

姜黄挥发油抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖的 Notch 通路机制研究

孙耀辉, 尹瑶, 丁秀敏, 张志英, 彭黎慧

武汉大学中南医院皮肤科, 湖北 武汉 430071

摘要: **目的** 本研究对姜黄挥发油抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖的效果进行研究, 并分析 Notch 通路的参与作用, 为临床治疗和新药研发提供参考。 **方法** 将生长状态良好的皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞随机分为 4 组: 对照组、姜黄挥发油低剂量组 (1 mmol/L)、中剂量组 (10 mmol/L) 和高剂量组 (100 mmol/L) ($n=8$)。除对照组细胞外, 其他各组细胞均采用对应剂量的姜黄挥发油共培养 4 h, 分析各组细胞的增殖抑制率, 采用酶联免疫吸附测定法检测 Notch 通路蛋白的表达变化。 **结果** 低剂量组、中剂量组和高剂量组的细胞增殖抑制率分别为 15.1%、22.9% 和 39.9% ($P<0.05$), 同时, 随着姜黄挥发油剂量的增加, Bax 蛋白的表达明显升高 ($P<0.05$), 而 Bcl2 蛋白的表达明显降低 ($P<0.05$), Notch1 和 Notch2 蛋白的表达也明显降低 ($P<0.05$)。 **结论** 姜黄挥发油能有效抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖, 且可能与其抑制 Notch 通路蛋白的表达有关。

关键词: 姜黄挥发油; 鳞状细胞癌; 增殖; Notch 通路; 抑制率

中图分类号: R739.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)10-1193-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.10.011

Inhibition of turmeric volatile oil on squamous cell carcinoma cell line A431 and the involvement of Notch pathway

SUN Yao-hui, YIN Yao, DING Xiu-min, ZHANG Zhi-ying, PENG Li-hui

Department of Dermatology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China

Abstract: **Objective** The present research aimed to explore the inhibition of turmeric volatile oil on squamous cell carcinoma cell line A431 and the involvement of Notch pathway. **Methods** Squamous cell carcinoma cell lines A431 were divided into 4 groups, control group, turmeric volatile oil at low (1 mmol/L), middle (10 mmol/L) and high dose (100 mmol/L) groups ($n=8$). The inhibition effect on cell proliferation was detected by MTT and the expression of Notch1 and Notch2 were assayed by real time PCR, ELISA and immunohistochemistry. **Results** The inhibition rates were 15.1%, 22.9% and 39.9% at low, middle and high doses, showing significant differences ($P<0.05$). Along with the increase of the dose of turmeric volatile oil, the expression of Bax was significantly increased while the expression of Bcl2, Notch1 and Notch2 was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusions**

Turmeric volatile oil inhibits the proliferation of squamous cell carcinoma cell line A431, which may involve inhibition of the Notch pathway.

Key words: turmeric volatile oil; squamous cell carcinoma; proliferation; Notch pathway; inhibition rate

鳞状细胞癌是多发于表皮及其附属器官的恶性肿瘤, 多见于鳞状上皮覆盖的部位。皮肤鳞状细胞癌是临床上常见的皮肤疾病, 给患者带来沉重的负担, 严重影响患者的生存状态。已有的证据显示皮肤鳞状细胞癌的发病率有逐年升高的趋势, 且由于其在临床和组织病理学上的多样性而容易被误诊^[1-2]。因此, 探

基金项目: 武汉大学 HOPE 护理学院自主科研课题资助项目 (30600023)

作者简介: 孙耀辉 (1976-), 女, 湖北武汉人, 学士, 医师, 研究方向: 皮肤病防治。

索皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及其抑制的相关机制具有重要的临床价值。Notch 信号转导通路是多种恶性肿瘤发生、发展及恶化的重要原因^[3], 也是药物治疗的重要潜在靶点^[4]。但是目前临床上尚无特效的治疗手段。姜黄为姜黄属植物姜黄的干燥根茎, 是常用的活血化瘀中药, 具有破血行气、通经止痛、祛风疗痹等功效, 其主要有效成分为姜黄挥发油和姜黄素^[5]。姜黄挥发油能有效抑制胃癌细胞、急性早幼粒白血病细胞株 HL-60、肝胚细胞癌 HepG2 细胞株及人肺腺癌 A549 细胞增殖及诱导其凋亡^[6-8]。但是目前尚未见到关于姜黄挥发油抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增

