

# 姜黄素对皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞侵袭的抑制作用\*

吴 健<sup>1</sup>, 崔蕾蕾<sup>1</sup>, 刘连庚<sup>2</sup>

(1. 盐城市第一人民医院检验科, 江苏盐城 224005; 2. 盐城市中医院检验科, 江苏盐城 224002)

**摘要:**目的 研究姜黄素对侵袭信号传导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)表达的调控, 初步探讨姜黄素在防治皮肤鳞状细胞癌侵袭转移中可能存在的新的作用机制。方法 以高侵袭性皮肤鳞癌细胞株 A431 为研究对象, 采用不同剂量姜黄素处理。MTT 法检测 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 和 50  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 24, 48 和 72 h 对细胞的毒性作用; Transwell 小室侵袭试验法检测 5, 10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素对细胞的侵袭能力, 黏附试验法检测对细胞的黏附能力; Western blot 法检测 5, 10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用后 STAT3 蛋白表达水平的影响, RT-PCR 法检测对细胞中 STAT3 基因 mRNA 转录水平的影响。结果 姜黄素浓度  $<15 \mu\text{mol/L}$ , 作用时间 24 h 时, 对细胞的生长抑制呈时间和剂量依赖性 ( $P > 0.001$ ), 当姜黄素浓度 15  $\mu\text{mol/L}$ , 作用时间为 24 h 时, 对细胞无明显毒性作用, 细胞存活率 85%; 细胞侵袭能力和黏附能力随着姜黄素浓度的增加而逐渐降低, 以 15  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素浓度处理效果最明显 ( $P > 0.05$ ); 姜黄素可明显抑制 STAT3 基因 mRNA 转录水平, 其抑制作用与剂量呈高度依赖性 ( $P > 0.05$ )。结论 姜黄素可通过抑制 STAT3 信号通路的活化及该信号通路靶基因 STAT3 的表达降低皮肤鳞癌 A431 细胞的侵袭性。

**关键词:**姜黄素; 皮肤鳞状细胞癌; 侵袭信号传导和转录激活因子 3; 侵袭

中图分类号: R739.5; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)05-062-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.019

## Inhibitory Effect of Curcumin on Invasion of Skin Squamous Cell Carcinoma A431 Cells

WU Jian<sup>1</sup>, CUI Lei-lei<sup>1</sup>, LIU Lian-geng<sup>2</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, the First People's Hospital of Yancheng City, Jiangsu Yancheng 224005, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Yancheng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Yancheng 224002, China)

**Abstract: Objective** To investigate the regulatory effect of curcumin on expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in skin squamous cell carcinoma tissues as well as the possible mechanism of curcumin in prevention and treatment of skin squamous cell carcinoma. **Methods** Highly invasive A431 cells were treated with curcumin at various dosages. The cytotoxic effects of treatment with 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 50  $\mu\text{mol/L}$  curcumin for 24, 48 and 72 h on A431 cells were measured by MTT assay. The invasion abilities of cells treated with 5, 10 and 15  $\mu\text{mol/L}$  curcumin were measured by Transwell test, while the adhesive abilities by cell adhesion assay. The effect of 5, 10 and 15  $\mu\text{mol/L}$  curcumin on expression levels of STAT3 were determined by western blot, while those on transcription level of STAT3 mRNA by RT-PCR. **Results** The treatment with curcumin at a dosage of more than 15  $\mu\text{mol/L}$  for more than 24 h inhibited the growth of A431 cells in time- and dose-dependent patterns ( $P < 0.001$ ). The treatment with curcumin at a dosage of not less than 15  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h showed no significant cytotoxic effect on the cells, while the survival rate of cells was more than 85%. The invasion and adhesive abilities of cells decreased gradually with the increasing curcumin concentration. The curcumin at a concentration of 15  $\mu\text{mol/L}$  showed the strongest inhibitory effect on the two abilities ( $P < 0.05$ ). Curcumin showed significantly dose-dependent inhibitory effect on the transcription level of STAT3 mRNA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Curcumin inhibited the invasive ability of A431 cells by inhibiting the activation of STAT3 signal pathway and expression of STAT3 as a target gene of the pathway.

