

· 基础研究 ·

姜黄素氧化损伤线粒体诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的研究

胡 辉, 荆绪斌, 蔡先彬, 王钦加

(汕头大学医学院第一附属医院消化科, 广东汕头 515041)

摘要:目的 探讨姜黄素诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的机制。方法 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用于肝癌细胞后, 用流式细胞仪检测细胞过氧化氢(H_2O_2)、线粒体膜电位和细胞亚二倍体凋亡峰情况; 比较姜黄素组和预处理组(姜黄素联合过氧化氢酶)线粒体膜电位和细胞亚二倍体凋亡峰变化情况。结果 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用于肝癌细胞 1、2、3 h 后检测 H_2O_2 分别为(13.49 \pm 3.23)%、(52.43 \pm 6.04)%、(48.21 \pm 7.18)%, 以 2 h 时间点最高。细胞线粒体膜电位在 6、12 h 分别为(59.68 \pm 4.47)%、(29.83 \pm 6.22)%, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。细胞亚二倍体凋亡峰在 24、48 h 分别为(26.53 \pm 4.28)%、(39.50 \pm 6.14)%, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。过氧化氢酶均能抑制上述 2 项指标改变, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 姜黄素作用肝癌细胞后产生 H_2O_2 , H_2O_2 损伤细胞线粒体, 呈时间依赖性诱导肝癌细胞凋亡。

关键词:姜黄素; 过氧化氢; 线粒体膜电位; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.03.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)03-0269-02

Curcumin induced apoptosis of hepatocellular carcinoma by oxidative damaged mitochondria

Hu Hui, Jing Xubin, Cai Xianbin, Wang Qinjia

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College, Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

Abstract: Objective To study the role of hydrogen peroxide on curcumin induced apoptosis of hepatocellular carcinoma. Methods Curcumin or curcumin combined with catalase acted on hepatocellular carcinoma, hydrogen peroxide, apoptotic Sub-G₁ peak and mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometer. Results Hydrogen peroxide ascended to(13.49 \pm 3.23)%, (52.43 \pm 6.04)%, (48.21 \pm 7.18)% respectively after 1, 2, 3 h. Mitochondrial membrane potential was damaged to (59.68 \pm 4.47)% and (29.83 \pm 6.22)% after 6, 12 h ($P < 0.01$). Apoptotic Sub-G₁ peak was (26.53 \pm 4.28)% and (39.50 \pm 6.14)% after 24, 48 h ($P < 0.01$). Catalase could reduce these changes ($P < 0.01$). Conclusion Curcumin in time dependent way induced hepatocellular carcinoma apoptosis by ascending hydrogen peroxide which damaged mitochondrial membrane potential.

Key words: curcumin; hydrogen peroxide; mitochondrial membrane potential; apoptosis

姜黄素是从姜科姜黄属植物姜黄根茎中提取的一种酚类色素, 其抗肿瘤效应近年来受到关注, 有实验证实姜黄素确有明确的抗肿瘤活性^[1-4]。作者的前期研究证实了姜黄素能够诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡, 但其作用机制仍有待进一步明确。本研究旨在探讨加入过氧化氢酶前、后姜黄素诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的变化, 以初步阐述姜黄素诱导肝癌细胞凋亡的机制。

1 材料与方

1.1 主要试剂 姜黄素($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$)购于成都思科华公司, 纯度大于 98%, 过氧化氢酶(CAT)、二甲亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司, 碘化丙啶(PI)、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司, 胰蛋白酶(Tyrisin)购自 Promega 公司, 2、7-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)和碘化二己基恶碳菁(DI-OC₆)分子探针购自美国 Ciochem 公司。将姜黄素溶于 DMSO 中, 使用时用培养基配成 8 mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌 SMMC-7721 细胞复苏后培养在含 10% 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液中, 每周传代 2 次, 取对数生长期细胞进行实验。培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度。人肝癌 SMMC-7721 细胞为汕头大学医学院病理室馈赠。

1.2.2 细胞内过氧化氢(H_2O_2)测定 DCFH-DA 和细胞内 H_2O_2 结合能发出荧光, 常用于检测 H_2O_2 水平。将细胞接种在 6 孔培养板中, 生长至 90% 融合时, 对照组加入等量培养

