

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.09.006
文章编号: 1005-8982 (2022) 09-0032-09

实验研究·论著

姜黄素抑制肺癌细胞A549上皮间质转化的机制研究

郑爽, 许林晖, 夏书月

(沈阳医学院附属中心医院 呼吸与危重症医学科, 辽宁 沈阳 110075)

摘要: **目的** 探讨姜黄素对肺癌细胞A549上皮间质转化的影响。**方法** 姜黄素诱导肺癌细胞A549 24 h, CCK-8法检测A549细胞活性, Transwell实验检测A549细胞迁移、侵袭的能力, Western blotting检测上皮间质转化标志蛋白的相对表达量, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测HOTAIR、E-cadherin、N-cadherin及Snail mRNA的相对表达量, 测序方法检测姜黄素诱导后lncRNA表达的变化, 实验验证介导姜黄素发挥作用的具体非编码RNA, 分析HOTAIR与临床病理参数之间的关系。**结果** CCK-8法检测结果显示, 姜黄素诱导肺癌细胞A549 24 h后, 不同浓度组肺癌细胞A549的OD值比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 随着姜黄素浓度的升高, OD值降低。Transwell结果显示, 姜黄素诱导肺癌细胞A549 24 h后, 姜黄素诱导组抑制肺癌细胞A549的侵袭、迁移, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blotting和qRT-PCR检测结果显示, 姜黄素诱导组的间质表型基因和蛋白(E-cadherin、N-cadherin、Snail)与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), N-cadherin、Snail相对表达量下降, E-cadherin相对表达量升高。癌旁正常组和肺癌组中HOTAIR的相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 肺癌组高于癌旁正常组。测序检测和qRT-PCR结果显示, 姜黄素抑制HOTAIR的表达。分析HOTAIR在肺癌组织中的表达及其与临床病理参数之间的关系显示, HOTAIR的表达与TNM分期、分化程度、淋巴结转移密切相关。对照组、姜黄素诱导组、姜黄素诱导+HOTAIR过表达组A549细胞OD值比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 姜黄素有效抑制肺癌细胞A549的增殖、侵袭及迁移, 姜黄素抑制lncRNA HOTAIR表达, 姜黄素抑制肺癌细胞A549上皮间质转化是通过HOTAIR实现的。

关键词: 肺肿瘤; 姜黄素; 上皮间质转化; HOTAIR

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Mechanism of curcumin inhibiting epithelial mesenchymal transformation of lung cancer cell line A549

Shuang Zheng, Lin-hui Xu, Shu-yue Xia

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110075, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of curcumin on epithelial-mesenchymal transition of A549. **Methods** The inhibitory effect of curcumin on lung cancer cell line A549 was detected by Transwell assay; the change of epithelial-mesenchymal transformation marker protein was detected by Western blotting; the relative expression of HOTAIR was detected by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR); and the change of lncRNA expression after curcumin induction was detected by sequencing. The specific non-coding RNA mediating the role of curcumin was verified, and the relationship between HOTAIR and clinicopathological parameters was analyzed. **Results** The results of CCK-8 assay showed that after 24 hours of curcumin-induced lung cancer cell line A549, the OD value of lung cancer cell A549 in different concentration

收稿日期: 2021-09-06

[通信作者] 夏书月, E-mail: 996003758@qq.com; Tel: 18002479675

groups was significantly different ($P < 0.05$), and the OD value decreased with the increase of curcumin concentration. Transwell results showed that 24 hours after curcumin-induced lung cancer cell A549, the curcumin-induced group inhibited the invasion and migration of lung cancer cell line A549, and there was significant difference between the curcumin-induced group and the control group ($P < 0.05$). The results of Western blotting and Real-time RT-PCR showed that the interstitial phenotypic genes and proteins (E-ca, N-ca, and Snail) in the curcumin-induced group were significantly different from those in the control group. The relative expression of N-ca and Snail decreased and the relative expression of E-ca increased in the curcumin-induced group. The relative expression of HOTAIR in lung cancer group was higher than that in normal group. The results of sequencing and Real-time RT-PCR showed that curcumin inhibited the expression of HOTAIR. The expression of HOTAIR in lung cancer and its relationship with clinicopathological parameters were analyzed. The results showed that the expression of HOTAIR was closely related to stage, differentiation, and lymph node metastasis. **Conclusion** Curcumin effectively inhibits the proliferation, invasion, and migration of lung cancer cell line A549. Curcumin inhibits the expression of lncRNA HOTAIR. Curcumin inhibits epithelial-mesenchymal transformation of lung cancer cell line A549 through HOTAIR.