**Keywords:** curcumin, skin squamous cell carcinoma, STAT3, invasion

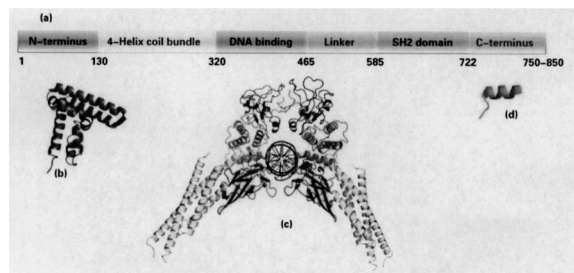
信号传导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是转录信号传导子与活化子家族(STAT)的重要成员之一(见图 1), 同时作为信号通路的致癌性关键分子, 影响着多种肿瘤细胞的关键分子, 如 CyclinD1, Bcl-2, MMP2 等, 这些分子影响肿瘤细胞的生长、

凋亡、血管生成和转移。STAT3 参与细胞多种生理过程, 并在细胞恶性转化中起着很大的作用<sup>[1,2]</sup>。STAT3 是多个致癌性酪氨酸激酶信号通路的汇聚焦点<sup>[3~5]</sup>, 在多种肿瘤细胞和组织中都有过多激活, 刺激与细胞增殖、分化及凋亡密切相关的基因异常表达, 进而刺激细胞增殖进而恶性转化, 抑制

\* 作者简介: 吴 健(1979-), 男, 硕士在读, 主管检验师, 主要从事肿瘤分子诊断方向的研究, E-mail: piaoxue1982717@sina.com。  
通讯作者: 刘连庚(1970-), 男, 副主任检验师, 主要从事肿瘤诊断研究 E-mail: wujianglinxing@163.com。

细胞凋亡最终表现为致癌性,所以目前定义为一种癌基因<sup>[6]</sup>。同时 STAT3 也在肿瘤微环境中高表达,所以,抑制肿瘤细胞及其微环境细胞 STAT3 表达被认为是肿瘤治疗的一个靶点。

姜黄素是一种天然植物多酚类色素(见图2),从姜科植物姜黄中提取,也存在其它姜科植物中。广泛存在于我国传统中药姜黄的根茎中。已有研究证实<sup>[7~9]</sup>,姜黄素是安全有效的 STAT3 的一种抑制剂,如在 T 细胞白血病中。姜黄素通过抑制 STAT3 上游 JAK 激酶的活性,从而阻止了 STAT3 的组成性磷酸化,在皮肤鳞状细胞癌中,姜黄素是否能通过抑制 STAT3 信号通路从而阻止肿瘤的侵袭转移,至今尚未见明确报道。本实验通过对不同浓度姜黄素对皮肤鳞癌 A431 细胞 STAT3 表达的影响,进一步探讨影响皮肤鳞癌侵袭转移的机制。



(a)STAT3 结构域的线性模式;(b)其 8 个螺旋的 STAT4 N 端;(c)磷酸化 STAT3 结合 DNA 晶体结构;(d)STAT6 的 c-末端转录活化结构域。

图 1 STAT3 的机构图示

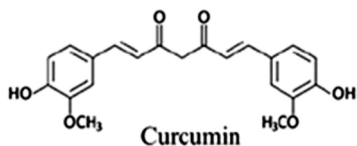


图 2 姜黄素(Curcumin)的化学结构式

## 1 材料与与方法

1.1 主要仪器及试剂 人皮肤鳞癌细胞株 A431 由中国科学院上海细胞生物研究所提供,姜黄素购自中国药品生物制品检定所,MTT 购自美国 Sigma 公司,RPMI1640 培养液美国 GIBCO 公司购置,美国 Cell Signaling Technologies 公司提供 STAT3 鼠单克隆抗体及 P-STAT3 鼠单克隆抗体,Transwell 小室购自 Millipore 公司,PCR 引物及 BSA 稀释液由上海生工合成,ReverTraAce-RT-PCR kit 购自 TOYOBO 公司,蛋白干粉由中国博士德公司购买。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养:A431 细胞在含 10 g/dl FBS 的 RPMI1640 培养液,放置于细胞培养箱中(37℃,5 ml/dl CO<sub>2</sub>),当细胞生长至 80% 融合时,用 0.25 g/dl 胰消化酶传代。

