

姜黄素通过 AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路在体外抑制脉络膜新生血管的机制

陈水龄¹, 亢泽峰², 褚文丽², 郝雪莲², 陶方方¹, 张明明², 李书娇²

引用: 陈水龄, 亢泽峰, 褚文丽, 等. 姜黄素通过 AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路在体外抑制脉络膜新生血管的机制. 国际眼科杂志 2022;22(4):541-548

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81574032)

作者单位: ¹(100091) 中国北京市, 中国中医科学院西苑医院眼科; ²(100040) 中国北京市, 中国中医科学院眼科医院

作者简介: 陈水龄, 博士研究生, 住院医师, 研究方向: 中西医结合治疗眼底病。

通讯作者: 亢泽峰, 博士研究生, 主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗眼病。 zefeng2531@163.com

收稿日期: 2021-07-04 修回日期: 2022-03-14

摘要

目的: 探讨姜黄素在体外抑制脉络膜新生血管 (CNV) 生成的作用及机制。

方法: 氯化钴 (CoCl₂) 诱导人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞建立化学性缺氧模型, 采用 CCK-8 法检测姜黄素对 CoCl₂ 诱导的 ARPE-19 细胞活性的影响, 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测姜黄素对 CoCl₂ 诱导的 ARPE-19 缺氧模型细胞内 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 及蛋白表达的影响。采用细胞划痕实验、Transwell 小室迁移实验、Transwell 小室侵袭实验及 Matrigel 基质胶管腔形成实验, 观察在非接触情况下 ARPE-19 细胞姜黄素的条件下培养液对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的增殖、迁移、侵袭和管腔形成的影响。

结果: 100 μ mol/L CoCl₂ 可成功建立 ARPE-19 细胞化学缺氧模型。CoCl₂ 在 100 μ mol/L 浓度下促进 ARPE-19 细胞中 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 及 p-AKT、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达。姜黄素在浓度为 100 μ mol/L 时可减少 ARPE-19 细胞中 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 及 p-AKT、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达。ARPE-19 细胞姜黄素低 (6.25 μ mol/L)、中 (25 μ mol/L)、高剂量组 (100 μ mol/L) 条件培养液可显著抑制 HUVEC 细胞水平迁移; 其中高剂量组条件培养液可显著抑制 HUVEC 细胞垂直迁移和细胞侵袭。ARPE-19 细胞姜黄素中、高剂量组条件培养液可抑制 HUVEC 细胞管腔形成。

结论: 姜黄素在 100 μ mol/L 对 CoCl₂ 诱导 ARPE-19 细胞缺氧有保护作用。姜黄素可在细胞水平抑制血管的生成。

关键词: 脉络膜新生血管; 姜黄素; 血管内皮生长因子 (VEGF); 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α); 蛋白激酶 B (AKT); 人视网膜色素上皮细胞; 人脐静脉内皮细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.4.03

Mechanism study of Curcumin on inhibiting experimental choroidal neovascularization *in vitro* by AKT/HIF-1 α /VEGF pathway

Shui-Ling Chen¹, Ze-Feng Kang², Wen-Li Chu², Xue-Lian Hao², Fang-Fang Tao¹, Ming-Ming Zhang², Shu-Jiao Li²

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81574032)

¹Department of Ophthalmology, Xiyuan Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China; ²Eye Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100040, China

Correspondence to: Ze-Feng Kang, Eye Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100040, China. zefeng2531@163.com

Received: 2021-07-04 Accepted: 2022-03-14

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect and mechanism of curcumin on inhibiting choroidal neovascularization (CNV) *in vitro*.

• **METHODS:** Human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells chemical hypoxia model was established by cobalt chloride (CoCl₂). CCK-8 method was used to detect the effect of curcumin on the activity of ARPE-19 cells induced by CoCl₂. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression of AKT, HIF-1 α , VEGF mRNA and protein in ARPE-19 cells hypoxia model induced by CoCl₂. Cell scratch test, transwell chamber migration test, transwell chamber invasion test and matrigel matrix hose lumen formation test were used to observe the effects of conditioned medium of curcumin in ARPE-19 cells on the proliferation, migration, invasion and lumen formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in non-contact condition.

• **RESULTS:** Chemical hypoxia model of ARPE-19 cells can successfully establish by CoCl₂ at 100 μ mol/L. CoCl₂ at the final concentration of 100 μ mol/L can promote the expression of AKT, HIF-1 α and VEGF mRNA and p-AKT, HIF-1 α and VEGF protein in ARPE-19 cells. Curcumin at the final concentration of 100 μ mol/L can reduce the expression of AKT, HIF-1 α and VEGF mRNA in ARPE-19

hypoxia model. Curcumin at the final concentration of $100\mu\text{mol/L}$ can reduce the expression of AKT, HIF-1 α and VEGF proteins in ARPE-19 hypoxia model. The conditioned medium of low ($6.25\mu\text{mol/L}$), medium ($25\mu\text{mol/L}$) and high dose ($100\mu\text{mol/L}$) curcumin in ARPE-19 cells can significantly inhibit the level migration of HUVEC. The conditioned medium in high dose group can significantly inhibit the vertical migration and cell invasion of HUVEC. The conditioned medium of middle and high dose curcumin in ARPE-19 cells can inhibit the lumen formation of HUVEC.

• **CONCLUSION:** Curcumin at $100\mu\text{mol/L}$ can protect ARPE-19 cells from hypoxia induced by CoCl_2 . Curcumin can inhibit the formation of blood vessels at the cellular level.

