

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.23.003

# 姜黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖凋亡和侵袭能力的影响

陈永宏,高月<sup>△</sup>

(重庆市北碚区中医院,重庆 400700)

**摘要:**目的 探讨姜黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖凋亡和侵袭能力的影响。方法 将非小细胞肺癌 A549 细胞分为对照组和低、中、高剂量组,分别用不含姜黄素的完全培养基和含有质量浓度为 10,20,40  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素的完全培养基培养细胞 48 h。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖情况,采用流式细胞分析技术检测细胞凋亡情况,采用 Transwell 侵袭转移实验检测细胞侵袭能力,采用 Western Blotting 技术检测细胞 P27,Orai1,caspase-3,以及表皮生长因子受体(EGFR)、基质交互分子 1(STIM1)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达情况。结果 对照组细胞吸光率显著高于低剂量组,低剂量组显著高于中剂量组,中剂量组显著高于高剂量组( $P < 0.05$ );对照组细胞凋亡率、增殖抑制系数显著低于低剂量组,低剂量组显著低于中剂量组,中剂量组显著低于高剂量组( $P < 0.05$ );对照组细胞 P27 和 caspase-3 显著低于低剂量组,低剂量组显著低于中剂量组,中剂量组显著低于高剂量组( $P < 0.05$ );对照组 Orai1,EGFR,STIM1 显著高于低剂量组,低剂量组显著高于中剂量组,中剂量组显著高于高剂量组( $P < 0.05$ );对照组视野细胞数和 MMP-9 显著高于低剂量组,低剂量组显著高于中剂量组,中剂量组显著高于高剂量组( $P < 0.05$ );对照组侵袭抑制率和 E-cadherin 显著低于低剂量组,低剂量组显著低于中剂量组,中剂量组显著低于高剂量组( $P < 0.05$ )。结论 姜黄素可通过调节非小细胞肺癌细胞蛋白表达来提高肿瘤细胞凋亡率,降低肿瘤细胞增殖能力和侵袭能力,且与姜黄素呈剂量依赖关系。

**关键词:**非小细胞肺癌;A549 细胞;姜黄素;肿瘤细胞;增殖;凋亡;侵袭

中图分类号:R965;R979.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)23-0009-04

## Effect of Curcumin on Proliferation, Apoptosis and Invasiveness of A549 Cells of Non-Small Cell Lung Cancer

Chen Yonghong, Gao Yue

(Chongqing Beibei District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, China 400700)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of curcumin on the proliferation, apoptosis and invasion of A549 cells of non-small cell lung cancer cells. **Methods** A549 cells of non-small cell lung cancer were divided into the control group, low dose group, middle dose group and high dose group, they were cultured in a complete medium without curcumin, or cultured in a complete medium containing 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$  curcumin for 48 h, respectively. The cell proliferation was detected by MTT, the cell apoptosis was detected by flow cytometry. The invasive ability of cells was detected by Transwell invasion and metastasis assay, and the expression of P27, Orai1, caspase-3, EGFR, STIM1, E-cadherin and MMP-9 was detected by Western Blotting. **Results** The cell absorptivity of the control group was significantly higher than that of the low dose group, that of the low dose group was significantly higher than that of the middle dose group, and that of the middle dose group was significantly higher than that of the high dose group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate and proliferation inhibition coefficient of the control group were significantly lower than those of the low dose group, those of the low dose group were significantly lower than those of the middle dose group, and those of the middle dose group were significantly lower than those of the high dose group ( $P < 0.05$ ). The P27, caspase-3 of cells of the control group were significantly lower than those of the low dose group, those of the low dose group were significantly lower than those of the middle dose group, and those of the middle dose group were significantly lower than those of the high dose group ( $P < 0.05$ ). The Orai1, EGFR and STIM1 of the control group were significantly higher than those of the low dose group, those of the low dose group were significantly higher than those of the middle dose group, and those of the middle dose group were significantly higher than those of the high dose group ( $P < 0.05$ ). The number of cells under visual field and MMP-9 of the control group were significantly higher than those of the low dose group, those of the low dose group were significantly higher than those of the middle dose group, and those of the middle dose group were significantly higher than those of the high dose group ( $P < 0.05$ ). The invasion inhibition rate and E-cadherin of the control group were significantly lower than those of the low dose group, those of the low dose group were significantly lower than those of the middle dose group, and those of the middle dose group were significantly lower than those of the high dose group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Curcumin can increase the apoptosis rate and decrease the proliferation and invasion ability of tumor cells by regulating the protein expression of non-small cell lung cancer, and this effect is related to the dose dependence of curcumin.

