

# 姜黄素对人翼状胬肉成纤维细胞增殖和凋亡及迁移的影响

曹莉<sup>1</sup>, 袁雪<sup>2</sup>, 张飞娥<sup>2</sup>, 钱金梅<sup>1</sup>, 张小玲<sup>3</sup>, 蔡岩<sup>3</sup>

引用:曹莉,袁雪,张飞娥,等.姜黄素对人翼状胬肉成纤维细胞增殖和凋亡及迁移的影响.国际眼科杂志 2023;23(5):731-737

基金项目:乌鲁木齐市卫生健康委科技计划项目(No.202141);新疆军区总医院北京路医疗区重点培育科研项目(No.2021jzlj1033)

作者单位:<sup>1</sup>(832002)中国新疆维吾尔自治区石河子市,石河子大学医学院;<sup>2</sup>(830054)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,新疆医科大学研究生学院;<sup>3</sup>(830099)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,新疆军区总医院全军眼科中心

作者简介:曹莉,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:眼表疾病、白内障。

通讯作者:蔡岩,毕业于第四军医大学,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼表疾病、白内障. wlmqren101@126.com

收稿日期:2022-10-15 修回日期:2023-04-18

## 摘要

**目的:**探讨姜黄素对体外培养的人翼状胬肉成纤维(HPF)细胞增殖和凋亡及迁移的影响。

**方法:**收集我院2021-11-24/12-16手术切除的翼状胬肉组织7例,进行原代成纤维细胞体外培养,并采用免疫荧光染色法进行细胞鉴定。采用含等量二甲亚砜的0、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理HPF细胞24h后,用CCK8法检测细胞增殖情况。根据CCK8检测结果将细胞分为对照组(不含姜黄素)、20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组,每组分别处理HPF细胞24h。采用流式细胞仪检测细胞凋亡,Transwell迁移实验检测细胞迁移,实时荧光定量PCR法和Western blot法检测Bax、Bcl-2、Cyclin D1及MMP2的mRNA与蛋白表达。

**结果:**与对照组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组和40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组均能抑制HPF细胞的增殖和迁移,并诱导其凋亡(均 $P<0.05$ )。与对照组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组能下调Cyclin D1及MMP2,上调Bax的mRNA表达,下调Bcl-2的蛋白表达(均 $P<0.05$ )。与对照组相比,40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组能下调Bcl-2、Cyclin D1及MMP2的mRNA与蛋白表达,上调Bax的mRNA与蛋白表达(均 $P<0.05$ )。与20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组相比,40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组能下调MMP2的mRNA表达,下调Bcl-2的蛋白表达,上调Bax的mRNA与蛋白表达(均 $P<0.05$ )。

**结论:**姜黄素可通过抑制Cyclin D1的表达抑制HPF细胞的增殖,通过下调Bcl-2并上调Bax的表达来诱导HPF细胞的凋亡,通过下调MMP2的表达来抑制HPF细胞的迁移。

**关键词:**姜黄素;翼状胬肉;成纤维细胞;增殖;凋亡;迁移

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.5.04

## Effects of curcumin on proliferation and apoptosis and migration of human pterygium fibroblasts

Li Cao<sup>1</sup>, Xue Yuan<sup>2</sup>, Fei-E Zhang<sup>2</sup>, Jin-Mei Qian<sup>1</sup>, Xiao-Ling Zhang<sup>3</sup>, Yan Cai<sup>3</sup>

**Foundation items:** Science and Technology Plan Project of Urumqi Health Commission (No.202141); Key Cultivation and Scientific Research Projects in Beijing Road Medical District of the General Hospital of Xinjiang Military Region (No.2021jzlj1033)

<sup>1</sup>Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, Xinjiang Urumqi Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Urumqi Autonomous Region, China; <sup>3</sup>Ophthalmology Center of the Army, General Hospital of Xinjiang Military Region, Urumqi 830099, Xinjiang Urumqi Autonomous Region, China

**Correspondence to:** Yan Cai. Ophthalmology Center of the Army, General Hospital of Xinjiang Military Region, Urumqi 830099, Xinjiang Urumqi Autonomous Region, China. wlmqren101@126.com

Received:2022-10-15 Accepted:2023-04-18

## Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of curcumin on the proliferation and apoptosis and migration of human pterygium fibroblasts (HPF) *in vitro*.

