

网络出版时间: 2020-12-9 16:03 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201208.0843.009.html>

姜黄素通过 PI3K/p53 信号通路 调控人胃癌细胞 SGC-7901 的增殖、凋亡和周期

李淑兰¹, 贺倩倩¹, 宫凯凯², 满玉清¹

摘要 目的 探讨姜黄素(Cur)对人胃癌细胞株 SGC-7901 增殖、凋亡和周期的影响及其分子机制。方法 采用不同浓度梯度 Cur(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理正常培养的 SGC-7901 细胞。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法检测在不同时间点(24、48、72 h)细胞增殖能力变化; Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡状况; 流式细胞术检测细胞凋亡水平及周期变化; Western blot 检测 PI3K/p53 信号通路相关蛋白表达变化。结果 MTT 结果显示, 与对照组比较, Cur 呈浓度依赖性抑制 SGC-7901 细胞增殖; 细胞荧光染色结果显示 Cur 处理组的细胞亮蓝色荧光强度减弱; 流式细胞术结果显示, 与对照组比较, 不同浓度 Cur 处理组细胞凋亡率增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), G_0/G_1 期细胞出现阻滞($P < 0.01$); Western blot 结果显示, 与对照组比较, 不同浓度 Cur 组细胞 PI3K 蛋白表达量、Akt 磷酸化水平均降低($P < 0.01$), 而 p21 和 p53 蛋白表达量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 Cur 能抑制 SGC-7901 细胞的增殖效应, 通过诱导细胞发生 G_0/G_1 期阻滞进而促进其凋亡进程, 这可能与其对 PI3K/p53 信号通路的调控密切相关。

关键词 姜黄素; 人胃癌细胞; 增殖; 凋亡; PI3K/p53 信号通路; 细胞周期

中图分类号 R 285.5; R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)01-0043-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.009

胃癌(gastric cancer, GC)作为全球常见的恶性肿瘤之一,正威胁着全球人的健康^[1]。GC 的早期症状不突出,临床早期诊断率低及手术治疗效果不佳是如今困扰医学界的主要难题。在现代医学中,包括紫杉醇在内的多种中药提取物已被证明能有效治疗 GC;然而,许多该类物质不能有效清除所有肿瘤细胞,这往往预示着预后不良^[2]。因此,目前迫切需要寻找有效、安全的抑制肿瘤增殖、迁移的预防

药物。如今,许多常用的药物都是从天然产品中提取的,姜黄素(Curcumin, Cur)作为重要的天然产物之一,逐渐成为医药学家研究的主要课题^[3]。近几十年来, Cur 在肿瘤治疗中的作用已被广泛研究,包括诱导细胞凋亡、抑制血管生成、提高化疗和放疗的敏感性^[4]。研究^[5]显示: Cur 在 GC 中能逆转化疗药物的耐药性,抑制癌细胞增殖,抑制侵袭;且相当多的证据表明 Cur 具有多种分子靶点,包括 STAT3、ROS、NF- κ B 转录因子和环氧合酶-2 等。该研究旨在通过观察不同浓度的 Cur 处理下, GC 细胞增殖、凋亡及周期变化情况,进而探究其治疗 GC 新的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 RPMI 1640 培养基、胎牛血清 FBS、青链霉素购自美国 Gibco 公司;姜黄素、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购于北京索莱宝公司; Hoechst 33258 染色试剂盒、PI 单染细胞周期检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天公司;全蛋白提取及 BCA 法蛋白定量测定试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;抗 PI3K、Akt 和 p-Akt 兔一抗购自英国 Abcam 公司;抗 p21、p53 及 β -actin 兔一抗和山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉三鹰公司。3111 型 CO_2 培养箱为美国 Thermo 公司产品;倒置显微镜为日本尼康公司产品;凝胶处理分析系统为美国 ABI 公司产品;酶标仪为美国 Bio-Tek 公司产品;FC500 型流式细胞仪为美国 Beckman 公司产品。

1.2 细胞培养 人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中科院细胞库。细胞培养在含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI 1640 完全培养基中;培养条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养。根据细胞生长状态定期换液,待细胞接近长满培养瓶底部时,用 0.25% 的胰酶消化传代。在药物处理实验开始之前,需对细胞进行同步