Keywords: lung neoplasms; curcumin; epithelial-mesenchymal transition; HOTAIR long non-coding RNA

肺癌是世界范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤,多数肺癌患者在就诊时就已经发生远处器官转移,丧失了手术机会^[1],不仅如此,肺癌术后的复发和转移也是影响患者生存率的重要因素。因此,找寻有效抑制肺癌侵袭、转移的药物和新的治疗靶点是目前亟待解决的问题。

上皮间质转化是一个动态细胞过程,细胞发生上皮间质转化过程中细胞骨架发生重塑,细胞间接触蛋白如E-cadherin丢失或减弱,上皮特性减弱,同时细胞获得间质特征,如Vimentin、N-cadherin、Snail等标志物表达升高,最终导致细胞的侵袭和迁移能力增强^[2-3]。因此,以阻止上皮间质转化发生为靶点,抑制肿瘤侵袭是目前关注的热点^[4]。姜黄素、雷公藤红素、青蒿素、雷公藤甲素、辣椒素在2007年被《Cell》杂志列为最有可能被开发成为现代药物的5种传统天然药用化合物^[5],对治疗肿瘤具有重大的意义。姜黄素是从中药材中提取的一种化学成分,是植物中稀有的二酮类化合物。姜黄素可抑制肿瘤细胞增殖,且对正常细胞无明显的细胞毒效应,因而在抗肿瘤治疗中得到广泛的研究与关注^[6]。研究证实,姜黄素不仅具有抗肿瘤作用,同时还可以抑制肿瘤的侵袭和转移^[7-8]。目前研究表明,姜黄素有多个治疗靶点,包括多种基因、生长因子、转录因子、信号传导通道等。随着对姜黄素认识的深入,人们发现长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)同样也是姜黄素下游重要的作用靶点^[9-10]。

lncRNA是长度>200个核苷酸的非编码RNA,可通过基因转录、转录后、翻译、翻译后水平调控基因表达,在多种生理学(细胞增殖、表观调控、基因组

印记、X染色体失活等)和病理学(癌症、神经退行性疾病、免疫功能障碍、心血管及代谢性疾病等)过程中发挥重要作用^[11]。近年来研究者发现,lncRNA在肿瘤治疗过程中同样发挥重要的调控作用^[12]。许多lncRNA的异常表达是导致肿瘤治疗失败的重要原因^[13]。HOTAIR是第一个被发现具有反式作用的lncRNA。研究证实,HOTAIR是上皮源性恶性肿瘤特征性分子事件,在多种肿瘤的发生、发展,以及预测预后上发挥重要的作用。那么,HOTAIR是否介导姜黄素在肺癌上皮间质转化过程值得关注。

本研究检测HOTAIR、E-cadherin、N-cadherin及Snail mRNA和蛋白相对表达量及lncRNA的表达,找寻介导姜黄素发挥作用的具体lncRNA,并进一步探讨这一过程发生的具体机制,为进一步明确姜黄素在肺癌治疗过程中发挥作用的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肺癌细胞株A549购自中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所,细胞在含100 mL/L胎牛血清(FBS)的1640培养基中,于37℃、5%二氧化碳培养箱中常规培养。细胞每天换液处理,待细胞密度生长至80%进行传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.2 肺癌组织标本

选取2013年5月—2015年6月于沈阳医学院附属中心医院行肺癌切除的患者93例。患者术前均未进行放疗。癌旁组织标本(距离肿瘤>2 cm)作为正常组织对照。根据患者病理结果,RT-PCR分

析 HOTAIR 的表达,按照表达量分为高表达和低表达,分析 HOTAIR 表达与年龄、性别、分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期之间的关系。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 法检测 A549 细胞活性 取对数生长期细胞,经无血清培养基饥饿处理 24 h 后,胰酶消化细胞并将细胞制备成细胞悬液加入到 96 孔培养板中,设立 6 个复孔;加入 0.0 μmol/L、1.0 μmol/L、2.5 μmol/L、5.0 μmol/L、10.0 μmol/L、20.0 μmol/L、25.0 μmol/L 和 50.0 μmol/L 浓度的姜黄素,对照组加入相同体积磷酸盐缓冲液 (PBS),待细胞生长到特定时间后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,于细胞培养箱内继续孵育 2 h;酶标仪 450 nm 处检测 OD 值,以 OD 值作为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.3.2 Transwell 实验检测 A549 细胞迁移、侵袭能力迁移实验: Transwell 小室上室内铺入姜黄素诱导后的 50 000 个细胞,以未加药组为对照组,下室中加入 600 μL 含 10% FBS 的培养基,小室置于 24 孔板中,于孵箱内继续培养 24 h。4% 多聚甲醛固定细胞,0.1% 结晶紫染色,显微镜下观察结果并拍照。每组设置 3 个复孔,所有实验独立重复 3 次。侵袭实验: Matrigel 胶 4℃ 冰箱中过夜充分溶解后,与培养基按照 1:8 稀释,预冷的枪头吸取 100 μL Matrigel 胶铺于上室,将 Transwell 小室置于孵箱内 90 min 后取出。其余分组以及步骤同迁移实验。

1.3.3 Western blotting 检测 E-cadherin、N-cadherin、Snail 蛋白的相对表达量 细胞刮刀收集对照组及姜黄素诱导组细胞,加入 RIPA 细胞裂解液,提取各组细胞蛋白。BCA 法检测各组细胞蛋白浓度。将样品调成相同浓度后加入 Running Buffer,100℃ 变性 5 min。取 50 μg 蛋白样品在 10% 分离胶中电泳,电泳结束后采用湿转法将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上,转膜条件:恒压 50 V,2 h。5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h 并孵育相应抗体,4℃ 过夜。三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (TBST) 清洗干净后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, ECL 发光,以 GAPDH 为内参。通过 Image J 对条带进行灰度值分析。实验重复 3 次。

