

MAPK 信号通路参与褪黑素对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制作用

周巧云¹ 桂淑玉¹ 周 青² 陈飞虎³ 汪 渊²

摘要 目的 探讨褪黑素(Mel)对人肺腺癌A549细胞增殖的影响及其作用机制。方法 以人肺腺癌细胞株A549为研究对象,分别用不同浓度的Mel处理A549细胞,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测Mel对A549细胞增殖的影响;光学显微镜下观察A549细胞形态学变化;Western blot分析细胞MAPK信号通路相关蛋白及骨桥蛋白(OPN)表达的变化。结果 Mel对A549细胞有明显的增殖抑制作用,并呈浓度和时间依赖性;高浓度(2.0 mmol/L)Mel处理组A549细胞数量减少,形态由梭形变成不规则形,细胞间间隙明显增大,成单层生长;Western blot检测显示2.0 mmol/L浓度的Mel能显著抑制JNK、p38的磷酸化,而使ERK磷酸化水平增加;同时,该浓度的Mel能明显抑制OPN蛋白的表达。结论 Mel能够呈浓度、时间依赖性抑制A549细胞的增殖,调节MAPK信号通路磷酸化水平和抑制OPN的表达可能为其作用路径之一。

关键词 褪黑素;人肺腺癌A549细胞;细胞增殖;信号转导;骨桥蛋白

中图分类号 R 734.2; R 345; R 979.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0186-05

肺癌是严重危害人类健康最常见的恶性肿瘤,其发病率逐年上升,是死亡率第一的恶性肿瘤,且手术治疗、放疗、化疗等治疗效果均不佳,5年生存率低(约16%)^[1]。因此,低毒、高效的抗肿瘤药物仍是研究的热点。褪黑素(melatonin,Mel)是由松果体分泌的一种生物活性物质,已经发现在抗氧化、调节生物节律、抗炎、镇痛、镇静、免疫调节、抗衰老、抗氧化等方面都发挥重要作用^[2-3]。有研究^[4-6]表明,Mel能有效抑制乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等多

2013-08-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272399);安徽省自然科学基金(编号:90413116)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院呼吸内科,合肥 230022

²安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学教研室,安徽省基因研究重点实验室,合肥 230032

³安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:周巧云,女,硕士研究生;

桂淑玉,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: guishuyu@126.com;

汪 渊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wangyuan@ahmu.edu.cn

种肿瘤的增殖,与常规抗肿瘤药物联合应用具有增强疗效、减少抗肿瘤药物的用量和减少不良反应等作用^[7]。但Mel抗肿瘤的作用机制和路径复杂,至今尚未完全清楚。该研究主要观察Mel作用下肺腺癌细胞系A549的细胞增殖情况及其过程中骨桥蛋白(osteopontin,OPN)的表达,探讨Mel抗肿瘤可能的作用机制,为Mel在肿瘤防治方面提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人肺腺癌A549细胞购于美国ATCC公司,在37℃、5%CO₂条件下,用含10%小牛血清的DMEM培养基培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2 主要试剂 Mel由安徽医科大学临床药理研究所提供,用二甲基亚砜(DMSO)配制成浓度为1g/L,分装后-20℃避光保存;DMEM购于Gibco公司;小牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于Sigma公司;DMSO溶解配制浓度为5g/L,分装后置-20℃避光保存;鼠抗人β-actin、OPN、JNK、pJNK、兔抗人p38和pp38、羊抗人pERK、兔抗人ERK均购于美国Santa Cruz公司;羊抗鼠、兔抗羊、羊抗兔IgG-HRP、ECL显色试剂盒以及BCA定量试剂盒均购于Pierce公司。

1.3 细胞增殖实验 采用MTT法。选取对数生长期细胞,以 1.5×10^7 /L细胞浓度种子于96孔培养板,200μl/孔,待贴壁,次日弃去原液加入含有Mel的培养液,按其浓度分为8组: Mel(0.1、0.5、0.75、1.0、2.5、5.0 mmol/L)组、细胞对照组及溶剂对照组(1‰ DMSO),孵育3d后每孔加入20μl MTT(5g/L),37℃温育4h,小心弃去原液,每孔加入100μl DMSO溶解结晶物,振荡10min,于570nm测定吸光度(optical density,OD)值。每浓度设6个复孔,每组取4次实验的平均值,根据各组中各孔OD平均值,按照如下公式计算细胞生长的抑制率:抑制率(%) = (对照组OD₅₇₀ - 实验组OD₅₇₀) / 对照组OD₅₇₀ × 100%,分析量效关系。通过软件计算药物的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值。取浓度为0.1、0.75、2.5 mmol/L Mel分别处理

