

姜黄素对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞增殖及 VEGF 和 NF- κ B p65 表达的抑制作用

项彪¹, 潘颖喆², 谢安琪³, 程希², 邓玲²

引用: 项彪, 潘颖喆, 谢安琪, 等. 姜黄素对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞增殖及 VEGF 和 NF- κ B p65 表达的抑制作用. 国际眼科杂志 2022;22(5):764-768

作者单位:¹(441000) 中国湖北省襄阳市, 锦州医科大学湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院研究生培养基地;²(441000) 中国湖北省襄阳市, 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院眼科;³(421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院眼科
作者简介: 项彪, 锦州医科大学在读硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 潘颖喆, 毕业于武汉大学, 博士, 硕士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 眼底病. pyz917@sina.com

收稿日期: 2021-09-04 修回日期: 2022-04-11

摘要

目的: 观察不同浓度姜黄素对体外高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞 (HRCECs) 增殖及血管内皮生长因子 (VEGF)、核因子- κ B (NF- κ B) p65 表达的影响。

方法: 用高糖培养基模拟糖尿病环境建立 HRCECs 体外高糖模型, 将培养的细胞分为: 正常对照组、高糖对照组、高糖+20、40、80 μ mol/L 姜黄素组, 分别用 CCK-8 法检测姜黄素干预后 HRCECs 的增殖能力, 用 Western-blot 及免疫细胞化学法检测 VEGF、NF- κ B p65 的表达。

结果: CCK-8 法结果显示: 与正常对照组比较, 高糖显著促进 HRCECs 增殖 ($P < 0.01$), 各浓度姜黄素作用 12、24、48h 后与高糖对照组比较, 细胞增殖均有明显抑制作用 ($P < 0.01$), 且呈浓度与时间依赖性。Western-blot 结果显示: 与正常对照组比较, 高糖对照组中 VEGF-A、NF- κ B p65 表达显著增加 ($P < 0.01$), 各浓度姜黄素作用 12、24、48h 后与高糖对照组比较, VEGF-A、NF- κ B p65 的表达显著减少, 且随着浓度增加、时间延长抑制作用增强, 各加药组间两两比较均有差异 ($P < 0.01$)。免疫细胞化学法结果显示: 与正常对照组相比, 高糖对照组 VEGF 表达显著增加 ($P < 0.01$), 各浓度姜黄素干预 24h 后与高糖对照组比较, VEGF 表达逐渐下降 ($P < 0.01$), 各加药组间两两比较均有差异 ($P < 0.01$)。

结论: 姜黄素可呈浓度与时间依赖性地抑制高糖诱导的 HRCECs 增殖以及 VEGF、NF- κ B p65 的表达, 这种增殖抑制作用可能与其下调 VEGF、NF- κ B p65 表达有关。

关键词: 姜黄素; 人视网膜血管内皮细胞; 增殖; 血管内皮生长因子 (VEGF); 核因子- κ B (NF- κ B)

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.5.13

Inhibitory effect of curcumin on proliferation and expression of VEGF and NF- κ B p65 of HRCECs induced by high glucose

Biao Xiang¹, Ying-Zhe Pan², An-Qi Xie³, Xi Cheng², Ling Deng²

¹Postgraduate Training Basement of Jinzhou Medical University, Xiangyang No.1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, Hubei Province, China; ²Department of Ophthalmology, Xiangyang No.1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, Hubei Province, China; ³Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Ying-Zhe Pan. Department of Ophthalmology, Xiangyang No.1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, Hubei Province, China. pyz917@sina.com

Received: 2021-09-04 Accepted: 2022-04-11

Abstract

• **AIM:** To observe the effects of different concentrations of curcumin on the proliferation and expression of VEGF and NF- κ B p65 of human retinal capillary endothelial cells (HRCECs) induced by high glucose *in vitro*.

• **METHODS:** The hyperglycemia model of HRCECs *in vitro* was established by simulating diabetic environment with high glucose medium. The cultured cells were divided into normal control group, high glucose control group, high glucose + 20, 40 and 80 μ mol/L curcumin groups. The proliferation of HRCECs was detected by CCK-8 assay, and the expression of VEGF and NF- κ B p65 was detected by Western-blot and immunocytochemistry.

