

• 实验研究 •

山姜素对脂多糖诱导的结肠 NCM460 细胞损伤及对 VDR/Nrf2/HO-1 通路的作用研究

江聪, 杨保伟, 田甜

海口市中医医院 肛肠科, 海南 海口 570100

摘要: **目的** 研究山姜素对脂多糖诱导的结肠 NCM460 细胞损伤修复及对维生素 D3 受体 (VDR)/核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/血红素加氧酶-1 (HO-1) 通路的调节作用。**方法** 使用脂多糖建立 NCM460 细胞损伤模型, 分别设置对照组, 山姜素低、中、高剂量组及白藜芦醇组, 山姜素低、中、高剂量组分别加入终浓度为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的山姜素, 白藜芦醇组加入终浓度为 120 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇, 继续培养 72 h 后, CCK-8 法测定 NCM460 细胞增殖率, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定 NCM460 细胞上清液肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 及 NCM460 细胞匀浆液超氧化物歧化酶 (SOD)、一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA) 水平, 流式细胞术测定 NCM460 细胞凋亡率, 使用试剂盒测定 NCM460 细胞线粒体膜电位水平, 实时定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 测定 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 mRNA 水平, 免疫印迹法 (Western blotting) 测定 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 蛋白水平。**结果** 与模型组比较, 山姜素各剂量组及白藜芦醇组 NCM460 细胞增殖率、SOD 水平、线粒体膜电位、VDR、Nrf2 及 HO-1 mRNA 及蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$), NCM460 细胞上清液 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 水平、细胞匀浆液 NO 及 MDA 水平、NCM460 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 山姜素能够显著抑制脂多糖诱导的结肠 NCM460 细胞损伤后炎症因子的释放及细胞凋亡, 恢复 NCM460 细胞氧化损伤的修复能力及线粒体膜电位改变, 促进 NCM460 细胞增殖, 其机制可能与调节 VDR/Nrf2/HO-1 通路有关。

关键词: 山姜素; 细胞损伤修复; 维生素 D3 受体 (VDR)/核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/血红素加氧酶-1 (HO-1) 通路; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素-6

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)06-1289-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.06.001

Effects of alpinetin on lipopolysaccharide-induced colon NCM460 cell damage and VDR/Nrf2/HO-1 pathway

JIANG Cong, YANG Bao-wei, TIAN Tian

Department of Proctology, Haikou Traditional Chinese Medicine Hospital, Haikou 570100, China

Abstract: **Objective** To study the effects of alpinetin on lipopolysaccharide induced colon NCM460 cell damage and regulation of VDR/Nrf2/HO-1 pathway. **Method** NCM460 cells were treated with lipopolysaccharide to establish damage model. Control group, low, medium and high dose groups of alpinetin group, and resveratrol group were set up, respectively. Low, medium and high dose groups of alpinetin were added with final concentration of 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ of alpinetin, respectively, and resveratrol group was added with final concentration of 120 $\mu\text{mol/L}$. Continue to develop after 72 h, CCK-8 method was used to detect NCM460 cell proliferation rate and enzyme-linked immunosorbent (ELISA) was used to measure the levels of TNF- α , IL-17, IL-8, IL-6, IL-1 β , SOD, NO, MDA of NCM460 cells. The apoptosis rate of NCM460 cells was determined by flow cytometry, mitochondrial membrane potential of NCM460 cells was determined by kits, and mRNA levels of VDR, Nrf2 and HO-1 of NCM460 cells were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The protein levels of VDR, Nrf2, and HO-1 in NCM460 cells were determined by Western blotting. **Results** Compared with model group, the proliferation rate of NCM460 cells, SOD level, mitochondrial membrane potential, VDR, Nrf2 and HO-1 mRNA and protein levels of NCM460 cells in various dosage groups of

收稿日期: 2023-04-17

基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目 (22A200144)

作者简介: 江聪, 男, 研究方向为肛肠诊疗。E-mail: bitter00@163.com

alpinetin and resveratrol group were significantly increased ($P < 0.05$), and NCM460 cells that TNF- α , IL-17, IL-8, IL-6, IL-1 β level, NO and MDA level, NCM460 apoptosis rate was significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusions** Alpinetin can significantly inhibit the release of inflammatory factors and apoptosis of colon NCM460 cells after lipopolysaccharide-induced injury, restore the repair ability of oxidative damage and the change of mitochondrial membrane potential of NCM460 cells, and promote the proliferation of NCM460 cells. The mechanism may be related to the regulation of VDR/Nrf2/HO-1 pathway.

