doi:10.11659/jjssx.09E025050

·基础研究·

虾青素对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响

朱宁伟[1],俞淑芳[1],赵嫣嫣[1],姚佳琪[2],应晶晶[2] (1.浙江药科职业大学药学院,浙江 宁波 315100;2.宁波市第二医院药学部,浙江 宁波 315010)

[摘 要] **目的** 探究虾青素对非小细胞肺癌A549细胞增殖、迁移和凋亡的影响及可能的作用机制。**方法** 采用不同浓度虾青素(1 mmol/L、2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L和8 mmol/L)干预A549细胞,采用CCK-8法检测不同浓度虾青素对非小细胞肺癌A549细胞增殖的影响;采用细胞划痕实验检测细胞迁移率;采用Hoechst33342染色和JC-1染色检测虾青素对非小细胞肺癌A549细胞凋亡的影响;采用Western blot检测凋亡相关蛋白NF-κB、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、Caspase-3表达。**结果** 虾青素能够抑制A549细胞增殖和迁移($P<0.05$),并促进细胞凋亡($P<0.05$);虾青素能够下调A549细胞NF-κB和Bcl-2蛋白表达($P<0.05$),并上调Bax和Caspase-3蛋白表达($P<0.05$)。**结论** 虾青素能够抑制A549细胞增殖和迁移,并通过NF-κB通路引起A549细胞凋亡。

[关键词] 非小细胞肺癌;A549细胞;虾青素;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R284.1;R917 [文献标志码] A [收稿日期] 2025-09-12

Effects of astaxanthin on proliferation, migration and apoptosis of non-small cell lung cancer cells

ZHU Ning-wei[1],YU Shu-fang[1],ZHAO Yan-yan[1],YAO Jia-qi[2],YING Jing-jing[2] (1.Department of Pharmacy,Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo Zhejiang 315100, China;2. Department of Pharmacy, Ningbo No.2 Hospital, Ningbo Zhejiang 315010, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of astaxanthin on proliferation, migration and apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells and the possible mechanism of action. **Methods** A549 cells were treated with various concentrations of astaxanthin (1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 6 mmol/L and 8 mmol/L), and the effects of different concentrations of astaxanthin on the proliferation of non-small cell lung cancer A549 cells were assessed by the CCK-8 assay. The cell migration rate was detected by scratch wound healing assay. The effect of astaxanthin on apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells was detected by Hoechst33342 staining and JC-1 staining. The expression levels of apoptosis related proteins NF-κB, B cell lymphoma/leukemia-2(Bcl-2), Bcl-2-associated X protein(Bax), Caspase-3 were detected by Western blot. **Results** Astaxanthin could inhibit the proliferation and migration of A549 cells($P<0.05$), and promote cell apoptosis($P<0.05$). Astaxanthin could down-regulate the expression levels of NF-κB and Bcl-2 proteins of A549 cells ($P<0.05$), and up-regulate the expression levels of Bax and Caspase-3 proteins($P<0.05$). **Conclusion** Astaxanthin suppresses the proliferation and migration of A549 cells, and induce apoptosis of A549 cells via the NF-κB pathway.

Keywords: non-small cell lung cancer;A549 cells;astaxanthin;cell proliferation;cell apoptosis

肺癌是生物医学领域最具挑战性的疾病之一,其中非小细胞肺癌是其主要病理类型,占80%以上[1]。近年来的调查发现,肺癌的发病率与病死率居高不下,已成为威胁人类生命健康的重大公共卫生问题,同时也给社会带来了沉重的疾病负担[2]。因此,研发新型抗癌药物已成为当前肿瘤药物研发领域亟待攻克的核心问题。

虾青素是一种具有强抗氧化活性与抗炎特性的天然活性物质[3-4],同时兼具抗肿瘤、抗凋亡、免疫调节等多种生物学活性,且其抗肿瘤活性已成为当前研究的热点[5]。研究证实,虾青素对肝癌、乳腺癌细胞等多种癌细胞都具有抑制作用。虾青素可呈浓度依赖性地促进小鼠肝癌细胞以及人类肝癌细胞线粒体凋亡,其机制与JAK1/STAT3、NF-κB P65和Wnt/β-catenin相关[6];Kim等[7]的研究表明,虾青素可通过MAPK通路调节相关凋亡分子的表达来诱导SKBR3乳腺癌细胞的凋亡。越来越多的研究显示,虾青素可以介导相关通路诱导癌细胞凋亡[5,8],有望成为肿瘤治疗领域中极具潜力的候选药物。