• **KEYWORDS:** choroidal neovascularization; Curcumin; vascular endothelial growth factor (VEGF); hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α); protein kinase B (AKT); human retinal pigment epithelial cells; human umbilical vein endothelial cells

Citation: Chen SL, Kang ZF, Chu WL, *et al.* Mechanism study of Curcumin on inhibiting experimental choroidal neovascularization *in vitro* by AKT/HIF-1 α /VEGF pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(4):541-548

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是年龄相关性黄斑病变(age-related macular degeneration, ARMD)、病理性近视(pathological myopia, PM)及中心性渗出性脉络膜视网膜病变(central exudative choroidal retinopathy, CEC)等多种眼底疾病的病理表现。CNV的形成是多细胞与多因子共同作用的结果,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知促进CNV形成的重要的因子之一。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)相关信号通路是参与调控这些细胞与因子活性的重要信号通路^[1]。目前,中药单体在抗新生血管方面的研究较多,尤其是在抗肿瘤新生血管方面,也为眼科新生血管类疾病的研究提供了思路。姜黄素(Curcumin)是从姜科植物姜黄、郁金、莪术提取的一种多酚类化合物,也是姜黄发挥药理作用的主要成分,体内外实验研究证实其药理作用广泛^[2-3],主要有抗炎、抗氧化、抗新生血管及抗肿瘤等^[4-5],但在CNV方面的研究较少。本研究探讨姜黄素在体外抑制CNV的作用机制,为CNV的治疗提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人视网膜色素上皮(ARPE-19)细胞购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC);人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自美国ScienCell公司。

1.1.2 主要试剂 氯化钴(CoCl_2)和姜黄素(美国Sigma), DMEM/F12培养液(美国Hyclon), ECM培养基(美国Cell Signaling Technology), 胎牛血清(美国Gibco), Matrigel基质胶(美国BD), CCK-8试剂盒(日本同仁)。RNA试剂

盒(北京康为世纪生物科技有限公司)。一抗: anti-AKT和 anti-p-AKT(美国CST), anti-HIF-1 α 和 anti-VEGF-A(美国Abcam)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8法筛选造模试剂 CoCl_2 和实验药物姜黄素及阳性对照药雷珠单抗的浓度 将对数生长期ARPE-19细胞接种于96孔板培养24h;分别加入浓度为0、50、100、200、400及 $800\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 溶液分别培养6、12、24和48h后,每孔加入CCK-8溶液 $20\mu\text{L}$,培养4h后检测各孔在450nm的吸光度值(OD值)。以正常组细胞活性为1,各实验组细胞活性=(实验组平均OD值-空白孔平均OD值)/(正常组平均OD值-空白孔平均OD值),每组3个复孔。同样的方法加入浓度为0、6.25、12.5、25、50、100及 $200\mu\text{mol/L}$ 姜黄素分别培养6、12、24和48h;浓度为0、5、10、20、40和 $80\mu\text{g/mL}$ 雷珠单抗培养24h。

1.2.2 CCK-8法检测各实验组ARPE-19细胞的活性 将对数生长期ARPE-19细胞接种于96孔板中培养24h,根据分组给予不同干预,正常组:ARPE-19;模型组:ARPE-19+ CoCl_2 ;雷珠单抗组:ARPE-19+ CoCl_2 +雷珠单抗;姜黄素低剂量组:ARPE-19+ CoCl_2 +姜黄素低剂量;姜黄素中剂量组:ARPE-19+ CoCl_2 +姜黄素中剂量;姜黄素高剂量组:ARPE-19+ CoCl_2 +姜黄素高剂量组。培养24h后加入CCK-8溶液 $20\mu\text{L}$,培养4h后检测各孔在450nm的吸光度值(OD值)。以正常组细胞活性为1,各实验组细胞活性=(实验组平均OD值-空白孔平均OD值)/(正常组平均OD值-空白孔平均OD值)。

1.2.3 RT-qPCR检测各组细胞AKT和HIF-1 α 及VEGF mRNA的表达 制备各组ARPE-19细胞样本,按照Trizol说明书提取总RNA,逆转录合成cDNA。qPCR设置反应条件:95 $^\circ\text{C}$ ×10min→95 $^\circ\text{C}$ ×15s→60 $^\circ\text{C}$ ×1min,35~40个循环,进行目的基因扩增,以GAPDH为内参,得到目的基因表达的相对定量值,进行统计学分析。其中引物由上海生工生物工程有限公司设计与合成,具体序列如下: GAPDH-F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA, GAPDH-R: GACTCATCGTACTCTGCTTGCT, AKT-F: ACTGTCATCGAACGCACCTT, AKT-R: CTCCTCCTCCTCCTGCTTCT, HIF-1 α -F: ACCTATGACCTGCTTGCTG, HIF-1 α -R: GGCTGTGTCGACTGAGGAA, VEGF-F: GAGTACATCTTCAAGCCATCCT, VEGF-R: TGCTCTATCTTTCTTTGGTCTGC。

1.2.4 Western blot检测各组细胞AKT、p-AKT、HIF-1 α 和VEGF蛋白的表达 采用Western blot法检测 CoCl_2 ($100\mu\text{mol/L}$)对ARPE-19细胞AKT、p-AKT、HIF-1 α 和VEGF蛋白表达的影响。制备细胞样本,提取总蛋白,BCA法计算蛋白浓度,制备蛋白SDS-PAGE胶,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜(湿转),抗体孵育(其中一抗稀释比例为AKT 1:1000, p-AKT 1:2000, HIF-1 α 1:500, VEGF 1:1000),曝光显影,测定条带灰度值,以 β -actin条带的光密度值校正,得到目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 CCK-8法检测缺氧条件下ARPE-19细胞姜黄素条件培养液对HUVEC细胞活性的影响 根据1.2.2制备缺氧条件下ARPE-19细胞不同组条件培养液,CCK-8法检测各组条件培养液对HUVEC细胞活性的影响(具体方法同1.2.1)。

