、高剂量组细胞中 NF- $\kappa$ B p65、PRL-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白及其 mRNA 相对表达量均显著降低, E-cadherin 蛋白及其

mRNA 相对表达量均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 详见表5、图4、表6。

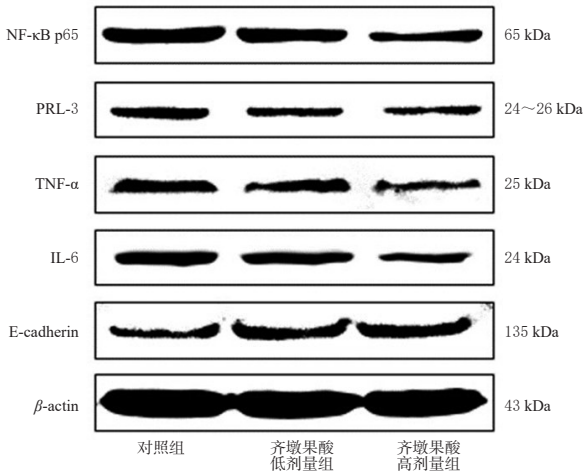


图3 齐墩果酸对SKOV3细胞中增殖、侵袭、转移相关蛋白表达影响的电泳图

Fig 3 Electrophoretograms of the effects of oleanolic acid on the expression of proteins related to proliferation, invasion and metastasis in SKOV3 cells

表4 各组细胞中增殖、侵袭、转移相关蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 4 Effects of oleanolic acid on the expression of proteins related to proliferation, invasion and metastasis in SKOV3 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	NF-κB p65	PRL-3	TNF-α	IL-6	E-cadherin
对照组	0.51±0.06	0.17±0.02	0.20±0.03	0.30±0.04	0.08±0.03
齐墩果酸低剂量组	0.33±0.05*	0.10±0.02*	0.12±0.02*	0.22±0.02*	0.18±0.02*
齐墩果酸高剂量组	0.15±0.04**	0.08±0.02**	0.07±0.02**	0.09±0.02**	0.28±0.05**

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

表5 齐墩果酸对LPS诱导的SKOV3细胞中NF-κB/PRL-3通路相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 5 Effects of oleanolic acid on the expression of NF-κB/PRL-3 pathway related proteins in SKOV3 cells induced by LPS( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	NF-κB p65	PRL-3	TNF-α	IL-6	E-cadherin
对照组	0.04±0.02	0.19±0.04	0.16±0.02	0.12±0.03	0.42±0.06
LPS模型组	0.49±0.04**	0.53±0.03**	0.53±0.03**	0.38±0.05**	0.06±0.02**
齐墩果酸低剂量组	0.39±0.03*	0.39±0.05*	0.46±0.03	0.23±0.02*	0.18±0.03**
齐墩果酸高剂量组	0.12±0.02**	0.19±0.05**	0.35±0.04**	0.11±0.02**	0.24±0.04**

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与LPS模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. LPS model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3.5 齐墩果酸对NF-κB过表达诱导的SKOV3细胞NF-κB/PRL-3通路相关蛋白表达水平的影响

与对照组比较,NF-κB p65过表达模型组细胞中

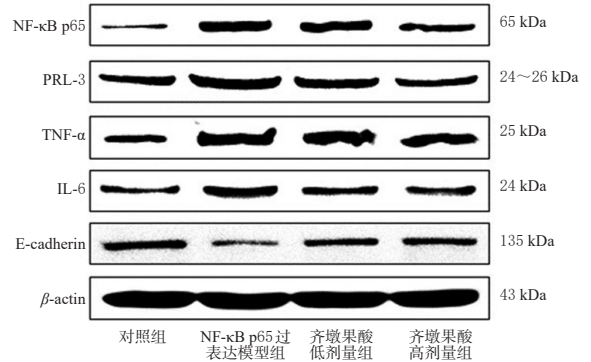


图4 齐墩果酸对LPS诱导SKOV3细胞中NF-κB/PRL-3通路相关蛋白表达影响的电泳图

Fig 4 Electrophoretograms of the effects of oleanolic acid on the expression of NF-κB/PRL-3 pathway related proteins in SKOV3 cells induced by LPS