目前,国内外关于虾青素作用于非小细胞肺癌的相关研究尚处于初步探索阶段,虽已证实虾青素对于肺癌细胞具有一定抑制作用,但其具体作用机制仍需系统且深入的研究。在虾青素抑制癌细胞凋亡的众多通路中,NF-κB通路可能扮演了重要的角色,早期肺

[基金项目] 浙江省卫生健康行业科技计划项目(2025HY0999);宁波市自然科学基金项目(2024J356);宁波市卫生健康科技计划项目(2024Y11);朱绣山先生人才奖励基金项目(2023HMJQ34)

[通信作者] 应晶晶,E-mail:yingjingjing0616@163.com

癌组织中多伴有NF-κB通路的激活[9-10]；且NF-κB的过表达广泛存在于非小细胞肺癌及小细胞肺癌患者的肿瘤样本中，与癌症进展、转移及不良预后密切相关[11]。另有研究证实，NF-κB表达与B细胞淋巴瘤/白血病-2（B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2）表达呈正向关，与Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein, Bax）表达呈负相关[12]，而Bcl-2、Bax蛋白表达水平与细胞增殖、凋亡等有关。然而对于虾青素能否通过NF-κB通路引起非小细胞肺癌凋亡，从而抑制非小细胞肺癌细胞A549增殖目前尚不清楚。据此，本研究探讨虾青素对A549细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制，旨在为虾青素用于肺癌治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞株与药物

非小细胞肺癌A549细胞（批号：FH0045）购自上海富衡生物科技有限公司；虾青素（批号：SML0982）购自美国默克Sigma；抗NF-κB（批号：66535）、抗Bcl-2（批号：60178-1-Ig）、抗Bax（批号：60267-1-Ig）、抗Caspase-3（批号：66470-2-Ig）、β-actin（批号：66009-1-Ig）购自武汉Proteintech。

1.2 A549细胞复苏培养

将装有A549细胞的冻存管取出后，快速移至37 ℃水浴锅中恒温加热1 min左右，并轻轻晃动冻存管，使之全部溶解。于超净工作台内将A549细胞液转移到细胞培养液中，然后倒入细胞培养瓶，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。

1.3 虾青素浓度配制及细胞分组

取1 mg虾青素，加入1.68 mL DMSO配制成浓度为10 mmol/L的母液。取配制好的母液50 μL、100 μL、200 μL、300 μL和400 μL，分别加入450 μL、400 μL、300 μL、200 μL和100 μL培养基稀释，最终得到浓度分别为1 mmol/L、2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L和8 mmol/L的虾青素溶液。将浓度为1 mmol/L的虾青素溶液作为虾青素低剂量组；取配制好的母液150 μL，加入350 μL培养基稀释混合得到浓度为3 mmol/L的虾青素溶液作为虾青素高剂量组，对照组仅加入对应剂量培养基。

1.4 CCK-8法检测细胞增殖能力

将A549细胞接种到96孔板中，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。24 h后细胞成指数生长，分别加入不同浓度梯度（1 mmol/L、2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L、8 mmol/L）的虾青素，设置3个复孔，置于细胞培养箱中培养，然后每孔加入10 μL CCK-8溶液（上海碧云天，批号：C0037），继续在细胞培养箱中避光培养2 h。使用多功能酶标仪测定450 nm波长处的吸光度。细胞抑制率=[(Ac−As)/(Ac−Ab)]×100%，As为实验孔吸光度；Ac为对照孔吸光度；Ab为空白孔吸光度。

1.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

取对照组、虾青素低剂量组、虾青素高剂量组A549细胞并接种到相应孔中，每组3个复孔。使用无菌移液器枪头，沿提前标记的直线垂直于细胞培养板底面的方向匀速进行划痕，然后用PBS冲洗至划痕区域干净，置于培养箱中培养。分别在0、24 h时，于显微镜下拍照记录。利用Image J图像分析软件计算划痕区域面积，细胞迁移率=(0 h划痕面积−24 h划痕面积)/0 h划痕面积×100%，实验重复3次。