殖与 Notch 信号转导通路的相关性报道。本研究对姜黄挥发油抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖的 Notch 通路机制进行研究,为临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂 皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞购自上海细胞研究所;MTT 购自 Sigma 公司;Bax 蛋白检测试剂盒购自 R&D 公司;Bcl2 检测试剂盒购自 Abcam 公司;Notch1 及 Notch2 引物由上海生工合成;Notch1 蛋白检测试剂盒购自 Omega 公司;Notch2 蛋白检测试剂盒购自 Sigma 公司;氯化钠购自国药集团;细胞培养板购自 Costar 公司;其余试剂为市售分析纯。

1.2 细胞分组 将生长状态良好的皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞随机分为 4 组:对照组、姜黄挥发油低剂量组(1 mmol/L)、中剂量组(10 mmol/L)和高剂量组(100 mmol/L)($n=8$)。对照组细胞给予生理盐水共培养 4 h,其他各组细胞均采用对应剂量的姜黄挥发油共培养 4 h。

1.3 细胞增殖抑制实验 接种生长状态良好的皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞 100 μ l(约 10^5)于细胞培养板中培养(控制 5%的 CO_2 浓度、饱和湿度)。待细胞状态生长良好后用加入化合物共培养;然后加入 MTT (200 μ l)继续培养。培养结束后用无菌磷酸缓冲液(PBS)在脱色摇床上冲洗 3 次(每次 10 min),加入二甲亚砜(DMSO),剧烈震荡,溶解。用全波长酶标仪分析细胞培养孔的吸光度,计算细胞的增殖抑制率。增殖抑制率%=(OD_{对照组细胞}-OD_{试验组细胞})/OD_{对照组细胞}。

1.4 Real-time PCR (RT-PCR) 扩增 Notch1 及 Notch2 基因 采用荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)分析 Notch1 及 Notch2 蛋白 mRNA 水平的变化。Real-time PCR 的扩增条件为:95 $^{\circ}C$ 10 min;94 $^{\circ}C$ 15 s,60 $^{\circ}C$ 15 s,72 $^{\circ}C$ 30 s,扩增 33 个循环。反应体系为 20 μ l(模板 2 μ l;上游引物 1.0 μ l;下游引物 1.0 μ l;2.5 \times SYBR Green(TianGen)8 μ l;超纯水 8 μ l)。扩增所用的引物序列: β -actin:5'-GGGAAATCGTGCGTGACAT-3';5'-CAGGAGGAGCAATGATCTT-3';Notch1:5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3';5'-ACAGTTCCACAAAGGCATCC-3';Notch2:5'-GACTCTGGAATATCCCTGGGACAACA-3';5'-AGGTTTGCTGCATCGACATCTG-3'。

1.5 免疫细胞化学测定 Notch1 和 Notch2 在细胞中的定位及表达 将在盖玻片上生长良好细胞进行相应浓度的化合物进行共培养,用于-20 $^{\circ}C$ 状态下的冰丙酮固定 10 min,无菌环境下室温吹干。1% Triton-100

共培养 60 min,增加细胞膜透性,无菌磷酸缓冲液漂洗 3 次;2%胎牛血清白蛋白封闭 1 h,加一抗 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜,无菌磷酸缓冲液漂洗 3 次。将载玻片与 FITC 标记二抗避光 37 $^{\circ}C$ 温孵 1 h,PBS 漂洗 5 次后荧光显微镜拍照。

1.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定 Bax/Bcl2 及 Notch1 和 Notch2 水平 ①建立标准曲线:设标准孔,每个孔中加入样本稀释液 100 μ l,第一个孔加标准品 100 μ l,混匀后用加样器取出 100 μ l 移至第二孔。重复操作至第 7 孔。最后从第 7 孔中吸出 100 μ l 丢弃,使其最终体积为 100 μ l;②加样:待测样本孔每个孔加入待测样本 100 μ l;③将反应板充分混匀后置 37 $^{\circ}C$ 2 h;洗板:用洗涤液将反应板充分洗涤 5 次,倒置于滤纸上印干;④每个孔中加入第一抗体工作液 50 μ l;⑤将反应板置于 37 $^{\circ}C$ 条件下 60 min 洗板:同步骤 4;⑥每个孔中加入酶标抗体工作液 100 μ l;⑦将反应板置于 37 $^{\circ}C$ 条件下 60 min;洗板:同步骤 4;⑧每个孔中加入底物工作液 100 μ l,置于 37 $^{\circ}C$ 暗处条件下反应 5~10 min;⑨每个孔加入终止液 50 μ l,在 450 nm 处测定各孔光吸收值。