基, 实验组加入 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素, 分别作用 1、2、3 h, 胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 2 次, 用流式细胞仪检测细胞荧光强度。在检测 30 min 前加入终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA, 检测细胞数为 1×10^6 个, 激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 530 nm。

1.2.3 线粒体膜电位检测 DI-OC₆ 是线粒体的特异荧光染料, 广泛用于线粒体膜电位的检测。将细胞接种在 6 孔培养板中, 生长至 90% 融合时, 对照组加入等量培养基, 实验组加入 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素, 预处理组在实验组基础上加入 100 $\mu\text{g/mL}$ CAT, 分别作用 6、12 h, 胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 2 次, 用流式细胞仪检测细胞荧光强度。DI-OC₆ 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 检测细胞数为 1×10^6 个, 激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 530 nm。

1.2.4 细胞亚二倍体凋亡峰测定 将细胞接种于 6 孔培养板中, 生长至 90% 融合时, 对照组加入等量培养基, 实验组加入 80 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素, 预处理组在实验组基础上加入 100 $\mu\text{g/mL}$ CAT, 分别作用 24、48 h, 胰蛋白酶消化, PBS 洗 2 次, 70% 乙醇固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS 洗 3 次, 0.5 mg/mL RNA 酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h, 用 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 PI 染色, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 30 min, 300 目尼龙网过滤后流式细胞仪检测, 检测细胞数为 1×10^6 个。激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 620 nm。

1.3 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据采用 SPSS11.0 统计软件处理。两组以上数据间比较用方差分析, 两组间比较用 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞内 H_2O_2 姜黄素作用细胞后短时间内即产生 H_2O_2 , 随着时间延长, H_2O_2 生成增加。在 1、2、3 h 时间点, 荧光强度分别为 $(13.49 \pm 3.23)\%$ 、 $(52.43 \pm 6.04)\%$ 、 $(48.21 \pm 7.18)\%$, 除 2 h 时间点和 3 h 时间点比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外, 余两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明在 2 h 左右 H_2O_2 产生达高峰, 见图 1。

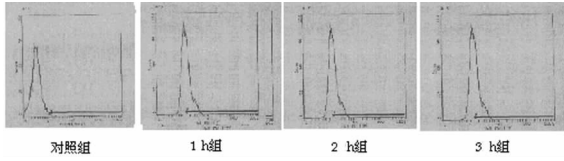


图 1 不同时间点过氧化氢变化

2.2 线粒体膜电位 细胞在姜黄素作用后, 线粒体膜电位发生变化。以对照组为参照 100%, 6 h 时间点实验组和预处理组荧光强度分别为 $(59.68 \pm 4.47)\%$ 、 $(73.33 \pm 3.68)\%$; 差异有统计学意义 ($F = 32.19, P < 0.01$); 12 h 时间点实验组和预处理组荧光强度分别为 $(29.83 \pm 6.22)\%$ 、 $(46.98 \pm 6.32)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 28.45, P < 0.01$), 说明 CAT 能部分抑制线粒体膜电位降低, 见图 2、3。