1.6 Hoechst33342染色检测细胞凋亡情况

取对照组、虾青素低剂量组、虾青素高剂量组A549细胞并接种到相应孔中，每组3个复孔。在培养箱中培养24 h后用PBS清洗，加入4%多聚甲醛室温固定30 min，吸出多聚甲醛后用PBS清洗3次，每孔加入Hoechst33342染液800 μL，置于恒温箱30 min。弃去染液后，用PBS清洗2次，在荧光显微镜镜下拍照，观察细胞核形态。

1.7 JC-1染色

取对照组、虾青素低剂量组、虾青素高剂量组A549细胞并接种到相应孔中，每组3个复孔。培养24 h后，吸除培养液，PBS清洗细胞1次，加入1 mL细胞培养液。加入1 mL JC-1染色工作液（杭州联科生物，批号：MJ101），充分混匀后于细胞培养箱中37 ℃孵育20 min。孵育期间，按照每1 mL JC-1染色缓冲液（5×）加入4 mL蒸馏水的比例，配制适量的JC-1染色缓冲液（1×），并放置于冰浴。孵育结束后，吸除上清，用JC-1染色缓冲液（1×）清洗2次。加入2 mL细胞培养液，荧光显微镜下观察。JC-1染色线粒体膜电位正常发出橙红色荧光，线粒体膜电位较低时，红色荧光转变成绿色荧光。

1.8 Western blot检测NF-κB、Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白水平

取对照组、虾青素低剂量组、虾青素高剂量组A549细胞并接种到相应孔中，每组3个复孔。培养24 h，提取蛋白后采用BCA法测定细胞中蛋白总含量。应用10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至PVDF膜。将PVDF膜与5%的脱脂奶粉室温封闭1 h后，分别加入NF-κB、Bcl-2、Bax、Caspase-3（1∶1 000）及β-actin（1∶4 000）一抗4 ℃孵育过夜后洗膜，二抗（武汉Proteintech，批号：SA00001-1，）室温孵育2 h后进行显影。使用Image J软件处理图像并提取数据。

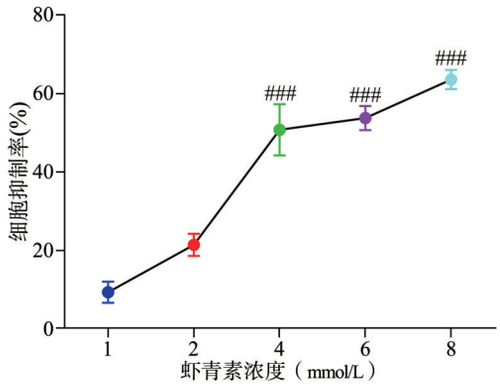
1.9　统计学分析

数据分析及处理采用SPSS 26.0软件，结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组数据比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用*LSD*法，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　CCK-8实验结果

CCK-8实验结果显示，虾青素作用A549细胞24 h时，随着浓度增加，A549细胞的抑制率逐渐增高（图1）。虾青素浓度为4 mmol/L、6 mmol/L和8 mmol/L时细胞抑制率显著高于虾青素浓度为1 mmol/L的细胞抑制率，差异具有统计学意义（$P<0.001$）。因4 mmol/L虾青素处理后细胞存活率较低，无法进行蛋白检测，而2 mmol/L与1 mmol/L浓度接近，故后续实验选择3 mmol/L浓度。



