

姜黄素联合花姜酮对非小细胞肺癌细胞生物学行为的协同作用及机制研究^Δ

刘嘉欣*,张 韵,黄慧贤,李建芬,姚志新(广州中医药大学第一附属医院/广东省中医临床研究院药学部门
中药房,广州 510405)

中图分类号 R965;R734.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)07-0787-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.07.04



摘要 目的 研究姜黄素(CUR)联合花姜酮(ZER)对人非小细胞肺癌(NSCLC)A549细胞生物学行为的协同作用及机制。方法 采用CCK-8法和金氏公式筛选CUR和ZER联用后协同作用最佳的浓度组合。后续实验分为空白组、CUR组、ZER组和CUR+ZER组,采用流式细胞术评价细胞凋亡情况,克隆形成实验评价细胞增殖能力,划痕实验、Transwell迁移实验评价细胞迁移能力,Transwell侵袭实验评价细胞侵袭能力,Western blot法检测磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、血管内皮生长因子A(VEGF-A)蛋白的相对表达水平。**结果** CUR、ZER对A549细胞的半数抑制浓度约为16、12 μmol/L;CUR 8 μmol/L+ZER 6 μmol/L组合的药物联用增效指数最大,其细胞增殖抑制率为(77.41±4.16)%,协同作用最明显。与CUR组、ZER组比较,CUR+ZER组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$),细胞克隆形成率、细胞迁移率、迁移细胞数、侵袭细胞数,以及细胞中p-PI3K、p-Akt、VEGF-A蛋白的相对表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** CUR和ZER联用后起到协同作用,能显著促进NSCLC细胞凋亡,抑制细胞增殖、迁移和侵袭,其潜在机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路,进而下调VEGF-A的蛋白表达密切相关。

关键词 姜黄素;花姜酮;非小细胞肺癌;A549细胞;协同作用

Study on the synergistic effect and mechanism of curcumin combined with zerumbone on the biological behavior of non-small cell lung cancer cells

LIU Jiaxin, ZHANG Yun, HUANG Huixian, LI Jianfen, YAO Zhixin (TCM Pharmacy, Pharmacy Department, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine/Guangdong Clinical Research Academy of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the synergistic effect and mechanism of curcumin (CUR) combined with zerumbone (ZER) on the biological behavior of non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells. **METHODS** CCK-8 method and Gin's formula were used to screen the optimal concentration combination for synergistic effect after the combination of CUR and ZER. The cells were divided into blank group, CUR group, ZER group, and CUR+ZER group. Flow cytometry was used to evaluate cell apoptosis, and clone formation experiment was used to evaluate cell proliferation ability, scratch experiment and Transwell migration experiment were used to evaluate cell migration ability, and Transwell invasion experiment was used to evaluate cell invasion ability. Western blot assay was used to detect the protein expressions of phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase (p-PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). **RESULTS** The half inhibitory concentrations of CUR and ZER on A549 cells were approximately 16 and 12 μmol/L, respectively; the drug combination of CUR 8 μmol/L+ZER 6 μmol/L had the highest efficiency enhancement index, with the cell proliferation inhibition rate of (77.41±4.16)%, indicating the most significant synergistic effect. Compared with the CUR and ZER groups, the cell apoptosis rate in the CUR+ZER group was significantly increased ($P<0.01$), while the cell clone formation rate, cell migration rate, the number of migrating cells, the number of invading cells, and relative expression levels of p-PI3K, p-Akt, and VEGF-A proteins in the cells were significantly reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** The combination of CUR and ZER has a synergistic effect, significantly promoting the apoptosis of NSCLC cells, and inhibiting cell proliferation, migration, and invasion. Its potential mechanism may be closely related to the inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway, thereby down-regulating the protein expression of VEGF-A.

KEYWORDS curcumin; zerumbone; non-small cell lung cancer; A549 cells; synergistic effect

^Δ基金项目 广东省中医药局科研项目(No.20221152)

*第一作者 主管中药师。研究方向:医院中药学、临床中药学。

E-mail:26828070@qq.com

肺癌,特别是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),在恶性肿瘤领域的发病率和病死率常年高居榜首。目前,虽然新型药物研发和治疗策略都有

