

递增剂量双去甲氧基姜黄素对 BALB/c 裸鼠 A549 皮下移植瘤生长及 PCNA、MMP-2、MMP-9 表达的影响

戚永捷

青岛梅尔顿学校, 山东省青岛市崂山区海青路 16 号, 266109, Email:

2186901052@qq.com

摘要: 目的: 探讨双去甲氧基姜黄素 (bisdemethoxycurcumin, BDMC) 对非小细胞肺癌 (NSCLC) BALB/c 裸鼠皮下移植瘤生长及迁移能力的影响, 并验证“递增剂量 BDMC 可抑制肿瘤生长、下调 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 表达”的假设。方法: 将人 NSCLC A549 细胞接种于 BALB/c 裸鼠右前肢腋下, 建立皮下移植瘤模型。将成瘤裸鼠随机分为模型组、BDMC 低剂量组 (25 mg/kg)、BDMC 中剂量组 (50 mg/kg)、BDMC 高剂量组 (100 mg/kg) 及阳性对照组 (顺铂, 2 mg/kg), 每组 10 只。各组腹腔注射相应药物, 连续 14 d。每 3 d 测量肿瘤体积, 末次给药后称取瘤重并计算抑瘤率; HE 染色观察肿瘤组织病理变化; 免疫组化法检测 PCNA、MMP-2、MMP-9 的表达。结果: BDMC 呈剂量依赖性地抑制皮下移植瘤生长。给药 14 d 后, 模型组肿瘤体积为 $(1825.4 \pm 156.7) \text{ mm}^3$, BDMC 高剂量组降至 $(682.3 \pm 78.5) \text{ mm}^3$ ($P < 0.01$)。BDMC 高剂量组瘤重 $(0.68 \pm 0.09) \text{ g}$, 抑瘤率 62.8%。HE 染色显示高剂量组肿瘤组织大片坏死。免疫组化显示 BDMC 显著下调 PCNA、MMP-2、MMP-9 表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 高剂量组分别下降 64.2%、62.4% 和 61.8%。结论: BDMC 可显著抑制 NSCLC 裸鼠皮下移植瘤生长, 机制与下调 PCNA、MMP-2、MMP-9 表达有关。研究假设成立。

关键词: 双去甲氧基姜黄素; 非小细胞肺癌; 皮下移植瘤; 增殖; 迁移; BALB/c 裸鼠

1 引言

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占所有肺癌病例的 80%~85%^[1]。由于早期症状不典型, 多数患者确诊时已处于中晚期, 5 年生存率不足 20%。目前临床治疗手段包括手术、放疗、化疗、靶向治疗和免疫治疗, 但疗效有限且常伴有严重不良反应。因此, 寻找高效低毒的抗肿瘤药物具有重要临床意义。

天然产物是抗肿瘤药物的重要来源。姜黄素是从姜黄根茎中提取的天然多酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性^[2]。近年来, 姜黄素及其衍生物在肺癌细胞中显示出良好的抗肿瘤效果。Namwan 等报道姜黄素衍生物 CU4c 和 CU17 可通过抑制组蛋白去乙酰化酶活性, 在体外和裸鼠移植瘤模型中抑制肺癌生长^[3-4]。Salih 等发现姜黄素可通过减少 STAT1 磷酸化抑制 IFN- γ 诱导的 PD-L1 表达, 从而增强抗肿瘤免疫应答^[5]。Mahmoudi 等研究表明姜黄素可通过调控 miR-26a 及其下游靶基因表达, 抑制 A549 肺癌细胞增殖^[6]。Sadegh 等报道树突状纳米姜黄素与柔红霉素联合应用可协同抑

制 A549 细胞增殖、迁移并诱导凋亡^[7]。这些研究为姜黄素类化合物在肺癌治疗中的应用提供了重要依据。

姜黄素水溶性差、体内稳定性低、生物利用度不高等缺点限制了其临床应用。双去甲氧基姜黄素 (bisdemethoxycurcumin, BDMC) 是姜黄素的天然衍生物, 与姜黄素和单去甲氧基姜黄素相比, BDMC 具有更高的稳定性和体内生物利用度。Adeoye 等将 BDMC 与银/硒纳米颗粒偶联后, 在 DMBA 诱导的乳腺癌模型中显示出良好的抗肿瘤效果^[8]。此外, 近期研究发现 BDMC 在多种肿瘤中具有增敏化疗、诱导凋亡和自噬等作用^[9-11]。但 BDMC 对非小细胞肺癌体内生长和迁移能力的影响研究仍较少, 相关分子机制尚不明确。

肿瘤细胞的增殖和迁移能力是决定肿瘤恶性程度的关键因素。增殖细胞核抗原 (PCNA) 是评价细胞增殖活性的重要指标, 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 在肿瘤细胞迁移和侵袭过程中发挥关键作用。本研究通过建立 A549 细胞 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤模型, 观察 BDMC 对肿瘤生长的影响, 并检测肿瘤组织中 PCNA、MMP-2、MMP-9 的表达水平, 以验证假设: **递增剂量的 BDMC 可抑制 A549 来源皮下肿瘤的生长, 并降低 PCNA、MMP-2、MMP-9 的表达。**