A549 细胞 1、3、7 d 后分析两者的时效关系 ,方法同上。后续实验选择作用浓度 0.1、2.0 mmol/L ,作用时间为 3 d。

1.4 A549 细胞形态学观察 Mel 作用细胞 3 d 后 ,在 NIKON T300 倒置显微镜(日本 NIKON 公司)下观察细胞形态并拍照 ,设溶剂对照组。

1.5 Western blot 检测蛋白表达 药物处理 3 d 的细胞 ,分 0.1、2.0 mmol/L Mel 处理组及溶剂对照组 ,共 3 组 ,用 PBS 洗涤 3 次 ,加入蛋白提取缓冲液 (Tris-HCl ,pH 7.14; 150 mmol/L NaCl ,1 mmol/L EDTA ,1% Triton ,0.1% SDS ,5 mg/L Leupeptin ,1 mmol/L PMSF) 200 μl/瓶 ,冰上放置 30 min ,在冰上刮下细胞 移入 1.5 ml EP 管 ,反复冻融 3 次 ,在高速冷冻离心机中 14 000 r/min 离心 20 min ,将上清液吸入另一 1.5 ml EP 管中 ,用 BCA 试剂盒对不同的细胞裂解产物定量其总蛋白浓度 ,调整后加入 4 ×蛋白上样缓冲液 ,煮沸 5 min ,分装后于 -80 °C 冰箱保存待用。取约 20 μg 蛋白行 SDS-PAGE 电泳 ,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后 加一抗 4 °C 摆床过夜 ,PBS 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 ,用 ECL 发光试剂盒检测 ,X 线片自显影显示结果 ,以 Image Pro 4.5 图像分析软件进行灰度扫描 ,分析各条带的灰度值 ,以 β-actin 作为内参照 ,分别以 JNK、pJNK、p38、pp38、ERK、pERK、OPN 和 β-actin 进行灰度比值计算作半定量分析。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。MTT 实验各组均数资料比较采用单因素方差分析 ,Western blot 结果经过 Image Pro 4.5 分析软件测定各个条带的灰度值 ,与 β-actin 灰度值的比值作为各蛋白的相对含量 ,蛋白相对含量的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 Mel 对 A549 细胞增殖的影响 MTT 结果表明: Mel 能抑制 A549 细胞在体外增殖 ,不同浓度的 Mel 作用于细胞 3 d ,随着 Mel 浓度的增高 ,抑制率有逐渐上升的趋势 ,与溶剂对照组比较差异有统计学意义 ($F = 179.791 ,P < 0.05$) ,呈浓度依赖性 ,见表 1。随后选取 0.1、0.75、2.5 mmol/L Mel 分别作用于细胞 1、3、7 d 后发现 ,Mel 作用细胞 3 d 与 1 d 组抑制率比较 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ; Mel 作用细胞 7 d 与 3 d 组比较 ,抑制率明显上升 ($P < 0.05$) ,呈时间依赖性 ,见表 2。

表 1 不同浓度 Mel 对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD ₅₇₀	抑制率(%)	IC ₅₀ (mmol/L)
溶剂对照	0.67 ± 0.04	-	
Mel(mmol / L)			
0.1	0.55 ± 0.05	17.50*	
0.5	0.51 ± 0.02	23.53*	1.864
0.75	0.47 ± 0.02	29.00*	
1.0	0.41 ± 0.03	38.78*	
2.5	0.18 ± 0.02	72.99*	
5.0	0.10 ± 0.01	84.15*	

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

表 2 不同处理时间对 A549 细胞增殖的影响

组别	时间 (d)	OD ₅₇₀	抑制率(%)	F 值
溶剂对照	1	0.73 ± 0.03	-	
	3	0.68 ± 0.03	-	
	7	0.78 ± 0.01	-	
Mel 0.1 mmol / L	1	0.72 ± 0.04	2.25	17.471
	3	0.55 ± 0.05	17.50*	
	7	0.64 ± 0.02	18.37* #	
Mel 0.75 mmol / L	1	0.60 ± 0.03	18.62	24.955
	3	0.47 ± 0.03	29.00*	
	7	0.52 ± 0.01	33.23* #	
Mel 2.5 mmol / L	1	0.43 ± 0.05	40.83	194.068
	3	0.18 ± 0.02	72.99*	
	7	0.14 ± 0.01	82.75*	