Key words: alpinetin; cell damage repair; VDR/Nrf2/HO-1 pathway; TNF- α ; IL-6

结肠细胞损伤引起的肠黏膜功能减退是导致结肠组织屏障能力降低的主要原因之一^[1-2]。结肠细胞损伤如不及时干预,会导致结肠组织炎症性改变,导致腹痛、腹泻的发生,同时,细菌及病毒会通过受损结肠细胞进入腹腔,引起腹腔感染,甚至全身性感染,严重的会引起患者死亡^[3-4]。然而,目前临床中缺少结肠损伤的治疗药物,所以结肠损伤治疗药物的研发仍是当前的工作重点。维生素 D3 受体(VDR)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)是近年来研究发现的与结肠细胞损伤密切相关的信号通路,Shang 等^[5]研究表明溃疡性结肠炎及 NCM460 细胞损伤的发生与 VDR/Nrf2/HO-1 通路有关,而调节 VDR/Nrf2/HO-1 通路则能够显著抑制炎症因子的释放,促进 NCM460 细胞损伤的修复。山姜素是从姜黄等姜科植物中提取得到的化合物,研究表明其对于细胞损伤具有显著的修复作用^[6-7],然而,山姜素对于结肠细胞损伤的修复能力及作用机制目前尚未见明确报道。本文通过研究山姜素对于结肠 NCM460 细胞损伤的修复作用及机制,为山姜素的药理作用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

人源 NCM460 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 药品与试剂

山姜素(质量分数 $\geq 98\%$,货号 SA9300)、白藜芦醇(质量分数 $\geq 98\%$,货号 R8350)、胰蛋白酶(货号 T1350)、二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(货号 PC0020)、脂多糖(货号 L8880)、磷酸盐缓冲液(PBS,货号 P1020)、化学发光液(货号 PE0010)、一氧化氮(NO,货号 BC1470)试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒(货号 C0038)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(货号 C1062)、线粒体膜电位检测试剂盒(货号 C2006)、PCR 试剂盒(货号 D7250)、肿瘤坏死因

子- α (TNF- α ,货号 PT518)、ELISA 试剂盒白细胞介素-17(IL-17,货号 PI550)、白细胞介素-8(IL-8,货号 PI640)、白细胞介素-6(IL-6,货号 PI330)、白细胞介素-1 β (IL-1 β ,货号 PI305)、超氧化物歧化酶(SOD,货号 S0101)、丙二醛(MDA,货号 BC0020)购自碧云天生物科技有限公司;磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH,货号 ab9485)、VDR(货号 ab109234)、Nrf2(货号 ab62352)、HO-1(货号 ab52947)兔抗体、山羊抗兔 IgG(货号 ab205718)购自艾博抗贸易有限公司;PCR 引物设计及合成由赛默飞世尔科技有限公司完成。

1.3 仪器

IX83 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);GelDoc XR+凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);K3 酶标仪(赛默飞世尔科技公司);ProFlex3x32 梯度 PCR 仪(美国应用生物系统有限公司);CellXpert C170 CO₂ 恒温培养箱(Eppendorf 艾本德中国有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 NCM460 细胞损伤模型的建立 取 NCM460 细胞复苏后,用不含血清及青-链霉素的 DMEM 培养液,于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,待 NCM460 细胞进入指数生长期后,收集 NCM460 细胞,室温,1 000 r/min 离心 8 min,弃上清,使用 DMEM 培养液调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,接种于培养皿中,设置对照组和模型组,模型组加入终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的脂多糖后继续培养 24 h^[8],使用胰蛋白酶消化并收集 NCM460 细胞,1 000 r/min 室温离心 10 min,弃去上清,收集 NCM460 细胞备用。

1.4.2 分组及给药 调整造模后的 NCM460 细胞浓度为 2×10^4 个/mL,接种于细胞培养板,分别设置模型组及山姜素低、中、高剂量组及白藜芦醇组,加入不含血清及青-链霉素的 DMEM 培养液培养 24 h 至细胞贴壁后,山姜素低、中、高剂量组分别加入终浓度为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 山姜素^[9],白藜芦醇组加入终浓度为 120 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇^[10],对照

组和模型组更换新鲜培养液。

1.4.3 NCM460 细胞增殖率的测定 按照 1.4.1 项下建立 NCM460 细胞损伤模型后,调节 NCM460 细胞密度为 2×10^4 个/mL,取 100 mL NCM460 细胞,接种于 96 孔细胞培养板上,另设调零组只加入细胞培养液不加 NCM460 细胞,于细胞培养箱中培养 24 h 后,弃去培养液,按照 1.4.2 项下分组并给药后继续于细胞培养箱孵育 72 h,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,于 37°C 培养箱中继续孵育 1 h,用酶标仪测定各组 NCM460 细胞吸光度 (A) 值,并计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{调零}}) / A_{\text{对照}}$$

1.4.4 NCM460 细胞上清液 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 的测定 按照 1.4.2 项下分组并给药后,继续培养 NCM460 细胞 72 h,收集各组 NCM460 细胞上清液,使用试剂盒测定 NCM460 细胞上清液 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 水平。

1.4.5 NCM460 细胞 SOD、NO、MDA 的测定 按照 1.4.2 项下分组并给药后,继续培养 NCM460 细胞 72 h,收集 NCM460 细胞,使用细胞裂解液充分裂解后,8 000 r/min 室温离心 10 min,取上清,使用试剂盒测定 NCM460 细胞裂解液 SOD、NO、MDA 水平。