1.2.2 MTT 法对姜黄素处理细胞杀伤力的检测:取对数生长期细胞,分别在 96 孔板每孔中加入 4×10<sup>3</sup> 个细胞,按照王晓飞等<sup>[10]</sup>方法进行试验分组及操作程序后在 490 nm 波长处酶标仪测定光密度 A 值,并按以下公式计算细胞生存率(%)。实验重复 3 次。细胞生存率(%)=(实验组 A<sub>490nm</sub> - 空白对照组 A<sub>490nm</sub>)/实验对照组 A<sub>490nm</sub> × 100%。

1.2.3 Transwell 小室侵袭试验法检测姜黄素对细胞侵袭能力影响:将对数生长期细胞分为以下四组:阴性对照组(0.1 g/dl DMSO);姜黄素 5 μmol/L 处理组;姜黄素 10, 15 μmol/L 处理组;姜黄素 15 μmol/L 处理组。参考王晓飞等<sup>[10]</sup>方法进行 Transwell 小室侵袭试验步骤进行得出平均值和均方差。

1.2.4 黏附试验法检测姜黄素对细胞黏附能力影响:按以上分类的四组进行预处理细胞 24 h。配制终浓度为 10 μg/ml 的纤维连接蛋白溶液,包被 96 孔细胞以每孔 50 μl 于培养板,密封后 4℃ 12 h; PBS 洗涤 5 次,加入含 1 g/dl BSA 的无血清的 RPMI1640 培养液,50 μl/孔,37℃ 封闭 2 h;经 0.25 g/dl 胰酶消化细胞,细胞浓度调整至 2×10<sup>4</sup> 个/孔,接种 96 孔板中,每组设 3 个复孔,孵育 1.5 h;PBS 洗涤 5 次,加入 2 mg/ml MTT 50 μl/孔,孵育 3 h;弃去 MTT,加入 DMSO 每孔 150 μl,振荡 15 min,酶标仪 490 nm 波长处测定 A 值,并按以下公式计算黏附细胞量:黏附细胞量 = 实验组 A<sub>490nm</sub> - 阴性对照组 A<sub>490nm</sub>。

1.2.5 Western blot 法检测姜黄素对细胞 STAT3, P-STAT3 蛋白表达影响:将 A431 细胞按 1×10<sup>4</sup> 个/cm<sup>2</sup> 接种到培养瓶中,贴壁后按下列四组加入相应的药物:阴性对照组(0.1 g/dl DMSO),姜黄素(5, 10, 15 μmol/L)处理组。培养 24 h 后提取各组细胞总蛋白,经 10 g/dl SDS-PAGE 分离后,转移至 PVDF 膜上,经 5 g/dl 脱脂牛奶室温封闭 1 h,封闭后用 TBST 洗 5 次,每次 5 min,敷一抗后 4℃ 12 h,后 TBST 洗 5 次,每次 10 min;敷二抗,室温摇床振荡 1 h, TBST 洗 5 次,每次 10 min。ECL 成像系统成像,拍照。

1.2.6 RT-PCR 法检测姜黄素对细胞中 STAT3 基因 mRNA 转录水平的影响:将 A431 细胞按 2×10<sup>5</sup> 个/cm<sup>2</sup> 接种至 6 孔板中,贴壁后,按 1.2.5 项四组给药。培养 24 h 后,提取各细胞总 RNA 并进行测定,再取 10 μg 总 RNA,用 ReverTraAce-RT-PCR kit 将其逆转录成 cDNA,总体积 20 μl, 99℃ 5 min, 4℃ 5 min, cDNA 引物于 -20℃ 保存备用。引物序列见表 1,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。以 β-actin 基因为内参物。

反应条件为:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,退火 30 s(STAT3 55℃),72℃延伸 2 min,进行 26 个循环;72℃再延伸 10 min,2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,成像系统采集图像并分析。

