

姜黄素预防高糖诱导的 H9c2 细胞损伤的最适浓度筛选

卫小娟^{1,2}, 李树德¹, 黄映光³, 李青玲¹, 李治纲¹, 何水旺², 李思熯^{1*}

(1. 昆明医科大学 基础医学院 生物化学与分子生物学系, 云南 昆明 650500;
2. 中国科学院 昆明动物研究所, 云南 昆明 650201; 3. 云南省第一人民医院 普外一科, 云南 昆明 650032)

摘要: 为筛选出用于预防高糖诱导的 H9c2 细胞损伤的最适姜黄素浓度, 检测不同浓度姜黄素处理下 H9c2 细胞的部分指标的表达, 并观察细胞形态变化. 结果显示, 与模型组相比, 姜黄素浓度为 4×10^{-6} , 8×10^{-6} 和 20×10^{-6} mol/L 时细胞增殖活力上升; 姜黄素各组的 Caspase 3 和 Cleaved-Caspase 3 的蛋白表达均显著下调; 姜黄素 4×10^{-6} mol/L 时, H9c2 细胞形态和数量恢复, 且分布均匀, 排列紧密, 与正常组细胞无较大差异. 最终选择 4×10^{-6} mol/L 时的姜黄素作为预防高糖诱导的 H9c2 细胞损伤的最适浓度.

关键词: 姜黄素; H9c2 细胞; 最适浓度; CCK8; Western blotting

中图分类号: R34 文献标志码: A 文章编号: 1674-5639 (2022) 06-0073-06

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2022.06.013

Selection of the Optimal Concentration of Curcumin to Prevent the Injury of the H9c2 Induced by High Glucose

WEI Xiaojuan^{1,2}, LI Shude¹, HUANG Yingguang³, LI Qingling¹, LI Zhigang¹, HE Shuiwang², LI Siman^{1*}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China 650500;

2. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan, China 650201;

3. The First General Surgery Department of Yunnan First People's Hospital, Kunming, Yunnan, China 650032)

Abstract: In order to screen out the optimal curcumin concentration for preventing H9c2 cell damage induced by high glucose, the expression of some indexes of H9c2 cells under different curcumin concentrations is detected, and the morphological changes of the cells are observed. The results show that cell proliferation activity increase at curcumin concentrations of 4×10^{-6} mol/L, 8×10^{-6} mol/L and 20×10^{-6} mol/L compared with the model group. The protein expression of Caspase 3 and Cleaved-Caspase 3 are significantly down-regulated in curcumin groups. When curcumin is 4×10^{-6} mol/L, the morphology and number of H9c2 cells are recover, and the distribution is uniform and the arrangement is tight with no significant difference from the control group. Curcumin at 4×10^{-6} mol/L is finally selected as the optimal concentration for preventing H9c2 cell damage induced by high glucose.

Key words: Curcumin; H9c2; optimum concentration; CCK8; Western blotting

中草药是我国传统医学的重要医用资源,也是千百年来我国无数医者理论和实践的积累,而关于

中草药中特定成分及其治疗效果研究也成为基础医学的研究热点. 姜黄作为传统中药,能行气破瘀,

收稿日期: 2022-10-10

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金资助项目 (82160533); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金资助项目 (2019FE001-016).

作者简介: 卫小娟 (1989—), 女, 河南灵宝人, 硕士研究生, 主要从事代谢性疾病基础研究.

*通信作者: 李思熯 (1981—), 女, 云南昆明人, 副教授, 硕士, 主要从事代谢性疾病基础研究, E-mail: km-lisiman@163.com.

通经止痛. 主治胸腹胀痛、肩臂痹痛、心痛难忍、产后血痛、疮癤初发、月经不调、闭经、跌打损伤^[1]. 姜黄素 (Curcumin, Cur) 是姜黄根茎中主要的天然多酚. 作为姜黄的主要提取物, 其最初作为食品添加剂用于食品着色, 而近年来的研究^[2]表明其具有抗氧化、抗炎症的作用. 姜黄素极低的毒副作用和广泛的生物活性, 为研究临床疾病的治疗提供了新的方向. 姜黄素除有抗癌作用外, 对心血管系统、急性肺损伤、神经系统疾病、肾组织损伤和肝组织损伤均有良好的保护和缓解作用^[3-23].