**Key words:** non-small cells lung cancer; A549 cells; curcumin; tumor cell; proliferation; apoptosis; invasion

第一作者:陈永宏,男,大学本科,副主任医师,研究方向为肿瘤病理学,(电话)023-68353625(电子信箱)chengyonghong001@sina.com。

<sup>△</sup>通信作者:高月,女,博士研究生,副主任技师,研究方向为病理检验,(电子信箱)moon19740000@163.com。

非小细胞肺癌是我国发病率和致死率最高的肿瘤性疾病,高度的侵袭性是其致死率高、复发率高的主要原因。目前,抗肿瘤药物的作用机制大多数都是以提高肿瘤细胞凋亡率,降低肿瘤细胞增殖能力和侵袭能力为主。有研究提出,某些药物对肿瘤细胞的上述一个特性或多个特性存在着影响作用。姜黄素是从姜黄根茎中提取出来的酚类化合物,具有抗炎、抗氧化和抑制肿瘤细胞生长的能力<sup>[1]</sup>。本研究中探讨了姜黄素对肿瘤细胞的增殖、凋亡和侵袭功能的影响机制。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:722n 型分光光度计(上海菁华科学仪器有限公司);acea novocyte 型流式细胞分析仪(艾森生物有限公司);奥林巴斯 cx23 型光学显微镜(奥林巴斯株式会社);genosens1850 型凝胶成像仪(上海勤翔凝胶科学仪器有限公司)。

试剂:姜黄素(上海士锋生物科技有限公司,批号 B10359-25g);二甲基亚砜(上海士锋生物科技有限公司,批号 A5852);小牛血清(批号 HLC1401),1640 培养基(批号 HLC150120)均购于上海哈林生物科技有限公司。四甲基偶氮唑盐溶液(批号 M2003);DMSO 溶液(批号 D2650);胰酶(批号 T4674);binding buffer, Annexin-FITC, Propidium Iodide 细胞凋亡检测试剂盒(批号 APOAC-1KT)均购于 Sigma 公司。P27 单克隆抗体(批号 P2092),Orai1 单克隆抗体(批号 O8264),Caspase-3 单克隆抗体(批号 c8487),EGFR 单克隆抗体(批号 SAB4300352),STIM1 单克隆抗体(批号 S6197),E-cadherin 单克隆抗体(批号 U3254),MMP-9 单克隆抗体(批号 SAB4501896),GAPDH 单克隆抗体(批号 G9295)均购于 Sigma 公司。

细胞:非小细胞肺癌 A549 细胞由西南医院呼吸内科赠送。

### 1.2 方法

细胞培养方法:将对数期非小细胞肺癌 A549 细胞用含有 7% 小牛血清的 1640 培养基,按 1:5 的比例在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养<sup>[2]</sup>。

姜黄素溶液配置方法:将 5.90 mg 姜黄素用 200 μL 二甲基亚砜溶解,再加入 7 800 μL 无血清 1640 培养基配制质量浓度为 2 000 μmol/L 的姜黄素溶液原液<sup>[3]</sup>。

