

姜黄素对高浓度葡萄糖诱导的 RF/6A 细胞损伤的抑制作用

左中夫, 张强, 刘学政

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院人体解剖学教研室

作者简介: 左中夫, 博士, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。

通讯作者: 刘学政, 教授, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变. liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期: 2012-10-12 修回日期: 2013-01-21

Curcumin attenuates high glucose concentration-induced RF/6A damage

Zhong-Fu Zuo, Qiang Zhang, Xue-Zheng Liu

Department of Human Anatomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue - Zheng Liu. Department of Human Anatomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. liuxuezheng168@vip.sina.com

Received: 2012-10-12 Accepted: 2013-01-21

Abstract

• **AIM:** To explore protective effects of curcumin on high glucose concentration induced rhesus choroido-retinal endothelial cell (RF/6A) damage.

• **METHODS:** RF/6A was randomly assigned into 4 groups ($n=6/\text{group}$): Control group (CONT group, DMEM+10% FBS), high glucose concentration group (HGC group, DMEM+10% FBS+40mmol/L glucose), curcumin group (CUR group, DMEM+10% FBS+30 $\mu\text{mol/L}$ curcumin) and curcumin-glucose group (C-G group, DMEM+10% FBS+40mmol/L glucose+30 $\mu\text{mol/L}$ curcumin). Five days later, cells were observed with microscope, and cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Moreover, agarose gel electrophoresis was introduced to investigate DNA ladder in each group. We also detected expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α).

• **RESULTS:** Compared with CONT group, cell viability in HGC group was decreased ($P<0.01$), showing no obvious difference in CUR or C-G groups ($P>0.05$). HGC group presented obvious DNA ladder, while no ladder was observed in CONT, CUR or C-G group. Furthermore, compared with CONT group, TNF- α was up-regulated in HGC group ($P<0.01$), and no difference was detected in CUR group or C-G group ($P>0.05$).

• **CONCLUSION:** Curcumin attenuates high glucose concentration induced RF/6A apoptosis, maintaining cell viability, which may result from reversing HGC-induced up-regulation of TNF- α .

• **KEYWORDS:** high glucose concentration; curcumin; rhesus choroido-retinal endothelial cell

Citation: Zuo ZF, Zhang Q, Liu XZ. Curcumin attenuates high glucose concentration-induced RF/6A damage. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(2):262-264

摘要

目的:探讨姜黄素对高浓度葡萄糖培养的恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞 (rhesus choroido-retinal endothelial cell, RF/6A) 损伤的保护作用及机制。

方法:RF/6A 细胞分 4 组培养 ($n=6/\text{组}$), 对照组: DMEM 培养基+100/L 胎牛血清; 高糖组: 对照组培养基添加 40mmol/L 葡萄糖; 姜黄素组: 对照组培养基添加 30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素; 姜黄素-高糖组: 对照组培养基添加 40mmol/L 葡萄糖及 30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素。分组培养 5d 后, 显微镜观察各组细胞生长状态, 噻唑蓝比色法 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 检测各组细胞活力, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA ladder 判断凋亡, Western-blot 检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达。

结果:与对照组相比, 高糖组 RF/6A 细胞生长状态较差, 活力明显降低 ($P<0.01$), 而姜黄素组及姜黄素-高糖组 RF/6A 活力无明显变化 ($P>0.05$)。高糖组 RF/6A 出现明显的 DNA ladder, 对照组、姜黄素组以及姜黄素-高糖组未见明显 DNA ladder。与对照组相比, 高糖组 TNF- α 表达上调 ($P<0.01$), 姜黄素组及姜黄素-高糖组 TNF- α 表达无明显变化 ($P>0.05$)。

结论:姜黄素抑制高浓度葡萄糖诱导的 RF/6A 细胞凋亡, 维持细胞活力, 可能与姜黄素恢复高浓度葡萄糖诱导的 TNF- α 表达有关。

关键词:高浓度葡萄糖; 姜黄素; 猴脉络膜-视网膜内皮细胞
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.11

