

探索·发现

姜黄素类似物EF24诱导A549细胞自噬及 凋亡关系的研究

汪宇 周桃 孙韩艳 黄蓓*

(安徽大学生命科学学院, 合肥 230039)

摘要 从细胞自噬及凋亡关系角度探讨姜黄素类似物EF24对A549细胞的杀伤机理。选用不同浓度的EF24对体外培养的A549细胞处理,采用MTT方法检查细胞存活率,吖啶橙染色观察细胞形态,蛋白质免疫印迹(Western blot)方法检测与细胞自噬及凋亡相关蛋白的表达及对AMPK-mTOR-S6K信号通路的影响。结果显示,EF24作用24 h的 IC_{50} 为 $8.5 \mu\text{mol/L}$,对A549细胞生长抑制作用优于姜黄素,而接近顺铂。自噬及凋亡蛋白检测显示,在 $4 \mu\text{mol/L}$ 、 $8 \mu\text{mol/L}$ 时A549细胞以自噬为主,在 $16 \mu\text{mol/L}$ 时以凋亡为主;加入 100 nmol/L 自噬抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)后,细胞存活率同比升高。同时还发现,随着EF24浓度的增加,细胞内AMPK-Thr172磷酸化水平上升,mTOR-Ser2481、S6K-Thr389磷酸化水平的下调。由此可见,EF24可通过AMPK的激活下调mTOR-S6K途径抑制细胞生长,在EF24浓度 $4\text{--}8 \mu\text{mol/L}$ 范围内,自噬对凋亡起到促进作用。

关键词 姜黄素类似物EF24; 自噬; 凋亡

姜黄(curcuma)是传统的中药,是姜科植物*Curcuma Longa* Linn.的根茎,姜黄素(curcumin)是从姜黄中提取的酚类色素,为姜黄的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用。姜黄素可抑制人子宫内膜癌细胞(HEC1B)的增殖,并诱导细胞凋亡,其诱导凋亡机制是将细胞阻滞在 G_2/M 期来实现的^[1]。但姜黄素水溶性差,利用率不高。联苯二氟酮EF24[3,5-bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one]为姜黄素的类似物^[2-3](图1),Andrea等^[4]的研究表明,EF24在对肺癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌中的作用效果要优于姜黄素。Selvendiran等^[5]在对顺铂(cisplatin)有抗性的人卵巢癌细胞研究中发现,EF24可使细胞停滞在 G_2/M 期,引起细胞的凋亡。

AMPK是一种存在于真核细胞中结构高度保守的对能量代谢起关键作用的激酶,是由 $\alpha\beta\gamma$ 亚基组成的复合物。当细胞处于不良环境条件下(如低糖、低氧等)导致AMP/ATP比值增高,致使AMP与AMPK的 γ 亚基结合,活化AMPK的 α 亚基,使其能够与LKB1激酶结合,致使Thr172磷酸化。活化的AMPK可进一步激活结节性硬化复合体(tuberous sclerosis

complex, TSC),并通过TSC抑制其下游底物哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)^[6]。在酵母的研究中发现:当TOR被抑制时,Atg13激酶的部分去磷酸化导致了其与Atg1蛋白激酶的结合加强,从而激活了Atg1,进而导致自噬的产生^[7-9]。在营养充足条件下,细胞内AMP/ATP比值下降,AMPK活性受到抑制,激活AKT-mTOR-S6K信号通路,AKT通过抑制TSC的活性,从而激活mTOR来调节细胞的生长代谢^[10]。AKT通过改变促凋亡蛋白Bax的构象,防止线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)的改变、阻止细胞色素C的释放及caspase-3的激活,继而抑制细胞凋亡^[11]。

自噬最初被认为是在营养匮乏时细胞将自身的胞质成分、细胞器消化转化成能量以便生存^[12-13];在肿瘤发生过程中,自噬可使其逃避细胞死亡^[14]。凋亡是细胞接受某些信号刺激后,在特定的基因调控下进行的一种主动性消亡过程,称为I型程序性细胞