与 Mel 同一浓度 1 d 组比较: * $P < 0.05$; 与 Mel 同一浓度 3 d 组比较: # $P < 0.05$

2.2 Mel 对 A549 细胞形态学的影响 从图 1 可以看出 ,用 0.1 mmol/L 或 2.0 mmol/L Mel 作用于 A549 细胞 3 d 后 ,溶剂对照组细胞生长速度快 ,不随时间的延长而发生形态改变 细胞贴壁紧 ,呈现恶性肿瘤细胞无序、堆积的生长特点。Mel 0.1 mmol / L 处理组较对照组细胞变狭长 ,细胞间间隙稍有增大。Mel 2.0 mmol/L 处理组细胞数目明显减少 ,生长速度变慢 ,由梭形变成不规则形 ,细胞间间隙更大 ,成单层生长。

2.3 Mel 对 A549 细胞内 pJNK、pp38、pERK 蛋白表达的影响 从图 2 可以看出 0.1 mmol/L Mel 处理组上述信号通路蛋白的表达无明显变化; 而 2.0 mmol/L Mel 处理组 JNK、p38 的磷酸化水平及 OPN 蛋白的表达明显下降 ,ERK 磷酸化的表达增加 ,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,但 JNK、p38、ERK 的表达两组未见明显差异。

2.4 Mel 对 A549 细胞内 OPN 蛋白表达的影响 从图 3 可以看出 0.1 mmol/L Mel 处理组 OPN 蛋白的表达无明显变化 ,而 2.0 mmol/L Mel 处理组 OPN 蛋白表达明显下降 ,与对照组比较 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 。

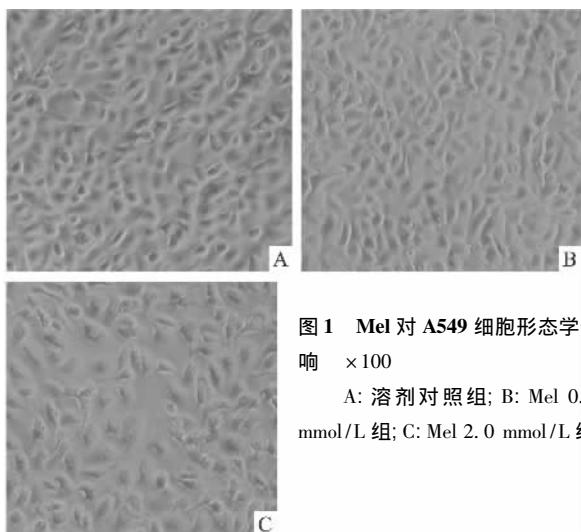


图1 Mel对A549细胞形态学影响 $\times 100$
A: 溶剂对照组; B: Mel 0.1 mmol/L 组; C: Mel 2.0 mmol/L 组

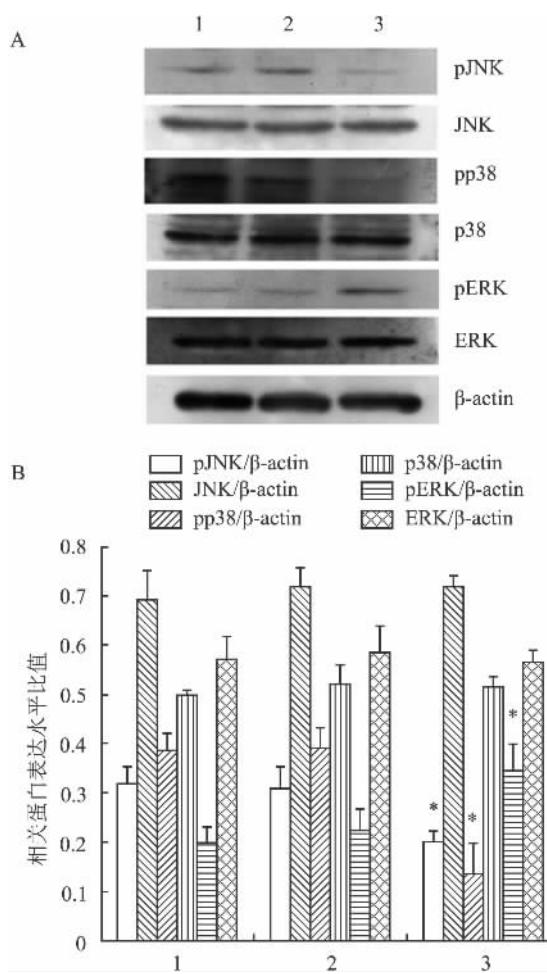


图2 Mel对A549细胞内MAPK信号通路蛋白表达的影响
1: 溶剂对照组; 2: Mel 0.1 mmol/L 组; 3: Mel 2.0 mmol/L 组;
A: Western blot结果; B: 灰度扫描及分析图; 与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

