

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003451

姜黄素加重结肠癌细胞株 HCT-116 线粒体损伤和促进细胞凋亡的作用研究

徐明亮¹, 康清梅², 张顺涛³, 张 雄⁴, 高敏娜⁴, 曾 波³

(1. 西南医科大学附属医院麻醉科, 泸州 646099; 2. 西南医科大学病理教研室, 泸州 646099;

3. 重庆医科大学附属永川医院消化内科, 重庆 402160; 4. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察姜黄素对结肠癌细胞株 HCT-116 细胞增殖和凋亡的影响以及对细胞线粒体形态和功能的改变, 并探讨其可能的机制。**方法:**体外培养结肠癌细胞株 HCT-116, 给与不同浓度的姜黄素 (5、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$) 处理, 细胞计数试剂盒 CCK-8 观察细胞增殖的变化并筛选出最佳作用浓度。流式细胞术检测细胞凋亡的改变。线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 检测细胞内线粒体膜电位的变化。电镜和 Mito Tracker Deep Red 染色观察细胞内线粒体形态结构的变化。三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒检测细胞 ATP 和 ROS 的变化。分光光度计检测与凋亡密切相关的 caspase-3 和 caspase-9 活性变化。最后, Western blot 检测结肠癌细胞内 caspase-3 和 caspase-9 蛋白水平的变化。**结果:**姜黄素处理细胞株 HCT-116 细胞后, 细胞的增殖水平受到抑制, 且呈浓度-时间依赖性, 其半数最大抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 13 $\mu\text{mol/L}$ 。姜黄素不仅增加早期凋亡的结肠癌细胞的比例, 还使细胞内线粒体膜电位水平下降, 且呈浓度依赖性。电镜结果显示姜黄素处理后, 细胞内线粒体出现明显的线粒体肿胀, 线粒体嵴肿胀、消失、膜破裂和空泡等。Mito Tracker Deep Red 染色后显示线粒体数量减少且呈碎片状。细胞内的 ATP 生产明显下降。另外, 姜黄素还增加细胞内 caspase-3 和 caspase-9 酶活性和蛋白水平的表达。**结论:**姜黄素抑制结肠癌 HCT-116 细胞的增殖, 并促进细胞的凋亡, 其机制与姜黄素加重线粒体形态和功能的损伤有关。

【关键词】HCT-116 细胞株; 姜黄素; 凋亡; 线粒体**【中图分类号】**R363.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-11-27

Curcumin aggravates the mitochondria damages of colon cancer cell line HCT-116 and promotes the apoptosis of the cells

Xu Mingliang¹, Kang Qingmei², Zhang Shuntao³, Zhang Xiong⁴, Gao Minna⁴, Zeng Bo³

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University; 2. Department of Pathology, Southwest Medical University; 3. Department of Gastroenterology, The Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University; 4. Pathology Teaching and Research Office, Basic Medical College of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effects of curcumin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cell line HCT-116 as well as on the changes in mitochondrial morphology and function, and to explore the potential mechanism. **Methods:** Colon cancer cell line HCT-116 was cultured *in vitro* and treated with different concentrations of curcumin (5, 10, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$). Cell count kit-8 was used to observe the changes in cell proliferation, and the optimal concentration was identified. Flow cytometry was used for determination of the changes in cell apoptosis. Mitochondrial membrane potential assay kit JC-1 was applied to determine the changes in intracellular mitochondrial membrane potential. Electron microscopy and Mito Tracker Deep Red staining were used for observing the changes in mitochondrial morphology and structure. The changes in cellular adenosine triphosphate (ATP) and reactive oxygen species (ROS) were assessed by the corresponding assay kits. The changes in the activities and protein levels of apoptosis-related caspase-3 and caspase-9 enzymes were measured by spectrophotometry and western blotting, respectively. **Results:** After curcumin treatment, the proliferation of HCT-116 cells was significantly inhibited in a concentration-time dependent manner, and the half maximal inhibitory concentration was 13 $\mu\text{mol/L}$. Curcumin not only remarkably increased the proportion of cells in early apoptosis, but also significantly reduced the intracellular mitochondrial membrane potential

作者介绍: 徐明亮, Email: xuml2012@126.com,

研究方向: 认知发育疾病。

通信作者: 曾 波, Email: zengbo@hospital.cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市永川医院 2021 年度院内课题资助项目 (编号: YJJC202110)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240328.1055.022>

(2024-03-31)

level in a concentration dependent manner. The electron microscopy results showed that curcumin caused obvious mitochondrial swelling in cells, including crista swelling, disappearance, membrane rupture, and vacuoles. Mito Tracker Deep Red staining showed a significant decrease in mitochondria number and fragmentation appearance. The intracellular ATP production was significantly decreased. In addition, curcumin also increased the activities and protein expression of caspase-3 and caspase-9 enzymes in cells. **Conclusion:** Curcumin inhibits the proliferation of colon cancer HCT-116 cells and promotes cell apoptosis. The mechanism is related to the aggravation of mitochondrial morphology and function damage by curcumin.