收稿日期: 2012-01-17 接受日期: 2012-03-13

安徽省高校自然科学基金(No.KJ2012A030)资助项目

*通讯作者。Tel: 0551-5107341, E-mail: beihuang@163.com

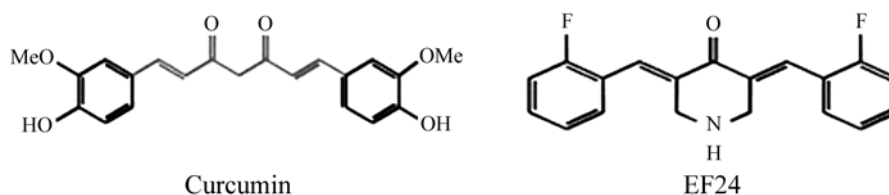


图1 姜黄素和EF24的结构式

Fig.1 Structures of curcumin and EF24

死亡^[15]。在细胞饥饿、生长因子缺乏时,自噬对维持细胞的存活起到一定的积极作用,然而过度的自噬能够引起细胞死亡,称为II型程序性细胞死亡。齐亚莉等^[16]用电离辐射诱导人乳腺癌细胞产生自噬,并促进细胞凋亡。自噬与凋亡的关系较为复杂,表现为:(1)自噬为凋亡所必需,自噬先于凋亡,进而促进凋亡;(2)自噬抑制凋亡,使肿瘤细胞凋亡率下降^[17];(3)自噬与凋亡共同促进细胞死亡,抑制其中之一都会转变为另一种细胞死亡途径^[18-19]。

本研究以人肺腺癌细胞系A549细胞作为研究对象,探讨EF24对A549细胞自噬和凋亡的调控关系及其对AMPK-mTOR-S6K细胞信号传导通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

EF24由美国Emory大学付海安教授惠赠,姜黄素、吖啶橙购于上海生工生物工程有限公司,顺铂、渥曼青霉素(wortmannin)、溴化二甲基噻唑二苯四氮唑(MTT)购于Sigma公司,A549细胞购于ATCC公司;caspase-3、LC3抗体、AMPK、AMPK-Thr172抗体购于Cell Signalling公司,mTOR、mTOR-Ser2481、S6K、S6K-Thr389购于Santa Cruz公司,荧光显微镜(olympus BX51)。

1.2 方法

1.2.1 MTT法 先用DMSO(二甲基亚砷)将EF24配置成10 mmol/L的母液,然后按实验要求再用DMEM培养液稀释成一定的浓度。

将 3×10^4 /mL的A549细胞接种于96孔板中,每孔100 μ L,加不同浓度的EF24溶液,静止培养12 h、24 h后加入10 μ L MTT溶液(5 mg/mL用PBS配制,pH 7.5)。继续孵育4 h后,每孔加入150 μ L DMSO,使MTT完全溶解;选择在490 nm波长处,用酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。按下公式计算细胞存活率:

细胞存活率=(加药组D值-空白组D值)/(对照组

D值-空白组D值) $\times 100\%$

1.2.2 细胞自噬形态学观察 接种细胞密度为 3×10^4 /mL的A549细胞于6孔板中,加入不同浓度的EF24溶液,培养24 h后加入终浓度为1 μ g/mL吖啶橙,染色15 min后荧光显微镜观察。

1.2.3 Western blot检测蛋白表达 接种细胞密度为 3×10^4 /mL的A549细胞于6孔板中,加入不同浓度的EF24溶液培养24 h,收集细胞,离心加入上样缓冲液;煮沸10 min后上样。以 β -actin为内参,SDS-PAGE电泳分离,电转至PVDF膜上。PVDF膜经封闭液封闭2 h后,加入一抗,4 $^{\circ}$ C过夜。用辣根过氧化物酶标记的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育2 h,TBST缓冲液洗涤后,ECL发光法检测蛋白表达。

1.2.4 统计学方法 采用SPSS 17.0软件处理收据,数据采用means \pm SD,用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计意义,实验数据均重复三次以上。