• **RESULTS:** The results of CCK-8 assay showed that high glucose promoted the proliferation of HRCECs significantly compared with the normal control group ($P < 0.01$). Curcumin at different concentrations could inhibit the proliferation of cells significantly in a concentration-dependent and time-dependent manner compared with the high glucose control group after being treated with curcumin at different concentrations for 12, 24 and 48h ($P < 0.01$). The results of Western-blot showed that compared with the normal control group, the expression of VEGF-A and NF- κ B p65 in the high glucose control

group was increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the high glucose control group, the expression of VEGF-A and NF- κ B p65 decreased significantly after being treated with curcumin at different concentrations for 12, 24 and 48h, and positively correlated with concentration and time ($P < 0.01$). The results of immunocytochemistry showed that the expression of VEGF in the high glucose control group was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.01$). After 24h of treatment with curcumin, the expression of VEGF was gradually decreased compared with the high glucose control group ($P < 0.01$). There were significant differences in pairwise comparison between each group ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Curcumin can inhibit the proliferation and the expression of VEGF and NF- κ B p65 of HRCECs induced by high glucose in a concentration-dependent and time-dependent manner, which may be related to its down-regulation of the expression of VEGF and NF- κ B p65.

• **KEYWORDS:** curcumin; human retinal capillary endothelial cells (HRCECs); proliferation; vascular endothelial growth factor (VEGF); nuclear factor- κ B (NF- κ B)

Citation: Xiang B, Pan YZ, Xie AQ, *et al.* Inhibitory effect of curcumin on proliferation and expression of VEGF and NF- κ B p65 of HRCECs induced by high glucose. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(5):764-768

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一。DR 导致视力下降甚至失明最主要的阶段是增殖性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR)。流行病学调查表明, DR 诊断 25a 后, PDR 的患病率接近 50%, 且大多数 1 型糖尿病 (T1DM) 患者将在大约 10a 后发展为 PDR^[1], 其病理学特征主要为晚期组织缺血缺氧, 诱导多种促血管生成因子和炎症因子的释放增加, 导致新生血管的形成, 从而继发玻璃体积血和视网膜脱离引起患者视力丧失^[2]。在 DR 的发生发展进程中, VEGF 和 NF- κ B 起着非常关键的作用。其中, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 被认为是促进血管生成的最主要因子, 也是抗血管生成的重要靶点^[3]。研究发现, PDR 患者玻璃体和纤维血管组织中的 VEGF 水平显著高于正常眼^[4]。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种多向性核转录因子, 广泛参与机体的免疫、炎症等生理病理过程^[5]。研究发现, DR 高血糖状态可引起活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成增加, 从而介导大量的炎症因子释放, 而炎症因子和 ROS 水平上调又可进一步激活 NF- κ B, 导致视网膜低度炎症^[6]。姜黄素 (curcumin, Cur) 是一种从姜科植物姜黄中提取的主要的多酚类活性成分, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用, 尤其在抗肿瘤方面具有较强的功效, 能通过下调 VEGF 的表达抑制肿瘤

新生血管的形成^[7-8]。研究还发现, 姜黄素显著降低脂质过氧化, 增加细胞内抗氧化剂含量, 调节抗氧化酶, 并清除高血糖诱导的 ROS 产生^[9]。但其对于高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞 (human retinal capillary endothelial cells, HRCECs) 是否也能通过降低 VEGF、NF- κ B 的表达而发挥治疗作用尚不明确。因此, 本研究通过 CCK-8 细胞增殖实验、Western-blot 及免疫细胞化学法, 探讨姜黄素对于高糖诱导的 HRCECs 作用的潜在机制。

