

# 姜黄素对 $H_2O_2$ 诱导的 HT29 细胞氧化损伤的保护作用及机制研究

钟 宇,黄琼林,莫明明,杨青锦,蔡 春\*

广东医科大学分析中心, 湛江 524023

**摘要:**研究姜黄素对  $H_2O_2$  诱导 HT29 细胞氧化应激的保护作用及其可能的分子机制。分别采用低、中、高浓度姜黄素处理  $H_2O_2$  诱导的 HT29 细胞氧化损伤模型,并设置  $H_2O_2$  模型组和正常对照组;MTT 法确定  $H_2O_2$  最佳损伤浓度和时间及姜黄素(2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )对  $H_2O_2$  诱导的 HT29 细胞活性的影响;AnnexinV/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡情况;PI 染色流式细胞术检测细胞周期变化;DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧(ROS);JC-1 染色检测细胞线粒体膜电位;比色法测定乳酸脱氢酶(LDH)释放量,以及丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、caspase-3 和 caspase-9 的水平。结果显示姜黄素组(2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )明显提高  $H_2O_2$  诱导的 HT29 细胞的存活率( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与  $H_2O_2$  模型组相比,姜黄素组细胞凋亡率降低( $P < 0.01$ ),增殖指数增高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),LDH 释放量和细胞内 ROS 降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),线粒体膜电位上升( $P < 0.01$ ),SOD 活力增加( $P < 0.01$ ),MDA 降低( $P < 0.01$ ),caspase-3 和 caspase-9 活性增强( $P < 0.01$ ),并呈剂量-效应关系。结果表明姜黄素在一定剂量范围内对  $H_2O_2$  诱导的 HT29 细胞氧化损伤具有较好的保护作用,该作用可能与清除 ROS,减轻 DNA 氧化损伤,抑制线粒体通路介导的细胞凋亡有关。

**关键词:**姜黄素; $H_2O_2$ ;HT29 细胞;氧化应激

中图分类号:R285.5;R961

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)3-0401-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.3.005

## Protective effects and mechanism of curcumin against $H_2O_2$ -induced oxidative injury on HT29 cells

ZHONG Yu, HUANG Qiong-lin, MO Ming-ming, YANG Qing-jin, CAI Chun\*

Analysis center, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China

**Abstract:** To investigate the protective effects and potential mechanism of curcumin against  $H_2O_2$ -induced oxidative injury in HT29 Cells. A model of  $H_2O_2$ -induced injury in HT29 Cells was successfully established. Cells were divided into control group, model group, curcumin (low, medium and high concentrations) groups. The optimal damage concentration and time of  $H_2O_2$ , and the effect of curcumin (2.5, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) on the activity of  $H_2O_2$ -induced HT29 cells were determined by MTT assay. The apoptotic rate of HT29 cells was detected by Annexin V/ Propidium iodide staining. HT29 cell cycle alteration was analyzed by Propidium iodide staining. ROS production was assessed by DCFH-DA fluorescence. Mitochondria membrane potential was determined by JC-1 staining. The activities of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), caspase-9 and caspase-3 were measured by the spectrophotometric method. Compared with  $H_2O_2$  model group, the cell in Curcumin groups exhibited significantly increased viability ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), decreased apoptosis index ( $P < 0.01$ ), increased proliferation index ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), decreased intracellular ROS ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), increased mitochondrial membrane potential ( $P < 0.01$ ), and enhanced caspase-9 and caspase-3 activity ( $P < 0.01$ ). In addition, curcumin groups reduced LDH leakage ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), inhibited MDA formation ( $P < 0.01$ ) and increased SOD levels ( $P < 0.01$ ). Curcumin has favorable protective effect on  $H_2O_2$ -induced HT29 cell injury in a certain dose range, which may be related to scav-

收稿日期:2018-09-17 接受日期:2019-01-23

基金项目:国家自然科学基金(21375029);湛江市科技攻关计划(2015B01025);广东省医学科研基金(A2017005, B2017044);广东医科大学科研基金面上培育项目(M2016021);广东省中医药局项目(20182072)

\*通信作者 Tel:86-759-2388591; E-mail:caichun@gdmc.edu.cn

enging ROS, alleviating DNA oxidative damage and inhibiting mitochondrial pathway-mediated apoptosis.