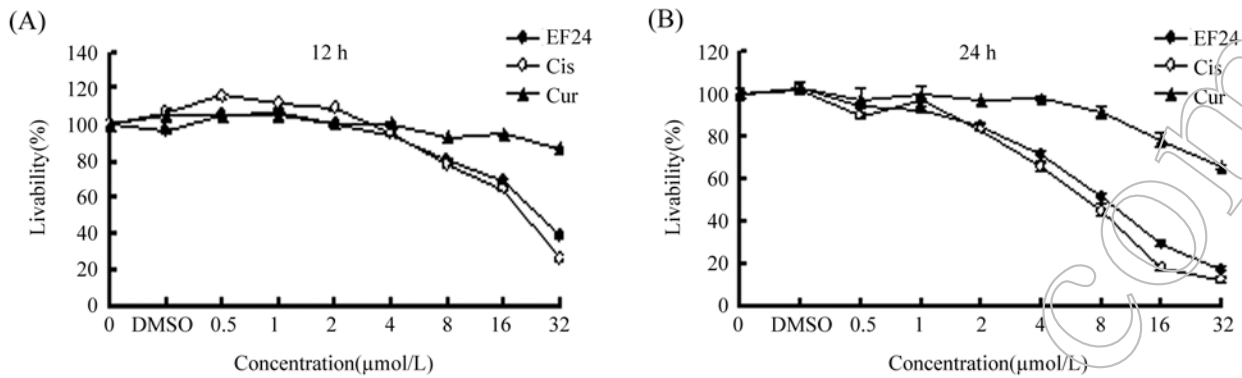
2 结果

2.1 EF24抑制A549增殖

用不同浓度的EF24处理A549细胞,分别在12 h、24 h时检测细胞存活率,结果显示,EF24抑制A549细胞的增殖,且抑制效果随着浓度、时间的增加而增强,12 h、24 h时EF24的IC₅₀分别在27 μ mol/L、8.5 μ mol/L,与姜黄素、顺铂作对照发现,EF24对A549细胞的抑制率大于姜黄素(12 h及24 h的IC₅₀>32 μ mol/L),接近顺铂(12 h、24 h的IC₅₀分别为24 μ mol/L和7.5 μ mol/L)。

2.2 EF24引起细胞自噬及凋亡

吖啶橙可使细胞质和细胞核分别染上暗红色和亮绿色,酸性囊泡被染成亮红色^[20-22]。在自噬发生后,自噬泡与酸性囊泡溶酶体结合形成自噬溶酶体,此时的酸性囊泡被吖啶橙着色,作为后期自噬的一种标志^[23]。渥曼青霉素是PI3K激酶的抑制剂;在



A: 细胞处理12 h; B: 细胞处理24 h; 二甲基亚砜(0.32%)。

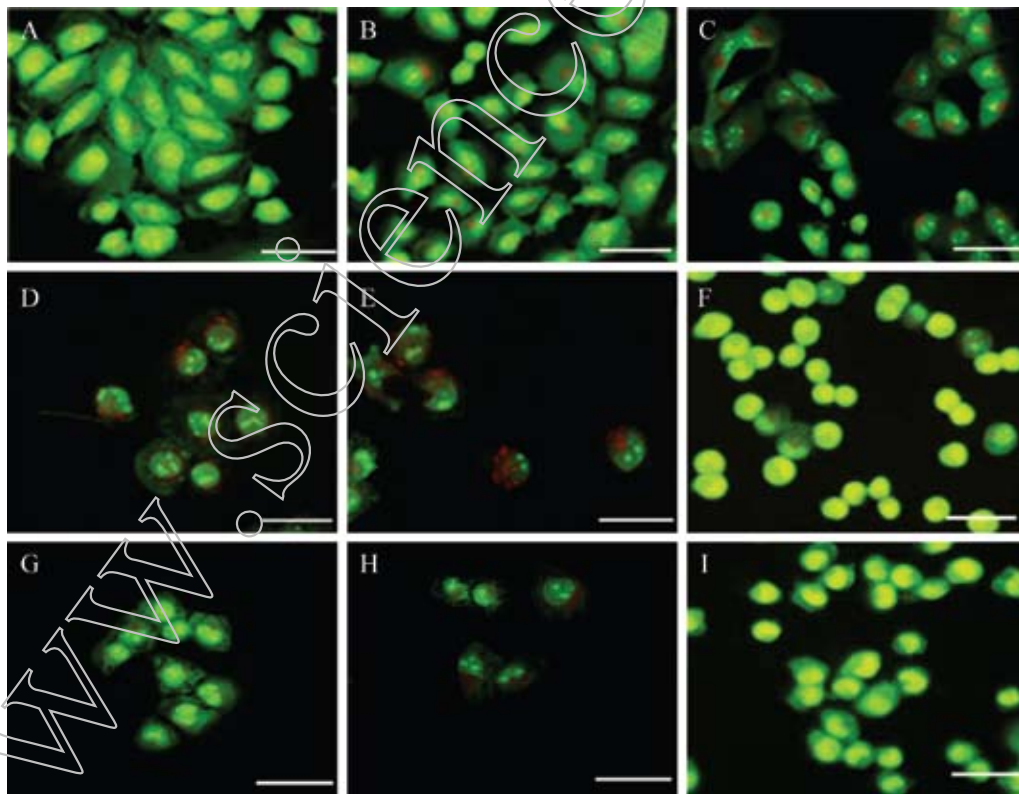
A: cells were treated with 12 h; B: cells were treated with 24 h; DMSO(0.32%)。