• **METHODS:** A total of 7 cases of pterygium tissue removed at our hospital from November 24, 2021 to December 16, 2021 were collected. Then, primary fibroblasts were cultured *in vitro* and identified by immunofluorescence staining. HPF were treated with 0, 10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$  curcumin containing equal amount of dimethyl sulfoxide for 24h, then the cell proliferation was detected by CCK8 assay. According to the results of CCK8, the cells were divided into control group, 20 $\mu\text{mol/L}$  curcumin group and 40 $\mu\text{mol/L}$  curcumin group, and the cells were treated with corresponding concentration of curcumin for 24h in each group. Flow cytometry was used to detect apoptosis, Transwell migration assay was used to detect cell migration, and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction and Western blot were used to detect the expression of mRNA and protein of B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Cyclin D1 and matrix metalloproteinase 2 (MMP2).

• **RESULTS:** Compared with the control group, both

20 $\mu$ mol/L curcumin group and 40 $\mu$ mol/L curcumin group can inhibit the proliferation and migration of HPF and induce its apoptosis (all  $P < 0.05$ ). Compared with the control group, 20 $\mu$ mol/L curcumin group can down-regulate the mRNA expression of Cyclin D1 and MMP2, up-regulate the mRNA expression of Bax, and down-regulate the protein expression of Bcl-2 (all  $P < 0.05$ ). Compared with the control group, 40 $\mu$ mol/L curcumin group can down-regulate the expression of mRNA and protein of Bcl-2, Cyclin D1 and MMP2, and up-regulate the expression of mRNA and protein of Bax (all  $P < 0.05$ ). Compared with 20 $\mu$ mol/L curcumin group, the 40 $\mu$ mol/L curcumin group can down-regulate the mRNA expression of MMP2, down-regulate the protein expression of Bcl-2, and up-regulate the mRNA and protein expression of Bax (all  $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Curcumin can inhibit the proliferation of HPF by inhibiting the expression of Cyclin D1, induce the apoptosis of HPF by down-regulating Bcl-2 and up-regulating the expression of Bax, and inhibit the migration of HPF by down-regulating the expression of MMP2.

• **KEYWORDS:** curcumin; pterygium; fibroblasts; proliferation; apoptosis; migration

**Citation:** Cao L, Yuan X, Zhang FE, et al. Effects of curcumin on proliferation and apoptosis and migration of human pterygium fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(5):731-737

## 0 引言

翼状胬肉是一种常见的眼表疾病,世界范围内发病率为1.3%~53%<sup>[1]</sup>。手术是治疗翼状胬肉的主要方式,但翼状胬肉术后复发率高。有研究表明翼状胬肉的发生发展与翼状胬肉细胞的增殖、凋亡和迁移有关<sup>[2]</sup>。临床上通过术中应用丝裂霉素等抗代谢药物降低翼状胬肉的术后复发率,但这些药物可能会引起巩膜溶解等一系列严重并发症<sup>[3]</sup>。因此,需要寻找更加安全有效的药物来治疗翼状胬肉和降低翼状胬肉术后复发率。姜黄素(curcumin, Cur)是从姜黄等植物的根茎中提取得到的疏水性多酚化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗纤维化等作用,而无明显毒副作用<sup>[4-7]</sup>。故本研究用姜黄素对人翼状胬肉成纤维(human pterygium fibroblasts, HPF)细胞进行干预,观察姜黄素对HPF细胞增殖、凋亡和迁移的影响,以及对Bcl-2相关X蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1, CCND1)、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)的mRNA与蛋白表达的影响,以期对翼状胬肉的治疗提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 **取材** 收集新疆军区总医院全军眼科中心在2021-11-24/12-16手术切除的翼状胬肉组织7例。纳入标准:(1)按照诊断标准确诊的位于鼻侧的原发性翼状胬肉;(2)头部平坦,体部菲薄,无明显充血的静止期翼状胬肉;(3)头部侵入角膜2~4mm。排除标准:(1)复发性翼状胬肉;(2)活动性眼部炎症;(3)假性翼状胬肉;(4)单眼多发

的翼状胬肉<sup>[8]</sup>。本研究遵守《赫尔辛基宣言》,通过新疆军区总医院伦理委员会审批(No.20210301007)。所有患者知情并签署知情同意书。

