

6-姜烯酚诱导人结直肠癌细胞凋亡及与 Bax、BCL2、Caspase3 和 PARP1 基因表达的影响

王宇锋¹, 陈超¹, 杨春², 李海², 杨银学²

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004) (2. 宁夏医科大学总医院, 宁夏银川 750004)

摘要: 本文通过体外细胞实验应用 6-姜烯酚对 HCT116 和 HT29 进行干预, 以探讨 6-姜烯酚诱导结直肠癌细胞凋亡及与相关凋亡蛋白 (Bax、BCL2、Caspase3 和 PARP1) 表达之间的关系。利用倒置荧光显微镜观察不同浓度的 6-姜烯酚干预 HCT116 及 HT29 后细胞形态的变化, CCK8 法测定不同分组 HCT116 及 HT29 抑制率, 并绘制细胞增殖曲线, Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测不同分组 HCT116 及 HT29 凋亡, Western-blot 检测分析凋亡相关蛋白表达情况 (Bax、BCL2、Caspase3 和 PARP1)。结果显示, 与对照组相比, 6-姜烯酚可不同程度地诱导 HCT116 及 HT29 凋亡, 促进 Bax、Caspase3 和 PARP1 蛋白水平表达 ($p < 0.05$), 抑制 BCL2 蛋白水平表达 ($p < 0.05$), 并增加 Bax/BCL2 比值比例 ($p < 0.05$)。因此, 6-姜烯酚诱导 HCT116、HT29 发生凋亡可能是与激活 Bax、Caspase3 和 PARP1 的表达以及增加 Bax/BCL2 比值比例相关, 这一发现可为结直肠癌的临床治疗与预防提供有效参考依据。

关键词: 6-姜烯酚; 细胞凋亡; 结直肠肿瘤; Bax/BCL2 比值

文章编号: 1673-9078(2017)11-7-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.002

Effects of 6-Shogaol on the Apoptosis of Human Colorectal Cancer Cells and the Expression of Bax, BCL2, Caspase3 and pARp1

WANG Yu-feng¹, CHEN Chao¹, YANG Chun², LI Hai², YANG Yin-xue²

(1. Ningxia Medical University, Clinical Medical College, Yinchuan 750004, China)

(2. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: In this study, HCT116 and HT29 were directly induced by 6-shogaol through in vitro cell experiment to investigate the effects of 6-shogaol on the apoptosis of human colorectal cancer cells and the expression of associated apoptotic proteins (Bax, BCL2, Caspase3 and PARP1). The changes of cell morphology with the treatment of 6-shogaol were observed by inverted phase contrast microscope. The inhibition rate of HCT116 and HT29 was detected by CCK8 and the cell proliferation curves were drawn. The apoptosis in human HCT116 and HT29 were detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry and the expression of related proteins (Bax, BCL2, Caspase3 and PARP1) was analyzed using western-blot. Compared with the model group, 6-shogaol could inhibit the apoptosis of HCT116 and HT29 in a concentration dependent manner ($p < 0.05$), which also could enhance the expression of Bax, Caspase3 and PARP1 inhibit the expression of BCL2 and increase the ratio of Bax/BCL2 ($p < 0.05$). Therefore, the apoptosis of HCT116 and HT29 induced by 6-shogaol may be related to the activation of Bax, Caspase3, PARP1 expression and the increase of the Bax/BCL2 ratio. This finding can provide references for the clinical treatment and prevention of colorectal cancer.

Key words: 6-shogaol; Apoptosis; Colorectal neoplasms; Bax/BCL2 ratio

结直肠肿瘤 (Colorectal neoplasms) 是目前一种较为常见的高危害消化道恶性肿瘤, 其发病率和致死

收稿日期: 2017-06-20

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (NZ16136); 宁夏“研究生教育创新计划”学位点建设项目 (YXW2017014)

作者简介: 王宇锋 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 结直肠肿瘤发生发展机制

通讯作者: 杨银学, 男, 主任医师 (教授), 博士生导师, 研究方向: 结直肠肿瘤发生发展机制

率均居前列^[1], 尤其在近年来, 结直肠癌的发病率和死亡率在中国呈现出逐年上升的趋势, 严重影响人们的生活质量^[2]。结直肠肿瘤的发生发展是一个多途径、多基因参与及多步骤的过程, 其早期诊断往往困难, 进展至中晚期易发生多处转移, 甚至出现复发、耐药特性^[3]。虽然近来结直肠肿瘤的综合治疗方法有很大提升, 但是晚期结直肠肿瘤患者的死亡率仍居高不下, 规范的外科手术辅以放、化疗仍然是唯一有效治疗手段^[4]。

细胞凋亡具体是指生理条件下,当机体受刺激后,为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的自杀性死亡^[5]。与细胞坏死不同,细胞凋亡不是一件被动的过程,而是主动过程,它涉及一系列基因(Bax、BCL2、Caspase3 和PARP1 等)的激活、表达以及调控等作用,它也不是病理条件下自体受损的一种现象,而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种正常死亡过程^[6]。

凋亡是一种多基因严格控制的过程,这些基因在种属之间非常保守,如Bcl-2 家族、caspase家族和Bax,癌基因如C-myc和抑癌基因p53 等^[7],近年来随着分子生物学技术和分子免疫学的研究不断提升,对细胞凋亡的过程也有了很高的了解,但迄今为止,具体凋亡过程尤其是哪些基因的具体表达以及通过哪些通路诱导细胞凋亡却不完全清楚,而且凋亡过程的紊乱还与许多疾病甚至肿瘤的发生有直接或间接的密切关系^[8]。

生姜(Zingiber)作为一种香料、膳食调味剂,在全世界范围内得到广泛的应用^[9]。6-姜烯酚作为干姜的主要组成部分,对比其他生姜提取物,因其具有优异的生物活性和增强的稳定性而备受关注^[10]。广泛报道称^[11~15],6-姜烯酚具有多种药理作用和中药价值,包括抗炎、镇痛、解热、抗氧化、抗癌及治疗胃溃疡等。还有国外学者称^[16],6-姜烯酚在人类非小细胞肺癌A-549中可以通过可通过mTOR 通路诱导细胞自噬作用进而导致细胞凋亡。此外,Tan 等^[17]人也研究称6-姜烯酚及其衍生物可明显抑制乳腺癌增殖,具体可能与通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 有关。