表6 齐墩果酸对LPS诱导的SKOV3细胞中NF-κB/PRL-3通路相关基因mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 6 Effects of oleanolic acid on mRNA expression of NF-κB/PRL-3 pathway related gene in SKOV3 cells induced by LPS( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	NF-κB p65	PRL-3	TNF-α	IL-6	E-cadherin
对照组	1.00±0.19	0.96±0.20	1.04±0.16	1.10±0.14	1.02±0.17
LPS模型组	4.29±0.67**	5.51±0.71**	3.31±0.22**	2.43±0.42*	0.33±0.08**
齐墩果酸低剂量组	2.41±0.63*	3.87±0.33*	2.32±0.24*	1.56±0.05*	0.57±0.05*
齐墩果酸高剂量组	2.18±0.72*	2.97±0.31**	2.06±0.34*	1.22±0.13*	0.83±0.21*

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与LPS模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. LPS model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

NF-κB p65、PRL-3、TNF-α、IL-6蛋白的相对表达量均显著升高,E-cadherin蛋白的相对表达量显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );与NF-κB p65过表达模型组比较,齐墩果酸低、高剂量组细胞中NF-κB p65、PRL-3、TNF-α、IL-6蛋白的相对表达量均显著降低,E-cadherin蛋白的相对表达量均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见图5、表7。

## 4 讨论

卵巢癌具有早期难以诊断、恶性程度高、极易发生转移等特点,难以进行早期预防,治疗难度较大<sup>[21-22]</sup>。近年来,卵巢癌的发病率逐年升高,且呈年轻化趋势<sup>[23]</sup>,故探寻有效防治卵巢癌的药物已成为目前研究的热点。研究表明,肿瘤细胞微环境与肿瘤的发生发展具有密切关联<sup>[10-11]</sup>,因此改善肿瘤细胞微环境为肿瘤的防治提供了新思路。

齐墩果酸为可用于肿瘤患者的免疫调节,其广泛存在于蔬菜、水果和可食用植物中,是一种自然资源充足的天然活性成分,具有显著的抗炎、调节免疫、保肝及抗

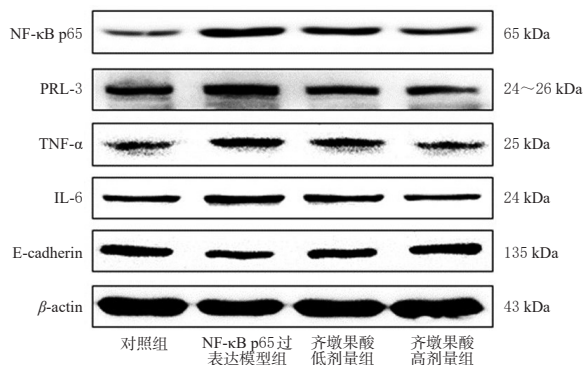


图5 齐墩果酸对NF-κB p65过表达诱导SKOV3细胞中NF-κB/PRL-3通路相关蛋白表达影响的电泳图

Fig 5 Electrophoretograms of the effects of oleanolic acid on the expression of NF-κB/PRL-3 pathway related proteins in SKOV3 cells induced by NF-κB p65-overexpression

表7 齐墩果酸对NF-κB p65过表达诱导的SKOV3细胞中NF-κB/PRL-3通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 7 Effects of oleanolic acid on the expression of NF-κB/PRL-3 pathway related proteins in SKOV3 cells induced by NF-κB-overexpression ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	NF-κB p65	PRL-3	TNF-α	IL-6	E-cadherin
对照组	0.10 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.38 ± 0.04
NF-κB p65过表达模型组	0.27 ± 0.03**	0.39 ± 0.03**	0.25 ± 0.02*	0.29 ± 0.04*	0.27 ± 0.02*
齐墩果酸低剂量组	0.18 ± 0.03*	0.29 ± 0.02*	0.18 ± 0.02*	0.20 ± 0.01*	0.33 ± 0.02*
齐墩果酸高剂量组	0.12 ± 0.03**	0.19 ± 0.02**	0.14 ± 0.02**	0.14 ± 0.03*	0.36 ± 0.04*