2020-08-18 接收

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(编号: 2017WS801)

作者单位: 滨州医学院附属医院¹ 药理学、² 肿瘤研究实验室, 滨州 256603

作者简介: 李淑兰,女,本科,主管药师;

满玉清,男,副主任药师,责任作者, E-mail: myq388_md@163.com

化处理后再进行分组及药物处理。

1.3 MTT 法检测 Cur 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用 取生长处于对数期的 SGC-7901 细胞,按照 1.0×10^5 /ml 浓度接种于 12 孔培养板中。将细胞分为 4 组,分别为对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ Cur)、10 $\mu\text{mol/L}$ Cur 处理组、20 $\mu\text{mol/L}$ Cur 处理组、40 $\mu\text{mol/L}$ Cur 处理组,每组设置 3 个平行复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度的培养箱中培养 72 h,分别在 24、48、72 h 取样,按 MTT 法操作处理后测量各孔细胞在 490 nm 处的吸光度 (OD); 计算各组细胞在不同时间点的增殖抑制率,抑制率 (%) = $(1 - \text{药物组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。以时间点为横坐标,以抑制率为纵坐标,绘制各组细胞的增殖抑制率变化统计图并分析。

1.4 Hoechst 33258 荧光染色观察 SGC-7901 细胞凋亡状况 采用 Hoechst 33258 荧光染色的方法检测细胞凋亡状况: 取生长处于对数期的 SGC-7901 细胞,按照 1.0×10^5 /ml 浓度接种于 24 孔培养板中。将细胞按上述 1.3 操作分为 4 组。药物与细胞共孵育 48 h 后,收集各组细胞,按 Hoechst 33258 染色试剂盒操作,依次经过固定、洗涤、制片、染色、去染及淬灭后于荧光显微镜下观察细胞核形态并拍照。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染检测 SGC-7901 细胞凋亡水平 取生长处于对数期的 SGC-7901 细胞,按照 1.0×10^5 /ml 浓度接种于 24 孔培养板中。将细胞按上述 1.3 操作分为 4 组,共培养 48 h 后,根据 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒操作检测各组细胞凋亡率: 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集细胞; 加入 1 ml 预冷的 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,1 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,弃上清液,重复 2 次; 将细胞重悬于 200 μl 的结合缓冲液; 加入 10 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI,轻轻混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min; 加入 300 μl 结合缓冲液,随即进行流式细胞仪检测; 使用 CXP 分析软件进行分析并记录结果。总凋亡率 = (第二象限 B2 细胞占比 + 第四象限 B4 细胞占比)。

1.6 PI 单染检测 SGC-7901 细胞周期变化 按上述 1.3 操作对各组细胞进行分组及对应处理。然后根据 PI 细胞周期流式检测试剂盒说明书进行操作: 收集培养 48 h 后的各组细胞,分别用胰蛋白酶进行消化处理; 用 $1 \times \text{PBS}$ 溶液浸洗 2 次,移至 1.5 ml 离心管中; 加入冰冷 70% 乙醇 3 ml 固定细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h; 用冷 PBS 清洗细胞 2 次,1 000 r/min 离心 5

min,弃上清液; 加入 1 ml PI 染液 (含核糖核酸酶),轻轻震荡混匀,室温下避光放置 30 min; 用流式细胞仪进行上机检测; 使用 CXP 分析软件进行分析并记录结果。