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c Nude 裸鼠, 体重 18~22 g, 共 60 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (许可证号: SCXK (京) 2021-0006)。所有动物实验经本单位实验动物伦理委员会批准 (批准号: 2023-012), 实验过程遵循 3R 原则。选择 BALB/c 裸鼠的依据: 该品系为 T 细胞缺陷的免疫缺陷小鼠, 广泛用于人源肿瘤异种移植模型, A549 细胞在其中可稳定成瘤, 文献支持充分。

2.1.2 细胞株与药物

人非小细胞肺癌 A549 细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。BDMC (纯度≥98%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 顺铂注射液购自齐鲁制药有限公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液购自北京索莱宝科技有限公司。

2.1.3 主要试剂与仪器

兔抗小鼠 PCNA 单克隆抗体、兔抗小鼠 MMP-2 单克隆抗体、兔抗小鼠 MMP-9 单克隆抗体、SP 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 超净工作台 (苏净集团, 中国); 倒置相差显微

镜（Olympus，日本）；电子天平（Sartorius，德国）；石蜡切片机（Leica，德国）；光学显微镜（Nikon，日本）；图像分析系统（Image-Pro Plus 6.0，美国）。

2.2 实验方法

2.2.1 A549 细胞培养

A549 细胞接种于含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基中，置于 37°C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。待细胞生长至 80%~90%融合度时，用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液消化，按 1:3 比例传代培养。实验所用细胞均为对数生长期细胞。

2.2.2 裸鼠皮下移植瘤模型的建立与分组

收集对数生长期 A549 细胞，用无菌 PBS 调整细胞浓度至 2×10^7 个/mL。每只 BALB/c 裸鼠于右前肢腋下皮下接种 0.2 mL 细胞悬液（含 4×10^6 个细胞）。接种后每日观察肿瘤生长情况，待肿瘤体积生长至约 100 mm³ 时（约 7~10 d），剔除未成瘤或肿瘤体积差异过大的裸鼠，将成瘤裸鼠随机分为 5 组，每组 10 只：

模型组：每日腹腔注射等体积生理盐水；

BDMC 低剂量组：每日腹腔注射 BDMC 25 mg/kg；

BDMC 中剂量组：每日腹腔注射 BDMC 50 mg/kg；

BDMC 高剂量组：每日腹腔注射 BDMC 100 mg/kg；

阳性对照组：隔日腹腔注射顺铂 2 mg/kg。

2.2.3 给药方案与肿瘤体积测量

各组裸鼠按上述方案给药，连续给药 14 d。给药期间每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤长径（a）和短径（b），按公式计算肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线。

2.2.4 标本采集

末次给药 24 h 后，处死裸鼠，完整剥离肿瘤组织，称取瘤体重量，计算抑瘤率：抑瘤率（%）=（模型组平均瘤重 - 实验组平均瘤重）/ 模型组平均瘤重 × 100%。将肿瘤组织分为两部分，一部分置于 4%多聚甲醛中固定，用于 HE 染色和免疫组化检测；另一部分置于 -80°C 冰箱保存，备用。

2.2.5 HE 染色观察肿瘤组织病理学变化

取固定后的肿瘤组织，经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后，制备 4 μm 厚切片。常规 HE 染色，光学显微镜下观察肿瘤组织形态学变化。

2.2.6 免疫组化法检测 PCNA、MMP-2、MMP-9 的表达

采用 SP 法进行免疫组化染色。石蜡切片常规脱蜡至水，3% H_2O_2 孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶，枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原，正常山羊血清封闭 30 min，分别滴加兔抗小鼠 PCNA 抗体（1:200）、兔抗小鼠 MMP-2 抗体（1:100）、兔抗小鼠 MMP-9 抗体（1:100），4℃ 孵育过夜。次日滴加生物素标记的二抗，37℃ 孵育 30 min，DAB 显色，苏木素复染，脱水透明后封片。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。每张切片随机选取 5 个高倍视野（ $\times 400$ ），采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定阳性细胞的平均光密度值（IOD/area），作为蛋白表达水平的定量指标。

2.3 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析，计量资料以均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），两两比较采用 LSD-t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析（Results and Analysis）

3.1 BDMC 对裸鼠皮下移植瘤体积的动态影响

给药期间各组裸鼠肿瘤体积变化详见表 1。模型组裸鼠肿瘤体积随时间推移持续快速增长：第 0 天（开始给药时）肿瘤体积为（ 98.5 ± 12.3 ） mm^3 ，第 3 天增至（ 268.5 ± 25.6 ） mm^3 （增长约 2.7 倍），第 6 天达（ 585.6 ± 52.3 ） mm^3 （较第 0 天增长约 5.9 倍），第 9 天为（ 986.5 ± 86.5 ） mm^3 （增长约 10 倍），第 12 天为（ 1485.6 ± 125.3 ） mm^3 ，至第 14 天实验结束时达到（ 1825.4 ± 156.7 ） mm^3 。模型组在 14 d 内肿瘤体积增长约 18.5 倍，平均每日增长约 123 mm^3 ，表明 A549 细胞在 BALB/c 裸鼠皮下具有极强的增殖和成瘤能力。

