

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.15.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240603.1058.003\(2024-06-03\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240603.1058.003(2024-06-03))姜黄素抑制 NF- κ B 核易位调控胰腺癌对吉西他滨的敏感性*王艳丽^{1,2}, 戈立秀^{1,2}, 曾昭伟^{1,2}, 王睿³, 张爱民^{1,2,△}

(1. 天津市南开医院检验科, 天津 300100; 2. 天津市中西医结合急腹症研究所, 天津 300100;

3. 天津金域医学检验实验室有限公司, 天津 300100)

[摘要] **目的** 探讨姜黄素调控胰腺癌细胞增强吉西他滨敏感性的机制。**方法** 为验证姜黄素对胰腺癌 PANC1 细胞中 p53 及核因子- κ B(NF- κ B) p65 核易位的影响, 将细胞以 0、10、20、30 μ mol/L 姜黄素处理, 得到空白组、10 μ mol/L 姜黄素组、20 μ mol/L 姜黄素组和 30 μ mol/L 姜黄素组; 采用免疫荧光染色技术在荧光显微镜下确定 NF- κ B p65 细胞内分布情况; Western blot 技术确定细胞内 p53 蛋白的表达水平; 逆转录-实时荧光定量 PCR 技术确定细胞内 p53 mRNA 的表达水平; 联合采用 miRstar 和 JASPAR 软件预测寻找可能受 NF- κ B p65 核转位调控的 microRNA(miRNA); 采用双荧光素酶报告实验分别验证 miRNA 与 p53 的关系。为验证姜黄素是否通过 NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴影响吉西他滨对 PANC1 细胞的敏感性, 以 10 μ mol/L 的吉西他滨处理细胞得到吉西他滨组, 以 20 μ mol/L 姜黄素及 10 μ mol/L 吉西他滨处理细胞得到姜黄素联合吉西他滨组; 经姜黄素(20 μ mol/L)和吉西他滨(10 μ mol/L)联合处理细胞后, 分别将寡核苷酸对照(mimic NC)和 miR-26b-5p 模拟物(mimic)转染至细胞, 得到 mimic NC 和 mimic miR-26b-5p 组; 将 pcDNA3.1 空载质粒和 pcDNA3.1-p53 过表达质粒分别转染至细胞, 得到 pcDNA3.1 组和 p53 组; 采用 MTT 实验检测细胞活力; 采用膜联蛋白-V(Annexin V)/碘化丙啶(PI)双染色流式细胞术测定细胞凋亡水平。**结果** 与空白组比较, 各姜黄素处理组(10、20、30 μ mol/L 姜黄素组)细胞内 p53 mRNA 及蛋白表达水平均升高; 与空白组比较, 20 μ mol/L 姜黄素组细胞核内 NF- κ B p65 表达水平降低; miRstar 和 JASPAR 预测软件找到 8 个 miRNA 可能受 NF- κ B p65 核易位调控, 其中有 3 个具有靶向 p53 基因的潜力, 尤其以 miR-26b-5p 效果最明显。双荧光素酶报告实验验证发现 miR-26b-5p 与 p53 确有相互作用。与 mimic NC 组比较, mimic miR-26b-5p 组 p53 mRNA 和蛋白表达水平均下降; 与吉西他滨组比较, 姜黄素联合吉西他滨组细胞活力降低、细胞凋亡率增加; 与 mimic NC 组比较, mimic miR-26b-5p 组细胞活力升高、细胞凋亡率下降, 且与 pcDNA3.1 组比较, pcDNA3.1-p53 组细胞活力下降、细胞凋亡率升高。**结论** 姜黄素通过抑制 NF- κ B p65 蛋白核转位降低 miR-26b-5p 基因的表达, 进而增加 p53 基因和蛋白的表达, 通过 NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴增强了胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性。

[关键词] 姜黄素; NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴; 胰腺癌; 吉西他滨敏感性**[中图法分类号]** R285**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2024)15-2247-07**Curcumin regulates sensitivity of pancreatic cancer to gemcitabine by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B***WANG Yanli^{1,2}, GE Lixiu^{1,2}, ZENG Zhaowei^{1,2}, WANG Rui³, ZHANG Aimin^{1,2,△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China; 2. Tianjin Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Acute Abdominal Disease, Tianjing 300100, China; 3. Tianjin Jinyu Medical Laboratory Co., Ltd, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of curcumin in enhancing gemcitabine sensitivity by regulating pancreatic cancer cells. **Methods** In order to verify the effect of curcumin on p53 and NF- κ B p65 nuclear translocation in pancreatic cancer cell PANC1, the pancreatic cancer PANC1 cells were treated with 0, 10, 20, 30 μ mol/L curcumin to obtain the blank group, 10 μ mol/L curcumin group, 20 μ mol/L curcumin group and 30 μ mol/L curcumin group. The intracellular distribution of NF- κ B p65 was determined by immunofluorescence staining under fluorescence microscope. The expression level of p53 protein in cells was determined by Western blot. The expression level of p53 mRNA was determined by reverse transcription-real-time fluorescence quantitative PCR. The combined use of miRstar and JASPAR softwares predicted to seek microRNA