1.7 Western bolt 检测 SGC-7901 细胞中 PI3K/p53 信号通路相关蛋白的表达 收集培养 48 h 后的各组细胞,采用全蛋白提取试剂盒进行蛋白提取; 用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度; 取 20 μg 蛋白和 4 μl $2 \times \text{SDS}$ 缓冲液混合均匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min; 上样,SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转至 PVDF 膜上; 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; PBS 洗膜; PBS 洗膜后分别加入一抗 (PI3K, 1 : 1 000; p-Akt, 1 : 1 000; Akt, 1 : 2 000; p53, 1 : 1 000; p21, 1 : 1 000; β -actin, 1 : 1 500), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜; PBS 洗膜; 加入 HRP 标记的 IgG 二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 0.5 h; PBS 洗膜; 用 ECL 化学发光进行显色。以 β -actin 为内参蛋白,后采用 Quantity One 图像分析软件进行灰度比 (蛋白相对表达水平) 分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,多组间比较选择单因素方差分析,进一步组间两两比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cur 处理对 SGC-7901 细胞增殖的影响 本研究设不同浓度梯度的 Cur (0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组,以 MTT 法检测 SGC-7901 细胞不同时间点 (24、48、72 h) 增殖抑制率。结果显示: 24 h 时各处理组细胞增殖抑制率分别为 (3.70 $\pm$ 1.44)、(9.23 $\pm$ 0.63)、(14.40 $\pm$ 1.14); 48 h 时各处理组细胞增殖抑制率分别为 (9.77 $\pm$ 1.43)、(21.79 $\pm$ 0.76)、(27.40 $\pm$ 0.36); 72 h 时各处理组细胞增殖抑制率分别为 (12.33 $\pm$ 0.87)、(27.42 $\pm$ 1.18)、(34.20 $\pm$ 0.49)。与同时间点 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cur 处理组比较, 20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cur 处理组细胞增殖抑制率均增加 ($F = 37.70$ 、176.73、313.25, $P < 0.01$); 与同时间点 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cur 处理组比较, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cur 处理组细胞增殖抑制率均增加 ($F = 20.32$ 、89.80、56.08; $P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示 Cur 呈一定的剂量依赖性抑制 SGC-7901 细胞的增殖 (图 1)。

2.2 Cur 处理对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 本研究设不同浓度梯度的 Cur (0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组,以 Hoechst 33258 染色法及 Annexin V-FITC/PI

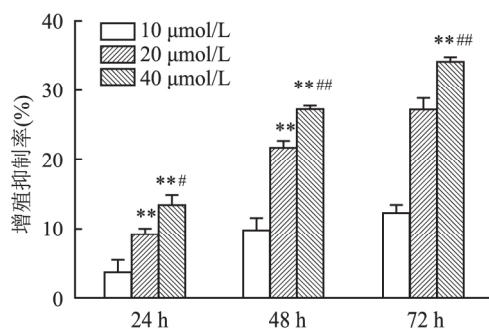


图1 Cur对SGC-7901细胞增殖的影响

与10 μmol/L Cur处理组比较: ** $P < 0.01$; 与20 μmol/L Cur处理组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

双染法检测 SGC-7901 细胞的凋亡状况。Hoechst 33258 染色结果显示(图2): 对照组细胞细胞核轮廓清晰可见, 小核及染色质浓缩现象不突出; 而 Cur 梯度处理组细胞细胞核染色呈亮白色, 蓝色荧光强度降低, 染色质浓缩现象加重, 其中尤以 40 μmol/L Cur 处理组效果最突出。流式细胞术结果显示(图3): 4 组细胞凋亡率依次分别为(4.69% ± 0.85%)、(14.57% ± 1.05%)、(27.52% ± 1.22%) 和 (34.46% ± 1.91%); 与对照组比较, 3 个 Cur 梯度处理组细胞总凋亡率均增加 ($F = 106.05, 468.01, 405.60$, $P < 0.01$); 与 10 μmol/L Cur 处理组比较, 20、40 μmol/L Cur 处理组细胞总凋亡率均上升 ($F = 128.77, 166.69$; $P < 0.01$); 与 20 μmol/L Cur 处理组比较, 40 μmol/L Cur 处理组细胞总凋亡率上升 ($F = 128.78$, $P < 0.05$)。结果提示 Cur 呈剂量依赖性促进 SGC-7901 细胞凋亡。

