

6-姜烯酚对 H₂O₂ 诱导 NCM460 和 HCT116 氧化损伤的作用研究

王宇锋^{1,2}, 陈超¹, 杨银学³, 巩发海¹, 孙书豪¹, 李海³

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004) (2. 上海儿童医学中心, 上海 200127)

(3. 宁夏医科大学总医院, 宁夏银川 750004)

摘要: 建立结肠癌细胞氧化损伤模型, 加入 H₂O₂ 刺激, 通过体外细胞实验研究 6-姜烯酚对 H₂O₂ 诱导人正常肠上皮细胞 (NCM460) 和原位结肠癌细胞 (HCT116) 氧化损伤的不同作用及可能的分子机制。利用倒置显微镜观察不同浓度 6-姜烯酚对 H₂O₂ 诱导 NCM460 和 HCT116 后细胞形态的改变。CCK8 法筛选 6-姜烯酚的浓度区间, 并测定细胞存活率。Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测不同分组细胞凋亡。Western-blot 检测分析相关凋亡蛋白 (Caspase3、PARP1、MCC1、A2F、BCL2) 的表达。结果显示, 与对照组相比, 6-姜烯酚可降低 H₂O₂ 诱导的 NCM460 中 Caspase3、PARP1、MCC1、A2F 表达, 促进 BCL2 的表达 ($p < 0.05$), 具有抗氧化作用, 并促进 H₂O₂ 诱导的 NCM460 增殖 ($p < 0.05$), 但是在 HCT116 中。6-姜烯酚却促进 Caspase3、PARP1、MCC1、A2F 表达, 抑制 BCL2 表达 ($p < 0.05$), 不同程度加强 H₂O₂ 对 HCT116 的氧化损伤, 抑制细胞增殖 ($p < 0.05$)。因此可以得出 6-姜烯酚对 H₂O₂ 诱导 NCM460 及 HCT116 具有明显不同的相反作用, 这一发现可为进一步研究 6-姜烯酚抗结肠肿瘤具体相关机制或通路提供指导意义。

关键词: 过氧化氢 (H₂O₂); 人正常肠上皮细胞 (NCM460); 原位结肠癌细胞 (HCT116); 6-姜烯酚; 细胞增殖

文章篇号: 1673-9078(2017)12-6-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.12.002

Effects of 6-shogaol on H₂O₂-Induced Oxidative Damage in NCM460 and HCT116

WANG Yu-feng^{1,2}, CHEN Chao¹, YANG Yin-xue³, GONG Fa-hai¹, SUN Shu-hao¹, LI Hai³

(1. Ningxia Medical University, Clinical Medical College, Yinchuan 750004, China) (2. Shanghai Children's Medical Center, Shanghai 200127, China) (3. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: In this study, the model of oxidative damage in colorectal cancer cells was established. After the stimulation of hydrogen peroxide (H₂O₂), the different effects and possible molecular mechanisms of 6-shogaol on H₂O₂-induced oxidative damage in human intestinal epithelial cells (NCM460) and *in situ* colon cancer cells (HCT116) cells *in vitro* were investigated. Inverted microscope was used to observe the changes of cell morphology in HCT116 and NCM460 induced by H₂O₂ with different concentrations of 6-shogaol. CCK-8 (Cell Counting Kit-8) method was used to screen the concentration interval of 6-shogaol and the cell survival rate was determined. Annexin and V-FITC/PI cytometry were used to detect apoptosis of different groups. The expressions of related apoptotic proteins (Caspase-3, poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), MCC1, A2F, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)) were detected by Western-blot. As compared with the model group, 6-shogaol could reduce the expressions of caspase-3, PARP-1, MCC-1, A2F and promote the expression of Bcl-2 ($p < 0.05$) in NCM460 induced by H₂O₂, indicating that 6-shogaol had anti-oxidant and pro-proliferative effects ($p < 0.05$). However, 6-shogaol could promote the expression of caspase3, PARP-1, MCC1 and A2F, and inhibit the expression of Bcl-2 ($p < 0.05$) in HCT116 induced by H₂O₂, indicating that 6-shogaol could enhance the oxidative damage of HCT116 induced by H₂O₂ and inhibit cell proliferation ($p < 0.05$). It could be concluded that 6-shogaol had different opposite effects in NCM460 and HCT116 induced by H₂O₂, which might provide guidance for further studies on specific mechanisms or pathways of 6-shogaol against colorectal cancer.

Key words: hydrogen peroxide (H₂O₂); human intestinal epithelial cells (NCM460); *in situ* colon cancer cells (HCT116); 6-shogaol; cell proliferation

收稿日期: 2017-07-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81460369); 宁夏自然科学基金项目 (NZ16136); 2017 年宁夏“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: 李海, 男, 主任医师 (教授), 硕士生导师, 研究方向: 结直肠肿瘤发生发展机制

结直肠肿瘤 (Colorectal neoplasms) 是目前全世界最为常见的恶性肿瘤之一。然而, 至今为止, 除了将结直肠恶性肿瘤的病理分期可以作很好的分类之外, 其余的主要治疗手段仍以手术切除, 联合放、化疗为主, 早期的恶性结直肠肿瘤 5 年生存率可高达 90%。但因其较高的复发率及转移率, 加上患者对放、化疗的不良反应, 其死亡率一直居高不下。探索结直肠肿瘤的发生发展机制, 对于寻找新的治疗方案, 降低结直肠肿瘤的发病率和死亡率有很大的意义^[1]。

由细胞失衡引起的氧化应激反应, 消除活性氧 (ROS), 包括超氧阴离子和过氧化氢 (H_2O_2), 是导致结直肠癌细胞损伤和死亡的主要原因^[2]。过氧化氢可以通过超氧化物歧化酶 (SOD) 产生的超氧阴离子歧化酶 (SOD) 加速酶促过程^[3,4]。此外, 还有文献报道称^[5], H_2O_2 因为比其他 ROS 的半衰期较长, 是导致细胞氧化损伤的一个重要原因, 并且可以被转化成一个高活性的羟基自由基并且可以被还原成亚铁或亚铜离子。抑制氧化应激, 即所谓的抗氧化剂, 包括直接的抗氧化剂和间接的抗氧化剂, 防止活性氧的生成或清除氧。直接的抗氧化剂是通过活性氧和氢的修改分离出电子的氨基, 而间接的抗氧化剂可能是通过上调 II 期解毒和抗氧化酶发挥作用^[6]。近来有报道称^[7,8], 一些抗氧化剂如酚米迦勒反应受体可以通过直接和间接方法共同发挥抗氧化作用, 被称为双功能抗氧化剂。