1.7 统计分析 应用 SAS 9.1 软件对统计学分析,定量资料采用均数 \pm 标准差进行统计描述,两组数据的组间比较采用 t' 检验(总体方差不齐);多组数据的组间比较采用方差分析(总体方差齐,进一步通过 SNK- q 检验进行多重比较)或 Kruskal-Wallis H 检验(总体方差不齐,进一步通过 Nemenyi 法进行多重比较);检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 姜黄挥发油对 A431 细胞增殖的抑制作用 姜黄挥发油能有效抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖,且低剂量组、中剂量组和高剂量组的抑制率分别为 15.1%、22.9% 和 39.9%,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 姜黄挥发油对 A431 细胞增殖抑制的效果分析

组别	n	抑制率(% $\bar{x}\pm s$)
对照组		
姜黄挥发油低剂量组	8	15.1 \pm 2.31
姜黄挥发油中剂量组	8	22.9 \pm 3.65
姜黄挥发油高剂量组	8	39.9 \pm 2.88
F 值		143.19
P 值		<0.001

2.2 姜黄挥发油对 A431 细胞凋亡蛋白表达的影响 低剂量、中剂量和高剂量的姜黄挥发油处理后 A431

细胞中 Bax 蛋白的表达明显升高而 Bcl2 蛋白的表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 ELISA 法分析姜黄挥发油对 A431 细胞凋亡蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Bax/ β -actin	Bcl2/ β -actin
对照组	8	0.22 \pm 0.06	0.49 \pm 0.12
姜黄挥发油低剂量组	8	0.29 \pm 0.04	0.45 \pm 0.09
姜黄挥发油中剂量组	8	0.33 \pm 0.07	0.36 \pm 0.07
姜黄挥发油高剂量组	8	0.54 \pm 0.11	0.26 \pm 0.05
<i>F</i> 值		27.34	11.20
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.3 姜黄挥发油对 A431 细胞 Notch 通路蛋白基因表达的影响 低剂量、中剂量和高剂量的姜黄挥发油处理后 A431 细胞中 Notch1 和 Notch2 蛋白的表达明显降低,但 Notch1 低剂量组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$),其余各组差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 RT-PCR 姜黄挥发油对 A431 细胞 Notch 通路蛋白基因表达的影响($\Delta Ct, \bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Notch1/ β -actin	Notch2/ β -actin
对照组	8	9.15 \pm 1.22	6.20 \pm 1.41
姜黄挥发油低剂量组	8	8.98 \pm 1.17	5.78 \pm 1.07
姜黄挥发油中剂量组	8	5.44 \pm 1.34	4.19 \pm 1.33
姜黄挥发油高剂量组	8	4.25 \pm 1.06	3.25 \pm 0.98
<i>F</i> 值		34.22	10.34
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.4 姜黄挥发油对 A431 细胞 Notch 通路蛋白表达的影响 低剂量、中剂量和高剂量的姜黄挥发油处理后 A431 细胞中 Notch1 和 Notch2 蛋白的表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 ELISA 法分析姜黄挥发油对 A431 细胞 Notch 通路蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Notch1/ β -actin	Notch2/ β -actin
对照组	8	0.67 \pm 0.12	0.46 \pm 0.10
姜黄挥发油低剂量组	8	0.59 \pm 0.15	0.40 \pm 0.07
姜黄挥发油中剂量组	8	0.47 \pm 0.09	0.32 \pm 0.05
姜黄挥发油高剂量组	8	0.44 \pm 0.06	0.25 \pm 0.03
<i>F</i> 值		7.52	14.73
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.5 免疫细胞化学法分析姜黄挥发油对 A431 细胞 Notch 通路蛋白表达的影响 采用免疫细胞化学法分析姜黄挥发油对 A431 细胞 Notch 通路蛋白表达发现随着姜黄挥发油剂量的增加,Notch1 和 Notch2 蛋白的荧光强度明显降低,见图 1、图 2。