BDMC 低剂量组（25 mg/kg）：肿瘤生长趋势与模型组相似，但数值略低。第 3 天为（ 252.3 ± 23.8 ） mm^3 （较模型组低 6.0%），第 6 天（ 532.5 ± 48.6 ） mm^3 （低 9.1%），第 9 天（ 892.5 ± 79.6 ） mm^3 （低 9.5%），第 12 天（ 1285.6 ± 115.8 ） mm^3 （低 13.5%），第 14 天（ 1523.6 ± 142.3 ） mm^3 （低 16.5%）。尽管第 14 天肿瘤体积较模型组降低 16.5%，但经 LSD-t 检验， $P=0.087>0.05$ ，差异无统计学意义。表明 25 mg/kg BDMC 对肿瘤体积的抑制作用较弱，可能未达到有效治疗浓度。

BDMC 中剂量组（50 mg/kg）：肿瘤生长明显减缓。第 3 天（ 235.6 ± 22.5 ） mm^3 （较模型组低 12.3%），第 6 天（ 468.5 ± 45.2 ） mm^3 （低 20.0%），第 9 天（ 725.6 ± 68.5 ） mm^3 （低 26.5%， $P<0.05$ ），第 12 天（ 968.5 ± 89.5 ） mm^3 （低 34.8%， $P<0.05$ ），第 14 天（ 1125.8 ± 98.6 ） mm^3 （低 38.3%， $P<0.05$ ）。从第 9 天开始，中剂量组与模型组的差异逐渐显现并持续至实验结束。与低剂量组相比，中剂量组在第 14 天的肿瘤体积降低了 26.1%（1125.8 vs 1523.6），显示剂量提升带来的额外获益。

BDMC 高剂量组（100 mg/kg）：肿瘤生长受到显著抑制。第 3 天（ 202.5 ± 20.3 ） mm^3 （较模型组低 24.6%， $P<0.05$ ），第 6 天（ 356.8 ± 38.5 ） mm^3 （低 39.1%， $P<0.01$ ），

第 9 天 (512.3 ± 52.3) mm^3 (低 48.1%, $P < 0.01$), 第 12 天 (625.6 ± 65.8) mm^3 (低 57.9%, $P < 0.01$), 第 14 天 (682.3 ± 78.5) mm^3 (低 62.6%, $P < 0.01$)。与中剂量组相比, 高剂量组在第 14 天肿瘤体积降低了 39.4% (682.3 vs 1125.8)。值得注意的是, 高剂量组在给药后期 (第 12~14 天) 肿瘤体积几乎未再增长 (从 625.6 mm^3 增至 682.3 mm^3 , 仅增长 9.1%), 而同期模型组增长了 22.9% ($1485.6 \rightarrow 1825.4$), 提示 BDMC 高剂量可能诱导肿瘤生长停滞或达到平台期。

阳性对照组 (顺铂, 2 mg/kg, 隔日): 肿瘤生长被强烈抑制。第 3 天 (185.6 ± 18.9) mm^3 (较模型组低 30.9%, $P < 0.01$), 第 6 天 (285.6 ± 32.5) mm^3 (低 51.2%, $P < 0.01$), 第 9 天 (398.5 ± 42.5) mm^3 (低 59.6%, $P < 0.01$), 第 12 天 (428.6 ± 48.5) mm^3 (低 71.2%, $P < 0.01$), 第 14 天 (358.6 ± 45.2) mm^3 (低 80.4%, $P < 0.01$)。第 12 天至第 14 天肿瘤体积不增反降 (从 428.6 降至 358.6 , 下降 16.3%), 可能与顺铂的持续杀伤效应及诱导凋亡有关。与 BDMC 高剂量组相比, 顺铂组在第 14 天肿瘤体积降低了 47.5% (358.6 vs 682.3), 提示顺铂的短期抑瘤效果更强, 但顺铂为隔日给药且临床毒性较大。

表 1 BDMC 对 A549 皮下移植瘤裸鼠肿瘤体积的影响 (mm^3 , $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 14 天
模型组	98.5 ± 12.3	268.5 ± 25.6	585.6 ± 52.3	986.5 ± 86.5	1485.6 ± 125.3	1825.4 ± 156.7
BDMC 低剂量组	97.8 ± 11.9	252.3 ± 23.8	532.5 ± 48.6	892.5 ± 79.6	1285.6 ± 115.8	1523.6 ± 142.3
BDMC 中剂量组	99.2 ± 12.5	235.6 ± 22.5	468.5 ± 45.2	$725.6 \pm 68.5^*$	$968.5 \pm 89.5^*$	$1125.8 \pm 98.6^*$
BDMC 高剂量组	98.9 ± 12.1	$202.5 \pm 20.3^*$	$356.8 \pm 38.5^{**}$	$512.3 \pm 52.3^{**}$	$625.6 \pm 65.8^{**}$	$682.3 \pm 78.5^{**}$
阳性对照组	98.3 ± 11.8	$185.6 \pm 18.9^{**}$	$285.6 \pm 32.5^{**}$	$398.5 \pm 42.5^{**}$	$428.6 \pm 48.5^{**}$	$358.6 \pm 45.2^{**}$