[Key words] cell line HCT-116; curcumin; apoptosis; mitochondria

结直肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,其侵袭、转移和复发是导致患者死亡的主要原因。尽管随着医学的不断发展,结直肠癌的诊疗方式有很大的改进,预后也有明显提高,但远未达到令人满意的地步。因此,探索结直肠癌发生、发展的分子机制以及寻找并开发新的药物或治疗方案对提高结直肠癌的治愈率有重要意义^[1]。

线粒体是一种拥有双层膜、动态的、半自主性细胞器,由外膜、膜间隙和内膜组成,通过融合和分裂2种方式来维持其结构完整性,以发挥其生物学功能。线粒体不仅是体内的“能量工厂”,可通过氧化磷酸化产生ATP,提供生命活动所需要的能量。还参与体内的细胞增殖、凋亡、自噬、氧化应激等多种生理活动。因此,线粒体正常的结构和功能对维持机体的多种生命活动至关重要^[2]。大量研究表明,线粒体参与调控多种病理生理过程,如:细胞的存活、增殖、迁移与侵袭,而这些恰恰是肿瘤细胞所表现出来的恶性特征:无限增殖、代谢异常、易转移和侵袭等。因此,肿瘤的发生发展与线粒体的功能异常密切相关^[3-4],改善线粒体的功能对肿瘤的治疗有重要的意义。

姜黄素是从姜黄等姜科、天南星科类植物的根茎中提取的一种脂溶性多酚类化合物,具有抗炎^[5]、抗氧化^[6]、抑制神经元退行性变性^[7]等多种特性。大量研究已经证实姜黄素具有抗肿瘤特性,不仅对包括结直肠癌在内的多种恶性肿瘤有明显的抑制作用^[8-9],还表现出很好的安全性,本身无明显毒副作用,还能减轻一些常规的化疗药物的毒副作用^[10-11]。姜黄素抑制肿瘤的机制不清,多涉及作用于不同的靶点,如黏附分子、转录因子、生长调节因子、细胞信号分子和血管生成调节因子等^[12-13]。本研究以结肠癌细胞株HCT-116为研究对象,给与姜黄素处理,观察姜黄素对该细胞增殖、凋亡以及肿瘤细胞内线粒体的形态和功能的影响,并探讨其发挥作用的机制,为治疗结肠癌提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

结肠癌细胞株HCT-116细胞购自尚恩生物公司,高糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清、青霉素/链霉素、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、SDS-PAGE试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒JC-1等购自北京博奥森生物技术有限公司。姜黄素来自Sigma公司。BCA蛋白浓度检测试剂盒、ATP检测试剂盒等购自碧云天生物技术有限公司;CCK-8、caspase-3和caspase-9酶活性检测试剂盒购自凯基公司。抗体caspase-3、caspase-9和内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)购自博士德生物公司;电化学发光(electrochemi-luminescence, ECL)试剂盒购自美国Bio-rad公司。Mito Tracker Deep Red购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 研究方法

1.2.1 姜黄素溶液配置和处理 称取100 mg姜黄素,以DMSO溶解,并加入三蒸水使其浓度为1.0 mmol/L,过滤后-20℃保存。药物处理时,将姜黄素母液(1.0 mmol/L)分别加入4 mL培养液中,使得白藜芦醇的工作液浓度分别为5、10、20、30 μmol/L。

1.2.2 细胞培养 将冻存的HCT116细胞放置于37℃水浴锅中,待完全溶解后移至10 mL离心管中,离心1 000 r/min × 5 min,弃上清,加入DMEM培养液(含血清、青链霉素),充分混匀后,移至25 cm²的培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱中,待完全贴壁生长后,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.3 CCK-8 将HCT-116细胞按每孔5 000个细胞接种于96孔板中,置37℃、5% CO₂培养箱中培养,用不同浓度(5、10、20、30 μmol/L)姜黄素处理,作用1、2和3 d,并设空白对照组和溶剂对照组即DMSO组(浓度为0.1%),每组设6个复孔。每孔加入20 μL的CCK-8溶液,继续培养1 h,用酶标仪上检测其450 nm处的吸光度(absorbance, A)值,并按下列公式计算白藜芦醇对结肠癌细胞的增殖率的影响:结肠癌细胞增殖率(%)=试验组A_{450 nm}/空白对照组A_{450 nm} × 100%。