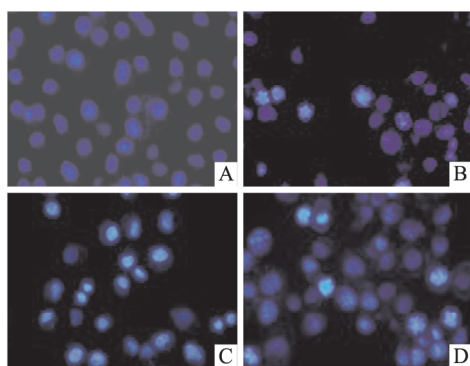


图2 Hoechst 33258 荧光染色 ×400

A: 对照组; B: 10 μmol/L Cur 处理组; C: 20 μmol/L Cur 处理组; D: 40 μmol/L Cur 处理组

2.3 Cur 处理促进 SGC-7901 细胞发生 G_0/G_1 期细胞阻滞 为检测 Cur 对 SGC-7901 细胞周期的影响, 本研究设不同浓度梯度的 Cur (0、10、20、40 μmol/L) 处理组, 以 PI 单染法检测 SGC-7901 细胞

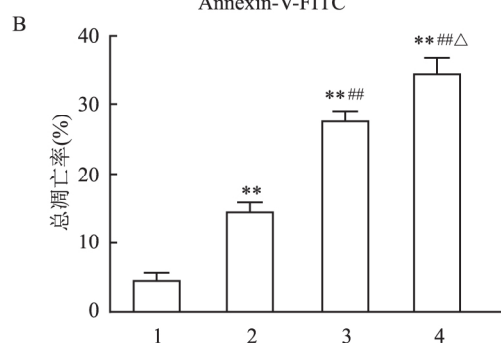
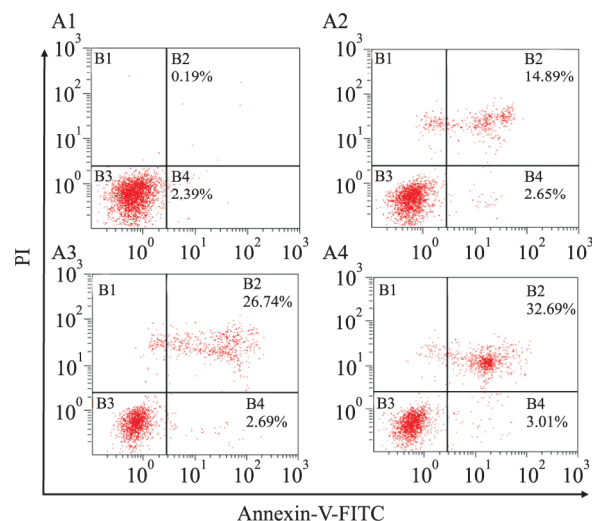


图3 Cur对SGC-7901细胞凋亡的影响

A: 流式细胞术检测细胞凋亡; B: 各组细胞凋亡率统计分析; 1: 对照组; 2: 10 μmol/L Cur 处理组; 3: 20 μmol/L 的 Cur 处理组; 4: 40 μmol/L Cur 处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 10 μmol/L Cur 处理组比较: # $P < 0.05$; 与 20 μmol/L Cur 处理组比较: △ $P < 0.05$

的周期变化。结果显示(图4): 4 组细胞 G_0/G_1 期细胞占比依次分别为 (32.93% ± 1.16%)、(42.49% ± 1.07%)、(57.12% ± 1.41%) 和 (69.24% ± 2.28%); 与对照组比较, 3 个 Cur 梯度处理组细胞 G_0/G_1 期细胞占比均增加 ($F = 73.47, 349.87, 403.83$, $P < 0.01$); 与 10 μmol/L Cur 处理组比较, 20、40 μmol/L Cur 处理组细胞 G_0/G_1 期细胞占比均上升 ($F = 135.92, 225.97$, $P < 0.01$); 与 20 μmol/L Cur 处理组比较, 40 μmol/L Cur 处理组细胞 G_0/G_1 期细胞占比同样上升 ($F = 40.90$, $P < 0.01$)。结果提示 Cur 呈剂量依赖性影响细胞周期进程, 主要表现为 G_0/G_1 期细胞阻滞。

2.4 Cur 处理对 SGC-7901 细胞 PI3K/p53 信号通路的影响 为探究 Cur 对 SGC-7901 细胞增殖、凋亡和周期影响的分子机制, 本研究采用 Western blot 检测了 PI3K/p53 信号通路相关蛋白的表达。结果显示(图5) 4 组各指标蛋白相对表达量分别为 [PI3K:

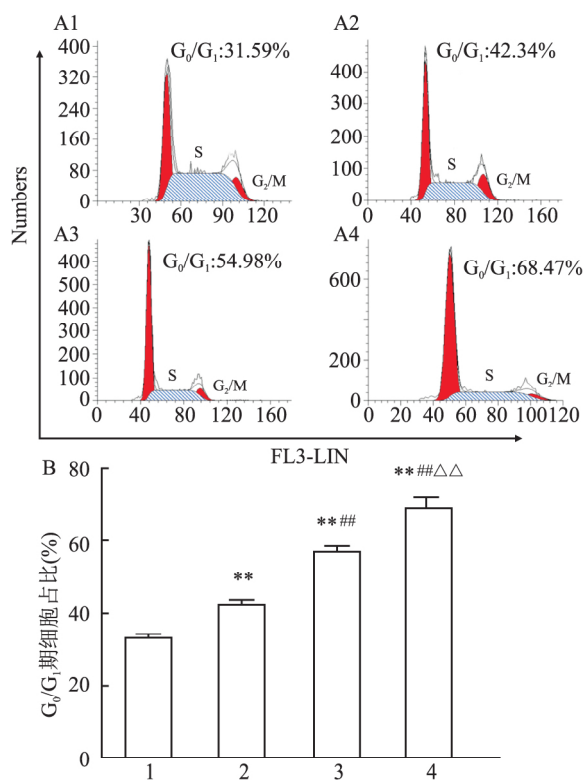


图4 Cur对SGC-7901细胞周期的影响

A: 流式细胞术检测细胞周期; B: 各组细胞 G₀/G₁ 期细胞占比统计分析; 1: 对照组; 2: 10 μmol/L Cur 处理组; 3: 20 μmol/L Cur 处理组; 4: 40 μmol/L Cur 处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 10 μmol/L Cur 处理组比较: ## $P < 0.01$; 与 20 μmol/L Cur 处理组比较: △△ $P < 0.01$

(0.41 ± 0.01)、(0.32 ± 0.01)、(0.25 ± 0.01)、(0.19 ± 0.01); p-Akt/Akt: (0.85 ± 0.01)、(0.73 ± 0.02)、(0.54 ± 0.02)、(0.32 ± 0.01); p53: (0.23 ± 0.02)、(0.29 ± 0.01)、(0.37 ± 0.02)、(0.57 ± 0.01); p21: (0.24 ± 0.02)、(0.32 ± 0.01)、(0.36 ± 0.01)、(0.49 ± 0.02)。与对照组比较 3 个 Cur 梯度处理组细胞 PI3K 蛋白表达量、p-Akt 水平均降低 ($F = 132.95, 358.94$, $P < 0.01$), 而 p21 和 p53 蛋白表达量均升高 ($F = 119.88, 243.38$; $P < 0.01$); 与 10 μmol/L Cur 处理组比较 20、40 μmol/L Cur 处理组细胞 PI3K 蛋白表达量、p-Akt 水平均降低 ($F = 70.65, 234.06$, $P < 0.01$), 而 p21 和 p53 蛋白表达量均升高 ($F = 81.15, 217.42$; $P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 20 μmol/L Cur 处理组比较 40 μmol/L Cur 处理组细胞 PI3K 蛋白表达量、p-Akt 水平均降低 ($F = 36.10, 124.27$, $P < 0.01$), 而 p21 和 p53 蛋白表达量均升高 ($F = 84.05, 195.84$, $P < 0.01$)。提示 Cur 呈剂量依赖性抑制 PI3K 信号通路的活化, 同时激活 p53。