(miRNA) potentially regulated by NF- κ B p65 nuclear translocation. The double luciferase reporting assay was used to respectively verify the relationship between miRNA and p53. In order to verify whether curcumin infect the sensitivity of PANC1 cell through NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 axis, the gemcitabine group was obtained by 10 μ mol/L gemcitabine treating cells, and the curcumin combined gemcitabine group was obtained by 20 μ mol/L curcumin and 10 μ mol/L gemcitabine treating cells. After the cells were treated with curcumin (20 μ mol/L) and gemcitabine (10 μ mol/L), oligonucleotides mimic NC and miR-26b-5p mimic were transfected into cells, and the mimic NC group and miR-26b-5p group were obtained. pcDNA3.1 no-load plasmid and pcDNA3.1-p53 overexpression plasmid were transfected into cells, respectively, and the pcDNA3.1 group and p53 group were obtained. The cell activity was detected by MTT assay. The cellular apoptosis level was determined by Annexin V/PI double staining. **Results** Compared with the blank group, the intracellular p53 mRNA and protein expression levels in the various curcumin treated groups (10, 20, 30 μ mol/L curcumin groups) all were increased. Compared with the blank group, the expression level of NF- κ B p65 in the nucleus of 20 μ mol/L curcumin group was decreased. The miRstar and JASPAR prediction software found 8 miRNA that may be regulated by NF- κ B p65 nuclear translocation, in which 3 miRNA had potential to target p53 genes, especially miR-26b-5p effect was most significant. The double luciferase report experiment confirmed that miR-26b-5p did interact with p53. Compared with the mimic NC group, the expression levels of p53 mRNA and protein in the mimic miR-26b-5p group were decreased. Compared with the gemcitabine group, the cell viability in the curcumin combined gemcitabine group was decreased and the apoptosis rate was increased. Compared with the mimic NC group, the cell activity in the mimic miR-26b-5p group was increased and the apoptosis level was decreased. Moreover compared with the pcDNA3.1 group, the cell activity in the pcDNA3.1-p53 group was decreased and the apoptosis level was increased. **Conclusion** Curcumin reduces the expression of miR-26b-5p gene by inhibiting the nuclear translocation of NF- κ B p65 protein, and then increase the p53 gene and protein expression, and enhance the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine by the NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 axis.

[Key words] curcumin; NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 axis; pancreatic cancer; gemcitabine sensitivity

胰腺癌是一种恶性程度较高的消化道肿瘤,约 90%为起源于腺管上皮的导管腺癌^[1]。由于早期的确诊率低,手术难度大,胰腺癌的治愈率极低,5 年生存率仅为 2%~10%,是预后最差的恶性肿瘤之一。我国胰腺癌的发病率和死亡率近年来呈上升趋势^[2]。目前术后化疗是防止胰腺癌复发、降低疾病死亡率的重要手段,但化疗耐药却降低了该治疗方法的有效性。揭示胰腺癌细胞耐药机制、改进治疗手段对于解决上述难题至关重要。

吉西他滨是治疗胰腺癌的主要化疗药物,但在临床应用中,吉西他滨单药或联合其他化疗药物方案的治疗效果均不佳,且在化疗过程中产生的获得性耐药进一步限制了胰腺癌的化疗效果^[3]。传统中药,已经被认为是开发新的抗肿瘤分子药物的宝贵资源。姜黄素属于酚类衍生物,提取自姜黄、郁金、莪术、石菖蒲等姜科植物,为橙黄色结晶粉末,其分子式为 C₂₁H₃₀O₆,相对分子量为 368.37,熔点 183 $^{\circ}$ C,主链含有不饱和脂肪族及芳香族基团,结构不稳定,水溶解度较差,易被光降解,可溶于乙醇和氯仿等有机溶剂^[4]。当代中国中医药经典著作《中华本草》和《中国药典》中都提到了姜黄具有止痛、清心、活血、行气、驱寒、消炎等药用价值。现代医学证实姜黄素具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、消炎等作用^[5-6]。越来越多的研究

显示,姜黄素对多种肿瘤均有明显的抑制作用,美国国立肿瘤研究所已将其列为第三代癌化学预防药^[7]。姜黄素能通过多种机制提高化疗和放疗药物对肿瘤灶的细胞毒性作用,充分体现了中药的多靶点、不良反应小等优点。有报道称,吉西他滨联合姜黄素可明显改善自身的细胞毒性作用,抑制胰腺癌细胞的增殖,促进细胞凋亡^[8]。p53 基因是细胞中重要的抑癌基因,它可以通过调控细胞周期与细胞凋亡等多种机制抑制肿瘤发生。文献报道显示,胰腺癌细胞可以通过降低细胞内 p53 蛋白表达水平增强自身对化疗药物吉西他滨的抗性^[9]。因此,本研究探讨姜黄素增强吉西他滨敏感性的机制,以及 p53 在其中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞系 PANC1 细胞购自中国生命科学院,DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司。胎牛血清和 1%青-链霉素均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。姜黄素和吉西他滨购自德国 Sigma-Aldrich 公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,姜黄素浓度有 10、20、30 μ mol/L,吉西他滨浓度为 10 μ mol/L,于-80 $^{\circ}$ C 长期保存。mimic miR-26b-5p 及寡核苷酸对照(mimic NC)由广州锐博生物科技有限公司合成,

pcDNA3.1 空载质粒和 pcDNA3.1-p53 质粒由上海吉玛基因股份有限公司合成。所有引物由上海生物工程有限公司合成。mRNA 荧光定量 PCR 实验试剂盒购自苏州恒宇生物科技有限公司, Lipofectamine 2000 转染试剂、微 RNA(microRNA, miRNA)加尾法荧光定量试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 PANC1 细胞处理及分组