目前对姜黄素的药用研究主要集中在抗肿瘤作用上, 已有研究^[3-5]显示, 姜黄素在前列腺癌、结肠癌、肾癌、非小细胞肺癌和白血病治疗中能诱导癌细胞凋亡, 抑制癌细胞增殖和迁移. 除了具备抗肿瘤效果, 多项研究^[6-8]显示, 姜黄素可以通过调节细胞增殖和凋亡, 对心血管系统起到保护作用. 糖尿病患者的心血管疾病往往由体内长期的高糖环境诱发, 并多表现为细胞凋亡与坏死, 但是姜黄素对高糖诱导的心肌细胞损伤的保护研究较少, 且对于不同的细胞, 姜黄素的最适作用浓度有所不同. 在细胞凋亡过程中, Caspase 与真核细胞凋亡密切相关, 其中 Caspase 3 在细胞凋亡过程中有着举足轻重的位置, 它是一种促进细胞凋亡的蛋白酶, 它的作用底物很多, 其中大部分可被 Caspase 3 水解^[9-11]. 本研究旨在通过检测 H9c2 心肌细胞增殖活力和 Caspase 3 及活性片段 Cleaved-Caspase 3 的蛋白表达, 筛选出姜黄素对高糖诱导的 H9c2 细胞损伤预防的最适浓度.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

姜黄素 ($C_{21}H_{20}O_6$) 购自西安首禾生物科技有限公司, 分子质量为 368.39, 以二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配制成 0.1 mol/L 储存液置于 4 °C 避光保存. 二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Solarbio 公司, CCK8 试剂盒购自 Biosharp 公司, DMEM 低 $NaHCO_3$ 基础培养基购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司, 胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司, 0.25% EDTA 胰蛋白酶购自 Gibco 公司, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自上海源培生物科技股份有限公司, 青霉素 - 链霉素双抗溶液购自 Gibco 公司, GAPDH、Caspase 3、Cleaved-Caspase 3 抗体购自 Affinity Biosciences 公司, 蛋白定量试剂盒 (BCA 法) 购自北京普利莱基因技术有限公司.

1.2 细胞培养

H9c2 (2-1) 大鼠正常心肌细胞株购自中国科学院上海细胞库. 将 H9c2 细胞接种于 T75 培养瓶中, 加入含有 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 低 $NaHCO_3$ 基础培养基, 置于 5% CO_2 培养箱中 37 °C 环境下培养, 2~3 d 传代, 稳定传代 3 次后, 取细胞进行实验.

1.3 实验分组及细胞处理

实验分为正常组、模型组、 4×10^{-6} mol/L 处理组、 8×10^{-6} mol/L 处理组、 12×10^{-6} mol/L 处理组、 16×10^{-6} mol/L 处理组、 20×10^{-6} mol/L 处理组, 实验各组处理详见表 1.

表 1 实验分组与处理

	正常组	模型组	姜黄素				
			4×10^{-6} mol/L	8×10^{-6} mol/L	12×10^{-6} mol/L	16×10^{-6} mol/L	20×10^{-6} mol/L
细胞铺板							
姜黄素	-	-	+	+	+	+	+
孵育 4 h							
高浓度葡萄糖/ (100 mmol · L ⁻¹)	-	+	+	+	+	+	+
孵育 48 h							

1.4 CCK8 法检测细胞增殖活力

取稳定传代, 生长密度达 80% 以上, 且状态良好的 H9c2 细胞, 弃上清, 用 PBS 洗 3 次, 胰酶消化并收集细胞, 重悬, 计数. 调整细胞悬液, 最

终使 96 孔板中每孔细胞数在 5 000 个左右. 然后将 96 孔板放入培养箱中, 孵育 24 h 使细胞贴壁. 按表 1 处理细胞, 并设置空白组 (无细胞), 每组 6 个复孔. 处理完成后, 弃去 96 孔板中原培养基,

每孔加入 1.0×10^{-4} L 提前配好的含有 CCK8 的培养基 (CCK8: 培养基 = 1:10), 在 5% CO_2 培养箱中, 37 °C 环境下培养 4 h 后, 使用酶标仪测其 OD 值 (使用光源波长为 450 nm). 收集数据并按照下式计算各组细胞的增殖活力:

$$\text{细胞增殖活力} = \frac{(\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})}{(\text{正常组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})} \times 100\%$$

