

## 姜黄素联合顺铂对非小细胞肺癌细胞 A549 放疗增敏作用的初步研究

200433 上海 同济大学附属上海市肺科医院放疗科 蔡 勇, 王季颖

**【摘要】** 目的 探讨姜黄素联合顺铂对非小细胞肺癌细胞 A549 放疗增敏的影响。方法 采用 MTT 法观察不同浓度姜黄素 (10、20、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ) 和顺铂 (1、2、5、10、20  $\text{mg/L}$ ) 作用 24、48 及 72 h 后的细胞存活率, 根据实验设计分为单纯照射 (R) 组、姜黄素+照射 (C+R) 组、顺铂+照射 (P+R) 组及姜黄素+顺铂+照射 (C+P+R) 组, 采用克隆形成实验检测 4 组经不同剂量 X 线 (0、2、4、6、8、10 Gy) 照射后的存活分数 (SF) 并通过单击多靶模型拟合细胞存活曲线计算增敏比 (SER), 分别采用人工划痕、Transwell 试验及 Western blotting 检测以上 4 组处理 24 h 后的细胞迁移、侵袭及表皮生长因子受体 (EGFR) 的蛋白水平。结果 随姜黄素 (10~200  $\mu\text{mol/L}$  范围内) 和顺铂 (1~20  $\text{mg/L}$  范围内) 浓度增加, A549 细胞的细胞存活率降低, 抑制效应呈浓度和时间依赖方式, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); C+P+R 组在照射剂量为 2~10 Gy 时的细胞 SF 均低于其余 3 组, 而 C+R 组在 4~10 Gy, P+R 组在 2~10 Gy 时的细胞 SF 均低于 R 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), C+R 组、P+R 组及 C+P+R 组相对于 R 组的 SER 依次为 1.24、1.31 和 1.96; C+P+R 组的迁移距离、穿膜细胞数量及 EGFR 蛋白水平均低于其余 3 组, 而 C+R 组和 P+R 组的以上指标亦低于 R 组, 以上差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 姜黄素联合顺铂可抑制 A549 细胞增殖并具有放射增敏作用, 同时抑制其迁移和侵袭, 可能与 EGFR 相关信号通路受抑制有关。

**【关键词】** 姜黄素; 顺铂; 放疗增敏; 表皮生长因子受体

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2015)01-0013-05

### A preliminary study on radiosensitization effect of curcumin plus cisplatin on non-small cell lung cancer A549 cells

CAI Yong, WANG Jiyong. Department of Radiation Oncology, Shanghai Pulmonary Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200433, China

**【Abstract】 Objective** To explore the radiosensitization effect of curcumin plus cisplatin on non-small cell lung cancer A549 cells. **Methods** Cell viability at 24, 48 and 72 h after treatment with different concentrations (10, 20, 50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$ ) of curcumin or (1, 2, 5, 10, 20  $\text{mg/L}$ ) of cisplatin were determined by MTT. According to the experimental protocol, the below experiments were carried out in irradiation (R) group, curcumin+irradiation (C+R) group, cisplatin+irradiation (P+R) group and curcumin+cisplatin+irradiation (C+P+R) group. The colony formation assay was employed to observe the surviving fraction (SF) of above four groups after X-ray irradiation of 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy. The artificial scratch, Transwell test and Western blotting were employed to detect the cell migration, invasion and protein level of epidermal growth factor receptor (EGFR) at 24 h after treatment in four groups. **Results** The cell viability of A549 cells gradually decreased with the increasing concentration of curcumin ranging from 10 to 200  $\mu\text{mol/L}$  and cisplatin ranging from 1 to 20  $\text{mg/L}$  in a dose- and time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). The SF of C+P+R group were lower than the remaining 3 groups under the dose of 2-10 Gy ( $P < 0.05$ ). Compared with the R irradiation group, there was lower SF in C+R group under the dose of 4-10 Gy and P+R group under the dose of 2-10 Gy with significant difference ( $P < 0.05$ ). Compared with R group, the sensitizing enhancement ratio were 1.24, 1.31 and 1.96 in C+R group, P+R group and C+P+R group, respectively. There were lower migration distance, transmembrane cell number and EGFR protein level in C+P+R group versus the remaining 3 groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the R group, the above indicators were also lower in C+R group and P+R group under the dose of 2-10 Gy with significant difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Curcumin plus cisplatin can inhibit the proliferation of A549 cells with radiosensitizing effect and suppress its migration and invasion possibly via inhibition of EGFR signaling pathways.