所突破,但临床治疗仍存在药物毒副作用大、患者多年生存率不理想等问题^[1],因此迫切需要更加安全有效的肺癌治疗药物。

中药及其复方制剂具有毒性较低、副作用较少等优势,是肿瘤药物研发的新思路和新方向^[2]。中药姜黄及姜黄属药用植物是目前国内外研究的热点之一。姜黄素(curcumin, CUR)是一种来源于姜黄的多酚类物质,是姜黄的主要活性成分^[3]。研究指出,CUR具有抑制肿瘤、抗病毒、调节血脂等多种药理活性^[3-5],对结肠癌、肺癌和乳腺癌等多种肿瘤细胞的增殖具有明显的抑制作用,并可诱导细胞凋亡和死亡^[5-6]。花姜酮(zerumbone, ZER)是一种来源于姜科植物的单环倍半萜类物质,具有抗感染和调节免疫等多种药理活性,并能够抑制多种肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[7-8]。磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)通路是细胞内重要的信号转导通路,可抑制多种刺激诱发的细胞凋亡、促进细胞周期进展,从而促进细胞的增殖或增强细胞对凋亡的抗性^[9-10]。本课题组前期研究显示,CUR和ZER联用对人NSCLC A549细胞存在协同效应倾向(拟另文发表)。本研究拟进一步探讨不同剂量CUR和ZER联用对A549细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡等的协同作用,同时基于PI3K/Akt信号通路探讨潜在的作用机制,以期明确CUR和ZER联用对NSCLC细胞的作用,为中药姜黄及其有效成分协同治疗NSCLC提供新思路和新方向。

1 材料

1.1 主要仪器

5427R型高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司;DM2500型荧光倒置显微镜购自德国Leica公司;EVOS FL型显微镜系统、3111型CO₂培养箱均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Epoch型酶标仪购自美国BioTek公司;Gel Doc EZ型凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司;C6 plus型流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 主要药物与试剂

CUR、ZER标准品(批号分别为wkq22010701、wkq22020604,纯度均≥98%)均购自四川省维克奇生物科技有限公司;DMEM培养基、RPMI-1640完全培养基、乙二胺四乙酸(EDTA)-胰酶、青-链霉素双抗、基质胶Matrigel(货号分别为11965092、11875093、25200072、15140148、20230948)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;胎牛血清(货号10100147)购自美国Gibco公司;兔源磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)单克隆抗体、兔源p-Akt单克隆抗体、内参β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体(货号分别为4228、4060、4967)均购自美国CST公司;兔源血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(货号分别为46154、230806)均购自英国Abcam公司;CCK-8试剂、

Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、细胞周期试剂盒、Beyo ECL Plus显色试剂盒(货号分别为C0043、C1062、C1052、P0018M)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 细胞株

人NSCLC A549细胞(批号20211208)购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养与分组

A549细胞冻存管解冻后用移液枪将细胞悬液转移至5 mL离心管中,以1 000 r/min离心5 min。吸弃上清液后,用1 mL完全培养基重悬细胞。向10 cm培养皿中加入7 mL RPMI-1640完全培养基。将上述细胞悬液转移至培养皿中,混匀后,于37 °C、饱和湿度、5% CO₂培养箱恒温培养。待培养瓶中细胞长至80%时,用EDTA-胰酶洗脱,再用RPMI-1640完全培养基分别稀释细胞至实验需要的相应密度,即得细胞悬液。

2.2 CUR和ZER协同最佳浓度的确定

2.2.1 CCK-8实验

取“2.1”项下对数生长期的细胞,按 8×10^4 个/mL、每孔0.1 mL接种至96孔板,待细胞过夜贴壁后移出培养基,分别用不同浓度的CUR(0、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 μmol/L)、ZER(0、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 μmol/L)、CUR+ZER[高、中、低浓度组合,分别以CUR、ZER的半数抑制浓度(IC₅₀)作为中浓度,低、高浓度分别是中浓度的1/2和2倍]干预,并以RPMI-1640完全培养基为空白对照(空白组),每浓度设置8个复孔。培养24 h后,每孔加入CCK-8试剂适量,孵育2 h,使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(optical density, OD)值,并计算不同浓度组合的细胞增殖抑制率[细胞增殖抑制率(%)=(1-给药组OD值/空白组OD值)×100%]及药物IC₅₀。以“1-细胞增殖抑制率”反映细胞活力。

2.2.2 药物的联用效果分析

采用金氏公式计算药物的联用效果, $CDI = E_{(a+b)} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$ 。式中,CDI为增效指数, $E_{(a+b)}$ 为实测的两药联用效应, E_a 为a药的单用效应, E_b 为b药的单用效应;若 $0.55 < CDI < 0.85$,表明药物联用效应为拮抗;若 $0.85 \leq CDI < 1.15$,表明药物联用效应为相加;若 $1.15 \leq CDI < 20$,表明药物联用效应为协同^[11-12]。根据CDI,选择CUR和ZER联用后协同作用最明显的剂量进行后续实验。