1.5 Western blotting 检测凋亡蛋白的表达

按表 1 处理细胞后, 弃去原培养基, 使用 PBS 洗 3 次, 胰酶消化后收集细胞; 加入细胞裂解液与蛋白磷酸酶抑制剂混合物于细胞中, 在冰上裂解 30 min, 制成的蛋白样品采用 BCA 法检测蛋白样品的浓度, 并用 1X Buffer 和无菌水将各蛋白样品浓度调整到同一浓度, 100 °C 变性 10 min; 每个泳道上样 3×10^{-5} g, 经 10% SDS-PAGE 电泳后, 在半干转膜仪中将目标蛋白转移至 PVDF 膜上; 用 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 40 min; TBST 洗膜, 再用抗体稀释液根据说明书稀释的一抗常温孵育 30 min 之后, 在 4 °C 环境下过夜孵育 8 h; TBST 洗膜, 辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:10 000) 常温孵育 2 h; TBST 洗膜, 用 ECL 显影液对目的条带进行显影, GAPDH 作为内参; 使用 Image J 软件对图片进行扫描和分析.

1.6 形态学观察

选取生长状态良好的 H9c2 细胞弃上清, 加 PBS 洗 3 次, 胰酶消化并收集细胞, 重悬细胞, 并计数. 调整细胞悬液, 使细胞密度在 5×10^5 个/mL, 每孔加细胞悬液 2 mL. 将铺好板的 6 孔板放入培养箱中, 孵育 24 h 使细胞贴壁. 吸去原培养基, PBS 洗 3 次, 正常组和模型组分别加 1 mL 正常培养基, 姜黄素 4×10^{-6} mol/L 处理组加入 1 mL 含姜黄素的培养基, 培养 4 h. 弃去培养基, PBS 洗 3 次, 正常组中加 2 mL 完全培养基, 其他组中按 2 mL/孔分别加入含 0.1 mol/L 高浓度葡萄糖的培养基, 培养 48 h. 普通光学显微镜下观察细胞形态变化.

1.7 统计学处理

实验数据使用 SPSS V17.0 或 Graphpad Prism 6.0 软件分析, 采用 (平均值 \pm 标准差) 表示. 两组数据间使用独立样本 *t* 检验进行比较, 两组以上的多组数据之间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义, 以 $P < 0.01$ 表示有显著统计学意义. 使用 Graphpad Prism 6.0 软件进行绘图.

2 结果

2.1 姜黄素对高糖诱导的 H9c2 细胞的增殖活力的影响

如图 1 所示, 高糖处理的 H9c2 细胞增殖活力为 (61.92 \pm 13.07)%; 使用姜黄素预处理的 H9c2 细胞增殖活力, 除 12×10^{-6} mol/L 处理组 (58.78 \pm 6.27)%、 16×10^{-6} mol/L 处理组 (61.91 \pm 12.97)% 外, 其余各组均有所上升, 分别为: 4×10^{-6} mol/L 处理组 (68.46 \pm 15.25)%、 8×10^{-6} mol/L 处理组 (68.67 \pm 17.69)%、 20×10^{-6} mol/L 处理组 (62.66 \pm 17.26)% , 但姜黄素各浓度组无统计学意义 ($P > 0.05$).

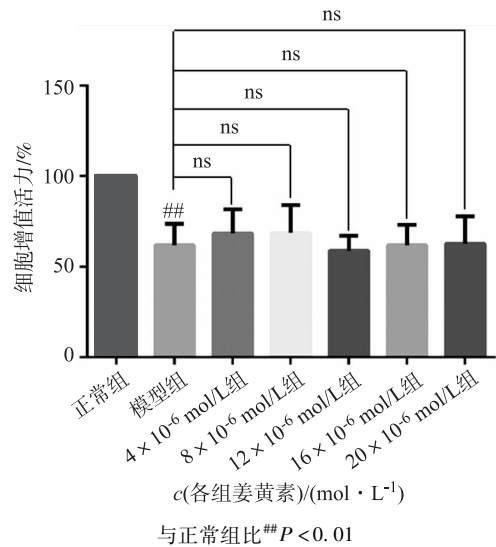


图 1 不同浓度姜黄素对 H9c2 细胞增殖活性的影响

2.2 姜黄素对高糖诱导的 H9c2 细胞的凋亡蛋白表达的影响

如图 2 结果显示, 与正常组相比, 模型组的 Caspase 3 的蛋白表达水平显著上调; 与模型组相比, 姜黄素各浓度组 Caspase 3 的蛋白表达水平显著下调; 且随着姜黄素浓度升高 (4×10^{-6} ~ 16×10^{-6} mol/L 范围内), Caspase 3 蛋白表达水平逐渐下调, 但其浓度达到 20×10^{-6} mol/L 时 Caspase 3 蛋白表达水平又开始上调.