1.4.6 NCM460 细胞凋亡率的测定 按照 1.4.2 项下分组并给药后,继续培养 NCM460 细胞 72 h,收集 NCM460 细胞,8 000 r/min 室温离心 5 min,弃去上清,使用 PBS 重悬 NCM460 细胞并计数,取 5×10^4 个 NCM460 细胞,8 000 r/min 室温离心 5 min,弃上清,使用 $195 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 结合液重悬 NCM460 细胞,加入 5 mL Annexin V-FITC 并混匀,加入 $10 \mu\text{L}$ 碘化丙啶,混匀,室温避光孵育 20 min,使用流式细胞仪检测并计算 NCM460 细胞凋亡率。

1.4.7 NCM460 细胞线粒体膜电位的测定 按照 1.4.2 项下分组并给药后,继续培养 NCM460 细胞 72 h,弃去培养液,使用 PBS 洗涤 NCM460 细胞后,加入 1 mL 新鲜 DMEM 培养液,加入 1 mL JC-1 工作液, 37°C 孵育 20 min 后弃去上清,用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,置于荧光显微镜下观察拍照。

1.4.8 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 mRNA 水平的测定 按照 1.4.2 项下分组并给药后,继续培养 NCM460 细胞 72 h,收集 NCM460 细胞,使用试剂盒提取 NCM460 细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,使用 PCR 试剂盒,以 GAPDH 为内参,采

用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法测定 VDR、Nrf2 及 HO-1 mRNA 相对水平。引物序列见表 1。反应体系为模板 DNA $2 \mu\text{L}$,正反向引物各 $2 \mu\text{L}$,PCR Master Mix $25 \mu\text{L}$,使用蒸馏水补充至 $50 \mu\text{L}$ 。反应程序为 92°C 预变性 3 min, 92°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 68°C 延伸 60 s,进行 35 个循环, 68°C 最终延伸 10 min。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
VDR	CTGACCCTGGAGAC TTTGAC	TTCCTCTGCACTTCC TCATC
Nrf2	CTTTGGTAACCATCT GTATGCTGGG	ATGTTGCAAGCTCCT ATACGTTGTG
HO-1	GAACCCAGTCTATGC CCCAC	GCGCTGCAAGGGAT GATTTC
GAPDH	AACGACCCCTTCATT GAC	TCCACGACATACTCA GCAC

1.4.9 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 蛋白水平的测定 按照 1.4.2 项下分组并给药后,继续培养 NCM460 细胞 72 h,收集 NCM460 细胞,使用细胞裂解液 RIPA 对 NCM460 细胞充分裂解后, 4°C 、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 法测定上清液蛋白浓度并取相当于 $50 \mu\text{g}$ 蛋白的上清液,葡聚糖凝胶电泳分离后,依次经转膜、脱脂奶粉封闭后,分别经 1:500 稀释的 GAPDH、VDR、Nrf2、HO-1 兔抗体 4°C 孵育过夜后,TBST 溶液清洗,使用 1:1 000 稀释的山羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 1 h,TBST 再次清洗后,使用凝胶成像仪成像、拍照,并以 GAPDH 为内参,计算 VDR、Nrf2、HO-1 的蛋白相对水平。

1.5 数据处理

所有数据采用 SPSS 26.0 软件进行处理及统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 山姜素对 NCM460 细胞增殖率的影响

与对照组比较,模型组 NCM460 细胞增殖率显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,山姜素各剂量组和白藜芦醇组 NCM460 细胞增殖率均显著升高 ($P < 0.05$),且呈剂量相关性,见表 2。

2.2 山姜素对 NCM460 细胞上清液 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 的影响

与对照组比较,模型组 NCM460 细胞上清液 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 水平均显著升高

表 2 各组 NCM460 细胞增殖率比较结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Comparison of proliferation rate of NCM460 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞增殖率/%
对照	—	100
模型	—	35.23 $\pm$ 1.93*
山姜素	25	52.76 $\pm$ 2.29 [#]
	50	71.82 $\pm$ 1.75 ^{#&}
	100	93.36 $\pm$ 1.38 ^{#&@}
白藜芦醇	120	82.33 $\pm$ 2.10 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与山姜素 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与山姜素 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [@] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs alpinetin 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; [@] $P < 0.05$ vs alpinetin 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