引用:左中夫, 张强, 刘学政. 姜黄素对高浓度葡萄糖诱导的 RF/6A 细胞损伤的抑制作用. 国际眼科杂志 2013;13(2):262-264

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 可导致患者视力减退, 甚至失明, 目前仍缺乏有效治疗手段。视网膜内皮细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达上调, 损伤内皮细胞受损, 增强微血管通透性, 是 DR 微血管病变的重要机制之一^[1]。研究表明, 姜黄素可抑制单核巨噬细胞 TNF- α 的表达, 抑制成纤维细胞 TNF- α 的活性^[2]。因此, 本研究拟探讨姜黄素对高浓度葡萄糖培养的 RF/6A TNF- α 表达的影响, 及对 RF/6A 损伤的抑制作用, 以期 DR 的治疗提供新的思路。

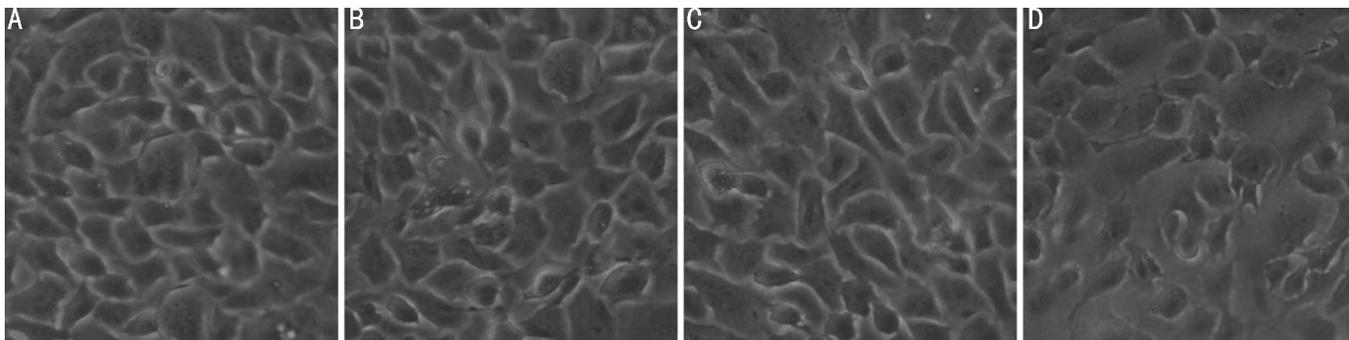


图1 分组培养5d,RF/6A细胞形态变化($\times 400$) A:对照组;B:姜黄素组;C:姜黄素-高糖组;D:高糖组。

1 材料和方法

1.1 材料 RF/6A(中科院上海细胞库),DMEM 高糖培养基及 D-葡萄糖(Gibco 生物公司),甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT,碧云天生物公司),姜黄素及 TNF- α 抗体(Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 根据文献及本课题组前期研究结果^[3,4],本实验分4组($n=6$ /组):对照组(DMEM 培养基+100mL/L 胎牛血清),高糖组(DMEM 培养基+100mL/L 胎牛血清+40mmol/L 葡萄糖),姜黄素组(DMEM 培养基+100mL/L 胎牛血清+30 μ mol/L 姜黄素),姜黄素-高糖组(DMEM 培养基+100mL/L 胎牛血清+40mmol/L 葡萄糖+30 μ mol/L 姜黄素)。分组培养5d后检测。

