

# 芳姜黄酮对人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞迁移、侵袭及凋亡的影响和机制研究

王叶<sup>1</sup>, 王麒淞<sup>1</sup>, 骆衡<sup>2,3</sup>, 荣冬芸<sup>1</sup>, 曹煜<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>贵州医科大学临床医学院; <sup>2</sup>贵州医科大学药用植物与利用国家重点实验室;

<sup>3</sup>贵州医科大学中药天然产物化学重点实验室; <sup>4</sup>贵州医科大学附属医院皮肤科, 贵阳 550004

**摘要:**为研究芳姜黄酮(Ar-Turmerone)对人鳞状细胞癌A431细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及机制。实验采用CCK-8法检测抑制率,吉姆萨染色观察细胞形态,划痕实验和Transwell小室实验研究细胞迁移和侵袭能力的变化,流式细胞仪检测细胞凋亡率。此外,通过实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)与蛋白质印迹法(western blot)法检测mRNA和蛋白表达。siRNA阻断Notch1,Hes1和PTEN,检测相应的下游mRNA和蛋白的表达变化,流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果发现,芳姜黄酮可以抑制A431细胞增殖,使细胞形态发生改变,抑制细胞体外迁移和侵袭能力,促进细胞凋亡。经过芳姜黄酮处理后,Notch1,Hes1,PTEN的mRNA和蛋白表达升高。沉默Notch1,Hes1 mRNA和蛋白表达低于单纯给药组,而沉默Hes1,PTEN mRNA和蛋白表达也低于单纯给药组;沉默PTEN后,与单纯给药组相比,细胞死亡率降低。总之,芳姜黄酮可以抑制人鳞状细胞癌A431细胞的增殖并促进其凋亡,且具有抑制体外迁移和侵袭的作用,其促进细胞凋亡的机制是通过Notch1/Hes1/PTEN途径实现的。

**关键词:**芳姜黄酮;皮肤鳞状细胞癌A431细胞;凋亡;Notch1;Hes1;PTEN

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0870-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.021

## Effects of Ar-Turmerone on the migration, invasion and apoptosis of human squamous cell carcinoma A431 cells

WANG Ye<sup>1</sup>, WANG Qi-song<sup>1</sup>, LUO Heng<sup>2,3</sup>, RONG Dong-yun<sup>1</sup>, CAO Yu<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Guizhou Medical University Clinical Medical College;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University;

<sup>3</sup>Key Laboratory of Chemistry for Natural, Chinese Academy of Science;

<sup>4</sup>Department of Dermatology, First Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

**Abstract:** In order to study the effects of Ar-Turmerone on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human squamous cell carcinoma A431 cells, CCK-8 method was used to detect the inhibition rate of Ar-Turmerone on A431 cells. Cell morphology was observed by Giemsa staining, cell migration ability was analyzed by scratch assay; cell invasion ability was studied by Transwell chamber experiment, apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expression of mRNA was detected by real-time PCR, and the protein was detected by western blotting. The expression of Notch1, Hes1 and PTEN was blocked by siRNA, the expression of corresponding downstream mRNA and protein was detected, and the apoptosis rate was detected by flow cytometry. It was found that the action of Ar-Turmerone on A431 cells can inhibit cell proliferation, affect cell morphology, and inhibit cell migration and invasion, and promote cell apoptosis. After treatment, Notch1, Hes1, PTEN mRNA and protein expression were elevated. Silencing Notch1, Hes1 mRNA and protein expression were lower than the simple administration group, while silencing Hes1, PTEN mRNA and protein expression was also lower than the simple administration group; after silencing PTEN, compared with the simple drug-administered group, the death rate of the cell is reduced. In conclusion, it can

收稿日期:2018-12-17 接受日期:2019-04-09

基金项目:贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(QZYY-2018-089);贵州省中药现代化专项(2012-5018);贵阳市科技计划(20161001);云岩区软科学项目((2016)2号)

\*通信作者 Tel:86-013984347099; E-mail:caoyudoctor1@aliyun.com

be proved that the Ar-Turmerone can inhibit the proliferation of human squamous cell carcinoma A431 cells and promote its apoptosis; it can inhibit migration and invasion *in vitro*; the mechanism of Ar-Turmerone promoting apoptosis is through Notch1/Hes1 /PTEN pathway is implemented.

**Key words:** Ar-Turmerone; hauman squamous cell carcinoma A431 cells; apoptosis; Notch1; Hes1; PTEN

人皮肤鳞状细胞癌(Skin squamous cell carcinoma,SSCC)是一种起源于表皮或皮肤附属器角质细的恶性上皮性肿瘤,是最常见的皮肤恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。皮肤鳞状细胞癌发展快,对组织破坏力强,具有很强的侵袭力和迁移力,转移率高达 16%。目前临幊上针对皮肤鳞癌最常见的治疗方式是手术切除治疗,但术后复发、转移并不少见<sup>[2]</sup>。对于已经转移或晚期患者,化疗药物在达到正常治疗量时,对人体正常细胞和器官有着巨大毒性,且如今化疗期间易出现多药耐药问题<sup>[3]</sup>。因此,新型药物的研发对于SSCC 的治疗具有重大意义。芳姜黄酮(Ar-Turmerone)已经被国内外研究学者证实对乳腺癌细胞、血液肿瘤细胞具有一定的抑制作用,并进行了相关机制研究<sup>[4,5]</sup>,但对于皮肤鳞状细胞癌相关研究罕见报道。本研究以皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞为对象,观察芳姜黄酮对 A431 细胞增殖抑制、凋亡、体外迁移、侵袭的作用,并探讨芳姜黄酮是否通过 Notch1 / Hes1 / PTEN 通路影响皮肤鳞状细胞癌 A431 的凋亡,为皮肤鳞状细胞癌的新药研发提供相关的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