###：与1 mmol/L相比，$P<0.001$

图1　虾青素对A549细胞增殖的影响

2.2　细胞划痕实验结果

细胞划痕实验结果显示，与对照组相比，虾青素低剂量组和虾青素高剂量组细胞迁移率明显降低（$P<0.05$），且高剂量组抑制效果更显著，见图2。

2.3　Hoechst33342染色结果

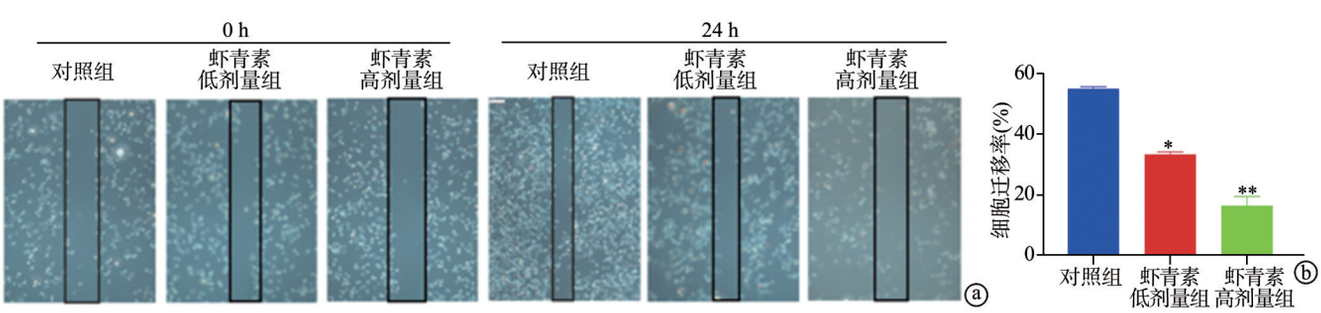
Hoechst33342染色结果显示，对照组细胞核呈清晰的圆形，且细胞密度较高、分布相对均匀，未观察到明显的核形态异常（如碎裂、固缩等）；虾青素低剂量组和虾青素高剂量组中A549细胞核形态变化明显，核染色增强，荧光明亮，细胞核出现边集化和明显碎裂，尤其虾青素高剂量组变化更明显（图3a）。虾青素低剂量组和虾青素高剂量组中核形态异常含量显著高于对照组，虾青素高剂量组中核形态异常含量显著高于虾青素低剂量组，差异均有统计学意义（$P<0.01$），见图3b。

2.4　JC-1染色结果

JC-1染色结果显示，对照组呈红色荧光，而虾青素低剂量组和虾青素高剂量组以绿色荧光为主（图4a）。与对照组相比，虾青素低剂量组和虾青素高剂量组细胞线粒体膜电位降低（$P<0.01$），见图4。