表 3 各组 NCM460 细胞上清液中 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Comparison of levels of TNF- α , IL-17, IL-8, IL-6, and IL-1 β in the supernatant of NCM460 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TNF- α /(ng $\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-17/(ng $\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-8/(ng $\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-6/(ng $\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-1 β /(ng $\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	—	73.44 $\pm$ 2.94	79.04 $\pm$ 3.13	47.15 $\pm$ 2.93	478.19 $\pm$ 15.17	52.31 $\pm$ 2.30
模型	—	167.35 $\pm$ 3.16*	447.28 $\pm$ 5.68*	326.08 $\pm$ 7.41*	1 209.38 $\pm$ 18.03*	173.14 $\pm$ 3.51*
山姜素	25	115.73 $\pm$ 1.72 [#]	157.32 $\pm$ 3.11 [#]	103.72 $\pm$ 4.26 [#]	921.71 $\pm$ 19.61 [#]	95.05 $\pm$ 4.22 [#]
	50	97.35 $\pm$ 2.39 ^{#&}	122.19 $\pm$ 3.78 ^{#&}	80.32 $\pm$ 5.61 ^{#&}	732.95 $\pm$ 20.36 ^{#&}	84.68 $\pm$ 3.55 ^{#&}
	100	80.46 $\pm$ 3.98 ^{#&@}	96.17 $\pm$ 3.62 ^{#&@}	67.58 $\pm$ 4.58 ^{#&@}	552.03 $\pm$ 9.24 ^{#&@}	69.07 $\pm$ 4.24 ^{#&@}
白藜芦醇	120	85.32 $\pm$ 2.14 [#]	107.92 $\pm$ 2.84 [#]	70.59 $\pm$ 3.49 [#]	631.72 $\pm$ 29.71 [#]	77.04 $\pm$ 4.56 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与山姜素 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与山姜素 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [@] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs alpinetin 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; [@] $P < 0.05$ vs alpinetin 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

表 4 各组 NCM460 细胞 SOD、NO、MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Comparison on SOD, NO, and MDA levels of NCM460 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	75.59 $\pm$ 1.60	35.76 $\pm$ 2.36	11.09 $\pm$ 1.97
模型	—	23.61 $\pm$ 1.71*	85.42 $\pm$ 2.04*	35.21 $\pm$ 1.38*
山姜素	25	46.17 $\pm$ 2.54 [#]	58.80 $\pm$ 1.91 [#]	26.37 $\pm$ 1.35 [#]
	50	60.81 $\pm$ 3.17 ^{#&}	49.18 $\pm$ 1.33 ^{#&}	19.07 $\pm$ 1.83 ^{#&}
	100	72.09 $\pm$ 2.24 ^{#&@}	37.87 $\pm$ 1.42 ^{#&@}	13.47 $\pm$ 1.70 ^{#&@}
白藜芦醇	120	64.78 $\pm$ 1.39 [#]	45.28 $\pm$ 1.57 [#]	16.28 $\pm$ 1.29 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与山姜素 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与山姜素 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [@] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs alpinetin 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; [@] $P < 0.05$ vs alpinetin 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

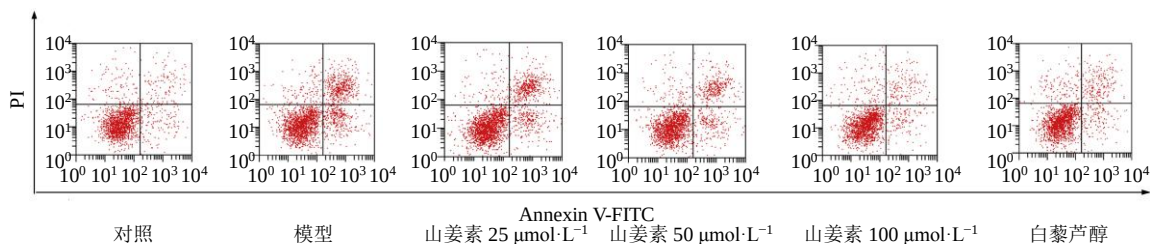


图 1 NCM460 细胞凋亡结果

Fig. 1 Apoptosis of NCM460 cells

($P < 0.05$); 与模型组比较, 山姜素各剂量组及白藜芦醇组 NCM460 细胞上清液 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见表 3。

2.3 山姜素对 NCM460 细胞 SOD、NO、MDA 水平的影响

与对照组比较, 模型组 NCM460 细胞 SOD 水平显著降低, NO、MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 山姜素各剂量组及白藜芦醇组 NCM460 细胞 SOD 水平显著升高, NO、MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见表 4。

2.4 山姜素对 NCM460 细胞凋亡的影响

与对照组比较, 模型组 NCM460 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 山姜素各剂量组和白藜芦醇组 NCM460 细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见图 1、表 5。

表 5 NCM460 细胞凋亡率比较结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Table 5 Comparison of apoptosis rates of NCM460 cells
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞凋亡率/%
对照	—	4.76 $\pm$ 0.58
模型	—	47.62 $\pm$ 1.26*
山姜素	25	31.35 $\pm$ 1.74 [#]
	50	14.01 $\pm$ 1.17 ^{#&}
	100	8.91 $\pm$ 0.69 ^{#&@}
白藜芦醇	120	7.98 $\pm$ 1.82 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与山姜素 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与山姜素 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [@] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs alpinetin 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; [@] $P < 0.05$ vs alpinetin 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

2.5 山姜素对 NCM460 细胞线粒体膜电位的影响

与对照组比较, 模型组 NCM460 细胞线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 山姜素各剂量组及白藜芦醇组 NCM460 细胞线粒体膜电位均显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见图 2、3。

2.6 山姜素对 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 mRNA 水平的影响

与对照组比较, 模型组 NCM460 细胞 VDR、Nrf2、HO-1 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 山姜素各剂量组及白藜芦醇组 NCM460 细胞 VDR、Nrf2、HO-1 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见表 6。