1 材料和方法

1.1 材料 HRCECs (上海中科院细胞库); 低糖/高糖 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 姜黄素、胰酶 (美国 Sigma 公司); CCK-8 细胞增殖试剂盒 (上海碧云天生物公司); 兔抗人 VEGF 多克隆抗体, 兔抗人 NF- κ B 多克隆抗体, 兔抗人血管内皮生长因子 IgG, 蛋白预染 Marker, BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (武汉博士德生物公司); 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 全自动酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。本研究经襄阳市第一人民医院医学伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 姜黄素溶液的配制 姜黄素, 纯度 > 95%, 称取 14.2mg 姜黄素粉末溶解于 1mL 100% 的二甲基亚砜 (DMSO) 溶剂中, 根据 $C = m/M \cdot V$, 配制浓度为 40mmol/L 的姜黄素母液, 除菌分装后保存在 -20℃ 冰箱中。临用前, 用 DMEM 高糖培养基稀释至实验所需浓度, DMSO 终浓度 < 0.1%。

1.2.2 细胞处理及分组 将 HRCECs 置于含有青/链双抗、胎牛血清的 DMEM 培养基中, 放入培养箱中培养。取处于对数生长期的细胞进行实验分组: 空白组 (G0 组, 只含高糖 DMEM 培养基的调零组), 正常对照组 (NG 组, 低糖 DMEM 培养基+细胞), 高糖对照组 (HG 组, 高糖 DMEM 培养基+细胞), G1 组 (高糖 DMEM 培养基+细胞+20 μ mol/L 姜黄素), G2 组 (高糖 DMEM 培养基+细胞+40 μ mol/L 姜黄素), G3 组 (高糖 DMEM 培养基+细胞+80 μ mol/L 姜黄素)。正常糖浓度的 DMEM 培养基葡萄糖浓度为 5.5mmol/L, 统称为低糖培养基; 高糖 DMEM 培养基中葡萄糖浓度为 25mmol/L; G0 组仅设于 CCK-8 实验。

1.2.3 CCK-8 法检测 HRCECs 增殖 取对数生长期且长势良好的 HRCECs 用于实验, 将细胞经 PBS 洗涤、胰酶消化、离心后, 用 DMEM 培养基制成浓度为 5×10^4 cell/mL 的单细胞悬液, 以每孔 200 μ L 将悬液接种于 96 孔板内, 每组设 5 个复孔, 培养至细胞贴壁。按照上述分组分别培养 12、24、48h, 向每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L, 37℃ 孵育 4h 后, 用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光度值 (A 值), 计算每组浓度复孔平均值及细胞增殖抑制率, 上述实验重复 3 次。细胞抑制率 (%) = $[(\text{对照组平均 A 值} - \text{加药组平均 A 值}) / (\text{对照组平均 A 值} - \text{空白组平均 A 值})] \times 100\%$ 。

1.2.4 Western-blot 法检测 HRCECs 中蛋白的表达 收集各组处理 24h 后的 HRCECs 用 PBS 洗涤, 加入适量的 RIPA 裂解液 4℃ 下反应 20min 以提取细胞总蛋白。加入 1/5 体积的 5 \times 蛋白上样缓冲液, 置于 100℃ 沸水中 10min。BCA 法检测蛋白浓度。按照每孔 50 μ g 上样量进行 SDS-PAGE 电泳。恒流 300mA 电转 90min 后, 用 5% 的脱脂牛奶室温下封闭 60min。然后分别加入经 TBST 液稀释

的 VEGF、NF- κ B 和 β -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 1h。采用 Image J 软件测定灰度值,计算 A 值,以 β -actin 为内参计算蛋白相对表达量。

1.2.5 免疫细胞化学法检测 HRCECs 中蛋白的表达 将预先消毒灭菌的盖玻片放入 6 孔板内,制备浓度为 5.0×10^4 cell/mL 的单细胞悬液,每孔内滴入 2mL 悬液,培养 48h 后弃液,按照分组加入不同的条件培养液,共 5 组:NG 组、HG 组、G1~G3 组,每组设 2 个复孔,继续培养 24h 后取出盖玻片,用 PBS 洗涤,4% 多聚甲醛室温固定 15min。再经 PBS 洗涤,0.1% Triton-X100 室温通透化处理 15min 作染色前处理。然后在 3% 过氧化氢-甲醇溶液中浸泡 30min,以灭活内源性过氧化物酶,用 PBS 液洗涤后,再将其置于二抗来源的非免疫兔血清湿盒中封闭 30min,去除血清后甩干;加入一抗(兔抗人 VEGF 1:200),同时用 PBS 代替一抗设为阴性对照组,4 $^{\circ}$ C 湿盒中过夜,室温下复温 30min,PBS 液洗涤,加入生物素标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。最后,经 SABC 法染色、DAB 显色、苏木素复染、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,干燥后显微镜下观察。上述实验重复 3 次。计算各组标本灰度值:阳性灰度值与背景灰度值之差。