目前为止,6-姜烯酚抑制结直肠癌机制尚未明确,本实验旨在具体研究6-姜烯酚诱导结直肠癌细胞凋亡及与Bax、BCL2、Caspase3 和PARP1 表达的影响,并进一步探讨其可能的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂

MCC 细胞培养液和胎牛血清(FBS)购自于凯基公司;pAGE 和 SDS 购于美国 Abcam 公司;pS(青霉素加链霉素)、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗、CCK8 试剂盒、BCA 蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自于 Gemini Bio-products (West Sacramento, CA);脱脂牛奶、ECL 和 TEMED 购于 Thermo Fisher Scientific;0.45 μm PVDF 膜购于美国 Abcam 公司;Bax、BCL2、

Caspase3、PARP1 和 β -actin 抗体购自于 Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, CA);6-姜烯酚购自于上海源叶生物公司;甲醇、TBST 和 Tris-甘氨酸缓冲液购自于南京化学试剂有限公司;PBS 购于银川伟博鑫试剂公司;30%聚丙烯酰胺购于 Bio-Rad Laboratories (Berkeley, CA)。

1.1.2 实验仪器

超净工作台(Bio-Rad, 型号 ESCO AC6);CO₂ 培养箱(Bio-Rad, 型号 03793-8867);液氮罐(CBS 型号: 2000);全自动高压锅(Bio-Rad, 型号: MLS-3088);高速冷冻离心机(Bio-Rad, 型号 4536R);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad, GEL DOC2012);紫外可见酶标仪(美国 Bio-Rad, 型号: 770);电子天平(美国 Thermo, 型号: BT456s);倒置相差荧光显微镜(美国 Bio-Rad Laboratories, 型号: Discover.V24);水平摇床(常州普天仪器, 型号 HY-4)。

1.1.3 实验细胞

人结直肠细胞(HCT116、HT29)购自于美国 ATCC 细胞库(Manassas, VA);细胞培养条件:10%胎牛血清的 MCC 培养基、PS(100 U/mL 链霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% O₂、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞复苏与常规培养

取出预先在实验室液氮罐中冻存的 HCT116 和 HT29,迅速放进 37.5 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中,不停摇动以促进管中细胞融化,待冻存管中的细胞液完全融化后立即转移至超净台,吸取冻存管液至离心管中并进行离心机 1000 r/min, 5 min 离心,弃上清,分别加入含有 10% FBS 的 MCC 培养基轻轻吹打,再将细胞液转移至含有完全培养基 MCC 的培养皿中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,用倒置相差显微镜下观察细胞的贴壁生长情况,选择每天换 1 次培养液。当细胞密度达到 90%以上时,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,以 1:2 或者 1:3 传代,取对数生长期的细胞作为实验用。

1.2.2 分组药物干预

设立两组不同的药物干预组:分别选用浓度为 0、5、10、15、20 μM 的 6-姜烯酚分别干预 HCT116 和 HT29,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,于倒置相差显微镜下观察不同浓度的 6-姜烯酚对不同分组细胞增殖的影响及细胞形态的变化。

1.2.3 CCK8 法绘制 6-姜烯酚抑制细胞增殖曲线

细胞计数板计数所制备的上述不同浓度 6-姜烯酚干预组的 HCT116 和 HT29 细胞数,接种到 96 孔板内,按比例 1:2 依次用培养基稀释成一个细胞浓度,一般做 3~5 个细胞浓度梯度,每孔建议 4 个复孔。接种后培养 2~4 h 使细胞贴壁,然后加入 CCK 试剂培养 24 h, 37 °C 温箱孵育 1 h,在酶标仪上应用 490 nm 测定光吸收值 OD 值,并计算:细胞抑制率=(对照孔 OD 值-实验孔 OD 值)/对照孔 OD 值×100%,绘制两组不同浓度 6-姜烯酚干预后的细胞抑制率曲线。

1.2.4 提取细胞蛋白,并测定蛋白含量

将上述不同浓度 6-姜烯酚干预组细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,收集细胞,用 BCA 提取试剂盒提取细胞蛋白,并测出蛋白浓度,按照每 4 μL 蛋白样品加入 1 μL 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液的比例,混合蛋白样品和蛋白上样缓冲液,于 100 °C 水浴锅中煮 5 min 充分变性蛋白质以备用。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡

取上述不同药物干预组的细胞 2000 r/min, 5 min 离心, pBS 冲洗细胞 2 次,贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集,收集 10×10⁴ 以上细胞。加入 500 μL 的 Binding Buffer 重新悬浮细胞,并先后加入等比例的 1 μL Annexin V-FITC 和 5 μL propidium iodide 混匀,室温、避光、反应 10 min 左右,立即在 1 h 内应用流式细胞仪 L3 通道观察检测细胞凋亡。

1.2.6 Western-Blot 检测蛋白表达

根据所测蛋白浓度调整分离胶和浓缩胶比例配置,将蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶 100 V 电泳约 1 h,然后电转液中湿性电转 80 V、2 h,电转至 PVDF 膜,4%脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,摇床摇匀,加入抗体 Caspase3 (1:2000 稀释)、PARP1 抗体 (1:1000 稀释)、Bax 抗体 (1:2000 稀释)、BCL2 (1:1000 稀释)、β-actin (1:1000 稀释),4 °C 摇床 60 r/min 过夜。予以 1% TBST 洗膜,加入相应二抗,室温孵育 1 h,再予 1% TBST 洗膜后加入适宜剂量的 ECL 显色液在暗室凝胶成像仪下曝光成像,并用 Image J 软件进行图像分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,实验数据以均数+标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用两样本 t 检验,多组间比较采用方差分析, $p \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 6-姜烯酚可不同程度地抑制 HCT116、HT29 增殖