Mel以色氨酸为原料, 经过羟化、脱羧及N-乙酰转移酶等的催化后而最终形成, 迅速进入血液循环,

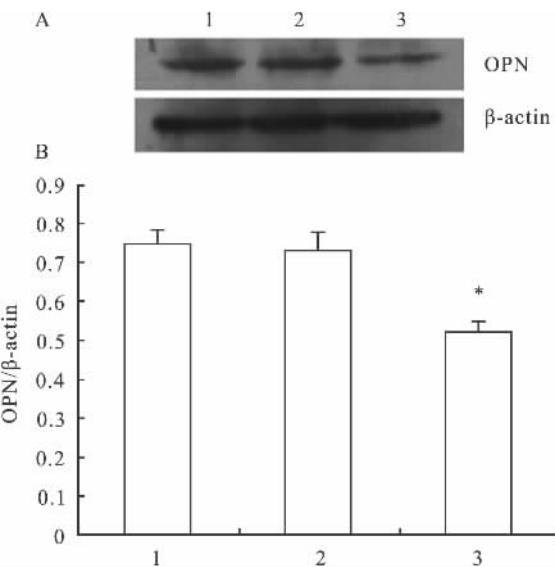


图3 Mel对A549细胞内OPN蛋白表达的影响

1: 溶剂对照组; 2: Mel 0.1 mmol/L 组; 3: Mel 2.0 mmol/L 组;
A: Western blot结果; B: 灰度扫描及分析图; 与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

分布到全身各部位发挥生理活性。现已证实,Mel除了可保证正常生物节律、调节内分泌腺的功能、抗应激和延缓衰老外,与肿瘤的发生、发展及治疗亦有着密切的关系^[8]。

MTT结果显示Mel能明显抑制肺腺癌A549细胞增殖,作用3 d后0.1、0.75、2.5 mmol/L浓度的抑制率分别为29.07%、38.99%、76.79%,2.5 mmol/L作用1、3、7 d以后抑制率最高达到了85.49%。增殖抑制率随着浓度增加和作用时间延长而升高,其增殖抑制呈剂量和时间依赖性。当2.0 mmol/L浓度的Mel处理A549细胞3 d时发现细胞形态发生明显变化:细胞数量明显减少,由梭形变成不规则形,细胞间间隙增宽,平铺呈单层生长。提示Mel有抑制A549细胞增殖的作用。

MAPK信号通路是真核细胞介导细胞外信号到细胞内反应的重要信号转导系统,调节细胞的生长、分化、分裂和死亡,主要有3条MAPK信号通路,即JNK、p38、ERK^[9]。JNK/MAPK途径在细胞分化、凋亡中起着至关重要的作用,与JNK/MAPK途径一样,p38/MAPK途径也介导细胞因子和凋亡的信号转导,ERK/MAPK途径亦是重要的细胞增殖信号转导途径,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡等^[10]。Mel可通过影响细胞信号通路抑制肿瘤细胞的增殖^[11-12],选择性地阻断肿瘤细胞的信号转导,破坏其自控性生长,已成为肿瘤治疗研究的热点^[13]。本研究中,Western blot结果显示:2.0 mmol/L浓度的Mel处理A549细胞3 d后,JNK、p38的磷酸化呈降

低趋势,ERK 磷酸化水平增加,提示 Mel 可能通过抑制 JNK、p38 的磷酸化水平从而抑制肿瘤细胞自控性生长;而 ERK 磷酸化增加可能激活凋亡相关蛋白酶的活性而启动凋亡信号^[14],表明 Mel 可能通过影响 MAPK 信号通路抑制 A549 细胞的增殖。