表 1 RT-PCR 引物序列

Primers	Primer sense	Primer sequences 5'-3'	Product size(bp)
STAT3	Forward	CCTTCCTGCGGTCAGT	344
	Reverse	GCTGCAGGTCGTTGGTGCTAC	344
β-action	Forward	ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG	231
	Reverse	AGGAAGGAAGGCTGGAAGTC	231

1.3 统计学分析 SPSS13.0 统计学软件处理,以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示数据,独立样本 *t* 检验用于各实验组组间均数分析,单因素方差分析多组数据, $P > 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 姜黄素处理细胞杀伤力结果 姜黄素浓度 15  $\mu\text{mol/L}$ ,作用时间 24 h 为临界点,姜黄素浓度  $> 15 \mu\text{mol/L}$ ,作用时间  $> 24 \text{ h}$  细胞的生长抑制呈时间和剂量依赖性,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );姜黄素浓度  $\leq 15 \mu\text{mol/L}$ ,作用时间  $\leq 24 \text{ h}$  时,姜黄素对细胞毒性作用差异无统计学意义,细胞存活率 85%,见表 2。所以姜黄素浓度  $\leq 15 \mu\text{mol/L}$ ,作用时间为  $\leq 24 \text{ h}$  时为侵袭和黏附试验的条件。

2.2 姜黄素对细胞侵袭能力影响结果 对照组及

5,10,15  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理组细胞穿膜细胞数分别是(462.33±36.71)/视野,(310.33±37.66)/视野,(189.10±17.06)/视野和(126.33±8.62)/视野。与对照组相比,穿膜细胞数随着姜黄素药物浓度的增加而逐渐减少,以 15  $\mu\text{mol/L}$  组实验效果最明显,实验各组之间差异均有统计学意义( $F = 85.67, P < 0.05$ ),见图 3。

表 2 各组浓度梯度姜黄素对 A431 细胞作用后的抑制率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

实验分组 ( $\mu\text{mol/L}$ )	抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
5	4.30±3.30	16.66±4.49	27.36±3.18
10	12.30±0.53 <sup>#</sup>	32.11±2.51 <sup>#</sup>	56.73±0.31 <sup>#●</sup>
15	20.62±0.62 <sup>◇</sup>	54.12±2.12 <sup>◇</sup>	61.23±2.48 <sup>△●</sup>
20	63.33±0.84 <sup>*</sup>	71.79±0.64 <sup>*■</sup>	75.00±1.09 <sup>△●</sup>
25	61.11±1.27 <sup>*</sup>	69.65±0.98 <sup>*</sup>	67.57±10.98 <sup>△</sup>

注:\* vs 5,10,15  $\mu\text{mol/L}, P < 0.05$ ;△ vs 5,10  $\mu\text{mol/L}, P < 0.05$ ;◇ vs 5,10,20,25  $\mu\text{mol/L}, P < 0.05$ ;# vs 5,15,20,25  $\mu\text{mol/L}, P < 0.05$ ;■ vs 24 h,  $P < 0.05$ ;● vs 48 h,  $P < 0.05$ 。

2.3 姜黄素对细胞黏附能力影响结果 对照组及 5,10,15  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理组的细胞黏附量分别是 1.355±0.094,0.876±0.022,0.478±0.031 和 0.303±0.026。与对照组相比,细胞粘附能力随着姜黄素药物浓度的增加而呈现逐渐下降的趋势,15  $\mu\text{mol/L}$  处理组作用效果最明显,各实验组之间差异均有统计学意义( $F = 378.72, P < 0.01$ )。