生姜来源于姜科植物姜 (*Zingiber officinale* Rosc) 的新鲜根茎, 姜的根茎 (干姜)、栓皮 (姜皮) 和叶 (姜叶) 均可入药^[9]。生姜在中医药学里具有发散、止呕和止咳等功效, 现代研究表明, 生姜还具有多种药理学和生理学功能, 如抗肿瘤^[10]、消炎^[11]、抑制环氧化酶 COX2 的表达^[12]、止吐^[13]、解热^[14]和降血糖^[15]等。6-姜烯酚作为生姜的主要活性成分, 因其具有优异的生物活性和极高的稳定性。近年来的相关研究表明, 6-姜烯酚的抑制胃溃疡^[16]、抗肿瘤^[17]以及抗氧化^[18]等功能越来越得到广泛的关注。故推测, 在结直肠肿瘤的增殖过程中, 6-姜烯酚是否也可以抑制结直肠癌细胞的增殖呢? 其具体机制又与哪些通路有关呢? 本研究拟通过检测 6-姜烯酚对 NCM460 及 HCT116 干预表达差异的研究, 进而探讨 6-姜烯酚在结直肠肿瘤细胞增殖中是否具有不同的抑制或促进作用, 旨在为新型药物的研发及临床应用提供必要的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂

McCoy'5A 细胞培养液、RPMI1640 细胞培养液、胎牛血清 (FBS) 购自于以色列; 0.3%过氧化氢溶液购于中杉金桥; PAGE、SDS 购于武汉博士德; 双抗 (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 蛋白定量试剂盒购自于凯基生物公司; 脱脂牛奶、ECL、TEMED 购于新西兰; 0.45 μ m PVDF 膜购于 Thermo 公司; Caspase3、PARP1、MCC1、A2F、BCL2、 β -actin 抗体购自于美国 Abcam 公司; 6-姜烯酚购自于上海源叶生物公司; 甲醇、TBST、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 Thermo 公司。

1.1.2 实验仪器

超净工作台 (Bio-Rad, 型号 ESCO AC2); CO2 培养箱 (Bio-Rad, 型号 03793-6732); 液氮罐 (CBS 型号: 2001); 全自动高压锅 (Bio-Rad, 型号: MLS-3022); 高速冷冻离心机 (Bio-Rad, 型号 5430R); 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad, GEL DOC2000); 紫外可见酶标仪 (美国 Bio-Rad, 型号: 680); 电子天平 (美国 Thermo, 型号: BT323s); 倒置荧光显微镜 (美国 Thermo, 型号: Discover.V22); 水平摇床 (常州普天仪器, 型号 HY-4)。

1.1.3 实验细胞

人正常肠上皮细胞 (NCM460)、原位结肠癌细胞 (HCT116) 购自于美国 ATCC 细胞库, 细胞培养条件: 10%胎牛血清的 MCC 培养基、含 100 U/mL 链霉素和 100 μ g/mL 青霉素, 置于 37 $^{\circ}$ C、95% O_2 、5% CO_2 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

取出保存在液氮罐中冷存的 NCM460、HCT116, 迅速放进 37.5 $^{\circ}$ C 水浴锅中, 并不停晃动冻存管以促进融化, 待冻存管中的细胞液完全融化后迅速转移至超净台, 吸取冻存管液至离心管中并进行离心机 1500 r/min, 5 min 离心, 弃去上清液, 分别加入含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基和 McCoy'5A 培养基小心均匀吹打, 然后将细胞液再次转移至含有完全培养基的培养皿中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养, 次日在显微镜下观察细胞的贴壁生长情况, 隔 24 h 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, 次日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: 第一组 NCM460-

对照、NCM460-H₂O₂、460-H₂O₂-6 姜烯酚 (5 μM)、NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM)、NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (15 μM); 第二组 HCT116- 对照、HCT116-H₂O₂、HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM)、HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (20 μM)、HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (40 μM), 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 于显微镜下观察 6-姜烯酚对不同分组 NCM460、HCT116 增殖的影响及细胞形态的变化。

1.2.3 CCK8 法制作标准曲线

先用细胞计数板计数所制备的上述不同药物干预组的细胞悬液中的细胞数量, 然后接种到 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, 测定 OD 值, 制作出一条以细胞数为横坐标、OD 值为纵坐标的标准曲线。

1.2.4 提取细胞蛋白, 并测定蛋白含量

将上述不同药物干预组细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 收集细胞, 用 BCA 提取试剂盒提取相应的细胞蛋白, 并用 BCA 检测蛋白剂量试剂盒测出相应的蛋白浓度, 并配平, 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, 以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悬浮离心 (2000 r/min, 5 min), 收集细胞, 贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集, 用 PBS 洗涤、离心细胞两次 (2000 r/min, 5 min), 收集 1~5×10⁵ 细胞。加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide, 并再次混匀, 室温、避光、反应 5~15 min, 在 1 h 内应用流式细胞仪观察检测。

1.2.6 Western-Blot 检测蛋白表达

按照所测的蛋白浓度, 将蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶 80 V 电泳约 1.5 h, 然后电转液中湿性电转 100 V、1.5 h, 电转至 PVDF 膜, 4% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h, 并用摇床摇匀, 加入相应的抗体 Caspase3 (1:2000 稀释)、PARP1 抗体 (1:1000 稀释)、MCC1 抗体 (1:2000 稀释)、A2F (1:1000 稀释)、BCL2 (1:1000 稀释)、β-actin (1:1000 稀释), 4 °C 孵育过夜。应用 1% TBST 洗膜, 加入相应的二抗, 室温孵育 1 h, 再用 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 Lab 软件进行图像分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 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-姜烯酚对 H₂O₂ 诱导 NCM460 氧化损伤

具有保护作用

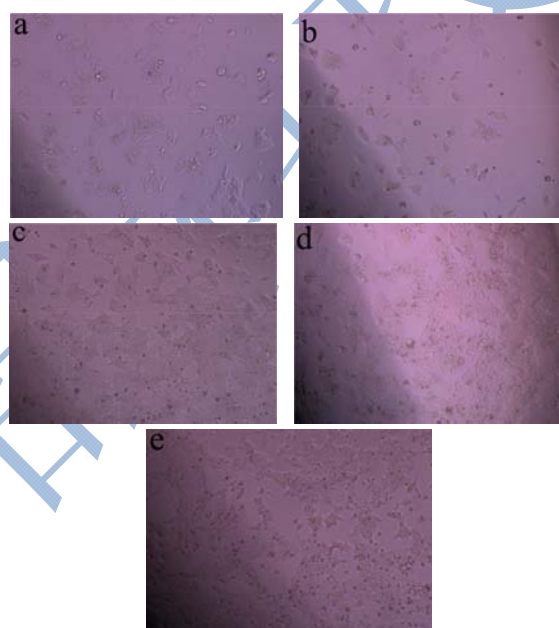


图 1 显微镜下不同浓度 6-姜烯酚干预 NCM460 24 h 后细胞的形态变化

Fig.1 The morphological changes of NCM460 cells after intervention with different concentrations of 6-shogaol for 24 h by microscope observation