OPN 是一种磷酸化、带负电荷、具有亲水性的酸性分泌糖蛋白。OPN 与其受体结合后激活下游因子,使肿瘤细胞与细胞外基质相关联,影响细胞生长,改变细胞的信号转导系统,促进细胞骨架的重建,参与肿瘤细胞的增殖和转移^[15]。OPN 通过 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)序列和肿瘤细胞的整合素受体结合后引起聚集黏附激酶(FAK)磷酸化,可通过 MAPK 途径,调节细胞骨架蛋白组装、细胞迁移^[16]。体外实验及动物模型清楚的指出 OPN 在调节肿瘤发生发展进程中起重要作用^[17]。OPN 在肺癌组织和肺癌细胞系中均过度表达^[18~19]。本研究结果显示 A549 细胞中 OPN 呈高表达,Mel 处理后 OPN 表达明显下降,提示 Mel 抑制 A549 细胞增殖可能是通过影响 MAPK 的 3 条通路 JNK、p38、ERK 磷酸化来抑制 OPN 的表达有关。

参考文献

- [1] Siegel R , Naishadham D , Jemal A. Cancer statistics , 2012 [J]. CA Cancer J Clin , 2012 , 62(1) : 10~29.
- [2] Berra B , Rizzo A M. Melatonin: circadian rhythm regulator , chro-nobiotic , antioxidant and beyond [J]. Clin Dermatol , 2009 , 27 (2) : 202~9.
- [3] Cardinali D P , Esquifino A I , Srinivasan V , et al. Melatonin and the immune system in aging [J]. Neuroimmunomodulation , 2008 , 5(4~6) : 272~8.
- [4] Orendas P , Kassayova M , Kajo K , et al. Celecoxib and melatonin in prevention of female rat mammary carcinogenesis [J]. Neoplasma , 2009 , 56(3) : 252~8.
- [5] Tanaka T , Yasui Y , Tanaka M , et al. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats [J]. Chem Biol Interact , 2009 , 177(2) : 128~36.
- [6] Sainz R M , Mayo J C , Tan D X , et al. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via re-ceptor and PKA independent mechanism [J]. Prostate , 2005 , 63 (1) : 29~43.
- [7] 张燕,马天,苏喜改,等.褪黑素的抗肿瘤作用机制和化疗增敏作用研究现状[J].临床合理用药杂志,2011,4(4):156~8.
- [8] Bob P , Fedor-Freybergh P. Melatonin , consciousness , and traumatic stress [J]. J Pineal Res , 2008 , 44(4) : 341~7.
- [9] 杨光,裘正军.信号转导通路与肿瘤侵袭和转移机制的研究与进展[J].现代肿瘤学,2009,17(2):362~4.
- [10] Olson J M , Hallahan E R. P38MAPK kinase: a convergence point in cancer therapy [J]. Trends Mol Med , 2004 , 10(3) : 125~9.
- [11] García-Navarro A , González-Puga C , Escames G , et al. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture [J]. J Pineal Res , 2007 , 43(2) : 195~205.
- [12] Tam C W , Mo C W , Yao K M , et al. Signaling mechanisms of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22Rv1 human prostate cancer cells: implications for prostate cancer chemoprevention [J]. J Pineal Res , 2007 , 42(2) : 191~202.
- [13] AL-Shenbel I F , Shidata H R , Sampalis J , et al. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression colorectal cancer [J]. Cancer , 1993 , 71(6) : 1954~9.
- [14] Nguyen T T , Tran E , Nguyen T H , et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells [J]. Carcinogenesis , 2004 , 25 (5) : 647~59.
- [15] Chakraborty G , Jain S , Kundu G C. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor dependent breast tumor growth angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms [J]. Cancer Res , 2008 , 68(1) : 152~61.
- [16] 陈荣新,叶胜龙.骨桥蛋白相关分子与肿瘤转移的关系[J].国际病理科学与临床杂志,2006,26(3):209~12.
- [17] 陈孝宇,胡超杰,左莉,等.重组 Endocan 转染 MDCK 细胞对其表达骨桥蛋白的影响[J].安徽医科大学学报,2008,43(4):381~4.
- [18] Zhang J , Takahashi F , Takahashi K , et al. Differential osteopontin expression in lung cancer [J]. Cancer Let , 2001 , 171(2) : 215~22.
- [19] Agrawal D , Chen T , Irby R , et al. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression , using pooled sample expression profiling [J]. J Nat Cancer Inst , 2002 , 94(7) : 513~21.