**【Key Words】** Curcumin; Cisplatin; Radiosensitization effect; Epidermal growth factor receptor

近年来,放疗是治疗肺癌的常用手段,尤其对无法手术及复发患者,其在肺癌治疗中的地位逐步提高。与小细胞肺癌不同,非小细胞肺癌对放疗不敏感,反应率较低,故总体上治疗效果不令人满意<sup>[1-2]</sup>。故提高非小细胞肺癌的放疗效果有重要意义,放疗增敏已成为放疗工作者关注的热点,同时国内外的研究人员正在努力寻找和尝试各种放疗增敏的方法。姜黄素是一种从多种中药根茎中提取的酚类化合物,具有多种生物活性,如降血压、降血脂、抗氧化及免疫调节等<sup>[3-5]</sup>。近年来发现其还具有抗肿瘤活性,如可抑制多种肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[6-8]</sup>,故本研究推测其对非小细胞肺癌也有抑制作用。顺铂是肺癌化疗的常用药物,已有研究报道姜黄素联合顺铂对非小细胞肺癌有增殖抑制和凋亡诱导作用<sup>[9]</sup>,但是否有放疗增敏作用,目前尚不清楚,故本研究探讨姜黄素联合顺铂对非小细胞肺癌细胞 A549 放射增敏性的影响,现将结果报告如下。

## 1 材料与与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 姜黄素、二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,非小细胞肺癌细胞 A549 细胞购自中国科学院上海细胞所,胰蛋白酶、RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购于碧云天生物公司,兔抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)多抗及内参 GAPDH 购自美国 Santa Cruz 公司,新生牛血清购于杭州四季青生物公司;仪器:CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购自美国 Thermo Forma 公司,医用直线加速器购自美国瓦里安公司,ELX800 型全自动酶标仪购自美国 Bio-tek 公司,垂直电泳仪、ECL 发光剂购自美国 GE 公司,硝酸纤维素膜购自美国 Bio-Rad 公司。

**1.2 细胞培养** A549 细胞于含 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中。细胞贴壁生长良好,每 3 天传代 1 次。取对数生长期的细胞进行实验。

**1.3 细胞照射条件** 用电子直线加速器照射细胞,细胞培养板下方置 5 cm 厚水箱,上方放置 1.5 cm 等效组织胶。源靶距为 100 cm,以 10 cm×10 cm 射野给予 6 MV X 线照射(剂量率为 200 cGy/min)。根据实验的要求照射不同剂量,照射后的细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中继续培养。

**1.4 MTT 检测** 取对数生长期细胞以  $6.0 \times 10^7/L$

的浓度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100  $\mu$ l,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,加入不同浓度姜黄素(10、20、50、100、200  $\mu$ mol/L)和顺铂(1、2、5、10、20 mg/L),以不加姜黄素和顺铂处理的为对照组,两种药物其余浓度为实验组。分别于培养 24、48 和 72 h 后,每孔加入 20  $\mu$ l MTT(2 g/L),继续孵育 4 h 后,终止培养。吸去培养液,每孔加 DMSO 150  $\mu$ l,在酶标仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值。每个浓度设平行重复 6 孔,重复实验 3 次。按以下公式计算:细胞存活率(%) =  $(A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

**1.5 克隆形成实验** 根据 MTT 检测结果,选取对细胞毒性的较小的姜黄素和顺铂浓度进行后续试验。将处于对数生长期的细胞消化成单细胞悬液,计数稀释,以 200 个/孔密度接种于 24 孔板中,每板细胞分为单纯照射(R)组、姜黄素+照射(C+R)组、顺铂+照射(P+R)组及姜黄素+顺铂+照射(C+P+R)组,24 h 后均给予 0、2、4、6、8 和 10 Gy 照射,继续培养 10 d 后,无水乙醇固定 15 min,0.1% 结晶紫染色 20 min,于倒置显微镜下计数 >50 个细胞的克隆数,并计算克隆形成率(PE):  $PE(\%) = (\text{处理组克隆形成平均数}/\text{接种细胞数}) \times 100\%$ 。细胞存活分数(SF) = 照射组 PE/未照射组 PE  $\times 100\%$ 。试验重复 3 次,取平均值。按多靶单击模型[ $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ ]拟合绘制细胞存活曲线。根据公式计算辐射增敏比(SER) = 对照组  $D_0$ /实验组  $D_0$ 。实验重复 3 次。