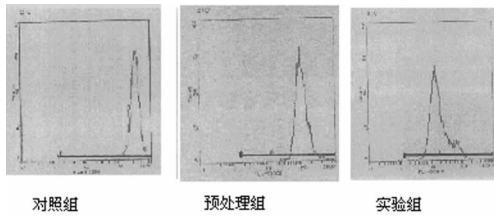


图 2 6 h 线粒体膜电位变化

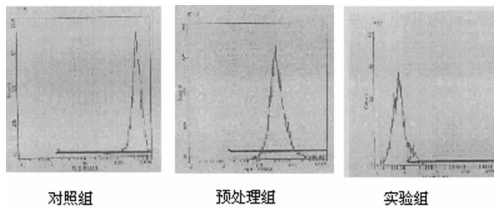


图 3 12 h 线粒体膜电位变化

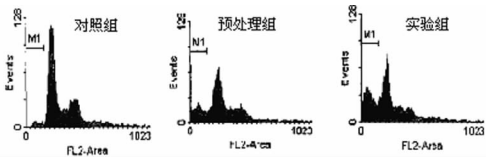


图 4 24 h 细胞亚二倍体凋亡峰变化

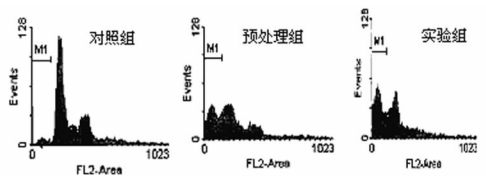


图 5 48 h 细胞亚二倍体凋亡峰变化

2.3 亚二倍体凋亡峰 姜黄素作用细胞后发生凋亡。在 24 h 时间点对照组、预处理组、实验组荧光强度分别为 $(3.11 \pm 0.82)\%$ 、 $(17.11 \pm 1.62)\%$ 、 $(26.53 \pm 4.28)\%$, 3 组比较差异有统计学意义 ($F = 9.15, P < 0.01$); 在 48 h 时间点对照组、预

处理组、实验组荧光强度分别为 $(3.28 \pm 0.95)\%$ 、 $(26.11 \pm 5.62)\%$ 、 $(39.50 \pm 6.14)\%$; 3 组比较差异有统计学意义 ($F = 6.36, P < 0.05$), 说明 CAT 能部分阻断细胞凋亡, 见图 4、5。

3 讨 论

线粒体途径是细胞凋亡主要途径之一, 线粒体在启动细胞凋亡过程中起重要作用^[4-6]。细胞凋亡的早期表现之一为线粒体不可逆损伤, 线粒体损伤后释放细胞色素 C 进入细胞质, 与凋亡蛋白活化因子 1 结合, 能够激活半胱氨酸门氨酸特异蛋白激酶的级联反应, 导致 DNA 断裂, 凋亡形成。线粒体膜损伤后, 因线粒体膜转运孔开放, 造成线粒体内、外膜间的离子自由通过, 使线粒体膜电位下降, 故线粒体膜电位改变量一定程度上反映线粒体损伤程度^[7-8]。

众多研究显示姜黄素可诱导多种细胞的凋亡, 对于其诱导凋亡的机制也在不断探索中。本实验观察到姜黄素作用于肝癌 SMMC-7721 细胞后, 在 6、12 h 时间点均检测到线粒体膜电位降低, 12 h 时间点膜电位下降程度更低; 在 48 h 时间点检测到细胞凋亡峰高于 24 h 时间点, 说明在一定范围内, 姜黄素呈时间依赖性损伤细胞线粒体, 诱导细胞凋亡。

在进一步实验中, 检测到姜黄素分别作用肝癌细胞 1、2、3 h 后, 均迅速产生大量的 H_2O_2 , 在 2 h 时间点达高峰。这一现象发生在线粒体膜电位降低之前。 H_2O_2 能够穿透大部分细胞膜, 与细胞内的铁离子反应产生羟基自由基, 羟基自由基能使线粒体膜脂质过氧化, 形成的脂质过氧化物对线粒体具有损伤作用。氧自由基能损伤线粒体, 而线粒体损伤又可产生氧自由基, 二者互为因果^[9-12]。在生物体内, CAT 是一种重要的酶, 能将 H_2O_2 还原成氧分子和水, 维持细胞和机体的正常功能。已有实验表明, CAT 能在一定程度上减轻 H_2O_2 引起的凋亡^[13-15]。本实验也发现, 加入 CAT 后, 不仅 H_2O_2 浓度降低, 还能减轻线粒体膜电位下降程度, 减少肝癌细胞凋亡数量。

参考文献:

- [1] Reuter S, Eifes S, Dicato M, et al. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11): 1340-1351.
- [2] Tong QS, Zheng LD, Lu P, et al. Apoptosis-inducing effects of curcumin derivatives in human bladder cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(3): 279-287.
- [3] Tharakan ST, Inamoto T, Sung B, et al. Curcumin potentiates the antitumor effects of emcitabine in an orthotopic model of human bladder cancer through suppression of proliferative and angiogenic biomarkers [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(2): 218-228.
- [4] 杨家荣, 杨慧, 潘铁军. 姜黄素对膀胱肿瘤细胞组织蛋白酶 D 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2008, 37(14): 1540-1543.
- [5] 胡太平, 曾建国. 芹菜素诱导人胃癌细胞凋亡作用及机制研究[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2007, 27(1): 6-9.
- [6] Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer [J]. *Onco Gene*, 2004, 23(16): 2850-2860.
- [7] 王通, 曾耀英, 邢飞跃, 等. 胸腺细胞和细胞器线粒体膜电位研究[J]. *分子细胞生物学报*, 2006, 39(2): 132-138.
- [8] He Y, Wang J, Liu X, et al. Toosendanin (下转第 274 页)