1.2.4 流式细胞术 将结肠癌HCT-116细胞按每孔4 × 10⁵个接种于24孔板中。姜黄素处理后,收集每组细胞悬液至无菌EP管中;离心800 r/min × 5 min,去上清,加入磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)重悬细胞,再次离心弃上清;加入5 mL的70%乙醇,固定,4℃过夜;次日,将固定

好的细胞离心 1 000 r/min × 5 min, 弃上清后加入 PBS 重悬细胞; 加入 5 μ L RNaseA 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h, 加入终浓度为 50 mg/mL 碘化丙啶 4 $^{\circ}$ C 避光染色过夜, 在流式细胞仪上分析。

1.2.5 JC-1 法 采用流式细胞法。将结肠癌 HCT-116 细胞接种于 24 孔板中, 密度为 5×10^5 个/孔。姜黄素处理后, 收集每组细胞悬液至无菌 EP 管中; 离心 400 g × 5 min, 洗掉上清; 用 0.5 mL JC-1 工作液悬浮细胞, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱孵育 15~30 min; 离心 400 g × 5 min, 洗掉上清; 用 2 mL 细胞培养液重悬细胞, 离心 400 g × 5 min, 吸掉上清; 再次用 2 mL 细胞培养液重悬细胞, 离心 400 g × 5 min, 吸掉上清; 用 0.5 mL 新鲜培养液重悬细胞, 即可进行后续的流式分析。

1.2.6 Mito Tracker Deep Red 染色 配置 Mito-Tracker Red 工作液, 并避光保存。将贴壁的 HCT-116 细胞接种于培养板中, 姜黄素处理后加入 Mito-Tracker Red 工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15~30 min; 去除 Mito-Tracker Red 工作液, 加入 37 $^{\circ}$ C 预温育的新鲜细胞培养液; 然后用激光共聚焦显微镜进行观察。

1.2.7 电镜检测 待姜黄素处理 HCT116 细胞后, 收集各组细胞, 离心 1 000 r/min × 5 min, 弃上清, 加入 PBS 重悬细胞, 吹打混匀后再次离心, 如此反复 3 次。最后一次离心完毕, 弃上清, 加入戊二醛 1 mL, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定 30 min, 送电镜室进行固定、脱水、包埋、切片以及染色。

1.2.8 ATP 含量检测 采用 ATP 检测试剂盒, 简单步骤如下: 准备, 试剂、样品和标准品制备。加样: 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上加样标准品 50 mL, 待测样品孔中加样品稀释液 40 mL 和待测样品 10 mL (样品最终稀释度为 5 倍) 轻轻晃动混匀。温育: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。加酶: 每孔加入酶标试剂 50 mL, 空白孔除外; 再次孵育和洗涤后显色。显色: 每孔先加入显色剂 A 50 mL, 再加入显色剂 B 50 mL, 轻轻震荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min。终止: 每孔加终止液 50 mL, 终止反应并进行测定: 450 nm 波长依序测量各孔的 A 值。

1.2.9 Caspase3 和 caspase9 的活性检测 收集姜黄素处理后的各组 HCT-116 细胞后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次 (离心 2 000 r/min × 5 min), 收集 (3~5) × 10⁶ 个细胞; 在沉淀的细胞中加入 200 μ L 冰冷 Lysis Buffer 吹打均匀; 置冰上裂解 20 min, 涡旋振荡 4 次, 每次 10 s; 4 $^{\circ}$ C 离心 10 000 r/min × 1 min; 小心吸取上清, 转移至新的管中, 并放置冰上待用; 测定其中的蛋白浓度; 吸取 50 μ L 含 100~200 μ g 蛋白的细胞样品加入 50 μ L 的 2 × Reaction Buffer, 再加入 5 μ L Caspase-3 Substrate, 充分混匀后于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h; 酶标仪在 $\lambda=405$ nm 测定其 A 值。通过计算 $A_{\text{Res}}/A_{\text{对照}}$ 的倍数来确定其活性的大小变化。Caspase-9 方法同 caspase-3。

1.2.10 Western blot 收集各组细胞, 加入 1 mL 蛋白裂解液, 充分裂解后于 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min × 15 min 离心后, 用 Bradford 法测定每组蛋白样品浓度并分装保存。配置 8%~10% 的 Page 胶, 上样 40 μ g 经 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白电转