2.3 细胞凋亡检测

实验分为空白组(溶剂对照)、CUR组(CUR 8 μmol/L)、ZER组(ZER 6 μmol/L)和CUR+ZER组(CUR 8 μmol/L+ZER 6 μmol/L),剂量依据“2.2.1”和“2.2.2”结果设置,每组设置8个复孔。取“2.1”项下对数生长期的细胞,按 1×10^6 个/mL、每孔2 mL接种至6孔板,待细胞过夜贴壁后移除培养基,各组换含有相应浓度药物/溶剂的培养

基。培养24 h后,按照Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒说明书进行染色处理,再采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。流式细胞仪设四分门,其中Q1区域为坏死细胞,Q2区域为晚期凋亡细胞,Q3区域为活细胞,Q4区域为早期凋亡细胞。细胞凋亡率(%)=(Q2区域凋亡细胞+Q4区域凋亡细胞)/细胞总数×100%。

2.4 细胞增殖检测

采用克隆形成实验检测。按照“2.3”项下分组给药/溶剂。取“2.1”项下对数生长期的细胞,按 1×10^6 个/mL、每孔2 mL接种至6孔板,待细胞过夜贴壁后移除培养基,每组换含有相应浓度药物/溶剂的培养基。含药培养基每48 h更换1次,合计培养14 d。随后,收集各组细胞,以10%甲醇固定后,再以0.1%结晶紫染色;清洗后,常温晾干。采用显微镜观察并统计各组细胞的有效克隆数(>10个细胞即为有效克隆),计算细胞克隆形成率[细胞克隆形成率(%)=细胞有效克隆数/细胞总数×100%]。

2.5 细胞迁移能力检测

2.5.1 划痕实验

按照“2.3”项下分组给药/溶剂。按照“2.1”项下制备浓度 1×10^6 个/mL的细胞悬液,以每孔2 mL接种至6孔板。使用记号笔在6孔板背面画作井字标记。在细胞贴壁生长80%左右时,垂直于井字标记横线进行细胞划痕。移除培养基,每组换含有相应浓度药物/溶剂的培养基。药物处理0、48 h,采用显微镜观察,取5个随机视野进行拍照。采用Image Pro Plus 6.0软件获得细胞划痕距离并计算细胞迁移率[细胞迁移率(%)=(0 h划痕距离-48 h划痕距离)/0 h划痕距离×100%]。

2.5.2 Transwell迁移实验

按照“2.3”项下分组给药/溶剂。取对数生长期细胞,采用空白培养基进行饥饿处理6 h。随后,消化细胞,并制备浓度 1×10^6 个/mL的细胞悬液,以每孔0.2 mL接种至24孔板的Transwell小室(膜孔直径8 μm),每孔补充含药培养基至0.8 mL。24 h后收集Transwell小室样品,拭去膜上残留细胞,随后采用10%甲醇固定,0.1%结晶紫染色。样品清洗后,常温晾干,采用显微镜观察,在Transwell小室下层,取5个随机视野进行拍照。采用Image Pro Plus 6.0软件统计迁移细胞数。

2.6 细胞侵袭能力检测

采用Transwell侵袭实验检测。按照“2.3”项下分组给药/溶剂。用PBS将基质胶Matrigel在冰上稀释配制成适宜浓度,随后加入Transwell小室(膜孔直径8 μm),在Transwell小室培养箱放置0.5 h固化备用。后续操作按照“2.5.2”项下实验进行,采用结晶紫法计算侵袭细胞数。

2.7 细胞中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。按照“2.3”项下分组给药/溶剂、进行细胞消化和接种。收集细胞,裂解制备样

品,冷冻离心后收集上清液,浓度定量和蛋白变性。蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至聚偏二氟乙烯膜上,室温封闭30 min。随后,加入p-PI3K、p-Akt、VEGF-A、 β -actin一抗(稀释比例均为1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,冷藏过夜;孵育后回收一抗,用TBST缓冲液洗膜5 min×5次,加入相应IgG二抗(稀释比例为1:3 000),室温下孵育120 min;以ECL发光液显色,并置于凝胶成像仪下成像。采用Image J软件进行分析,以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示各蛋白的相对表达水平。

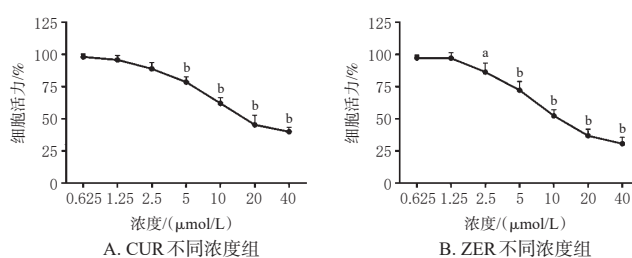
2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据处理和绘图。计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 CUR和ZER协同最佳浓度的确定结果