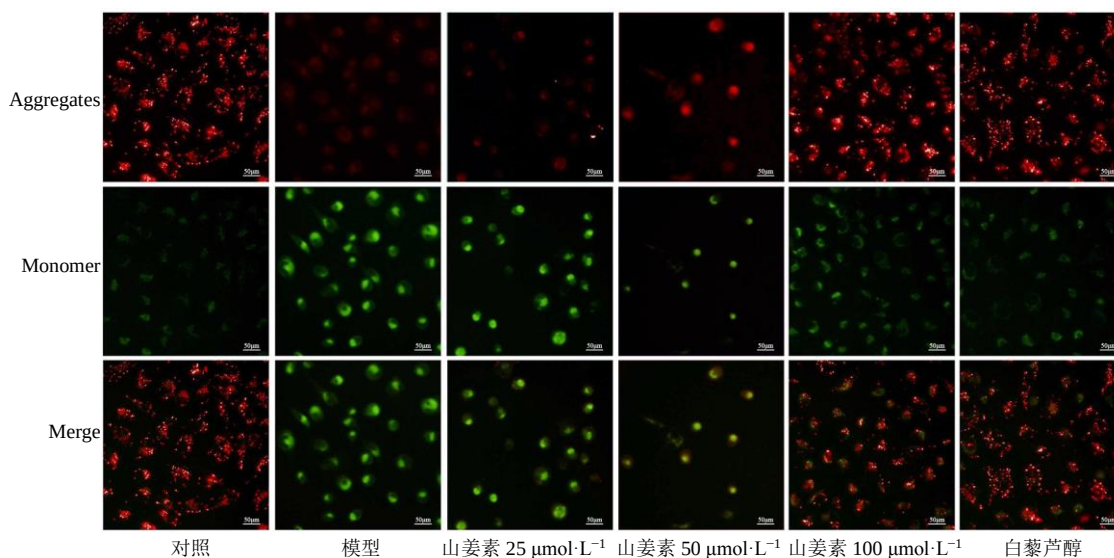


图 2 NCM460 细胞线粒体膜电位比较结果
Fig. 2 Comparison of mitochondrial membrane potential in NCM460 cells

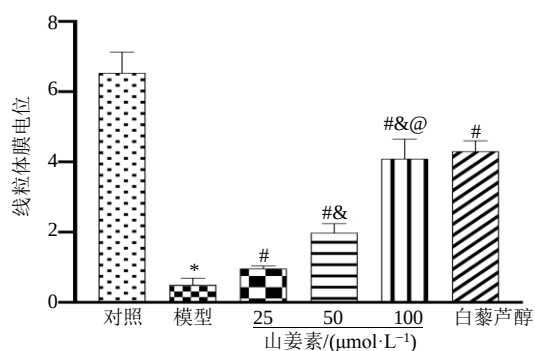
2.7 山姜素对 NCM460 细胞 VDR、Nrf2、HO-1 蛋白的影响

与对照组比较, 模型组 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 山姜素各剂量组及白藜芦醇组 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见图 4、5。

3 讨论

结肠细胞损伤是指由于各种原因引起的结肠组织细胞损伤、凋亡, 进而引起结肠组织功能性改变, 结肠壁变薄, 血供减少, 导致结肠组织对细菌、病毒的防御能力降低。临床中结肠组织细胞损伤表现为腹痛腹泻、恶心、呕吐, 肠鸣音减弱或消失。由于肠道内存在多种细菌及粪便, 结肠细胞损伤后

如不及时干预, 可能导致结肠内容物流入腹腔, 甚至并发全身感染^[11]。目前临床中由外力引起的闭合伤、穿刺伤及肠镜检查、灌肠等引起的医源性损伤引起的结肠细胞损伤较为常见。目前临床中对于结肠组织损伤的治疗以手术治疗为主, 主要采用单纯修补吻合、结肠造口术及肠外置等手段, 然而上述治疗手段治疗效果并不理想^[12], 并且严重影响患者的生活质量, 给患者及家庭带来巨大的精神负担。因此, 结肠细胞损伤修复药物的研发仍是当前临床的主要任务之一。NCM460 细胞作为人的正常结肠上皮细胞, 广泛应用于科研实验研究中。脂多糖是引起细胞炎症损伤的主要物质之一, 脂多糖诱导的 NCM460 细胞损伤是目前结肠细胞损伤研究中常见的建模方式。本实验通过研究山姜素对于脂多糖诱



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与山姜素 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与山姜素 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs alpinetin 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs alpinetin 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

图 3 NCM460 细胞线粒体膜电位比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 3 Comparison of mitochondrial membrane potential in NCM460 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

