

ERK1/2 在姜黄素对肺癌 A549 细胞增殖抑制中的作用

李子广¹, 王恩举¹, 刘兆阳¹, 吴华璞²

[摘要]目的:探讨姜黄素在抑制肺癌 A549 细胞增殖过程中,对 ERK1/2 丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路的影响。方法:不同浓度的姜黄素作用于 A549 细胞 24 h 后,采用 MTT 法检测姜黄素对 A549 肺癌细胞增殖的抑制作用;应用 Western blot 分别检测 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白及其下游相关基因基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、组织金属蛋白酶抑制物-1(TIMP-1)的表达。结果:姜黄素对 A549 细胞增殖有明显的抑制作用,且具有剂量依赖性($P < 0.01$)。姜黄素抑制 A549 细胞 p-ERK 蛋白的表达($P < 0.05$),但不影响总 ERK1/2 蛋白的表达;姜黄素可促进 TIMP-1 蛋白表达($P < 0.05$),但抑制 MMP-9 的表达($P < 0.01$)。结论:姜黄素影响 ERK1/2MAPK 信号转导通路,调节凋亡相关蛋白表达是其抑制 A549 细胞增殖的作用之一。

[关键词] 肺肿瘤;姜黄素;ERK1/2 信号转导;基质金属蛋白酶

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2 [文献标识码] A

The role of ERK1/2 signal pathway in the proliferation-inhibitory effect of curcumin on A549 cells

LI Zi-guang¹, WANG En-ju¹, LIU Zhao-yang¹, WU Hua-pu²

(1. Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233040; 2. Department of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the role of ERK1/2 MAPK signal pathway in the proliferation-inhibitory effect of curcumin on A549 lung cancer cells. **Methods:** The proliferation-inhibitory effect of curcumin on A549 cells was assessed with method of MTT assay. Levels of ERK1/2, p-ERK1/2, TIMP-1 and MMP-9 protein expression were measured by Western blot. **Results:** Curcumin inhibited A549 cells proliferation in a dose-dependent manner. The level of p-ERK1/2, MMP-9 decreased and the expression of TIMP-1 protein increased with the dose of curcumin but the expression of ERK1/2 protein had no change. **Conclusions:** Curcumin could influence the ERK1/2 MAPK signal pathway, induce the expression of apoptosis-related proteins and inhibit the proliferation of A549 cells.

[Key words] lung neoplasms; curcumin; ERK1/2 signal transduction; matrix metalloproteinases

姜黄素系从姜科植物中提取的一种食物色素,具有多方面的药理作用,近年来有研究^[1]表明其可抑制体内、外肿瘤的生长及诱导多种肿瘤细胞凋亡。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK) 通路是最经典的,也是介导细胞增殖和肿瘤形成的一条重要通路。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs) 对细胞外基质降解导致肿瘤的转移和复发是肿瘤病人致死的主要因素^[2-3]。最近,ERK 信号通路参与肿瘤的侵袭、转移过程而倍受关注。为此,本文研究姜黄素在抑制肺癌 A549 细胞增殖过程中对 ERK1/2 丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路的影响;分析 ERK1/2 信号通路对肺癌细胞 MMP-9、组织金属蛋白酶抑制物-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 蛋白表达的

影响,评价其临床应用价值,为姜黄素应用于肺癌治疗提供相应的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及细胞培养 选择肺癌细胞株 A549 (蚌埠医学院第一附属医院呼吸病科实验室冻存复苏),用含 10% 小牛血清的 PRIM-1640 培养基,将 A549 肺癌细胞置于 37 °C,含 5% CO₂,饱和湿度培养箱内培养。2~3 天进行传代 1 次。

1.2 主要试剂 姜黄素(美国 Sigma 公司)(批号:080715),PRMI-1640 培养基、噻唑蓝,MTT 粉、二甲基亚砜(DMSO)均购于 Gibco 公司,胎牛血清,胰酶购于北京中杉金桥生物有限公司,ERK-1、ERK-2 兔抗人单克隆抗体、异常活化 ERK(p-ERK)小鼠抗人单克隆抗体、羊多抗 TIMP-1、羊多抗 MMP-9、鼠多抗 β-actin 抗体和 Western 印迹荧光试剂均为美国 Santa Cruz 产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG、抗羊 IgG 为美国 Jackson 公司产品。