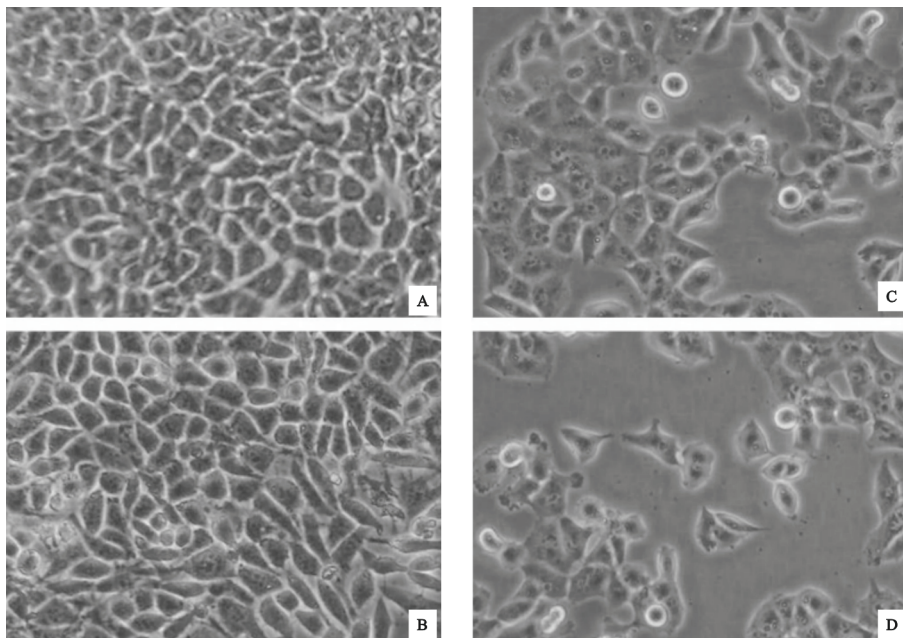


图 3 姜黄素对 A431 细胞体外侵袭能力的影响( $\times 100$ )

2.4 STAT3, P-STAT3 蛋白表达水平 P-STAT3 表达随着姜黄素浓度的增加,抑制作用逐渐增强,且与剂量呈高度相关性,其中 15  $\mu\text{mol/L}$  组效果最明显,各实验组之间差异均有统计学意义

( $F = 116.67, P < 0.05$ ),而总 STAT3 蛋白水平差异在统计学上无意义。见图 4 和图 5。

2.5 STAT3 基因 mRNA 转录水平 姜黄素对 STAT3 基因 mRNA 转录水平的抑制作用随着药

物浓度的增加而增强,与姜黄素剂量呈高度相关性,5,10,15  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理组细胞中 STAT3 基因 mRNA 转录水平分别为  $0.514 \pm 0.175$ ,  $0.278 \pm 0.058$ ,  $0.045 \pm 0.003$ 。与对照组  $0.780 \pm 0.135$  比较,转录水平明显降低,以 15  $\mu\text{mol/L}$  实验组效果最明显 ( $t=9.466$ ,  $P<0.01$ ),各实验组间的差异均有统计学意义 ( $F=24.132$ ,  $P>0.05$ ),见图 6。