#### 1.1.2 药品与试剂

芳姜黄酮(美国 Gayman Chemical),DMEM 高糖培养基,PBS,青链霉素双抗(美国 HyClone),四季青胎牛血清,胰酶(美国 gibco),CCK-8 试剂(日本同仁),吉姆萨染色试剂盒(中国 Solarbio),Transwell 小室(美国 Corning),Matrigel 胶(美国 BD 公司),Annexin V-FICT/PI 细胞凋亡检测试剂盒, RNA 提取试剂盒,全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国江苏碧云天生物科技研究所),逆转录试剂盒、real-time PCR 试剂盒(日本 TaKa-Ra 公司), $\beta$ -Actin、Notch1、Hes1、PTEN 抗体(英国 Abcam 公司),Lipofectamine2000(美国 Invitrogen Life Technologies 公司)。

### 1.1.3 主要仪器

多功能酶标仪 SYNERGY-H4(美国 Bio-Tek),DO3 THINK 倒置显微镜,流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson) StepOnePlus Real-Time PCR 仪、E-Gel Imager 凝胶成像系统(美国 Life Technologies)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

A431 细胞在培养瓶中贴壁生长,用含 10% 胎牛血清的完全培养基,于 37 ℃,含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,每隔 3~4 天传代一次,取处于对数生长期的细胞用于实验。

### 1.2.2 增殖抑制率测定

CCK-8 法检测细胞增殖抑制率。将细胞消化离心后将浓度稀释成  $1 \times 10^5$  个/mL,取 50 μL 接种于 96 孔板,设置 5 个复孔,待细胞贴壁后加药。将芳姜黄酮:DMSO 按 100:1 配置成 1 g/L 母液。参照荣冬芸<sup>[6]</sup>等的实验方法,实验组以等体积法计算芳姜黄酮浓度,使其终浓度为 0、2.5、5、10、20、40、80、160 mg/L,终体积为 100 μL。同时,设细胞对照组(除不加药物外,处理同实验组)、空白对照组(除不加 DMSO、药物及细胞,余处理同实验组),继续培养 24、48、72 h,结束前 2.5 h 避光加入 CCK-8 试剂 10 μL/孔,继续孵育 2.5 h 后酶标仪检测 450 nm 波长吸光度(A)值。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (\text{细胞对照组 A450 - 实验组 A450}) / (\text{细胞对照组 A450 - 空白对照组 A450}) \times 100\%$$

### 1.2.3 凋亡形态观察

消化离心收集细胞,重悬计数后以完全培养基稀释至  $1 \times 10^5$  个/mL,将细胞悬液接种于 6 孔板中(1 mL/孔),加药使药物终浓度为 0、20、40、80 mg/L,培养 24 h,按照吉姆萨试剂盒方法染色,倒置显微镜下观察细胞形态,拍照记录。

### 1.2.4 体外迁移实验

将细胞悬液接种于 6 孔板,待细胞平铺面积达 80% 后,用 1 mL 的枪头在孔内划痕,用 PBS 洗去脱落细胞,于倒置显微镜下对划痕进行拍照。实验组加药使药物终浓度为 5、10 mg/L,设置含 0.1% DM-

SO 的培养基对照组,于培养箱中培养 24、48 h,再次于显微镜下拍照。用 Image J 软件计算加药前后划痕面积,计算面积比。

$$\text{面积比} = (\text{加药前初始划痕面积} - \text{加药 } 24 \text{ h} / 48 \text{ h} \text{ 后划痕面积}) / (\text{加药前初始划痕面积}) \times 100\%$$

### 1.2.5 Transwell 体外侵袭实验

将配置好的 Matrigel 胶均匀铺于 Transwell 小室内,A431 细胞饥饿 24 h 后制备成细胞悬液。实验组将细胞分别用浓度为 5、10 mg/L 的不含血清的芳姜黄酮重悬,设置含 DMSO 的无血清培养基对照组,并调整细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL,取 200  $\mu\text{L}$  接种于铺好胶的小室中,在下室内加入 600  $\mu\text{L}$  含 15% 血清的完全培养基,置于培养箱中孵育。24、48 h 后用棉签擦去小室内的细胞和胶,按照结晶紫染色试剂盒步骤染色,在倒置显微镜下随机选取 6 个视野,显微镜下计数每个视野中的细胞数量,重复实验 3 次。

$$\text{细胞平均穿膜数量} = 6 \text{ 个视野中的细胞总数} / 6$$

### 1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率

收集细胞后以完全培养基重悬,按 1 mL 每孔接种于 6 孔板,培养箱中培养 12 h 后,实验组加入芳姜黄酮,使药物终浓度分别为 20、40、80 mg/L,设置不加药的细胞对照组,继续培养 48 h。小心消化收集细胞,PBS 洗涤后,参照 Annexin V-FITC/ PI 试剂盒说明书操作,上流式细胞仪检测,重复实验 3 次,计算凋亡率。