1.3 MTT 比色法分析细胞增殖情况 消化、搜集

[收稿日期] 2010-03-12

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第二附属医院 呼吸内科,安徽 蚌埠 233040; 2. 蚌埠医学院 药学系,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 李子广(1982-) 男,硕士,住院医师。

相对于对数生长期的 A549 细胞,按 2×10^4 /ml 接种于 96 孔培养板,每孔接种 100 μ l,用含 10% 小牛血清的 PRMI-1640 培养液培养 24 h 后吸出培养液,分别加入 100 μ l 5、10、20、40 μ mol/L 的姜黄素,每个浓度组设 6 个复孔,对照组不加药物。分别于加药后 24 h 加入 20 μ l 5 mg/ml 的 MTT 溶液。4 h 后吸去上清,每孔加入 100 μ l DMSO,于振荡器上振荡使完全溶解,30 min 后在 490 nm 波长处用酶联免疫检测仪测吸光度值(OD),实验重复 3 次。细胞增殖抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组的 OD 值} - \text{空白对照组的 OD 值}) / (\text{阴性对照组的 OD 值} - \text{空白对照组的 OD 值})] \times 100\%$ 。

1.4 Western blot 检测 p-ERK1/2、ERK1/2、TIMP-1、MMP-9 表达水平 收集经 5、10、20、40 μ mol/L 姜黄素作用 24 h 后的 A549 细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入预冷的细胞裂解液和 1 μ mol/L PMSF,30 min 后,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清,-80 $^{\circ}$ C 贮存备用。Bradford 法蛋白定量。SDS-PAGE 电泳,半干式电转移将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜后放入封闭缓冲液(含 5% 脱脂奶粉 TBST),室温封闭 1 h,加入兔抗人 ERK-1、ERK-2 单克隆抗体(工作浓度均为 1:500)及小鼠抗人 p-ERK 单抗、羊多抗 TIMP-1、MMP-9(均为 1:500)4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 漂洗 3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,羊抗小鼠 IgG、兔抗羊 IgG(二抗,工作浓度为 1:5 000)37 $^{\circ}$ C 作用 1 h,TBST 漂洗,将 Western 印迹试剂涂于 PVDF 膜上,暗室 X 线片曝光、冲洗、拍照及计算机图像分析,各实验组检测指标的条带灰度值与 β -actin 条带灰度值比较作为该指标的相对值。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 姜黄素对 A549 细胞增值的影响 5、10、20、40 μ mol/L 姜黄素分别作用于 A549 细胞 24 h 后细胞抑制率与对照组差异均有统计学意义($P < 0.01$) (见表 1)。

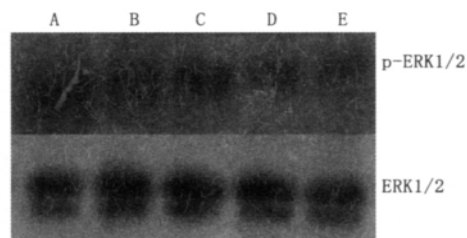
2.2 姜黄素对 A549 细胞 ERK、p-ERK 蛋白表达的影响 结果显示各组 A549 细胞均有两条带(非磷酸化和磷酸化 ERK),上面一条带为 44 kDa 的 ERK1(p44),下面一条带为 42 kDa 的 ERK2(p42)。姜黄素呈浓度依赖性抑制磷酸化 ERK1/2(p44/42)的表达,用 5、10、20、40 μ mol/L 姜黄素处理 A549 细胞,均抑制了磷酸化 ERK1/2(p44/42)的表达,而且随着浓度递增其抑制作用逐渐增强($P < 0.01$),但