**Key words:** curcumin;  $H_2O_2$ ; HT29 cell; oxidative stress

氧化应激是自由基在体内产生的一种负面作用,自由基又称游离基,是具有非偶电子的基团或原子。自由基的产生与清除,处于动态平衡中,产生的自由基量很少时,在体内可以调节细胞生长、基因表达、杀菌、调节血管舒缩状态,从而发挥重要的生理功能。然而自由基的产生与清除之间的平衡被打破,在人体内积累到一定量时,很容易与邻近细胞发生化学反应,使细胞结构受到破坏,造成细胞功能丧失、基因突变、甚至死亡,最终引起氧化损伤相关疾病,如老年性痴呆、帕金森病、肿瘤及炎症等。研究发现氧化应激是炎症反应的一个重要病理过程<sup>[1,2]</sup>,氧化应激失衡在溃疡性结肠炎(UC)的发病及病理进程中发挥着至关重要的作用<sup>[3-5]</sup>,过度激活的氧化应激反应引起氧自由基大量表达,造成结肠组织细胞代谢障碍,肠黏膜屏障功能受损,最终导致肠道组织的慢性炎症反应<sup>[6,7]</sup>。

近年来,从天然药物中探寻具有清除自由基活性的高效低毒的天然抗氧化剂用于保护细胞免受氧化损伤成为研究热点<sup>[8]</sup>。姜黄素(curcumin)是一种相对分子质量低的多酚类化合物,主要来源于姜科植物郁金块根、姜黄根茎、莪术根茎和天南星科植物菖蒲根茎等。具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗凝、抗肝纤维化、抗动脉粥样硬化等广泛的药理活性,且毒性低、不良反应小<sup>[9-11]</sup>。研究发现多种疾病的发生与自由基形成、炎症反应的参与有关,姜黄素抗氧化活性和抗炎作用已引起国内外学者的广泛关注。本研究利用 $H_2O_2$ 诱导人HT29细胞氧化应激损伤模型,探讨姜黄素对HT29细胞的保护作用及其相关分子机制,以期姜黄素的药理药效及临床应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

HT29(人结肠癌细胞)购自美国ATCC公司。

### 1.2 试剂与仪器

RPMI-1640培养基、0.25% EDTA-胰酶、抗青霉素/链霉素溶液、胎牛血清(美国Gibco公司);MTT粉剂(美国Sigma公司);FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit、Cycletest Plus DNA Reagent kit(美国BD公司);caspase-3活性检测试剂盒、caspase-9活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);乳酸脱

氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、活性氧检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、PMSF(碧云天生物技术有限公司);姜黄素标准品(上海源叶生物有限公司HPLC  $\geq 98\%$ )。酶标仪(瑞士Tecan公司);流式细胞分析仪(美国BD公司);化学发光成像仪(上海天能科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

HT29细胞培养于含10% FBS、1%青链霉素双抗的RPMI-1640培养基中,37℃、5%  $CO_2$ 细胞培养箱内培养,2天传代1次。实验时将细胞接种于培养板中,待细胞进入对数生长期进行实验。

#### 1.3.2 细胞用药配制

称取适量姜黄素,溶于DMSO配成100 mmol/L的储存液,并通过0.22  $\mu m$ 膜过滤除菌,使用前,用含10% FBS的RPMI-1640培养液配成不同浓度的工作液。

#### 1.3.3 细胞损伤模型的建立

取对数生长期的细胞,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $5 \times 10^4$ 个/mL,按100  $\mu L$ /孔接种于96孔板中,放置于37℃、5%的 $CO_2$ 培养箱培养24 h。细胞贴壁,汇合度达到80%~90%,弃去培养基,加入用培养液稀释不同浓度的 $H_2O_2$ (0、25、50、100、200、400、800、1 600  $\mu mol/L$ ),设置空白组,空白组加入相同体积的培养液,每组设6个平行孔。培养4、8、12、24 h后,每孔加MTT(5 mg/mL)10  $\mu L$ ,置于37℃、5%的 $CO_2$ 孵箱中培养4 h后,每孔加100  $\mu L$ 的DMSO,震荡10 min,用酶标仪在490 nm处测定每孔OD值,计算细胞抑制率。