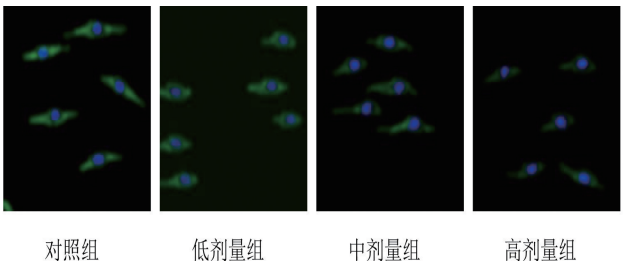


图 1 姜黄挥发油对 A431 细胞 Notch1 蛋白表达的影响(100 \times)

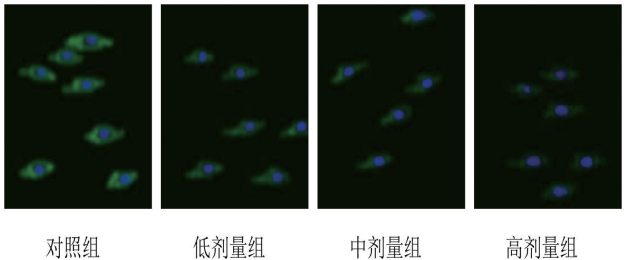


图 2 姜黄挥发油对 A431 细胞 Notch2 蛋白表达的影响(100 \times)

3 讨论

皮肤鳞状细胞癌是临床上比较常见的恶性肿瘤,也是导致死亡的重要原因。但是目前关于皮肤鳞状细胞癌的发病机制尚不明确,临床上也无特效的治疗手段。因此,探索皮肤鳞状细胞癌细胞增殖抑制的相关机制具有重要的时间价值。本项目在对姜黄挥发油抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖的 Notch 通路机制进行研究时发现姜黄挥发油能有效抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖,同时,随着姜黄挥发油剂量的增加,Bax 蛋白的表达明显升高而 Bcl2 蛋白的表达明显降低,Notch1 和 Notch2 蛋白的表达也明显降低。因此,姜黄挥发油能有效抑制皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖,且可能与其抑制 Notch 通路蛋白的表达有关。

Notch 信号转导通路是细胞内最普遍存在的信号转导通路,其状态激活是多种皮肤疾病及恶性肿瘤的共同病理过程^[9]。在分析皮肤鳞状细胞癌组织中 Notch1 和 NF- κ B p65 的表达及意义的研究中发现 Notch1 的低表达和 NF- κ Bp65 的过表达可能与皮肤鳞癌的发生发展密切相关^[10]。Notch1 过表达能引起皮肤鳞癌 SCL-1 细胞的细胞周期静止在 G0/G1 期,Notch1 信号途径可能在皮肤鳞癌的进展中起作用^[11]。在分析寻常型银屑病患者皮损中 miRNA-34a 及其靶基因 Notch1 的表达及意义时也证实 miRNA-34a 在寻常型银屑病皮损组织中的表达高于正常人皮肤组织,其可能通过调控靶基因 Notch1 参与寻常型银屑病的发病机制^[12]。同时,Notch 信号通路参与了恶性肿瘤侵袭、转移等病理过程^[13],且特异性抑制 Notch2 信号

湖南省 2004–2016 年学校突发公共卫生事件流行病学分析

叶金波, 高立冬, 刘富强, 肖洁华, 丁胜非, 岳文芳

湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 了解湖南省学校突发公共卫生事件的流行病学特征, 为科学制定防控措施提供依据。 **方法** 收集湖南省 2004–2016 年报告的学校突发公共卫生事件资料, 应用描述性流行病学方法分析。 **结果** 湖南省 2004–2016 年共报告 1 034 起学校突发公共卫生事件, 主要为一般事件 972 起 (94.00%), 事件类型以传染病疫情为主, 共 954 起 (92.26%), 其中报告疫情最多的是呼吸道传染病, 共 726 起 (76.10%); 2004–2016 年学校突发公共卫生事件每年的发生高峰为 3–6 月 (495 起, 47.87%) 和 9–11 月 (402 起, 38.88%); 报告事件数最多是长沙市, 223 起 (21.57%); 高发学校为乡村中小学 (492 起, 47.58%), 其罹患率最高, 为 5.93% ($\chi^2=5925.62, P<0.001$); 呼吸道传染病的疫苗接种率不高。 **结论** 传染病疫情是学校突发公共卫生事件防控的重点。教育和卫生计生部门应加大对学校卫生的投入, 健全联防联控机制, 学校需加强晨午检、因病缺勤登记和免疫规划等综合防控措施。