广应用。

参考文献:

- [1] Hwang BH, Cha HJP. Pattern-mapped multiple detection of 11 pathogenic bacteria using a 16S rDNA-based oligonucleotide microarray [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(2):183-192.
- [2] Kodanl M, Yang G, Conklin LM, et al. Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(6): 2175-2182.
- [3] Haffar M, Gilbride KA. The utility and application of real-time PCR and FISH in the detection of single-copy gene targets in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium [J]. *Can J Microbiol*, 2010, 56(3):254-262.
- [4] Cha CH, An HK, Kim JU. Detection of vancomycin-resistant enterococci using multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis [J]. *Korean J Lab Med*, 2010, 30(2):138-146.
- [5] Schwartz SB, Thurman KA, Mitchell SC, et al. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates using real-time PCR and high-resolution melt analysis [J]. *Clin microbiol infect*, 2009, 15:756-762.
- [6] Wehrle E, Didier A, Moravek M, et al. Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR Green 1 [J]. *Mol Cell Probes*, 2010, 24(3):124-130.
- [7] Kugelman G, Tapsall JW, Goire N, et al. Simple, rapid, and inexpensive detection of *Neisseria gonorrhoeae* resistance mechanisms using heat-denatured isolates and SYBR green-based real-time PCR [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(10):4211-4216.
- [8] Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, et al. Melting curve analysis for rapid detection of topoisomerase gene mutations in *Haemophilus influenzae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(3):781-784.
- [9] Cheng JC, Huang CL, Lin CC, et al. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR [J]. *Clin Chem*, 2006, 52(11):1997-2004.
- [10] Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, et al. Detection and differentiation of in vitro-spiked bacteria by real-time PCR and melting-curve analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(2):512-517.
- [11] 孙迎娟, 董国英, 丁钰, 等. 医院感染病原菌的分布及耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(9):1141-1144.
- [12] Zhu LX, Wang D, Zhang GB, et al. Development of a base stacking hybridization-based microarray method for rapid identification of clinical isolates [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 59(2):149-156.
- [13] Tseng CP, Cheng JC, Tseng CC, et al. Broad-range ribosomal RNA real-time PCR after removal of DNA from reagents: melting profiles for clinically important bacteria [J]. *Clin Chem*, 2003, 49(2):306-309.

(收稿日期:2011-07-20 修回日期:2011-09-15)

(上接第 270 页)

- inhibits hepatocellular carcinoma cells by inducing mitochondria-dependent apoptosis [J]. *Planta Med*, 2010, 76(13):1447-1453.
- [9] Xiao D, Powolny AA, Singh SV. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(14):3015-3017.
- [10] Bagchi-Rakshit S, Mandal L, Pal BC, et al. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(11):1662-1675.
- [11] Martín R, Ibeas E, Carvalho-Tavares J, et al. Natural triterpenic diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-mediated mitochondrial depolarization and JNK activation [J]. *PLoS One*, 2009, 4(1):59-75.
- [12] Xiao D, Powolny AA, Singh SV. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(44):5962-5965.
- [13] Palapati P, Averill-Bates DA. Mild thermotolerance induced at 40 °C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 151(4):542-550.
- [14] Lüpertz R, Chovolou Y, Kampkter A, et al. Catalase overexpression impairs TNF-alpha induced NF-kappa B activation and sensitizes MCF-7 cells against TNF-alpha [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(5):1497-1511.
- [15] Price M, Terlecky SR, Kessel D. A role for hydrogen peroxide in the pro-apoptotic effects of photodynamic therapy [J]. *Photochem Photobiol*, 2009, 85(9):1491-1494.

(收稿日期:2011-07-18 修回日期:2011-07-28)