将不同浓度 6-姜烯酚干预 HCT116、HT29 后,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,在倒置相差显微镜下观察细胞的数量及形态变化 (放大 10×100 倍)。结果显示 (图 1 和 2),与对照组相比, HCT116 和 HT29 组随着 6-姜烯酚浓度的升高,细胞数也不同程度的明显减少。

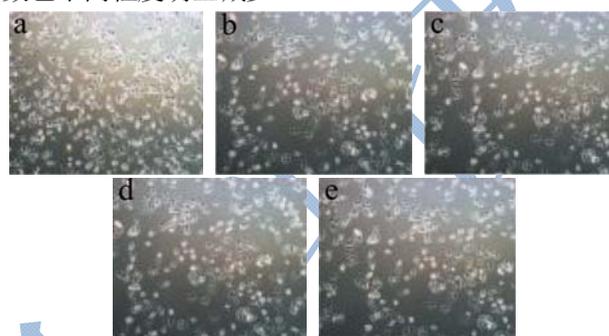


图 1 显微镜下不同浓度 6-姜烯酚干预 HCT116 24 h 后细胞的形态变化

Fig.1 The morphological changes of HCT116 intervened by different concentrations of 6-shogaol after 24 h

注: a 表示 HCT116-对照组; b 表示 HCT116-6 姜烯酚 (5 μM) 组; c 表示 HCT116-6 姜烯酚 (10 μM) 组; d 表示 HCT116-6 姜烯酚 (15 μM) 组; e 表示 HCT116-6 姜烯酚 (20 μM) 组。

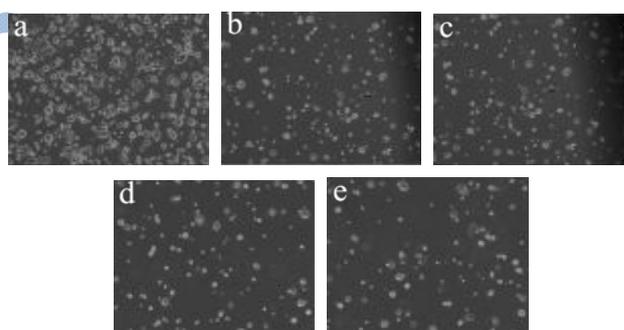


图 2 显微镜下不同浓度 6-姜烯酚干预 HT29 24 h 后细胞的形态变化

Fig.2 The morphological changes of HT29 intervened by different concentrations of 6-shogaol after 24 h

注: a 表示 HT29-对照组; b 表示 HT29-6 姜烯酚 (5 μM) 组; c 表示 HT29-6 姜烯酚 (10 μM) 组; d 表示 HT29-6 姜烯酚 (15 μM) 组; e 表示 HT29-6 姜烯酚 (20 μM) 组。

2.2 CCK8 法测定不同浓度 6-姜烯酚诱导 HCT116 及 HT29 抑制率

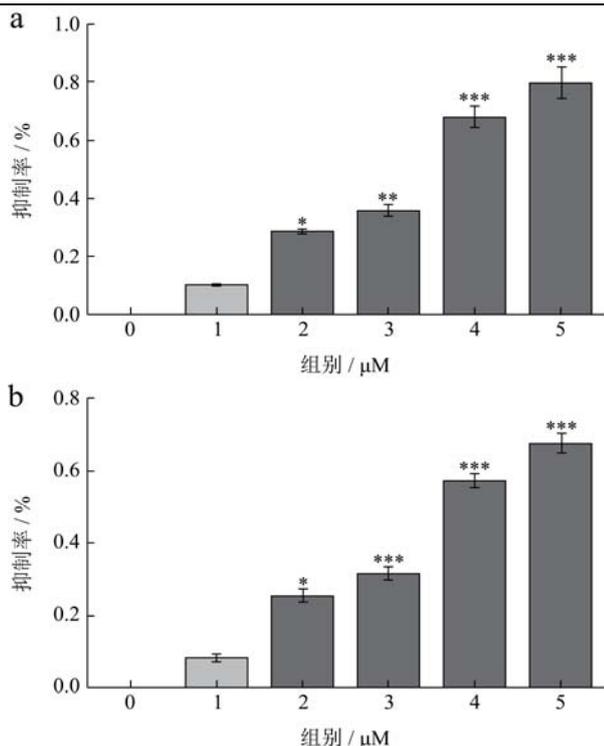


图3 CCK8 法检测不同浓度 6-姜烯酚对 HCT116、HT29 增殖能力的调控 (24 h)

Fig.3 Effects of 6-shogaol on the proliferations of HCT116 and HT29 detected by CCK8 assay (24 h)

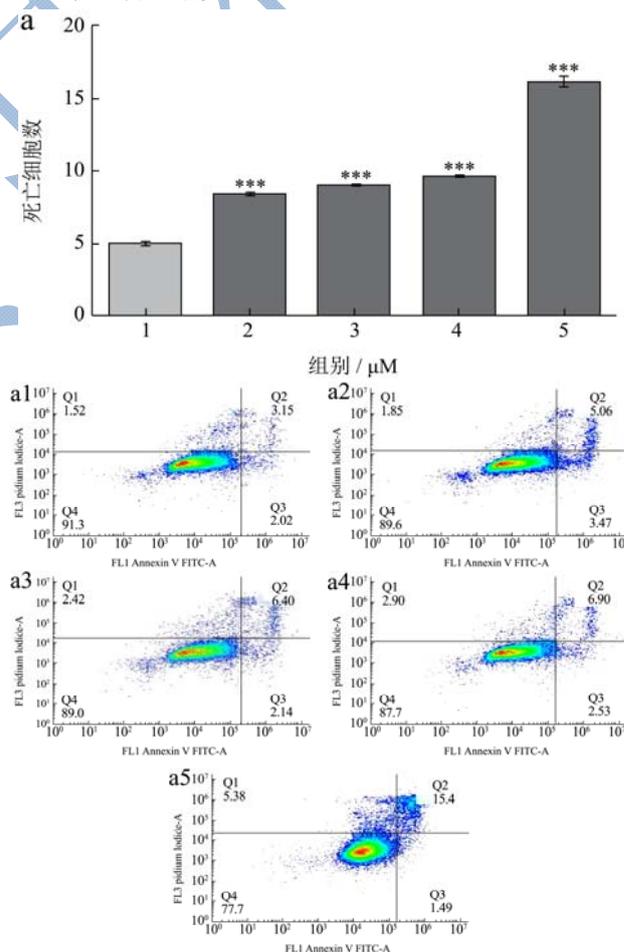
注: 图 a 中, 0 表示空白对照组; 1 表示阴性对照组; 2 表示 HCT116-6 姜烯酚 (5 μM) 组; 3 表示 HCT116-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 4 表示 HCT116-6 姜烯酚 (15 μM) 组; 5 表示 HCT116-6 姜烯酚 (20 μM) 组。图 b 中, 0 表示空白对照组; 1 表示阴性对照组; 2 表示 HT29-6 姜烯酚 (5 μM) 组; 3 表示 HT29-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 4 表示 HT29-6 姜烯酚 (15 μM) 组; 5 表示 HT29-6 姜烯酚 (20 μM) 组。与对照组相比, $##p < 0.01$; 与 H_2O_2 组相比, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