### 1.2.7 siRNA 转染

siRNA 的设计由上海吉玛生物公司完成,lipofectamine2000 转染技术转染细胞。细胞转染后无血清培养 6 h,更换完全培养基,继续培养至 48 h,检测相关 mRNA 及蛋白表达。荧光标记 siRNA (cy3-siRNA) 评价转染效率,转染效率约为 80%。转染成功后,设置空白组(未作任何处理的 A431 细胞)、对照组(阴性 siRNA 转染的 A431 细胞),加药组(以 20 mg/L 的芳姜黄酮作用于 A431 细胞)、siRNA 组(siRNA 转染细胞),siRNA + 药物组(以 20 mg/L 的芳姜黄酮作用于转染后的 A431 细胞)。检测 Notch1、Hes1 和 PTEN 的 mRNA 及蛋白表达,流式细胞仪检测沉默 PTEN 后细胞的凋亡率。

### 1.2.8 real-time PCR 检测 mRNA 表达

使用 Trizol 试剂从细胞中分离出 RNA。根据逆转录试剂盒的说明书逆转录总 RNA,然后使用 real-time PCR 试剂盒和所选基因的特异性引物进行定

量实时 PCR。反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 1 min,进行 40 个循环。以管家基因  $\beta$ -actin 为对照,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算相对表达水平。

### 1.2.9 Western blot 检测蛋白表达

将细胞在裂解缓冲液中裂解,并通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,10% 凝胶)分离来自每个样品的 50  $\mu\text{g}$  蛋白质,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。使用抗 Notch1、抗 Hes1、抗 PTEN 抗体孵育。ECL 发光液进行发光反应,于暗室中曝光,将条带强度以  $\beta$ -actin 标准化。

### 1.2.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行数据的统计学分析,实验数据结果均采用均数( $\bar{x}$ ) ± 标准差(s)表示,多样本之间的均数比较采用单因素方差分析,两种样本间的均数比较采用独立样本 t 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCK-8 法检测芳姜黄酮对 A431 细胞增殖的影响

5 ~ 160 mg/L 的芳姜黄酮作用于 A431 细胞 24、48、72 h 后,其增殖抑制率与对照组相比升高,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ );当芳姜黄酮浓度为 2.5 mg/L 时,三个处理时间后增殖抑制率与对照组相比均无明显差异( $P$  均  $> 0.05$ )。当药物浓度在 10 ~ 80 mg/L 时,随作用时间的延长,增殖抑制率逐渐升高,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ ),但当药物浓度为 160 mg/L 时,继续增加作用时间,增殖抑制率也无明显变化(48 h vs 72 h,  $P > 0.05$ )。芳姜黄酮在 24、48、72 h 的  $IC_{50}$  分别是 124.67、98.82、72.16 mg/L,结果表明实验浓度对 A431 细胞的增殖具有抑制作用,且呈现一定的时间-剂量依赖性(见表 1)。

### 2.2 芳姜黄酮对 A431 细胞形态的影响

对照组细胞呈多角形、排列紧密,芳姜黄酮不同浓度组细胞贴壁性降低,细胞间隙增宽,形态改变,可见核固缩、核碎裂和核溶解,上述现象随药物浓度增加更为明显(见图 1)。

### 2.3 芳姜黄酮对 A431 细胞迁移能力的影响

与对照组相比,实验组细胞迁移能力降低,差异有统计学意义(24 h 时  $P < 0.05$ ,48 h 时  $P < 0.01$ ),提示随芳姜黄酮浓度增高,培养时间增加可抑制 A431 细胞迁移(见图 2)。

表 1 芳姜黄酮对 A431 细胞增殖抑制率的影响( $n=5, \bar{x} \pm s$ )Table 1 Effect of Ar-Turmerone on the inhibition rate of A431 cell proliferation ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

芳姜黄酮 Ar-Turmerone (mg/L)	增殖抑制率 Inhibition rate (%)		
	24 h	48 h	72 h
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2.5	1.50 ± 0.48	1.78 ± 0.19	1.81 ± 0.95
5	3.29 ± 1.59 **	14.12 ± 0.66 **	22.75 ± 1.53 **
10	14.24 ± 2.22 **	27.07 ± 1.60 ** ##	31.42 ± 2.12 ** ## ▽▽
20	25.19 ± 5.57 **	32.68 ± 2.67 ** ##	39.96 ± 2.05 ** ## ▽▽
40	33.66 ± 4.08 **	39.63 ± 1.84 ** ##	45.01 ± 1.46 ** ## ▽▽
80	42.25 ± 4.15 **	51.22 ± 1.57 ** ##	60.34 ± 1.00 ** ## ▽▽
160	55.22 ± 2.81 **	63.46 ± 1.74 ** ##	71.03 ± 1.71 ** ##

注:与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 24 h 相比, ##  $P < 0.01$ ; 与 48 h 相比, ▽▽  $P < 0.01$ 。

Note: compare with the control group, \*\*  $P < 0.01$ ; compare with the 24 h group, ##  $P < 0.01$ ; compare with the 48 h group, ▽  $P < 0.01$ .