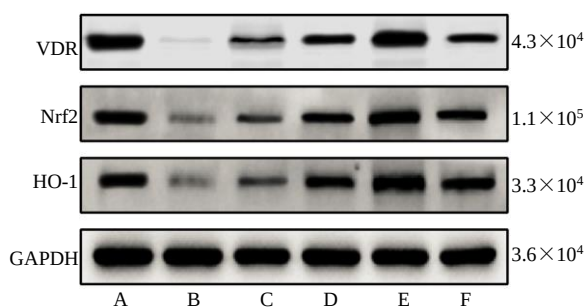
表 6 NCM460 细胞 VDR、Nrf2、HO-1 mRNA 水平比较结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 6 Comparison of mRNA levels of VDR, Nrf2 and HO-1 in NCM460 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	VDR mRNA 相对表达量	Nrf2 mRNA 相对表达量	HO-1 mRNA 相对表达量
对照	—	5.23 ± 0.16	4.61 ± 0.39	6.33 ± 0.41
模型	—	$0.78 \pm 0.06^*$	$0.31 \pm 0.11^*$	$0.91 \pm 0.21^*$
山姜素	25	$2.28 \pm 0.11^\#$	$1.02 \pm 0.13^\#$	$1.76 \pm 0.38^\#$
	50	$3.70 \pm 0.26^{\#\&}$	$2.67 \pm 0.39^{\#\&}$	$3.21 \pm 0.46^{\#\&}$
	100	$5.05 \pm 0.36^{\#\&@}$	$4.19 \pm 0.18^{\#\&@}$	$5.86 \pm 0.29^{\#\&@}$
白藜芦醇	120	$4.32 \pm 0.24^\#$	$3.35 \pm 0.26^\#$	$4.27 \pm 0.34^\#$

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与山姜素 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与山姜素 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs alpinetin 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs alpinetin 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group



A-对照 B-模型 C-山姜素 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-山姜素 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E-山姜素 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ F-白藜芦醇组

A-control B-model C-alpinetin 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-alpinetin 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E-alpinetin 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ F-resveratrol

图 4 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 蛋白水平比较
Fig. 4 Comparison of VDR, Nrf2 and HO-1 protein levels in NCM460 cells

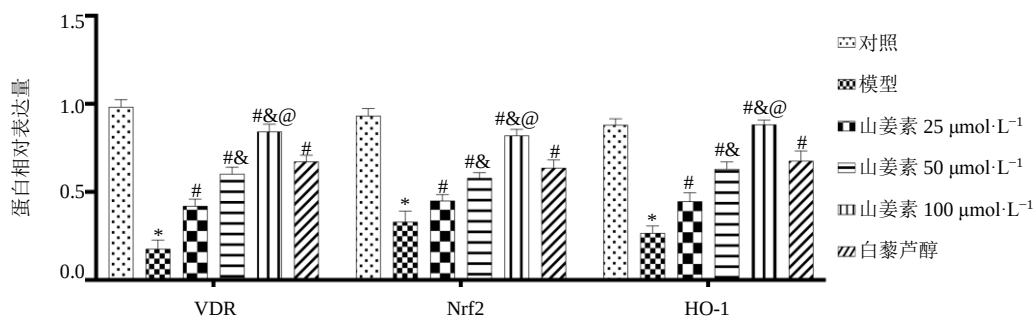
的释放, 提高 H9C2 细胞存活率, 由此可见, 山姜素对于细胞损伤具有显著的修复作用。然而, 山姜素对于结肠细胞损伤的修复作用及机制目前尚未

导的结肠 NCM460 细胞损伤的修复作用及机制, 为结肠组织细胞损伤的临床治疗提供参考和依据。赵丽等^[10]研究证实, 白藜芦醇对于脂多糖诱导的结肠 NCM460 细胞损伤有明显的修复作用, 所以本实验使用白藜芦醇作为阳性对照药物。

山姜素是从姜黄、豆蔻及郁金等姜科植物中提取分离得到的单体化合物, 研究表明其具有抗菌、抗氧化、抗血栓、阵痛、止吐等多种药理作用^[13-14]。近年来研究发现山姜素对于细胞损伤具有显著的修复作用。谭悦等^[15]研究表明, 山姜素能够显著降低溃疡性结肠炎模型小鼠结肠组织病理评分, 减轻结肠组织炎症反应; 代万武等^[16]研究证实山姜素能够显著抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症损伤, 抑制细胞死亡, 提高细胞增殖率; 陈颖妹等^[9]研究证实山姜素能够显著修复缺氧诱导的心肌细胞损伤, 提高心肌 H9C2 细胞抗氧化应激水平, 抑制炎症因子

见明确报道, 因此本实验通过研究山姜素对于结肠 NCM460 细胞的修复作用及机制, 为结肠损伤的药理作用研究提供参考。

TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 是常用的评价结肠细胞损伤的指标, 喻伟等^[8]研究证实, 抑制结肠上皮细胞 IL-17、IL-8 水平能够显著逆转脂多糖诱导的结肠上皮 Caco-2 细胞的损伤及凋亡; 何玉华等^[17]研究证实, 抑制 TNF- α 、IL-6 水平能够显著抑制脂多糖诱导的结肠 NCM460 细胞的炎症损伤, 修复肠道屏障功能; 宋家乐等^[18]研究表明, 抑制结肠 Caco-2 细胞 TNF- α 、IL-8 及 IL-1 β 水平, 能够显著抑制脂多糖对 Caco-2 细胞的炎症诱导作用。本实验结果表明, 与正常 NCM460 细胞比较, 模型组 NCM460 细胞上清液 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 水平显著升高, 与模型组比较, 山姜素各剂量组 NCM460 细胞上清液 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 水平呈剂量相关性明显降低, 提示山姜素