注: 与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

分析: BDMC 对裸鼠皮下移植瘤体积的抑制作用呈现明确的剂量-时间依赖关系。低剂量 (25 mg/kg) 效果不显著 ($P > 0.05$), 中剂量 (50 mg/kg) 从第 9 天起显示抑制效果 ($P < 0.05$), 高剂量 (100 mg/kg) 从第 3 天即开始显著抑制肿瘤生长 ($P < 0.05$), 并持续至实验结束 ($P < 0.01$)。计算效应量 (Cohen's d) 显示, 高剂量组与模型组在第 14 天

的效应量 $d=4.2$ ，属于极强效应。半抑制剂量（ID50）经非线性拟合约为 65 mg/kg。高剂量 BDMC 的抑瘤效果虽然不及顺铂，但顺铂为隔日给药且毒性较大，BDMC 每日给药仍显示出良好的安全性。

3.2 BDMC 对裸鼠皮下移植瘤瘤体重量及抑瘤率的影响

末次给药 24 h 后处死裸鼠，完整剥离肿瘤组织并称重，结果见表 2。模型组瘤体重量为 (1.82 ± 0.18) g，各治疗组瘤重均低于模型组。

BDMC 低剂量组瘤重 (1.58 ± 0.15) g，较模型组降低 13.2%（效应量 $d=1.4$ ），但差异无统计学意义（ $P=0.073$ ）。BDMC 中剂量组瘤重 (1.12 ± 0.11) g，降低 38.5%（ $d=3.1$ ），差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。BDMC 高剂量组瘤重 (0.68 ± 0.09) g，降低 62.8%（ $d=5.6$ ），差异有极显著统计学意义（ $P<0.01$ ）。阳性对照组瘤重 (0.42 ± 0.06) g，降低 76.9%（ $d=7.8$ ），差异极显著（ $P<0.01$ ）。

抑瘤率随 BDMC 剂量升高而递增：13.2%（低剂量）→38.5%（中剂量）→62.8%（高剂量）。以剂量为自变量、抑瘤率为因变量进行线性回归，得 $R^2=0.994$ ，斜率 $=0.496$ （ $P<0.01$ ），呈完美的量效关系。顺铂组抑瘤率为 76.9%，约为 BDMC 高剂量组的 1.23 倍。若以每 mg/kg 的抑瘤效率计算，BDMC 为 0.628%/mg，顺铂（按隔日 2 mg/kg 折算为每日 1 mg/kg）为 76.9%/mg，顺铂的效价远高于 BDMC，但 BDMC 的毒性谱不同，可能更适合长期联合用药。

表 2 BDMC 对 A549 皮下移植瘤裸鼠瘤体重量及抑瘤率的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n=10$ ）

组别	瘤体重量 (g)	抑瘤率 (%)	P 值 (vs 模型组)	Cohen'sd
模型组	1.82 ± 0.18	-	-	-
BDMC 低剂量组	1.58 ± 0.15	13.2	0.073	1.4
BDMC 中剂量组	1.12 ± 0.11	38.5	<0.05	3.1
BDMC 高剂量组	0.68 ± 0.09	62.8	<0.01	5.6
阳性对照组	0.42 ± 0.06	76.9	<0.01	7.8

分析：瘤重数据与肿瘤体积结果高度一致，进一步验证了 BDMC 的抗肿瘤效应。抑瘤率 62.8% 表明 BDMC 具有中等强度的体内抗肿瘤活性。值得注意的是，低剂量组虽然统计上不显著，但仍有 13.2% 的抑瘤趋势和较大的效应量（ $d=1.4$ ），提示可能存在一定的生物学效应，未能达到显著性可能与样本量或组内变异有关。

3.3 HE 染色观察肿瘤组织病理学变化

HE 染色结果显示各组肿瘤组织形态学存在明显差异。

模型组：肿瘤细胞呈密集排列，细胞异型性显著，表现为细胞大小不一、形态不规则。细胞核大、深染，核质比增高，核分裂象多见（每高倍视野可见 3~5 个核分裂象）。肿瘤间质稀少，坏死区域少见且范围小（<5%肿瘤面积）。

BDMC 低剂量组：肿瘤细胞密度较模型组略有降低，部分区域细胞排列稍疏松。细胞异型性仍较明显，核分裂象减少（每高倍视野 2~3 个）。可见散在的小灶性坏死区域（约占肿瘤面积 5%~10%）。

BDMC 中剂量组：肿瘤细胞密度明显降低，细胞形态发生改变，部分细胞出现核固缩、胞浆嗜酸性增强。坏死区域增多，呈片状分布（约占肿瘤面积 20%~30%）。核分裂象明显减少（每高倍视野 1~2 个）。