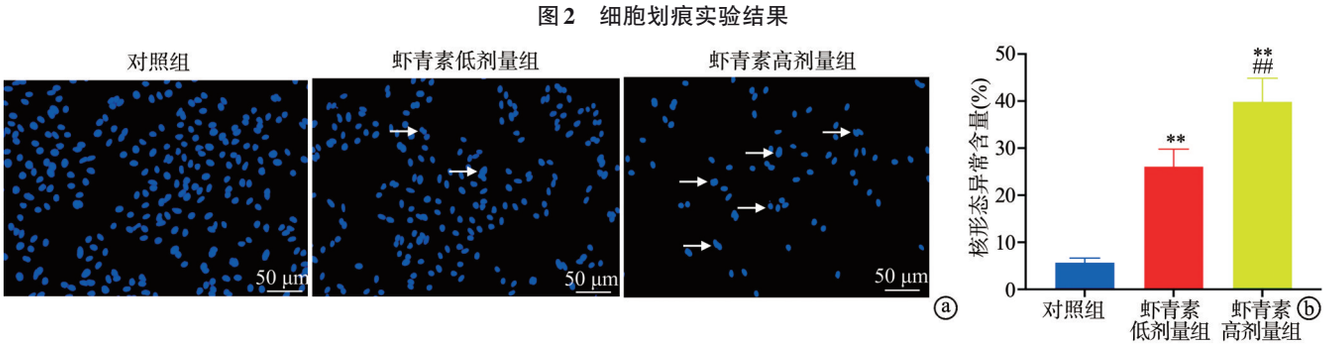
2.5　Western blot检测凋亡相关蛋白

Western blot结果显示，与对照组相比，虾青素高剂量组细胞的NF-κB和Bcl-2蛋白表达显著下降（$P<0.05$），



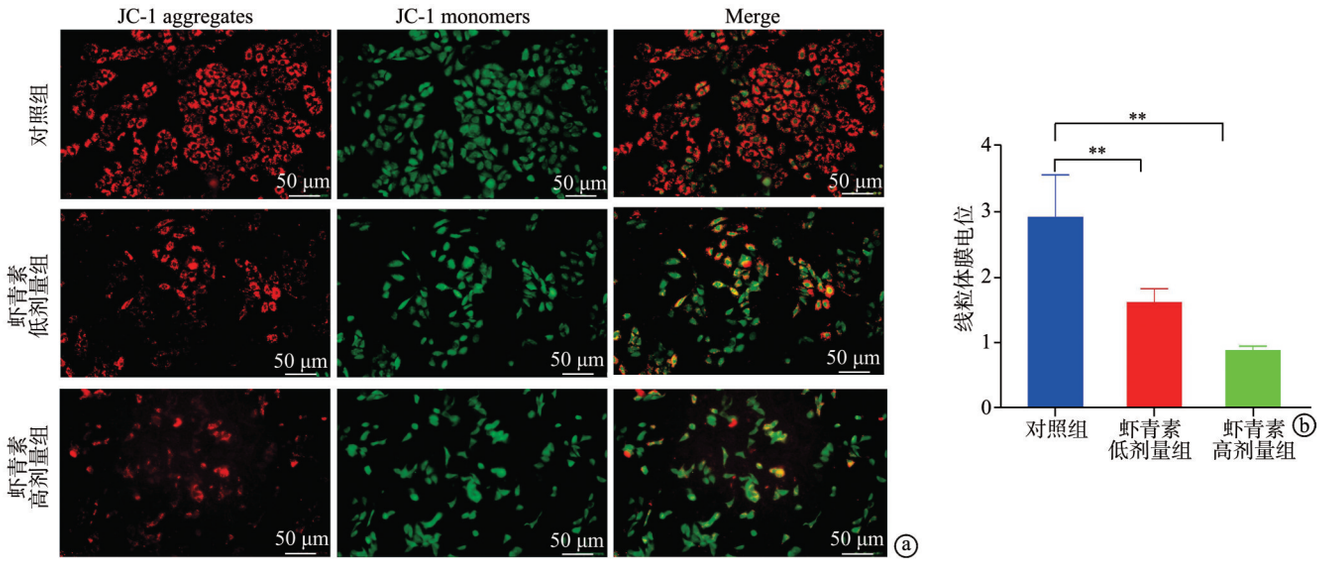
a：各组细胞划痕愈合情况；b：各组细胞迁移率定量分析　*：与对照组相比，$P<0.05$；**：与对照组相比，$P<0.01$

图2　细胞划痕实验结果



a：Hoechst33342染色结果；b：各组核异常定量分析　箭头：固缩、裂解的细胞核；**：与对照组相比，$P<0.01$；##：与虾青素低剂量组相比，$P<0.01$