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与山姜素 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与山姜素 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs alpinetin $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs alpinetin $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

图5 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Comparison of VDR, Nrf2 and HO-1 protein relative expression levels in NCM460 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

能够呈剂量相关性明显抑制脂多糖诱导的 NCM460 细胞的损伤后 TNF- α 、IL-17、IL-8、IL-6、IL-1 β 的分泌,促进 NCM460 细胞损伤后的炎症修复。同时 SOD、NO、MDA 水平与 NCM460 细胞的氧化应激损伤及自我修复有关,易国栋等^[19]研究证实,抑制结肠上皮细胞 MDA 及 NO 水平,提高 SOD 水平能够有效提高结肠上皮细胞抗氧化应激能力,进而降低结肠上皮细胞的炎症损伤。本实验结果表明,给予 NCM460 细胞不同剂量的山姜素后,NCM460 细胞 MDA 及 NO 水平明显降低, SOD 水平明显升高,提示山姜素能够呈剂量相关性显著恢复脂多糖诱导的 NCM460 细胞损伤后抗氧化应激能力,并促进 NCM460 细胞损伤修复。

线粒体膜电位与维持细胞正常功能有关,研究表明,结肠细胞损伤与线粒体膜电位的改变有关。裴茂华等^[20]研究证实,线粒体膜电位水平降低与 NCM460 细胞的损伤及凋亡密切相关,调节脂多糖诱导的 NCM460 细胞损伤后膜电位的变化,能够显著抑制 NCM460 细胞凋亡;马志华等^[21]研究证实线粒体膜电位改变会导致结肠上皮细胞 NCM460 的炎症损伤和凋亡;杨婉等^[22]研究表明,线粒体膜电位降低会导致结肠上皮细胞炎症因子的释放及细胞凋亡,介导结肠上皮细胞炎症损伤的病理过程。因此,调节结肠上皮细胞线粒体膜电位变化可能是改善结肠细胞损伤的重要途径之一。本实验研究发现,与对照组比较,模型组 NCM460 细胞线粒体膜电位显著降低,给予 NCM460 细胞不同剂量山姜素后,NCM460 细胞线粒体膜电位呈剂量相关性显著升高,同时,流式细胞术结果表明,山姜素各剂量组 NCM460 细胞凋亡率明显降低,提示山姜素能够呈剂量相关性显著升高 NCM460 细胞线粒体膜电

位,调节 NCM460 细胞能量代谢,抑制 NCM460 细胞炎症损伤及凋亡。

VDR/Nrf2/HO-1 通路是近年来研究发现的与细胞损伤的发生及发展密切相关的重要信号通路。赵宇萌等^[23]研究表明, Nrf2/HO-1 通路与细胞氧化应激损伤及炎症反应的发生及发展密切相关,而激活 Nrf2/HO-1 通路,提高 Nrf2、HO-1 等相关蛋白水平能够显著减轻体外 N2a 细胞的氧化损伤;朱妍妍等^[24]研究证实,激活 Nrf2/HO-1 通路能够逆转小鼠 GC-2 细胞氧化损伤,提高 GC-2 细胞氧化应激后自我修复能力,降低凋亡率;孙中美等^[25]研究表明, VDR 参与溃疡性结肠炎的发生及进展过程, VDR 水平的异常降低会导致溃疡性结肠炎大鼠结肠组织细胞炎症损伤及免疫平衡紊乱,而提高结肠组织细胞 VDR 水平能够显著促进结肠组织病理性恢复,修复结肠黏膜免疫屏障。由此可见, VDR/Nrf2/HO-1 通路在结肠组织细胞损伤的发生及发展过程中占有重要地位,而调节 VDR/Nrf2/HO-1 通路及相关蛋白水平可能是修复溃疡性结肠细胞损伤的重要途径。本实验结果表明,与对照组比较,模型组 NCM460 细胞 VDR、Nrf2 及 HO-1 mRNA 及蛋白水平显著降低;与模型组比较,山姜素各剂量组及白藜芦醇组 NCM460 细胞 VDR、Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白水平显著升高,提示山姜素能够呈剂量相关性激活结肠 NCM460 细胞 VDR/Nrf2/HO-1 通路,提高 VDR、Nrf2、HO-1 蛋白水平,进而抑制 NCM460 细胞炎症损伤,提高 NCM460 细胞损伤后的自我修复能力。