**1.6 人工划痕实验** 4 组细胞以  $1 \times 10^5$  个的浓度接种于 96 孔培养板后经 4 Gy 照射,常规培养至形成单层,在单层培养细胞上,用移液器吸头沿培养板底部作“一”字形划痕,倒置显微镜下拍摄并确定划痕边缘区域及相对距离。将培养液更换为无血清培养液,按分组要求继续培养;细胞处理结束后,倒置显微镜下拍摄并计算划痕边缘相对距离,比较处理前后划痕边缘相对距离的差值。实验重复 3 次。

**1.7 Transwell 试验** 收集 4 组经 4 Gy 照射的细胞,以 10% 胎牛血清的培养基重悬细胞至  $5 \times 10^5$  个/mL,Transwell 上室加 200  $\mu$ l 细胞悬液,下室加入 600  $\mu$ l 含 10% 胎牛血清的细胞培养基,孵育 24 h,棉签擦去上室上面的细胞,移去 Transwell,倒置,风干,加入 500  $\mu$ l 含 0.1% 结晶紫染色,将小室置于其中,30 min 后取出。直径上取 4 个视野,照相,计算穿膜

细胞数。实验重复 3 次。

**1.8 Western blotting** 将 4 组经 4 Gy 照射的细胞, 孵育 24 h 后, 加入裂解液裂解 30 min, 转入预冷 EP 管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清测蛋白浓度, 等体积加还原上样缓冲液, 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 上样量 20~50  $\mu$ l, 80 V 电泳至浓缩胶和分离胶分界处后调为 100 V, 湿转蛋白至 PVDF 膜。一抗(1:500)室温孵育 2 h, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 $\times$ 5 min。ECL 化学发光显色, X 胶片曝光、显影、定影, 以 GAPDH 作为内参。胶片扫描后采用 IPP 软件检测目的条带光密度, 最终结果表示为各条带灰度值与内参的比值。

**1.9 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 版软件对数据

进行处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用配对 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 姜黄素对肺癌 A549 细胞株的抑制效果** 不同浓度姜黄素或顺铂作用 A549 细胞株 24 h 后, 细胞存活率随浓度的增加而升高, 抑制效应呈浓度和时间依赖方式。姜黄素和顺铂对非小细胞肺癌 A549 细胞株的  $IC_{20}$  为 15.74  $\mu$ mol/L 和 1.25 mg/L, 为避免姜黄素和顺铂对 A549 细胞的毒性作用, 在增敏实验中姜黄素和顺铂浓度分别采用 10  $\mu$ mol/L 和 1 mg/L。见图 1。

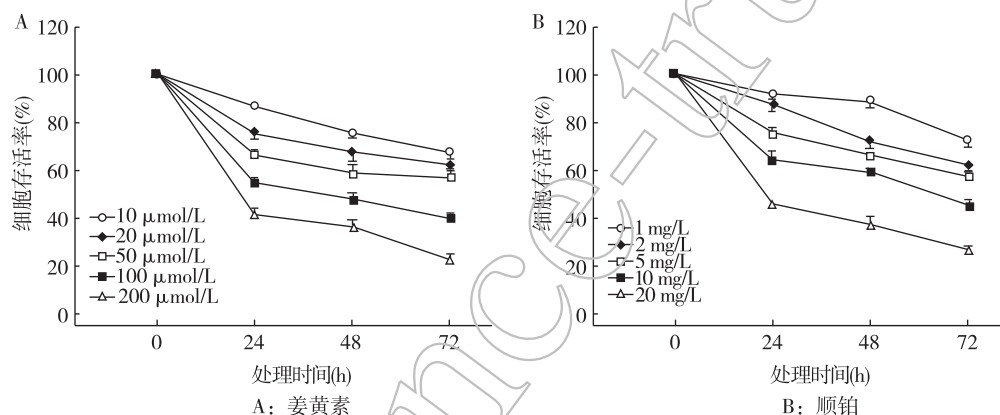


图 1 不同浓度姜黄素和顺铂对 A549 细胞存活的影响

**2.2 姜黄素联合顺铂对 X 线抑制 A549 细胞存活的影响** 采用 10  $\mu$ mol/L 姜黄素和 1 mg/L 顺铂单独或联合预处理 24 h 后, 细胞接受不同剂量 X 线照射(0、2、4、6、8、10 Gy)。C+P+R 组在照射剂量为 2~10 Gy 时的细胞 SF 均低于其余 3 组, 而 C+R 组在 4~10 Gy, P+R 组在 2~10 Gy 时的细胞 SF 均低于 R 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。C+R 组、P+R 组及 C+P+R 组相对于 R 组的辐射增敏比 SER 依次为 1.24、1.31 和 1.96。见表 1、图 2。