1.3.4 qRT-PCR 检测 HOTAIR、E-cadherin、N-cadherin、Snail mRNA 的相对表达量 采用 1 mL Trizol 试剂提取肺癌组织、癌旁正常组织、对照组细胞及姜黄素诱导组细胞总 RNA,采用紫外分光光度

计测定 RNA 浓度,取 1 μg 总 RNA 进行逆转录,逆转录 cDNA 条件:42℃ 预变性 15 min,70℃ 变性 15 min,1 个循环。引物通过 Primer 3 在线设计,经 Blast 检测评分后由上海生工生物工程股份有限公司合成。qRT-PCR 按照 20 μL 反应体系 (cDNA 2 μL, GoTap qPCR Master Mix, 2× 10 μL, 正反向引物各 0.4 μL, Nuclease-Free Water 7.2 μL),反应条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 1 min,共 40 个循环,记录每个样品的 Ct 值,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。每个样品设置 3 个复孔,每个实验独立重复 3 次。引物序列见表 1。

1.3.5 姜黄素处理前后的肺癌细胞 A549 转录组测序 姜黄素处理 24 h 后提取细胞总 RNA,对提取的 RNA

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
<i>E-cadherin</i>	正向: 5'-CCGCCATCGCTTACA-3'	262
	反向: 5'-GGCACCTGACCCTTGTA-3'	
<i>N-cadherin</i>	正向: 5'-GAAAGACCCATCCACG-3'	217
	反向: 5'-CCTGCTCACCACCACTA-3'	
<i>Snail</i>	正向: 5'-TCTCAGGTACCTGGCTGTTG-3'	250
	反向: 5'-TAGGATGCTGTCTTCCGTTG-3'	
<i>HOTAIR</i>	正向: 5'-GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC-3'	235
	反向: 5'-ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC-3'	
<i>TUG1</i>	正向: 5'-CAACCATTTTGAAGCCCTGT-3'	216
	反向: 5'-GCTTTACACTGGGTGCCATT-3'	
<i>LINC01125</i>	正向: 5'-CACCAAGGTAGTCGGCAAAT-3'	217
	反向: 5'-GCAGAGCGAGGTATGTAGGC-3'	
<i>LINC00662</i>	正向: 5'-GCACGACTTAGGGTCCATGT-3'	204
	反向: 5'-CGATGTGACAGGAAAGCTCA-3'	
<i>H19</i>	正向: 5'-TGCTGCACTTTACAACCACTG-3'	215
	反向: 5'-ATGGTGTCTTTGATGTTGGGC-3'	
<i>NBR2</i>	正向: 5'-ACGTTTGGTCCTTCACCTTG-3'	197
	反向: 5'-AGCAGCTCTCCATGTCCTGT-3'	
<i>LINC00960</i>	正向: 5'-GAGACAATGCCCAAAGAAA-3'	206
	反向: 5'-GAGACAATGCCCAAAGAAA-3'	
<i>GASS5</i>	正向: 5'-AACTTGCTGACCAGCTTA-3'	221
	反向: 5'-GCACTCTAGCTTGGGTGAGG-3'	
<i>MEG3</i>	正向: 5'-ATCATCCGTCACCTCCGTCTTC-3'	268
	反向: 5'-GTCCTCTTCATCCTTTGCTCTCG-3'	
<i>LINC00475</i>	正向: 5'-CACCAAGGTAGTCGGCAAAT-3'	207
	反向: 5'-GCAGAGCGAGGTATGTAGGC-3'	
<i>GAPDH</i>	正向: 5'-GCAGAATCCACGCCAGTACAAGAT-3'	312
	反向: 5'-TCTTCTTCAGTCGCTCCAGCTCTT-3'	

进行质量检测,采用Illumina HiSeq 2000高通量测序平台对浓度、纯度和完整性符合测序质量要求的样本进行转录组测序。构建文库,通过应用Agilent 2100 Bioanalyzer检测总RNA浓度、RIN值及28S/18S片段大小。采用边合成边测序技术,利用BGISEQ-500平台进行高通量测序,得到100 bp的测序读长。筛选通过测序获得的原始数据中低质量、接头污染及未知碱基N含量过高的reads,获得有效reads,即clean reads,以保证结果的可靠性。本部分实验交由北京诺禾致源公司完成。

1.3.6 细胞转染 HOTAIR过表达质粒及阴性对照质粒购自上海吉凯基因科技有限公司。细胞传代后,待细胞融合度达到约50%左右,使用Lipofectamine 3000转染试剂盒进行转染。根据转染说明书首先取2支2.5 mL的无菌EP管,随后在管中加入250 μ L的Opti-MEM培养基,2支EP管分别加入5 μ L Lipofectamine 3000和P3000转染试剂,Lipofectamine 3000的EP管中加入5 μ L的质粒,静置3 min,将Lipofectamine 3000与P3000试剂混合,室温静置3 min,最后加入培养皿中,培养6 h后换液,转染后24 h收集细胞,提取总RNA,验证转染效率。按照同样步骤转染后进行Western blotting、Transwell及CCK-8实验,步骤同前。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用 t 检验或方差分析,进一步两两比较用秩和检验;计数资料以例(%)表示,比较用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素抑制肺癌细胞增殖