至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 然后置入 TBST 稀释的抗体 caspase-3、caspase-9 和 GAPDH, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 充分洗涤后加入 1:5 000 的 HRP 标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 2 h, 最后用 ECL 发光试剂盒行曝光显影, 经 Bio-rad Chemical Dax XRS 凝胶成像系统进行条带的分析。

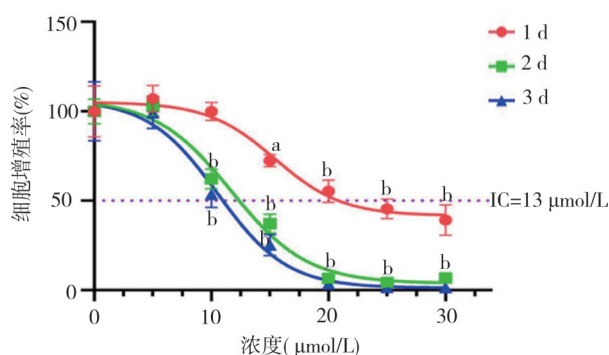
1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 所有计量资料均采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间均数比较采用单因素或重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 姜黄素抑制 HCT-116 细胞的增殖

溶剂 DMSO 组和 5、10、20、30 μ mol/L 的姜黄素处理 HCT-116 细胞 1 d 后的增殖率分别为: (100.00 ± 14.22)%、(99.92 ± 5.00)%、(72.44 ± 3.42)%、(55.28 ± 6.23)% 和 (39.14 ± 8.53)%; 作用 2 d 后的增殖率分别为: (100.00 ± 6.93)%、(103.02 ± 5.51)%、(62.14 ± 5.54)%、(6.60 ± 1.56)% 和 (6.77 ± 1.07)%; 3 d 后的增殖率分别为: (100.00 ± 16.54)%、(99.16 ± 8.82)%、(53.52 ± 7.36)%、(3.45 ± 1.44)% 和 (1.30 ± 1.01)%。经多因素重复测量方差分析结果显示增殖率与时间相关 ($F=414.884$, $P<0.001$), 而时间与浓度存在交互作用 ($F=16.545$, $P<0.001$), 表明增殖率呈明显的时间-浓度依赖性。进一步两两比较, 与 DMSO 处理组比较, 5 μ mol/L 姜黄素处理后, HCT-116 细胞的增殖率差异无统计学意义 ($P=0.133$), 当浓度增加至 10 μ mol/L 和 20 μ mol/L 时, 细胞的增殖率差异有统计学意义 ($P<0.001$ 和 $P<0.001$); 与浓度 10 μ mol/L 比较, 20 μ mol/L 的姜黄素处理后, 细胞的增殖率差异有统计学意义 ($P<0.001$) (图 1)。



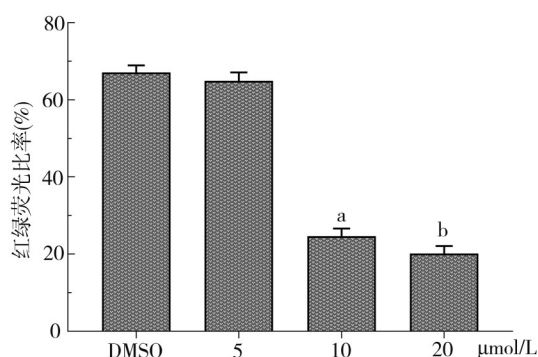
注: a, 与空白对照组比较, $P<0.05$; b, 与作用 1 d 组比较, $P<0.05$

图 1 姜黄素抑制了 HCT-116 细胞的增殖呈浓度-时间依赖性

2.2 姜黄素促进了 HCT-116 细胞的凋亡

由图 2 结果显示, 溶剂 DMSO 组和 5、10、20 μ mol/L 的姜黄素处理后凋亡早期细胞比例分别为: (5.75 ± 0.26)%、(6.68 ± 0.47)%、(49.40 ± 1.63)% 和 (79.08 ± 0.54)%, 4 组比较差异有统计学意义 ($F=6 286.761$, $P<0.001$)。进一步两两比较: 与 DMSO 处理组比较, 当姜黄素浓度为 5 μ mol/L 时, 细

胞的凋亡率差异无统计学意义 ($P=0.170$); 当浓度增加至 $10 \mu\text{mol/L}$ 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡率明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.001$ 、 $P<0.001$); 与 $10 \mu\text{mol/L}$ 比较, $20 \mu\text{mol/L}$ 的结肠癌细胞的凋亡率明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。