1.2.6 细胞划痕实验检测各组条件培养液对 HUVEC 细胞水平迁移的影响 待 HUVEC 细胞生长至 80% 融合时, 调整细胞浓度至每毫升 1×10^5 个, 接种于 24 孔板中待细胞生长融合成单层细胞后, 用 $10 \mu\text{L}$ 微量加样枪头垂直于板底行“—”字形划痕, PBS 冲洗, 镜下拍摄 0h 和不同条件培养液干预 24h 后的照片 (40 \times), 重复 3 次。测量并计算各组迁移率, 迁移率 = $(S_0 - S_t) / S_0 \times 100\%$ (S_0 : 原始裸区面积, S_t : 各时间点裸区面积)。

1.2.7 Transwell 小室法检测各组条件培养液对 HUVEC 细胞垂直迁移和侵袭的影响 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭的不同在于侵袭实验需要加入 Matrigel 基质胶。调整 HUVEC 细胞至每毫升 1×10^5 个, 在 Transwell 的下室, 根据分组给予不同条件培养液; 在 Transwell 的上室加入 HUVEC 细胞悬液。加样后培养 24h, 吸尽小室内液体, 擦去小室内未迁移的细胞, 多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 晾干。倒置显微镜下取上下左右中间 5 个视野拍照 (100 \times), 相对垂直迁移率 = 实验组/正常组, 相对侵袭率 = 实验组/正常组。

1.2.8 Matrigel 基质胶法检测各组条件培养液对 HUVEC 细胞管腔形成的影响 96 孔板中用预冷的枪头在每孔加入 Matrigel 基质胶培养 2h, 使胶凝固。同时消化 HUVEC 细胞, 调整至每毫升 2×10^5 个, 根据分组给予不同条件培养液和 HUVEC 细胞悬液, 接种于 96 孔板中培养 6h。倒置显微镜下取上下左右中间 5 个不同视野进行拍照 (100 \times), 相对管腔形成率 = 实验组/正常组。

统计学分析: 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 CoCl_2 对 ARPE-19 细胞活性的影响 随着浓度的增加, 细胞活性呈现先增长后抑制, 当 CoCl_2 浓度 $\geq 200 \mu\text{mol/L}$ 时, ARPE-19 细胞的数量显著减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 镜下可见细胞皱缩稀疏。因此, 我们选择 CoCl_2 浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$, 干预 24h 进行后续实验研究, 见表 1。

2.2 不同浓度姜黄素对 ARPE-19 细胞活性的影响 姜黄素浓度在 $0 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 时, 对细胞活性没有影响, 镜下观察细胞形态未见变化。当浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活性明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 镜下观察细胞皱缩, 数量减少。因此, 我们选择姜黄素浓度为 6.25、25、 $100 \mu\text{mol/L}$ 为低、中、高剂量进行后续相关实验研究, 见表 2。

2.3 不同浓度雷珠单抗对 CoCl_2 诱导的 ARPE-19 细胞活性的影响 当雷珠单抗浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 时, ARPE-19 细胞的活性较 CoCl_2 组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 当浓度 $> 20 \mu\text{g/mL}$ 时, ARPE-19 细胞的活性较 CoCl_2 组和正常组均降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此, 我们选择雷珠单抗浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 进行后续相关实验研究, 见表 3。

2.4 各组间 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 相对表达量 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 相对表达量模型组均高

表 1 不同浓度 CoCl_2 对 ARPE-19 细胞活性的影响

CoCl_2 ($\mu\text{mol/L}$)	$(n = 3, \bar{x} \pm s)$			
	6h	12h	24h	48h
0	1	1	1	1
50	1.06 ± 0.05	1.05 ± 0.10	1.08 ± 0.11	1.04 ± 0.13
100	1.07 ± 0.06	1.17 ± 0.08	1.28 ± 0.11^a	1.14 ± 0.15
200	0.91 ± 0.04	0.73 ± 0.10^a	0.71 ± 0.13^a	0.76 ± 0.04^a
400	0.82 ± 0.04^a	0.61 ± 0.09^a	0.67 ± 0.12^a	0.66 ± 0.07^a
800	0.72 ± 0.07^a	0.37 ± 0.04^a	0.48 ± 0.04^a	0.36 ± 0.10^a
<i>F</i>	24.076	48.404	29.381	27.417
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: ^a $P < 0.05$ vs $0 \mu\text{mol/L}$ 组。

表 2 不同浓度姜黄素对 ARPE-19 细胞活性的影响

姜黄素 ($\mu\text{mol/L}$)	$(n = 3, \bar{x} \pm s)$			
	6h	12h	24h	48h
0	1	1	1	1
6.25	1.03 ± 0.03	1.04 ± 0.01	0.95 ± 0.02	1.04 ± 0.10
12.5	1.08 ± 0.03	1.07 ± 0.08	0.97 ± 0.03	1.12 ± 0.09
25	1.05 ± 0.01	1.04 ± 0.07	1.06 ± 0.03	1.03 ± 0.05
50	1.10 ± 0.07	1.03 ± 0.01	1.01 ± 0.09	1.11 ± 0.07
100	1.10 ± 0.08	0.93 ± 0.03	0.94 ± 0.13	0.97 ± 0.09
200	0.85 ± 0.11^a	0.58 ± 0.05^a	0.73 ± 0.07^a	0.81 ± 0.02^a
<i>F</i>	6.343	43.793	7.498	7.250
<i>P</i>	0.002	<0.01	0.001	0.001