#### 1.3.4 姜黄素给药剂量范围的确定

细胞铺板同上,置于37℃、5%的 $CO_2$ 培养箱培养24 h。给予不同浓度的姜黄素(0、2.5、5、10、25、50、100、200  $\mu mol/L$ ),同时设DMSO组与空白组,DMSO组加入含0.1% DMSO的培养液培养细胞,空白组加入相同体积的培养液,每组设6个平行孔,继续培养24 h。MTT法检测不同浓度姜黄素对 $H_2O_2$ 诱导的HT29细胞活力的影响。

1.3.5 姜黄素对 $H_2O_2$ 诱导的HT29细胞氧化损伤保护作用研究的细胞分组及药物处理

取实验待用细胞分组为:①正常组(Control):

加入完全培养基;②模型组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):加入终浓度为 800 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理细胞 24 h;③姜黄素低剂量组(Cur-1)、中剂量组(Cur-2)、高剂量组(Cur-3):细胞贴壁后,终浓度分别为 2.5、5、10 μmol/L 姜黄素预处理 6 h 后,再加入终浓度为 800 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,作用 24 h。

### 1.3.6 姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞毒性的影响

细胞接种于 96 孔板中,放置于 37 ℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。细胞分组及药物处理同“1.3.5”,MTT 法检测姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HT29 细胞毒性的影响。

### 1.3.7 Annexin/PI 双标记法检测 HT29 细胞凋亡

细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及药物处理同“1.3.5”。收集细胞和上清液,用 PBS 轻洗 2 次;1000 rpm 离心 5 min,弃上清,加入适量 1×Binding Buffer 重悬细胞,使细胞密度大约为 1×10<sup>6</sup> 个/mL。加入 5 μL Annexin V-FITC 避光染色 15 min,再加入 5 μL PI 于室温下避光孵育 5 min;流式细胞仪检测荧光强度。

### 1.3.8 PI 染色分析 HT29 细胞周期

细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及药物处理同“1.3.5”。收集细胞,预冷的 70% 乙醇固定,4 ℃ 过夜。弃去乙醇, PBS 清洗 2 次,加入 0.5 mL 含 10 μL 碘化丙啶及 10 μL RNase 的染色缓冲液悬浮细胞,避光孵育 30 min,流式细胞仪检测。

### 1.3.9 细胞内 ROS 和线粒体膜电位检测

细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及药物处理同“1.3.5”。收集细胞,按试剂盒说明书步骤操作,流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平和线粒体膜电位。

### 1.3.10 LDH 漏出量的检测

细胞接种于 96 孔板中,细胞分组及药物处理同“1.3.5”,设空白对照孔,孵育结束,取各孔上清 120 μL 至新的 96 孔板中,加 60 μL 配好的 LDH 检测工作液,室温避光孵育 30 min 后,用酶标仪在 490 nm 处测定 OD 值,按照试剂说明书计算酶释放量百分数。

### 1.3.11 细胞内 SOD,MDA 水平和 caspase-3, caspase-9 酶活性的检测

细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及药物处理同“1.3.5”。收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,裂解细胞,离心取上清液,另取少量样品上清用 Bradford 法测定蛋白浓度,按试剂盒说明书操作,酶标仪检测细

胞内 SOD,MDA 水平和 caspase-3, caspase-9 活性。

### 1.3.12 统计学分析

应用 SPSS 19.0 及 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行统计分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。计量资料应经方差齐性检验。若为方差齐性,两组间差异采用 *t* 检验,多组间用单因素方差分析,*P* < 0.05 被认为具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 细胞损伤模型的建立

如图 1 所示,与正常对照组比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度为 800 μmol/L,作用时间 4、8、12、24 h 细胞抑制率分别为 22.91%、26.12%、30.30%、36.64%。确定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导细胞损伤的终浓度为 800 μmol/L,作用时间为 24 h。

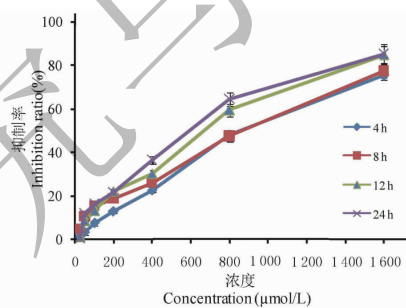


图 1 MTT 法检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HT29 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability in HT29 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

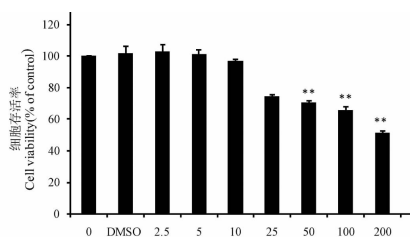


图 2 MTT 法检测姜黄素对 HT29 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of curcumin on cell viability in HT29 cells by MTT assay ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

注:与对照组比较,\*\**P* < 0.01。

Note: Compared with the control group, \*\**P* < 0.01.