1.1.2 **主要试剂与仪器** 姜黄素(美国Sigma公司)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国Gibco公司)、DMEM/F12(1:1)液体培养基(美国HyClone公司)、二甲基亚砜(美国Sigma公司)、CCK8试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)、动物组织总RNA提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司)、兔抗人Vimentin抗体(ab92547,美国Abcam公司)、兔抗人Pan Cytokeratin抗体(ab234297,美国Abcam公司)、兔抗人Bax抗体(ab182733,美国Abcam公司)、兔抗人Bcl-2抗体(ab182858,美国Abcam公司)、兔抗人Cyclin D1抗体(ab134175,美国Abcam公司)、兔抗人MMP2抗体(ab92536,美国Abcam公司)、兔抗人 $\beta$ -Actin抗体(bs-0061R,北京博奥森生物技术有限公司)、Alexa Fluor 488标记驴抗兔IgG二抗(ab150073,美国Abcam公司)、HRP标记羊抗兔IgG二抗(bs-40295G-HRP,北京博奥森生物技术有限公司)、Transwell小室(美国Corning公司)、酶标仪(美国Thermo公司)、流式细胞仪(美国BD公司)、实时荧光定量PCR仪(美国Thermo公司)、电泳仪及电转仪(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 **HPF细胞的体外培养** 将手术切除的翼状胬肉头、体、颈部组织保存于含100U/mL青霉素、100mg/L链霉素的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中,在超净工作台上用PBS冲洗翼状胬肉组织3次,将翼状胬肉剪成约1mm $\times$ 1mm $\times$ 1mm大小的组织块,将剪碎的组织块平铺于细胞培养皿,等待30min,待组织块贴壁后向培养皿中加入含100U/mL青霉素、100mg/L链霉素及10%FBS的DMEM/F12完全培养基,将培养皿放置于37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中,每2~3d换液一次,待细胞密度生长到80%~90%时采用0.25%胰蛋白酶消化传代,取3~6代细胞用于后续实验。

1.2.2 **细胞鉴定** 将HPF细胞接种于激光共聚焦培养皿中,待细胞密度生长到80%后吸除培养基, PBS浸洗, 4%多聚甲醛室温固定细胞15min。PBS浸洗, 0.5%曲拉通X-100室温通透细胞30min。PBS浸洗, 5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭1h。弃封闭液, 分别加入5%BSA、用5%BSA稀释的兔抗人Vimentin抗体(1:250)、用5%BSA稀释的兔抗人Pan Cytokeratin抗体(1:250)、4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS浸洗, 加入用5%BSA稀释的Alexa Fluor 488标记驴抗兔IgG二抗(1:200), 室温避光孵育1h。PBS浸洗, 加入DAPI避光孵育10min。PBS浸洗, 使用荧光显微镜观察发射波长为488nm时蛋白的表达情况。

1.2.3 **CCK8法检测HPF细胞增殖情况及细胞分组** 使用二甲基亚砜将姜黄素粉剂配制成100mmol/L的浓储液储存于-20 $^{\circ}$ C, 使用时用完全培养基稀释成相应浓度, 并且各个浓度的姜黄素中均含有等量的二甲基亚砜。将HPF细胞以5 $\times$ 10<sup>3</sup>个/孔的密度接种于96孔板, 设置3个复孔。HPF细胞贴壁过夜后吸除培养基, 向培养孔中加入分别含0、10、20、40、80、160 $\mu$ mol/L姜黄素的完全培养基

100 $\mu$ L。姜黄素处理 HPF 细胞 24h 后吸除培养基并用 PBS 清洗细胞 1 次,向培养孔中加入 10 $\mu$ L CCK8 反应液与 90 $\mu$ L DMEM/F12 培养基,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 1.5h 后使用酶标仪测量各孔在 450nm 处的吸光度。计算细胞活力,并使用 GraphPad 7.0 软件筛选出细胞活力为 50% 的姜黄素浓度,即半数抑制浓度。以细胞活力为 50% 左右的姜黄素浓度为高浓度处理组(40 $\mu$ mol/L 姜黄素组),浓度递减 50% 为低浓度处理组(20 $\mu$ mol/L 姜黄素组),同时设对照组(不含姜黄素),每组用相应浓度姜黄素处理 HPF 细胞 24h。

**1.2.4 流式细胞仪检测 HPF 细胞凋亡情况** 各组 HPF 细胞经相应浓度姜黄素处理 24h 后收集细胞,用 500 $\mu$ L 1 $\times$  Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5 $\mu$ L PI,避光孵育 15min 后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