统计学分析:使用 SPSS26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析并作图,各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,CCK-8 与 Western-blot 实验中多组间及多个时间点均数的比较用重复测量数据的方差分析,免疫细胞化学实验中多组间均数的比较用单因素方差分析,组间及各时间点均数的两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 法检测姜黄素对高糖诱导的 HRCECs 增殖能力的影响 干预不同时间各组 A_{450} 比较,差异有统计学意义 ($F_{\text{组间}} = 687.00$, $F_{\text{时间}} = 179.50$, $F_{\text{交互}} = 26.74$, 均 $P < 0.001$)。与 NG 组相比,HG 组中 HRCECs 增殖能力显著增强 ($P < 0.01$),随着干预时间的延长而增强。增殖抑制率随着药物的浓度增加而上升,具有浓度依赖性。在相同药物浓度作用下,随着干预时间的延长,细胞增殖能力减弱 ($P < 0.01$),细胞增殖抑制率逐渐上升,具有时间依赖性。结果表明,高糖环境下的 HRCECs 增殖能力显著增强,而姜黄素对高糖诱导的 HRCECs 增殖有明显抑制作用,且随着浓度的增加、干预时间的延长抑制作用增强,见表 1,图 1。

2.2 Western-blot 法检测姜黄素对高糖诱导的 HRCECs 中 VEGF-A 和 NF- κ B p65 表达的影响 实验结果显示:与 NG 组比较,HG 组中 VEGF-A、NF- κ B p65 的表达显著升高 ($P < 0.01$);与 HG 组比较,G1~G3 组中 VEGF-A、NF- κ B p65 的表达均显著下降 ($P < 0.01$);在相同药物浓度作用下,随着干预时间延长,HRCECs 中 VEGF-A、NF- κ B p65 的表达呈下降趋势 ($P < 0.01$);在相同干预时间下,HG 组与 G1~G3 组之间两两比较,随着姜黄素浓度增加,HRCECs 中 VEGF-A、NF- κ B p65 的表达呈下降趋势 ($P < 0.01$)。结果表明,姜黄素对高糖诱导的 HRCECs 中 VEGF-A、NF- κ B p65 的表达具有下调作用,且在药物浓度范围内呈剂量-时间依赖性,见表 2、3,图 2~4。