不同分组的 HCT116 及 HT29 加入不同浓度的 6-姜烯酚干预, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养中培养 24 h, CCK8 法检测细胞抑制率与空白对照组相比差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。结果显示 (图 3a), 与阴性对照组相比, HCT116-6 姜烯酚 (5 μM) 组、HCT116-6 姜烯酚 (10 μM) 组、HCT116-6 姜烯酚 (15 μM) 组及 HCT116-6 姜烯酚 (20 μM) 组抑制率明显增加, 尤其是 HCT116-6 姜烯酚 (20 μM) 组抑制率更为明显 ($p < 0.05$); 随着 6-姜烯酚的浓度升高, 可不同程度地抑制 HCT116 增殖 ($p < 0.05$)。结果显示 (图 3b), 与阴性对照组相比, HT29-6 姜烯酚 (5 μM) 组、

HT29-6 姜烯酚 (10 μM) 组、HT29-6 姜烯酚 (15 μM) 组及 HT29-6 姜烯酚 (20 μM) 组抑制率明显增加, 尤其是 HT29-6 姜烯酚 (20 μM) 组抑制率更为明显 ($p < 0.05$); 随着 6-姜烯酚的浓度升高, 可不同程度地抑制 HCT116 增殖 ($p < 0.05$)。

2.3 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 6-姜烯酚诱导人 HCT116、HT29 凋亡

Tan 等人^[17]研究发现 6-姜烯酚可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 而抑制乳腺癌和结肠癌细胞的增殖。本实验从 Annexin V-FITC/PI 荧光双参数点图同样可以观察 (图 4a 和 b), 其中右上象限和右下象限为死亡细胞。在 HCT116 各分组细胞中, 随着 6-姜烯酚的浓度增加, 右下象限和右上象限死亡细胞数明显不同程度增加 (图 4a); 在 HT29 各分组细胞中, 随着 6-姜烯酚的浓度增加, 右下象限和右上象限死亡细胞数也明显增多 (图 4b)。



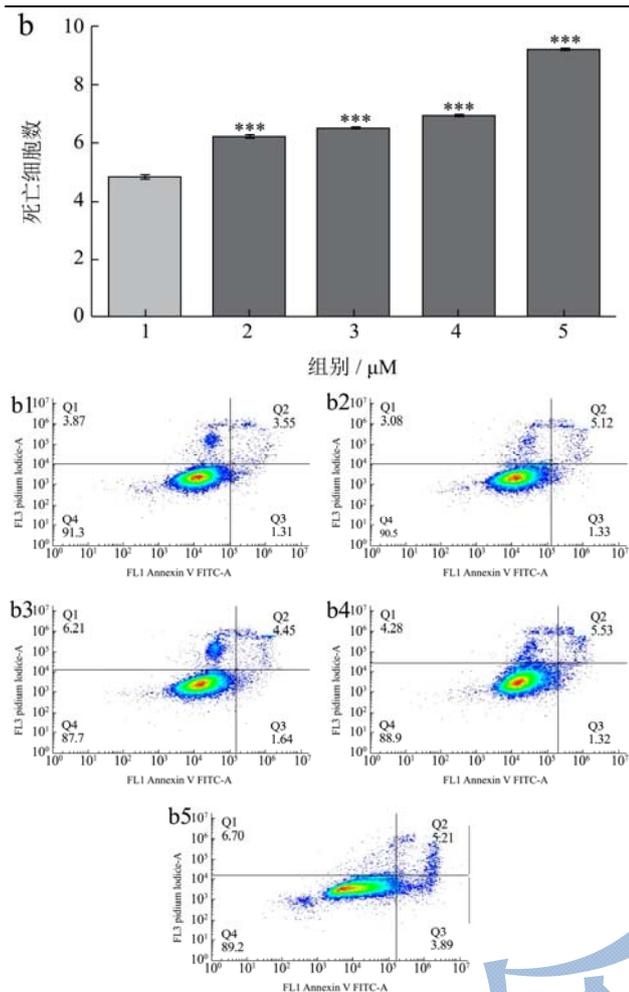


图4 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 6-姜烯酚诱导人 NCM460 及 HCT116 凋亡

Fig.4 The apoptosis of human HT29 and HCT116 induced by 6-shogaol detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry

注：图 a 中，0 表示空白对照组；1 表示阴性对照组；2 表示 HCT116-6 姜烯酚 (5 μM) 组；3 表示 HCT116-6 姜烯酚 (10 μM) 组；4 表示 HCT116-6 姜烯酚 (15 μM) 组；5 表示 HCT116-6 姜烯酚 (20 μM) 组。图 b 中，0 表示空白对照组；1 表示阴性对照组；2 表示 HT29-6 姜烯酚 (5 μM) 组；3 表示 HT29-6 姜烯酚 (10 μM) 组；4 表示 HT29-6 姜烯酚 (15 μM) 组；5 表示 HT29-6 姜烯酚 (20 μM) 组。与对照组相比，### $p < 0.01$ ；与 H_2O_2 组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