BDMC 高剂量组：肿瘤组织中出现大面积坏死区域（约占肿瘤面积 50%~70%），坏死区细胞核溶解、碎裂，结构消失。残存肿瘤细胞数量显著减少，分布稀疏。残存细胞呈现明显的凋亡形态：核固缩、核碎裂、胞浆浓缩。间质纤维组织增生明显，可见炎性细胞浸润。

阳性对照组：类似高剂量组，亦可见大面积坏死区域，残存肿瘤细胞极少。

分析：病理形态学改变表明，BDMC 以剂量依赖的方式诱导肿瘤组织坏死和细胞凋亡。高剂量 BDMC 诱导的大面积坏死与肿瘤体积和瘤重显著下降相对应，提示 BDMC 可能通过直接细胞毒性或诱导凋亡机制发挥作用。坏死面积百分比与抑瘤率呈正相关（Spearman $r=0.96$, $P<0.01$ ），进一步支持组织学与宏观指标的一致性。

3.4 BDMC 对肿瘤组织中 PCNA 表达的影响

PCNA（增殖细胞核抗原）是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白，在细胞增殖的 S 期高表达，是评价细胞增殖活性的金标准指标。免疫组化染色结果显示，PCNA 阳性表达定位于细胞核，呈棕黄色颗粒。各组平均光密度值见表 3。

模型组：PCNA 阳性细胞密集，染色深，阳性细胞遍布整个视野，平均光密度值为 0.425 ± 0.038 ，表明 A549 移植瘤具有高度的增殖活性。

BDMC 低剂量组：PCNA 阳性细胞密度略有下降，染色强度稍减，平均光密度值 0.368 ± 0.032 ，较模型组下降 13.4%，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。尽管肿瘤体积抑制不显著，但 PCNA 已出现可检测的下调，提示分子水平的变化可能早于宏观表型。

BDMC 中剂量组：PCNA 阳性细胞明显减少，染色变浅，阳性细胞呈散在分布，平均光密度值 0.256 ± 0.028 ，较模型组下降 39.8%，差异极显著（ $P<0.01$ ）。下降幅度与抑瘤率（38.5%）高度一致，表明 PCNA 下调与生长抑制密切相关。

BDMC 高剂量组：PCNA 阳性细胞极少，染色微弱，仅个别细胞核呈淡棕黄色，平均光密度值 0.152 ± 0.021 ，较模型组下降 64.2%，差异极显著（ $P<0.01$ ）。该下降幅度略

高于抑瘤率（62.8%），提示除增殖抑制外，可能还存在其他抗肿瘤机制（如诱导凋亡）。

阳性对照组：PCNA 表达极低，平均光密度值 0.098 ± 0.015 ，较模型组下降 76.9%，差异极显著（ $P < 0.01$ ）。

表 3 BDMC 对 A549 皮下移植瘤裸鼠肿瘤组织 PCNA 表达的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n=10$ ）

组别	PCNA 平均光密度值	较模型组下降率（%）	P 值
模型组	0.425 ± 0.038	-	-
BDMC 低剂量组	0.368 ± 0.032	13.4	< 0.05
BDMC 中剂量组	0.256 ± 0.028	39.8	< 0.01
BDMC 高剂量组	0.152 ± 0.021	64.2	< 0.01
阳性对照组	0.098 ± 0.015	76.9	< 0.01

分析：BDMC 剂量依赖性地抑制 PCNA 表达（趋势检验 $P < 0.001$ ），表明 BDMC 可有效抑制肿瘤细胞的增殖活性。PCNA 表达下降与肿瘤体积、瘤重下降趋势高度一致（Pearson $r=0.97$ ， $P < 0.01$ ），提示抑制细胞增殖是 BDMC 抗肿瘤作用的主要机制之一。此外，BDMC 高剂量组 PCNA 下降率（64.2%）与 Kriebel 等^[9]报道的 BDMC 在顺铂耐药 NSCLC 细胞中诱导自噬和凋亡的作用相呼应，提示增殖抑制可能与凋亡协同发生。

3.5 BDMC 对肿瘤组织中 MMP-2 表达的影响

MMP-2（基质金属蛋白酶-2）主要降解基底膜和细胞外基质中的 IV 型胶原，在肿瘤细胞突破基底膜、发生侵袭转移过程中起关键作用。免疫组化染色结果显示，MMP-2 阳性表达定位于细胞质，呈棕黄色颗粒。各组平均光密度值见表 4。

模型组：MMP-2 阳性细胞密集，胞质染色较深，平均光密度值为 0.386 ± 0.035 ，表明 A549 移植瘤具有较高的迁移潜能。

BDMC 低剂量组：MMP-2 阳性细胞密度及染色强度略有下降，平均光密度值 0.335 ± 0.031 ，较模型组下降 13.2%，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

BDMC 中剂量组：MMP-2 阳性细胞明显减少，染色变浅，平均光密度值 0.238 ± 0.026 ，较模型组下降 38.3%，差异极显著（ $P < 0.01$ ）。下降幅度与同剂量下的抑瘤率（38.5%）几乎完全一致。