注: a 表示 NCM460 对照组; b 表示 NCM460-H₂O₂ 组; c 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (5 μM) 组; d 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM) 组; e 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (15 μM) 组。

不同分组的 NCM460 加入不同浓度的 6-姜烯酚干预, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 在倒置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), 与对照组相比, NCM460-H₂O₂ 组细胞数明显减少, NCM460-6 姜烯酚组, 细胞数明显增加, 而 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚组, 随着 6-姜烯酚浓度的升高, 细胞数呈现不同程度地增加, 表明 6-姜烯酚有一定的抗氧化保护作用, 可对抗 H₂O₂ 对正常细胞的干预刺激, 促进 NCM460 增殖。

2.2 6-姜烯酚可加强 H₂O₂ 诱导 HCT116 氧化损伤

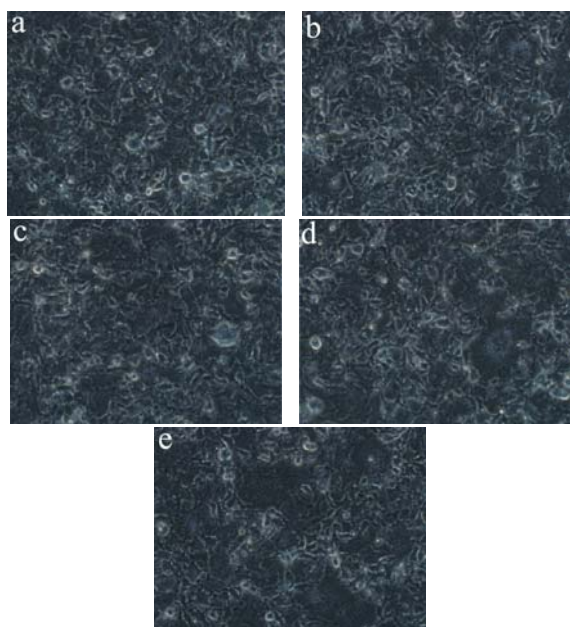


图2 显微镜下不同浓度 6-姜烯酚干预 HCT116 24 h 后细胞的形态变化

Fig.2 The morphological changes of HCT116 cells after intervention with different concentrations of 6-shogaol for 24 h by microscope observation

注: a 表示 HCT116 对照组; b 表示 HCT116-H₂O₂ 组; c 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM) 组; d 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (20 μM) 组; e 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (40 μM) 组。

不同分组的 HCT116 加入不同浓度的 6-姜烯酚干预, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养中培养 24 h, 在倒置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 2), 与对照组相比, HCT116-H₂O₂ 组细胞数明显减少, HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚组随着 6-姜烯酚浓度的升高, 细胞数也明显减少, 甚至在 6-姜烯酚 40 μM 浓度时, 仍可明显加强 H₂O₂ 对细胞的氧化损伤, 抑制细胞增殖。表明 6-姜烯酚可明显加强 H₂O₂ 对 HCT116 的氧化损伤, 抑制细胞增殖。

2.3 CCK8 法制作不同分组 NCM460 的生长曲线

不同分组的 NCM460 加入不同浓度的 6-姜烯酚干预, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养中培养 24 h, CCK8 法检测显示细胞的光密度明显下降与空白对照

组相比差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。结果显示 (图 3), 与阴性对照组相比, NCM460-H₂O₂、460-H₂O₂-6 姜烯酚 (5 μM)、NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM)、NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (15 μM) 组细胞数明显减少, 尤其是 NCM460-H₂O₂ 组细胞数家减少更为明显 ($p < 0.05$); 随着 6-姜烯酚的浓度升高, 可不同程度地抑制 H₂O₂ 对细胞的的氧化损伤, 促进细胞增殖 ($p < 0.05$)。

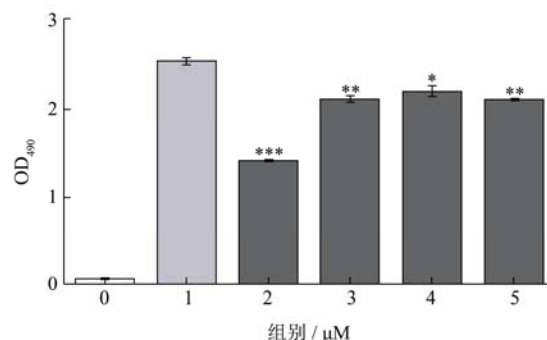


图3 CCK8 法检测不同浓度 6-姜烯酚对 NCM460 增殖能力的调控 (24 h)

Fig.3 The regulation of different concentrations of 6-gingerol on the ability of NCM460 proliferation was detected by CCK-8 assay (24 h)

注: 0 表示空白对照组; 1 表示阴性对照组; 2 表示 NCM460-H₂O₂ 组; 3 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (5 μM) 组; 4 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 5 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (15 μM) 组。与对照组相比, *** $p < 0.001$; 与 NCM460 组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

2.4 CCK8 法制作不同分组 HCT116 的生长曲线

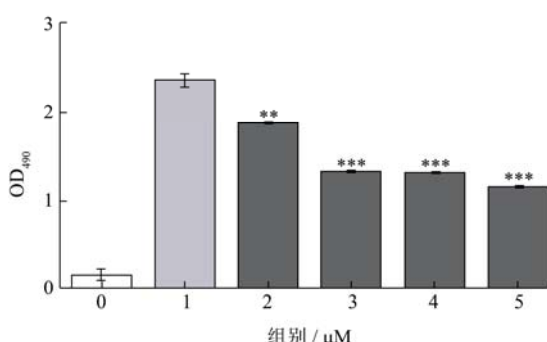


图4 CCK8 法检测不同浓度 6-姜烯酚对 HCT116 增殖能力的调控 (24 h)

Fig.4 The regulation of different concentrations of 6-gingerol on the ability of HCT116 proliferation was detected by CCK-8 assay (24 h)