**2.3 姜黄素联合顺铂对 X 线抑制 A549 细胞迁移的影响** 以 R 组为参考(1.00), C+R 组、P+R 组及 C+P+R 组的迁移距离分别为(0.86 $\pm$ 0.09)、(0.79 $\pm$ 0.06)和(0.37 $\pm$ 0.05)倍, 组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); C+P+R 组迁移距离均低于 C+R 组和 P+R 组。见图 3。

**2.4 姜黄素联合顺铂对 X 线抑制 A549 细胞侵袭的影响** R 组、C+R 组、P+R 组及 C+P+R 组相处理

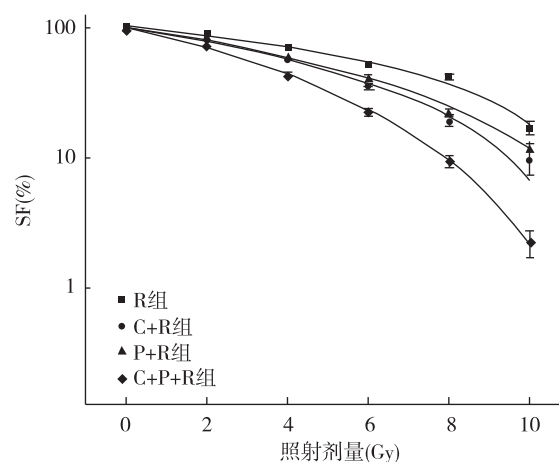


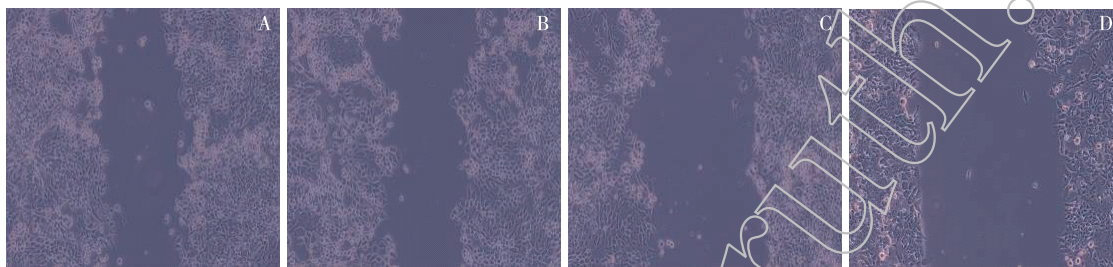
图 2 多靶单击模型拟合存活曲线

24 h 后穿膜细胞数分别(521 $\pm$ 21)、(352 $\pm$ 17)、(229 $\pm$ 12)和(154 $\pm$ 16)个, 组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); C+P+R 组的穿膜细胞数低于 C+R 组和 P+R 组 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

表 1 4 组不同照射剂量细胞 SF (%)

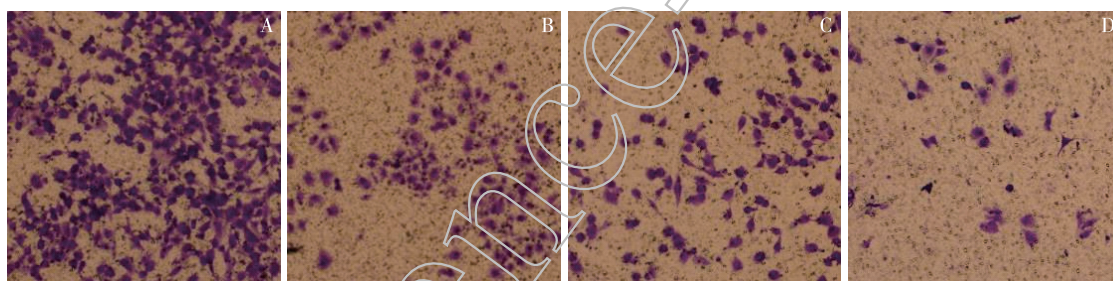
组别	照射剂量 (Gy)					
	0	2	4	6	8	10
R 组	100.00±1.43	91.10±3.69	70.22±2.33	52.25±1.74	41.58±1.28	17.08±1.93
C+R 组	95.01±3.27	85.59±2.05	56.35±1.91 <sup>*</sup>	35.40±2.05 <sup>*</sup>	19.74±1.53 <sup>*</sup>	9.61±1.24 <sup>*</sup>
P+R 组	97.83±2.04	80.78±1.72 <sup>*</sup>	62.79±3.37 <sup>**</sup>	41.43±1.28 <sup>**</sup>	22.43±2.09 <sup>**</sup>	12.09±1.76 <sup>**</sup>
C+P+R 组	96.24±2.56	72.78±3.64 <sup>**△</sup>	42.84±2.63 <sup>**△</sup>	22.59±2.25 <sup>**△</sup>	9.40±0.87 <sup>**△</sup>	2.22±0.45 <sup>**△</sup>