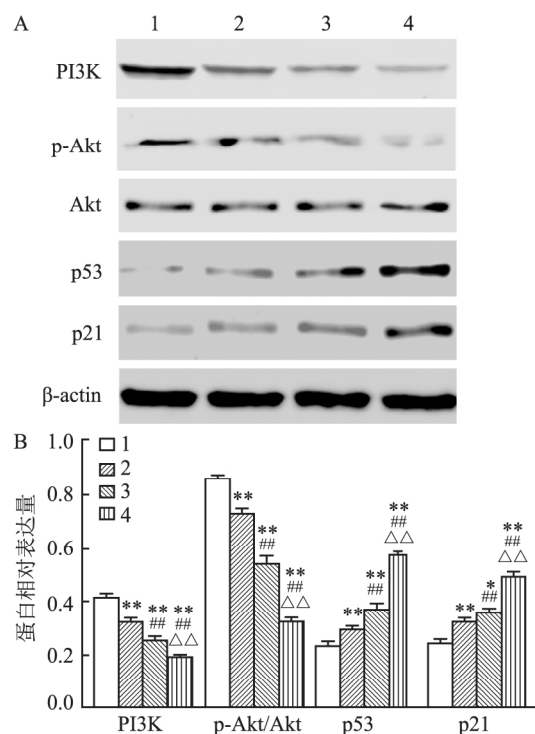


图5 Cur对SGC-7901细胞PI3K/p53信号通路的影响

A: Western blot 检测结果; B: 各指标蛋白相对表达量统计分析; 1: 对照组; 2: 10 μmol/L Cur 处理组; 3: 20 μmol/L Cur 处理组; 4: 40 μmol/L Cur 处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 10 μmol/L Cur 处理组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 20 μmol/L Cur 处理组比较: △△ $P < 0.01$

3 讨论

本实验研究了 Cur 对 GC 细胞 SGC-7901 增殖、凋亡和周期的影响, 同时还探讨了 Cur 的作用机制与 PI3K/p53 通路的关系。结果表明 Cur 能抑制 SGC-7901 细胞的增殖效应, 通过诱导细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞进而促进其凋亡进程。

本研究中的 Cur 是一种天然植物化学物质, 能够抑制 GC 细胞中 PI3K 通路, 激活 p53, 从而诱导凋亡。已有研究^[6]证实 PI3K 是 GC 的致癌基因, p53 是 GC 的抑癌基因, 这在一定程度上支持了本研究结果的可信性。有研究^[7]表明, Cur 可以通过多种生物学过程抑制 GC, 包括肿瘤发生、周期、增殖、凋亡以及侵袭调控等。在本研究中, MTT 结果显示 Cur 呈剂量依赖性的抑制 GC 细胞 SGC-7901 增殖, Hoechst 33258 荧光染色结果显示癌细胞核染色质固缩严重, 且亮蓝色荧光强度随 Cur 浓度的增加而逐渐减弱。随后的流式细胞凋亡检测结果进一步证实了 Cur 对 SGC-7901 细胞的促凋亡作用与其对细胞的周期调控密切相关, 主要表现为促使细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞。

目前, Cur 对 GC 细胞的分子机制的研究较多。Sun et al^[8]证实, Cur 可通过上调胃肿瘤细胞 miR-33b 水平进而抑制肿瘤细胞生长, 诱导凋亡。同时, Cur 可以下调 NF- κ B 信号通路和激活 Ras/ERK 信号通路增强人类 GC 细胞的药物敏感性^[9]。此外, Cur 还能通过调控 NF- κ B/VEGF 信号通路抑制间充质干细胞介导的血管生成进而抑制 GC 发生^[10]。Cur 类似物 CH-5 同样能抑制人 GC 细胞株 HGC-27 的增殖、迁移和侵袭, 其机制被证实与下调基质金属蛋白酶 2 的表达和胶原酶活性有关^[11]。该研究中, 对于 Cur 作用机制的研究针对的是 PI3K/p53 通路。肿瘤抑制蛋白 p53 能够通过调控包括细胞周期阻滞、细胞凋亡和 DNA 修复等在内的微观机制抑制癌细胞生长^[12]。譬如, p53 可抑制人类结直肠癌、肺癌、卵巢癌和 GC 的细胞增殖、迁移和侵袭。相反, PI3K 在乳腺癌、子宫内膜癌、肺癌及 GC 等多种癌症中扮演着癌症促进作用, 而 p53 是其下游负调控靶基因。PI3K 信号通路是细胞内信号通路的重要协调因子, 可以调节多种信号通路, 包括细胞增殖、迁移和代谢等^[13]。Xu et al^[14]证实, Cur 通过下调 PI3K 信号通路抑制甲状腺癌细胞的侵袭。在食管癌相关研究^[15]中, Cur 被证明通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有效抑制食管癌细胞 Ec-9706 的增殖过程。该研究中通过 Western blot 检测在 Cur 的处理下, SGC-7901 细胞 PI3K/p53 通路相关蛋白的表达变化情况。结果显示随着 Cur 浓度的增加, GC 细胞中 PI3K 蛋白以及 p-Akt 水平逐渐下调。然而, p53 及相关蛋白 p21 表达增加, 表明 Cur 是通过抑制 PI3K 信号通路的活化进而促进 p53 的激活。