细胞总 ERK 表达均无改变(见图 1、表 2)。

表 1 不同浓度姜黄素作用 24 h 时 A549 细胞增殖的抑制率($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组 (μ mol/L)	吸光度值 (490 nm)	抑制率 (%)	F	P	MS _{组内}
对照组	—	0.5130 \pm 0.0012	0.15 \pm 0.12		
姜黄素组	5	0.5780 \pm 0.0142	7.18 \pm 2.17 **		
	10	0.5413 \pm 0.0127	16.56 \pm 1.38 **	441.81	<0.01 2.364
	20	0.5003 \pm 0.0174	27.42 \pm 2.13 **		
	40	0.4420 \pm 0.0152	31.43 \pm 0.81 **		

q 检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$



A: 对照组; B~E: 姜黄素 5、10、20、40 μ mol/L

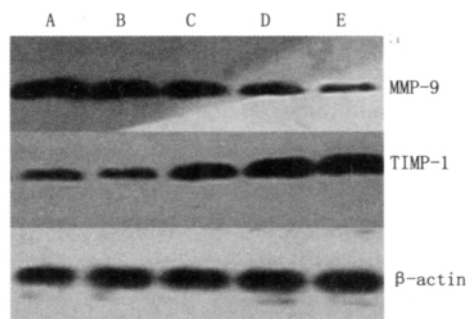
图 1 不同浓度的姜黄素作用 A549 细胞 24 h 时的 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白的表达

表 2 姜黄素作用 A549 细胞 24 h 时的 p-ERK1/2 蛋白的表达($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组 (μ mol/L)	p-ERK1/2 表达 (%)	F	P	MS _{组内}
对照组	—	24.53 \pm 1.12		
姜黄素组	5	22.09 \pm 0.65 **		
	10	18.12 \pm 0.73 $\Delta\Delta$ **	117.73	<0.05 0.602
	20	14.60 \pm 0.69 $\Delta\Delta$ **		
	40	13.03 \pm 0.57 $\Delta\Delta$ **		

q 检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$; 与 5 μ mol/L 组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 姜黄素对 A549 细胞 TIMP-1、MMP-9 表达水平的调节作用 与对照组比较, A549 细胞经不同浓度的姜黄素作用 24 h 时,随着浓度的逐渐增大, MMP-9 表达水平均明显降低, TIMP-1 水平均明显增加($P < 0.01$) (见图 2、表 3)。



A: 对照组; B~E: 姜黄素 5、10、20、40 μ mol/L

图 2 不同浓度的姜黄素作用 A549 细胞 24 h 时的 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白的表达

表3 姜黄素作用 A549 细胞 24 h 时的 MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

	分组($\mu\text{mol/L}$)	MMP-9 表达(%)	TIMP-1 表达(%)
对照组	—	20.35 \pm 1.05	10.75 \pm 0.82
姜黄素组	5	17.68 \pm 0.51 **	13.90 \pm 0.53 **
	10	15.42 \pm 0.73 **	16.18 \pm 0.61 **
	20	12.18 \pm 0.68 **	19.05 \pm 0.79 **
	40	10.03 \pm 0.84 **	22.57 \pm 1.02 **
F	—	83.91	104.44
P	—	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	0.613	0.598

q 检验: 与对照组比较 * * $P < 0.01$

3 讨论

肺癌是临床最常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率逐年增加,由于肺癌的发生、发展是多基因、多阶段、多步骤的复杂演进过程,尽管采用了手术、放疗和化疗等综合治疗措施,由于转移和多药耐药等原因,疗效都不是很理想。因此迫切需要寻求新的有效的靶向药物的治疗。姜黄素来源于姜黄、郁金、莪术、菖蒲等中药的根茎,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤^[4-8]的作用。有研究^[9]表明,姜黄素作用于人类 Burkitt 淋巴瘤时发现,其能下调 B 细胞淋巴瘤患者腹水细胞 CA46 的 c-myc、bcl-2、p53 表达水平,上调 Fas 蛋白 A 的表达水平,从而抑制 CA46 的增殖。本实验选用 A549 肺癌细胞株,选用不同浓度的姜黄素作用其 24 h 时,结果显示姜黄素能有效地抑制 A549 肺癌细胞的增殖,并且 A549 肺癌细胞的抑制率与姜黄素浓度有一定关系。