为验证姜黄素对 PANC1 细胞中 p53 及核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 核易位的影响, 将 PANC1 细胞分为空白组; DMSO(即 0 μ mol/L 姜黄素)处理细胞; 姜黄素处理组: 以不同浓度姜黄素处理细胞, 分为 10 μ mol/L 姜黄素组、20 μ mol/L 姜黄素组、30 μ mol/L 姜黄素组。为验证姜黄素是否通过 NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴影响吉西他滨对 PANC1 细胞的敏感性, 将细胞分为吉西他滨组: 以终浓度 10 μ mol/L 吉西他滨处理细胞; 姜黄素联合吉西他滨组: 分别加入终浓度 20 μ mol/L 的姜黄素及 10 μ mol/L 的吉西他滨; mimic NC 组及 mimic miR-26b-5p 组: 姜黄素联合吉西他滨处理 48 h 后, 以 Lipofectamine 2000 转染试剂分别转染 5 μ L mimic NC、mimic miR-26b-5p; pcDNA3.1 组及 pcDNA3.1-p53 组: 姜黄素联合吉西他滨处理 48 h 后以 Lipofectamine 2000 转染试剂分别转染 2 μ g 的 pcDNA3.1 或 pcDNA3.1-p53 质粒。

1.3 逆转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-26b-5p、p53 mRNA 表达

TRIzol 法提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA。miR-26b-5p 引物序列: 正向 5'-CAG GGT CCG AGG TAT TCT GC-3', 反向 5'-TCA AGT AAT TCA GGA TAG GTG TCG T-3'; p53 引物序列: 正向 5'-CTT TGA GGT GCG TGT TTG TGC-3', 反向 5'-CCC CTT TCT TGC GGA GAT TC-3'; β -actin 引物序列: 正向 5'-AGT TGC GTT ACA CCC TTT CTT G-3', 反向 5'-TGT CAC CTT CAC CGT TCC AGT-3', 反应体系: 2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq 2.0 μ L、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μ L、正反向引物(5 pmol/ μ L)各 1.0 μ L、cDNA 0.5 μ L、DDW 7.1 μ L, 补水至总体积 20 μ L。miR-26b-5p PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; p53 PCR 反应条件 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min、50 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。以 β -actin 为内参, 按公式(Folds=2^{- $\Delta\Delta C_t$})计算出基因的表达水平。

1.4 Western blot 检测 p53 蛋白表达

使用 RIPA 裂解液(北京碧云天生物技术有限公司)提取细胞中的蛋白, 并用 BCA 试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]进行蛋白浓度的测定。然后使用 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白。接着将蛋白转移到聚偏氟

乙烯(PVDF, 美国 Millipore 公司)膜上, 并在脱脂牛奶中封闭 2 h。之后, 用 p53 一抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司)4 $^{\circ}$ C 孵育 PVDF 膜过夜。随后, 将 PVDF 膜与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司)孵育 2 h。使用增强化学发光法(ECL)发光液(北京碧云天生物技术有限公司)使蛋白条带可视化, Image J 软件对 Western blot 结果进行半定量分析。

1.5 免疫荧光检测 NF- κ B p65 核易位

细胞采用多聚甲醛固定, 使用 NF- κ B 激活-核转运检测试剂盒(北京碧云天生物技术有限公司)进行检测, 用 Triton X-100 在细胞表面打孔, 加入异硫氰酸荧光素蛋白(FITC)标记的 p65 抗体标记细胞内的 p65 蛋白, 用 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)标记细胞染色体 DNA, 荧光显微镜观察, 确定 NF- κ B p65 在细胞内的分布与定位。

1.6 NF- κ B p65 与 miR-26b-5p 的结合预测

联合采用 miRstar 和 JASPAR 预测软件, 寻找可能受 NF- κ B p65 核易位调控的 miRNA。

1.7 双荧光素酶报告实验

采用 Targetscan 在线平台预测 p53 mRNA 3' UTR 区域内受 NF- κ B p65 核易位调控最明显的 miRNA 的靶定关系和结合位点, 根据生物信息学预测结果, 将 p53 mRNA 3'-UTR 模拟物(p53 WT)及突变体(p53 MUT)混合 mimic miR-26b-5p 或阴性对照模拟物(mimic NC)转染 PANC1 细胞, 转染 24 h 后裂解细胞, 测定荧光强度。