注: 0 表示空白对照组; 1 表示阴性对照组; 2 表示 HCT116-H₂O₂ 组; 3 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM) 组;

4 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (20 μM) 组; 5 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (40 μM) 组; 与对照组相比, ****p*<0.001; 与 HCT116 组相比, **p*<0.05, ***p*<0.01。

不同分组的 HCT116 分别加入不同浓度的 6-姜烯酚干预, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养中培养 24 h, CCK8 法检测显示细胞的光密度明显下降与空白对照组相比差异有统计学意义 (*p*<0.05)。结果显示 (图 3), 与阴性对照组相比, HCT116-H₂O₂、HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM)、HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (20 μM)、HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (40 μM) 组细胞数明显减少, 尤其在 40 μM (6-姜烯酚) 浓度时, 细胞数家减少更为明显 (*p*<0.05); 随着 6-姜烯酚的浓度升高, 可不同程度地加强 H₂O₂ 对细胞的的氧化损伤, 进而抑制细胞增殖 (*p*<0.05)。

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

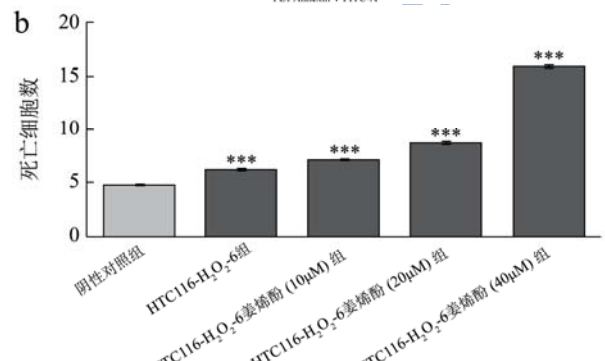
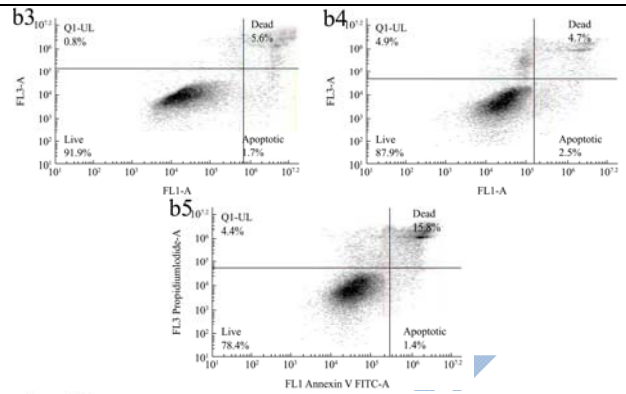
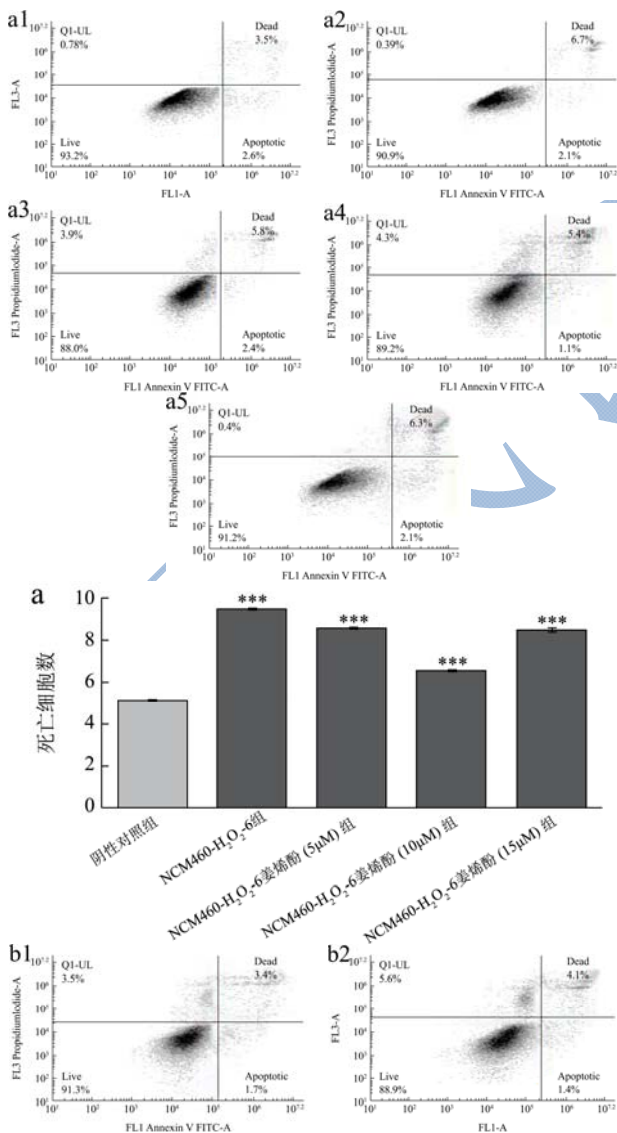


图 5 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 6-姜烯酚诱导人 NCM460 及 HCT116 凋亡

Fig.5 The apoptosis of human NCM460 and HCT116 induced by 6-shogaol were detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry

注: 图 a 中, 1 表示阴性对照组; 2 表示 NCM460-H₂O₂ 组; 3 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (5 μM) 组; 4 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 5 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚 (15 μM) 组。图 b 中, 1 表示阴性对照组; 2 表示 HCT116-H₂O₂ 组; 3 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (10 μM) 组; 4 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (20 μM) 组; 5 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚 (40 μM) 组。与对照组相比, ****p*<0.001; 与阴性对照组相比, **p*<0.05, ***p*<0.01。

NH Kim 等^[19]发现 Akt 抑制神经酰胺诱导神经母细胞瘤细胞凋亡是通过阻断细胞凋亡诱导因子 (AIF) 易位来实现的。还有学者称^[20]在研究人神经母细胞瘤细胞株研究神经酰胺诱导细胞死亡的机制中发现, 活性 Akt 和 Bcl-2 成功阻断神经酰胺诱导的神经元细胞死亡通过凋亡诱导因子的表达抑制易位促进细胞发生凋亡, 进而抑制细胞增殖。本实验将培养的各分组细胞 (NCM460、HCT116) 分别上流式细胞仪检测, 从荧光双参数点图可以观察 (图 5a、b), 其中右上象限和右下象限为死亡细胞。在 NCM460 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减少 (图 5a); 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增多 (图 5b), 从而证实了在

各 NCM460 分组中,6-姜烯酚具有明显的抗氧化作用,可以促进细胞增殖,但是在各 HCT116 分组中,却呈现明显相反的作用,加强了 H₂O₂ 对细胞的氧化损伤,抑制细胞增殖。