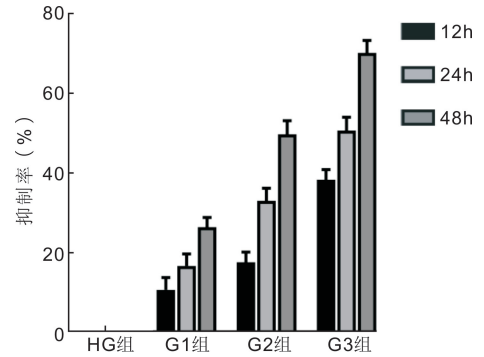


图 1 不同浓度姜黄素作用不同时间后对高糖诱导的 HRCECs 增殖抑制率的影响。

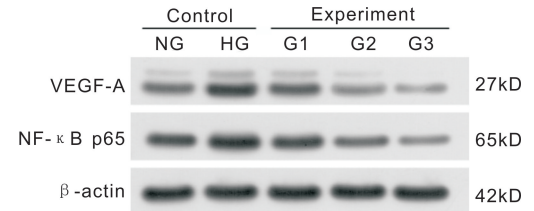


图 2 姜黄素作用 12h 后对高糖诱导的 HRCECs 中 VEGF-A 和 NF- κ B p65 表达的影响。

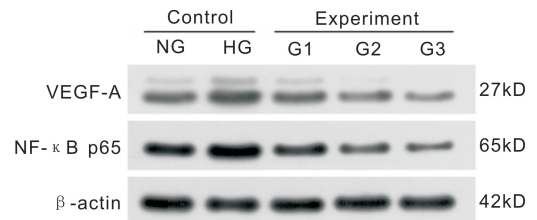


图 3 姜黄素作用 24h 后对高糖诱导的 HRCECs 中 VEGF-A 和 NF- κ B p65 表达的影响。

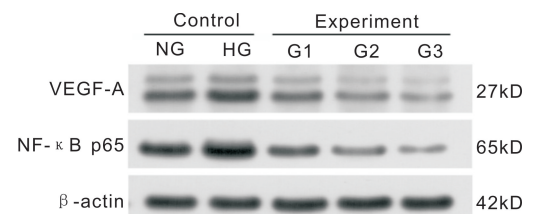


图 4 姜黄素作用 48h 后对高糖诱导的 HRCECs 中 VEGF-A 和 NF- κ B p65 表达的影响。

2.3 免疫细胞化学法检测姜黄素对高糖诱导的 HRCECs 中 VEGF 表达的影响 VEGF 的表达主要存在于 HRCECs 的细胞膜及细胞浆中,阳性表现为棕褐色颗粒着染。灰度值结果显示,与 NG 组比较,HG 组 HRCECs 中 VEGF 的表达明显增多 ($P < 0.01$)。不同浓度姜黄素干预 24h 后与 HG 组比较,HRCECs 中 VEGF 表达明显减少 ($P < 0.01$),随着药物浓度增加,细胞膜及细胞浆中的棕褐色阳性着染逐渐减少,颜色变淡,不同浓度加药组之间两两比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明姜黄素能有效抑制 HRCECs 中 VEGF 的表达,且随着药物浓度增加抑制作用增强,上述结果与 Western-blot 结果相符,见表 4、图 5。

3 讨论

视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 是 DR 患者病情恶化、视力丧失的主要原因,其发生发展与 HRCECs 的增殖、VEGF 及 NF- κ B 表达上调之间关系密切。

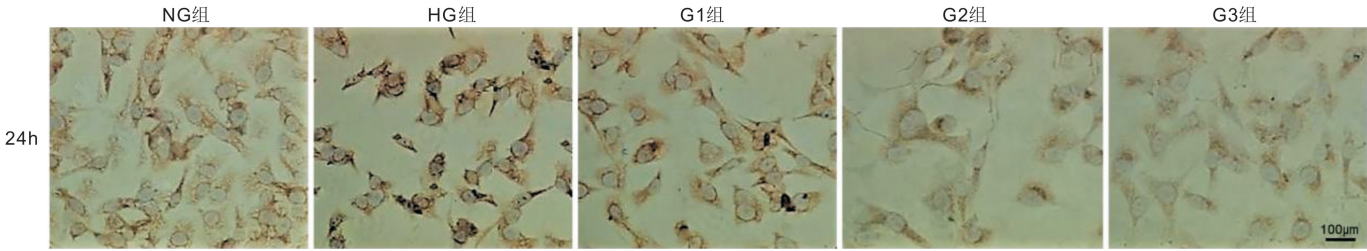


图5 免疫细胞化学法检测姜黄素对高糖诱导的HRCECs中VEGF表达的影响。

表1 不同浓度姜黄素作用不同时间后对高糖诱导的HRCECs增殖的影响

组别	干预 12h		干预 24h		干预 48h	
	$A_{450}(\bar{x}\pm s)$	抑制率(%)	$A_{450}(\bar{x}\pm s)$	抑制率(%)	$A_{450}(\bar{x}\pm s)$	抑制率(%)
G0组	0.074±0.033	-	0.077±0.032	-	0.073±0.041	-
NG组	0.602±0.028 ^b	-	0.693±0.020 ^b	-	0.726±0.026 ^b	-
HG组	0.716±0.041	0	0.790±0.029	0	0.846±0.036	0
G1组	0.651±0.021 ^{b,d,f}	10.12	0.674±0.016 ^{b,d,f}	16.27	0.642±0.024 ^{b,d,f}	26.39
G2组	0.601±0.035 ^{b,d}	17.91	0.554±0.025 ^{b,d}	33.10	0.460±0.015 ^{b,d}	49.94
G3组	0.472±0.027 ^b	38.00	0.430±0.014 ^b	50.49	0.309±0.029 ^b	69.47