注:与 R 组比较, \* $P<0.05$ ;与 C+R 组比较, # $P<0.05$ ;与 P+R 组比较, △ $P<0.05$



A:R 组;B:C+R 组;C:P+R 组;D:C+P+R 组

图 3 不同处理 24 h 的细胞迁移情况(×200)



A:R 组;B:C+R 组;C:P+R 组;D:C+P+R 组

图 4 不同处理 24 h 的细胞侵袭情况(结晶紫染色 ×40)

2.5 姜黄素联合顺铂对 X 线抑制 EGFR 表达的影响 C+R 组、P+R 组及 C+P+R 组处理 24 h 后的 EGFR 水平分别为  $0.47±0.04$ 、 $0.41±0.04$  和  $0.23±0.04$ ,均低于 R 组的  $0.59±0.05$ ,且 C+P+R 组的低于其余两组,以上差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 5。

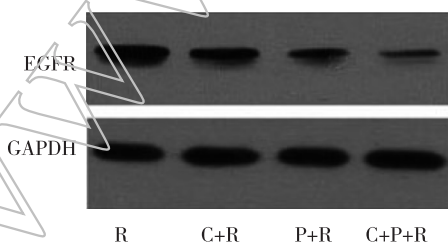


图 5 不同处理 24 h 的 EGFR 表达情况

### 3 讨论

从本研究结果证实,姜黄素可以明显抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞株的增殖,且这种抑制效应与药物作用浓度存在剂量-效应关系,浓度越高,抗肿瘤作用越强,与以往报道一致<sup>[8-9]</sup>。同时鉴于姜黄素对其他肿瘤的增殖也有较好的抑制效果,表明该药物具有较广的抗肿瘤效果。本研究为避免姜黄素本身细胞毒性对放疗效果的影响,故选取了无明显细胞毒性的低剂量进行后续研究。从细胞存活曲线可发现,A549 细胞的 SF 随辐射剂量的增高呈指数性降低,尤其在 6~10 Gy 的范围内更为明显,以上表明细胞具有辐射抗性,提示 A549 细胞具有亚致死损伤的修复能力。姜黄素与顺铂单独或联合使用均可增强 X 线对 A549 细胞的杀伤效果,

而联合使用的杀伤效果要强于两者单独使用,具体表现在联合用药的 SF 均低于姜黄素和顺铂单用,而给予姜黄素与顺铂处理后,细胞存活曲线显示“肩区”明显缩短,提示细胞辐射抗性减弱,而姜黄素联合顺铂的辐射增敏比为 1.96,以上证据均表明姜黄素与顺铂对体外培养的 A549 细胞有较明确的辐射增敏作用。

侵袭转移是肺癌治疗失败的主要原因之一<sup>[10]</sup>,放疗亦可用于肺癌转移病灶的治疗。故本研究通过研究姜黄素联合顺铂对体外培养细胞迁移和侵袭来从另一个方面评价其放疗增敏作用。研究发现姜黄素联合顺铂处理可增强 X 线照射对迁移和侵袭的抑制作用,具体表现为迁移距离和穿膜细胞数均降低。以上证据表明姜黄素联合顺铂对 A549 细胞放疗增敏作用较为全面,不仅抑制其增殖,而且还可抑制侵袭和转移过程。