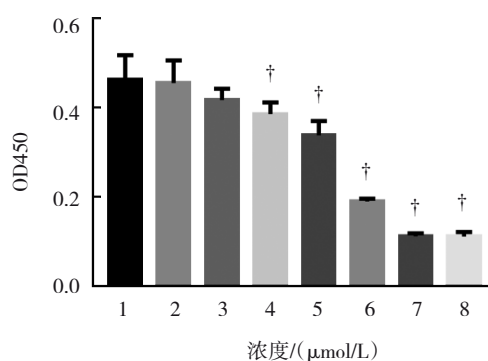
CCK-8实验结果证实,姜黄素诱导肺癌细胞A549 24 h后,不同浓度组肺癌细胞A549的OD值比较,差异有统计学意义($P<0.05$),随着姜黄素浓度的升高,OD值降低。25.0 μ mol/L姜黄素能有效抑制A549细胞增殖,故将此浓度选做本实验使用浓度。见表2和图1。

2.2 姜黄素抑制肺癌细胞侵袭和转移

Transwell实验结果显示,姜黄素诱导肺癌细胞

表2 不同浓度肺癌细胞A549 OD值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	OD值
姜黄素0.0 μ mol/L组	0.46 \pm 0.06
姜黄素1.0 μ mol/L组	0.45 \pm 0.05
姜黄素2.5 μ mol/L组	0.41 \pm 0.02
姜黄素5.0 μ mol/L组	0.38 \pm 0.03
姜黄素10.0 μ mol/L组	0.33 \pm 0.04
姜黄素20.0 μ mol/L组	0.19 \pm 0.01
姜黄素25.0 μ mol/L组	0.11 \pm 0.01
姜黄素50.0 μ mol/L组	0.10 \pm 0.01
F值	6.514
P值	0.000



1: 姜黄素0.0 μ mol/L组; 2: 姜黄素1.0 μ mol/L组; 3: 姜黄素2.5 μ mol/L组; 4: 姜黄素5.0 μ mol/L组; 5: 姜黄素10.0 μ mol/L组; 6: 姜黄素20.0 μ mol/L组; 7: 姜黄素25.0 μ mol/L组; 8: 姜黄素50.0 μ mol/L组; †与0 μ mol/L组比较, $P<0.05$ 。

图1 姜黄素抑制肺癌细胞A549增殖 ($\bar{x}\pm s$)

A549 24 h后,姜黄素诱导组抑制肺癌细胞A549的侵袭、迁移能力与对照组比较:姜黄素诱导组细胞侵袭数(208.66 \pm 13.61)个,对照组(357.33 \pm 19.01)个,差异有统计学意义($t=11.01$, $P=0.0004$)。姜黄素诱导组细胞迁移数(223.10 \pm 8.88)个,对照组(411.66 \pm 16.80)个,差异有统计学意义($t=17.190$, $P=0.000$)。见图2。

2.3 姜黄素抑制肺癌细胞A549上皮间质转化

qRT-PCR和Western blotting实验结果显示,姜黄素诱导肺癌细胞A549后,姜黄素诱导组的E-cadherin、N-cadherin、Snail mRNA和蛋白相对表达量与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),姜黄素诱导组N-cadherin、Snail mRNA和蛋白相对表达量升高,E-cadherin mRNA和蛋白相对表达量下降。见表3、4及图3。

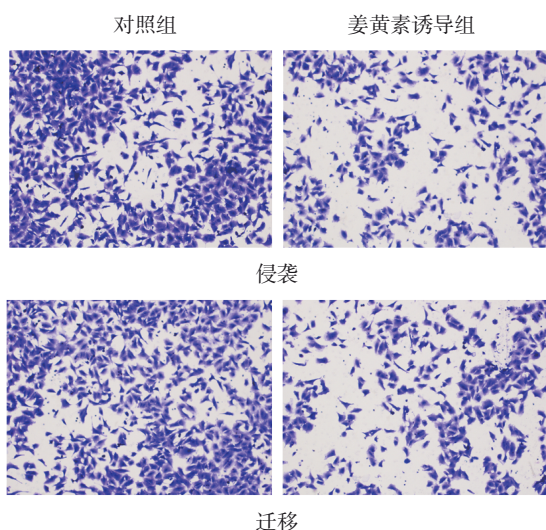


图 2 姜黄素抑制肺癌细胞 A549 的侵袭与迁移

表 3 两组肺癌细胞 A549 中 E-cadherin、N-cadherin、Snail mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin mRNA	N-cadherin mRNA	Snail mRNA
对照组	0.99 ± 0.12	1.03 ± 0.11	0.98 ± 0.13
姜黄素诱导组	0.33 ± 0.14	2.50 ± 0.10	2.32 ± 0.10
t 值	36.892	10.911	10.350
P 值	0.007	0.008	0.009

表 4 两组肺癌细胞 A549 中 E-cadherin、N-cadherin、Snail 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白	Snail 蛋白
对照组	1.02 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.38 ± 0.04
姜黄素诱导组	0.35 ± 0.03	1.27 ± 0.02	0.98 ± 0.05
t 值	14.713	51.082	10.355
P 值	0.004	0.000	0.009