参考文献

- [1] Choi Y J, Kim N. Gastric cancer and family history[J]. *Korean J Intern Med* 2016, 31(6): 1042–53.
- [2] Turkmen E, Erdogan B, Kodaz H, et al. Post progression survival analysis of metastatic gastric and gastroesophageal junction cancer patients after second-line treatment[J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2016, 79(2): 211–5.
- [3] 胡乃霞, 石岩, 徐诚等. 姜黄素对放射性脑损伤大鼠行为学与血脑屏障保护作用的研究[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(10): 56–60.
- [4] Kumar A, Sirohi V K, Anum F, et al. Enhanced apoptosis, survivin down-regulation and assisted immunochemotherapy by curcumin loaded amphiphilic mixed micelles for subjugating endometrial cancer[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(6): 1953–63.
- [5] Zou P, Xia Y, Chen T, et al. Selective killing of gastric cancer cells by a small molecule targeting ROS-mediated ER stress activation[J]. *Mol Carcinogen*, 2016, 55(6): 1073–86.
- [6] Li C, Zhang J, Wu H, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 facilitates metastasis of gastric cancer through driving epithelial-mesenchymal transition and PI3K/Akt/GSK3 β activation[J]. *Sci Rep* 2017, 7(1): 45275–86.
- [7] 黄果, 王佑权, 刘国文, 等. 姜黄素诱导胃癌细胞 SGC-7901 凋亡机制[J]. *中国公共卫生*, 2017, 33(7): 1082–5.
- [8] Sun Q, Zhang W, Guo Y, et al. Curcumin inhibits cell growth and induces cell apoptosis through upregulation of miR-33b in gastric cancer[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(10): 13177–84.
- [9] Cao A L, Tang Q F, Zhou W C, et al. Ras/ERK signaling pathway is involved in curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(1): 56–63.
- [10] Huang F, Yao Y, Wu J, et al. Curcumin inhibits gastric cancer-derived mesenchymal stem cells mediated angiogenesis by regulating NF- κ B/VEGF signaling[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5538–47.
- [11] Silva G, Teixeira L F, Seba V, et al. Curcumin analog CH-5 suppresses the proliferation, migration, and invasion of the human gastric cancer cell line HGC-27[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 279.
- [12] Zhang P, Zuo Z, Wu A, et al. MiR-600 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting p53 in mutant p53-expressing human colorectal cancer cell lines[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1789–96.
- [13] Fruman D A, Chin H, Hopkins B D, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605–35.
- [14] Xu X B, Qin J, Liu W Y. Curcumin inhibits the invasion of thyroid cancer cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Gene*, 2014, 546(2): 226–32.
- [15] 涂启敏, 黄宏灵. PI3K/AKT/mTOR 在姜黄素抑制食管癌细胞增殖中的作用[J]. *解剖学研究*, 2018, 40(3): 174–7.

Curcumin regulates the proliferation, apoptosis and cycle of human gastric cancer cell SGC-7901 via the PI3K/p53 signaling pathways

Li Shulan¹, He Qianqian¹, Gong Kaikai², et al

(¹Dept of Pharmacy, ²Laboratory of Cancer Reserch Affiliated Hospital of Binzhou Medical College Binzhou 256603)

Abstract Objective To investigate the effect of Curcumin (Cur) on the proliferation, apoptosis and cycle of human gastric cancer cell line SGC-7901 and its molecular mechanism. **Methods** SGC-7901 cells were treated with

网络出版时间: 2020-12-14 14:17 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201211.1421.002.html>