1.2.2 细胞生长状态检测 调整细胞浓度 $1 \times 10^4/200\mu$ L,将200 μ L细胞混悬液接种于96孔板,24h后换液,分组培养5d后,于倒置显微镜下观察细胞生长状态,再以MTT法检测细胞活力。每孔加入20 μ L MTT溶液(5mg/mL)继续培养3h,弃培养液,加入150 μ L二甲基亚砷振荡15min。选择490nm波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值(A值),计算细胞活力:细胞活力=实验组A值/正常组A值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 RF/6A细胞的DNA提取及DNA ladder检测 细胞以TBS重悬后收集于EP管内,加入蛋白裂解液于50 $^{\circ}$ C水浴3h,加入等体积的平衡酚,以6000r/min离心15min。将黏滞的水相转移至另一离心管。苯酚抽提两次,收集水相。加入1/5体积10mol/L的醋酸铵及2倍体积的无水乙醇,室温下6500r/min离心5min收集沉淀即DNA。DNA样本以80V电压,10g/L琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照记录。

1.2.4 Western-blot检测RF/6A细胞TNF- α 表达 以细胞粉碎仪粉碎细胞,12000r/min,4 $^{\circ}$ C离心15min,收集、测定并调节上清蛋白浓度后,SDS-PAGE电泳(150V电压)后转移至PVDF膜,以封闭液(1 \times TBST,50g/L脱脂奶粉)4 $^{\circ}$ C封闭过夜后分别以TNF- α 及 β -actin一抗37 $^{\circ}$ C孵育2h(分别为1:1000,1:2000),再以相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(均为1:4000)37 $^{\circ}$ C孵育2h,ECL发光试剂盒暗室显影。

统计学分析:数据均采用均数 \pm 标准差表示,利用SPSS 17.0 for windows进行单因素方差分析,两两比较用LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

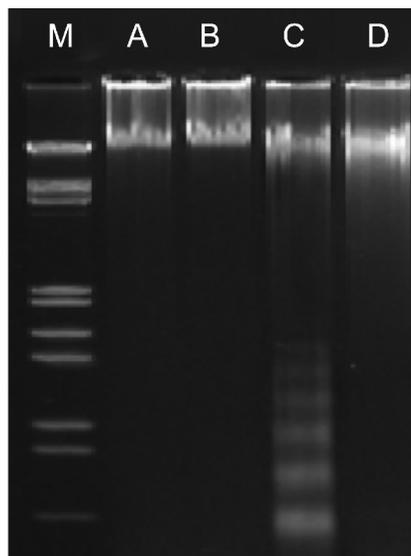


图2 DNA琼脂糖凝胶电泳 M:Marker;A:对照组;B:姜黄素组;C:高糖组;D:姜黄素-高糖组。

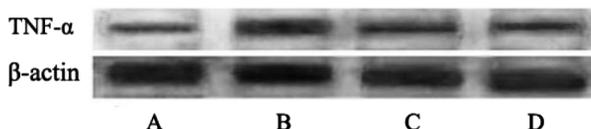


图3 RF/6A细胞中TNF- α 蛋白表达 A:对照组;B:高糖组;C:姜黄素组;D:姜黄素-高糖组。

2 结果

2.1 RF/6A形态学变化 分组培养5d时,对照组、姜黄素组及姜黄素-高糖组细胞呈椭圆形,少数呈梭形,生长致密。高糖组RF/6A胞体萎缩、变小,细胞间隙增大,数量减少(图1)。

2.2 RF/6A细胞活力检测 MTT检测显示,与对照组相比,高糖组RF/6A细胞活力明显降低(73.26 ± 5.37 vs 100.00 ± 6.32 , $P < 0.01$),而姜黄素组及姜黄素-高糖组细胞活力未见明显变化(95.49 ± 5.87 vs 94.28 ± 7.63 , $P > 0.05$)。

2.3 RF/6A细胞DNA ladder变化 琼脂糖凝胶电泳显示,高糖组出现了明显的ladder条带,对照组、姜黄素组及姜黄素-高糖组未见明显DNA ladder(图2)。

2.4 RF/6A细胞TNF- α 的表达 以 β -actin为内参照,Western-blot检测显示,与对照组相比,高糖组TNF- α 表达上调,姜黄素组及姜黄素-高糖组TNF- α 表达无明显变化(图3)。

3 讨论

DR是糖尿病的主要并发症之一,也是成年人致盲的重要因素。本研究以高浓度葡萄糖模拟体内高血糖环境,以RF/6A为研究对象,探讨了姜黄素对高浓度葡萄糖培养的RF/6A的保护作用及机制。结果表明,高浓度葡萄糖可能通过上调RF/6A的TNF- α 表达诱导了RF/6A凋亡,抑制了RF/6A活性,姜黄素可能通过抑制TNF- α 表达从而抑制高浓度葡萄糖诱导的RF/6A凋亡,并恢复RF/6A活性。