2.6 6-姜烯酚可降低 H₂O₂ 诱导的 NCM460 中 Caspase3、PARP1、MCC1、A2F 的表达,并促进 BCL2 的表达

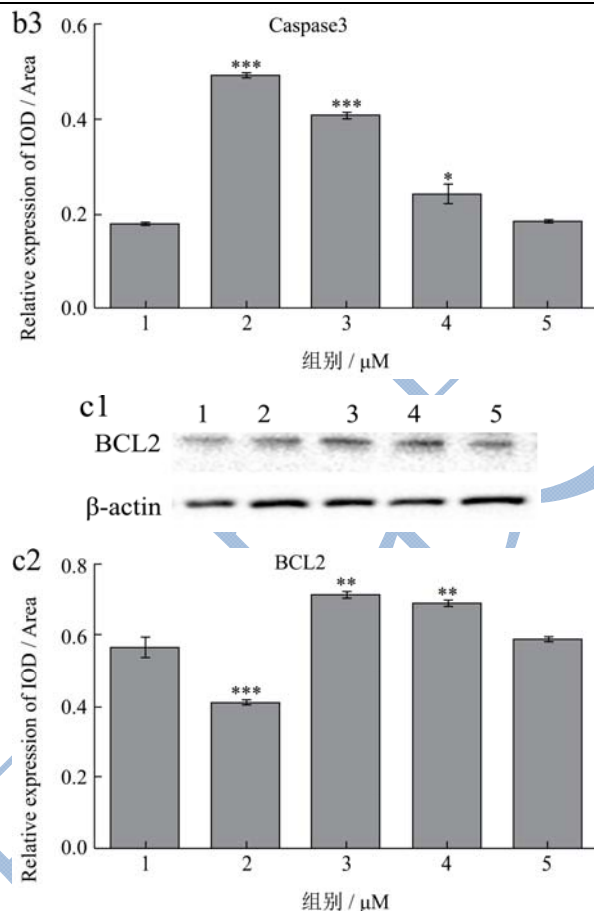
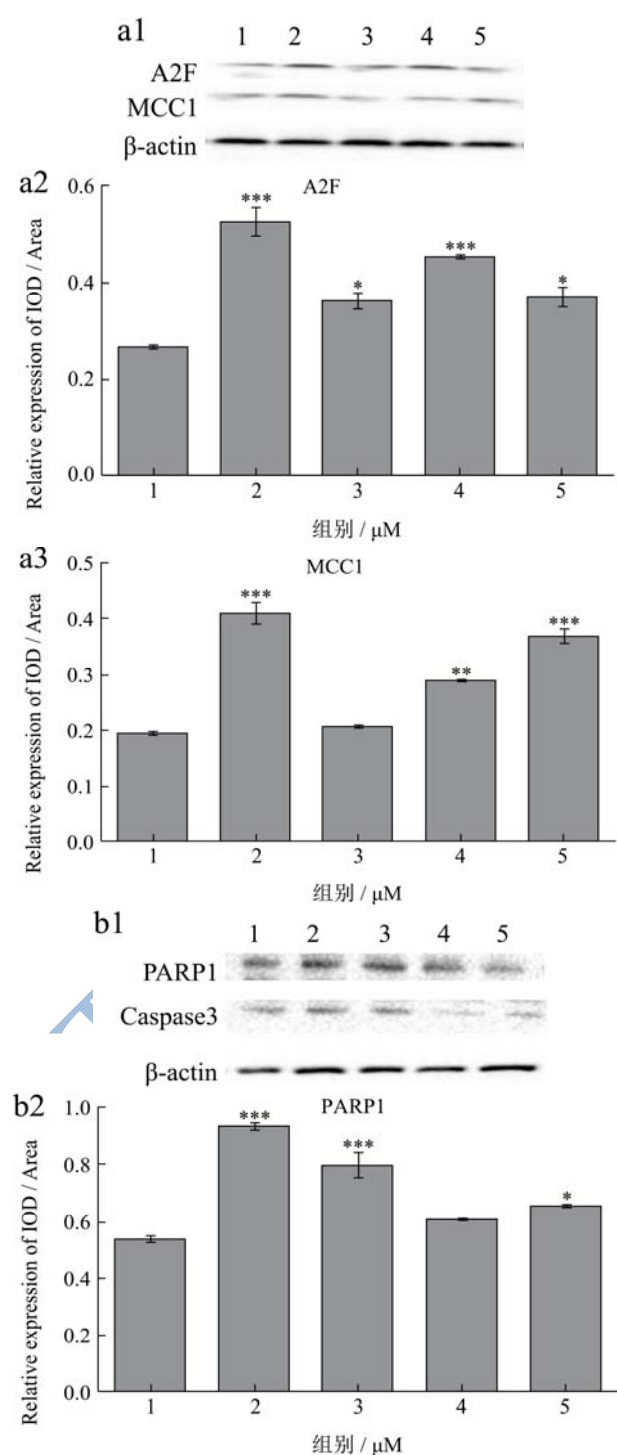


图6 Western-blot 检测 6-姜烯酚 NCM460 中 Caspase3、PARP1、MCC1、A2F 及 BCL2 的表达的影响

Fig.6 Effects of 6-shogaol on the expressions of caspase3, PARP-1, Bax and Bcl-2 in NCM460 were detected by Western-blot

注: 1 表示 NCM460-对照组; 2 表示 NCM460-H₂O₂ 组; 3 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚(5 μM)组; 4 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚(10 μM)组; 5 表示 NCM460-H₂O₂-6 姜烯酚(15 μM)组。与对照组相比, ****p*<0.001, 与 NCM460 组相比; **p*<0.05, ***p*<0.01。

陈晨等^[21]报道,重点探讨了 6-姜烯酚调控 2 型丙酮酸激酶的机制研究,考察了 6-姜烯酚对 PKM2 蛋白水平以及核转位的影响,同时考察了 6-姜烯酚对 PKM2 核内调控蛋白 STAT3 蛋白表达以及核转位的影响,并对 STAT3 下游靶蛋白 Cyclin D1、Bcl-xL、MMP-2、MMP-9、Caspase3 和 PARP1 等表达进行了验证。齐斯琴等^[22]重点探讨了 PARP-1、Caspase-3、survivin 和 Bcl-2 家族的前凋亡蛋白(Bax)在子宫颈癌组织中的表达及其与宫颈癌临床病理特征的关系,证实了 Caspase3、PARP1 和 MCC1 等阳性表达可以作为宫颈癌早期诊断和治疗提供充分的理论依据。本研究结果显示如图 6a、6b 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、MCC1、A2F 表达呈现不同程度升高($p<0.05$), 但与 NCM460-H₂O₂ 比较, 不同浓度的 6-姜烯酚对 Caspase3、PARP1、MCC1、A2F 表达呈现不同程度降低 ($p<0.05$); 如图 6c 所示, 随着 6-姜烯酚的浓度升高, Western-blot 检测 BCL2 的表达逐渐升高($p<0.05$)。