1.8 噻唑蓝(MTT)实验检测细胞活力

将细胞定量(1×10^5 /L)接种到 96 孔板中并培养 24 h 向每个孔中加入 20 μ L MTT[5 mg/mL; 生工生物工程(上海)股份有限公司]并继续孵育 4 h。小心吸弃孔内培养液, 添加 100 μ L DMSO 溶解甲臞晶体。最后用酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)记录 490 nm 处的吸光度[A₍₄₉₀₎]。

1.9 膜联蛋白-V(Annexin V)/碘化丙啶(PI)双染色流式细胞术检测细胞凋亡

使用 Annexin V/PI 双染色细胞凋亡检测试剂盒(北京碧云天生物技术有限公司)检测细胞凋亡情况。收集细胞, PBS 洗涤并以 1.0×10^6 /mL 的细胞浓度重悬。然后将 100 μ L 细胞加入 1.5 mL 带盖离心管中。将 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 加入离心管中, 避光孵育 15 min。接着加入 400 μ L 结合缓冲液并混合。最后, 使用 FACScan[®] 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)在 1 h 内检测细胞。

1.10 统计学处理

用 Graphpad Prism8.0 软件作图, SPSS20.0 软件进行数据统计分析, 所以实验均重复 3 次, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度姜黄素对 PANC1 细胞 p53 表达的影响

空白组 p53 mRNA 表达水平为 0.422 ± 0.005 , 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组 p53 mRNA 表达水平分别为 0.479 ± 0.004 、 0.532 ± 0.005 和 0.617 ± 0.006 。随着姜黄素浓度增加,p53 mRNA 表达水平升高,各姜黄素浓度组与空白组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 不同浓度姜黄素对 PANC1 细胞 p53 蛋白的表达水平的影响

随着姜黄素浓度增加,p53 蛋白的表达水平升高,与空白组比较,各姜黄素浓度组差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