2.4 HOTAIR 在肺癌组织中的表达及其与临床病理参数之间的关系

癌旁正常组 HOTAIR mRNA 的相对表达量 (0.05 ± 0.06) 与肺癌组 HOTAIR mRNA 的相对表达量 (0.14 ± 0.10) 比较, 差异有统计学意义 ($F = 7.495, P = 0.000$), 肺癌组高于癌旁正常组。通过分析 HOTAIR 与肺癌患者临床病理参数之间的关系, 发现 HOTAIR 的表达与患者的 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移密切相关, 与患者年龄、性别无关。结果提示 HOTAIR 参与了肺癌的进展。

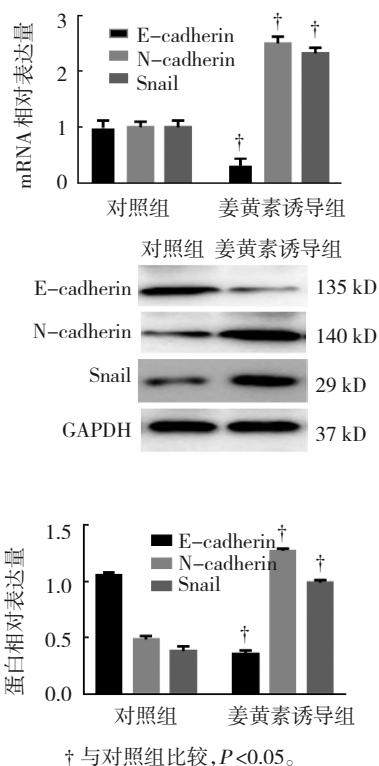


图 3 姜黄素抑制肺癌细胞 A549 上皮间质转化

见表 5。

2.5 姜黄素抑制 lncRNA HOTAIR 表达

qRT-PCR 结果证实, 姜黄素抑制肺癌细胞 lncRNA HOTAIR 的表达最为明显 (见表 6)。测序结果显示, 姜黄素对多个 lncRNA 表达均有调控作用 (见图 4)。

2.6 姜黄素通过 HOTAIR 抑制肺癌细胞上皮间质转换

为确定 HOTAIR 是参与姜黄素调控肺癌细胞上皮间质转化的下游效应因子, 本研究对肺癌细胞 A549 转染 HOTAIR 质粒再给予姜黄素干预。结果证实姜黄素抑制肺癌细胞上皮间质转化的效果与抑制增殖被逆转。对照组、姜黄素诱导组、姜黄素诱导+HOTAIR 过表达组 A549 细胞 OD 值分别为 (0.57 ± 0.06)、(0.14 ± 0.05) 和 (0.53 ± 0.07), 3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 101.300, P = 0.000$)。这一结果提示姜黄素抑制肺癌细胞上皮间质转化是通过 lncRNA HOTAIR 实现的。见图 5。

表 5 不同临床病理参数的肺癌患者 HOTAIR 表达的比较
例(%)

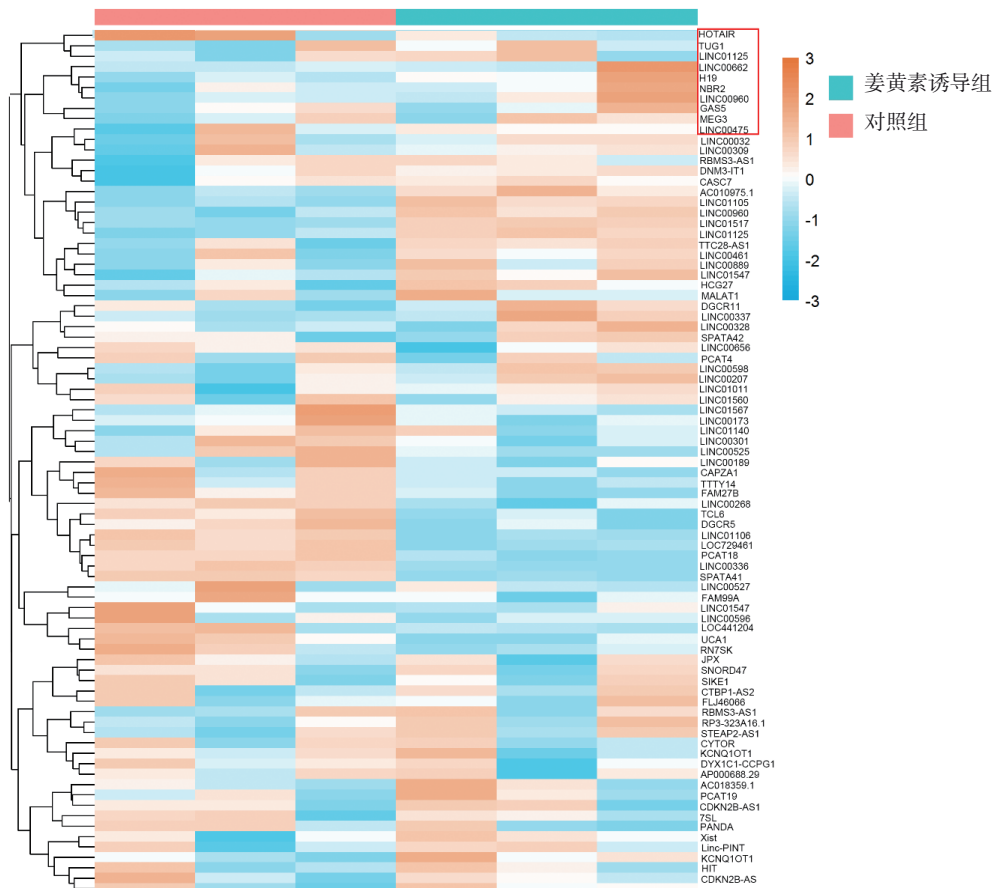
临床病理参数	n	HOTAIR 高表达	χ^2 值	P 值
年龄				
≤ 60 岁	44	21(47.7)	1.376	0.244
> 60 岁	49	27(55.1)		
性别				
男	53	29(54.7)	0.069	0.794
女	40	19(47.5)		
分化程度				
高分化	69	31(44.9)	10.992	0.001
低分化	24	17(70.8)		
淋巴结转移				
有	73	44(60.3)	27.124	0.001
无	20	4(20.0)		
TNM 分期				
I、II	63	39(61.9)	25.129	0.001
III、IV	30	9(30.0)		