近年来发现 EGFR 在恶性肿瘤放疗抵抗中的作用较为显著<sup>[11-12]</sup>,且研究发现 EGFR 表达水平越高,放射抵抗性就越强<sup>[13]</sup>,EGFR 介导放疗抵抗的机制较为复杂,可能与肿瘤细胞损伤后自我修复有关,而降低 EGFR 水平是增敏剂发挥作用的常用途径。本研究进一步发现姜黄素可增加 X 线对 EGFR 的降低作用,同时联合顺铂后抑制效应进一步增强,以上表明姜黄素联合顺铂可降低 EGFR 的表达,可能为其发挥作用的机制。此外,近年来研究发现姜黄素可通过核因子- $\kappa$ B 通路来发挥抗癌作用,如 Kunnumakkara 等<sup>[14]</sup>发现姜黄素可通过抑制核因子- $\kappa$ B 活性来增强吉西他滨对胰腺癌原位模型的抗肿瘤效果。Wilken 等<sup>[15]</sup>对姜黄素在头颈部鳞状细胞癌治疗应用的综述中也阐述,姜黄素可作为核因子- $\kappa$ B 的抑制剂,通过影响其下游基因的表达来发挥抗癌效果。以上证据均表明姜黄素可通过调节核因子- $\kappa$ B 通路来发挥抗肿瘤效果。故结合以上症状,在姜黄素联合顺铂针对 A549 放疗增敏作用中,核因子- $\kappa$ B 可能也参与了 EGFR 对以上过程的调控作用,将在后续研究中进行论证。

综上所述,姜黄素联合顺铂可抑制 A549 细胞增殖并具有放射增敏作用,同时抑制其迁移和侵袭,可能与 EGFR 相关信号通路受抑制有关,在提高非小细胞放疗效果上有一定的应用前景。

## 参考文献

[1] 赵辉,谷俊东,滑峰,等.放疗时间选择对局限性小细胞

肺癌预后影响的 meta 分析[J].中国肺癌杂志,2010,13(9):892-897.

[2] Kimple RJ. Strategizing the clone wars: pharmacological control of cellular sensitivity to radiation[J]. Mol Interv, 2010, 10(6): 341-353.

[3] 宋露萍.姜黄素治疗动脉粥样硬化性心血管疾病的研究进展[J].中南医学科学杂志,2013,41(4):417-421.

[4] 康顺爱,王志成,李艳博,等.姜黄素对紫外线氧化损伤人角质形成细胞的保护作用[J].中国老年学杂志,2008,28(17):1688-1690.

[5] 黄红艳,王营,陈复兴,等.姜黄素诱导的免疫耐受性人树突状细胞的研究[J].中国免疫学杂志,2011,27(7):611-615.

[6] 樊华,俞军.姜黄素对人胃腺癌细胞株 BGC-823 生长抑制及诱导凋亡的作用[J].临床肿瘤学杂志,2012,17(5):408-411.

[7] Li X, Xie W, Xie C, et al. Curcumin modulates miR-19/PTEN/AKT/p53 axis to suppress bisphenol A-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation[J]. Phytother Res, 2014, 28(10):1553-1560.

[8] Hong JM, Park CS, Nam-Goong IS, et al. Curcumin enhances docetaxel-induced apoptosis of 8505C anaplastic thyroid carcinoma cells[J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2014, 29(1):54-61.

[9] 曹宏,刁路明,夏东,等.姜黄素与顺铂联合对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡作用[J].武汉大学学报(医学版),2008,29(2):213-217.

[10] Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, et al. Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines[J]. Lung Cancer, 2014, 86(3):304-310.

[11] Eke I, Schneider L, Förster C, et al. EGFR/JIP-4/JNK2 signaling attenuates cetuximab-mediated radiosensitization of squamous cell carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2013, 73(1):297-306.

[12] Eke I, Sandfort V, Storch K, et al. Pharmacological inhibition of EGFR tyrosine kinase affects ILK-mediated cellular radiosensitization in vitro[J]. Int J Radiat Biol, 2007, 83(11-12):793-802.

[13] Rego RL, Foster NR, Smyrk TC, et al. Prognostic effect of activated EGFR expression in human colon carcinomas; comparison with EGFR status[J]. Br J Cancer, 2010, 102(1):165-172.

[14] Kunnumakkara AB, Guha S, Krishnan S, et al. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products[J]. Cancer Res, 2007, 67(8):3853-3861.

[15] Wilken R, Veena MS, Wang MB, et al. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 12.

收稿日期:2014-11-16; 修回日期:2014-12-29