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与NF-κB p65过表达模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. NF-κB p65-overexpression model group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

肿瘤等作用<sup>[24-25]</sup>。本研究探讨了齐墩果酸对卵巢癌SKOV3细胞增殖、侵袭、转移的影响。CCK-8结果显示,随着齐墩果酸给药浓度的增加和作用时间的延长,SKOV3细胞的增殖能力有随之减弱的趋势,齐墩果酸各剂量组细胞存活率均显著低于对照组,说明齐墩果酸对SKOV3细胞增殖具有抑制作用。Transwell实验结果显示,20、40 μmol/L齐墩果酸均能够显著减少卵巢癌SKOV3细胞迁移、侵袭细胞数目,说明其具有抑制SKOV3细胞迁移与侵袭的作用。

肿瘤细胞炎性浸润是肿瘤发生发展过程中的一个重要特征。NF-κB信号通路介导的炎症反应能够促进大量炎症因子(如TNF-α、IL-6等)释放,加速肿瘤细胞的增殖、侵袭与转移<sup>[26-27]</sup>。其中,TNF-α能够增加血管通透性,IL-6能够促进血管生成及肿瘤细胞增殖、分化,在肿瘤细胞侵袭与转移过程中发挥着重要的作用<sup>[28]</sup>。PRL-3是肿瘤细胞侵袭与转移的关键调控因子<sup>[29]</sup>,研究表明,

该因子能够促进触发肿瘤细胞上皮间质转化活化,抑制上皮标志物E-cadherin蛋白的表达,从而降低肿瘤细胞黏附作用并促进细胞外基质降解,最终诱导肿瘤细胞向周围组织、血管侵袭和转移<sup>[30-31]</sup>。由此可见,NF-κB/PRL-3信号通路对肿瘤细胞增殖、侵袭、转移均具有促进作用。研究显示,SKOV3细胞中NF-κB信号通路异常活化,具有促进卵巢癌细胞增殖、侵袭、转移的作用,活化的NF-κB信号通路能够促进PRL-3高表达进而促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移<sup>[32]</sup>。这提示靶向调节NF-κB/PRL-3信号通路可作为抑制卵巢癌细胞增殖、侵袭、转移的重要途径。

本研究结果表明,不同浓度齐墩果酸均能够显著抑制SKOV3细胞中NF-κB p65、PRL-3、TNF-α、IL-6蛋白的表达,升高E-cadherin蛋白的表达。研究显示,LPS能够通过活化NF-κB信号通路介导炎症反应以促进肿瘤细胞上皮间质转化<sup>[33]</sup>。因此,本研究运用LPS诱导SKOV3细胞活化NF-κB/PRL-3信号通路,进一步研究齐墩果酸对该信号通路的调控作用。结果显示,采用LPS诱导后,SKOV3细胞中NF-κB p65、PRL-3、TNF-α、IL-6蛋白及其mRNA的表达均显著升高,E-cadherin蛋白及其mRNA的表达均显著降低;采用齐墩果酸干预能够显著降低细胞中NF-κB p65、PRL-3、TNF-α、IL-6蛋白及其mRNA的表达,升高E-cadherin蛋白及其mRNA的表达。这提示齐墩果酸抑制SKOV3细胞侵袭、转移的作用可能与调控NF-κB/PRL-3信号通路以抑制炎症反应有关。NF-κB信号通路活化能够激活PRL-3、抑制E-cadherin,从而促进肿瘤细胞的侵袭与转移<sup>[34]</sup>。为了进一步确定齐墩果酸是否通过抑制NF-κB p65进而调节PRL-3、TNF-α、IL-6、E-cadherin的表达,本研究运用Lipofectamine™ 2000转染试剂将NF-κB p65质粒转染至SKOV3细胞中,使细胞中的NF-κB p65过表达,从而激活PRL-3、TNF-α、IL-6等相关蛋白。结果显示,齐墩果酸仍然能够抑制NF-κB p65过表达诱导的炎症反应,下调SKOV3细胞中NF-κB p65、PRL-3、TNF-α、IL-6蛋白的表达,上调E-cadherin蛋白的表达。由此推测,齐墩果酸可能主要通过抑制炎症反应及上皮细胞间质化过程而抑制SKOV3细胞增殖、侵袭、转移。