2.4 6-姜烯酚可增加 HCT116 中 Caspase3、PARP1、Bax 表达，并抑制 BCL2 表达

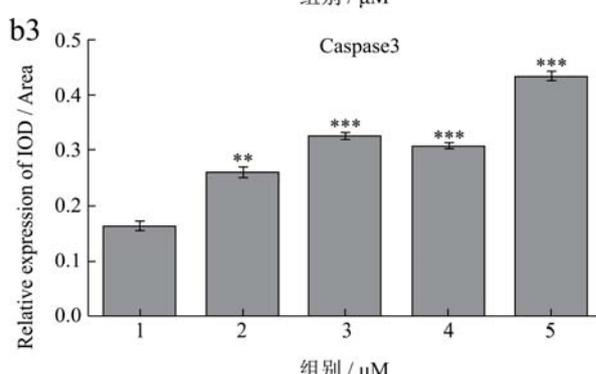
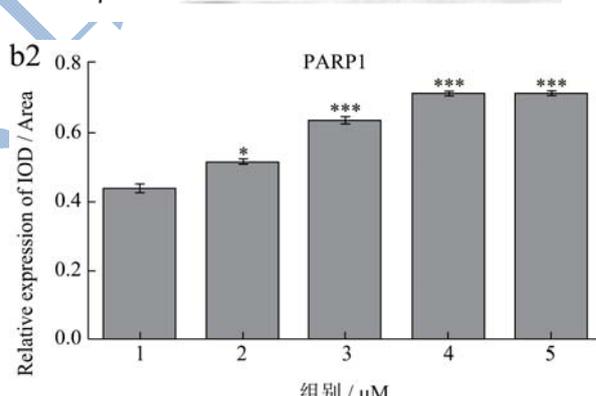
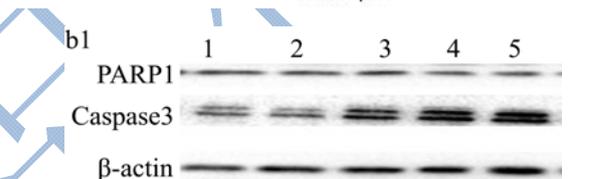
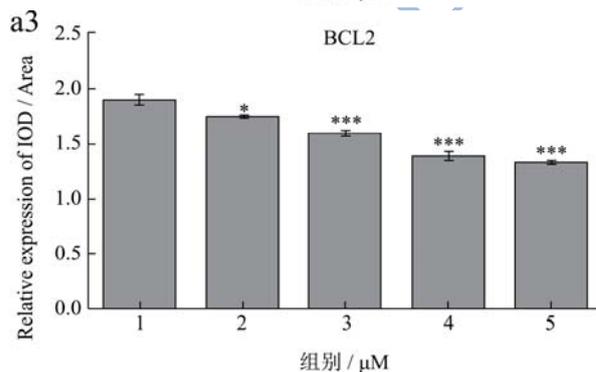
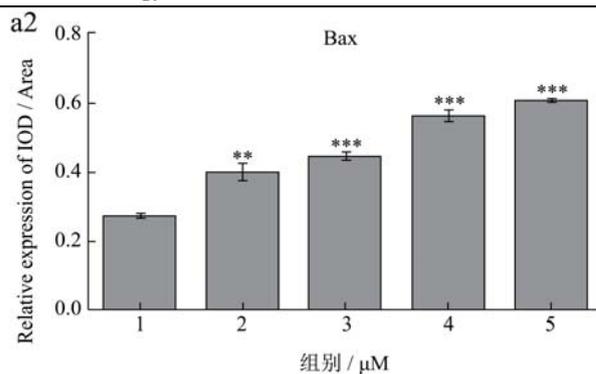
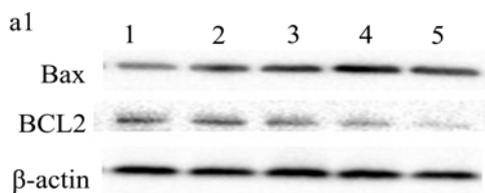


图5 Western-blot 检测 6-姜烯酚对 HCT116 中 Caspase3、pArp1、Bax 及 BCL2 的表达的影响

Fig.5 The effects of 6-shogaol on the expressions of Caspase3, pArp1, Bax and BCL2 in HCT116 detected by Western-blot

注: 1 表示阴性对照组; 2 表示 HCT116-6 姜烯酚 (5 μM) 组; 3 表示 HCT116-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 4 表示 HCT116-6 姜烯酚 (15 μM) 组; 5 表示 HCT116-6 姜烯酚 (20 μM) 组。与对照组相比, $##p<0.01$; 与 H_2O_2 组相比, $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。

Park^[18]等报道, 6-姜烯酚可通过靶向 Caspase3、PARP1、Bax 抑制 TRIF 依赖信号通路, 在人体、动物和肿瘤细胞系中, 6-姜烯酚的重要代谢路径是硫醇尿酸路径, 其最初通过谷胱甘肽-S-转移酶与谷胱甘肽 (GSH) 形成共轭化合物。如图 5 (a 和 b) 所示, 与对照组 (1 组) 比较, Western-blot 检测不同浓度的 6-姜烯酚对 Caspase3、PARP1、Bax 表达呈现不同程度升高 ($p<0.05$), 但随着 6-姜烯酚的浓度升高, Western-blot 检测 BCL2 的表达逐渐降低 ($p<0.05$)。同样说明 6-姜烯酚可能通过对 Caspase3、PARP1、Bax 及 BCL2 的不同表达来促进肿瘤细胞凋亡的。

2.5 6-姜烯酚可增加 Bax/BCL2 比值

史婷婷^[19]等研究发现, 芹菜素可对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡发生促进作用, 同时证实了凋亡可能与降低 Bax/BCL2 比值有直接关系。还有学者^[20]发现铁皮石斛多糖对高糖诱导的血管内皮细胞也与 Bax/BCL2 比值有密切关系。本研究结果显示 (如图 6), 与对照组 (1 组) 相比, 随着 6-姜烯酚浓度的升高, Bax/BCL2 比值逐渐升高, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。故表明 6-姜烯酚可能通过提高 Bax/BCL2 比值以促进肿瘤细胞发生凋亡。