注: ^a $P < 0.05$ vs $0 \mu\text{mol/L}$ 组。

表 3 不同浓度雷珠单抗对 CoCl_2 诱导的 ARPE-19 细胞活性的影响

组别	ARPE-19 细胞活性 $(n = 3, \bar{x} \pm s)$
正常组	1
CoCl_2 组	1.28 ± 0.11^a
$\text{CoCl}_2 + 5 \mu\text{g/mL}$ 雷珠单抗组	1.15 ± 0.14
$\text{CoCl}_2 + 10 \mu\text{g/mL}$ 雷珠单抗组	1.05 ± 0.15
$\text{CoCl}_2 + 20 \mu\text{g/mL}$ 雷珠单抗组	0.83 ± 0.06^c
$\text{CoCl}_2 + 40 \mu\text{g/mL}$ 雷珠单抗组	$0.58 \pm 0.10^{a,c}$
$\text{CoCl}_2 + 80 \mu\text{g/mL}$ 雷珠单抗组	$0.53 \pm 0.04^{a,c}$
<i>F</i>	25.341
<i>P</i>	<0.01

注: ^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs CoCl_2 组。

于正常组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 雷珠单抗组均低于模型组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 姜黄素低、中剂量与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 姜黄素高剂量组较模型组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与雷珠单抗组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

2.5 各组间 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白相对表达量 各组间 AKT 蛋白比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), p-AKT、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白相对表达量模型组均高于

表4 各组间 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 相对表达量

($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	AKT	HIF-1 α	VEGF
正常组	1	1	1
模型组	4.07 \pm 0.24 ^a	4.31 \pm 0.27 ^a	3.48 \pm 0.35 ^a
雷珠单抗组	2.67 \pm 0.27 ^c	2.09 \pm 0.39 ^c	1.77 \pm 0.27 ^c
姜黄素低剂量组	3.55 \pm 0.47	3.03 \pm 0.47	2.67 \pm 0.20
姜黄素中剂量组	3.40 \pm 0.22	3.26 \pm 0.57	2.52 \pm 0.37
姜黄素高剂量组	2.67 \pm 0.13 ^c	2.21 \pm 0.39 ^c	1.93 \pm 0.17 ^c
<i>F</i>	39.878	17.161	22.163
<i>P</i>	<0.01	0.002	<0.01

注:^a P <0.05 vs 正常组;^c P <0.05 vs 模型组。

正常组,差异均有统计学意义(P <0.05),雷珠单抗组均低于模型组,差异均有统计学意义(P <0.05)。p-AKT 和 HIF-1 α 蛋白相对表达量姜黄素低、中剂量与模型组比较差异均无统计学意义(P >0.05),姜黄素高剂量组较模型组降低,差异均有统计学意义(P <0.05),与雷珠单抗组比较差异无统计学意义(P >0.05)。VEGF 蛋白相对表达量姜黄素低剂量组与模型组比较差异均无统计学意义(P >0.05),姜黄素中、高剂量组较模型组降低,差异均有统计学意义(P <0.05),与雷珠单抗组比较差异无统计学意义(P >0.05),见图1,表5。

2.6 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞活性的影响 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞活性的影响比较差异无统计学意义(P >0.05),见表6。

2.7 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞水平迁移的影响 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞水平迁移的影响比较差异有统计学意义(P <0.05)。与正常组相比模型组 HUVEC 细胞水平迁移显著增加,差异有统计学意义(P <0.05);与模型组相比雷珠单抗组水平迁移较少,差异有统计学意义(P <0.05);姜黄素条件培养液低、中、高剂量组水平迁移较模型组明显减少,差异有统计学意义(P <0.05),其中,高剂量组与雷珠单抗组比较差异无统计学意义(P >0.05),见图2,表6。

2.8 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞垂直迁移的影响 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞垂直迁移的影响比较差异有统计学意义(P <0.05)。与正常组相比模型组 HUVEC 细胞垂直迁移显著增加,差异有统计学意义(P <0.05);与模型组相比雷珠单抗组垂直迁移较少,差异有统计学意义(P <0.05);姜黄素条件培养液低、中剂量组细胞垂直迁移与模型组相比差异无统计学意义(P >0.05),姜黄素条件培养液高剂量组垂直迁移较模型组明显减少,差异有统计学意义(P <0.05),与雷珠单抗组比较差异无统计学意义(P >0.05),见图3,表6。

2.9 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞侵袭的影响 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞侵袭的影响比较差异有统计学意义(P <0.05)。与正常组相比模型组 HUVEC 细胞侵袭显著增加,差异有统计学意义(P <0.05);与模型组相比雷珠单抗组侵袭显著减少,差异有统计学意义(P <0.05);姜黄素条件培养液低、中剂量

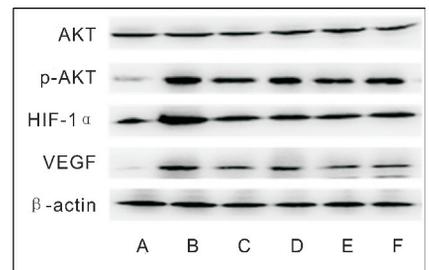


图1 各组间 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白相对表达量 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组。

组细胞侵袭与模型组相比差异无统计学意义(P >0.05),姜黄素条件培养液高剂量组侵袭较模型组显著减少,差异有统计学意义(P <0.05),与雷珠单抗组比较差异无统计学意义(P >0.05),见图4,表6。