**1.2.5 Transwell 迁移实验检测 HPF 细胞迁移情况** 将 HPF 细胞以 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种于 Transwell 小室的上室,并在上室中加入相应浓度的姜黄素(用无血清培养基配制)200 $\mu$ L,在下室中加入含 20% FBS 的完全培养基 600 $\mu$ L。将 Transwell 小室放置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中,24h 后取出 Transwell 小室的上室。PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定细胞 20min, PBS 洗涤 3 次,0.1% 结晶紫染色 20min, PBS 洗涤 3 次,用棉签擦去上室中未迁移的细胞, PBS 洗涤 3 次,晾干后在显微镜下观察迁移细胞并随机选取 5 个视野计数。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测各组 HPF 细胞 Bax、Bcl-2、Cyclin D1 及 MMP2 mRNA 表达** 各组 HPF 细胞经相应浓度姜黄素处理 24h 后按照动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,按照 Takara 反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,按照 Takara 荧光定量试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 反应。使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目标基因的相对表达量。引物序列见表 1。

**1.2.7 Western blot 法检测各组 HPF 细胞 Bax、Bcl-2、Cyclin D1 及 MMP2 的蛋白表达** 各组 HPF 细胞经相应浓度姜黄素处理 24h 后用 PBS 浸洗 3 次。弃 PBS 后用 RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30min,4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 15min 后收集上清液。以 BCA 法对蛋白定量,上清液中加入适量体积的 PBS 和蛋白上样缓冲液使得最终蛋白浓度为 2 $\mu$ g/ $\mu$ L,100 $^{\circ}$ C 蛋白变性 10min 后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。行 12% SDS-PAGE 电泳,上样量为 20 $\mu$ L,80V 电泳 30min 后改为 100V 继续电泳 1h。采用湿转的方式(100mA,1h)将蛋白电转到 PVDF 膜上。TBST 洗膜 3 次,5% 脱脂牛奶封闭 2h。TBST 洗膜 3 次,分别加入用抗体稀释液稀释的兔抗人 Bax 抗体(1:1000)、兔抗人 Bcl-2 抗体(1:1000)、兔抗人 Cyclin D1 抗体(1:1000)、兔抗人 MMP2 抗体(1:1000)、兔抗人  $\beta$ -Actin 抗体(1:5000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,加入用抗体稀释液稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗(1:5000)室温孵育 2h。TBST 洗膜 3 次,滴加 ECL 后进行显色。使用 Image J 计算各个条带的灰度值。

统计学分析:采用 SPSS24.0 对数据进行统计学分析,计量资料符合正态分布者采用均数 $\pm$ 标准差表示。组间比较采用单因素方差分析;方差齐时,组间两两比较使用 LSD-*t* 法;方差不齐时,组间两两比较使用 Tamhan's T2 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HPF 细胞的培养与鉴定** 组织块培养第 3~5d 开始出现少量长梭形细胞从组织块边缘爬出(图 1A)。传代至第 3 代后,细胞为形态均一的长梭形(图 1B)。免疫荧光染色显示细胞波形蛋白表达阳性(图 1C),广谱细胞角蛋白表达阴性(图 1D)。结合标本组织来源、细胞形态学观察及免疫荧光染色结果,可证明本研究培养的细胞为 HPF 细胞。

**2.2 姜黄素对 HPF 细胞增殖的影响** 与对照组相比,浓度为 10、20、40、80、160 $\mu$ mol/L 的姜黄素均能抑制 HPF 细胞的增殖,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。并且 HPF 细胞活力随姜黄素浓度的增加逐渐降低。40 $\mu$ mol/L 姜黄素处理 24h 后 HPF 细胞活力为 54.18% $\pm$ 3.71%,该浓度接近姜黄素的半数抑制浓度(46.38 $\mu$ mol/L),故将高浓度组设为 40 $\mu$ mol/L 姜黄素组,低浓度组设为 20 $\mu$ mol/L 姜黄素组,同时设对照组(不含姜黄素)。

**2.3 三组 HPF 细胞凋亡情况比较** 对照组凋亡率为 9.18% $\pm$ 0.77%,20 $\mu$ mol/L 姜黄素组凋亡率为 11.37% $\pm$ 0.87%,40 $\mu$ mol/L 姜黄素组凋亡率为 31.73% $\pm$ 0.68%,三组间比较差异有统计学意义( $F = 771.77, P < 0.05$ ),20 $\mu$ mol/L 和 40 $\mu$ mol/L 姜黄素组与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),40 $\mu$ mol/L 姜黄素组与 20 $\mu$ mol/L 姜黄素组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。