如图 3 结果显示, 与正常组相比, 模型组的 Cleaved-Caspase 3 的蛋白表达水平下调 ($P > 0.05$); 与模型组相比, 姜黄素 4×10^{-6} mol/L 时 Cleaved-Caspase 3 的蛋白表达依然下调 ($P > 0.05$); 其他各浓度组相比于模型组, Cleaved-Caspase 3 的蛋白表达均显著上调, 12×10^{-6} mol/L 时上调最明显.

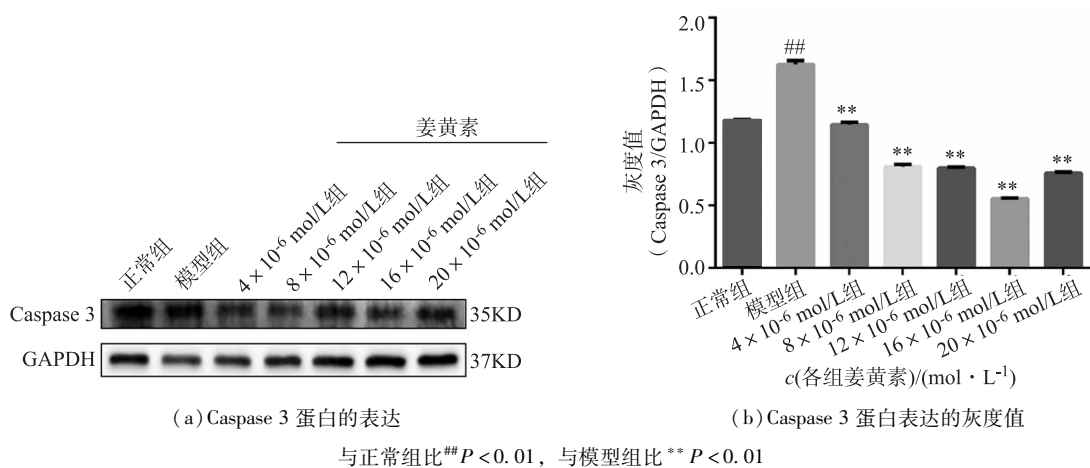


图2 不同浓度姜黄素处理 H9c2 细胞中 Caspase 3 的蛋白表达水平

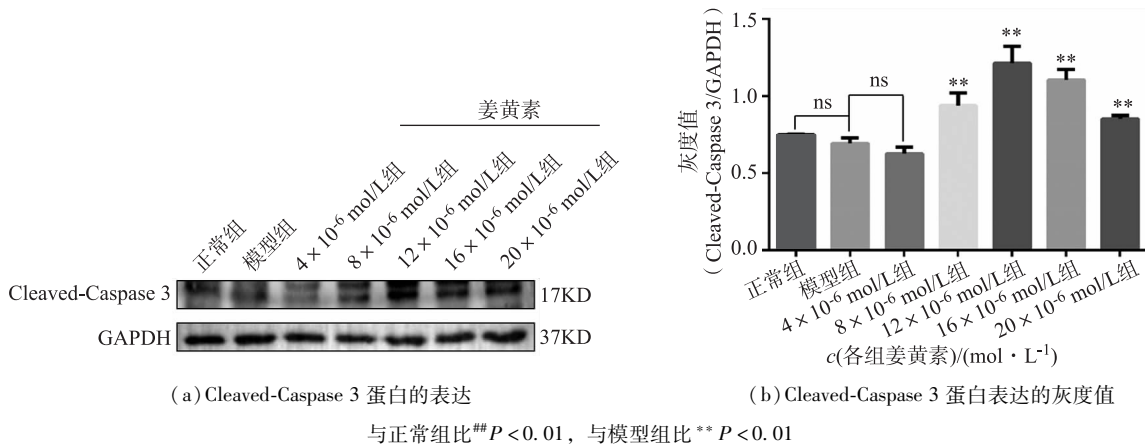


图3 不同浓度姜黄素处理 H9c2 细胞中 Cleaved-Caspase 3 的蛋白表达水平

2.3 不同处理条件下 H9c2 细胞形态变化

根据 CCK8 检测结果和 WB 结果，我们选择 4×10^{-6} mol/L 作为预防高糖诱导的 H9c2 细胞损伤的最佳作用浓度。观察细胞形态发现，正常组的 H9c2 心肌细胞形态呈梭形，均匀分布于培养皿中，