Melatonin inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cell line possibly through MAPK signal pathway

Zhou Qiaoyun¹, Gui Shuyu¹, Zhou Qing², et al

(¹Dept of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Laboratory of Molecular Biology Dept of Biochemistry Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effect of melatonin on the proliferation of human lung adenocarcinoma cells

MicroRNA-21 对胆管癌细胞侵袭与转移的影响

刘振^{1,2}, 黄强¹, 刘臣海¹, 林先盛¹, 谢放^{1,2}, 朱成林^{1,2}, 任维华²

摘要 目的 探讨 microRNA-21 对胆管癌 QBC939 细胞株侵袭转移能力的作用。方法 构建合成无关序列、microRNA-21 mimics 和 microRNA-21 inhibitor 并转染至胆管癌 QBC939 细胞中。实验设自然生长组 (Cell)、转染无关序列组 (Cell-NC)、转染 microRNA-21 mimics 组 (Cell-21M) 及转染 microRNA-21 inhibitor 组 (Cell-21I)。运用实时定量 RT-PCR 检测各组细胞 microRNA-21 的表达; 通过黏附实验检测各组细胞聚集能力的变化; 划痕实验、Transwell 迁移观察细胞迁移能力变化, Transwell 侵袭实验观察细胞侵袭能力变化。结果 与 Cell 组相比, microRNA-21 在 Cell-NC 组表达无明显差异, 在 Cell-21M 组表达增加, 在 Cell-21I 组表达降低。黏附实验显示: 与 Cell 组相比, Cell-NC 组细胞聚集能力无明显变化, Cell-21M 组细胞聚集能力增强, Cell-21I 组细胞聚集能力减弱 ($P < 0.05$); 划痕实验及 Transwell 迁移实验示 Cell-NC 组细胞迁移能力无明显变化, Cell-21M 组细胞迁移能力增强, Cell-21I 细胞聚集能力减弱 ($P < 0.05$); Transwell 侵袭实验示 Cell-NC 组细胞侵袭能力无明显变化, Cell-21M 组细胞侵袭能力增强, Cell-21I 细胞侵袭能力减弱 ($P < 0.05$)。结论 microRNA-21 可增强胆管癌 QBC939 细胞的

侵袭与转移能力 提示 microRNA-21 可能在胆管癌的侵袭转移过程中发挥重要作用。

关键词 胆管癌; microRNA-21; 侵袭; 转移

中图分类号 R 73-37

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)02-0190-04

胆管癌是起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤, 其临床症状表现较晚, 缺乏特异的肿瘤标志分子, 早期诊断较为困难。目前, 根治性切除虽然能使患者获得最佳疗效, 但大部分肿瘤在发现时已发生侵袭转移, 导致手术切除率较低, 且手术复发率高, 预后较差。对于放、化疗不敏感^[1]。因此, 探讨胆管癌的发病、侵袭转移机制, 提高胆管癌的早期诊断对临床治疗有着重要的意义。该课题组前期研究^[2]结果显示胆管癌组织中 microRNA-21 的表达明显高于癌旁组织, 且与胆管癌侵袭转移密切相关。本研究通过调控 microRNA-21 在胆管癌 QBC939 细胞系中的表达, 进一步探讨 microRNA-21 对胆管癌细胞株 QBC939 细胞侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人胆管癌 QBC939 细胞株由实验室自行保存; DMEM-高糖培养基、胎牛血清、青链霉素、PBS 购自 Hyclone 公司; Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司。microRNA-21 mimics 由广州锐博生物科技

2013-08-27 收稿

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1208085mh176)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 普通外科、² 肝胆胰外科安徽省重点实验室, 合肥 230001

作者简介: 刘振男, 硕士研究生;
黄强, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hq-sohu@sohu.com

and its mechanism. **Methods** Regard lung adenocarcinoma cancer cell strains as the research object. The A549 cells were treated with different concentration of melatonin (Mel). The proliferation of A549 cells was observed by MTT assay. The change of cell morphology was observed by light microscope. The expression of MAPK related protein and OPN was analyzed by Western blot. **Results** Mel could inhibit the proliferation of A549 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. Compared with control group, A549 cells in the group treated with Mel became lesser, more irregular, bigger intercellular gap, non-overlapping and monolayer. The Western blot analysis illustrated that 2.0mmol/L Mel could significantly decreased the expression of phosphorylation of JNK, p38 and OPN in A549 cells ($P < 0.05$), and the expression of phosphorylation of ERK was increased ($P < 0.05$), compared with control group. **Conclusion** Mel can inhibit the proliferation of A549 cells in a dose-dependent and time-dependent manner, which may be related to decrease the expression of OPN by regulating the phosphorylation level of MAPK signal pathway.

Key words melatonin; human lung adenocarcinoma A549 cell; cell proliferation; signal transduction; osteopontin