2.7 6-姜烯酚可促进 HCT116 中 Caspase3、PARP1、MCC1 和 A2F 的表达, 并抑制 BCL2 的表达

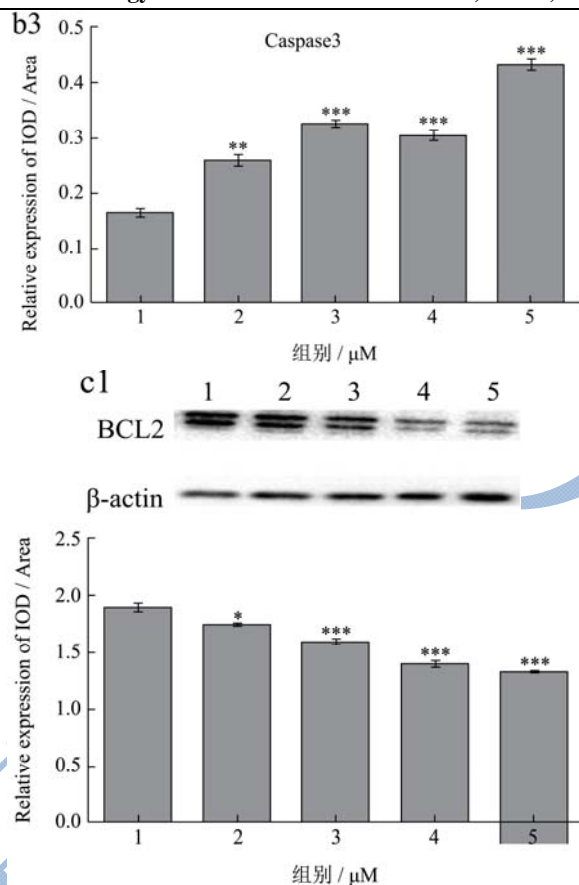
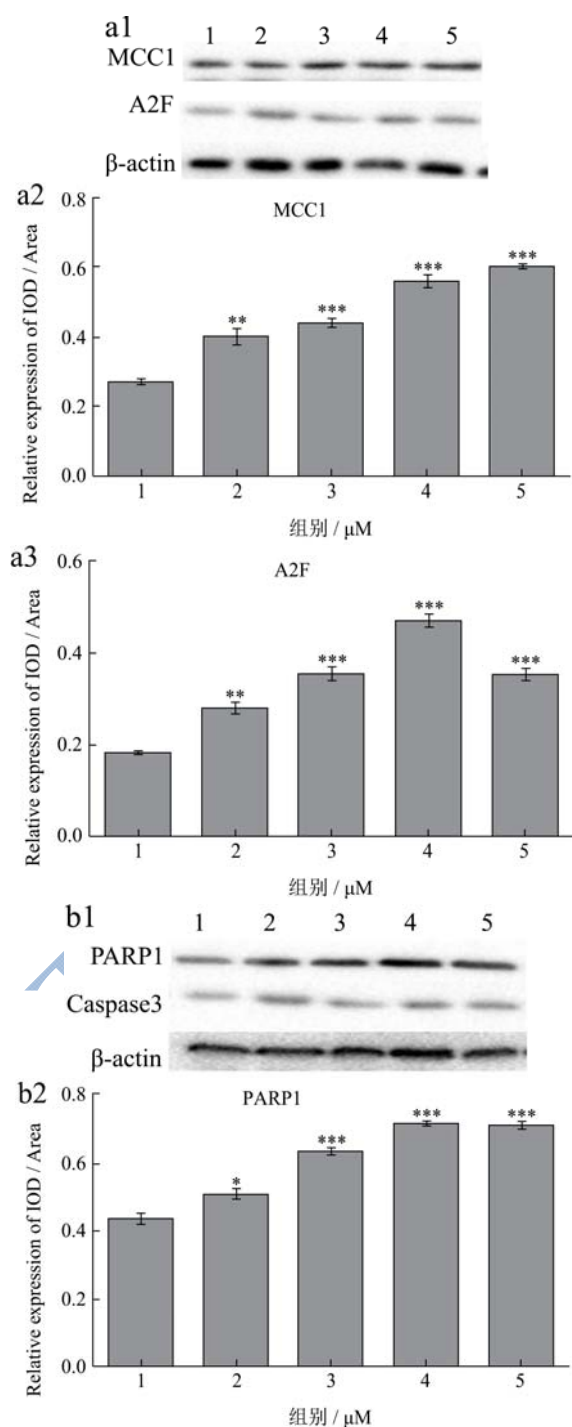


图7 Western-blot 检测 6-姜烯酚 HCT116 中 Caspase3、PARP1、MCC1、A2F 及 BCL2 的表达的影响

Fig.7 Effects of 6-shogaol on the expressions of caspase3, PARP-1, Bax and Bcl-2 in NCM460 were detected by Western-blot

注: 1 表示 HCT116-对照组; 2 表示 HCT116-H₂O₂ 组; 3 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚(10 μ M)组; 4 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚(20 μ M)组; 5 表示 HCT116-H₂O₂-6 姜烯酚(40 μ M)组。与对照组相比, *** $p<0.001$, 与 HCT116 组相比, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

Young 等^[23]通过建立卡拉胶诱导的大鼠急性足肿胀模型研究了 6-姜烯酚的体外抗炎、抗氧化保护作用, 最终证实了 6-姜烯酚具有抗炎、抗氧化的作用。Swarnalatha^[24]同时也报道了生姜各有效提取成分(6-姜烯酚、8-姜烯酚和 10-姜烯酚等)抗氧化、抗炎能力大小与剂量之间的关系, 结果发现 6-姜烯酚的抗氧化保护能力及抗炎作用与化合物结构密切相关, 同时也证实了这个可能与 6-姜烯酚中的 α,β -不饱和羰基相关。本实验如图 7 (a、b 和 c) 所示, 随着 6-姜烯酚浓度的升高, Western-blot 检测 Caspase3、PARP1、MCC1 和 A2F 表达呈现不同程度升高 ($p<0.05$), 而 BCL2 表达却逐渐降低($p<0.05$), 结果显示与 NCM460 中 6-姜烯酚的抗氧化保护作用相反, 理论结果与文献报道大致相同。