### 2.2 姜黄素对 HT29 细胞活力的影响

在正常细胞中,给予不同浓度的姜黄素(0、2.5、5、10、25、50、100、200 μmol/L)单独作用细胞 24 h。MTT 结果表明,与不加姜黄素的正常对照组比,姜黄素在 2.5 ~ 10 μmol/L 范围内对细胞无毒性;此外,0.1% DMSO 对细胞也无毒性(图 2)。

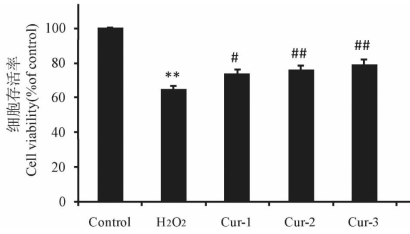


图3 姜黄素对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HT29 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 3 Effect of curcumin on cell death in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced HT29 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with the  $\text{H}_2\text{O}_2$  group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

### 2.3 姜黄素对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤 HT29 细胞活力的影响

与正常对照组相比,  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ ), 姜黄素组 (2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 细胞活力明显高于  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖关系 (图 3)。

### 2.4 姜黄素对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的 HT29 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示 (图 4),  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组细胞凋亡率较正常对照组显著增加 ( $P < 0.01$ ); 姜黄素组 (2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 细胞凋亡率显著低于  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组 ( $P < 0.01$ ), 并呈剂量依赖性抑制凋亡的增加。

### 2.5 姜黄素对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的 HT29 细胞周期的影响

与对照组比较 (图 5),  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组 G0/G1 期所占百分比显著升高 ( $P < 0.01$ ), S 期所占百分

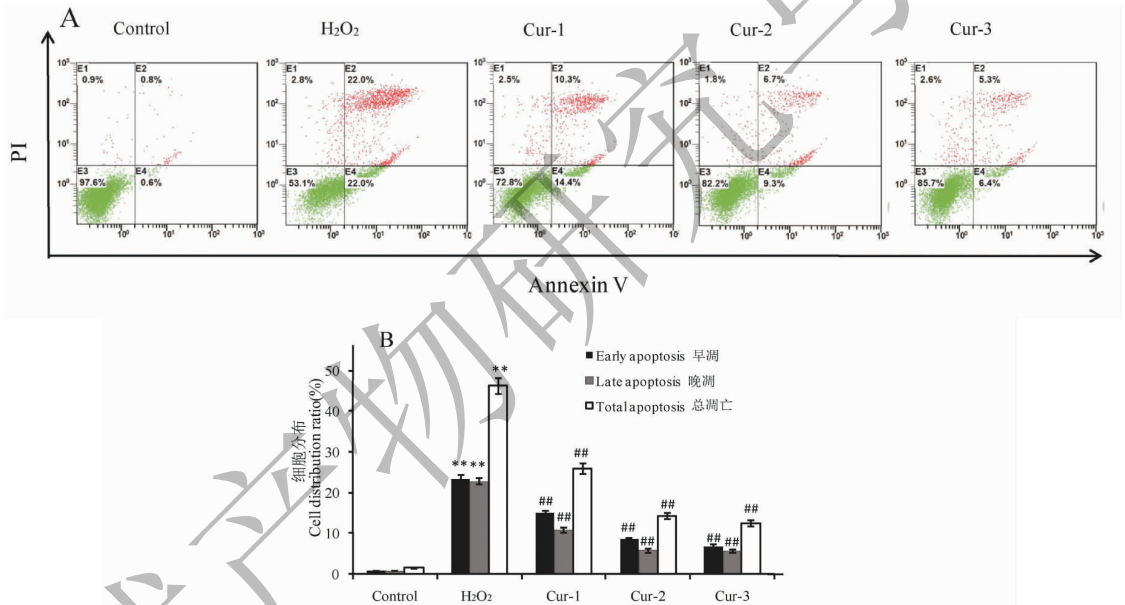


图4 姜黄素对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HT29 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Effect curcumin on apoptosis in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced HT29 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with the  $\text{H}_2\text{O}_2$  group, ##  $P < 0.01$ 。