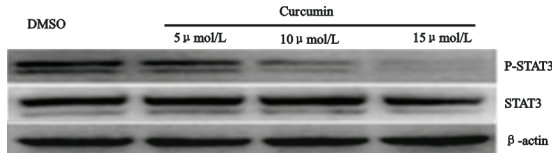


图 4 姜黄素对 A431 细胞中 STAT3 和 P-STAT3 蛋白表达的影响

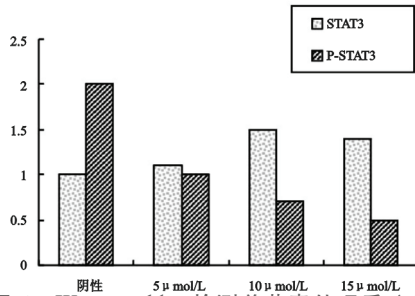


图 5 Western blot 检测姜黄素处理后 A431 细胞中 STAT3 和 P-STAT3 蛋白的相对表达量

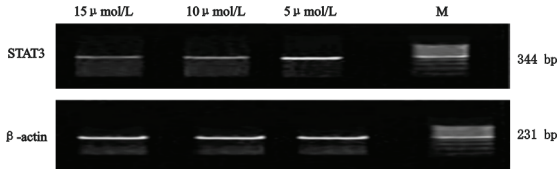


图 6 姜黄素对 A431 细胞中 STAT3 基因 mRNA 转录水平的影响

3 讨论 近 30 年来,我国肿瘤发生率及死亡率一直处于高增长的趋势。皮肤鳞癌是发病率较高的皮肤恶性肿瘤,其在皮肤恶性肿瘤中占有较大比例,其发生与紫外线辐射密切相关,随着环境及臭氧层破坏加重,其发病率一直呈持续上升趋势,一般为 80%~90%,在老年人中尤其明显<sup>[11,12]</sup>。因其病情发展快,破坏性大,可发生淋巴结转移,晚期可发生内脏转移,其防治越来越受人们关注。该类西医治疗目前无有效且经济的手段,传统中药因其具有广泛的药理作用以及毒副作用较小的优点,深入研究中药及其成分在皮肤鳞癌发生机制中遗传毒作用具有重要意义。近年来研究表明,许多传统中药具有一定的抗癌作用,并能诱导细胞凋亡、促进分化以及提高免疫功能。姜黄作为一种具有良好发展前景的抗癌药物,成为目前研究的热点<sup>[13]</sup>。

Kang 等<sup>[14~17]</sup>研究表明,姜黄素在动物模型上对皮肤癌、肝细胞癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、胃癌等多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用,并可诱导肿瘤细胞凋亡。目前研究显示,姜黄素类因其可以通过诱导恶性肿瘤细胞分化、诱导肿瘤细胞凋亡及对肿瘤生长各期的抑制效应来发挥其抗癌作用而在临床得到广泛的应用。

目前已被证实,STAT3 在多种肿瘤细胞和肿瘤微环境中各种细胞高表达,抑制肿瘤细胞及其微环境各种基质细胞 STAT3 已被公认为肿瘤治疗的靶点<sup>[18]</sup>。本研究为了探讨姜黄素通过抑制 STAT3 信号通路以及 STAT3 基因表达对皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞侵袭的抑制作用,以 A431 为研究对象,采用不同剂量姜黄素处理,利用 MTT 法检测不同浓度姜黄素作用细胞株后对细胞的毒性作用,采用 Transwell 小室侵袭试验法检测了不同浓度姜黄素作用后细胞侵袭能力的影响,进行黏附试验检测细胞黏附能力的改变,结果显示,姜黄素浓度 15  $\mu\text{mol/L}$ ,作用时间 24 h 为临界点,姜黄素浓度  $>15 \mu\text{mol/L}$ ,作用时间  $>24 \text{h}$  细胞的生长抑制呈时间和剂量依赖性,姜黄素浓度  $\leq 15 \mu\text{mol/L}$ ,作用时间为 24 h 时,对细胞无明显毒性作用,细胞存活率 85%;细胞侵袭能力和黏附能力随着姜黄素浓度增加而逐渐降低,以 15  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素浓度处理效果最明显。

本次研究采用 Western blot 法检测不同浓度作用细胞株后 STAT3 及 P-STAT3 蛋白水平的变化,还采用 RT-PCR 检测了不同浓度姜黄素作用细胞株后 STAT3 基因 mRNA 转录水平的影响,显示姜黄素可明显抑制 STAT3 基因 mRNA 转录水平,其抑制作用呈剂量依赖性。

Cyclin D1 为 STAT3 表达的下游基因,受到 STAT3 活化的调节来影响皮肤鳞癌细胞的侵袭过程,促进肿瘤细胞的侵袭转移。本研究通过姜黄素抑制 STAT3 信号通路的活性及此信号通路靶基因 STAT3 的表达明显减弱,尝试可以从源头上防止 p-STAT3 信号传导途径诱导 Cyclin D1 过度表达从而导致皮肤鳞癌产生的影响提供理论依据,这将为临床药物抗肿瘤治疗及基因干扰治疗提供了一种可能,开辟一条新的重要途径。

参考文献:

[1] 陆海一,林 兰,刘继斌,等. 拮抗 Wnt 信号通路的 CpG 岛甲基化表型在肝癌预后中的临床价值[J]. 现代检验医学杂志,2013,28(6):22-25.  
Lu HY, Lin L, Liu JB, et al. Clinical significance of CpG island methylator phenotype (CIMP) in plasma associated with prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28 (6):22-25. (下转 69 页)