注: a, 与浓度 $5 \mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$; b, 与浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$

图2 姜黄素促进了HCT-116细胞凋亡

2.3 姜黄素加重了HCT-116细胞线粒体形态

为了更好地观察线粒体形态的改变, 本研究采用了 Mito Tracker Deep Red 染色和电镜分析法。如图3所示, 在 DMSO 处理 HCT-116 细胞后, 细胞的线粒体的数量较多, 呈现管状或长条状; 当浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时, 线粒体的形态无明显改变; 当浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 时, 线粒体的数量减少, 质量明显减轻, 呈小碎片状。

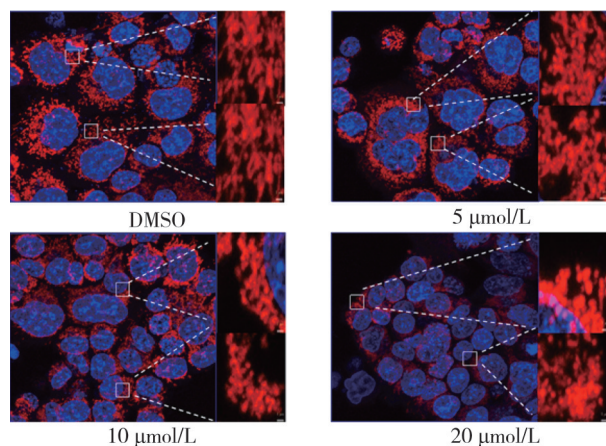


图3 姜黄素加重了HCT-116细胞的线粒体的形态损伤 (Mito Tracker Deep Red 染色)

电镜结果显示, 在 DMSO 处理组和 $5 \mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理 HCT-116 细胞后, 细胞内线粒体数量多, 形态结构完整, 无肿胀等现象。当姜黄素浓度增加至 $10 \mu\text{mol/L}$ 后, 细胞内线粒体数量有减少, 且出现明显的线粒体肿胀, 线粒体嵴肿胀、消失、膜破裂和空泡等, 这些现象随着浓度的增加更加明显 (图4)。

2.4 姜黄素降低HCT-116细胞内线粒体膜电位

JC-1 是一种阳离子脂质荧光染料, 有单体和多聚体 2 种

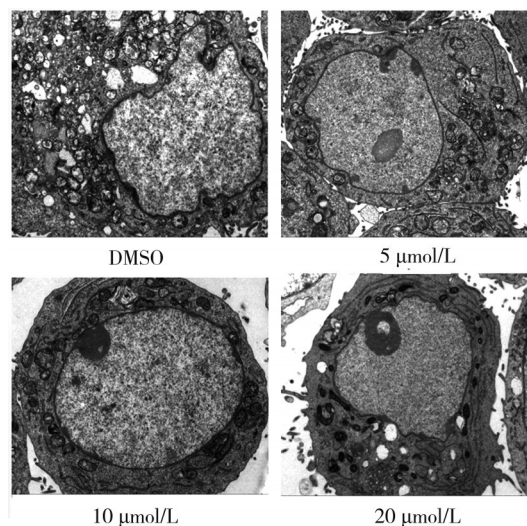
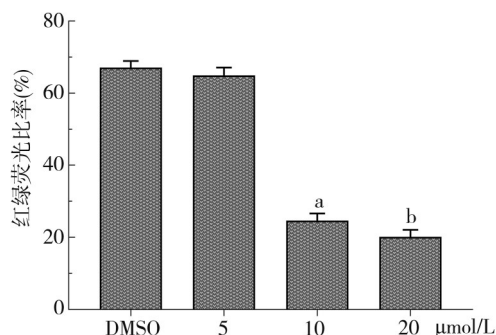


图4 姜黄素加重了HCT-116细胞的线粒体的形态损伤

形式。单体可通过流式细胞仪的 FL-1 通道检测呈绿色荧光; 而多体则通过 FL-2 通道检测呈红色荧光。当线粒体膜电位降低时, 线粒体膜电位被去极化, JC-1 从线粒体内释放, 红光强度减弱, 主要以单体的形式存在于胞质内发绿色荧光。因此, 根据这一特征检测线粒体膜电位的变化, 以显示细胞的凋亡水平变化。本实验结果表明, 溶剂 DMSO 组和 5 、 10 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理后膜电位分别为: (67.12 ± 1.86)%、(64.91 ± 2.23)%、(24.62 ± 2.02)% 和 (20.11 ± 1.98)%, 4 组比较差异有统计学意义 ($F=622.850$, $P<0.001$)。进一步两两比较: 与 DMSO 处理组比较, 当姜黄素浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞的膜电位差异无统计学意义 ($P=0.149$); 当浓度增加至 $10 \mu\text{mol/L}$ 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡率明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.001$ 和 $P<0.001$); 与 $10 \mu\text{mol/L}$ 比较, $20 \mu\text{mol/L}$ 的结肠癌细胞的凋亡率显著增加, 差异有统计学意义 ($P=0.008$) (图5)。