MTT 法检测细胞增殖情况:将细胞浓度调整为 50 000 个/mL 后,按 150 μL/孔加入 96 孔板,在 37℃ 及 5% CO<sub>2</sub> 环境下培养 24 h,吸出上清液,分别于低、中、高剂量组细胞培养孔中分别加入姜黄素溶液(姜黄素质量浓度分别为 10, 20, 40 μmol/L)和培养基,调整各孔体积为 150 μL,对照组则只加入等体积的培养基。在上述

环境中继续培养 48 h,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL,再培养 4 h,吸出各孔上清液,加入 DMSO 溶液 150 μL,震荡 10 min,在酶标仪上检测各孔在 490 nm 波长处的吸光度。细胞生长抑制率 = (对照组吸光值 - 实验组吸光值)/对照组吸光值<sup>[4-5]</sup>。

流式细胞分析技术检测细胞凋亡情况:将各组细胞浓度为 4 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞分别在不含姜黄素的培养基和姜黄素质量浓度为 10, 20, 40 μmol/L 的培养基中培养 48 h 后,收集细胞,尔后用胰酶消化,洗涤,然后用 binding buffer 细胞凋亡检测试剂盒重悬,加入 Annexin-FITC 和 Propidium Iodide 细胞凋亡检测试剂盒孵育 0.5 h,最后使用流式细胞分析仪检测样本<sup>[6]</sup>。

Transwell 侵袭转移实验检测细胞侵袭能力:将对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组细胞分别用不含姜黄素的培养基和含姜黄素质量浓度为 10, 20, 40 μmol/L 的培养基培养 48 h 后,离心重悬,调整细胞浓度为 4 × 10<sup>5</sup> 个/mL,将用 50 mg/L 的 matrigel 1:8 稀释液湿润后的 transwell 小室风干,然后每个小室加入 200 μL F-12 培养基,分别加入培养后的细胞,调整细胞浓度为 4 × 10<sup>5</sup> 个/mL,将小室放在 24 孔板上(每孔内含 F-12 培养基 200 μL),在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养 24 h。将 24 孔板内加入 4% 多聚甲醛 1 mL,再放入小室,固定 20 min,然后风干,染色,在显微镜下观察,计数细胞数量。侵袭抑制率 = (1 - 各实验组细胞数/对照组细胞数) × 100%<sup>[7]</sup>。

Western Blotting 法检测增殖凋亡相关蛋白和侵袭相关蛋白的表达情况:将对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组细胞分别用不含姜黄素的培养基、含姜黄素浓度为 10, 20, 40 μmol/L 的培养基,调整细胞浓度为 4 × 10<sup>5</sup> 个/mL,放入 12 孔板中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养 48 h。提取细胞总蛋白,使用 BCA 法检测细胞总蛋白,最后制胶,电泳,转膜,封闭,然后分别用 P27, Orai1, Caspase-3, EGFR, STIM1, E-cadherin, MMP-9, GAPDH 兔抗人单克隆蛋白在 37℃ 条件下对上述样品进行封闭,最后按说明书加入二抗结合,洗涤,成像<sup>[8]</sup>。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm s$ ) 表示,用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞增殖凋亡情况

由表 1 可知,对照组细胞吸光度显著高于低剂量组,低剂量组显著高于中剂量组,中剂量组显著高于高剂量组 (*P* < 0.05);而增殖抑制系数和凋亡率对照组显

著低于低剂量组,低剂量组显著低于中剂量组,中剂量组显著低于高剂量组( $P < 0.05$ )。说明姜黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖能力有抑制作用,同时还有诱导细胞凋亡的作用,且与姜黄素存在剂量依赖关系。

表 1 各组细胞增殖凋亡能力检测结果( $\bar{X} \pm s$ )

| 组别   | 吸光度                          | 增殖抑制系数(%)                   | 凋亡率(%)                      |
|------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 对照组  | 0.853 ± 0.021                | 0                           | 4.17 ± 0.87                 |
| 低剂量组 | 0.752 ± 0.015 <sup>a</sup>   | 11.84 ± 0.98 <sup>a</sup>   | 9.83 ± 0.92 <sup>a</sup>    |
| 中剂量组 | 0.674 ± 0.014 <sup>ab</sup>  | 20.98 ± 1.24 <sup>ab</sup>  | 15.76 ± 1.01 <sup>ab</sup>  |
| 高剂量组 | 0.537 ± 0.011 <sup>abc</sup> | 37.05 ± 2.23 <sup>abc</sup> | 25.87 ± 1.22 <sup>abc</sup> |