图2 三种化合物对A549肺癌细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of three compounds on the livability of A549 cell line

自噬早期阶段,抑制自噬体的形成^[24]。用不同浓度的EF24处理A549细胞24 h后吖啶橙染色观察其细胞形态的变化,结果显示,与对照相比,低浓度的EF24(1, 2 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞形态无异常(图3A~图3C); 4, 8 $\mu\text{mol/L}$ EF24处理的细胞,细胞质出现空泡化,酸性

囊泡增多(图3D和图3E),而大部分细胞核未发生明显变化;当同时加入100 nmol/L渥曼青霉素后,酸性囊泡相对减少(图3G和图3H);而单独加入16 $\mu\text{mol/L}$ EF24时,细胞核固缩、细胞形态变圆(图3F);再加入渥曼青霉素后,细胞形态变化不明显(图3I)。



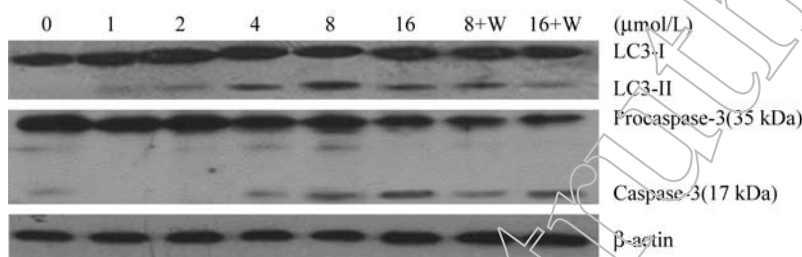
A: 0 $\mu\text{mol/L}$ EF24; B: 1 $\mu\text{mol/L}$ EF24; C: 2 $\mu\text{mol/L}$ EF24; D: 4 $\mu\text{mol/L}$ EF24; E: 8 $\mu\text{mol/L}$ EF24; F: 16 $\mu\text{mol/L}$ EF24; G: 4 $\mu\text{mol/L}$ EF24+W; H: 8 $\mu\text{mol/L}$ EF24+W; I: 16 $\mu\text{mol/L}$ EF24+W; W: wortmannin. Bar=50 μm .

图3 不同浓度EF24引起A549细胞自噬及凋亡的形态学观察(吖啶橙染色, 24 h)

Fig.3 Morphology observation of autophagy and apoptosis induced by different concentrations of EF24 in A549 cell line (acridine orange staining, 24 h)

同时,我们还利用LC3及caspase-3作为细胞自噬与凋亡检测的分子标志。LC3有两种类型,即LC3-I(18 kDa)和LC3-II(16 kDa),自噬发生时LC3-I降解为LC3-II,前者存在细胞溶质中,后者表达于自噬体膜上^[25]。Caspase-3为凋亡的执行人,在正常细胞中主要以无活性的酶原(procaspase-3)形式存在。Procaspase-3被剪切后,形成活化的caspase-3。Western blot方法检测LC3的活性变化时发现:在2~8 $\mu\text{mol/L}$ 的EF24范围内,随着浓度的增加,LC3-I

型降解成LC3-II型的比例增加,在8 $\mu\text{mol/L}$ 的EF24自噬的效果最明显,16 $\mu\text{mol/L}$ 处理组LC3-II型的比例开始降低。Caspase-3表达变化检测发现:与对照组相比,4 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的procaspase-3降解成caspase-3的比例有所增加,16 $\mu\text{mol/L}$ 处理组效果最明显(图4),此结果与图3的形态学观察结果一致,即小于8 $\mu\text{mol/L}$ 的EF24处理组在24 h时主要诱发A549细胞发生自噬,而大于16 $\mu\text{mol/L}$ 的EF24处理组主要引起细胞凋亡。



W: 渥曼青霉素; 实验至少进行三次独立性的重复。

W: wortmannin; Experiments were repeated at least three times independently.