综上所述,齐墩果酸可能通过调控NF-κB/PRL-3通路相关因子的表达,抑制炎症反应和上皮间质转化而抑制SKOV3细胞增殖、侵袭、转移,对于防治卵巢癌具有一定的潜力。

### 参考文献

[1] BOWTELI DD, BOHM S, AHMED AA, et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(11): 668-679.

[2] TORRE LA, TRABERT B, DESANTIS CE, et al. Ovari-

- an cancer statistics: 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(4):284-296.
- [ 3 ] 周琳,何秀萍.卵巢癌形成、诊断及治疗的研究进展[J].中国生育健康杂志,2018,29(5):491-493.
- [ 4 ] STEWART C, RALYEA C, LOCKWOOD S. Ovarian cancer: an integrated review[J]. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35(2):151-156.
- [ 5 ] FRANIER B, THOMPSON M. Early stage detection and screening of ovarian cancer: a research opportunity and significant challenge for biosensor technology[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019. DOI:10.1016/j.bios.2019.03.041.
- [ 6 ] LA VECCHIA C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2017, 26(1):55-62.
- [ 7 ] GOULOOZE SC, COHEN AF, RISSMANN R. Olaparib[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 81(1):171-173.
- [ 8 ] 程艳刚,荆然,谭金燕,等.齐墩果酸及其衍生物抗肿瘤作用机制研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(11):210-213.
- [ 9 ] SHANMUGAM MK, DAI X, KUMAR AP, et al. Oleanoic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence[J]. *Cancer Lett*, 2014, 346(2):206-216.
- [10] 唐亚尼,孙洋,叶茂.炎症反应促进肿瘤的侵袭和转移的研究进展[J].生命科学研究,2015,19(2):160-164.
- [11] CHANG CH, QIU J, O' SULLIVAN D, et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression[J]. *Cell*, 2015, 162(6):1229-1241.
- [12] QIN Y, ZHAO D, ZHOU HG, et al. Apigenin inhibits NF- $\kappa$ B and snail signaling, EMT and metastasis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27):41421-41431.
- [13] TANIGUCHI K, KARIN M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(5):309-324.
- [14] MCQUEENEY KE, SALAMOUN JM, BURNETT JC, et al. Targeting ovarian cancer and endothelium with an allosteric PTP4A3 phosphatase inhibitor[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(9):8223-8240.
- [15] WANG Z, ZHAI Z, DU X. Celastrol inhibits migration and invasion through blocking the NF- $\kappa$ B pathway in ovarian cancer cells[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1):819-824.
- [16] 王晶,张涛,商云飞.齐墩果酸对宫颈癌Hela细胞凋亡的影响[J].黑龙江医药科学,2011,34(1):31-32.