2.10 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞管腔形成的影响 ARPE-19 细胞各组条件培养液对 HUVEC 细胞管腔形成的影响比较差异有统计学意义(P <0.05)。与正常组比较模型组 HUVEC 细胞管腔形成明显增加,差异有统计学意义(P <0.05);与模型组比较雷珠单抗组管腔形成显著减少,差异有统计学意义(P <0.05);与模型组比较姜黄素条件培养液低剂量组管腔形成未见明显变化,中、高剂量组管腔形成显著减少,差异有统计学意义(P <0.05),其中高剂量组管腔形成与雷珠单抗组比较差异无统计学意义(P >0.05),见图5,表6。

3 讨论

多种细胞成分参与了 CNV 的形成,其中 RPE 细胞是 CNV 的主要细胞成分之一,CNV 病变早期就存在 RPE 细胞的萎缩或功能减退。RPE 是视网膜神经上皮层和脉络膜之间含有色素的单层细胞,它与视网膜光感受器细胞层、Bruch 膜和脉络膜毛细血管共同组成光感受器细胞-RPE-Bruch 膜-脉络膜毛细血管复合体,在视网膜生理病理中发挥重要作用^[6],与眼底新生血管性疾病的发生发展密切相关^[7-8]。在缺氧状态下,RPE 细胞异常分泌 VEGF 等促血管生长因子,Bruch 膜损伤,CNV 形成,视网膜光感受器细胞因缺乏脉络膜的营养供应而凋亡。内皮细胞作为组织与血液的第一道屏障,也是最先感受缺氧的细胞之一。在 CNV 疾病的发生发展过程中,RPE 细胞缺氧、内皮

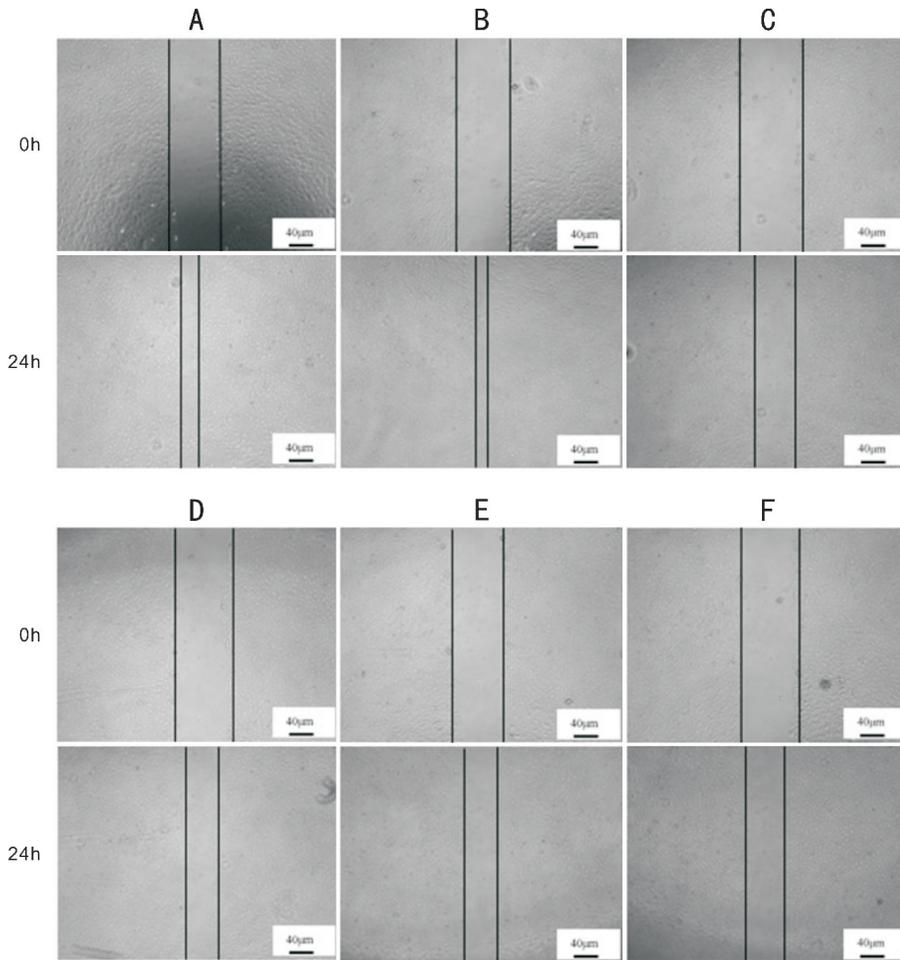


图2 ARPE-19细胞各组条件培养液对HUVEC细胞水平迁移的影响 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组。

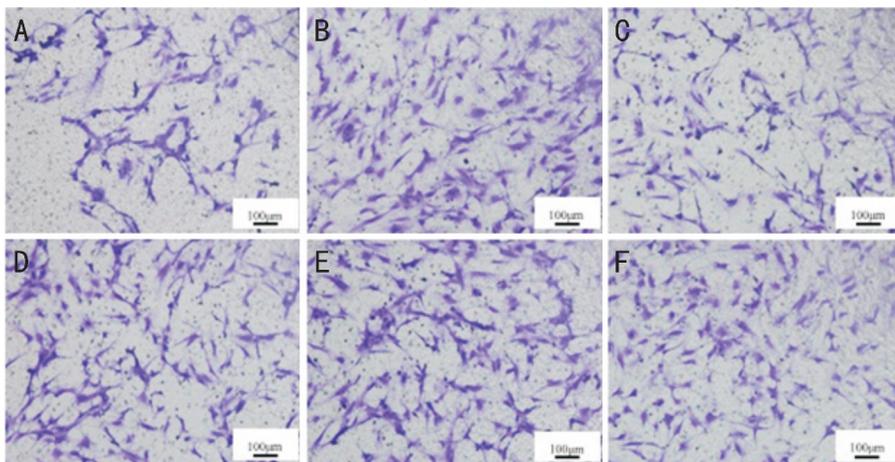


图3 ARPE-19细胞各组条件培养液对HUVEC细胞垂直迁移的影响 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组。