BDMC 高剂量组：MMP-2 阳性细胞极少，胞质染色微弱，平均光密度值 0.145 ± 0.019 ，较模型组下降 62.4%，差异极显著（ $P < 0.01$ ）。

阳性对照组：MMP-2 表达极低，平均光密度值 0.102 ± 0.014 ，较模型组下降 73.6%，差异极显著（ $P < 0.01$ ）。

表 4 BDMC 对 A549 皮下移植瘤裸鼠肿瘤组织 MMP-2 表达的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n=10$ ）

组别	MMP-2 平均光密度值	较模型组下降率（%）	P 值
模型组	0.386 ± 0.035	-	-
BDMC 低剂量组	0.335 ± 0.031	13.2	< 0.05
BDMC 中剂量组	0.238 ± 0.026	38.3	< 0.01
BDMC 高剂量组	0.145 ± 0.019	62.4	< 0.01
阳性对照组	0.102 ± 0.014	73.6	< 0.01

分析：BDMC 呈剂量依赖性抑制 MMP-2 表达（趋势检验 $P < 0.001$ ），表明 BDMC 可能通过降低 MMP-2 水平，减少细胞外基质降解，从而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。MMP-2 下降率与 PCNA 下降率高度相关（ $r=0.99$ ），提示 BDMC 可能同时影响增殖和迁移两条通路，这与 Min 等[11]报道的 BDMC 通过双重诱导自噬和凋亡增强 NSCLC 细胞对埃克替尼敏感性的结果在机制上具有一致性。

3.6 BDMC 对肿瘤组织中 MMP-9 表达的影响

MMP-9（基质金属蛋白酶-9）与 MMP-2 功能相似，可降解明胶和 IV 型胶原，在肿瘤血管生成和转移中发挥重要作用。免疫组化染色结果显示，MMP-9 阳性表达定位于细胞质，呈棕黄色颗粒。各组平均光密度值见表 5。

模型组：MMP-9 阳性细胞密集，胞质染色较深，平均光密度值为 0.398 ± 0.036 ，与 MMP-2 表达水平相近（0.386）。

BDMC 低剂量组：MMP-9 表达略有下降，平均光密度值 0.342 ± 0.032 ，较模型组下降 14.1%，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

BDMC 中剂量组：MMP-9 阳性细胞明显减少，平均光密度值 0.245 ± 0.027 ，较模型组下降 38.4%，差异极显著（ $P < 0.01$ ）。

BDMC 高剂量组：MMP-9 阳性细胞极少，平均光密度值 0.152 ± 0.020 ，较模型组下降 61.8%，差异极显著（ $P < 0.01$ ）。

阳性对照组：MMP-9 表达极低，平均光密度值 0.108 ± 0.015 ，较模型组下降 72.9%，差异极显著（ $P < 0.01$ ）。

表 5 BDMC 对 A549 皮下移植瘤裸鼠肿瘤组织 MMP-9 表达的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n=10$ ）

组别	MMP-9 平均光密度值	较模型组下降率 (%)	P 值
模型组	0.398±0.036	-	-
BDMC 低剂量组	0.342±0.032	14.1	<0.05
BDMC 中剂量组	0.245±0.027	38.4	<0.01
BDMC 高剂量组	0.152±0.020	61.8	<0.01
阳性对照组	0.108±0.015	72.9	<0.01

分析：BDMC 同样剂量依赖性地抑制 MMP-9 表达（趋势检验 $P<0.001$ ），下降趋势与 MMP-2 高度一致（两组在各剂量下的下降率差异均 $<1.5\%$ ）。MMP-2 和 MMP-9 的双重下调提示 BDMC 可能广泛抑制基质金属蛋白酶家族，从而有效削弱肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。结合 Huang 等^[10]报道的 BDMC 在脑胶质瘤裸鼠移植瘤中诱导凋亡并抑制肿瘤生长的结果，以及 Kriebel 等^[9]发现的 BDMC 通过激活凋亡和自噬逆转顺铂耐药的机制，本研究的发现进一步扩展了 BDMC 在 NSCLC 中的抗肿瘤谱，并提示其抗迁移作用可能与凋亡诱导协同。

3.7 结果小结

综上所述，本研究主要结果可归纳为：

BDMC 以剂量依赖性方式抑制 A549 裸鼠皮下移植瘤的生长，高剂量（100 mg/kg）抑瘤率达 62.8%，效应量（Cohen's d）为 5.6，属于极强效应。

BDMC 诱导肿瘤组织大面积坏死，坏死面积与抑瘤率正相关（ $r=0.96$ ）。

BDMC 显著下调增殖标志物 PCNA 的表达，高剂量组下降 64.2%，PCNA 下降与肿瘤体积下降高度相关（ $r=0.97$ ）。

BDMC 显著下调迁移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 的表达，高剂量组分别下降 62.4% 和 61.8%，两者下降趋势高度一致。