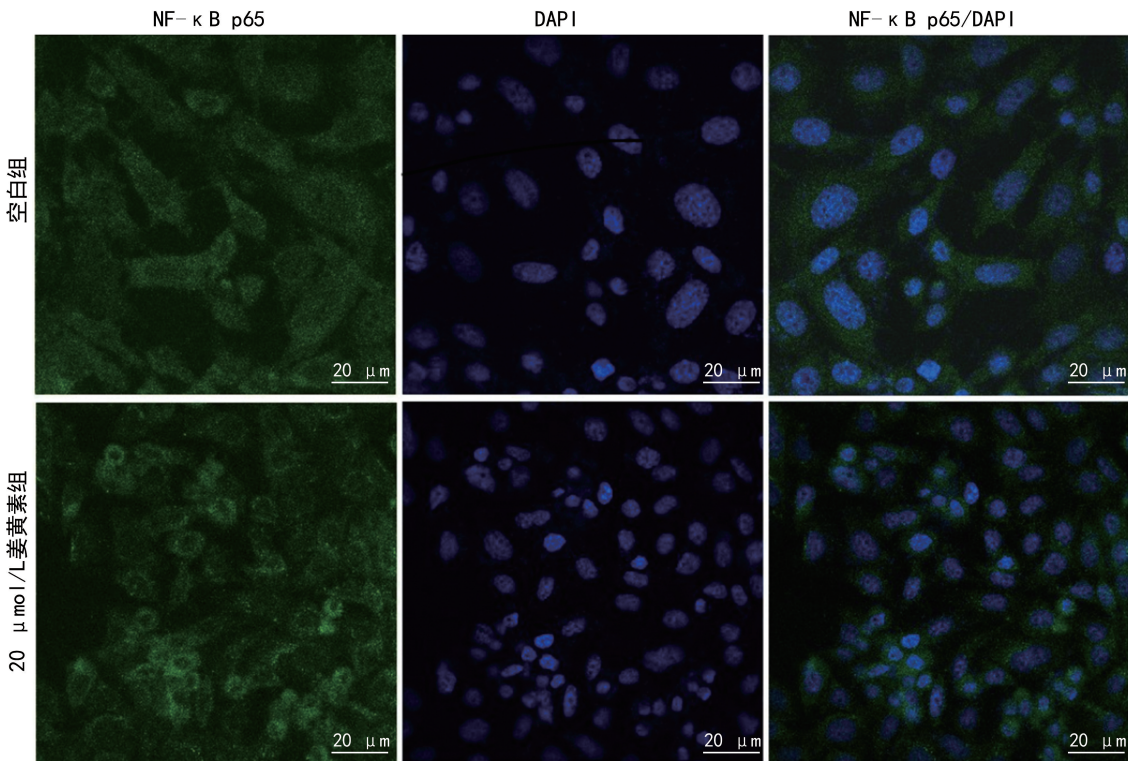


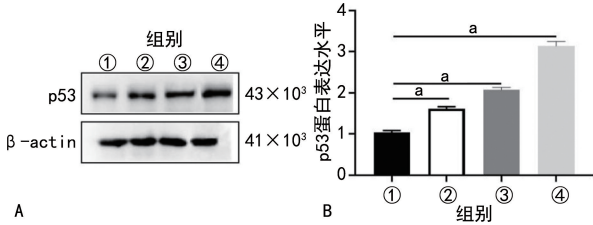
图 2 姜黄素对 PANC1 细胞 NF-κB 核易位的影响

2.4 双荧光素实验验证 miR-26b-5p 与 p53 的关系

联合采用 miRstar 和 JASPAR 预测软件,找出基因表达水平可能受 NF-κB p65 核易位调控的候选 miRNA,得到 8 个候选 miRNA 分子(miR-202、miR-105、miR-26b-5p、miR-92a、miR-92b、miR-107a、miR-127、miR-32)。采用 Targetscan 在线平台预测,8 个候选 miRNA 分子中有 3 个具有靶向 p53 基因潜力的 miRNA(miR-26b-5p、miR-92a、miR-92b)。经姜黄素($20\mu\text{mol/L}$)刺激,这 3 种 miRNA 在 PANC1 细胞内的表达水平较空白组均下降,尤以 miR-26b-5p 下降程度最为明显(图 3A)。通过双荧光素酶报告实验进一步验证发现,miR-26b-5p 与 p53 确有相互作用(图 3B)。过表达 miR-26b-5p 后,mimic miR-26b-5p 组

2.3 荧光染色实验验证姜黄素对 PANC1 细胞 NF-κB p65 核易位的影响

20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组细胞核内 NF-κB p65 表达水平较空白组降低,NF-κB p65 核易位减少,见图 2。



A:p53 蛋白 Western blot;B: Western blot 定量分析;①:空白组;②:10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组;③:20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组;④:30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组;^a: $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度姜黄素处理 PANC1 细胞后 p53 蛋白表达变化

p53 的 mRNA 和蛋白表达水平较 mimic NC 组下降(图 3C、D)。

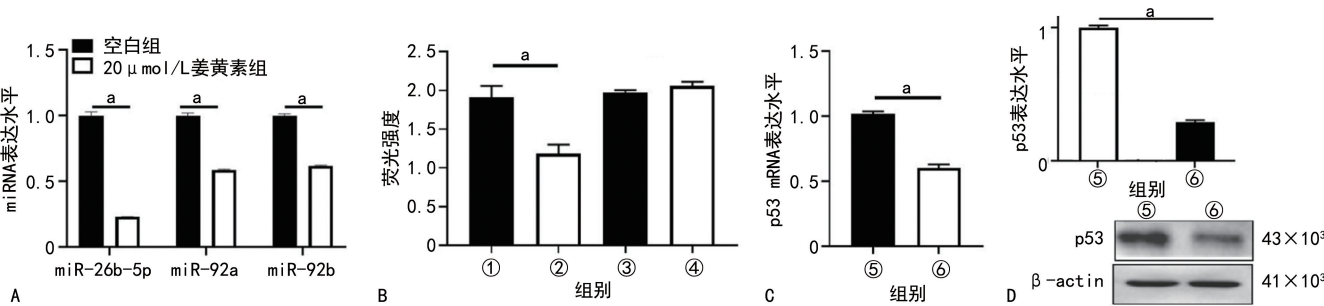
2.5 姜黄素通过 NF-κB p65/miR-26b-5p/p53 轴增强吉西他滨敏感性

2.5.1 MTT 实验验证姜黄素通过 NF-κB p65/miR-26b-5p/p53 轴抑制 PANC1 细胞活力

与空白组[(100.00 ± 1.35)%]
比较,吉西他滨组[(51.11 ± 2.34)%]
和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组[(65.38 ± 3.95)%]
细胞活力均下降,差异有统计学意义($P<0.05$),
姜黄素联合吉西他滨组[(42.71 ± 2.66)%]
细胞活力较吉西他滨组和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组
进一步下降,差异有统计学意义($P<0.05$),
见图 4A。而 mimic miR-26b-5p 组[(134.45 ± 3.54)%]
细胞活力较 mimic

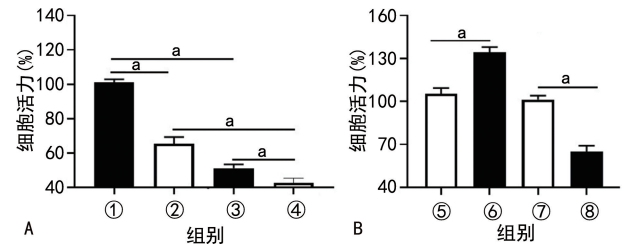
NC 组 $[(105.38 \pm 3.95)\%]$ 升高,差异有统计学意义 $(P<0.05)$;pcDNA3.1-p53 组 $[(64.81 \pm 4.29)\%]$ 细胞