表 6 两组 A549 细胞中 lncRNA 相对表达量比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	HOTAIR	TUG1	LINC01125	LINC00662
对照组	1.00 ± 0.03	1.03 ± 0.01	0.98 ± 0.02	1.02 ± 0.03
姜黄素诱导组	0.23 ± 0.09	0.42 ± 0.03	0.53 ± 0.10	0.89 ± 0.12
t 值	42.780	33.180	24.130	4.660
P 值	0.000	0.000	0.000	0.198

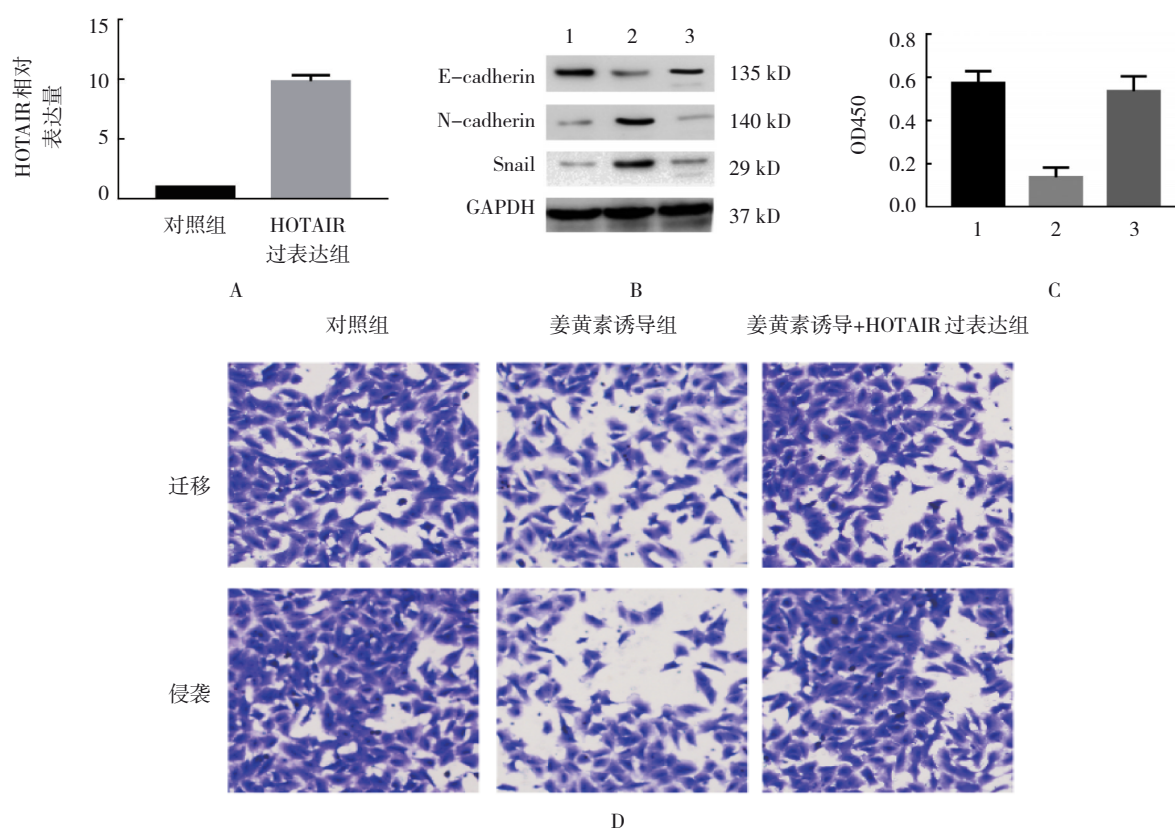
组别	H19	NBR2	LINC00960
对照组	0.99 ± 0.03	1.04 ± 0.04	0.97 ± 0.02
姜黄素诱导组	0.44 ± 0.1	0.93 ± 0.13	0.68 ± 0.12
t 值	29.070	1.370	16.730
P 值	0.000	0.999	0.000