且排列紧密，无畸形；模型组中 H9c2 心肌细胞形态不规则、数量减少且分布不均匀，细胞间出现较大空隙；姜黄素 4×10^{-6} mol/L 处理组的 H9c2 细胞形态和数量恢复，细胞分布均匀、排列紧密，与正常组细胞形态无较大差异（图 4）。

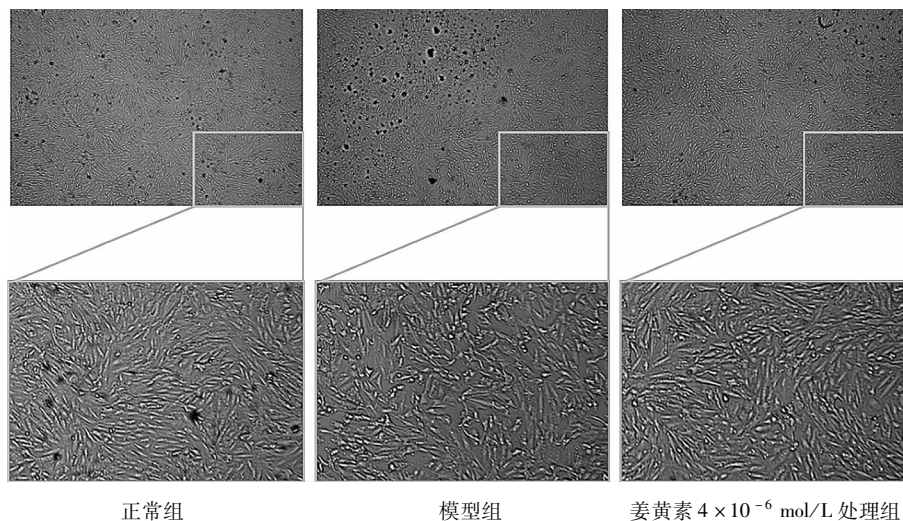


图4 H9c2 细胞在不同处理条件下的形态变化 (40 ×)

3 讨论与结论

对于不同的细胞或不同处理后的相同细胞, 姜黄素的最佳作用浓度不同. 有研究^[24]显示, 姜黄素可以降低 EC9706 和 TE13 细胞中 p-STAT3 的蛋白表达, 且存在剂量依赖性. HOSSEINZADEH L^[25]等人用不同浓度 ($5 \times 10^{-6} \sim 50 \times 10^{-6}$ mol/L) 的姜黄素预处理可使 H9c2 细胞通过产生 ROS 致敏 DOX 介导的凋亡. 也有研究^[7]显示, 10×10^{-6} mol/L 的姜黄素能够通过抑制 H9c2 心肌细胞内质网应激减弱棕榈酸诱导的细胞凋亡. 在本研究中, 前期通过 CCK8 结合 WB 结果, 最终确定 4×10^{-6} mol/L 为姜黄素对高糖诱导的 H9c2 细胞损伤预防的最适浓度. 而形态学观察也发现 4×10^{-6} mol/L 姜黄素处理组的 H9c2 细胞形态和数量恢复, 细胞分布均匀, 细胞排列紧密, 与正常组细胞形态无较大差异.

综上所述, 姜黄素可以通过抑制细胞凋亡, 增加细胞增殖活力, 缓解高糖诱导的 H9c2 细胞损伤. 其中姜黄素浓度为 4×10^{-6} mol/L 时, 对 H9c2 细胞具有最优的保护作用. 本研究结果可为姜黄素在高糖诱导的 H9c2 细胞损伤治疗方面提供实验数据基础, 也可为相关疾病的药物研发提供参考.