活力较 pcDNA3.1 组 $[(101.38 \pm 2.62)\%]$ 降低,差异有统计学意义 $(P<0.05)$,见图 4B。



A: 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理 PANC1 细胞后,3 种 miRNA 的表达水平分析;B: 双荧光素酶实验验证 miR-26b-5p 和 p53 的相互作用关系;C: 过表达 miR-26b-5p 对 p53 mRNA 表达水平的影响;D: 过表达 miR-26b-5p 对 p53 蛋白表达水平的影响;①: mimic NC+p53 WT 组;②: mimic miR-26b-5p+p53 WT 组;③: mimic NC+p53 MUT 组;④: mimic miR-26b-5p+p53 MUT 组;⑤: mimic NC 组;⑥: mimic miR-26b-5p 组;^a: $P<0.05$ 。

图 3 miR-26b-5p 与 p53 的作用关系验证



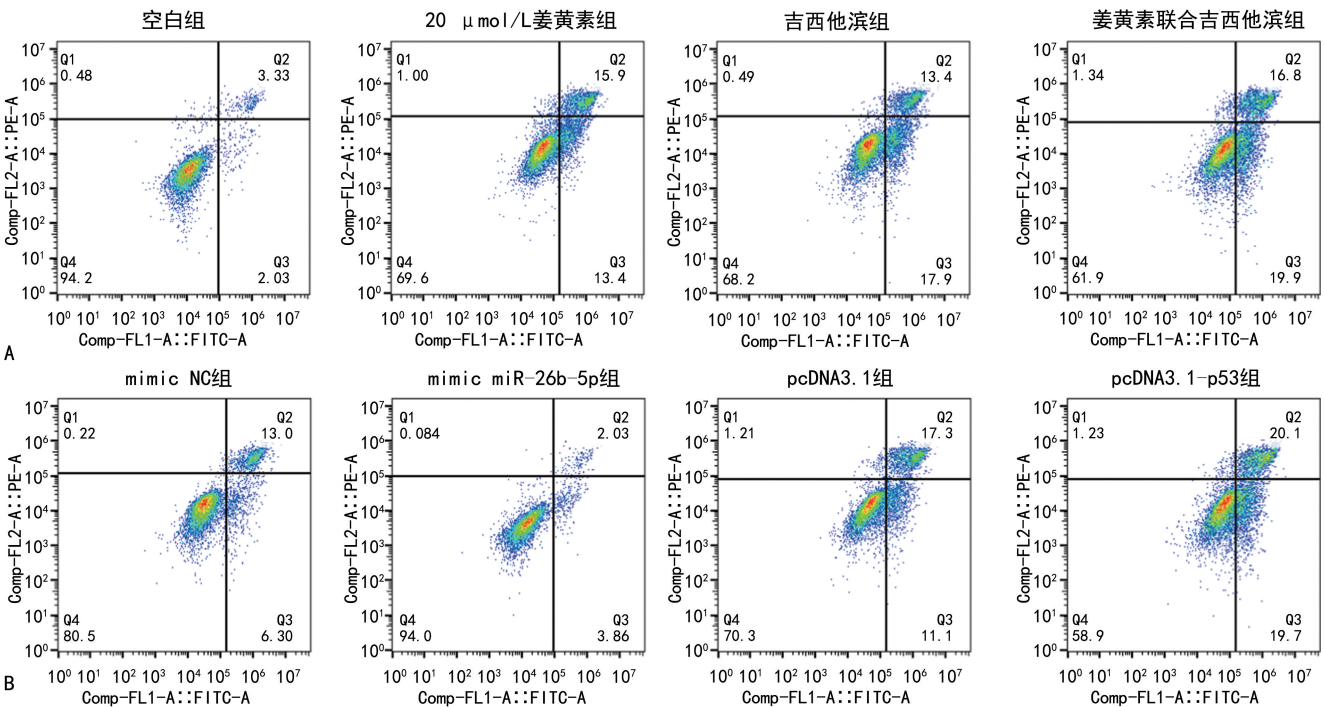
A: 姜黄素和吉西他滨对细胞活力的影响;B: miR-26b-5p 及 p53 对细胞活力的影响;①: 空白组;②: 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组;③: 吉西他滨组;④: 姜黄素联合吉西他滨组;⑤: mimic NC 组;⑥: mimic miR-26b-5p 组;⑦: pcDNA3.1 组;⑧: pcDNA3.1-p53 组;^a: $P<0.05$ 。

图 4 MTT 实验检测姜黄素通过 NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴对细胞活力的影响

2.5.2 Annexin V/PI 双染色流式细胞术验证姜黄

素通过 NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴增强 PANC1 细胞凋亡

与空白组 $[(5.36 \pm 0.96)\%]$ 比较,吉西他滨组 $[(31.30 \pm 1.10)\%]$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组 $[(29.30 \pm 0.82)\%]$ 细胞凋亡率均升高,差异有统计学意义 $(P<0.05)$,姜黄素联合吉西他滨组 $[(36.70 \pm 1.47)\%]$ 细胞凋亡率较吉西他滨组和 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组进一步升高,差异有统计学意义 $(P<0.05)$,见图 5A; mimic miR-26b-5p 组 $[(5.89 \pm 1.03)\%]$ 细胞凋亡率较 mimic NC 组 $[(32.40 \pm 1.42)\%]$ 明显降低,差异有统计学意义 $(P<0.05)$;pcDNA3.1 组 $[(45.25 \pm 1.62)\%]$ 细胞凋亡率较 pcDNA3.1-p53 组 $[(35.83 \pm 1.56)\%]$ 升高,差异有统计学意义 $(P<0.05)$,见图 5B。