CCK-8实验结果显示,CUR剂量从5 $\mu\text{mol/L}$ 开始,对A549细胞的活力出现抑制作用,且CUR的抑制作用具有浓度依赖趋势。CUR抑制作用的 IC_{50} 约为16 $\mu\text{mol/L}$,因此以16 $\mu\text{mol/L}$ 作为CUR的中浓度进行后续联合用药研究。ZER剂量从2.5 $\mu\text{mol/L}$ 开始,对A549细胞的活力出现抑制作用,且ZER的抑制作用具有浓度依赖趋势。ZER抑制作用的 IC_{50} 约为12 $\mu\text{mol/L}$,因此以12 $\mu\text{mol/L}$ 作为ZER的中浓度进行后续联合用药研究。结果见图1。



a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与空白组比较, $P < 0.01$ 。

图1 不同浓度CUR、ZER单独对细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

根据CCK-8实验结果,选择CUR(8、16、32 $\mu\text{mol/L}$)和ZER(6、12、24 $\mu\text{mol/L}$)的不同浓度组合研究抑制A549细胞活力的协同效应。结果显示(表1),CUR 8 $\mu\text{mol/L}$ +ZER 6 $\mu\text{mol/L}$ 、CUR 16 $\mu\text{mol/L}$ +ZER 6 $\mu\text{mol/L}$ 、CUR 8 $\mu\text{mol/L}$ +ZER 12 $\mu\text{mol/L}$ 、CUR 16 $\mu\text{mol/L}$ +ZER 12 $\mu\text{mol/L}$ 这些组合的CDI均在1.15以上,提示这些组合对A549细胞的细胞活力的抑制均有协同作用。其中,CUR 8 $\mu\text{mol/L}$ +ZER 6 $\mu\text{mol/L}$ 组合的CDI最大,其细胞增殖抑制率为(77.41 \pm 4.16)%,表明CUR 8 $\mu\text{mol/L}$ +ZER 6 $\mu\text{mol/L}$ 联用的协同作用最明显。因此,选择CUR 8 $\mu\text{mol/L}$ 、ZER 6 $\mu\text{mol/L}$ 、CUR 8 $\mu\text{mol/L}$ +ZER 6 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验研究。

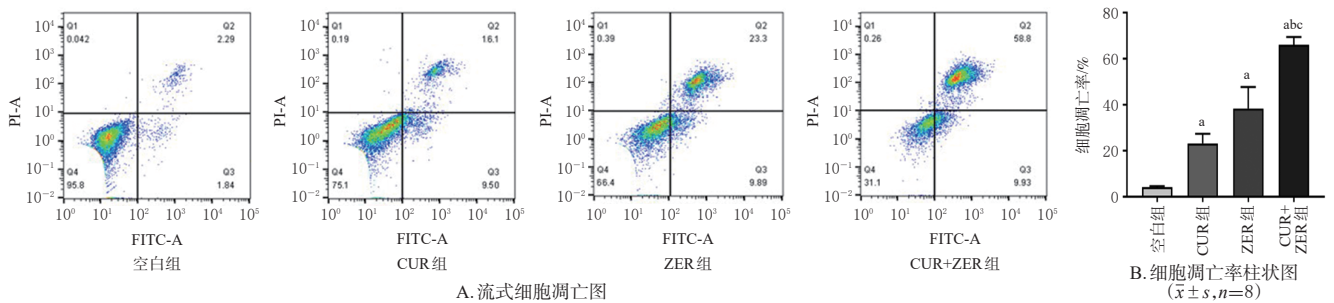
表1 不同浓度CUR和ZER组合的细胞增殖抑制率及CDI结果(n=8)

CUR和ZER联用	细胞增殖抑制率/%	CDI	CUR和ZER联用	细胞增殖抑制率/%	CDI
8 μmol/L+0 μmol/L	27.25 ± 5.41	-	32 μmol/L+6 μmol/L	88.19 ± 3.95	1.14
16 μmol/L+0 μmol/L	55.14 ± 6.46	-	8 μmol/L+12 μmol/L	79.15 ± 3.55	1.19
32 μmol/L+0 μmol/L	61.33 ± 5.73	-	16 μmol/L+12 μmol/L	91.34 ± 3.26	1.16
0 μmol/L+6 μmol/L	41.38 ± 6.12	-	32 μmol/L+12 μmol/L	92.27 ± 2.91	1.12
0 μmol/L+12 μmol/L	53.38 ± 7.07	-	8 μmol/L+24 μmol/L	82.85 ± 4.61	1.02
0 μmol/L+24 μmol/L	73.84 ± 5.99	-	16 μmol/L+24 μmol/L	93.13 ± 2.84	1.05
8 μmol/L+6 μmol/L	77.41 ± 4.16	1.34	32 μmol/L+24 μmol/L	94.06 ± 3.63	1.04
16 μmol/L+6 μmol/L	86.38 ± 5.44	1.17			