高浓度葡萄糖可通过多种途径诱导内皮细胞凋亡,如氧化应激、多元醇-肌醇途径激活、蛋白激酶C(protein kinase C,PKC)途径激活、氨基己糖途径激活以及晚期糖基化终末化产物(advanced glycation endproducts,AGE)堆积等^[5]。DNA ladder是双螺旋DNA断裂形成片段所致,是细胞凋亡的表现形式之一^[6]。本研究发现,高浓度葡萄糖诱导RF/6A发生了凋亡。姜黄素是植物姜黄的根茎提取物,具有抑制凋亡的作用,可通过特异性 β_2 糖蛋白上调PRDX6表达而抑制氧化镍诱导的晶状体上皮细胞凋亡^[7]。本研究也显示,姜黄素-高糖组未见明显DNA ladder条带,表明姜黄素可抑制高浓度葡萄糖诱导的RF/6A凋亡。此外,姜黄素组也未出现明显DNA ladder条带,表明姜黄素未诱导生理状态的RF/6A产生凋亡。

TNF- α 与细胞增殖分化关系密切,TNF- α 表达上调或活性增强可诱导细胞发生凋亡,TNF- α 在DR的发病过程中也发挥了重要作用。研究表明,糖尿病时视网膜内皮细胞TNF- α 表达上调,参与了内皮细胞凋亡的发生,也通过诱导炎症介质白细胞介素-1的表达,增加微血管通透性,诱发视网膜微血管渗漏,促进了DR的发生和发

展^[1,2]。姜黄素可抑制单核巨噬细胞TNF- α 的表达,抑制成纤维细胞TNF- α 的活性^[2]。本课题研究发现,高浓度葡萄糖组TNF- α 表达上调,RF/6A凋亡,细胞活力降低,而姜黄素-高糖组TNF- α 表达恢复至对照组水平,RF/6A细胞亦未见凋亡,细胞活力恢复,提示姜黄素通过抑制高浓度葡萄糖引起的TNF- α 表达上调,从而抑制RF/6A细胞凋亡,恢复细胞活力。

本研究对姜黄素抑制高糖损伤RF/6A的机制进行了初步探讨,但仍有待进一步深入研究。高浓度葡萄糖除了通过氧化应激、PKC途径及AGE堆积上调TNF- α 的表达之外^[5],还有那些因素参与了TNF- α 的表达上调?此外,TNF- α 参与DR发生发展的具体机制也有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF- α suppression. *FASEB J* 2002;6(3):438-440
- 2 Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol* 1995;49(11):1551-1556
- 3 左中夫,王轶晶,冯闯,等. Ang-1对高糖中培养的RF/6A的影响. *中国实用医药* 2009;4(8):1-2
- 4 唐小卿,聂亚雄,冯鉴强,等. 姜黄素对H₂O₂损伤PC12细胞的保护作用. *中国药理学通报* 2004;20(6):672-676
- 5 Nacci C, Tarquinio M, Montagnani M. Molecular and clinical aspects of endothelial dysfunction in diabetes. *Intern Emerg Med* 2009;4(2):107-116
- 6 Ghardi M, Moreels M, Chatelain B, et al. Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Mol Med* 2012;29(5):769-780
- 7 Chhunchha B, Fatma N, Bhargavan B, et al. Specificity protein, Sp1-mediated increased expression of Prdx6 as a curcumin-induced antioxidant defense in lens epithelial cells against oxidative stress. *Cell Death Dis* 2011;2:e234