- [17] BAO X, GAO M, XU H, et al. A novel oleanolic acid-loaded PLGA-TPGS nanoparticle for liver cancer treatment[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(7):1193-1203.
- [18] ZHAO X, LIU M, LI D. Oleanolic acid suppresses the proliferation of lung carcinoma cells by miR-122/Cyclin G1/MEF2D axis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 400(1/2):1-7.
- [19] 耿传营,徐波,李红艳,等.3种中药单体对卵巢癌端粒酶活性与放射敏感性的影响[J].中华中医药杂志,2009, 24(10):1372-1375.
- [20] 于洋,刘师兵,李松岩,等.脂多糖通过调节iNOS表达影响人卵巢癌SKOV3/DDP细胞顺铂耐药性的研究[J].毒理学杂志,2017,31(5):350-354.
- [21] 李晶,吴妙芳,林仲秋.《FIGO 2018 妇癌报告》:卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌诊治指南解读[J].中国实用妇科与产科杂志,2019,35(3):304-314.
- [22] BURSTEIN HJ, KRILOV L, ARAGON-CHING JB, et al. Clinical cancer advances 2017: annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(12):1341-1367.
- [23] WEBB PM, GREEN AC, JORDAN SJ. Trends in hormone use and ovarian cancer incidence in US white and Australian women: implications for the future[J]. *Cancer Causes Control*, 2017, 28(5):365-370.
- [24] 廖忻,陈文莹,杨杰也琦,等.齐墩果酸的来源及护肾作用研究进展[J].安徽农学通报,2018,24(6):156-160.
- [25] 王京,郑诚月,王杨,等.齐墩果酸衍生物的合成、抗癌活性及构效关系研究进展[J].国外医药(抗生素分册), 2017, 38(3):118-124.
- [26] 胡芳.核因子- $\kappa$ B与卵巢癌[J].国外医学(妇产科学分册), 2001, 28(4):228-231.
- [27] 方艳惠,赵喜娃,安丽沙. IL-6对卵巢癌细胞迁移和侵袭影响及机制探讨[J].中华肿瘤防治杂志,2018, 25(16):1156-1162.
- [28] 林镇海,闫士灿,张洁筠,等. MST4通过激活MAPK-ERK信号通路调节炎症因子释放促进肝癌的侵袭和转移的机制研究[J].中国癌症杂志,2017, 27(9):681-686.
- [29] 宋秀军,刘建红,吕进,等. PRL-3在肿瘤中作用机制的研究进展[J].临床肿瘤学杂志,2017, 22(6):566-569.
- [30] XIONG J, LI Z, ZHANG Y, et al. PRL-3 promotes the peritoneal metastasis of gastric cancer through the PI3K/Akt signaling pathway by regulating PTEN[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4):1819-1828.
- [31] XU H, ZENG Y, LIU L, et al. PRL-3 improves colorectal cancer cell proliferation and invasion through IL-8 mediated glycolysis metabolism[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(4):1271-1279.
- [32] GARI HH, DEGALA GD, RAY R, et al. PRL-3 engages the focal adhesion pathway in triple-negative breast cancer cells to alter actin structure and substrate adhesion

# 干姜及其炮制品色差值与活性成分含量的相关性研究<sup>△</sup>

林华坚\*,张梓豪,孟江#,王淑美(广东药科大学中药学院/国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室/广东省高校中药质量工程技术研究中心,广州 510006)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)10-1197-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.10.08