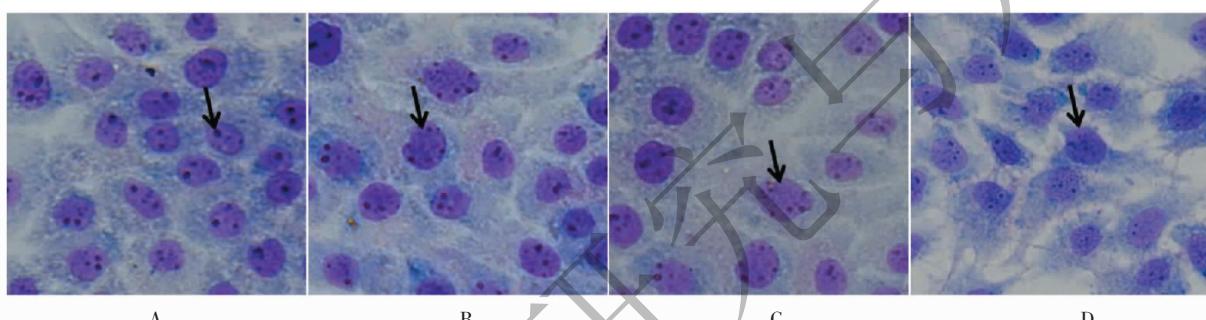


图 1 芳姜黄酮(0、20、40、80 mg/L)处理 48 h 对 A431 细胞形态变化的影响

Fig. 1 Effects of Ar-Turmerone (0, 20, 40, 80 mg/L, 48 h) on the morphological changes of A431 cells

注:A:对照组(倒置显微镜下,  $\times 400$ );B-D:20,40,80 mg/L芳姜黄酮处理细胞(倒置显微镜下,  $\times 400$ ),箭头示细胞核

Note: A: control group (inverted microscope,  $\times 400$ ); B-D: 20, 40, 80 mg/L Ar-Turmerone treated cells (inverted microscope,  $\times 400$ ), the arrow shows the nucleus.

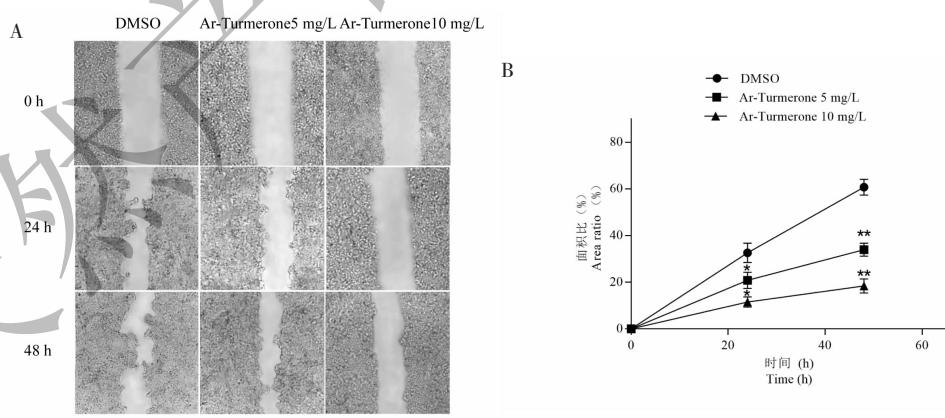


图 2 芳姜黄酮(5、10 mg/L)、DMSO 组作用于 A431 细胞(24、48 h)后横向迁移图

Fig. 2 Lateral migration plots of A431 cells after Ar-Turmerone (5, 10 mg/L) and DMSO treatment (0, 24, 48 h)

注:A: A431 细胞横向迁移代表性图像(倒置显微镜下,  $\times 100$ );B: 芳姜黄酮与 DMSO 组细胞迁移统计(倒置显微镜下,  $\times 100$ )。

与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: A : A431 cells lateral migration representative plot (inverted microscope,  $\times 100$ ); B : Ar-Turmerone (5, 10 mg/L)

group and DMSO group cell migration statistics (inverted microscope,  $\times 100$ ). Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.4 芳姜黄酮对 A431 细胞侵袭能力的影响

实验组 A431 细胞与对照组相比穿膜细胞数量明显减少, 差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ ), 且随

作用时间延长, 细胞穿膜数量逐渐减少, 差异具有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ ), 提示随芳姜黄酮浓度升高, 作用时间延长可抑制 A431 细胞的侵袭(见图 3)。

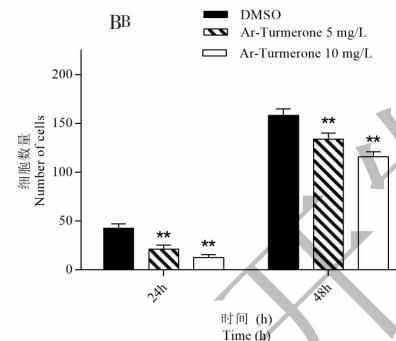
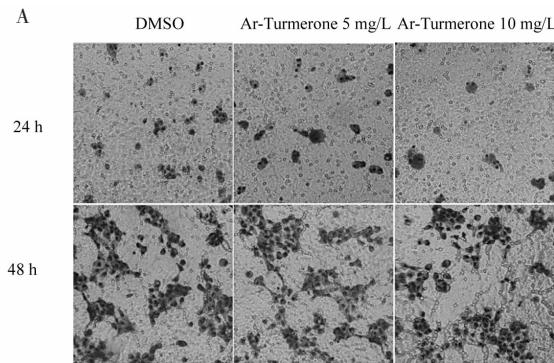