图4 不同浓度EF24引起A549细胞自噬及凋亡相关蛋白检测(Western blot, 24 h)

Fig.4 Detection of Autophagy and apoptosis-related protein in A549 cell line treated with different concentration of EF24 (Western blot, 24 h)

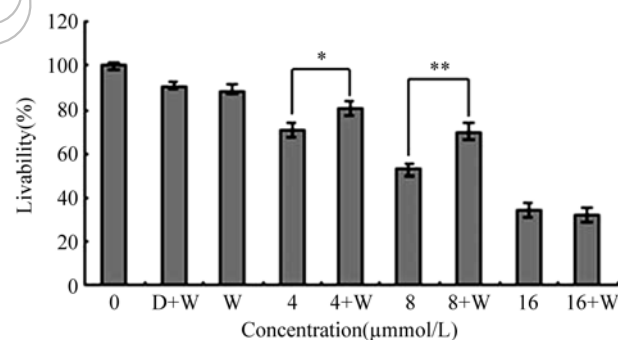
2.3 自噬促进细胞凋亡

为探讨EF24处理后所引起的A549细胞自噬与凋亡相互关系及对细胞存活率的影响,本实验在EF24处理并同时加入100 nmol/L的自噬抑制剂渥曼青霉素后检测其对细胞存活率及LC3、caspase-3活性的变化,结果显示:在EF24为4 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$ 时与单独加药组相比较其细胞存活率分别升高了15%、20%左右,呈现显著性差异、极显著性差异,而16 $\mu\text{mol/L}$ EF24加渥曼青霉素后对A549的存活率没有影响(图5);另一方面,8 $\mu\text{mol/L}$ 的EF24加渥曼青霉素处理组的LC3-I降解成LC3-II的比例减少,procaspase-3降解成caspase-3的比例减少,而16 $\mu\text{mol/L}$ EF24加渥曼青霉素后procaspase-3、caspase-3的活性影响不明显(图4),因为16 $\mu\text{mol/L}$ EF24引起的主要是细胞凋亡(图3)。

实验结果说明,当渥曼青霉素抑制自噬后,细胞存活率增加,细胞凋亡减弱,提示在本实验EF24对A549细胞处理中自噬促进细胞凋亡。

2.4 EF24引起AMPK、mTOR、S6K蛋白表达的变化

为探讨EF24是否通过AMPK-mTOR-S6K细胞信号传导通路来影响A549细胞的生存与死亡,本实



D: 0.32% 二甲基亚砜; W: 渥曼青霉素(100 nmol/L); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