- [2] Qu Y, Dang S, Hou P, et al. Gene methylation in gastric cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2013(424):53-65.
- [3] Talbot JJ, Song X, Wang X, et al. The cleaved cytoplasmic tail of polycystin-1 regulates Src-dependent STAT3 activation[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(8):1737-4178.
- [4] Aparicio-Siegmund S, Sommer J, Monhasery N, et al. Inhibition of protein kinase II(CK2) prevents induced signal transducer and activator of transcription (STAT) 1/3 and constitutive STAT3 activation[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(8):2131-2148.
- [5] Liu L, Gaboriaud N, Vouggianopoulou K, et al. ML-2384, a new 6-bromindirubin derivative with dual JAK/Src kinase inhibitory activity, suppresses growth of diverse cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(2):178-184.
- [6] Wang J, Zhang L, Chen G, et al. Small molecule 1'-acetoxychavicol acetate suppresses breast tumor metastasis by regulating the SHP-1/STAT3/MMPs signaling pathway[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 148(2):279-289.
- [7] Chung SS, Vadgama JV, et al. Curcumin and epigallocatechin gallate inhibit the cancer stem cell phenotype via down-regulation of STAT3-NFκB signaling[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(1):39-46.
- [8] Uehara Y, Inoue M, Fukuda K, et al. Inhibition of β-catenin and STAT3 with a curcumin analog suppresses gastric carcinogenesis in vivo[J]. *Gastric Cancer*, 2014:[Epub ahead of print].
- [9] Hu A, Huang JJ, Jin XJ, et al. Curcumin suppresses invasiveness and vasculogenic mimicry of squamous cell carcinoma of the larynx through the inhibition of JAK-2/STAT-3 signaling pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(1):278-288.
- [10] 王晓飞, 郭变琴, 张曦文, 等. 联氨基姜黄素抑制 STAT3 信号通路对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移性的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(2):111-115.  
Wang XF, Guo BQ, Zhang XW, et al. Hydrazinocurcumin suppresses invasion and migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells through inhibiting STAT3 signal pathway[J]. *Acta Academiae Medici-nae Militaris Tertiae*, 2011, 33(2):111-113.
- [11] Kraljik N, Rosso M, Ageel A, et al. The incidence of skin squamous cell carcinoma in Osijek-Baranja County—an epidemiological study[J]. *Coll Antropol*, 2011, 35(Suppl 2):77-80.
- [12] Wu J, Zhang JR, Qin J. Clinical significance of methylation of E-cadherin and p14ARF gene promoters in skin squamous cell carcinoma tissues[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(7):1808-1812.
- [13] Snyder M, Huang JY, Huang XY, et al. A STAT3/NFκB complex is necessary for the expression of fascin in metastatic breast cancer cells in response to IL-6 and TNF-α [J]. *J Biol Chem*, 2014; DOI: 10.1074/jbc.M114.591719.
- [14] Kang JH, Kang HS, Kim IK, et al. Curcumin sensitizes human lung cancer cells to apoptosis and metastasis synergistically combined with carboplatin[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015; pii: 1535370215571881. [Epub ahead of print].
- [15] Toden S, Okugawa Y, Buhrmann C, et al. Novel evidence for curcumin and boswellic acid induced chemoprevention through regulation of miR-34a and miR-27a in colorectal cancer[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8(5):431-443.
- [16] Fiala M. Curcumin and omega-3 fatty acids enhance NK cell-induced apoptosis of pancreatic cancer cells but curcumin inhibits interferon-γ production: benefits of omega-3 with curcumin against cancer[J]. *Molecules*, 2015, 20(2):3020-3026.
- [17] Zhou GZ, Sun GC, Zhang SN, et al. The interplay between autophagy and apoptosis induced by one synthetic curcumin derivative hydrazinobenzoylcurcumin in A549 Lung Cancer Cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2015, 29(6):267-273.
- [18] Kim GT, Lee SH, Kim YM. Quercetin regulates serine 2-AMPK-mTOR signaling pathway and induces apoptosis via increased intracellular ROS in HCT116 colon cancer cells[J]. *J Cancer Prev*, 2013, 18(3):264-270.