图 3 芳姜黄酮(5、10 mg/L)、DMSO 组作用于 A431 细胞(24、48 h)后侵袭能力图

Fig. 3 A431 cell invasion capacity affected by Ar-Turmerone (5, 10 mg/L) and DMSO treatment (24, 48 h)

注:A: A431 细胞侵袭能力代表图像(倒置显微镜下,  $\times 200$ ); B: Ar-Turmerone(5,10 mg/L)与 DMSO 组

细胞侵袭统计, 与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: A: A431 cells invasion capacity represents plots(inverted microscope,  $\times 200$ ); B: Ar-Turmerone(5,10 mg/L) and DMSO group cell invasion statistics. Compared with control group, \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.5 芳姜黄酮对 A431 细胞凋亡率的影响

20、40、80 mg/L 药物浓度时的 A431 细胞凋亡率分别为  $(8.30 \pm 0.36)\%$ 、 $(16.37 \pm 0.46)\%$ 、

$(30.48 \pm 1.08)\%$ , 与对照组  $(0.02 \pm 0.01)\%$  相比凋亡率升高, 差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ ) (见图 4)。

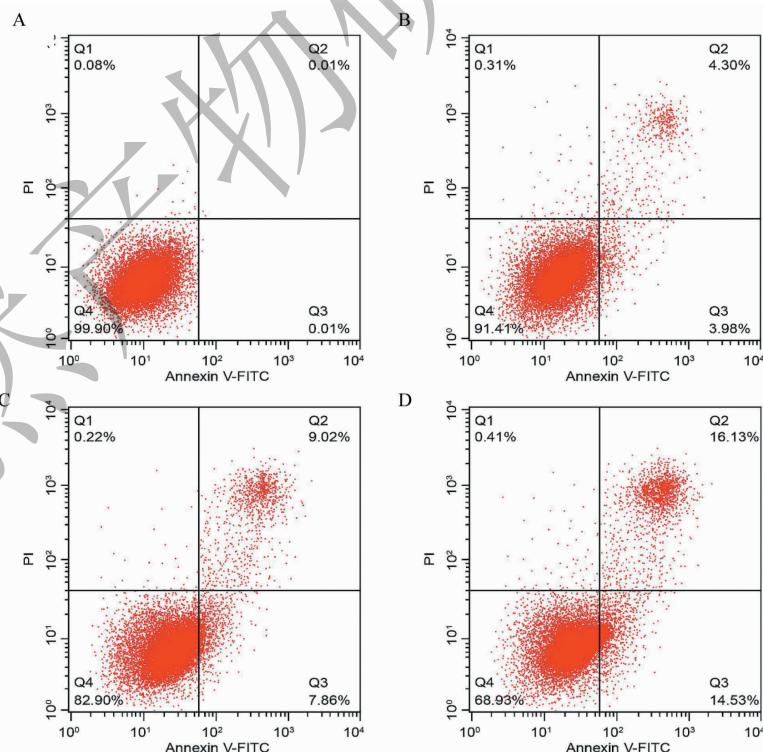


图 4 芳姜黄酮(0、20、40、80 mg/L)作用于 A431 细胞(48 h)后凋亡率图

Fig. 4 A431 cell apoptotic rate affected by Ar-Turmerone (0, 20, 40, 80 mg/L) treatment (48 h)

注: A-D: A431 细胞凋亡代表图像; A: 对照组; B-D: 芳姜黄酮浓度为 20、40、80 mg/L 时的凋亡图像。

Note: A-D: A431 cells apoptotic representative plot; A: Control group; B-D: Ar-Turmerone (20, 40, 80 mg/L) group apoptotic rate.

## 2.6 芳姜黄酮对 A431 细胞 Notch1 和 Hes1、PTEN mRNA 和蛋白表达的影响

随药物浓度增加,Notch1、Hes1 和 PTEN 的 mRNA 和蛋白表达的量与对照组相比逐渐上调,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。Pearson 分析显示 Notch1、Hes1、PTEN 的蛋白表达与药物浓度呈正相关关系( $r = 0.694, 0.937, 0.982, P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ) (见图 5)。

## 2.7 siRNA 沉默 Notch1、Hes1 和 PTEN 后对下游靶基因和蛋白的影响

阴性 siRNA 转染细胞后,相应蛋白表达与空白组相比无差异( $P$  均  $> 0.05$ ),siRNA 成功转染细胞后,相应蛋白表达下调,与空白组相比有差异( $P$  均  $< 0.01$ )。沉默 Notch1 后,si Notch1 + 芳姜黄酮组 Hes1 的 mRNA 和蛋白表达与加药组相比下调,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );沉默 Hes1 表达后,si Hes1 + 芳姜黄酮组 PTEN 的 mRNA 和蛋白表达与加药组相比下调,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ) (见图 6)。