3 结论

3.1 过氧化氢(H_2O_2)是人体内的一种代谢产物,同时它也是一种活性氧自由基(reactive oxygenspecies, ROS),可以不同程度地诱导细胞损伤和凋亡^[23]。过氧化氢(H_2O_2)可以穿透细胞膜,并与细胞内的还原型铁离子发生Fenton反应,进而生成高度毒性的羟自由基,对多种细胞可以直接发生损害,甚至诱导死亡^[24]。过氧化氢(H_2O_2)造成的结直肠癌肿瘤细胞损伤和凋亡,已经成为国内外学者研究结直肠癌肿瘤发生发展机制的重要工具之一。

3.2 氧化应激反应是指机体在遭受各种有害刺激时,体内就会产生过多的高活性分子,如活性氧自由基(reactive oxygenspecies, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogenspecies, RNS),如果细胞氧化程度超出自身氧化物的清除,此时体内的氧化系统和抗氧化系统就会失衡,从而可明显诱导细胞损伤和凋亡^[25]。一些活性氧自由基,诸如过氧化物、羟自由基和 H_2O_2 都是高活性分子,这些高活性分子如果积聚过多,还可引起脂质过氧化、DNA损伤和蛋白氧化损伤,进一步加剧细胞功能紊乱和细胞死亡^[26]。体内的活性氧自由基主要来源于 H_2O_2 和超氧阴离子,它的特性是更容易穿透细胞膜,直接对细胞造成损伤,有国外学者表明^[27], $A\beta 1-42$ 引起的细胞毒性就是源于细胞内 H_2O_2 的过多积累,其性质又相对稳定,所以 H_2O_2 对细胞造成的氧化损伤越来越得到广泛的关注。

3.3 为了解6-姜烯酚可能参与结直肠癌肿瘤凋亡的机制,本实验重点检测凋亡相关蛋白Caspase3、PARP1、MCC1、A2F及BCL2在结直肠癌肿瘤细胞和正常肠道细胞中的表达情况,并分析对比了这些凋亡相关蛋白在结直肠癌肿瘤细胞中的不同表达及与凋亡机制的可能关系。其中,BCL2是通过线粒体途径进而对细胞凋亡进行调控,是十分重要的抗凋亡基因^[28]。Caspase3更是促进细胞凋亡的核心因子,很多研究称一旦触及Caspase3的释放表达,促凋亡过程是不可逆转的,该蛋白的活性和表达直接决定肿瘤细胞的凋亡状态^[29]。

3.4 本研究结果提供证据表明,6-姜烯酚通过降低Caspase3、PARP1、MCC1和A2F表达,促进BCL2的表达,促进NCM460增殖,具有明显抗氧化保护作用。但在HCT116细胞,6-姜烯酚却起到相反的作用,加强了 H_2O_2 对细胞的诱导损伤,抑制了肿瘤细胞的增殖。然而,6-姜烯酚具体的直接或者间接抗氧化作用机制及与通过哪些信号通路相关尚未明确,仍需要更多地研究来证实6-姜烯酚的具体抗氧化作用。随着6-姜烯酚研究的不断深入及分子技术的不断进步,可

以对提高药效,为新型药物的研发及临床应用提供必要的依据。

参考文献

- [1] 许敬尧.结直肠癌肿瘤 WHO 分类新进展以及诊断与鉴别诊断[C]//浙江省病理学术年会,2013
XU Jing-yao. New progress in WHO classification and diagnosis and differential diagnosis of colorectal cancer [C]// Annual Meeting of Pathology Society of Zhejiang, 2013
- [2] 罗云梅,付晓霞,杨丹莉,等.淫羊藿苷对 H_2O_2 诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用及机制[J].中国新药与临床杂志,2016,1:40-45
LUO Yun-mei, FU Xiao-xia, YANG Dan-li, et al. Protective effects and action mechanisms of icariin on oxidative injury of human umbilical vein endothelial cells induced by H_2O_2 [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Medicine, 2016, 1: 40-45
- [3] 许金龙,陈芳芳,庞佳楠,等.酪蛋白水解物类蛋白反应修饰产物对 H_2O_2 诱导的人脐静脉内皮细胞(HUPVC)氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2016,11:41-47
XU Jin-long, CHEN Fang-fang, PANG Jia-nan, et al. Protective effect of plastein reaction-modified casein hydrolysates on H_2O_2 -induced injury in human umbilical vein endothelial cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 11: 41-47
- [4] 薛瑾,王庆国,李翼飞,等.三草降压汤不同组分含药血清对 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤模型细胞活性的影响[J].中华中医药杂志,2013,10:2897-2900
XUE Jin, WANG Qing-guo, LI Yi-fei, et al. Effects of drug serum of Sancao Jiangya decoction different components on cell viability of H_2O_2 -induced oxidative damage model in human umbilical vein endothelial cell [J]. Chinese Journal of Chinese Medicine, 2013, 10: 2897-2900
- [5] 王萌.明党参根皮中五种香豆素对 H_2O_2 诱导的HUVEC的保护作用研究[J].价值工程,2016,35(36):132-134
WANG Meng. Research on protective effects of five coumarins from root bark of *Changium smyrnioides* Wolff on H_2O_2 -induced HUVEC [J]. Chinese Journal of Value Engineering, 2016, 35(36): 132-134
- [6] Jin-Kyoung Kim, Hae-Dong Jang. 6-shogaol attenuates H_2O_2 -induced oxidative stress via upregulation of Nrf2-mediated-glutamylcysteine synthetase and heme oxygenase expression in HepG2 cells [J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(1):319-327
- [7] Wang P, Peng X, Wei Z F, et al. Geraniin exerts