细胞受损及功能障碍是其中的关键因素,对内皮细胞的保护可阻止其进一步恶化,达到治疗疾病的目的。

缺氧诱导 VEGF 的表达是 CNV 发病机制中的重要环节。HIF-1 α 是细胞内氧平衡的关键调节因子,在缺氧诱导的血管生成、肿瘤发生、炎症反应以及细胞自噬等方面都起关键作用,它的激活可作为组织和细胞缺氧的直接反映与重要标志。本研究显示,CoCl₂ 在 100 μ mol/L 浓度时可以促进细胞中 HIF-1 α mRNA 和蛋白的表达,这说明我们的

ARPE-19 细胞体外缺氧模型的建立是成功的,与以往文献报道类似^[9-10],其机制与 AKT 信号通路有关。近年来大量的体内外实验研究证实姜黄素药理作用广泛^[2,11],主要有抗炎、抗氧化、抗新生血管^[3,5]及抗肿瘤等^[12-13],且无明显毒副作用。姜黄素在眼科相关的研究较多,包括抑制角膜新生血管形成^[13];抑制翼状胬肉成纤维细胞增生;抑制青光眼小梁切除术后滤过道瘢痕化;防治增殖性玻璃体视网膜病变^[14-15];抑制人^[16]和动物^[17-18]视网膜色素上

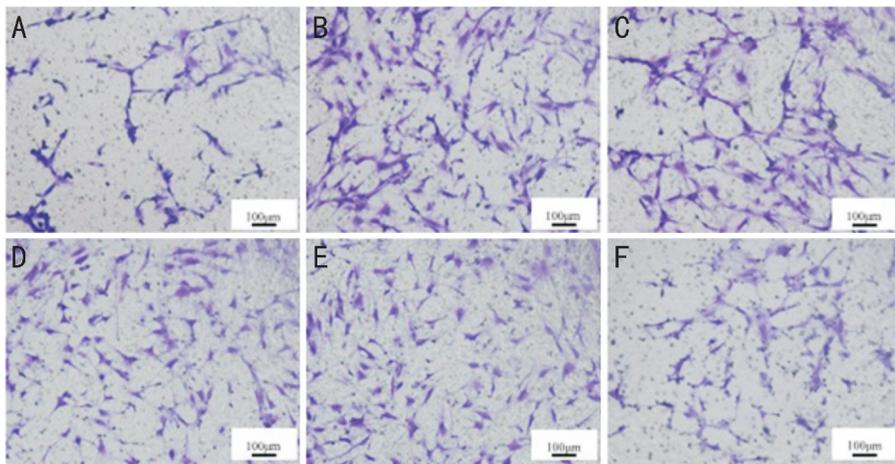


图4 ARPE-19细胞各组条件培养液对HUVEC细胞侵袭的影响 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组。

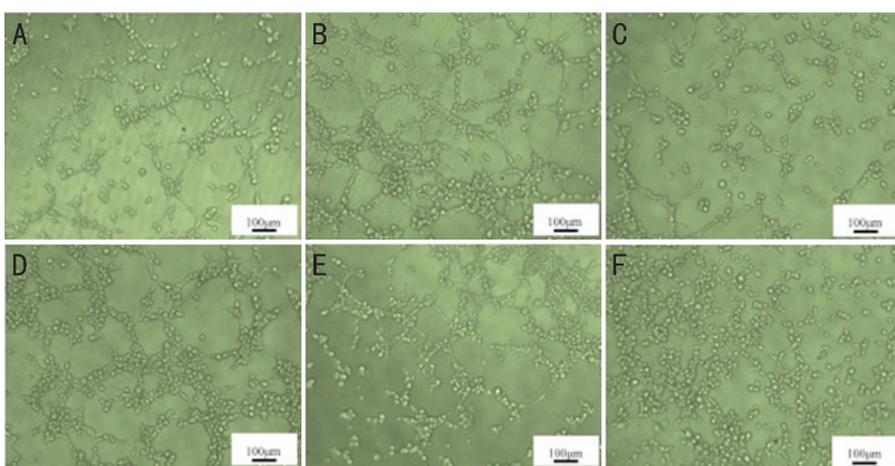


图5 ARPE-19细胞各组条件培养液对HUVEC细胞管腔形成的影响 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组。

表5 各组间 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白相对表达量 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	AKT	p-AKT	HIF-1 α	VEGF
正常组	0.84 \pm 0.12	0.30 \pm 0.05	0.42 \pm 0.10	0.21 \pm 0.03
模型组	1.02 \pm 0.13	1.28 \pm 0.15 ^a	1.40 \pm 0.17 ^a	0.95 \pm 0.04 ^a
雷珠单抗组	0.87 \pm 0.09	0.71 \pm 0.11 ^c	0.69 \pm 0.10 ^c	0.50 \pm 0.10 ^c
姜黄素低剂量组	0.97 \pm 0.07	1.08 \pm 0.02	1.05 \pm 0.13	0.85 \pm 0.03
姜黄素中剂量组	0.97 \pm 0.24	0.97 \pm 0.08	0.82 \pm 0.14	0.69 \pm 0.04 ^c
姜黄素高剂量组	1.08 \pm 0.11	0.74 \pm 0.05 ^c	0.71 \pm 0.06 ^c	0.64 \pm 0.07 ^c
F	0.891	29.781	13.382	54.948
P	0.541	<0.01	0.003	<0.01