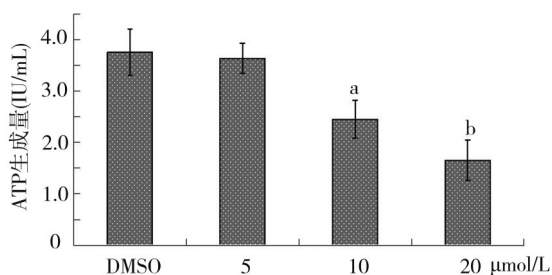
注: a, 与浓度 $5 \mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$; b, 与浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$

图5 姜黄素降低了HCT-116细胞内的线粒体膜电位

2.5 姜黄素减少了HCT-116细胞内ATP的生成

溶剂 DMSO 组和 5 、 10 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 ATP 含量分别为: (4.02 ± 0.21) IU/mL、(3.66 ± 0.37) IU/mL、(2.53 ± 0.26) IU/mL 和 (1.63 ± 0.06) IU/mL, 4 组比较差异有统计学意义 ($F=74.469$, $P<0.001$)。进一步两两比较: 与 DMSO 处理组比较,

当姜黄素浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,结肠癌细胞内产生的 ATP 含量无明显增加,差异无统计学意义 ($P=0.062$);当浓度增加至 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,结肠癌细胞产生的 ATP 明显增加,差异有统计学意义 ($P<0.001$ 和 $P<0.001$);与 10 $\mu\text{mol/L}$ 比较,20 $\mu\text{mol/L}$ 的结肠癌细胞产生的 ATP 明显增加,差异有统计学意义 ($P<0.001$) (图 6)。



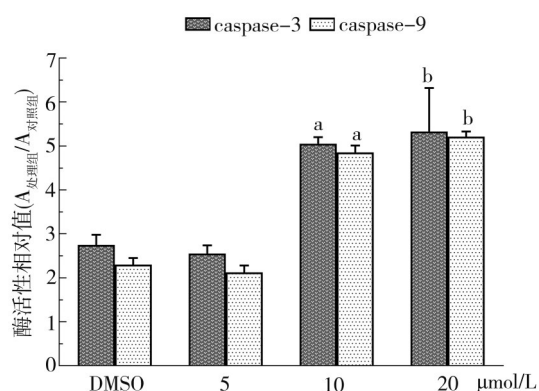
注:a,与浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$; b,与浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$

图 6 姜黄素抑制了 HCT-116 细胞内 ATP 的生成量

2.6 姜黄素增加了 HCT-116 细胞内 caspase-3 和 caspase-9 的酶活性和蛋白的表达

如图 7,溶剂 DMSO 组和 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 caspase-3 酶活性和 caspase-9 酶活性的相对值分别为: 2.75 ± 0.23 、 2.55 ± 0.19 、 5.05 ± 0.15 和 5.33 ± 0.99 以及 2.30 ± 0.15 、 2.12 ± 0.16 、 4.85 ± 0.16 和 5.21 ± 0.12 ,4 组比较差异有统计学意义 ($F_1=503.553$, $P_1<0.001$; $F_2=1\ 389.342$, $P_2<0.001$)。进一步两两比较:与 DMSO 处理组比较,当姜黄素浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,结肠癌细胞内 caspase-3 酶活性和 caspase-9 酶活性没有明显改变,差异有统计学意义 ($P_1=0.135$ 、 $P_2=0.102$);当浓度增加至 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, caspase-3 酶活性和 caspase-9 酶活性明显增强,差异有统计学意义 ($P_1<0.001$ 、 $P_2<0.001$);与 10 $\mu\text{mol/L}$ 比较,20 $\mu\text{mol/L}$ 的 caspase-3 酶活性和 caspase-9 酶活性明显增加,差异有统计学意义 ($P_1=0.044$ 、 $P_2=0.004$)。

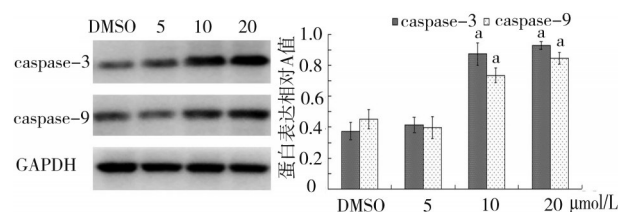
如图 8,溶剂 DMSO 组和 5、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达的相对值分别为: $(39.07 \pm 1.16)\%$ 、