**摘要** 目的:评价干姜及其炮制品色差值与活性成分含量的相关性。方法:采用高效液相色谱法测定6种活性成分的含量,采用色彩色差计测定干姜及其炮制品的色差值[明度( $L^*$ )、红绿色轴分量( $a^*$ )、黄蓝色轴分量( $b^*$ )]。采用SPSS 24.0软件对色差值与活性成分含量进行相关性分析。结果:姜酮、6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、二乙酰氧基-6-姜二醇和10-姜酚检测质量浓度的线性范围分别为2.65~105.90、10.15~406.00、4.87~194.80、5.28~211.20、6.14~245.70、7.02~280.80  $\mu\text{g/mL}$  ( $r$ 均大于0.999);定量限分别为7.46、13.68、14.37、16.62、17.03、17.99 ng,检测限分别为2.24、4.11、4.31、4.99、5.11、5.40 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%;平均加样回收率分别为101.34%、102.14%、101.22%、103.12%、103.74%、103.54%、103.06%、98.55%、99.43%、99.36%、103.51%、101.21%、100.85%、99.42%、99.60%、100.39%、97.69%、103.84% (RSD均小于3%,  $n=3$ );含量分别为0~0.66、0.06~7.57、0.03~1.45、0.29~3.47、0.15~2.85、0.04~2.83 mg/g。色差值 $L^*$ 、 $b^*$ 与干姜不同炮制程度呈极显著负相关( $P<0.01$ ), $a^*$ 与炮制程度呈正相关( $P<0.05$ );干姜炮制前后 $L^*$ 、 $b^*$ 与姜酮含量呈极显著负相关,与其余5种成分呈极显著正相关( $P<0.01$ ); $a^*$ 与姜酮呈极显著正相关( $P<0.01$ ),与其余5种成分无相关性( $P>0.05$ );干姜及其炮制品与姜酮含量呈极显著正相关,与其余5种成分含量呈极显著负相关( $P<0.01$ )。结论:干姜及其炮制品的色差值与其活性成分含量相关,即随炮制程度的加重,其 $a^*$ 增加, $L^*$ 、 $b^*$ 降低;姜酮含量升高,6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、二乙酰氧基-6-姜二醇、10-姜酚含量降低。

**关键词** 干姜;炮制品;高效液相色谱法;色彩色差计;活性成分;含量;色差值;相关性分析

## Correlation Study of Color Difference Values and Active Constituent Contents in Crude and Processed *Zingiber officinale*

LIN Huajian, ZHANG Zihao, MENG Jiang, WANG Shumei (School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University/Key Laboratory of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine/Engineering Technology Research Center for Chinese Materia Medica Quality of Guangdong Universities, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To evaluate the correlation between color difference values and active constituent contents of crude and processed *Zingiber officinale*. METHODS: HPLC method was adopted to determine the content of 6 active constituents. The color difference values of crude and processed *Z. officinale* [lightness ( $L^*$ ), red-green axis component ( $a^*$ ), yellow-blue axis component ( $b^*$ )] were determined by chromatic aberration meter. SPSS 24.0 software was adopted for the correlation analysis between color difference values and active constituent contents. RESULTS: The linear range of zingiberone, 6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol, diacetoxy-6-gingerol and 10-gingerol were 2.65-105.90, 10.15-406.00, 4.87-194.80, 5.28-211.20, 6.14-245.70, 7.02-280.80  $\mu\text{g/mL}$  ( $r>0.999$ ). The limits of quantification were 7.46, 13.68, 14.37, 16.62, 17.03, 17.99 ng, and the limits of detection were 2.24, 4.11, 4.31, 4.99, 5.11, 5.40 ng, respectively. RSDs of precision, stability, and repeatability tests were all lower than 3%. The average recovery rates were 101.34%, 102.14%, 101.22%; 103.12%, 103.74%, 103.54%; 103.06%,

properties critical for cell migration and invasion[J]. *Cancer Lett*, 2016, 380(2): 505-512.

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81873006, No.8110-2809);国家中医药管理局第6批全国老中医药专家学术经验继承工作项目(No.国中医药人教发[2017]29号);广东省教育厅重点平台和科研项目(No.2018KZDXM040, No.2016KTSCX064);

\*硕士研究生。研究方向:生药学。E-mail: nutwww@163.com

#通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药炮制原理与饮片质量控制。E-mail: jiangmeng666@126.com

[33] HUANG T, CHEN Z, FANG L. Curcumin inhibits LPS-induced EMT through downregulation of NF- $\kappa$ B-Snail signaling in breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(1): 117-124.

[34] LI H, LI Y, LIU D, et al. LPS promotes epithelial-mesenchymal transition and activation of TLR4/JNK signaling[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10429-10435.

(收稿日期:2019-09-14 修回日期:2020-03-26)

(编辑:段思怡)