**2.4 三组 HPF 细胞迁移情况比较** 对照组迁移细胞数为 88.80 $\pm$ 2.46 个,20 $\mu$ mol/L 姜黄素组迁移细胞数为 70.00 $\pm$ 2.91 个,40 $\mu$ mol/L 姜黄素组迁移细胞数为 43.67 $\pm$ 8.03 个,三组间比较差异有统计学意义( $F = 58.58, P < 0.05$ ),20 $\mu$ mol/L 和 40 $\mu$ mol/L 姜黄素组与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),40 $\mu$ mol/L 姜黄素组与 20 $\mu$ mol/L 姜黄素组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 4。

**2.5 三组 HPF 细胞 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP2 mRNA 表达比较** 三组间促凋亡基因 Bax、抗凋亡基因 Bcl-2、增殖调控相关基因 Cyclin D1、迁移相关基因 MMP2 的 mRNA 表达比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。20 $\mu$ mol/L 姜黄素组 Bcl-2 的 mRNA 表达与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与对照组比较,20 $\mu$ mol/L 姜黄素组能上调 Bax、下调 Cyclin D1、MMP2 mRNA 表达,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组相比,40 $\mu$ mol/L 姜黄素组能上调 Bax、下调 Bcl-2、Cyclin D1、MMP2 mRNA 表达,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。40 $\mu$ mol/L 与 20 $\mu$ mol/L 姜黄素组 Bcl-2 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),与 20 $\mu$ mol/L 姜黄素组相比 40 $\mu$ mol/L 姜黄素组能下调 MMP2 和上调 Bax mRNA 表达,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2,图 5。

**2.6 三组 HPF 细胞 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP2 蛋白表达比较** 三组间 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP2 的蛋白表达水平差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。20 $\mu$ mol/L 姜黄素组 Bax、Cyclin D1 及 MMP2 的蛋白表达与对照组比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),20 $\mu$ mol/L 姜黄素组与对照组比较能下调 Bcl-2 蛋白表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。40 $\mu$ mol/L 姜黄素组与对照组比较能下调 Bcl-2、Cyclin D1 及 MMP2 的蛋白表达,上调 Bax 的蛋白表达,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。40 $\mu$ mol/L 与 20 $\mu$ mol/L 姜黄素组 Cyclin D1 及 MMP2 的蛋白表达比较差异均无统计

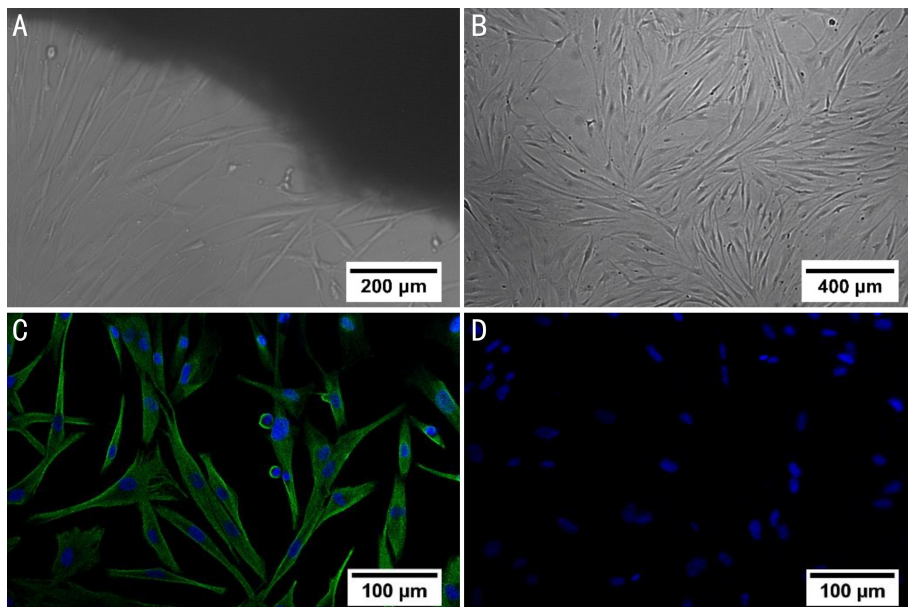


图1 HPF细胞的培养及鉴定 A:组织块法培养的HPF细胞;B:第3代HPF细胞;C:HPF细胞波形蛋白表达阳性;D:HPF细胞广谱细胞角蛋白表达阴性。

表1 引物序列

Gene	Direction	Primer	Product size(bp)
Bax	Forward	5'-CGAACTGGACAGTAAACATGGAG-3'	157
	Reverse	5'-CAGTTTGCTGGCAAAGTAGAAA-3'	
Bcl-2	Forward	5'-GACTTCGCCGAGATGTCCAG-3'	129
	Reverse	5'-GAACTCAAAGAAGGCCACAATC-3'	
Cyclin D1	Forward	5'-GTCTACTTCAAATGTGTGCAG-3'	228
	Reverse	5'-GGGATGGTCTCCTTCATCTTAG-3'	
MMP2	Forward	5'-ATTGTATTTGATGGCATCGCTC-3'	202
	Reverse	5'-ATTCAATCCCTGCAAAGAACAC-3'	
GAPDH	Forward	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	87
	Reverse	5'-GGCATGGACTGTGCTCATGAG-3'	