注:a,与浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$; b,与浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$

图 7 姜黄素促进了 HCT-116 细胞内 caspase-3 和 caspase-9 的酶活性

($41.10 \pm 1.56\%$)、($88.71 \pm 1.83\%$)、($91.78 \pm 1.60\%$)和($44.26 \pm 2.44\%$)、($45.70 \pm 2.19\%$)、($71.26 \pm 2.33\%$)、($81.52 \pm 3.11\%$),4 组比较差异有统计学意义 ($F_1=1\ 389.342$, $P_1<0.001$; $F_2=257.085$, $P_2<0.001$)。进一步两两比较:与 DMSO 处理组比较,当姜黄素浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,结肠癌细胞的 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达没有明显改变,差异无统计学意义 ($P_1=0.089$ 、 $P_2=0.056$);当浓度增加至 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,结肠癌细胞的蛋白表达明显抑制,差异有统计学意义 ($P_1<0.001$ 和 $P_2<0.001$);与 10 $\mu\text{mol/L}$ 比较,20 $\mu\text{mol/L}$ 的结肠癌细胞蛋白明显减少,差异有统计学意义 ($P_1=0.016$ 、 $P_2<0.001$)。



注:a,与浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$; b,与浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$

图 8 姜黄素促进 HCT-116 细胞 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平

3 讨论

肿瘤是机体在各种致癌因子的作用下,局部组织异常增生所形成的一种新生物,肿瘤的发生发展是一个多基因、多环节、多信号通路共同参与的、复杂的生物学过程。相较于正常的细胞,肿瘤细胞具有无限增殖、浸润和转移等生物学特征^[14],这就势必需要大量的能量、糖类、脂类、蛋白质等生物大分子。而线粒体是体内重要的细胞器之一,存在于除红细胞以外的所有的真核细胞中,是细胞进行生物氧化、物质代谢和能量代谢的主要场所,在氧自由基的生成、钙稳态调节、基因组调控等过程中也发挥着重要作用。肿瘤细胞的线粒体肯定异于正常细胞的线粒体。本研究结果表明,在结肠癌 HCT116 细胞中,线粒体数量多,体积大(代谢性增大)、呈管状或长条状,细胞内生成的 ATP 也较多。抵抗细胞凋亡也是恶性肿瘤细胞的又一重要的特性。线粒体是细胞的“自杀性武器存储库”,是凋亡活动的调控中心。在细胞凋亡的过程中,大部分的凋亡信号通路都涉及到线粒体形态和功能的改变。线粒体介导的细胞凋亡途径是最为重要的凋亡途径。研究结果表明,在 HCT-116 细胞中,线粒体膜电位处于较高水平,且与凋亡呈正相关的酶 caspase 3 和 caspase 9 的活性较低,蛋白表达也低,这些都符合恶性肿瘤细胞因自身增殖、抵抗细胞凋亡等特性对细

胞线粒体的需求。因此,在肿瘤的发生发展过程中,线粒体形态和功能异常发挥重要作用,以线粒体为靶标的肿瘤治疗的新策略逐渐成为研究的重点、热点。

姜黄素是一种从姜黄的根茎中提取出来的酚类化合物,在我国传统医学中,广泛被用于驱蚊、祛风活血、痛经止痛等,具有良好的医疗保健效果。而在现代医学中,姜黄素具有多种生物学活性,如抗炎^[5]、改善阿尔茨海默病的认知障碍^[7]等,且价格低廉,容易获取,在临床上有极佳的应用前景。随着姜黄素的研究不断的深入,其相关的毒性报道也逐渐增多。姜黄素摄入增多不仅对正常组织细胞的毒性作用外,甚至还可能引起继发肿瘤、肝肾毒性以及骨髓抑制等不良反应,这也限制其在临床上的应用^[15]。近年来,众多体外研究发现姜黄素对多种恶性肿瘤细胞有明显的抑制作用,但也有很多毒性作用,其作用浓度一般都控制在 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 。本研究选定浓度为 5、10、20 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素作用于结肠癌 HCT-116 细胞发现,当姜黄素浓度约 13 $\mu\text{mol/L}$ 时,瘤细胞的增殖抑制率就达到了 50%,且随着浓度的增加和时间的延长,细胞的增殖都受到明显的抑制,呈浓度-时间依赖性,这与以往研究结果相似^[16-17]。进一步研究发现,姜黄素对 HCT-116 细胞的线粒体的形态呈现明显的损伤作用:电镜结果显示线粒体的数量明显减少,且出现肿胀,线粒体嵴也有肿胀,甚至消失、膜破裂和空泡等;Mito Tracker Deep Red 染色显示线粒体的数量变少,质量减小,形态也从条状或管状变成碎片状。随着线粒体形态的发生损伤,其功能也出现异常:细胞内 ATP 的生成减少,线粒体介导的凋亡途径开始启动,表现为细胞凋亡明显增加,线粒体去极化现象加重,膜电位水平显著降低;caspase-3 和 caspase-9 的酶活性和蛋白表达水平都明显增强。