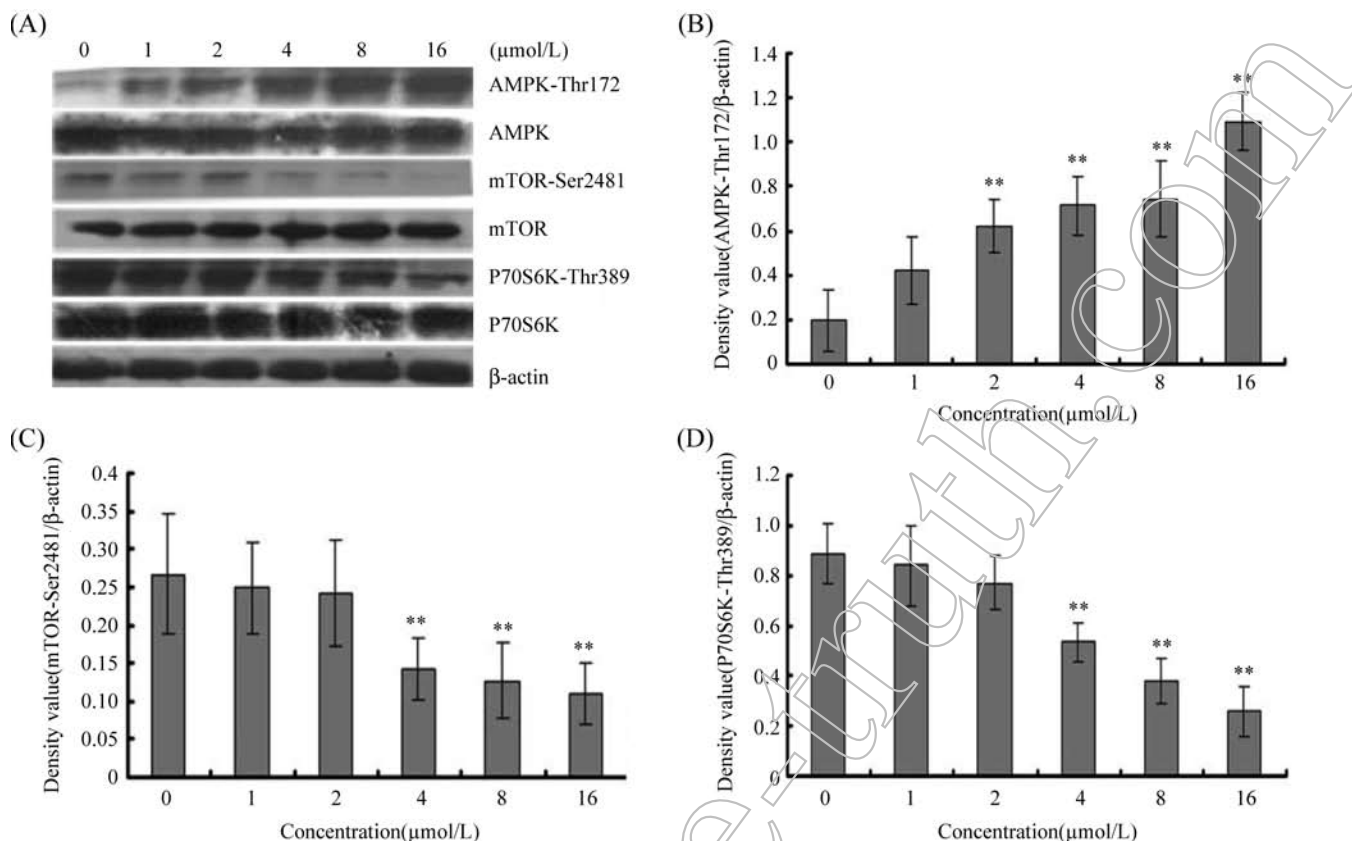
D: 0.32% DMSO; W: wortmannin(100 nmol/L); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 EF24联合渥曼青霉素对A549细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of EF24 with or without wortmannin on the livability of A549 cell line

验用Western blot方法检测不同浓度EF24处理组对该通路关键蛋白AMPK、mTOR、S6K活性的影响。

结果显示:随着EF24浓度的增加,AMPK-Thr172磷酸化水平逐渐增加;但mTOR-Ser2481、S6K-Thr389磷酸化水平逐渐下降。说明EF24通过提高AMPK磷酸化水平来下调mTOR、S6K的激酶活性从而抑制细胞生长,同时,mTOR活性的降低也促进了自噬的产生(图6)。



A: AMPK、mTOR、S6K活性的检测(蛋白免疫印迹法); B、C、D 分别为AMPK、mTOR、S6K灰度值(磷酸化蛋白/ β -肌动蛋白)。实验进行三次独立性的重复。与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ** $P < 0.01$ 。

A: AMPK, mTOR and S6K were detected by Western blot; B, C and D were the density value of AMPK, mTOR and S6K(phosphorylated protein/ β -actin). Experiments were repeated three times independently. ** $P < 0.01$, compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group.

图6 EF24对AMPK-mTOR-S6K信号传导通路关键蛋白的影响

Fig.6 Effect of EF24 on the key protein of AMPK-mTOR-S6K signaling pathway

3 讨论

自噬和凋亡在维持机体正常运转的过程中发挥着重要的作用,早期的肿瘤治疗方法是诱导肿瘤细胞的凋亡,而在治疗过程中,一些肿瘤细胞产生了抗性。自噬作为另一种程序性死亡方式已经成为新的研究热点。自噬就像一把双刃剑,研究药物处理肿瘤细胞过程中其与凋亡的关系显得尤为重要。

本研究用不同浓度的姜黄素类似物EF24处理A549细胞12 h及24 h发现,抑制细胞的生长呈现时间、剂量依赖关系。形态学观察及分子标记检测结果显示:4 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$ 的EF24处理24 h时,A549细胞经吖啶橙染色及蛋白检测显示以自噬为主;药物浓度为16 $\mu\text{mol/L}$ 时,A549细胞以凋亡为主;并证明自噬对凋亡起到促进的作用。Jia等^[26]研究用姜黄素处理K562细胞过程中发现,K562细胞既有自噬也有凋亡现象,且自噬对凋亡起促进作用,该实