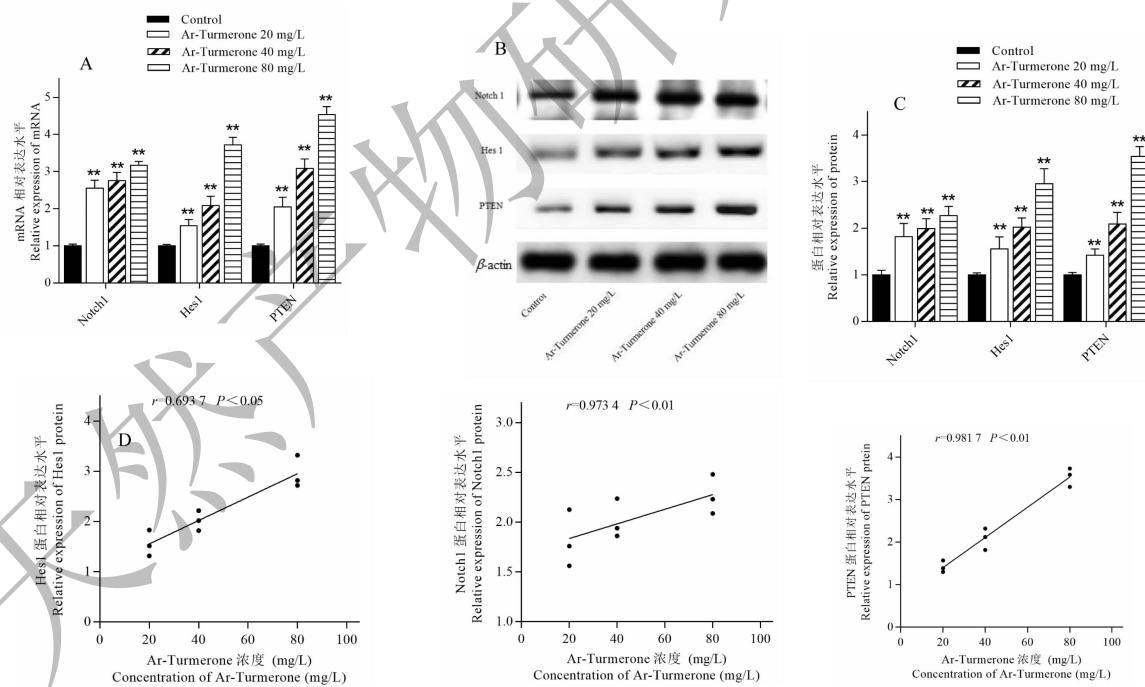


图 5 芳姜黄酮(0, 20, 40, 80 mg/L)作用于 A431 细胞后对 Notch1、Hes1 和 PTEN mRNA 及蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of Ar-Turmerone (0, 20, 40, 80 mg/L) on the expression of Notch1, Hes1, PTEN mRNA and protein

注:A:real-time PCR 检测 Notch1, Hes1 和 PTEN mRNA 的表达;B:Western blot 检测 Notch1, Hes1 和 PTEN 蛋白表达;C:蛋白表达量的定量分析;D:药物浓度与蛋白表达量的 Pearson 相关性分析。A, C:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

## 2.8 沉默 PTEN 对芳姜黄酮促凋亡作用的影响

空白对照组凋亡率( $0.00 \pm 0.00$ )% 和阴性对照组凋亡率( $0.01 \pm 0.00$ )% 无差异( $P > 0.05$ )。沉默 PTEN 后,在 20 mg/L 芳姜黄酮的作用下,A431 细胞的凋亡率为( $3.78 \pm 0.29$ )% ,高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),但是低于单纯用药组( $9.23 \pm 0.65$ )% ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ) (见图 7)。

## 3 结论

姜黄挥发油是姜黄的主要成分,本团队在前期研究中已经证实姜黄挥发油可以通过调节 caspase 3、caspase 9、survivin 等凋亡相关蛋白的表达促进皮肤鳞状细胞癌细胞的凋亡<sup>[7-8]</sup>。芳姜黄酮是姜黄挥发油的有效部位之一,其含量在姜黄挥发油中达到 30% 以上<sup>[9]</sup>,姜黄挥发油促进皮肤鳞癌细胞凋亡的作用是否涉及芳姜黄酮,目前尚不明确。本研究表明,芳姜黄酮对皮肤鳞癌 A431 细胞起到一定的抑制增殖和促进凋亡的作用,并对相关机制进行了深入探讨。

Note: A:real-time PCR detects the mRNA expression of A431 cells Notch1, Hes1 and PTEN; B:Western blot detects the protein expression of A431 cells Notch1, Hes1 and PTEN; C:Quantitative analysis of protein expression. D:Pearson correlation analysis between drug concentration and protein expression; A, C:Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

drug concentration and protein expression; A, C:Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