外源性 Apelin-13 通过调控 VEGF/PI3K/Akt 信号通路促进大鼠股骨骨折愈合

曾昭池 汤 勇 张先慧 朱志勇 吴开元 袁永端

摘要 目的 探讨 Apelin-13 调控 VEGF/PI3K/Akt 信号通路对大鼠股骨骨折愈合的影响。方法 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组 (sham 组)、模型组 (Model 组)、Apelin-13 低剂量组 [Apelin-13 L 组, 25 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] 和 Apelin-13 高剂量组 [Apelin-13 H 组, 75 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] , 每组 10 只。建立大鼠股骨骨折模型, 立即给予相应药物处理, 治疗 4 周。采用 Micro CT 和 X 射线分别检测各组大鼠股骨显微参数和骨痂直径; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察骨组织病理变化; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测血清中成骨标记物骨源性碱性磷酸酶 (BALP)、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP) 和破骨标记物抗酒石酸酸性磷酸酶-5b (TRACP-5b)、I 型胶原 C 端肽 (CTX) 表达水平; qRT-PCR 检测骨痂组织中血管内皮生长因子 A (VEGFA) mRNA 表达水平; Western blot 检测骨痂组织中 VEGF/PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平。结果 与 sham 组比较, Model 组大鼠股骨病理损伤较严重, 股骨骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数和 X 射线评分均降低, 血清中 BALP 和 PINP 水平降低, 而 TRACP-5b、CTX 含量均增加, 骨痂组织中 VEGFA mRNA 以及 VEGFA、VEGFR2、

PI3K p85、p-Akt 等蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Model 组比较, Apelin-13 H 组大鼠股骨病理损伤改善明显, 股骨骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数、X 射线评分和骨痂直径均增加, 血清中 BALP 和 PINP 含量增加, TRACP-5b 和 CTX 含量减少, 骨痂组织中 VEGFA mRNA 以及 VEGFA、VEGFR2、PI3K p85、p-Akt 蛋白表达水平增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 Apelin-13 L 组与 Model 组比较, 相关指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 外源性 Apelin-13 可促进大鼠股骨骨折愈合, 其机制可能与 VEGF/PI3K/Akt 信号通路的激活有关。

关键词 Apelin-13; 股骨骨折; 血管新生; VEGF/PI3K/Akt 信号通路

中图分类号 R 683

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0048-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.010

骨折是最常见的外科损伤, 促进骨再生、骨质生成和钙化在骨缺损修复中十分重要^[1]。Apelin 是血管紧张素 II 1 型受体相关蛋白 (APJ) 的内源性配体, 可介导血管生成和血管形成^[2], Apelin-13 是其中研究最为广泛的一类 Apelin。有研究^[3]表明, Apelin-13 可参与调节糖尿病、肥胖、高血压、心血管等疾病的病理生理过程, 但目前有关 Apelin-13 促进

2020-07-16 接收

基金项目: 湖南省卫健委科研计划项目 (编号: C2015-29)

作者单位: 解放军联勤保障部队第九二二医院骨科, 衡阳 421002

作者简介: 曾昭池, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: shushu0508@163.com

different concentration of Cur (0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$). 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the changes in cell proliferation at different time points (24, 48, 72 h). Hoechst 33258 fluorescence staining was used to observe cell status of apoptosis. Flow cytometry was used to detect apoptosis and cell cycle. However, the changes of related protein expression in PI3K/p53 signaling pathway were detected by Western blot. **Results** MTT results showed that the proliferation of SGC-7901 cells was inhibited by Cur in concentration-dependent manners. The results of cell fluorescence staining showed that Cur could promote the apoptosis of SGC-7901 cells, and the bright blue fluorescence intensity of cells reduced. The results of flow cytometry showed that compared with the control group, the apoptosis rate increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and G_0/G_1 phase cell was blocked in the group with different concentrations of Cur groups ($P < 0.05$). Western blot results showed that the protein level of PI3K and the phosphorylation level of Akt in cells of different concentrations reduced compared with the control group ($P < 0.01$), but the expression levels of p21 and p53 increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Cur inhibits the proliferation of SGC-7901 cell, induce G_0/G_1 phase arrest and promote apoptosis, which may be closely related to the regulation of PI3K/p53 signaling pathways.

Key words curcumin; human gastric cancer cell; proliferation; apoptosis; PI3K/p53 signaling pathway; cell cycle