图3　Hoechst33342染色结果



a:各组JC-1染色结果;b:各组JC-1染色结果定量分析　**:$P<0.01$

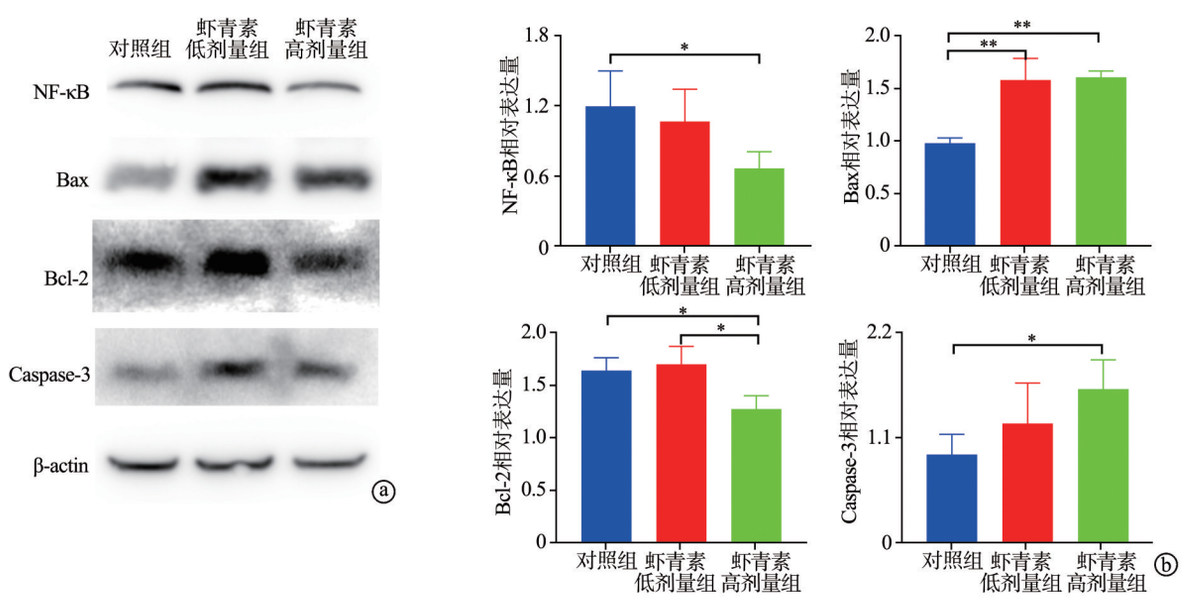
图4　JC-1染色结果

Bax和Caspase-3蛋白表达显著上升($P<0.05$),见图5。

3　讨论

肺癌作为发病率较高的癌症之一,亟需新型抗癌药物。虾青素作为一种具有预防和治疗潜力的生物活性化合物,在癌症治疗中展现出较大的应用前景。大量体内外研究证实了虾青素抗癌的疗效,包括神经系统癌症[13]和乳腺癌[14]等,这主要得益于其抗氧化、抗炎和抗增殖特性[15-16]。虾青素因较强的抗癌特性有望成为肿瘤治疗领域中极具潜力的候选药物。目前国内外关于虾青素作用于非小细胞肺癌的相关研究尚处于初步探索阶段,现有研究虽已证实虾青素对于肺癌细胞具有一定抑制作用,但具体作用机制仍缺乏系统阐释。NF-κB通路在早期肺癌组织中多呈激活状态,其过表达与非小细胞肺癌的进展、转移及不良预后密切相关,且可调控Bcl-2、Bax等凋亡相关蛋白的表达[9-12]。基于此,本研究聚焦虾青素对非小细胞肺癌A549细胞增殖、迁移和凋亡的影响,深入探究其是否通过NF-κB通路发挥作用,以期为临床治疗提供更多实验依据。

已有研究表明,虾青素对肝癌细胞增殖具有抑制作用,且随着浓度增加,增殖抑制作用更强[17]。本研究中CCK-8实验结果与之一致,不同浓度虾青素与A549



*:$P<0.05$;**:$P<0.01$

图5　虾青素对A549细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

细胞共培养后,细胞抑制率随虾青素浓度增加呈明显上升趋势,其中4 mmol/L、6 mmol/L和8 mmol/L浓度的细胞抑制率显著高于1 mmol/L浓度,且8 mmol/L浓度抑制效果最佳,明确证实了虾青素对A549细胞增殖的抑制呈浓度依赖性。有研究指出虾青素抑制细胞增殖与Wnt/β-catenin通路相关[18],这为后续深入探索虾青素调控A549细胞增殖的具体分子机制提供了方向。本研究中细胞划痕实验结果显示,与对照组相比,虾青素低剂量组和虾青素高剂量组的细胞迁移率均明显降低,且高剂量组抑制效果更为显著,表明虾青素可有效抑制A549细胞的迁移。这一结果与已有研究中虾青素通过调控JAK1/STAT3通路抑制细胞黏附和迁移的结论相符[19],进一步印证了虾青素在阻断肿瘤进展多个环节中的重要作用。

诱导细胞凋亡是虾青素在癌症治疗中的核心作用机制之一[20-21]。本研究中Hoechst33342染色与JC-1染色结果显示,虾青素可抑制肺癌细胞凋亡,且随着虾青素浓度升高,凋亡越明显。随后Western blot进一步证实,虾青素干预后Caspase-3蛋白水平显著上升,同时抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调、促凋亡蛋白Bax表达上调,这与已有研究中虾青素通过调控Bax、Bcl-2、Caspase-3表达诱导细胞凋亡的结论一致[21-23],从蛋白水平印证了虾青素对A549细胞的促凋亡作用。为明确虾青素促凋亡的潜在机制,本研究重点探究了NF-κB通路的作用。NF-κB作为关键凋亡相关蛋白,可通过调控Bcl-2、Bax等基因表达影响细胞凋亡进程,其中Bcl-2为抗凋亡基因,Bax为促凋亡基因[24]。本研究Western blot结果显示,与对照组相比,虾青素高剂量组NF-κB蛋白表达显著下降。已往研究亦证实,虾青素通过抑制NF-κB通路改变凋亡相关蛋白表达[25]。上述研究表明,虾青素可能通过下调NF-κB表达,打破Bcl-2/Bax的平衡,进而激活Caspase-3介导的凋亡通路,最终诱导A549细胞凋亡,这也与虾青素通过活化Bax/Bcl-2诱导细胞凋亡的研究结论一致[7]。