验还证明线粒体通透性的改变在自噬与凋亡过程中起到重要作用。Aoki等^[27]研究表明,姜黄素可通过自噬抑制恶性神经胶质瘤细胞的生长。姜黄素抑制AKT-mTOR-S6K通路并激活ERK信号通路从而产生自噬性细胞死亡,但未发生凋亡。Liu等^[28]以顺铂处理EC9706细胞后,细胞产生自噬抑制细胞凋亡。药物作用细胞后,自噬产生不同的效果,可能与细胞种类、药物浓度、药物作用时间等有密切的关系。

本实验的结果发现:当EF24处理A549细胞24 h,AMPK的Thr172的磷酸化随着药物浓度的增加而增强。磷酸化的AMPK下调mTOR-Ser2481及S6K-Thr389的活性,抑制蛋白质的合成,同时mTOR活性的抑制也促进自噬的产生。另一方面,EF24也可能通过抑制AKT的活性,激活促凋亡蛋白Bax,通过线粒体膜电位的改变,引起caspase-3的活化而导致细胞凋亡,中间过程仍需要进一步实验来证明。

在作用效果方面, EF24对A549细胞的抑制率要大于姜黄素(12 h及24 h的 $IC_{50}>32 \mu\text{mol/L}$), 接近cisplatin(12, 24 h的 IC_{50} 分别为24, $7.5 \mu\text{mol/L}$)。可能因为在一定浓度及时间范围内, 自噬对凋亡起到促进的作用, 且通过激活AMPK活性、抑制mTOR及S6K蛋白活性来增强EF24对A549细胞的杀伤效果。

本实验结果为研究EF24对肿瘤细胞的作用机理, 尤其是在探讨自噬与凋亡相互关系对细胞的杀伤效果方面提供了一些新的思路, 如何合理运用自噬促进剂或抑制剂从而达到快速细胞死亡的目的也是有待进一步探讨的问题。

参考文献 (References)