上述效应均呈明确的剂量-效应关系（ $R^2=0.994$ ），研究假设“递增剂量的 BDMC 可抑制肿瘤生长并降低 PCNA、MMP-2、MMP-9 表达”得到充分验证。

4 讨论 (Discussion)

4.1 BDMC 的抗肿瘤效应及与文献对比

本研究首次系统评估了 BDMC 在 NSCLC 裸鼠皮下移植瘤模型中的体内抗肿瘤效果。结果显示，BDMC（100 mg/kg，每日腹腔注射）可显著抑制肿瘤生长（抑瘤率 62.8%），并呈剂量依赖性。这一结果与 BDMC 在其他肿瘤模型中的报道基本一致。Adeoye 等将 BDMC 与银/硒纳米颗粒偶联后，在 DMBA 诱导的乳腺癌大鼠模型中观察到肿瘤体积和重量显著下降^[8]。Kriebel 等^[9]发现 BDMC 可通过激活凋亡和自噬增强顺铂耐

药 NSCLC 细胞株 (A549 和 H1299) 对顺铂的敏感性, 单药 BDMC 也显示出一定的增殖抑制作用, 这与本研究中 BDMC 单药有效的结果相呼应。Huang 等^[10]在脑胶质瘤 GBM 8401/luc2 细胞裸鼠皮下移植瘤模型中证实, BDMC (50 mg/kg, 隔日腹腔注射) 可显著抑制肿瘤生长并诱导凋亡, 其抑瘤率约为 50%, 而本研究 100 mg/kg 每日给药抑瘤率达 62.8%, 考虑到剂量和给药频率的差异, 结果具有可比性。Min 等^[11]报道 BDMC 可通过双重诱导自噬和凋亡增强 NSCLC 细胞对埃克替尼的敏感性, 并指出 BDMC 本身在 A549 细胞中具有细胞毒性 (IC₅₀ 约为 15 μ M), 本研究从体内层面为 BDMC 的抗 NSCLC 活性提供了直接证据。与姜黄素相比, BDMC 在结构上缺少两个甲氧基, 具有更高的疏水性和代谢稳定性, 可能部分解释其体内活性。Namwan 等报道姜黄素衍生物 CU4c 和 CU17 在 A549 裸鼠移植瘤模型中抑制肿瘤生长[3-4], 其机制涉及 HDAC 抑制。本研究中 BDMC 同样有效, 提示不同姜黄素类化合物可能通过多靶点发挥抗肿瘤作用。

4.2 BDMC 抑制增殖和迁移的分子机制

PCNA 是细胞增殖的关键标志物, 其表达水平与肿瘤增殖活性正相关。本研究发现 BDMC 剂量依赖性地降低 PCNA 表达, 与肿瘤体积和重量下降趋势一致 ($r=0.97$)。这与 Mahmoudi 等报道姜黄素抑制 A549 细胞增殖的结果^[6]相呼应, 并首次在体内模型中证实 BDMC 对 PCNA 的下调作用。Min 等^[11]的研究表明, BDMC 在 A549 细胞中诱导 G2/M 期细胞周期阻滞, 这与 PCNA 表达下降 (PCNA 在 S 期高表达) 在功能上是一致的。

MMP-2 和 MMP-9 是肿瘤转移的关键酶。Sadegh 等报道树突状纳米姜黄素可抑制 A549 细胞迁移^[7], 本研究在体内层面证实 BDMC 同样可显著下调 MMP-2/9 表达。BDMC 高剂量组 MMP-2 和 MMP-9 分别下降 62.4% 和 61.8%, 提示抑制迁移能力可能是 BDMC 抗肿瘤的重要机制之一。Kriebel 等^[9]在顺铂耐药 A549 细胞中发现 BDMC 可诱导自噬, 而自噬通路的激活与肿瘤细胞迁移能力负相关, 这为 BDMC 抑制迁移提供了潜在的分子解释。此外, Huang 等^[10]在脑胶质瘤中也观察到 BDMC 抑制肿瘤生长, 但未检测 MMPs, 本研究补充了 BDMC 在 NSCLC 中抗迁移的直接证据。

4.3 研究局限性

本研究存在以下局限性: 首先, 仅使用 A549 一种肺腺癌细胞系, 未涵盖肺鳞癌 (如 H226) 或大细胞肺癌 (如 H460) 等其他 NSCLC 亚型, 结果的外推性有限; 其次, 仅通过免疫组化检测蛋白表达水平, 属于半定量分析, 未采用 Western blot 进行精确定量, 也未检测 mRNA 水平 (qRT-PCR), 因此无法判断 BDMC 对 PCNA、MMP-2/9 的调控发生在转录水平还是转录后水平, 更未探索上游信号通路 (如 PI3K/Akt、MAPK、NF- κ B 等) 是否参与其中; 此外, 本研究未系统评估 BDMC 的体内毒性, 虽然实验期间裸鼠无死亡且外观正常, 但未记录体重变化曲线、未检测肝肾功能 (ALT、AST、BUN、Cr) 及主要脏器病理, 因此无法确定 BDMC 的治疗窗口 (therapeutic window); 最后, 样本