关键词: 突发公共卫生事件; 学校; 传染病疫情; 流行病学研究

中图分类号: R181.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006–3110(2017)10–1196–04 DOI:10.3969/j.issn.1006–3110.2017.10.012

Epidemiological analysis on emergency public health events at schools in Hunan Province, 2004–2016

YE Jin-bo, GAO Li-dong, LIU Fu-qiang, XIAO Jie-hua, DING Sheng-fei, YUE Wen-fang

Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Abstract: **Objective** To investigate the epidemiological characteristics of emergency public health events at schools in Hunan

作者简介: 叶金波 (1987–), 男, 硕士, 医师, 研究方向: 卫生应急。

通信作者: 刘富强, E-mail: 88037558@qq.com。

通路, 且抑制 MEK/ERK 通路可进一步增强抑制 Notch2 通路的抗肿瘤增殖效果, 提示 MEK/ERK 和 Notch2 2 条信号通路在胃癌 SGC-7901 细胞中存在交叉作用^[14]。在以后的研究中将进一步探讨 Notch 通路与其他通路的 Crosstalk 在此过程中的作用, 为进一步阐明姜黄挥发油抑制皮肤鳞癌的机制网络提供参考。

参考文献

- [1] 董慧婷, 张永红, 杨蕾, 等. 皮肤鳞状细胞癌 300 例临床及病理回顾分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2011, 7(4): 275–277.
- [2] 刘然, 刘剑锋, 郝欣欣. 皮肤鳞状细胞癌误诊为难治性糖尿病皮肤溃疡 1 例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 8(22): 5365.
- [3] 傅涛, 李佳欢, 蔡逊. Notch 信号通路在胃肠道肿瘤机制研究中的新进展[J]. 肿瘤学杂志, 2015, 6(10): 852–855.
- [4] 石丽芳, 芮红兵. Notch 信号在白血病中的作用机制与靶向治疗[J]. 医学综述, 2011, 6(10): 1475–1478.
- [5] 郑虎占, 董泽宏. 中药现代研究与应用[M]. 第 4 卷. 北京: 学苑出版社, 1998: 34.
- [6] 涂云华, 叶振源, 曹煜, 等. 姜黄挥发油对 THP-1 细胞增殖及凋亡

的影响[J]. 山东大学学报, 2015, 53(5): 46.

- [7] 石雪蓉, 顾健, 谭睿, 等. 姜黄挥发油抗肿瘤作用机制研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(1): 15.
- [8] 王海晶, 杨和平. 姜黄挥发油对人肺腺癌 A549 细胞作用的形态学研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(3): 220.
- [9] 王瑞, 夏永华. 皮肤鳞状细胞癌组织中 Notch1 和 NF- κ B p65 的表达及意义[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2013, 25(1): 16–18, 28.
- [10] 王瑞, 夏永华. 皮肤鳞状细胞癌组织中 Notch1 和 NF- κ B p65 的表达及意义[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2013, 9(1): 16–18.
- [11] 刘冬, 夏永华, 付丹丹, 等. Notch1 信号途径在皮肤鳞癌 SCL-1 细胞中的激活及其对细胞周期的影响[J]. 临床皮肤科杂志, 2010, 9(6): 333–336.
- [12] 陈春丽, 赵宗峰, 刘新梅, 等. 寻常型银屑病患者皮损中 miRNA-34a 及其靶基因 Notch1 的表达及意义[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2015, 13(6): 423–427.
- [13] 李大川, 胡彦华, 吴德全. Notch 信号通路 with 恶性肿瘤侵袭、转移关系的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 22(12): 1531–1534.
- [14] 刘富强, 陈依依, 岳婷婷, 等. 联合抑制 Notch2 和 MEK/ERK 通路对胃癌细胞增殖的影响[J]. 检验医学与临床, 2016, 10(3): 292–294.

收稿日期: 2017–02–04