比例显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组相比, 姜黄素组 (2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) G0/G1 期所占百分比明显减少 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), S 期所占百分比明显增加 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。

### 2.6 姜黄素对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 导致的胞内 ROS 水平和线粒体膜电位的影响

如图 6 所示, 与正常对照组比较,  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组 ROS 水平显著增高 ( $P < 0.01$ ), 线粒体膜电位显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组比较, 姜黄素组

(2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 剂量依赖性抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  导致的胞内 ROS 水平升高 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 线粒体膜电位剂量依赖性升高 ( $P < 0.01$ )。

### 2.7 姜黄素对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤 HT29 细胞内 LDH 漏出率的影响

如图 7 所示,  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组 LDH 释放量显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ); 姜黄素高、中剂量组 LDH 释放量较  $\text{H}_2\text{O}_2$  模型组降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

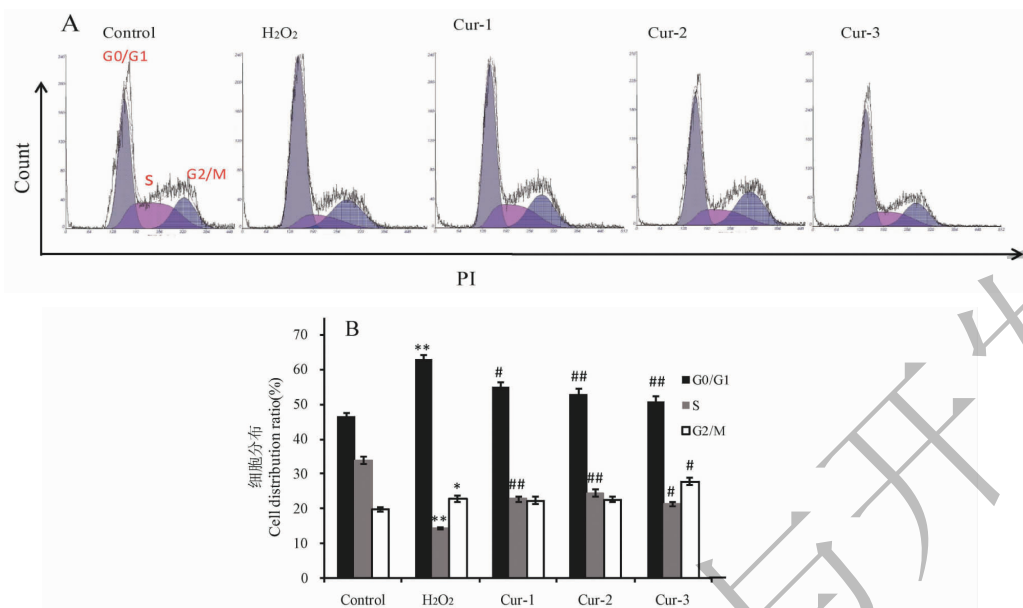


图5 姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 5 Effect of curcumin on cell cycle in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HT29 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

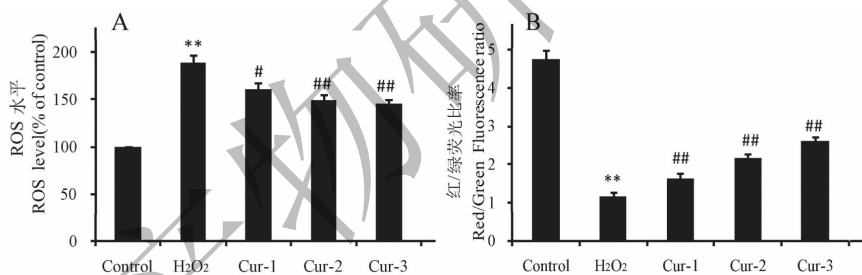


图6 姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞内 ROS 水平和线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 6 Effect of curcumin on the level of ROS and mitochondrial membrane potential in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HT29 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