A: 姜黄素和吉西他滨对 PANC1 细胞凋亡的影响;B: miR-26b-5p 及 p53 对 PANC1 细胞凋亡的影响。

图 5 流式细胞术检测姜黄素通过 NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴对细胞凋亡的影响

3 讨 论

胰腺癌是一种死亡率较高的恶性肿瘤。尽管吉西他滨单独使用或联合使用化疗药物是晚期胰腺癌的标准治疗方法,但其并未达到令人满意的结果^[10-12]。于是人们将对抗肿瘤的化疗药物研究向中草药扩展,意外发现植物提取物如姜黄素、椰皮素^[13]等可以起到很好的抑癌效果。现有研究表明,姜黄素抗肿瘤疗效明显且安全,其抑制胰腺癌的作用机制是通过调节信号通路抑制细胞内多种信号传导,进而抑制胰腺癌细胞的生长、侵袭转移,诱导凋亡,并能增加化疗药物的疗效及放疗的敏感性,从而达到抗癌作用。姜黄素具有多靶点药物治疗和胰腺癌潜在预防的双重作用,且价格低廉、来源丰富,对其研究已经取得了一些成果,但是其分子机制仍需进一步探究。

NF- κ B 是一类具有多向转录调节作用的核蛋白因子,通常以 p65/p50 形式存在,正常情况下,由 p65/p50 异二聚体,与核因子 κ B 抑制蛋白(I κ B)结合成三聚体,处于无活性状态,当细胞受生长因子、炎症因子等刺激时 I κ B 泛素化继而被蛋白酶水解,活化的 p65/p50 进入细胞核,与结合位点结合,启动相关基因转录^[14]。近年的研究表明 NF- κ B 与细胞增殖和凋亡的关系密切,在包括胰腺癌的多种恶性肿瘤中均存在 NF- κ B 的过度激活,其不仅通过多种信号转导途径直接作用于肿瘤细胞,还作为肿瘤相关炎症的主要始动和调控因素在肿瘤的增殖、细胞凋亡等方面发挥关键作用^[15-16]。本研究发现,姜黄素可以抑制 NF- κ B p65 核易位,这与以往的研究结果一致^[17]。

p53 基因是细胞中重要的抑癌基因,胰腺癌细胞可以通过降低胞内 p53 蛋白表达水平增强自身对化疗药物吉西他滨的抗性^[9]。本研究发现,用不同浓度的姜黄素处理 PANC1 细胞后,p53 的 mRNA 及蛋白表达水平均上升,且呈剂量依赖性,说明姜黄素能够增强 PANC1 细胞中 p53 基因的表达。此外,最近的研究表明姜黄素能通过改变 miRNA 的表达水平抑制癌细胞的生长、增强细胞凋亡,从而提高传统癌症治疗的疗效,提高恶性肿瘤患者的生存率^[18]。作者认为姜黄素处理的胰腺癌细胞 PANC1 中 p53 蛋白表达水平的升高可能是由某种 miRNA 对 p53 基因表达的抑制作用减弱造成的。此外有研究报道显示,NF- κ B p65 与 miRNA 基因上游顺式作用元件直接结合后,能诱导 miRNA 基因的表达^[16]。作者通过生物信息预测发现,miR-26b-5p 具有 NF- κ B p65 的结合位点,同时通过靶基因预测软件和双荧光素酶实验,发现 p53 确实是 miR-26b-5p 的靶基因,且能相互作用。因此,作者认为姜黄素可能通过抑制 NF- κ B p65 的核易位,抑制 miR-26b-5p 的表达,从而削弱对 p53 的抑制

作用。

吉西他滨在肿瘤中的作用机制为抑制核苷酸还原酶活性,影响 DNA 合成从而引起细胞凋亡,而对药物所介导的凋亡过程不敏感是导致化疗耐药的重要原因之一^[19]。而姜黄素可以通过抑制 NF- κ B p65 等的表达,促进细胞的凋亡,因此协同使用姜黄素可以改善细胞对吉西他滨产生的耐药。为了进一步验证姜黄素调控的 NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴是否能增加胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性,作者又进行 MTT 细胞活力实验及流式细胞术检测细胞凋亡实验,将细胞分为空白组、姜黄素处理组、吉西他滨组、姜黄素联合吉西他滨组、mimic miR-26b-5p 组及 mimic NC 组、pcDNA3.1-p53 组及 pcDNA3.1 组,结果发现,姜黄素联合吉西他滨处理降低了细胞的活力、增加了细胞的凋亡率,且过表达 miR-26b-5p 能够逆转姜黄素联合吉西他滨处理导致的细胞活力降低和凋亡增加,使 PANC1 细胞活力增强、凋亡减少;同时,虽然随着姜黄素浓度增加(10、20、30 μ mol/L)p53 表达水平逐步升高,但 MTT 及流式细胞实验中,30 μ mol/L 姜黄素和吉西他滨联合处理细胞后,细胞死亡过多,不利于联合效果检测,最终选择 20 μ mol/L 姜黄素与吉西他滨联合处理细胞。过表达 p53 能够协同姜黄素联合吉西他滨处理导致的细胞活力降低和凋亡增加,使 PANC1 细胞活力进一步减弱、凋亡增加,达到抑制肿瘤生长的目的。因此,本研究证明,姜黄素能够通过调控的 NF- κ B p65/miR-26b-5p/p53 轴,增加胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性。本研究的发现与之前的研究一致^[20-21],再次验证了姜黄素作为一种胰腺癌治疗药物具有良好的前景。