组别	GAS5	MEG3	LINC00475
对照组	0.96 ± 0.03	1.05 ± 0.02	1.01 ± 0.02
姜黄素诱导组	0.52 ± 0.13	1.39 ± 0.12	0.89 ± 0.11
t 值	23.860	22.480	5.210
P 值	0.000	0.000	0.099



测序分析姜黄素诱导后肺癌细胞 lncRNA 的表达变化。

图 4 姜黄素抑制 lncRNA HOTAIR 的表达



1:对照组; 2:姜黄素诱导组; 3:姜黄素诱导+HOTAIR 过表达组。A: A549 细胞过表达 HOTAIR 后, 过表达组 HOTAIR 的表达较对照组升高; B: 过表达 HOTAIR 后姜黄素抑制肺癌细胞上皮间质转化作用被逆转; C: 过表达 HOTAIR 后姜黄素抑制肺癌细胞增殖作用被逆转; D: 过表达 HOTAIR 后姜黄素抑制肺癌细胞侵袭和迁移作用被逆转。

图 5 姜黄素通过 HOTAIR 抑制肺癌细胞上皮间质转化

3 讨论

肺癌是世界范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤, 目前肺癌的治疗水平不断提高, 但患者的病死率仍居高不下, 其中一个重要的因素是多数患者在晚期发生远处器官转移, 使得多种治疗手段无法取得有效的治疗效果^[4]。因此, 抑制肺癌的侵袭和转移是提高患者生存率的有效方法之一。

上皮间质转化是在病理条件或生理状态下, 细胞上皮特性减弱, 同时获得间质特性。上皮间质转化现象存在于胚胎发育过程中, 研究证实上皮间质转化是胚胎成熟必不可少的过程^[4]。随着对上皮间质转化认识的深入, 越来越多的证据显示, 上皮间质转化在肿瘤侵袭和转移过程中同样发挥不可或缺的作用^[15-16]。目前, 以上皮间质转化过程为靶点, 抑制肿瘤的侵袭和转移已经成为肿瘤治疗研究的重要方向。但是, 在治疗过程中所使用的传统化疗药物常常伴随不良反应, 而且长期使用导致耐药的发生也是临床常见的问题^[17]。由于这

些限制, 国内外抗癌药物的研发逐渐将目光转向天然植物, 中药治疗成为肿瘤治疗领域新兴的热点。姜黄素是在植物中提取的化学成分, 具有较低的毒副作用, 尤其是姜黄素对肿瘤细胞具有抑制作用, 而对正常细胞无明显的细胞毒性作用。既往研究证实, 姜黄素在多种肿瘤中都体现出良好的抗肿瘤效果^[18]。姜黄素被认为是最有可能被开发成为现代天然药用化合物之一^[19]。姜黄素在多种肿瘤中不仅具有抑制肿瘤增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用, 同时具有抑制肿瘤向远处转移的作用。本研究 CCK-8 实验明确姜黄素对肺癌细胞的抑制作用, 同时发现 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素能有效抑制细胞的增殖, 故将 25 $\mu\text{mol/L}$ 选做本实验的使用浓度。本研究通过 Transwell 实验证实姜黄素能够抑制肺癌细胞的侵袭和转移, Western blotting 检测上皮间质转化标志蛋白发现, 姜黄素在抑制肺癌细胞侵袭和迁移的同时抑制了上皮间质转化的发生。上皮间质转化在肿瘤发生、侵袭、转移的早期有

重要的意义,肿瘤细胞上皮间质转化的发生使得肿瘤细胞迁移能力增强,更容易发生肿瘤早期转移^[20]。通过姜黄素治疗,肺癌细胞的侵袭和迁移能力受到抑制,上皮间质转化被逆转,说明姜黄素不仅对肺癌细胞快速增殖有抑制作用,同时对肺癌细胞的侵袭和迁移也有明显抑制作用。既往研究证实,姜黄素对肿瘤发挥抑制作用的机制,不仅有经典通路的参与,同时lncRNA的表达改变也是姜黄素发挥作用的重要机制^[21]。lncRNA不编码蛋白,在体内的病理生理过程中发挥着重要的调控作用^[22-23]。本研究结果证实肺癌患者组织中HOTAIR的表达显著升高,HOTAIR的表达与患者的TNM分期、分化程度、淋巴结转移密切相关,与患者年龄、性别无关。本研究测序发现姜黄素诱导后肺癌细胞中的lncRNAs改变显著,尤其是lncRNA HOTAIR。通过qRT-PCR进一步验证了姜黄素对lncRNA HOTAIR表达调控最为明显。HOTAIR是第一个被发现具有反式作用的lncRNA。人类HOTAIR在染色体12q13区域,由5个短外显子和1个长外显子共同组成。研究证实^[24],HOTAIR在肿瘤原发灶与转移灶的表达较正常组织高200~2000倍,提示HOTAIR在肿瘤的发生和转移过程中发挥重要的调控作用。本研究中发现姜黄素抑制HOTAIR的表达,提示姜黄素抑制肺癌细胞侵袭和转移是通过HOTAIR实现的。进一步在细胞中过表达HOTAIR后再给予姜黄素,姜黄素对肺癌细胞的抑制作用被逆转,证实姜黄素抑制肺癌细胞增殖,上皮间质转化是通过HOTAIR实现的。这些结果提示HOTAIR参与了肺癌的进展。本研究结果与LIU等^[25]的研究结果一致。