## 2.8 姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞内 SOD, MDA 水平和 caspase-3, caspase-9 酶活性的影响

与对照组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组中 SOD 显著下降 ( $P < 0.01$ ), MDA 显著升高 ( $P < 0.01$ ), caspase-3 和 caspase-9 的活性均明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组相比, 不同浓度姜黄素预处理组 SOD 明显恢复 ( $P < 0.01$ ), MDA 明显被抑制 ( $P < 0.01$ ), caspase-3 和 caspase-9 活性均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且在 2.5 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围呈剂量依赖关系 (见图 8)。

## 3 讨论

本实验通过研究姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HT29 细胞氧化应激的影响, 探讨其作用的分子机制。首先通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HT29 细胞建立体外氧化应激模型。为了确定姜黄素对 HT29 细胞作用的无毒剂量范围, 通过 MTT 实验, 确定低中高三个剂量 (2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 的姜黄素进行后续的研究。姜黄素组能上调 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞的存活率, 降低细胞凋亡。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组阻滞细胞于 G0/G1 期; 姜黄素组

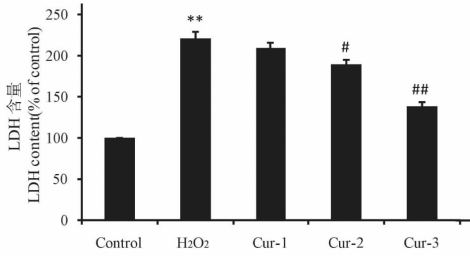


图7 姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞内 LDH 漏出率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig.7 Effect of curcumin on the releasing rate of LDH in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HT29 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

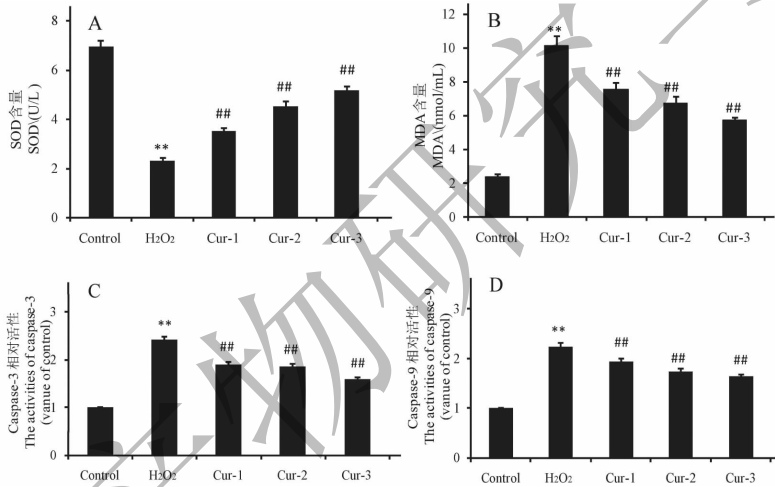


图8 姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞内 SOD,MDA 水平和 caspase-3,caspase-9 酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig.8 Effect of curcumin on the level of SOD,MDA,and the activities of caspase-3,caspase-9 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HT29 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, ##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, ##  $P < 0.01$ .

ROS,LDH 显著升高,SOD 活性降低,MDA 活性提高,表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导细胞膜结构受损,造成抗氧化系统功能减弱,清除氧自由基能力下降;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较,姜黄素组 ROS,LDH 显著降低,SOD 活性明显恢复,MDA 活性明显受到抑制,提示姜黄素具有明显的抗氧化生物学活性,对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的 HT29 细胞氧化损伤的保护作用可能与清除 ROS 有关。

线粒体是细胞的能量工厂,也是自由基最重要的来源,ROS 可以通过多条途径对线粒体造成损伤。本实验中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组线粒体膜电位较正常组

G0/G1 期细胞明显减少,S 期细胞增加。提示该剂量范围内的姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞氧化损伤的保护作用可能与抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 DNA 损伤有关。

活性氧(ROS)是造成 DNA 氧化损伤的主要原因之一,也是机体内主要的氧化剂,正常生理条件下,SOD 等体内的抗氧化剂能清除 ROS,使 ROS 的产生和清除处于动态平衡状态<sup>[12]</sup>。细胞受到损伤后,细胞内生成大量 ROS,引发细胞膜上脂质过氧化反应,生成终产物 MDA;MDA 可破坏组织细胞膜结构,导致受损的细胞膜通透性增强,LDH 等胞内酶大量漏出<sup>[13]</sup>,LDH 是细胞膜完整性的重要指标,细胞在氧化损伤过程中会将细胞内的 LDH 释放到培养液中,所以培养液中 LDH 活性大小可反映细胞的死亡或损伤程度。本研究结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组