注:G0组:只含高糖DMEM培养基的调零组;NG组:低糖DMEM培养基+细胞;HG组:高糖DMEM培养基+细胞;G1组:高糖DMEM培养基+细胞+20μmol/L姜黄素;G2组:高糖DMEM培养基+细胞+40μmol/L姜黄素;G3组:高糖DMEM培养基+细胞+80μmol/L姜黄素。^b $P<0.01$ vs HG组; ^d $P<0.01$ vs G3组; ^f $P<0.01$ vs G2组。

表2 高糖诱导的HRCECs经不同浓度姜黄素干预12、24、48h后VEGF-A的表达 ($n=5, \bar{x}\pm s$)

组别	干预 12h	干预 24h	干预 48h
NG组	0.746±0.019 ^b	0.635±0.012 ^b	0.659±0.024 ^b
HG组	1.129±0.021	0.987±0.035	1.015±0.030
G1组	0.888±0.013 ^{b,d,f}	0.666±0.023 ^{b,d,f}	0.470±0.017 ^{b,d,f}
G2组	0.537±0.009 ^{b,d}	0.449±0.018 ^{b,d}	0.371±0.022 ^{b,d}
G3组	0.406±0.016 ^b	0.332±0.008 ^b	0.307±0.011 ^b
F	2686.00(组间)	523.60(时间)	63.96(交互)
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:NG组:低糖DMEM培养基+细胞;HG组:高糖DMEM培养基+细胞;G1组:高糖DMEM培养基+细胞+20μmol/L姜黄素;G2组:高糖DMEM培养基+细胞+40μmol/L姜黄素;G3组:高糖DMEM培养基+细胞+80μmol/L姜黄素。^b $P<0.01$ vs HG组; ^d $P<0.01$ vs G3组; ^f $P<0.01$ vs G2组。

表3 高糖诱导的HRCECs经不同浓度姜黄素干预12、24、48h后NF-κB p65的表达 ($n=5, \bar{x}\pm s$)

组别	干预 12h	干预 24h	干预 48h
NG组	0.737±0.024 ^b	0.694±0.018 ^b	0.667±0.029 ^b
HG组	1.093±0.035	1.192±0.027	1.096±0.020
G1组	0.857±0.013 ^{b,d,f}	0.710±0.017 ^{b,d,f}	0.531±0.023 ^{b,d,f}
G2组	0.596±0.010 ^{b,d}	0.504±0.007 ^{b,d}	0.388±0.011 ^{b,d}
G3组	0.403±0.007 ^b	0.394±0.012 ^b	0.336±0.018 ^b
F	3570.00(组间)	348.60(时间)	69.57(交互)
P	<0.01	<0.01	<0.01

注:NG组:低糖DMEM培养基+细胞;HG组:高糖DMEM培养基+细胞;G1组:高糖DMEM培养基+细胞+20μmol/L姜黄素;G2组:高糖DMEM培养基+细胞+40μmol/L姜黄素;G3组:高糖DMEM培养基+细胞+80μmol/L姜黄素。^b $P<0.01$ vs HG组; ^d $P<0.01$ vs G3组; ^f $P<0.01$ vs G2组。

表4 姜黄素作用24h后各组HRCECs中VEGF的表达 ($n=7, \bar{x}\pm s$)

组别	VEGF灰度值
NG组	104.62±8.07 ^b
HG组	129.25±7.31
G1组	110.93±6.58 ^b
G2组	81.70±3.50 ^b
G3组	75.13±2.27 ^b
F	72.44
P	<0.001

注:NG组:低糖DMEM培养基+细胞;HG组:高糖DMEM培养基+细胞;G1组:高糖DMEM培养基+细胞+20μmol/L姜黄素;G2组:高糖DMEM培养基+细胞+40μmol/L姜黄素;G3组:高糖DMEM培养基+细胞+80μmol/L姜黄素。^b $P<0.01$ vs HG组。