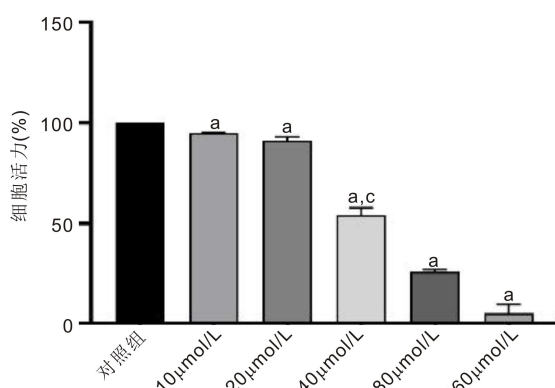


图2 姜黄素对HPF细胞增殖的影响(n=3) <sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 20μmol/L姜黄素组。

学意义(P>0.05)。与20μmol/L姜黄素组相比,40μmol/L姜黄素组能下调Bcl-2的蛋白表达水平,上调Bax的蛋白表达水平,差异均有统计学意义(P<0.05),见表3,图6。

### 3 讨论

翼状胬肉是一种以局部球结膜纤维血管组织增生并侵犯角膜为特点的常见眼表疾病,可引起视力下降、进行性散光、眼表不适等症状<sup>[9]</sup>。紫外线照射、抑癌基因失活、

上皮-间质细胞转化等是目前公认的翼状胬肉发病的原因,但各因素的具体作用机制有待进一步研究<sup>[10]</sup>。尽管学者们提出了翼状胬肉切除+自体结膜瓣移植术、翼状胬肉切除+结膜瓣转位术、翼状胬肉切除+自体角膜缘干细胞移植术、翼状胬肉切除+羊膜移植术等新型手术方式,翼状胬肉术后复发率仍高<sup>[11]</sup>。传统中药姜黄最早记载于《新修本草》,有破血行气,通经止痛的功效<sup>[12]</sup>。姜黄素作为中药姜黄发挥药理作用的主要活性成分,因其良好的抗肿瘤、抗纤维化等作用而无明显毒副作用受到广泛关注<sup>[6-7]</sup>。现有的研究表明姜黄素能诱导前列腺癌成纤维细胞的G<sub>2</sub>/M期阻滞和细胞凋亡,能抑制心脏成纤维细胞的增殖、迁移和胶原生成,能降低TGF-β1诱导的眼眶成纤维细胞分化并减弱眼眶成纤维细胞的促血管生成活性<sup>[13-15]</sup>。本研究发现姜黄素能抑制HPF细胞的增殖和迁移,并诱导其凋亡,提示姜黄素可能通过抑制HPF细胞增殖与迁移,及诱导HPF细胞凋亡来阻碍翼状胬肉的发展。

姜黄素能通过抑制细胞增殖来抑制肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的发生发展<sup>[16]</sup>。翼状胬肉与具有恶性增殖能力的肿瘤有着某些相同的特性。与边芳等<sup>[17]</sup>的研究结果相似,本研究也发现姜黄素能抑制HPF细胞的增殖。Cyclin D1可以通过正向调控细胞周期进程来促进癌细胞