显著降低,姜黄素预处理组能显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的线粒体膜电位的下降。表明 2.5 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  剂量范围内的姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞氧化损伤的保护作用可能与线粒体途径有关。

目前认为线粒体通路、死亡受体通路和内质网通路是细胞凋亡的三个主要凋亡信号通路,caspase-3 是这些凋亡信号通路的执行者<sup>[14]</sup>。caspase-9 是凋亡信号转导过程中重要的上游 caspase。在线粒体通路中,活化的 caspase-9 可以激活 caspase-3,引起细胞凋亡<sup>[15,16]</sup>。本研究通过对

caspase-3 和 caspase-9 酶活性进行检测,发现姜黄素组能显著下调 caspase-3 和 caspase-9 的活性,提示姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞氧化损伤的保护作用可能与线粒体介导的凋亡途径有关。

综上所述,2.5 ~ 10 μmol/L 剂量范围的姜黄素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT29 细胞氧化应激损伤具有较好的保护作用,其机制可能是通过抗氧化,改变细胞周期分布,减轻 DNA 氧化损伤,改善线粒体功能,下调诱导细胞凋亡的线粒体通路,从而发挥保护作用,修复 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化损伤。

#### 参考文献

- 1 Almeer RS, Mahmoud SM, Amin HK. Ziziphus spina-christi fruit extract suppresses oxidative stress and p38 MAPK expression in ulcerative colitis in rats via induction of Nrf2 and HO-1 expression[J]. Food Chem Toxicol, 2018, 115(5):49-62.
- 2 Lee SH, Kwon JE, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Intest Res, 2018, 6(1):26-42.
- 3 Mrowicka M, Mrowicki J, Mik M, et al. Association between SOD1, CAT, GSHPX1 polymorphisms and the risk of inflammatory bowel disease in the Polish population[J]. Oncotarget, 2017, 8:109332-109339.
- 4 Yan H, Wang H, Zhang X, et al. Ascorbic acid ameliorates oxidative stress and inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. Int J Clin Exp med, 2015, 8:20245-20253.
- 5 Shalkami AS, Hassan M, Bakr AG. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid-induced ulcerative colitis[J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(1):78-86.
- 6 Patlevic P, Vasková J, Švorc P, et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases[J]. Integr Med Res, 2016, 5:250-258.
- 7 Formentini L, Santacatterina F, Núez de Arenas C, et al. Mitochondrial ROS production protects the intestine from inflammation through functional M2 macrophage polarization[J]. Cell Rep, 2017, 19:1202-1213.
- 8 Kwon SH, Kim JA, Hong SI, et al. Loganin protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis by inhibiting phosphorylation of JNK, p38, and ERK 1/2 MAPKs in SH-SY5Y cells[J]. Neurochem Int. 2011, 58:533-541.
- 9 Zhou HT, Cao JM, Mi SQ, et al. Effects of curcumin on the protein and gene expression of inflammatory cytokines in renal tissue of rat with exercise-related renal ischemia-reperfusion injury[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:1687-1694.
- 10 Li XJ, Zhang XM, Wang M, et al. Preparation and tumor targeting evaluation of curcumin-loaded PLGA nanoparticles modified by tumor penetrating peptides[J]. Chin J New Drugs, 2016, 26:692-698.
- 11 Zhong Y, Yu W, Feng J, et al. Curcumin suppresses tumor necrosis factor-α-induced matrix metalloproteinase-2 expression and activity in rat vascular smooth muscle cells via the NF-κB pathway[J]. Exp Ther Med, 2014, 7:1653-1658.
- 12 Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF-κB signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17:907-916.
- 13 Zhang Z, Yang L, Wang B, et al. Protective role of liriiodendrin in mice with dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 52:203-210.
- 14 Green DR, Llamas F. Cell Death Signaling[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(12):1-24.
- 15 Chen J, Mehta JL, Li D, et al. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells[J]. Circ Res, 2004, 94:370-376.
- 16 Wang S, Long S, Hann SS, et al. Decoction of Chinese herbal medicine fuzheng kang-ai induces lung cancer cell apoptosis via STAT3/Bcl-2/caspase-3 pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018:8567905.