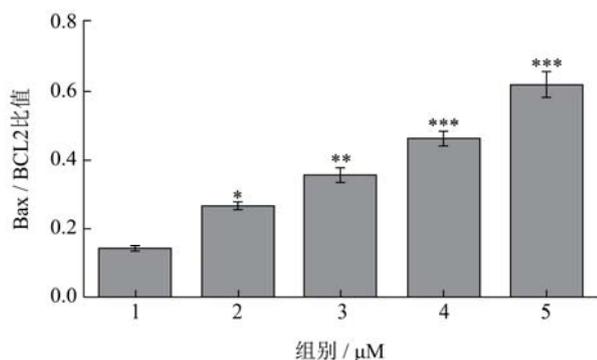


图 6 Western-blot 检测 6-姜烯酚对 HCT116 中 Bax/BCL2 比值的影响

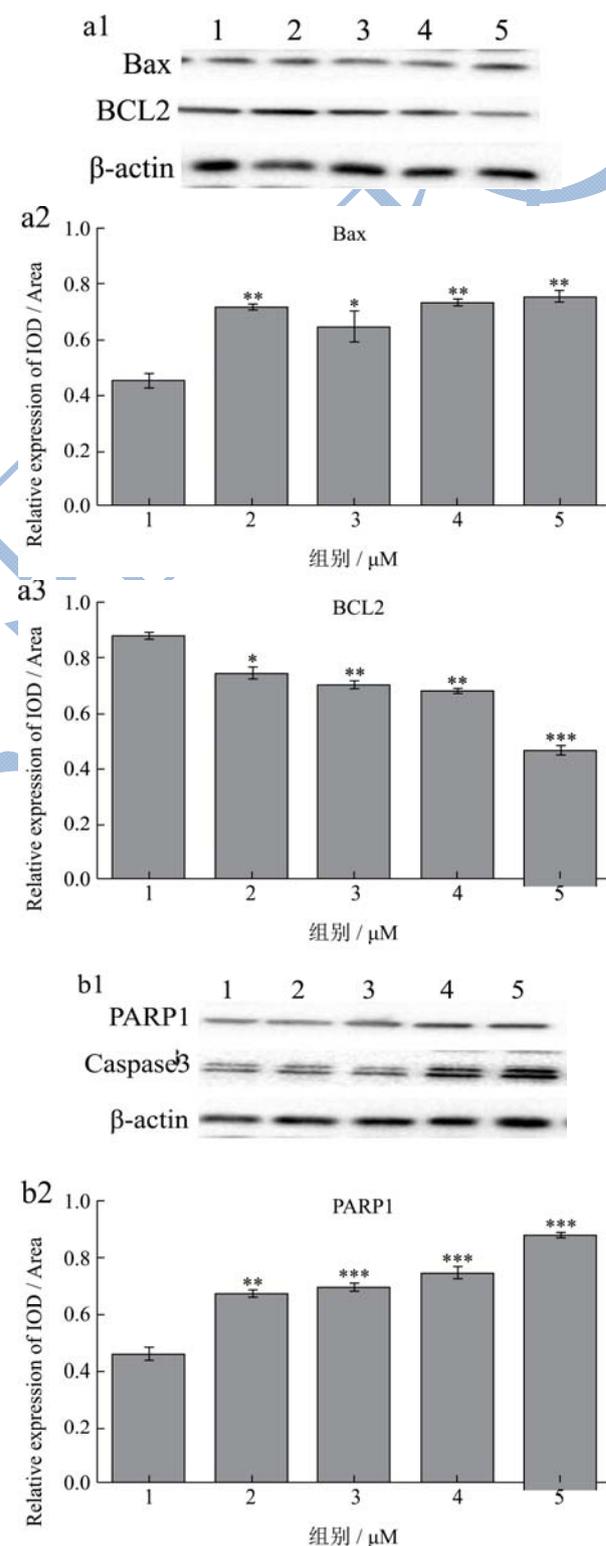
Fig.6 The effects of 6-shogaol on the expression of Bax/BCL2 ratio in HCT116 detected by Western-blot

注: 1 表示阴性对照组; 2 表示 HCT116-6 姜烯酚 (5 μM) 组; 3 表示 HCT116-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 4 表示 HCT116-6 姜烯酚 (15 μM) 组; 5 表示 HCT116-6 姜烯酚 (20 μM) 组。与对照组相比, $##p<0.01$; 与 H_2O_2 组相比, $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。

2.6 6-姜烯酚可增加 HT29 中 Caspase3、

PARP1、Bax 表达, 并抑制 BCL2 表达

与文献报道一致, 本实验如图 7 (a 和 b) 所示, 与对照组 (1 组) 比较, 同样得出 Western-blot 检测不同浓度的 6-姜烯酚对 Caspase3、PARP1、Bax 表达呈现不同程度升高 ($p<0.05$), 而 BCL2 的表达却逐渐降低 ($p<0.05$), 与 HCT116 细胞结论基本相同。



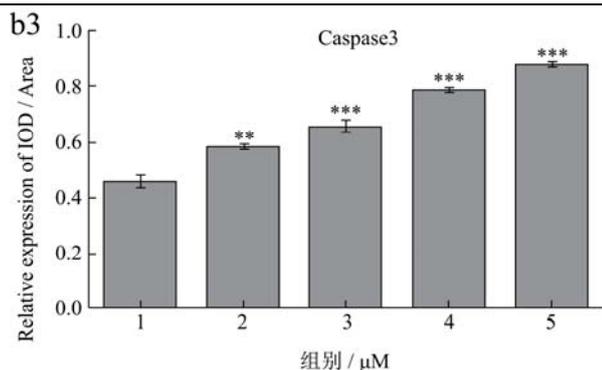


图7 Western-blot 检测 6-姜烯酚 HT29 中 Caspase3、PARP1、MCC1、A2F 及 BCL2 的表达的影响

Fig.7 The effects of 6-shogaol on the expressions of Caspase3, pArp1, Bax and BCL2 in HT29 detected by Western-blot