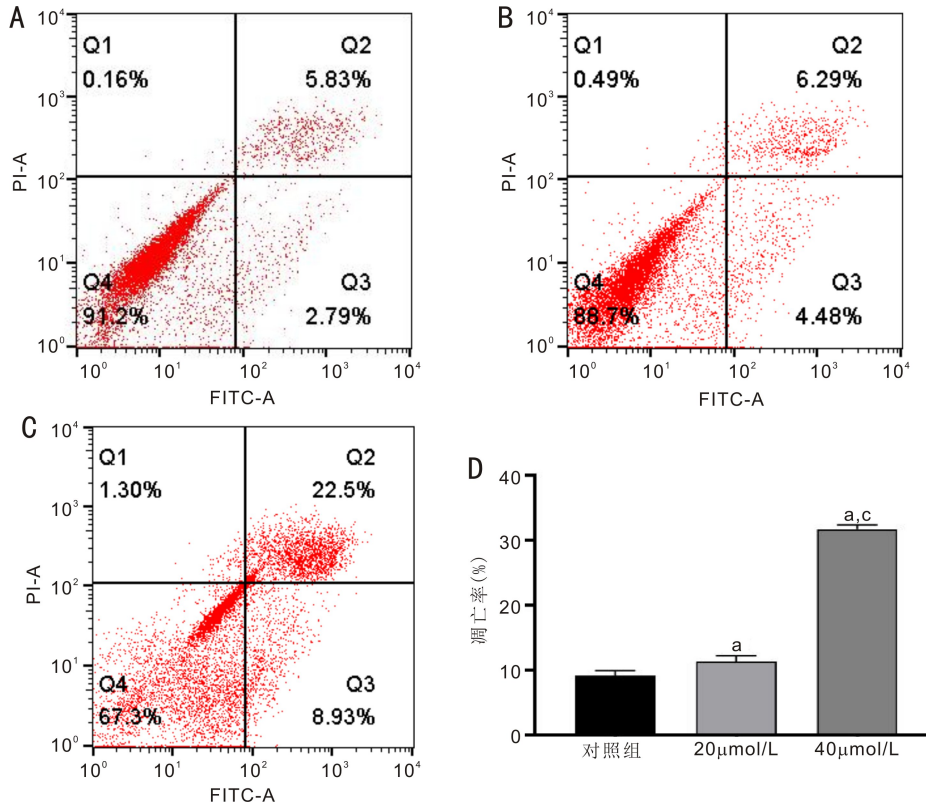


图3 三组 HPF 细胞凋亡情况比较 ( $n=3$ ) A: 对照组; B: 20μmol/L 姜黄素组; C: 40μmol/L 姜黄素组; D: 柱状图; <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 20μmol/L 姜黄素组。

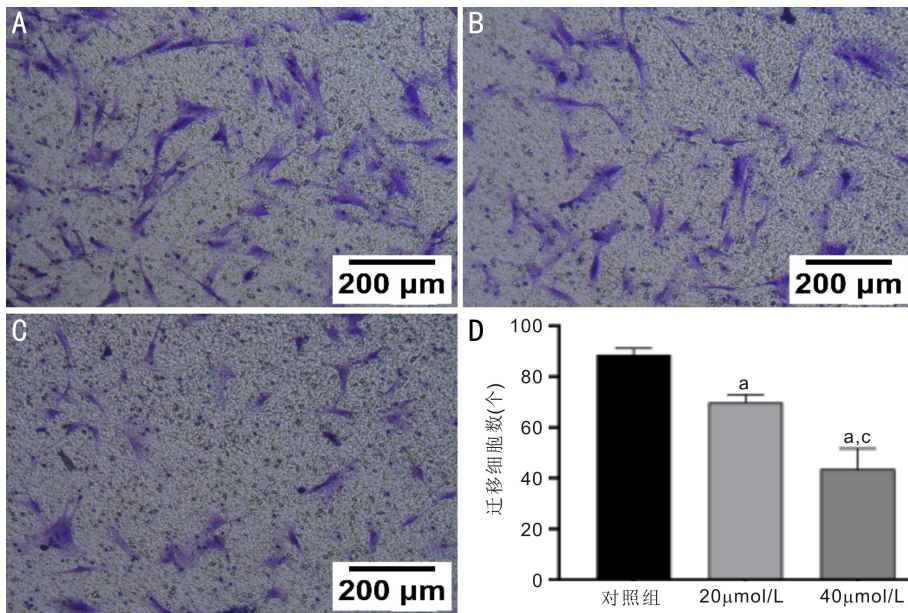


图4 三组 HPF 细胞迁移情况比较 ( $n=3$ ) A: 对照组; B: 20μmol/L 姜黄素组; C: 40μmol/L 姜黄素组; D: 柱状图; <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 20μmol/L 姜黄素组。

表2 三组 HPF 细胞 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP2 mRNA 表达比较

分组	Bax	Bcl-2	Cyclin D1	MMP2
对照组	1.00±0.08	1.01±0.19	1.05±0.35	1.00±0.09
20μmol/L 姜黄素组	2.17±0.39 <sup>a</sup>	0.81±0.13	0.60±0.10 <sup>a</sup>	0.85±0.08 <sup>a</sup>
40μmol/L 姜黄素组	3.88±0.82 <sup>a,c</sup>	0.62±0.07 <sup>a</sup>	0.37±0.09 <sup>a</sup>	0.59±0.02 <sup>a,c</sup>
<i>F</i>	22.56	5.78	7.52	27.05
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: 对照组: 不含姜黄素; <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 20μmol/L 姜黄素组。