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与低剂量组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与中剂量组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。下表同。

## 2.2 细胞增殖凋亡相关蛋白表达情况

由表 2 可知,P27 和 Caspase-3 蛋白的表达量,对照组显著低于低剂量组,低剂量组显著低于中剂量组,中剂量组显著低于高剂量组( $P < 0.05$ )。EGFR, Orai1, STIM1 蛋白表达,对照组显著高于低剂量组,低剂量组显著高于中剂量组,中剂量组显著高于高剂量组( $P < 0.05$ )。说明姜黄素可有效影响细胞增殖凋亡相关蛋白的表达,且存在剂量依赖关系。

表 2 各组细胞增殖和凋亡能力相关蛋白表达情况( $\bar{X} \pm s$ )

| 组别   | P27/GAPDH                  | Orai1/GAPDH                | Caspase-3/GAPDH             | EGFR/GAPDH                 | STIM1/GAPDH                |
|------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组  | 1.01 ± 0.05                | 1.04 ± 0.02                | 67.2 ± 7.5                  | 5.79 ± 0.10                | 1.02 ± 0.09                |
| 低剂量组 | 1.83 ± 0.07 <sup>a</sup>   | 0.92 ± 0.03 <sup>a</sup>   | 110.6 ± 9.3 <sup>a</sup>    | 3.75 ± 0.93 <sup>a</sup>   | 0.84 ± 0.05 <sup>a</sup>   |
| 中剂量组 | 3.72 ± 0.10 <sup>ab</sup>  | 0.76 ± 0.04 <sup>ab</sup>  | 154.9 ± 10.4 <sup>ab</sup>  | 2.51 ± 0.89 <sup>ab</sup>  | 0.68 ± 0.03 <sup>ab</sup>  |
| 高剂量组 | 5.56 ± 0.11 <sup>abc</sup> | 0.53 ± 0.02 <sup>abc</sup> | 193.7 ± 11.2 <sup>abc</sup> | 1.42 ± 0.78 <sup>abc</sup> | 0.48 ± 0.02 <sup>abc</sup> |

## 2.3 细胞侵袭能力及侵袭相关蛋白表达情况

由表 3 可知,视野细胞数和 MMP-9 蛋白的表达量对照组显著高于低剂量组,低剂量组显著高于中剂量组,中剂量组显著高于高剂量组( $P < 0.05$ );侵袭抑制率和 E-cadherin 表达量,对照组显著低于低剂量组,低剂量组显著低于中剂量组,中剂量组显著低于高剂量组( $P < 0.05$ )。说明姜黄素对 A549 细胞侵袭的作用,且存在剂量依赖关系。

表 3 各组细胞侵袭能力及侵袭相关蛋白表达量检测结果( $\bar{X} \pm s$ )

| 组别   | 视野细胞数                       | 侵袭抑制率(%)                    | E-cadherin/GAPDH             | MMP-9/GAPDH                  |
|------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 对照组  | 124.56 ± 3.67               | 0                           | 0.612 ± 0.026                | 0.792 ± 0.019                |
| 低剂量组 | 83.24 ± 3.23 <sup>a</sup>   | 33.17 ± 2.43 <sup>a</sup>   | 0.723 ± 0.023 <sup>a</sup>   | 0.685 ± 0.018 <sup>a</sup>   |
| 中剂量组 | 67.48 ± 3.01 <sup>ab</sup>  | 45.83 ± 3.43 <sup>ab</sup>  | 0.806 ± 0.017 <sup>ab</sup>  | 0.579 ± 0.013 <sup>ab</sup>  |
| 高剂量组 | 40.76 ± 2.01 <sup>abc</sup> | 67.28 ± 4.24 <sup>abc</sup> | 0.902 ± 0.018 <sup>abc</sup> | 0.421 ± 0.011 <sup>abc</sup> |