-: 单用未计算CDI。

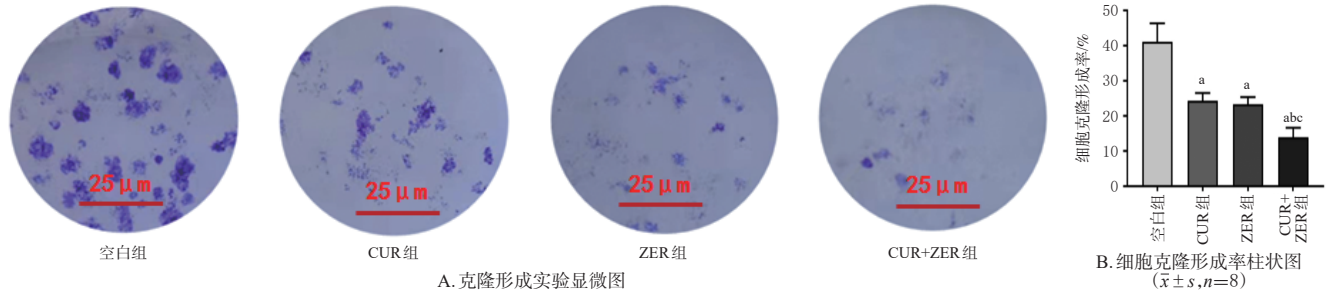
3.2 CUR和ZER联用对细胞凋亡的影响

与空白组比较,CUR组、ZER组、CUR+ZER组细胞凋亡率均显著升高($P < 0.01$);与CUR组、ZER组比较,CUR+ZER组细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$)。结果见图2。



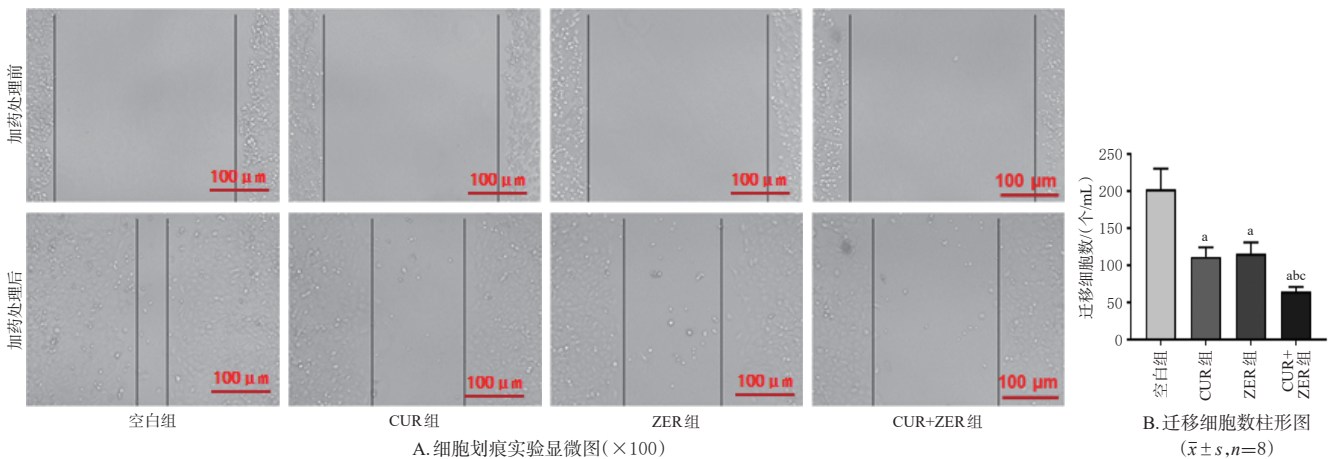
a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与CUR组比较, $P < 0.01$; c: 与ZER组比较, $P < 0.01$ 。

图2 CUR和ZER联用对细胞凋亡的影响



a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与CUR组比较, $P < 0.01$; c: 与ZER组比较, $P < 0.01$ 。

图3 CUR和ZER联用对细胞增殖的影响



a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与CUR组比较, $P < 0.01$; c: 与ZER组比较, $P < 0.01$ 。