参考文献

- [1] WU X,JIANG L,ZHANG Z,et al. Pancreatic cancer cell apoptosis is induced by a proteoglycan extracted from *Ganoderma lucidum*[J]. *Oncol Lett*,2021,21(1):34.
- [2] 王旭,程合,刘辰,等. 2022 年度胰腺癌研究及诊疗新进展[J]. *中国癌症杂志*,2023,33(1):1-13.
- [3] DAI S,PENG Y,ZHU Y,et al. Glycolysis promotes the progression of pancreatic cancer and reduces cancer cell sensitivity to gemcitabine [J]. *Biomed Pharmacother*,2020,121:109521.
- [4] NAUJOKAT C,MCKEE D L. The “big five” phytochemicals targeting cancer stem cells:curcumin, egcg, sulforaphane, resveratrol and genistein [J]. *Curr Med Chem*,2021,28(22):4321-4342.

- [5] ALMATROODI S A, SYED M A, RAHMANI A H. Potential therapeutic targets of curcumin, most abundant active compound of turmeric spice: role in the management of various types of cancer[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2021, 16(1): 3-29.
- [6] JOSHI P, JOSHI S, SEMWAL D, et al. Curcumin: an insight into molecular pathways involved in anticancer activity[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2021, 21(17): 2420-2457.
- [7] PENG Y, AO M, DONG B, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in the inflammatory diseases: status, limitations and countermeasures[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4503-4525.
- [8] 罗长江, 俞泽元, 曹宏泰, 等. 姜黄素与吉西他滨联用对胰腺癌细胞株增殖及凋亡的诱导作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(8), 1413-1415.
- [9] GAPTULBAROVA K A, TSYGANOV M M, PEVZNER A M, et al. NF- κ B as a potential prognostic marker and a candidate for targeted therapy of cancer[J]. *Exp Oncol*, 2020, 42(4): 263-269.
- [10] LIM S H, YUN J, LEE M Y, et al. Gemcitabine and erlotinib with or without oxaliplatin in previously untreated advanced pancreatic cancer: a randomized phase II trial[J]. *Yonsei Med J*, 2021, 62(8): 671-678.
- [11] LIERMANN J, MUNTER M, NAUMANN P, et al. Cetuximab, gemcitabine and radiotherapy in locally advanced pancreatic cancer: long-term results of the randomized controlled phase II PARC trial[J]. *Clin Transl Radiat Oncol*, 2022, 34: 15-22.
- [12] 付岚, 张晓霞, 陈旭霞, 等. 胰腺癌临床诊断现状的单中心调查分析[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(3): 357-359.
- [13] KUMAR G, FAROOQUI M, RAO C V. Role of dietary cancer-preventive phytochemicals in pancreatic cancer stem cells[J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2018, 4(4): 326-335.
- [14] PAVITRA E, KANCHARLA J, GUPTA V K, et al. The role of NF- κ B in breast cancer initiation, growth, metastasis, and resistance to chemotherapy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114822.
- [15] SHOKRI S, MAHMOUDVAND S, TAHERKHANI R, et al. Complexity on modulation of NF- κ B pathways by hepatitis B and C: a double-edged sword in hepatocarcinogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 14734-14742.
- [16] JUTOORU I, CHADALAPAKA G, LEI P, et al. Inhibition of NF- κ B and pancreatic cancer cell and tumor growth by curcumin is dependent on specificity protein down-regulation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(33): 25332-25344.
- [17] SUGIMOTO H, NAKAMURA M, YODA H, et al. Silencing of RUNX2 enhances gemcitabine sensitivity of p53-deficient human pancreatic cancer AsPC-1 cells through the stimulation of TAp63-mediated cell death[J]. *Cell Death Discov*, 2015, 6(10): e1914.
- [18] LI J, WEI H, LIU Y, et al. Curcumin inhibits hepatocellular carcinoma via regulating miR-21/TIMP3 axis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 2892917.
- [19] 央茂, 冯佳毅, 刘颖斌. 胰腺癌化疗中吉西他滨耐药机制研究进展[J]. *中国实用外科杂志*, 2022, 42(2): 225-229.
- [20] 彭梦媛. 姜黄素逆转胰腺癌 SW1990/GEM 细胞吉西他滨耐药的作用机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- [21] 牛楠. 姜黄素增强吉西他滨抗胰腺癌的机制研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2022.

(收稿日期: 2023-10-10 修回日期: 2024-05-20)

(编辑: 姚雪)