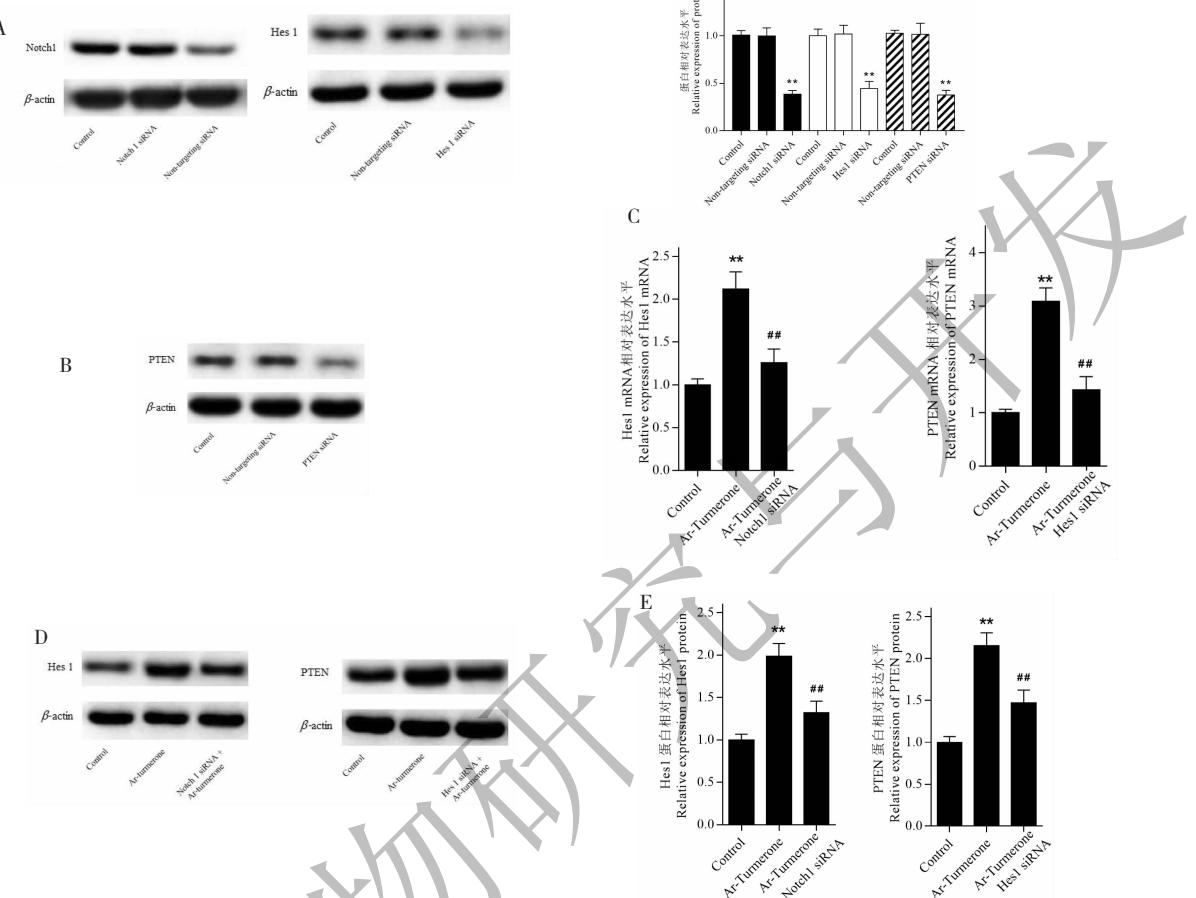


图 6 siRNA 沉默 Notch1、Hes1 和 PTEN 后对下游靶基因、蛋白的影响

Fig. 6 Effects of lower Notch1, Hes1 and PTEN expression on the expression of Notch1, Hes1 and PTEN mRNA and protein  
注:A, B:Western blot 检测 Notch1, Hes1 和 PTEN 沉默后对应的蛋白表达变化;C, D, E:real-time PCR 和 Western blot 检测 Notch1 沉默后芳姜黄酮对 Hes1 mRNA 和蛋白的表达影响及 Hes1 沉默后芳姜黄酮对 PTEN mRNA 和蛋白的表达;B, C, E: \* \* P < 0.01。

Note: A, B: Western blot detects the lower expression of Notch1, Hes1 and PTEN, the protein expression of A431 cells Notch1, Hes1 and PTEN;

C, D, E: real-time PCR and Western blot detects the effects of lower expression Notch1 on the expression of mRNA and protein

Hes1 and the lower expression of Hes1 on the expression of PTEN ;B, C, E: \* \* P < 0.01.

此研究中,通过 CCK-8 实验检发现芳姜黄酮对皮肤鳞癌 A431 细胞的增殖具有抑制作用,并且呈现一定的时间-剂量依赖性,低剂量即有较明显的抑制作用。细胞凋亡时是以 DNA 的降解为特征,可以观察到核固缩、核碎裂、核溶解等现象。通过吉姆萨染色,倒置显微镜下可观察到随药物浓度的增加,细胞逐渐失去正常形态,细胞间隙增加,黏附性降低,细胞核出现固缩,核碎裂形成的碎片逐渐增多,说明芳姜黄酮具有诱导细胞凋亡的作用。同时,流式细胞仪检测细胞凋亡发现,随药物浓度的增加,A431 细胞早期凋亡和晚期凋亡的细胞数量也逐渐增多,

进一步说明了芳姜黄酮具有促进 A431 细胞凋亡的作用。细胞迁移和侵袭实验表明,随药物浓度的增加,作用时间的延长,芳姜黄酮可以一定程度上抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。本实验在研究芳姜黄酮对 A431 细胞迁移、侵袭的影响时,所选择的药物浓度为 5、10 mg/L,作用时间为 24、48 h。但当药物浓度为 5、10 mg/L 时,作用 48 h 后的增殖抑制率分别为  $(14.12 \pm 0.66)\%$  和  $(27.07 \pm 1.60)\%$ ,细胞增殖在较小程度上受到抑制,可能对迁移和侵袭的实验结果有所影响,但结合多项实验数据,研究者仍然认为芳姜黄酮可以一定程度上抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。