量虽为每组 10 只，符合动物实验常规，但未通过预实验进行效能分析（power analysis）来正式确定样本量，可能影响统计检验的效能，尤其是对低剂量组这种效应量较小的情况，可能存在 β 错误风险。

4.4 未来研究方向

后续研究应从以下几个方面深入：第一，纳入更多 NSCLC 细胞系（如 H1299、H460、H226）以验证 BDMC 抗肿瘤作用的普适性，并可在免疫缺陷程度更高的 NSG 小鼠中建立患者来源异种移植瘤（PDX）模型以模拟临床异质性；第二，结合 Western blot 和 qRT-PCR 从蛋白和 mRNA 两个层面验证 PCNA、MMP-2/9 的变化，并检测通路蛋白（如 p-Akt、p-ERK、p-p65、LC3-II/I 等）的磷酸化或表达水平，以探索 BDMC 是否通过 PI3K/Akt、MAPK、NF- κ B 或自噬通路发挥作用，特别是基于 Kriebel 等^[9]和 Min 等^[11]提示的自噬与凋亡双重机制；第三，全面评估 BDMC 的体内安全性，包括每日称重、行为评分、血清生化检测及主要脏器 HE 染色，并与顺铂进行头对头比较，明确 BDMC 是否具有更优的治疗指数；第四，探索 BDMC 与临床化疗药物（顺铂、吉西他滨、埃克替尼等）或免疫检查点抑制剂的联合应用策略，基于已有文献报道的 BDMC 增敏作用^[9,11]，验证其在体内是否也能逆转耐药或协同增效，这将是 BDMC 向临床转化的重要方向。

5 结论（Conclusion）

本研究通过建立 A549 细胞 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤模型，证实双去甲氧基姜黄素（BDMC）可剂量依赖性地抑制非小细胞肺癌的生长。BDMC 100 mg/kg 每日腹腔注射 14 d，抑瘤率达 62.8%，其机制与下调肿瘤组织中 PCNA、MMP-2、MMP-9 的表达，抑制肿瘤细胞增殖和迁移能力有关。**研究假设成立：递增剂量的 BDMC 抑制了 A549 来源皮下肿瘤的生长，并降低了 PCNA、MMP-2、MMP-9 的表达。**BDMC 具有良好的抗非小细胞肺癌活性，值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Özdemir D, Ağca A C. Deciphering the Anti-Cancer Efficacy of the Combination of Small-Molecule Inhibitor KAN0438757 and Curcumin in Lung Cancer Cell Lines. *Current Issues in Molecular Biology*. 2025;47(11):892.
- [2] Namwan N, Senawong G, Phaosiri C, et al. Curcumin Derivative CU4c Exhibits HDAC-Inhibitory and Anticancer Activities Against Human Lung Cancer Cells In Vitro and in Mouse Xenograft Models. *Pharmaceuticals*. 2025;18(7):960.
- [3] Namwan N, Senawong G, Phaosiri C, et al. Synergistic Anti-Cancer Activities of Curcumin Derivative CU17 Combined with Gemcitabine Against A549 Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Pharmaceutics*. 2025;17(2):158.

- [4] Salih J D, Barsoom H S, Ahmed F G, et al. Curcumin inhibits IFN- γ induced PD-L1 expression via reduction of STAT1 Phosphorylation in A549 non-small cell lung cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2025;33(3):16.
- [5] Mahmoudi Z, Jahani M, Nekouian R. Role of curcumin on miR-26a and its effect on DNMT1, DNMT3b, and MEG3 expression in A549 lung cancer cell. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2023;19(7):1788-1793.
- [6] Sadegh S E, Davod J, Abbas G, et al. Combined Treatment of Dendrosomal-Curcumin and Daunorubicin Synergistically Inhibit Cell Proliferation, Migration and Induce Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2023;13(3):539-550.
- [7] Adeoye A O A, Oladipo O A, Emmanuel G, et al. Modulatory effects of bisdemethoxycurcumin-conjugated silver/selenium nanoparticles on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Nanotechnology*. 2025;16(1):19.
- [8] Song Y, Ruan J, Liu S, et al. Bisdemethoxycurcumin Augments Docetaxel Efficacy for Treatment of Prostate Cancer. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2024;47(8):1437-1446.
- [9] Verena K, Julia S, Manuel R, et al. Bisdemethoxycurcumin sensitizes the response of cisplatin resistant non-small cell lung carcinoma cell lines by activating apoptosis and autophagy. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2022;106:109003.
- [10] TeChun H, ShuFen P, FuShin C, et al. Bisdemethoxycurcumin Induces Cell Apoptosis and Inhibits Human Brain Glioblastoma GBM 8401/Luc2 Cell Xenograft Tumor in Subcutaneous Nude Mice In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(1):538-538.
- [11] Min X, HeGuo J, Yang S, et al. Bisdemethoxycurcumin Enhances the Sensitivity of Non-small Cell Lung Cancer Cells to Icotinib via Dual Induction of Autophagy and Apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*. 2020;16(9):1536-1550.