综上所述,本研究证实姜黄素不仅能够抑制肺癌细胞增殖,还能显著抑制侵袭和转移,以及上皮间质转化的发生。同时本研究还证实姜黄素抑制肺癌上皮间质转化是通过lncRNA HOTAIR实现的。

参 考 文 献 :

- [1] ATWATER T, COOK C M, MASSION P P. The pursuit of noninvasive diagnosis of lung cancer[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(5): 670-680.
- [2] 吴国成,陈焕. 黄连素调节非小细胞肺癌细胞糖酵解水平并抑制A549细胞EMT的发生[J]. *临床肺科杂志*, 2020, 25(8): 1206-1211.
- [3] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212-226.
- [4] SINGH M, YELLE N, VENUGOPAL C, et al. EMT: mechanisms and therapeutic implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 182: 80-94.
- [5] CORSON T W, CREWS C M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials[J]. *Cell*, 2007, 130(5): 769-774.
- [6] 白宏,刘利兵,别蓓蓓,等. 姜黄素抗肿瘤机制及其应用的研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2020, 35(1): 149-153.
- [7] WANG N Z, FENG T, LIU X N, et al. Curcumin inhibits migration and invasion of non-small cell lung cancer cells through up-regulation of miR-206 and suppression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Acta Pharm*, 2020, 70(3): 399-409.
- [8] 曾玉群,李冰,窦常伟. 姜黄素通过调控TUFT1/AKT信号通路抑制肝细胞癌增殖、迁移及侵袭研究[J]. *新中医*, 2020, 52(11): 6-9.
- [9] SHAO J, SHI C J, LI Y, et al. LincROR mediates the suppressive effects of curcumin on hepatocellular carcinoma through inactivating wnt/ β -catenin signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 847.
- [10] LIU Y, SUN H M, MAKABEL B, et al. The targeting of non-coding RNAs by curcumin: facts and hopes for cancer therapy (review)[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(1): 20-34.
- [11] GUSIC M, PROKISCH H. ncRNAs: new players in mitochondrial health and disease[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 95.
- [12] 张姗,许雅芊,袁陈伟,等. 长链非编码RNA XIST可预测乳腺癌新辅助治疗的敏感性及预后[J]. *肿瘤*, 2020, 40(7): 479-487.
- [13] 胡悦,黄瑞雪. 肿瘤放射治疗抵抗相关lncRNA的研究进展[J]. *毒理学杂志*, 2019, 33(4): 327-331.
- [14] 廖文尉,章诚,刘芙蓉,等. Wnt/ β -catenin信号调控EMT水平对小鼠胚胎干细胞向肝脏组织结构分化的影响[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(30): 2441-2447.
- [15] LI F, YANG L, ZHAO Y, et al. Intraoperative frozen section for identifying the invasion status of lung adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Surg*, 2019, 72: 175-184.
- [16] CHAKRABORTY S, MIR K B, SELIGSON N D, et al. Integration of EMT and cellular survival instincts in reprogramming of programmed cell death to anastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(2): 553-566.
- [17] 王舒亚,滕雪,孔祥雪,等. 长链非编码RNA在抗肿瘤药物耐药中的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2019, 25(11): 995-1000.
- [18] TOMEH, M A, HADIANAMREI R, ZHAO X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1033.
- [19] XU D Z, DONG P X, XIONG Y, et al. MicroRNA-361-mediated inhibition of HSP90 expression and EMT in cervical cancer is

- counteracted by oncogenic LncRNA NEAT1[J]. *Cells*, 2020, 9(3):632.
- [20] 张益玮, 彭秀达, 肖帅. 上皮-间充质转变的概念变迁及与肿瘤转移研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2020, 29(2): 241-247.
- [21] WENG W H, GOEL A. Curcumin and colorectal cancer: an update and current perspective on this natural medicine[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 80: 73-86.
- [22] YU H, XIE Y Y, ZHOU Z D, et al. Curcumin regulates the progression of colorectal cancer via LncRNA NBR2/AMPK pathway[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 18(8): 153303381987078.
- [23] SAHLU B W, ZHAO S J, WANG X G, et al. Long noncoding RNAs: new insights in modulating mammalian spermatogenesis[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2020, 11(2): 291-302.
- [24] GUPTA, R A, SHAH N, WANG K C, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1071-1076.
- [25] LIU W, YIN N C, LIU H, et al. Cav-1 promote lung cancer cell proliferation and invasion through lncRNA HOTAIR[J]. *Gene*, 2018, 641: 335-340.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 郑爽, 许林晖, 夏书月. 姜黄素抑制肺癌细胞 A549 上皮间质转化的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(9): 32-40.

Cite this article as: ZHENG S, XU L H, XIA S Y. Mechanism of curcumin inhibiting epithelial mesenchymal transformation of lung cancer cell line A549[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(9): 32-40.