图4 CUR和ZER联用对细胞迁移的影响

3.3 CUR和ZER联用对细胞增殖的影响

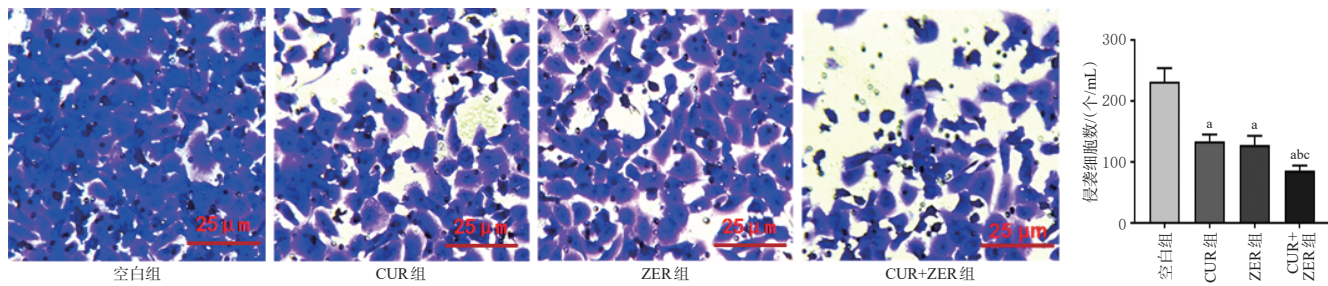
与空白组比较,CUR组、ZER组、CUR+ZER组细胞克隆形成率均显著降低($P < 0.01$);与CUR组、ZER组比较,CUR+ZER组细胞克隆形成率显著降低($P < 0.01$)。结果见图3。

3.4 CUR和ZER联用对细胞迁移的影响

与空白组比较,CUR组、ZER组、CUR+ZER组的细胞迁移率、迁移细胞数均显著降低($P < 0.01$);与CUR组、ZER组比较,CUR+ZER组细胞迁移率、迁移细胞数均显著降低($P < 0.01$)。结果见图4(细胞迁移率柱形图结果略)。

3.5 CUR和ZER联用对细胞侵袭的影响

与空白组比较,CUR组、ZER组、CUR+ZER组侵袭细胞数均显著降低($P < 0.01$);与CUR组、ZER组比较,CUR+ZER组侵袭细胞数显著降低($P < 0.01$)。结果见图5。



A. 细胞侵袭染色显微图(结晶紫染色, ×25)

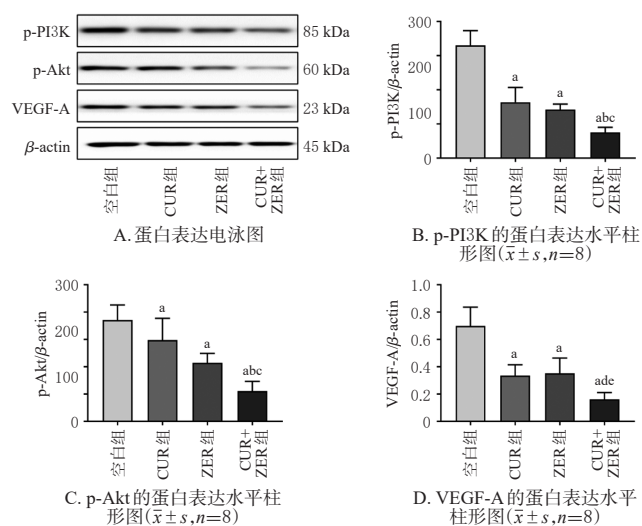
B. 侵袭细胞数柱形图($\bar{x} \pm s, n=8$)

a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与CUR组比较, $P < 0.01$; c: 与ZER组比较, $P < 0.01$ 。

图5 CUR和ZER联用对细胞侵袭的影响

3.6 CUR和ZER联用对PI3K/Akt信号通路的影响

与空白组比较, CUR组、ZER组、CUR+ZER组细胞中p-PI3K、p-Akt、VEGF-A蛋白的相对表达水平均显著降低($P < 0.01$); 与CUR组、ZER组比较, CUR+ZER组细胞中p-PI3K、p-Akt、VEGF-A蛋白的相对表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图6。



A. 蛋白表达电泳图

B. p-PI3K的蛋白表达水平柱形图($\bar{x} \pm s, n=8$)

C. p-Akt的蛋白表达水平柱形图($\bar{x} \pm s, n=8$)

D. VEGF-A的蛋白表达水平柱形图($\bar{x} \pm s, n=8$)

a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与CUR组比较, $P < 0.01$; c: 与ZER组比较, $P < 0.01$; d: 与CUR组比较, $P < 0.05$; e: 与ZER组比较, $P < 0.05$ 。