综上所述,姜黄素可通过加重结肠癌 HCT-116 细胞中线粒体的形态和功能的损伤,促进线粒体损伤所诱导的凋亡,进而抑制癌细胞的增殖,起到抗癌作用,这对深入探讨以线粒体为靶标的肿瘤治疗新策略具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Dilly A, Honick BD, Lee YJ, et al. Rational application of targeted therapeutics in mucinous colon/appendix cancers with positive predictive factors[J]. Cancer Med, 2020, 9(5): 1753-1767.
- [2] Wang ZH, Chen L, Li W, et al. Mitochondria transfer and transplantation in human health and diseases[J]. Mitochondrion, 2022, 65: 80-87.
- [3] Zhang L, Zhang W, Li ZY, et al. Mitochondria dysfunction in CD8⁺ T cells as an important contributing factor for cancer development and a potential target for cancer treatment: a review[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 227.
- [4] She G, Du JC, Wu W, et al. Hippo pathway activation mediates chemotherapy-induced anti-cancer effect and cardiomyopathy through causing mitochondrial damage and dysfunction[J]. Theranostics, 2023, 13(2): 560-577.
- [5] Justo MP, Cardoso CBM, Cantiga-Silva C, et al. Curcumin reduces inflammation in rat apical periodontitis[J]. Int Endod J, 2022, 55(11): 1241-1251.
- [6] Hussain H, Ahmad S, Shah SWA, et al. Synthetic mono-carbonyl curcumin analogues attenuate oxidative stress in mouse models[J]. Bio-medicines, 2022, 10(10): 2597.
- [7] Bland AR, Ashton JC, Kamal MA, et al. The current evidence for the therapeutic role of curcumin in Alzheimer's disease[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2023, 22(3): 318-320.
- [8] Almoshari Y, Iqbal H, Razzaq A, et al. Development of nanocubosomes co-loaded with dual anticancer agents curcumin and temozolomide for effective Colon cancer therapy[J]. Drug Deliv, 2022, 29(1): 2633-2643.
- [9] Shelash Al-Hawary SI, Abdalkareem Jasim S, M Kadhim M, et al. Curcumin in the treatment of liver cancer: from mechanisms of action to nanoformulations[J]. Phytother Res, 2023, 37(4): 1624-1639.
- [10] He W, Xia YQ, Cao PH, et al. Curcuminoid WZ35 synergize with cisplatin by inducing ROS production and inhibiting TrxR1 activity in gastric cancer cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 207.
- [11] Karthika C, Sureshkumar R, Sajini DV, et al. 5-fluorouracil and curcumin with pectin coating as a treatment regimen for titanium dioxide with dimethylhydrazine-induced colon cancer model[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(42): 63202-63215.
- [12] Selvam C, Prabu SL, Jordan BC, et al. Molecular mechanisms of curcumin and its analogs in colon cancer prevention and treatment[J]. Life Sci, 2019, 239: 117032.
- [13] Li H, Yan LP, Tang EKY, et al. Synthesis of TPGS/curcumin nanoparticles by thin-film hydration and evaluation of their anti-colon cancer efficacy *in vitro* and *in vivo*[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 769.
- [14] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [15] Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects[J]. Molecules, 2019, 24(16): 2930.
- [16] Chou YT, Koh YC, Nagabhushanam K, et al. A natural degradant of curcumin, feruloylacetone inhibits cell proliferation via inducing cell cycle arrest and a mitochondrial apoptotic pathway in HCT116 colon cancer cells[J]. Molecules, 2021, 26(16): 4884.
- [17] Xiang L, He B, Liu Q, et al. Antitumor effects of curcumin on the proliferation, migration and apoptosis of human colorectal carcinoma HCT-116 cells[J]. Oncol Rep, 2020, 44(5): 1997-2008.

(责任编辑:周一青)