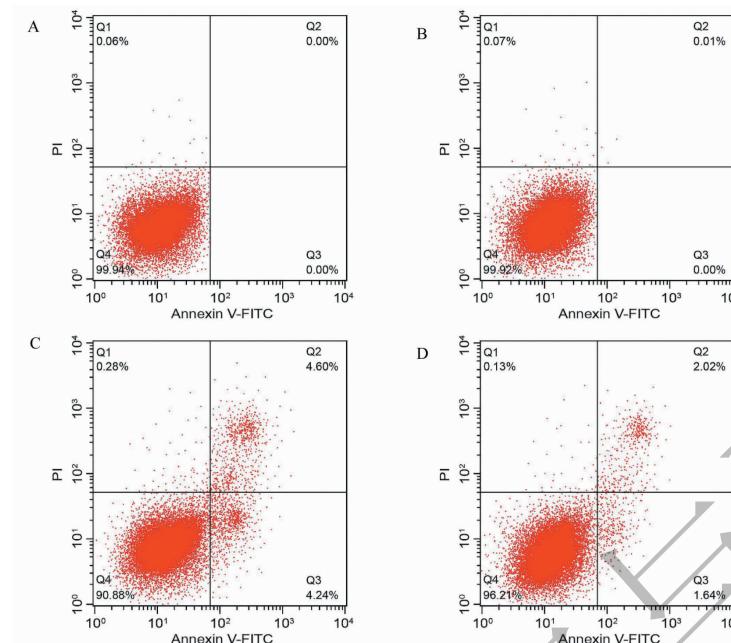


图 7 沉默 PTEN 后细胞凋亡率图(芳姜黄酮 20 mg/L,48 h)

Fig. 7 A431 cell apoptotic rate affected by the lower expression of PTEN (Ar-Turmerone 20 mg/L, 48 h)

注:A:空白对照组;B:阴性对照组;C:芳姜黄酮浓度为 20 mg/L 时的凋亡图像;D:PTEN 被抑制后,芳姜黄酮浓度为 20 mg/L 时的凋亡图像。

Note: A: Blank control group; B: Negative control group; C: Ar-Turmerone 20 mg/L group apoptotic rate; D: The lower expression of PTEN, and Ar-Turmerone 20 mg/L group apoptotic rate.

细胞凋亡的发生取决于促凋亡和抑凋亡成员的相对浓度。Notch 基因最早于 1917 年由 Thomas Hunt Morgan 在果蝇中发现,因其功能的部分缺失会在果蝇翅膀的边缘造成切迹而命名<sup>[10]</sup>。Notch 信号通路是一个在进化上十分保守的跨膜受体蛋白家族,Notch 信号通路的激活在控制细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭等方面发挥着重要作用<sup>[11,12]</sup>。在过去十年的研究中发现,Notch 信号通路相关蛋白在急性 T 淋巴细胞白血病、宫颈癌及乳腺癌中都有相关表达。毛秋霞等<sup>[13]</sup>学者曾研究报道,Notch 蛋白表达的异常与银屑病、恶性黑色素瘤、炎症性皮肤病等多种皮肤疾病相关;而 Notch 信号通路的缺失可能导致皮肤鳞状细胞癌的发生<sup>[14,15]</sup>。Zhang M 等<sup>[16]</sup>学者研究发现,皮肤鳞癌细胞中 Notch1 表达和激活水平均较低。Hes1 是 Notch1 的下游靶基因,其活化和抑制均受到 Notch1 的调控。PTEN 为一种新发现的抑癌基因,其调控受到多种因素的影响。Kim SJ 等<sup>[17]</sup>研究发现,可通过调节 Notch 信号通路影响 PTEN 的表达,从而抑制胃癌的发生。因此,芳姜黄酮是否通过 Notch1/Hes1/PTEN 信号通路促使皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞凋亡是值得探讨的问题。本研究通过 siRNA 质粒沉默 Notch1 基因

和 Hes1 基因,用合适的药物浓度干预转染后的细胞,检测基因和蛋白表达的变化。在成功沉默 Notch1 后,Hes1 的基因和蛋白表达量明显下调,而在沉默 Hes1 后,PTEN 的基因和蛋白表达量也呈下调趋势,同样沉默 PTEN 后,流式细胞仪检测细胞凋亡率与对照组相比明显下降。因此,研究者认为芳姜黄酮可能是激活了 Notch1,进而导致 Hes1 和 PTEN 的激活,发挥促进肿瘤细胞凋亡的作用。

综上所述,本研究发现芳姜黄酮不仅能够抑制 A431 细胞的增殖,诱导其凋亡,还能够抑制其侵袭和转移的能力。综上所述,Notch1/Hes1/PTEN 途径的激活是芳姜黄酮诱导皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞凋亡可能的机制,实验丰富了芳姜黄酮在皮肤肿瘤的治疗上应用的理论基础,为治疗皮肤鳞癌提供了新的作用靶点。

## 参考文献

- Cerra-Franco A, Grethlein SJ, Bertrand TE, et al. Congenital ichthyosis patient with squamous cell carcinoma of the skin who received concurrent chemoradiation: A case report [J]. Adv Radiat Oncol, 2018, 3(1):76-80.

(下转第 907 页)