综上,本研究证实虾青素能够有效抑制非小细胞肺癌细胞的增殖与迁移,并显著促进其凋亡。其潜在分子机制为:虾青素通过下调NF-κB表达,进一步调控凋亡相关蛋白的表达谱,使抗凋亡蛋白Bcl-2表达降低、促凋亡蛋白Bax与Caspase-3表达升高,最终经NF-κB通路介导的凋亡途径,发挥抑制细胞增殖、阻滞迁移并诱导凋亡的抗肿瘤作用。本研究为虾青素用于非小细胞肺癌治疗提供了明确的实验依据,后续可进一步开展体内实验及临床研究,深入探索其在体内的疗效及安全性,为其临床转化应用奠定基础。

[参考文献]

[1] Wang Y, Liu M, Zhang L, et al. Cancer CD39 drives metabolic adaption and mal-differentiation of CD4$^+$ T cells in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(12): 804. doi: 10.1038/s41419-023-06336-4.

[2] Wu F, Wang L, Zhou C. Lung cancer in China: current and prospect[J]. Curr Opin Oncol, 2021, 33(1): 40-46. doi: 10.1097/CCO.0000000000000703.

[3] Medoro A, Davinelli S, Milella L, et al. Dietary astaxanthin: a promising antioxidant and anti-inflammatory agent for brain aging and adult neurogenesis[J]. Mar Drugs, 2023, 21(12): 643. doi: 10.3390/md21120643.

[4] Cheng J, Abdulkerim E. The promising effects of astaxanthin on lung diseases[J]. Adv Nutr, 2020, 12(3): 850-864. doi: 10.1093/advances/nmaa143.

[5] Zeini MS, Pakravesh SM, Kolour SMJ, et al. Astaxanthin as an anticancer agent against breast cancer: an in vivo and in vitro investigation[J]. Curr Med Chem, 2025, 32(13): 2598-2607. doi: 10.2174/0109298673288774240406053607.

[6] Li J, Guo C, Wu J. Astaxanthin in liver health and disease: a potential therapeutic agent[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 2275-2285. doi: 10.2147/DDDT.S23 0749.

[7] Kim MS, Ahn YT, Lee CW, et al. Astaxanthin modulates apoptotic molecules to induce death of SKBR3 breast cancer cells[J]. Mar Drugs, 2020, 18(5): 266. doi: 10.3390/md180 50266.

[8] Erzurumlu Y, Catakli D, Dogan HK. Potent carotenoid astaxanthin expands the anti-cancer activity of cisplatin in human prostate cancer cells[J]. J Nat Med, 2023, 77(3): 572-583. doi: 10.1007/s11418-023-01701-1.

[9] Windmöller BA, Beshay M, Helweg LP, et al. Novel primary human cancer stem-like cell populations from non-small cell lung cancer: inhibition of cell survival by targeting NF-κB and MYC signaling[J]. Cells, 2021, 10(5): 1024. doi: 10.3390/cells10051024.

[10] Zhao J, Wang X, Mi Z, et al. STAT3/miR-135b/NF-κB axis confers aggressiveness and unfavorable prognosis in non-small-cell lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 493. doi: 10.1038/s41419-021-03773-x.

[11] Wen D, Li W, Song X, et al. NF-κB-mediated EAAT3 upregulation in antioxidant defense and ferroptosis sensitivity in lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1): 124. doi: 10.1038/s41419-025-07453-y.

[12] Ahmed OM, Ebaid H, El-Nahass ES, et al. Nephroprotective effect of pleurotus ostreatus and agaricus bisporus extracts and carvedilol on ethylene glycol-induced urolithiasis: roles of NF-κB, p53, Bcl-2, Bax and Bak[J]. Biomolecules, 2020, 10(9): 1317. doi: 10.3390/biom10091317.

[13] Zhang J, Liu M, Han T, et al. Advance toward function, production, and delivery of natural astaxanthin: a promising candidate for food ingredients with future perspectives[J]. Food Chem, 2025, 463(Pt4): 141428. doi: 10.1016/j.foodchem.2024.141428.

[14] Fathy N, El-Tarawy MA, Kamel MA, et al. Ameliorative effect of astaxanthin on DMBA-induced breast cancer in female rats: interplay between Notch-1 and related miRNAs[J]. Eur J Pharmacol, 2025, 1002: 177779. doi: 10.1016/j.ejphar.2025.177779.