MAPK 信号通路是研究较多的蛋白激酶级联通路,真核细胞中常见的有细胞外调节蛋白激酶,在细胞生长、发育、增殖及细胞恶性转化过程中起重要作用,ERK1/2 是其中的关键环节,在肝癌、头颈部鳞癌及前列腺癌等多种肿瘤,ERK1/2 信号通路的异常明显活化,pERK 可激活一系列胞质蛋白,促进肿瘤的发生发展以及肿瘤细胞的侵袭和转移^[10]。近来研究^[11]发现,ERK1/2 MAPK 信号通路在肺癌中被明显激活,Vicent 等^[12]发现在非小细胞肺癌中,ERK1/2 高表达,ERK1/2 的磷酸化显著增加^[13],抑制了 ERK1/2 的磷酸化后,能够通过抑制细胞的增殖、诱导凋亡起到抗肺部肿瘤的作用。吴丽贤等^[14]发现姜黄素可减少蛋白 P210bcr/abl 的含量,从而下调其激活的 Ras 信号通路,抑制 K562 细胞的增殖。

提示姜黄素抑制肺癌 A549 细胞增殖作用可能与 ERK 途径有关。本实验结果显示,姜黄素作用于 A549 细胞可引起 p-ERK1/2 的表达显著降低,而 ERK1/2 通路处于抑制状态,说明姜黄素可有效抑制 ERK1/2 信号通路。姜黄素可呈浓度依赖性抑制 A549 细胞中磷酸化 ERK1/2 的表达,但不影响总 ERK1/2 的表达。因此,抑制异常激活的 ERK1/2 信号通路可能是姜黄素抑制肺癌 A549 细胞侵袭性的机制之一。肿瘤细胞分泌以 MMPs 为主的多种酶类,可以降解细胞外基质的成分^[15]。MMP-9 可促进癌细胞对周围组织的浸润,在肿瘤血管生成及肿瘤侵袭和转移过程中起重要调节作用。肺癌细胞侵袭转移能力与其诱导产生蛋白酶降解细胞外基质、基底膜有关。TIMPs 是 MMPs 的抑制剂,TIMPs 与 MMPs 之间平衡在调节细胞外基质的稳态中有重要作用。大量研究^[16]发现,恶性肿瘤中 TIMPs 表达降低,活性减弱,从而认为肿瘤组织中 MMPs 活性增强、TIMPs 的活性减弱是肺癌侵袭和转移重要因素。在肺肿瘤细胞中 MMPs 的合成受 PI3K 激酶调控,同时也受 Raf/ERK 途径负调控^[17]。因此,我们对姜黄素能否调控肺癌 A549 细胞 MMPs 家族蛋白表达进行了研究,结果显示,姜黄素能下调抑制 MMP-9 表达,上调 TIMP-1 表达,这种作用将有利于肺癌 A549 细胞的凋亡。

综上所述,姜黄素可通过抑制 A549 细胞 ERK1/2 信号传导通路,调节 MMPs 家族蛋白表达,促进 A549 细胞的凋亡,这可能是中药姜黄素抗肿瘤的又一新机制。而其效应与 ERK1/2MAPK 密切相关,将可能成为姜黄素的重要靶点,为姜黄素用于肺癌的防治提供了新的实验依据,为肺癌靶向治疗提供理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction[J]. FEBS Letters 2002, 512(3): 334-340.
- [2] 翁密霞, 吴翠环, 杨秀萍. E-cadherin, CD44v6 和 PCNA 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. 癌症 2008, 27(2): 191-195.
- [3] 中强, 王益民, 曹延延, 等. 基质金属蛋白酶 3/7 基因多态性与脑星形胶质细胞瘤发病风险的关系[J]. 癌症 2007, 26(5): 463-468.
- [4] Gafner S, Cuendet M, Vergnes L, et al. Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems[J]. Phytochemistry 2004, 65(21): 2849-2859.
- [5] Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, et al. Curcumin in inhibitors