图6 CUR和ZER联用对PI3K/Akt信号通路的影响

4 讨论

CUR和ZER分别作为姜黄和球姜的主要有效成分, 已被证实对NSCLC具有抑制作用^[9]。本研究首先通过CCK-8实验获得了CUR、ZER单独对A549细胞活力的抑制作用浓度。同时采用金氏公式计算药物联用效果, 结果显示, CUR 8 μmol/L+ZER 6 μmol/L组合的CDI最大, 表明这组合的协同作用最明显。流式细胞实验和克隆形成实验结果显示, 与CUR组、ZER组比较, CUR+ZER组细胞凋亡率显著升高、细胞克隆形成率显著降低, 表明CUR和ZER联用后协同抑制细胞增殖的效果明显优于二者单独使用。

细胞迁移是正常细胞的基本功能之一, 是机体正常生长发育的生理过程, 也是活细胞普遍存在的一种运动形式^[10]。胚胎发育、血管生成、伤口愈合、免疫反应、炎

症反应、肿瘤转移等多个过程均涉及细胞迁移。由于转移性疾病是导致癌症患者死亡的关键因素, 因此了解细胞迁移机制对于癌症研究至关重要。考虑到NSCLC的主要特征之一是转移, 本研究划痕实验、Transwell迁移实验、Transwell侵袭实验结果显示, 与CUR组、ZER组比较, CUR+ZER组细胞迁移率、迁移细胞数、侵袭细胞数显著降低, 进一步证实CUR和ZER联用能够协同增强抑制细胞迁移和侵袭的能力。

PI3K/Akt信号通路是细胞生存和发育的关键通路^[13]。PI3K具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 被激活后, PI3K的p110亚基通过与p85亚基结合将底物磷脂酰肌醇二磷酸转化为磷脂酰肌醇三磷酸。而磷脂酰肌醇三磷酸与Akt的氮端PH结构域结合, 使Akt蛋白上的丝氨酸473和苏氨酸308磷酸化位点激活^[14]。Akt作为丝氨酸/苏氨酸激酶, 参与多种重要生长因子的生成和调控^[15]。生长因子VEGF-A是一种高度特异的促血管内皮生长因子, 具有促进血管通透性、调控细胞外基质变性、调控血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等功能^[16]。研究表明, PI3K/Akt通路可上调VEGF-A的表达, 从而促进肿瘤细胞的生长和迁移^[17]。为了深入探究CUR和ZER联用对PI3K/Akt/VEGF-A通路的影响, 本研究采用Western blot检测CUR和ZER联用对p-PI3K、p-Akt、VEGF-A蛋白表达水平的影响, 结果显示, 与空白组比较, CUR组、ZER组p-PI3K、p-Akt蛋白的相对表达水平均显著降低; 与CUR组、ZER组比较, CUR+ZER组p-PI3K、p-Akt蛋白的相对表达水平进一步降低, 这表明CUR和ZER联用可能通过协同抑制PI3K的激活、阻断p-PI3K与Akt的结合, 从而协同抑制Akt的激活, 诱导NSCLC细胞凋亡。同时, 本实验结果显示, 与CUR组、ZER组比较, CUR+ZER组VEGF-A蛋白的相对表达水平显著降低, 进一步提示CUR和ZER联用可能通过协同抑制Akt的激活、协同抑制VEGF-A的表达, 从而发挥协同促进NSCLC细胞凋亡和抑制其迁移的作用。

综上所述, CUR和ZER联用后起到协同作用, 能显著促进NSCLC细胞凋亡, 抑制细胞增殖、迁移和侵袭, 其潜在的机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路, 进而下调VEGF-A的蛋白表达密切相关。