新生血管的形成过程十分复杂,主要包括血管基底膜降解、内皮细胞增殖、迁移、成管四个阶段。研究发现,长期高糖环境对不同组织的血管内皮细胞影响不同,对大血管内皮细胞主要表现为抑制其生长,而对微血管内皮细胞反而表现为促进其增殖^[10]。本实验结果也提示,高糖环境下,HRCECs的增殖能力显著增强,与既往文献报道相符^[11];在给予不同浓度姜黄素干预后,可明显降低HRCECs的增殖能力,且抑制作用随着药物浓度增加、干预时间延长而增强。表明高糖诱导的HRCECs增殖能力增强,而姜黄素对其可有效抑制。

参与调控RNV形成的细胞因子众多,血管生成因子(如VEGF)起刺激作用,血管抑素和色素上皮衍生因子(PEDF)起抑制作用^[12]。正常环境下,各种因子保持动态平衡。但在高血糖、氧化应激及非感染性炎症反应等病理状态时,平衡状态会被破坏,促使血管生成的主要因子VEGF表达上调^[13]。VEGF与其受体结合后,可激活下游

的 PI3K/Akt、p38 及 Raf 等通路,来调控内皮细胞的增殖。本实验中 Western-blot 和免疫细胞化学法结果均显示, HG 组细胞中 VEGF 的表达量较 NG 组显著增加,表明一定浓度范围内高糖环境可上调 VEGF 的表达,与既往文献报道相符^[11]。姜黄素在抗新生血管形成方面的作用已经得到了证实。研究发现,姜黄素能通过调控 VEGF 信号通路诱导氧化应激和抑制血管生成,在结直肠癌的治疗上发挥作用^[8]。李勇等^[7]研究发现,姜黄素可通过降低 VEGF 的表达水平,抑制肝癌组织缺氧诱导的血管形成和肝癌细胞生长转移。本实验采用不同浓度姜黄素处理高糖诱导的 HRCECs 后发现,加药组细胞 VEGF 的表达显著下降,且呈浓度与时间依赖性。结合 CCK-8 结果,表明姜黄素抑制体外高糖诱导的 HRCECs 增殖可能与 VEGF 表达下调有关。

NF- κ B 是一种关键的促炎转录因子,其信号通路的激活是 DR 炎症反应发生发展过程中的关键一步。在 PDR 患者中,高血糖介导的 ROS 生成增加、NF- κ B 激活与 VEGF 上调之间关系显著^[14]。研究发现,高糖环境下氧化应激诱导的 ROS 上调和非酶糖基化产物与其受体的结合,均能引起 NF- κ B 的持续激活^[6,15]。正常情况下, NF- κ B 在胞浆中与抑制蛋白(I- κ B)结合处于失活状态。当受到刺激时,I- κ B 激酶发生磷酸化,导致游离的 NF- κ B 易位到细胞核,与特定的基因序列结合,诱导多种促炎因子、黏附因子、炎性酶、趋化因子等表达,从而促进炎症发生、细胞增殖和血管生成^[5],表明 NF- κ B 的激活是始动事件,随后其他炎症通路的激活逐步导致了 DR 微血管损伤。研究还发现 NF- κ B 通路的激活能诱导 VEGF 的表达^[16]。姜黄素对 NF- κ B 通路的抑制作用已在多种细胞中被报道。研究发现,姜黄素能通过抑制 I- κ B 激酶和 NF- κ B 活性诱导慢性粒细胞白血病细胞的 KCL-22 细胞凋亡^[17],其机制可能是由姜黄素自身的抗炎、抗氧化等药理特性改变了细胞的微环境和对 ROS 水平的调控。本研究中 Western-blot 结果示 HG 组细胞中 NF- κ B p65 的表达量较 NG 组显著增加,表明 NF- κ B 通路在 DR 进展过程中发挥着重要作用,与既往文献报道相符^[11]。在给予不用浓度姜黄素干预后,加药组细胞 NF- κ B p65 的表达显著下降,且呈浓度与时间依赖性。结合 CCK-8 结果,表明姜黄素抑制体外高糖诱导的 HRCECs 增殖可能与 NF- κ B p65 表达下调有关。