- 李伟宏, 焦金菊, 王青青, 常志杰. 姜黄素对子宫内腺癌细胞增殖和凋亡的影响. 数理医药学杂志(Li Weihong, Jiao Jinju, Wang Qingqing, Chang Zhijie. Effects of curcumin on proliferation and apoptosis in human endometrial carcinoma cells. Journal of Mathematical Medicine) 2009; 22(2): 141-3.
- Subramaniam D, May R, Sureban SM, Lee KB, George R, Kuppusamy P, *et al.* Diphenyl difluoroketone: A curcumin derivative with potent *in vivo* anticancer activity. Cancer Res 2008; 68(6): 1962-9.
- Sun AM, Shoji M, Lu YJ, Liotta DC, Snyder JP. Synthesis of EF24-tripeptide chloromethyl ketone: A novel curcumin-related anticancer drug delivery system. J Med Chem 2006; 49(11): 3153-8.
- Kasinski AL, Du YH, Thomas SL, Zhao J, Sun SY, Khuri FR, *et al.* Inhibition of I κ B kinase-nuclear factor- κ B signaling pathway by 3,5-bis(2-fluorobenzylidene) piperidin-4-one(EF24), a novel monoketone analog of curcumin. Mol Pharmacol 2008; 74(3): 654-61.
- Selvendiran K, Tong LY, Vishwanath S, Bratasz A, Trigg NJ, Kutala VK, *et al.* EF24 induces G₂/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. J Biol Chem 2007; 282(39): 28609-18.
- Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. Acta Physiol 2009; 196(1): 65-80.
- Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. Cell 2000; 103(2): 253-62.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo SQ, Oroz LG, *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet 2004; 36(6): 585-95.
- Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH. Molecular mechanism and regulation of autophagy. Acta Pharmacol Sin 2005; 26(12): 1421-34.
- Albanel J, Dalmases A, Rovira A, Rojo F. mTOR signalling in human cancer. Clin Transl Oncol 2007; 9(8): 484-93.
- Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. Oncogene 2001; 20(53): 7779-86.
- 李华顺. AMPK和mTOR的自噬姻缘. 中国细胞生物学学报(Li Huashun. Autophagy relationship between AMPK and mTOR. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(3): 336.
- Gustafsson AB, Gottlieb RA. Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. J Mol Cell Cardiol 2008; 44(4): 654-61.
- Levine B. Cell biology: Autophagy and cancer. Nature 2007; 446(7137): 745-7.
- 尚莹, 陆羨. 肿瘤治疗过程中凋亡与自噬的关系. 现代生物医学进展(Shang Ying, Lu Xian. The relationship between apoptosis and autophagy in tumor therapy. Progress in Modern Biomedicine) 2010; 10(4): 766-9.
- 齐亚莉, 张震宇, 王洪艳, 李金华, 龚守良. 电离辐射诱导人乳腺癌细胞自噬与凋亡的关系. 吉林大学学报(医学版)(Qi Yali, Zhang Zhenyu, Wang Hongyan, Li Jinhua, Gong Shouliang. Relationship between autophagy and apoptosis of MCF-7 cells induced by ionizing radiation. Journal of Jilin University, medicine edition) 2009; 35(6): 1007-10.
- Zhang HY, Kong XX, Kang JS, Su J, Li Y, Zhong JT, *et al.* Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human Glioma U251 cells. Toxicol Sci 2009; 110(2): 376-88.
- Maiuri MC, Zaickvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. Mol Cell Biol 2007; 27(9): 741-52.
- Lerner AE, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: Autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Differ 2009; 16(7): 966-75.
- Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, *et al.* A novel response of cancer cell to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. Cancer Res 2001; 61(2): 439-44.
- Mains RE, May V. The role of a low pH intracellular compartment in the processing, store, and secretion of ACTH and endorphin. J Biol Chem 1988; 263(16): 7887-94.
- Traganos F, Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: Supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocytes subpopulations. New York: Academic Press, 1994: 185-94.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Autophagy 2008; 4(2): 151-75.
- Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. Eur J Biochem 1997; 243(1/2): 240-6.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda t, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. EMBO J 2000; 19(21): 5720-8.
- Jia YL, Li J, Qin ZH, Liang ZQ. Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells. J Asian Nat Prod Res 2009; 11(11): 918-28.
- Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. Evidence that curcumin suppress the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* through induction of autophagy: Role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. Mol Pharmacol 2007; 72(1): 29-39.
- Liu DL, Yang Y, Liu Q, Wang JJ. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. Med Oncol 2011; 28(1): 105-11.

Study on the Relationship between Autophagy and Apoptosis in A549 Cells Induced by Curcumin Analogue EF24

Wang Yu, Zhou Tao, Sun Hanyan, Huang Bei*

(School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China)

Abstract This paper studies the cytotoxicity mechanism of curcumin analogue EF24 in A549 cell line (human lung adenocarcinoma cells) through the relationship between autophagy and apoptosis. After treatment with different concentrations of EF24 in A549 cell line, we used MTT assay to check cell viability, acridine orange staining to observe cell morphology change, and Western blot to detect cell autophagy and apoptosis-related protein in AMPK-mTOR-S6K signaling pathway. These results showed that the half lethal dose IC_{50} of EF24 in A549 cell line at 24 h was $8.5 \mu\text{mol/L}$, which was more less than curcumin and similar to cisplatin. With the detection of autophagy and apoptosis-related protein, we found that autophagy was a mainly phenomenon at the concentration of $4 \mu\text{mol/L}$ and $8 \mu\text{mol/L}$, however, the apoptosis played an important role at the concentration of $16 \mu\text{mol/L}$; Autophagy inhibitor wortmannin (100 nmol/L) could partly increase the cell survival rate. Meanwhile, we also found the increasing phosphorylation level of AMPK-Thr172 and decreasing phosphorylation level of mTOR-Ser2481 and S6K-Thr389 after treatment with EF24. Our results indicate that EF24 inhibited cell growth in A549 cell line through activating AMPK kinase and attenuate the mTOR-S6K pathway. Autophagy promoted cell apoptosis in the concentration range of $4\sim 8 \mu\text{mol/L}$ EF24.

Key words curcumin analogue EF24; autophagy; apoptosis

Received: January 17, 2012 Accepted: March 13, 2012

This work was supported by the Nature Science Fund of Colleges and Universities in Anhui Province (No.KJ2012A030)

*Corresponding author. Tel: 86-551-5107341, E-mail: beihuang@163.com