参考文献

- [1] HORVATH L, THIENPONT B, ZHAO L Y, et al. Overcoming immunotherapy resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC): novel approaches and future outlook[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):141.
- [2] 景亚婉, 曾灏, 程睿欣, 等. 非小细胞肺癌免疫耐药机制及应对策略的研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2023, 26(1): 66-77.
- JING Y W, ZENG H, CHENG R X, et al. Advances of immunotherapy resistance and coping strategies in non-small cell lung cancer[J]. *Chin J Lung Cancer*, 2023, 26(1): 66-77.
- [3] 于梦迪, 王明霞, 王海东. 姜黄素逆转非小细胞肺癌分子靶向药物耐药的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(12):1633-1637.
- YU M D, WANG M X, WANG H D. Research progress of reversion molecular targeted drug resistance in non-small cell lung cancer by curcumin[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2017, 33(12):1633-1637.
- [4] CHEN P, HUANG H P, WANG Y, et al. Curcumin overcome primary gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer cells through inducing autophagy-related cell death[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):254.
- [5] 金妮, 涂仕娟, 周宜, 等. 姜黄素抑癌的表现遗传学进展[J]. *中药与临床*, 2022, 13(3):113-123.
- JIN N, TU S J, ZHOU Y, et al. Epigenetic progress of curcumin in inhibiting cancer[J]. *Tradit Chin Med Clin Pract*, 2022, 13(3):113-123.
- [6] GIRISA S, SHABNAM B, MONISHA J, et al. Potential of zerumbone as an anti-cancer agent[J]. *Molecules*, 2019, 24(4):734.
- [7] 王梅林, 牛精铃, 高杨, 等. 花姜酮对MCF7细胞的增殖和迁移与侵袭的影响及其作用机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(16):1975-1977, 2000.
- WANG M L, NIU J L, GAO Y, et al. Effect of zerumbone on the proliferation, migration and invasion of MCF7 cells and the study of its mechanism[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2018, 34(16):1975-1977, 2000.
- [8] 万雪琼, 陈佳, 何超, 等. 花姜酮通过上调FBXW7表达抑制人非小细胞肺癌细胞系A549增殖、迁移和侵袭[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(8):1163-1168.
- WAN X Q, CHEN J, HE C, et al. Zerumbone inhibits the proliferation, migration and invasion of human non-small cell lung cancer cell line A549 through up-regulating FBXW7 expression[J]. *Basic Clin Med*, 2021, 41(8): 1163-1168.
- [9] GUO C M, LI N N, DONG C Y, et al. 33-kDa ANXA3 isoform contributes to hepatocarcinogenesis via modulating ERK, PI3K/Akt-HIF and intrinsic apoptosis pathways[J]. *J Adv Res*, 2021, 30:85-102.
- [10] 郑培佩, 肖健, 吴艳青. PI3K/AKT/FOXO信号通路介导的自噬在糖尿病认知功能障碍中的作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(5):588-594.
- ZHENG P P, XIAO J, WU Y Q. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling pathway-mediated autophagy in diabetes-associated cognitive dysfunction[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2021, 37(5):588-594.
- [11] 金正均. 合并用药中的相加[J]. *中国药理学报*, 1980, 1(2):70-76.
- JIN Z J. Addition in combination therapy [J]. *Chin J Pharmacol*, 1980, 1(2):70-76.
- [12] 戴雅彬, 黄慧, 张月芬, 等. 雷公藤内酯酮联合甘草次酸对促进人肝癌HepG2细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. *福建医科大学学报*, 2023, 57(1):1-8.
- DAI Y B, HUANG H, ZHANG Y F, et al. The effect of triptolide combined with glycyrrhetic acid to promote apoptosis and related protein expression in human liver cancer HepG2 cells[J]. *J Fujian Med Univ*, 2023, 57(1): 1-8.
- [13] 谭冠文, 朱朱, 周文静. 苦参碱通过TLR3下调PI3K/Akt通路抑制子宫肌瘤细胞的增殖、侵袭和迁移[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(21):2601-2605.
- TAN G W, ZHU Z, ZHOU W J. Matrine inhibits proliferation, invasion and migration of uterine leiomyoma cells via TLR3 down-regulating PI3K/Akt pathway[J]. *Chin J Immunol*, 2022, 38(21):2601-2605.
- [14] JIN Y, CHEN Y M, TANG H R, et al. Activation of PI3K/AKT pathway is a potential mechanism of treatment resistance in small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(3):526-539.
- [15] GENG J, LI X, ZHOU Z M, et al. EZH2 promotes tumor progression via regulating VEGF-A/AKT signaling in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2015, 359(2): 275-287.
- [16] YAO J H, SHAO Y, WANG J J, et al. Evaluation of diagnostic and predictive values of the serum VEGF-A level and systemic immune-inflammation index in small cell lung cancer[J]. *J Cancer*, 2021, 12(5):1356-1364.
- [17] 白玉萍. SREBP2通过转录激活SCARB1增强PI3K/AKT/HIF-1 α -VEGF途径促进肝细胞肝癌恶性生物学行为[D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- BAI Y P. SREBP2 enhances PI3K/Akt/HIF-1 α -VEGF pathway through transcriptional activation of SCARB1 and promotes malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2023.

(收稿日期:2023-10-19 修回日期:2023-11-14)

(编辑:舒安琴)