- NF-kappa B activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice[J]. *Hepatology* 2004 ,41(6) : 926 - 934.
- [6] Kang J ,Chen J ,Shi Y , *et al.* Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species [J]. *Biochem Pharmacol* 2005 ,69(8) : 1205 - 1213.
- [7] Zhu YG ,Chen XC ,Chen ZZ *et al.* Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neuron [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2004 ,25(12) : 1606 - 1612.
- [8] 王晓雷 ,张莲英 ,孙道旭 ,等. 姜黄素对裸鼠乳腺癌移植瘤 p21 及 CD44V6 表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志* ,2007 ,23(8) : 1524 - 1526.
- [9] 吴勇 ,陈元仲 ,许建华 ,等. 姜黄素对人类 Burkitt 淋巴瘤抗癌作用的研究 [J]. *中华肿瘤杂志* 2002 ,24(4) : 348 - 351.
- [10] Mccubrey JA ,Steelman LS ,Chappell WH *et al.* Roles of the Raf /MEK/ERK pathway in cell growth ,malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta* ,2007 ,1773(8) : 1263 - 1284.
- [11] Ji H ,Wang Z ,Perera SA ,*et al.* Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models [J]. *Cancer Res* 2007 ,67(10) : 4933 - 4939.
- [12] Vicent S ,Garayoa M ,Lopez-Picazo JM ,*et al.* Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients [J]. *Clin Cancer Res* 2004 ,10(11) : 3639 - 3649.
- [13] de Melo M ,Gerbase MW ,Curran J ,*et al.* Phosphorylated extracellular signal-regulated kinases are significantly increased in malignant mesothelioma [J]. *J Histochem Cytochem* 2006 ,54(8) : 855 - 861.
- [14] 吴丽贤 ,许建华 ,吴国华 ,等. 姜黄素对 K562 细胞增殖的影响及其与 P210bcr/abl 激活的 Ras 信号途径的关系 [J]. *中国药理学通报* 2003 ,19(1) : 33 - 37.
- [15] Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases [J]. *Nat Rev Cancer* 2003 ,3(7) : 489 - 501.
- [16] Urbanski SJ ,Edwards DR ,Maitland A ,*et al.* Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas [J]. *Br J Cancer* ,1992 ,66(6) : 1188 - 1194.
- [17] Zhang D ,Bar Eli M ,Meloche S *et al.* Dual regulation of MMP-2 expression by the type I insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals [J]. *J Biol Chem* ,2004 ,279(19) : 19683 - 19690.

(本文编辑 刘畅)

医学论文材料与方法常见问题(一)

结果是否可靠 结论是否可信 ,要看材料与方法; 论文是否能够发表 ,很大程度上还要看材料与方法。医学论文材料与方法的常见问题有:

1 未明确说明研究对象

应告诉读者研究对象是人还是动物 ,以及是什么样的人和什么样的动物 ,应描述受试者的年龄、性别和其他重要特征。如研究对象是人 ,还应交代选例的时间。

2 未交代具体的研究时间和地点

如“最近 3 年 ,我们对 82 例胃癌患者进行了手术切除……” ,研究时间具体是哪 3 年 ,这些胃癌病例选自何处 ,是选自作者单位还是加入了其他医院的患者 ,读者不得而知。

3 未说明诊断标准、纳入标准、剔除标准和疗效评价标准

诊断标准是让读者知道研究对象是否准确; 纳入标准是让读者知道研究对象所代表的人群; 剔除标准是保证受试者的安全。诊断标准和疗效评价标准应选择权威的国内外最新资料为依据 ,并标注参考文献。

4 未交代样本量和分组方法

明确确定样本量的依据 ,以反映研究样本的代表性。对照研究 ,应交代分组方法; 随机分组应说明如何随机分。

5 未说明干预措施和实施办法

如是否使用了“盲法”等。如受试者是人 ,还应说明研究是否符合《赫尔辛基宣言》的伦理学要求。