注:^aP<0.05 vs 正常组;^cP<0.05 vs 模型组。

表6 ARPE-19细胞各组条件培养液对HUVEC细胞的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	HUVEC 细胞活性(n=6)	水平迁移率(n=3)	垂直迁移率(n=3)	侵袭率(n=3)	管腔形成率(n=3)
正常组	1	0.70 \pm 0.01	1	1	1
模型组	1.22 \pm 0.05	0.88 \pm 0.05 ^a	3.40 \pm 0.47 ^a	2.63 \pm 0.28 ^a	3.56 \pm 0.38 ^a
雷珠单抗组	1.10 \pm 0.07	0.54 \pm 0.04 ^c	1.82 \pm 0.23 ^c	1.82 \pm 0.23 ^c	1.92 \pm 0.38 ^c
姜黄素低剂量组	1.10 \pm 0.07	0.61 \pm 0.03 ^c	2.97 \pm 0.18	2.41 \pm 0.26	2.74 \pm 0.40
姜黄素中剂量组	1.18 \pm 0.10	0.62 \pm 0.06 ^c	3.05 \pm 0.17	2.48 \pm 0.42	2.38 \pm 0.44 ^c
姜黄素高剂量组	1.10 \pm 0.09	0.54 \pm 0.05 ^c	2.24 \pm 0.35 ^c	1.70 \pm 0.36 ^c	1.57 \pm 0.30 ^c
F	2.328	19.008	32.497	13.870	20.457
P	0.17	0.001	<0.01	<0.01	<0.01

注:^aP<0.05 vs 正常组;^cP<0.05 vs 模型组。

皮细胞增殖^[19];延缓实验动物早期^[20]糖尿病视网膜病变^[21];减少^[22-23]视网膜缺血再灌注损伤^[24];神经节细胞损伤的保护^[25-26]及治疗眼部肿瘤等^[27]多方面。

正常情况下,眼部组织中 VEGF 表达水平很低;但在缺血、缺氧、炎症等应激情况下^[28-29],VEGF 的表达水平会显著增高,继而诱发新生血管形成。目前眼科临床使用的各种抗 VEGF 类药物通过抑制 VEGF 与受体结合从而抑制 CNV 生长及血管渗漏,改善或维持患者的视力。本研究显示 100 μ mol/L 的姜黄素可减少 ARPE-19 细胞中 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 及蛋白的表达,可见姜黄素对 CoCl₂ 诱导 ARPE-19 细胞缺氧具有保护作用,但需要达到一定剂量。体外血管形成实验可分为细胞增殖实验、水平迁移实验^[30-31]、垂直迁移实验^[32-35]、细胞侵袭实验^[36]、管腔形成实验,以及器官水平的人胎盘血管段培养模型和大鼠动脉环模型。目前通常所说的血管形成实验是指细胞的管腔形成实验,它可从侧面反映毛细血管的早期形成过程,是体外检测内皮细胞功能的指标。血管形成过程中内皮细胞会形成细胞条索,然后形成管腔。在特定条件下如基质胶、胶原等培养时可见到管腔形成^[37-38]。本研究显示姜黄素条件培养液低、中、高剂量组可降低细胞水平迁移;中、高剂量组可减少细胞管腔形成;高剂量组还可降低细胞垂直迁移及降低细胞侵袭。

综上所述,本研究结果表明姜黄素可在细胞水平抑制新生血管的形成,其机制可能与 AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路有关。但鉴于姜黄素药理作用复杂,且体外培养的细胞成分单一,其形态、功能和体内均有一定的差别,因此,进一步完善体内实验,证实其在抑制新生血管中的作用将为临床应用奠定坚实基础。

参考文献

- 1 Tzouveleakis A, Ntoliou P, Karameris A, et al. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -vascular endothelial growth factor (VEGF)-inhibitory growth factor (ING)-4- axis in sarcoidosis patients. *BMC Res Notes* 2012;5:654
- 2 Chin KY. The spice for joint inflammation; anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis. *Drug Des Devel Ther* 2016; 10: 3029-3042
- 3 Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: a recent update. *Food Chem Toxicol* 2015;83:111-124
- 4 Pescosolido N, Giannotti R, Plateroti AM, et al. Curcumin: therapeutic potential in ophthalmology. *Planta Med* 2014; 80 (4): 249-254
- 5 Zhao ZM, Li CG, Xi H, et al. Curcumin induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the induction of forkhead box O1 and inhibition of the PI3K/Akt pathway. *Mol Med Rep* 2015; 12 (4): 5415-5422
- 6 Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl* 1993;17:189-195
- 7 Bhutto I, Luttj G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment

- epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):295-317
- 8 Kinnunen K, Petrovski G, Moe MC, et al. Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2012;90(4):299-309
- 9 Seong H, Ryu J, Jeong JY, et al. Resveratrol suppresses vascular endothelial growth factor secretion via inhibition of CXC-chemokine receptor 4 expression in ARPE-19 cells. *Mol Med Rep* 2015;12(1):1479-1484
- 10 Slomiany MG, Rosenzweig SA. Hypoxia-inducible factor-1-dependent and-independent regulation of insulin-like growth factor-1-stimulated vascular endothelial growth factor secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318(2):666-675
- 11 Chen FY, Zhou J, Guo N, et al. Curcumin retunes cholesterol transport homeostasis and inflammation response in M1 macrophage to prevent atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;467(4):872-878
- 12 Zhou X, Su J, Feng S, et al. Antitumor activity of curcumin is involved in down-regulation of YAP/TAZ expression in pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 2016;7(48):79076-79088
- 13 Kuo CN, Chen CH, Chen SN, et al. Anti-angiogenic effect of hexahydrocurcumin in rat corneal neovascularization. *Int Ophthalmol* 2018;38(2):747-756
- 14 Sun Y, You ZP. Curcumin inhibits human retinal pigment epithelial cell proliferation. *Int J Mol Med* 2014;34(4):1013-1019
- 15 Ren YX, Ma JX, Zhao F, et al. Effects of curcumin on epidermal growth factor in proliferative vitreoretinopathy. *Cell Physiol Biochem* 2018;47(5):2136-2146
- 16 Shanmuganathan S, Sumantran VN, Angayarkanni N. Epigallocatechin gallate & curcumin prevent transforming growth factor beta 1-induced epithelial to mesenchymal transition in ARPE-19 cells. *Indian J Med Res* 2017;146(Suppl):S85-S96
- 17 Zhou X, Kuang X, Long C, et al. Curcumin inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells via multiple pathways. *Curr Mol Med* 2017;17(4):312-319
- 18 安建斌, 马景学, 高彦军, 等. 姜黄素对兔视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用. *中华眼底病杂志* 2009;25(1):38-42
- 19 安建斌, 马景学, 刘丹岩, 等. 姜黄素对兔视网膜色素上皮细胞 DNA 含量、线粒体膜电位及胞质内钙离子的影响. *中华眼科杂志* 2009;45(3):210-215
- 20 Zuo ZF, Zhang Q, Liu XZ. Protective effects of curcumin on retinal Müller cell in early diabetic rats. *Int J Ophthalmol* 2013;6(4):422-424
- 21 何琼, 何建中, 赖伟, 等. 姜黄素对糖尿病大鼠视网膜中 Ets-1 表达的影响. *实验与检验医学* 2017;35(5):677-694
- 22 Wang S, Ye Q, Tu J, et al. Curcumin protects against hypertension aggravated retinal ischemia/reperfusion in a rat stroke model. *Clin Exp Hypertens* 2017;39(8):711-717
- 23 彭栋梁, 王晓娜, 杨军. 姜黄素对大鼠视网膜缺血/再灌注损伤时内质网应激的影响. *世界中医药* 2018;13(4):929-935
- 24 张海江, 梁亮. 姜黄素对视网膜缺血再灌注损伤大鼠视网膜组织结构及 IL-23 和 IL-17 表达的影响. *国际眼科杂志* 2017;17(8):1423-1426
- 25 徐志刚, 吕淑慧, 王玉清, 等. 姜黄素对急性高血压家兔的视网膜

神经节细胞的保护作用. 国际眼科杂志 2016;16(2):231-233
 26 裴涌,郝旭红,孙晓楠,等.姜黄素在缺氧致视网膜神经节细胞氧化应激损伤中的作用及机制. 中国医科大学学报 2016;45(3):227-229
 27 Yue YK, Mo B, Zhao J, et al. Neuroprotective effect of curcumin against oxidative damage in BV-2 microglia and high intraocular pressure animal model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014;30(8):657-664
 28 Jouanneau E. Angiogenesis and gliomas: current issues and development of surrogate markers. *Neurosurgery* 2008;62(1):31-50
 29 Poincloux R, Collin O, Lizárraga F, et al. Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(5):1943-1948
 30 Yin J, Yu FSX. Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295(2):378-387
 31 Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol* 2004;4:21

32 唐秋琳,毕峰. Transwell 法检测细胞侵袭迁移能力实验中的影响因素. 实验科学与技术 2018;16(4):18-21
 33 Marshall J. Transwell (®) invasion assays. *Methods Mol Biol* 2011;769:97-110
 34 Benton G, Kleinman HK, George J, et al. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) *in vitro* and *in vivo* with cancer cells. *Int J Cancer* 2011;128(8):1751-1757
 35 Berens EB, Holy JM, Riegel AT, et al. A cancer cell spheroid assay to assess invasion in a 3D setting. *J Vis Exp* 2015;105:53409
 36 Kramer N, Walzl A, Unger C, et al. *In vitro* cell migration and invasion assays. *Mutat Res* 2013;752(1):10-24
 37 Ponce ML. Tube formation: an *in vitro* matrigel angiogenesis assay. *Methods Mol Biol* 2009;467:183-188
 38 Adini A, Fainaru O, Udagawa T, et al. Matrigel cytometry: a novel method for quantifying angiogenesis *in vivo*. *J Immunol Methods* 2009;342(1-2):78-81

2020 中国科技核心期刊眼科学类期刊主要指标及排名

期刊名称	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	1909	2	0.963	1	73.2	1
眼科新进展	1430	3	0.842	2	66.0	2
国际眼科杂志	2133	1	0.589	5	54.9	3
中华眼科医学杂志电子版	114	10	0.455	8	48.3	4
中华实验眼科杂志	1056	4	0.677	3	43.1	5
中华眼底病杂志	738	5	0.585	6	37.9	6
临床眼科杂志	450	7	0.470	7	37.6	7
眼科	388	8	0.393	9	26.9	8
中华眼视光学与视觉科学杂志	661	6	0.590	4	21.8	9
中国斜视与小儿眼科杂志	240	9	0.376	10	13.6	10

摘编自 2020 版《中国科技期刊引证报告》核心版