- cytoprotective effect against cellular oxidative stress by upregulation of Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via PI3K/AKT and ERK1/2 pathway [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2015, 1850(9): 1751-1761
- [8] Lee M H, Han M H, Lee D S, et al. Morin exerts cytoprotective effects against oxidative stress in C₂C₁₂ myoblasts via the upregulation of Nrf2-dependent HO-1 expression and the activation of the ERK pathway [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 39(2):399
- [9] 王正荣,马汉军.壳聚糖与生姜提取物复合膜在冷却猪肉保鲜中的应用[J].*保鲜与加工*,2017,1:12-16
WANG Zheng-rong, MA Han-jun. Preservation effects of complex film of chitosan and ginger extract on chilled pork [J]. *Preservation and Processing*, 2017, 1: 12-16
- [10] 张永鑫,李俊松,陈丽华,等.高效液相色谱法同时测定姜及其不同炮制品中 5 种姜辣素的含量[J].*中国药理学杂志*, 2012,47(6):471-474
ZHANG Yong-xin, LI Jun-song, CHEN Li-hua, et al. Simultaneous determination of five gingerols in raw and processed ginger by HPLC [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2012, 47(6): 471-474
- [11] 李田叶,刘卫华,梁娜,等.评估生姜及其不同炮制品中姜辣素和其抗氧化活性[J].*食品工业*,2016,12:180-183
LI Tian-ye, LIU Wei-hua, LIANG Na, et al. Quantitative assessment of gingerols and the antioxidant activity in ginger and its processed ginger [J]. *Food Industry*, 2016, 12: 180-183
- [12] 王丽霞,杨事维,李彬,等.超临界 CO₂ 流体萃取生姜姜辣素的抗氧化活性研究[J].*中国食品添加剂*,2014,8:96-101
WANG Li-xia, YANG Shi-wei, LI Bin, et al. Analysis of antioxidant activity of gingerol from ginger by supercritical CO₂ fluid extraction [J]. *Chinese Food Additives*, 2014, 8: 96-101
- [13] 刘丹,张程慧,安容慧,等.生姜主要生物活性成分提取及应用研究进展[J].*食品工业科技*,2016,37(20)
LIU Dan, ZHANG Cheng-hui, AN Rong-hui, et al. Advances on extraction and application of ginger bioactive ingredient [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 37(20)
- [14] 赵文竹,张瑞雪,于志鹏,等.生姜的化学成分及生物活性研究进展[J].*食品工业科技*,2016,37(11)
ZHAO Wen-zhu, ZHANG Rui-xue, YU Zhi-peng, et al. Research process in ginger chemical composition and biological activity [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 37(11)
- [15] 李锐,肖燕,和心依,等.中药姜黄化学成分、生物活性及体内代谢研究进展[J].*西华大学学报自然科学版*,2013, 32(3): 98-104
LI Rui, XIAO Yan, HE Xin-yi, et al. Advance in the research on chemical constitute, biological activity and *in-vivo* metabolism of *Curcuma longa* L. [J]. *Journal of Xihua University, Natural Science Edition*, 2013, 32(3): 98-104
- [16] 丁顺,王昕.生姜对阿司匹林诱发胃溃疡大鼠的胃粘膜保护作用研究[J].*中国民族民间医药*,2012,21(21):22-22
DING Shun, WANG Xin. Study on the protective effect of ginger on gastric mucosa in rats with gastric ulcer induced by aspirin [J]. *Chinese Folk Medicine*, 2012, 21(21): 22-22
- [17] Jin-Kyoung Kim, Hae-Dong Jang. 6-shogaol attenuates H₂O₂-induced oxidative stress via upregulation of Nrf2-mediated-glutamylcysteine synthetase and heme oxygenase expression in HepG2 cells [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2016, 25(1): 319-327
- [18] 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
- [19] Kim N H, Kim K, Park W S, et al. PKB/Akt inhibits ceramide-induced apoptosis in neuroblastoma cells by blocking apoptosis-inducing factor (AIF) translocation [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 102(5): 1160-1170
- [20] Yang S, Zhao X, Xu H, et al. AKT2 blocks nucleus translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) and endonuclease g (EndoG) while promoting caspase activation during cardiac ischemia [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(3)
- [21] 陈晨.6-姜烯酚通过下调 PKM2 的表达抑制黑色素瘤细胞的增殖与转移[D].南京:南京中医药大学,2015
CHEN Chen. 6-shogaol downregulate PKM2 expression to inhibit the proliferation and metastasis of melanoma cells [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2015
- [22] 齐斯琴,德胜,李冬梅,等.子宫颈鳞癌组织中 PARP-1、Caspase-3、survivin 和 Bax 的表达及其临床意义[J].*吉林大学学报(医学版)*,2013,39(3):512-516
QI Si-qin, DE Sheng, LI Dong-mei, et al. Expression of PARP-1, Caspase-3, survivin and Bax in cervical squamous cell carcinoma tissue and their clinical significance [J]. *Journal of Jilin University (Medical Edition)*, 2013, 39(3): 512-516
- [23] Young H Y, Luo Y L, Cheng H Y, et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 96(1-2): 207

- [24] Dugasani S, Pichika M R, Nadarajah V D, et al. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 127(2): 515
- [25] 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
- [26] Manton C, Chandra J. Oxidative stress and the proteasome: mechanisms and therapeutic relevance [M]. *Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer*. Springer International Publishing, 2014
- [27] 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 II formula on regulation of oxidation/antioxidation imbalance and ultrastructural of lung tissues of rats induced by CSE and LPS in rats [J]. *Journal of Nanjing University of Chinese Medicine*, 2015, 31 (1): 39-43
- [28] 刘薇.17 β -雌二醇和 2-甲氧基雌二醇对低氧性肺动脉高压大鼠氧化应激状态的影响[D].石家庄:河北医科大学,2015
LIU Wei. Effects of 17 β -estradiol and 2-methoxy estradiol on oxidative stress in rats with hypoxic pulmonary hypertension [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015
- [29] Yin F, Liu J, Ji X, et al. Baicalin prevents the production of hydrogen peroxide and oxidative stress induced by A β aggregation in SH-SY5Y cells [J]. *Neuroscience Letters*, 2011, 492(2): 76
- [30] 蒋立峰,桑锋,蒋士卿,等.精元康胶囊对骨髓抑制小鼠骨髓细胞凋亡相关基因表达水平的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2011,17(12):119-122
JIANG Li-feng, SANG Feng, JIANG Shi-qing, et al. Effect of Jingyuankang capsule on expression of apoptosis-related genes in bone marrow cells of model mice of chemotherapy-induced myelosuppression [J]. *Journal of Experimental Chinese Journal of Pharmacology*, 2011, 17(12): 119-122
- [31] 梁辰,戴静,周福祥,等.苦参碱促进胃癌细胞凋亡及对STAT3、Cleaved-caspase 3、MMP-2 蛋白表达的影响[J].*肿瘤药学*,2017,7(1):28-32
LIANG Chen, DAI Jing, ZHOU Fu-xiang, et al. Effects of matrine on the apoptosis of gastric cancer cells and on the expression of STAT3, Cleaved-caspase 3 and MMP-2 protein [J]. *Chinese Journal of Oncology Pharmacy*, 2017, 7(1): 28-32