注: 1 表示阴性对照组; 2 表示 HT29-6 姜烯酚 (5 μM) 组; 3 表示 HT29-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 4 表示 HT29-6 姜烯酚 (15 μM) 组; 5: HT29-6 姜烯酚 (20 μM) 组。与对照组相比, ## $p<0.01$; 与 H_2O_2 组相比, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

2.7 6-姜烯酚可增加 Bax/BCL2 比值

如图 8 所示, 与对照组 (1 组) 相比, 随着 6-姜烯酚浓度的升高, Bax/BCL2 比值逐渐升高, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。同样可以得出, 6-姜烯酚可能是通过增加 Bax/BCL2 比值来促进 HT29 细胞发生凋亡。

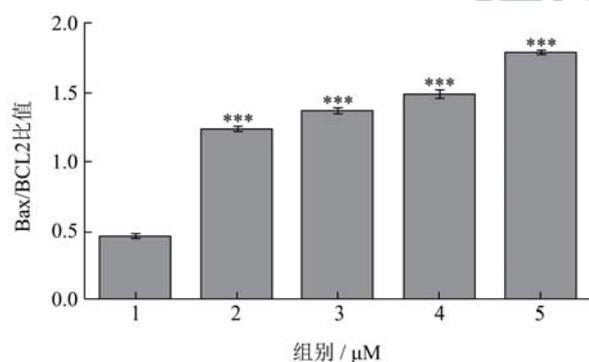


图8 Western-blot 检测 6-姜烯酚对 HT29 中 Bax/BCL2 比值的影响

Fig.8 The effects of 6-shogaol on the expression of Bax/BCL2 ratio in HT29 detected by Western-blot

注: 1 表示阴性对照组; 2 表示 HT29-6 姜烯酚 (5 μM) 组; 3 表示 HT29-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 4 表示 HT29-6 姜烯酚 (15 μM) 组; 5 表示 HT29-6 姜烯酚 (20 μM) 组。与对照组相比, ## $p<0.01$; 与 H_2O_2 组相比, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

3 结论

3.1 BCL2 家族蛋白^[18]在细胞凋亡过程中起到重要的引导作用, 这类蛋白质一般来说可以维持整个细胞膜

结构的完整性。有研究表明^[19,20], 已经在多种动物、细菌及线虫类中直接发现存在 BCL2 家族蛋白表达的证据, 但其功能却不尽相同, 一类可以抗凋亡, 例如 BCL2、BCL-xL 和 BCL-W 等, 另一类功能却截然相反, 可促使凋亡发生发展进程, 具体有 Bax、Bak 和 Bok 等家族成员。

3.2 目前一般研究的细胞凋亡通路大约有 3 条, 即内质网通路、线粒体通路及死亡受体表达通路^[21]。这三种通路联系密切, 可同时发生, 也可相继发生, 主要通过 Caspase3、PARP1、MCC1、A2F 和 BCL2 这几种凋亡蛋白的表达来调控细胞的凋亡, 尤其是 Caspase 家族的激活与释放, 几乎是每种凋亡通路的关键。此外, 国内外还有研究称^[22], 激活后的 Caspase3、PARP1、MCC1、Bax 和 BCL2 可以直接促进某种细胞凋亡通路的发生, 进而导致凋亡信号转导, 促使细胞死亡, 而且这种激活诱导反应一旦发生, 几乎是不可能逆转的。

3.3 本研究发现 6-姜烯酚可诱导 HCT116 和 HT29 凋亡, 并且可能与激活 Bax、Caspase3、PARP1 表达、释放及增加 Bax/BCL2 比值比例相关, 表明了 6-姜烯酚确实可以诱导结直肠癌发生凋亡, 抑制肿瘤增殖, 为临床治疗提供必要的理论依据。此外, 值得注意的是, 结直肠癌的发生发展是多因素、多途径、多步骤的过程, 其分子机制极其复杂, 所以应用 6-姜烯酚对结直肠癌的治疗仍需进一步评估治疗风险以及可能带来的一系列副作用。

参考文献

- [1] 王艳俊, 蒋永新, 刘珊, 等. 同期放化疗诱导人结直肠癌细胞发生上皮-间质转化[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(1): 115-120
WANG Yan-jun, JIANG Yong-xin, LIU Shan, et al. Epithelial mesenchymal transition induced by concurrent chemoradiotherapy in human colorectal cancer cells [J]. Journal of Clinical and Pathology, 2017, 37(1): 115-120
- [2] 李倩, 徐春燕, 彭鹏, 等. 姜黄素对 TNF- α 诱导人结直肠癌细胞上皮间充质转化、迁移的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(34): 1-3
LI Qian, XU Chun-yan, PENG Peng, et al. Effects of curcumin on epithelial mesenchymal transition and migration of human colorectal cancer cells induced by TNF- α [J]. Shandong Medical Journal, 2016, 56(34): 1-3
- [3] 董宁宁, 宋莉, 李卓玉, 等. 滴滴涕对人大肠癌 DLD1 细胞上皮间充质转化的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(2): 172-178