## 3 讨论

P27 和 EGFR 是 2 个与细胞周期密切相关的蛋白<sup>[9]</sup>。EGFR 可启动细胞生长周期,促进细胞进行有丝分裂,与多种肿瘤细胞的增殖存在关联<sup>[10]</sup>。非小细胞肺癌 A549 细胞在接受姜黄素干预后,EGFR 蛋白的含量较

未接受干预的对照组细胞相比下降明显,且这种下降幅度还与姜黄素的剂量呈显著相关性。P27 是一种可抑制细胞分裂和调控细胞周期的蛋白<sup>[11]</sup>,姜黄素可有效提高肿瘤细胞内该蛋白的表达,从而起到抑制肿瘤细胞进行有丝分裂的作用,且这种作用与姜黄素存在着显著的剂量依赖关系。可认为姜黄素是通过降低肿瘤细胞对 EGFR 的表达和提高 P27 蛋白表达的方式来抑制肿瘤细胞增殖。

STIM1 和 Orai1 是钙池操纵的钙离子通道(SOC)家族中十分重要的 2 种关键分子,其表达量的变化直接导致细胞的炎症、凋亡和基因转录变化<sup>[12]</sup>。姜黄素可有效降低上述 2 种蛋白表达量下降,且该效应与姜黄素剂量存在相关性。Caspase-3 是 Caspase 家族中重要的关键分子,是该家族诱导细胞凋亡的关键效应分子<sup>[13]</sup>,姜黄素可有效诱导该分子,且该作用还与姜黄素的剂量存在相关性。因此,可推测姜黄素是通过上调肿瘤细胞 Caspase-3 的表达,抑制 STIM1 和 Orai1 表达,从而起到诱导细胞凋亡的作用。

姜黄素可有效降低肿瘤细胞侵袭性,这种抑制作用也与姜黄素存在剂量依赖关系。本研究中发现姜黄素可有效降低 MMP-9 的表达量,提高 E-cadherin 的表达量,且这种变化也与姜黄素存在剂量依赖关系。E-cadherin 是介导细胞互相黏附的跨膜蛋白,其表达下降会导致肿瘤细胞间互相黏附松散导致肿瘤转移概率增大,姜黄素可有效上调肿瘤细胞中该蛋白的表达,加强肿瘤细胞间的黏附力,降低其侵袭性。同时,MMP-9 能降解细胞外基质,在肿瘤细胞转移过程中起到了很大作用,姜黄素可有效降低该蛋白的表达量,降低肿瘤细胞的转移能力<sup>[14]</sup>。认为姜黄素抑制肿瘤细胞转移的机制就是降低肿瘤细胞对于 MMP-9 的表达提高肿瘤细胞对 E-cadherin 表达。

本研究结果显示,姜黄素可有效抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖和侵袭,诱导肿瘤细胞凋亡,且与其药物浓度存在剂量依赖关系。随着姜黄素浓度的提高,肿瘤细胞凋亡率、侵袭抑制率和增殖抑制系数都较对照组或剂量较低实验组有显著升高,这与文献[15]报道相符。本研究中主要是在体外环境下利用 A549 细胞为载体研究姜黄素对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡和侵袭能力的影响的,但针对在人体环境下姜黄素的药理作用的研究较少,这将是下一步研究的方向。

## 参考文献:

- [1] 辛 华,江源铭,马 雷,等.姜黄素对前列腺癌细胞 C-erbB-2、Bax 和 Survivin 表达的影响[J]. 中医药信息, 2018(1): 16-18.
- [2] 李 菲,李 宁,李培义,等.细胞因子诱导的杀伤细胞与肺癌 A549 及 A549/DDP 细胞共培养下细胞因子的变化[J].