综上所述,山姜素能够显著抑制脂多糖诱导的结肠 NCM460 细胞损伤后炎症因子的释放及细胞凋亡,恢复 NCM460 细胞氧化损伤的修复能力及线

粒体膜电位改变,促进 NCM460 细胞增殖,其机制可能与调节 VDR/Nrf2/HO-1 通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Guo C, Guo D, Fang L, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 267: 118231.
- [2] Guo X, Wu X, Ni J, et al. Aqueous extract of *bulbus Fritillaria cirrhosa* induces cytokinesis failure by blocking furrow ingression in human colon epithelial NCM460 cells [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2020, 850-851: 503147.
- [3] Miao Y, Lv Q, Qiao S, et al. Alpinetin improves intestinal barrier homeostasis via regulating AhR/ suv39h1/TSC2/ mTORC1/autophagy pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 384: 114772.
- [4] Tsoi H, Chu E S H, Zhang X, et al. *Peptostreptococcus anaerobius* induces intracellular cholesterol biosynthesis in colon cells to induce proliferation and causes dysplasia in mice [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(6): 1419-1433.
- [5] Shang L, Liu Y, Li J, et al. Emodin protects sepsis associated damage to the intestinal mucosal barrier through the VDR/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 724511.
- [6] 崔立坤, 姚静, 辛勤, 等. 山姜素对角叉菜胶诱导的小鼠急性炎症的抗炎作用及机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(19): 2276-2279.
- [7] 王振冉, 李扬, 唐博. 山姜素对肺微血管内皮细胞损伤保护机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(4): 476-479.
- [8] 喻伟, 李丽. 谷氨酰胺对脂多糖诱导结肠上皮细胞炎症损伤的保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(10): 1074-1077.
- [9] 陈颖妹, 翟任群, 周菲. 山姜素对缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤的保护作用机制 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(18): 2220-2225.
- [10] 赵丽, 华夏, 谭晔, 等. 基于 Notch1 信号通路探讨白藜芦醇对人结肠上皮细胞炎症损伤的保护作用 [J]. *遵义医学院学报*, 2018, 41(6): 695-699.
- [11] Wu W, Fu G, Xuan R, et al. Food additive sodium bisulfite induces intracellular imbalance of biothiols levels in NCM460 colonic cells to trigger intestinal inflammation in mice [J]. *Toxicol Lett*, 2022, 359: 73-83.
- [12] Zhang L, Gui S, Xu Y, et al. Colon tissue-accumulating mesoporous carbon nanoparticles loaded with musca domestica cecropin for ulcerative colitis therapy [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3417-3438.
- [13] 戴华, 林建珍, 王彦蕊. 山姜素对冠心病大鼠心功能、血脂和血管内皮功能的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(20): 2813-2817.
- [14] 聂容荣, 袁晟光, 刘杰, 等. 山姜素对急性重症胰腺炎大鼠肺损伤中水通道蛋白-1 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(18): 5062-5064.
- [15] 谭悦, 关雅迪, 郑长清. 山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的保护作用及其作用机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(6): 1303-1311.
- [16] 代万武, 黄祖权, 张波, 等. 山姜素对脂多糖诱导的软骨细胞损伤的保护作用研究 [J]. *天津医药*, 2020, 48(12): 1137-1141.
- [17] 何玉华, 瞿波, 陈文, 等. 健脾益肾泄浊汤大鼠灌肠的含药血清对脂多糖诱导人结肠上皮细胞炎症损伤模型的影响 [J]. *西部医学*, 2022, 34(12): 1747-1752.
- [18] 宋家乐, 钱波, 王程强, 等. 柚叶总黄酮对 LPS 所致 Caco-2 结肠上皮细胞间高通透性的保护作用 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(2): 287-292.
- [19] 易国栋, 谭静. 萝卜硫素通过 Nrf2/ARE 通路对人结肠上皮细胞氧化应激损伤的调控作用 [J]. *西部中医药*, 2019, 32(11): 40-43.
- [20] 裴茂华, 陈倩, 王瑶, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 ACY1215 对急性肝衰竭过程中人正常结肠上皮细胞 NCM460 损伤的保护作用及机制研究 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2021, 30(5): 516-519.
- [21] 马志华, 阿迪力江·喀日, 阿布来提·阿不都哈尔. 上皮细胞能量代谢对炎症性肠病线粒体的影响 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2021, 29(7): 501-506.
- [22] 杨婉, 吕秋兰, 徐大星, 等. 可溶性尿酸对肠上皮细胞的影响及其机制 [J]. *青岛大学学报: 医学版*, 2022, 58(1): 13-18.
- [23] 赵宇萌, 陈吉聪, 肖洪贺, 等. 人参皂苷 Rg1 通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 H₂O₂-N₂a 细胞氧化应激损伤的研究 [J]. *现代中药研究与实践*, 2022, 36(1): 26-31.
- [24] 朱妍妍, 王桐生, 戴宁, 等. 金丝桃苷通过激活 Keap1/Nrf2/HO-1 通路保护小鼠 GC-2 细胞的氧化损伤[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(5): 673-680.
- [25] 孙中美, 丁庞华, 王文婷, 等. 清肠温中方通过 miR-675-5p/VDR 信号通路调控溃疡性结肠炎 Th17/Treg 免疫平衡及肠黏膜屏障的机制研究 [J]. *中国中医急症*, 2019, 28(1): 94-97.

[责任编辑 高源]