综上所述,本实验证实姜黄素能抑制高糖诱导的 HRCECs 增殖,其机制可能与其下调 HRCECs 中 VEGF-A、NF- κ B p65 的表达有关。但本实验仅是体外实验,而且关于 RNV 的生成因素只考虑了 VEGF 和 NF- κ B,实际上 DR 的发病机制复杂,参与的细胞因子众多,是多种因素相互作用的结果。本实验尚未明确姜黄素抑制 VEGF、NF- κ B 表达的具体机制,及它们间的相互作用关系。姜黄素对高糖诱导的 HRCECs 增殖及 VEGF、NF- κ B p65 表达的抑制作用的具体机制等问题有待进一步实验进行深入研究。

参考文献

- 1 Hainsworth DP, Bebu I, Aiello LP, *et al.* Risk factors for retinopathy in type 1 diabetes; the DCCT/EDIC study. *Diabetes Care* 2019;42(5): 875-882
- 2 Benlarbi-Ben Khedher M, Hajri K, Dellaa A, *et al.* Astaxanthin inhibits aldose reductase activity in *Psammomys obesus*, a model of type 2 diabetes and diabetic retinopathy. *Food Sci Nutr* 2019; 7(12): 3979-3985
- 3 Messias K, Barroso RM, Jorge R, *et al.* Retinal function in eyes with proliferative diabetic retinopathy treated with intravitreal ranibizumab and multispot laser panretinal photocoagulation. *Doc Ophthalmol* 2018; 137(2):121-129
- 4 Paine Suman K, Mondal Lakshmi K, Borah Prasanta K, *et al.* Pro- and antiangiogenic VEGF and its receptor status for the severity of diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2017;23:356-363
- 5 Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell* 2017;168(1-2):37-57
- 6 RübSam A, Parikh S, Fort PE. Role of inflammation in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):942
- 7 李勇,肖雅玲,陈朝晖,等.姜黄素对人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 内 β -连环蛋白信号通路的影响. *中华小儿外科杂志* 2014;35(7): 535-539
- 8 Moradi-Marjaneh R, Hassanian SM, Rahmani F, *et al.* Phytosomal curcumin elicits anti-tumor properties through suppression of angiogenesis, cell proliferation and induction of oxidative stress in colorectal cancer. *Curr Pharm Des* 2018;24(39):4626-4638
- 9 Epstein J, Sanderson IR, MacDonald TT. Curcumin as a therapeutic agent; the evidence from *in vitro*, animal and human studies. *Br J Nutr* 2010;103(11):1545-1557
- 10 Duffy A, Liew A, O'Sullivan J, *et al.* Distinct effects of high-glucose conditions on endothelial cells of macrovascular and microvascular origins. *Endothelium* 2006;13(1):9-16
- 11 Sun XP, Lu YB, Lei T. TPTEP1 suppresses high glucose-induced dysfunction in retinal vascular endothelial cells by interacting with STAT3 and targeting VEGFA. *Acta Diabetol* 2021;58(6):759-769
- 12 Ren JG, Jie CF, Talbot C. How PEDF prevents angiogenesis: a hypothesized pathway. *Med Hypotheses* 2005;64(1):74-78
- 13 Palanisamy K, Nareshkumar RN, Sivagurunathan S, *et al.* Anti-angiogenic effect of adiponectin in human primary microvascular and macrovascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2019;122:136-145
- 14 Choudhuri S, Chowdhury IH, Das S, *et al.* Role of NF- κ B activation and VEGF gene polymorphisms in VEGF up regulation in non-proliferative and proliferative diabetic retinopathy. *Mol Cell Biochem* 2015;405(1-2):265-279
- 15 Nishikawa T, Edelstein D, du XL, *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404(6779):787-790
- 16 Zhu T, Wang DX, Zhang W, *et al.* Andrographolide protects against LPS-induced acute lung injury by inactivation of NF- κ B. *PLoS One* 2013;8(2):e56407
- 17 Iqbal B, Ghildiyal A, Singh S, *et al.* Combinatorial effect of curcumin and tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in induction of apoptosis via inhibition of nuclear factor kappa activity and enhancement of caspase-3 activity in chronic myeloid cells: an *In-vitro* study. *J Cancer Res Ther* 2018;14(Supplement):S1193-S1200