- DONG Ning-ning, SONG Li, LI Zhuo-yu, et al. Effects of DDT on epithelial mesenchymal transition in human colorectal carcinoma DLD1 cells [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2017, 31(2): 172-178
- [4] 白璇.FOXQ1 基因沉默型大肠癌细胞的构建及大肠癌 FOXQ1 与 EGFR 基因的相关性研究[D].昆明:昆明医科大学,2015
- BAI Xuan. Construction of FOXQ1 silent colon cancer cell line and correlation between FOXQ1 and EGFR gene in colorectal cancer [D]. Kunming: Kunming Medical University, 2015
- [5] 朱双伟.FOXQ1 基因对大肠癌血管生成及增殖的影响和机制的探讨[D].重庆:重庆医科大学,2016
- ZHU Shuang-wei. The effect and mechanism of FOXQ1 gene on angiogenesis and proliferation of colorectal cancer [D]. Chongqing: Medical University of Chongqing, 2016
- [6] 李炜,李冰.细胞凋亡与 Nrf2 信号通路研究进展[J].国外医学医学地理分册,2013,34(1):60-64
- LI Wei, LI Bing. Advances in apoptosis and Nrf2 signaling pathway [J]. Foreign Medical Geographic Section, 2013, 34(1): 60-64
- [7] 崔丹,杨宝山.Nrf2 信号通路及肝细胞凋亡研究进展[J].实用肝脏病杂志,2016,19(3):365-368
- CUI Dan, YANG Bao-shan. Advances in Nrf2 signaling pathway and hepatocyte apoptosis [J]. Chinese Journal of Practical Liver Diseases, 2016, 19(3): 365-368
- [8] 徐德梅.卤代醌类化合物介导肝细胞炎症反应、内质网应激和凋亡的信号通路分析[D].重庆:西南大学,2015
- XU De-mei. Signal pathway analysis of halogenated quinone compounds mediating liver cell inflammatory response, endoplasmic reticulum stress and apoptosis [D]. Chongqing: Southwestern University, 2015
- [9] 杨煜翠.综述干姜的药理研究进展[J].医药卫生:文摘版,2016,4:261-261
- YANG Yu-cui. Review of progress in pharmacological research of dried ginger [J]. Medical Abstracts: Edition, 2016, 4: 261-261
- [10] 申成松.中药干姜临床配伍应用及药理研究[J].医药前沿,2016,6(7):330-331
- SHEN Cheng-song. Chinese medicine clinical application and pharmacological research of ginger and [J]. Medical Frontier, 2016, 6(7): 330-331
- [11] 孙晓娇.基于生物热动力学研究附子、干姜不同配伍层次组合的寒热药性/属性差异[D].成都:成都中医药大学,2014
- SUN Xiao-jiao. Biothermokinetic studies on aconite and dried ginger with different levels of combined cold heatnature/attribute difference [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2014
- [12] 左树宇.中药干姜临床配伍应用及药理分析[J].健康之路,2013,12
- ZUO Shu-yu. Chinese medicine clinical application and pharmacological analysis of ginger [J]. The Road to Health, 2013, 12
- [13] 潘文波,乐春生.中药干姜临床配伍应用及药理研究[J].亚太传统医药,2014,10(21):35-36
- PAN Wen-bo, YUE Chun-sheng. Chinese medicine clinical application and pharmacological study of ginger compatibility [J]. Asia Pacific Traditional Medicine, 2014, 10(21): 35-36
- [14] Simon-Brown K, Solval K M, Chotiko A, et al. Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 70: 119-125
- [15] Jorge N, Andreo D. Antioxidant activity of ginger extract (*Zingiber officinale*) in soybean oil under thermoxidation [J]. Nutrition & Food Science, 2013, 43(1): 49-54
- [16] Hung J Y, Hsu Y L, Li C T, et al. 6-Shogaol, an active constituent of dietary ginger, induces autophagy by inhibiting the AKT/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. J. Agric. Food Chem., 2009, 57(20): 9809-9816
- [17] Tan B S, Kang O, Mai C W T, et al. 6-Shogaol inhibits breast and colon cancer cell proliferation through activation of peroxisomal proliferator activated receptor gamma (ppARgamma) [J]. Cancer Lett., 2013, 336: 127-139
- [18] Park S J, Lee M Y, Son B S, et al. TBK1-targeted suppression of TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors by 6-shogaol, an active component of ginger [J]. Biosci., Biotechnol., Biochem., 2009, 73(7): 1474-1478
- [19] 史婷婷,白建平,梁月琴,等.芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响[J].中国药理学通报,2011,27(5):666-671
- SHI Ting-ting, BAI Jian-ping, LIANG Yue-qin, et al. Effects of apigenin on cardiomyocyte apoptosis and expression of related proteins Bcl-2, Bax and Caspase-3 in ischemia/reperfusion rats [J]. China Journal of

- Pharmacology, 2011, 27(5): 666-671
- [20] 张贝贝,刘文洪,李俊峰,等.铁皮石斛多糖对高糖诱导的血管内皮细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响[J].中国药理学通报,2015,31(1):64-70
- ZHANG Bei-bei, LIU Wen-hong, LI Jun-feng, et al. Effects of Dendrobium candidum polysaccharides on the expression of Bax and Bcl-2 in vascular endothelial cells induced by high glucose [J]. Chinese Journal of Pharmacology, 2015, 31(1): 64-70
- [21] Jin X, Liu Q, Jia L, et al. Pinocembrin Attenuates 6-OHDA-induced neuronal cell death through Nrf2/ARE pathway in SH-SY5Y cells [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2015, 35(3): 323-33
- [22] Jang J Y, Min J H, Chae Y H, et al. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via SHp-2 oxidation [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 20(16): 2528-40
- [23] Manton C, Chandra J. Oxidative Stress and the proteasome: mechanisms and therapeutic relevance [M]. Resistance to proteasome Inhibitors in Cancer. Springer International publishing, 2014
- [24] 林琳,于旭华,许银姬,等.健脾益肺 II 号对熏烟联合脂多糖诱导大鼠肺组织氧化/抗氧化失衡的调节及超微结构的影响[J].南京中医药大学学报自然科学版,2015, 31(1):39-43
- LIN Lin, YU Xu-hua, XU Yin-ji, et al. Effect of Jianpi Yifei No.2 on the regulation of oxidation/antioxidation imbalance and ultrastructural changes in lung tissues of rats induced by smoke and lipopolysaccharide [J]. Journal of Nanjing University of Chinese Medicine, 2015, 31(1): 39-43
- [25] 岳原亦,张扬,张一奇.Caspase 家族与细胞凋亡[J].中国医疗前沿,2011,6(6):25-26
- YUE Yuan-yi, ZHANG Yang, ZHANG Yi-qi. Caspase family and apoptosis [J]. Chinese Medical Research Frontiers, 2011, 6(6): 25-26