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 264 - 265.
- [2] SHAKERIA, CICERO A F G, PANAHI Y, et al. Curcumin: A naturally occurring autophagy modulator [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234 (5): 5643 - 5654.
- [3] MU J, WANG X, DONG L, et al. Curcumin derivative L6H4 inhibits proliferation and invasion of gastric cancer cell line BGC-823 [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120 (1): 1011 - 1017.
- [4] ZHANG H, XU W, LI B, et al. Curcumin promotes cell cycle arrest and inhibits survival of human renal cancer cells by negative modulation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2015, 73 (3): 681 - 686.
- [5] LEV-ARI S, STARR A, KATZBURG S, et al. Curcumin induces apoptosis and inhibits growth of orthotopic human non-small cell lung cancer xenografts [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25 (8): 843 - 850.
- [6] ZHU P, YANG M, HE H, et al. Curcumin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by downregulating Notch signaling [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 20 (2): 1541 - 1550.
- [7] GUAN G, LEI L, LV Q, et al. Curcumin attenuates palmitic acid-induced cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in H9C2 cardiomyocytes [J]. *Human and Experimental Toxicology*, 2019, 38 (6): 655 - 664.
- [8] LIU Y, LIU Y, HUANG X, et al. Protective effects and mechanism of curcumin on myocardial injury induced by coronary microembolization [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120 (4): 5695 - 5703.
- [9] 李世清, 陈福敏, 罗君, 等. 顺铂对结肠癌细胞株 Caco-2 增殖凋亡和 Bcl-2、Caspase3、Caspase9 蛋白表达的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23 (9): 1460 - 1464.
- [10] KATAYAMA S, SHIMODA K, TAKENAGA Y. Loss of ADAR1 in human iPS cells promotes caspase3-mediated apoptotic cell death [J]. *Genes Cells*, 2015, 20 (8): 675 - 680.
- [11] JOSEPHE K, LEVINEJ D. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2004, 20 (11): 2896 - 2902.
- [12] CHAI Y, CHEN Y, LIN S, et al. Curcumin regulates the differentiation of naive CD4+ T cells and activates IL-10 immune modulation against acute lung injury in mice [EB/OL]. (2022-01-28) [2022-07-05]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332220301360>.
- [13] ZHANG Y, LI L, ZHANG J. Curcumin in antidepressant treatments: An overview of potential mechanisms, pre-clinical/clinical trials and ongoing challenges [J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2020, 127 (4): 243 - 253.
- [14] KIM G, PIAO C, OH J, et al. Combined delivery of curcumin and the heme oxygenase-1 gene using cholesterol-conjugated polyamidoamine for anti-inflammatory therapy in acute lung injury [J]. *Phytomedicine*, 2019, 56: 165 - 174.
- [15] XIAO Z, XU F, ZHU X, et al. Inhibition of JNK phosphorylation by curcumin analog C66 protects LPS-induced acute lung injury [J]. *Drug Design Development and Therapy*, 2019, 13: 4161 - 4171.
- [16] REN Y, YANGZ, SUN Z, et al. Curcumin relieves paraquat-induced lung injury through inhibiting the thiore-

- doxin interacting protein/NLR pyrin domain containing 3 mediated inflammatory pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 20 (6): 5032 – 5040.
- [17] IKRAM M, SAEED K, KHAN A, et al. Natural dietary supplementation of curcumin protects mice brains against Ethanol-induced oxidative stress-mediated neurodegeneration and memory impairment via Nrf2/TLR4/RAGE signaling [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (5): 1082.
- [18] ABUBAKAR K, MUHAMMAD-MAILAFIYA M, DAN-MAIGORO A, et al. Curcumin attenuates lead-induced cerebellar toxicity in rats via chelating activity and inhibition of oxidative stress [J]. *Biomolecules*, 2019, 9 (9): 453.
- [19] HUANG W, LI X, WANG D, et al. Curcumin reduces LPS-induced septic acute kidney injury through suppression of lncRNA PVT1 in mice [EB/OL]. (2020 – 08 – 01) [2022 – 07 – 05]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320520300874>.
- [20] CHEN Y, LI C, DUAN S, et al. Curcumin attenuates potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation in mice [EB/OL]. (2019 – 07 – 21) [2022 – 07 – 05]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333221932462X>.
- [21] TAN R, LIU J, ZHANG Y, et al. Curcumin relieved cisplatin-induced kidney inflammation through inhibiting Mincle-maintained M1 macrophage phenotype [J]. *Phytotherapy*, 2019, 52: 284 – 294.
- [22] LUO D, CHEN J, LIU J, et al. Tetrahydrocurcumin and octahydrocurcumin, the primary and final hydrogenated metabolites of curcumin, possess superior hepatic-protective effect against acetaminophen-induced liver injury: Role of CYP2E1 and Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 123: 349 – 362.
- [23] FENG D, ZOU J, SU D, et al. Curcumin prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis in ApoE^{-/-} mice by improving intestinal barrier function and reducing endotoxin and liver TLR4/NF- κ B inflammation [J]. *Nutrition & Metabolism*, 2019, 16: 79.
- [24] LIU Y, WANG X, ZENG S, et al. The natural polyphenol curcumin induces apoptosis by suppressing STAT3 signaling in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018, 37 (1): 303.
- [25] HOSSEINZADEH L, BEHRAVAN J, MOSAFFA F, et al. Curcumin potentiates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells through generation of reactive oxygen species [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49 (5): 1102 – 1109.