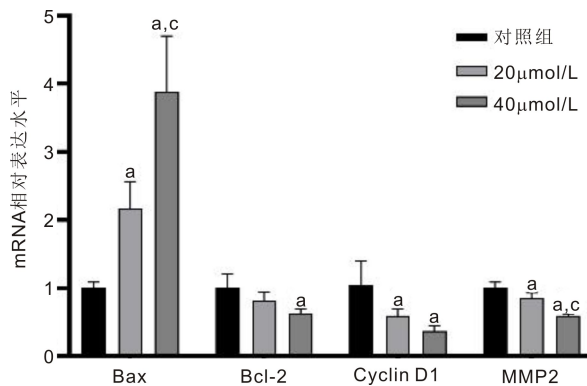


图5 三组 HPF 细胞 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP2 mRNA 表达比较 (n=3) <sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 20 μmol/L 姜黄素组。

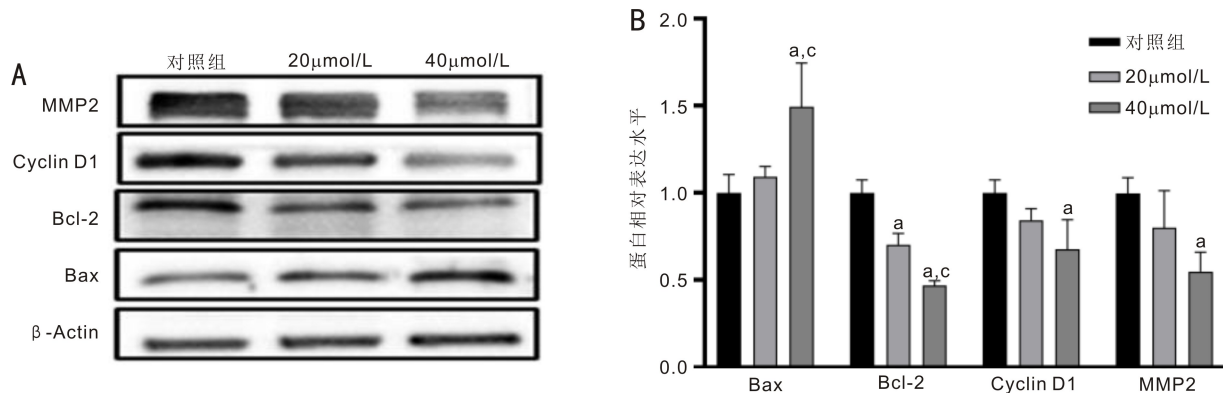


图6 三组 HPF 细胞 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP2 蛋白表达比较 (n=3) A: Western blot 结果; B: 柱状图; <sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 20 μmol/L 姜黄素组。

表3 三组 HPF 细胞 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP2 蛋白表达比较

分组	Bax	Bcl-2	Cyclin D1	MMP2
对照组	1.00±0.11	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.09
20 μmol/L 姜黄素组	1.09±0.06	0.70±0.07 <sup>a</sup>	0.84±0.07	0.80±0.22
40 μmol/L 姜黄素组	1.49±0.25 <sup>a,c</sup>	0.47±0.03 <sup>a,c</sup>	0.68±0.17 <sup>a</sup>	0.55±0.11 <sup>a</sup>
F	7.89	58.78	5.81	6.77
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:对照组:不含姜黄素; <sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 20 μmol/L 姜黄素组。

增殖,而 Sare 等<sup>[18]</sup>研究表明姜黄素能通过下调 Cyclin D1 的表达来抑制肝癌细胞的增殖。与此类似,本研究证实姜黄素能抑制 HPF 细胞的增殖,并能下调 Cyclin D1 的表达水平。

细胞凋亡是由基因控制的细胞程序化死亡,抗凋亡基因 Bcl-2 的下调和促凋亡基因 Bax 的上调可以诱导细胞的凋亡。姜黄素能上调人永生角质形成细胞 Bax/Bcl-2 的比率,并能通过 caspase 依赖途径和非 caspase 依赖途径诱导人永生角质形成细胞的凋亡<sup>[19]</sup>。本研究发现姜黄素能诱导 HPF 细胞的凋亡,还能下调 Bcl-2 的表达水平及上调 Bax 的表达水平。

与肿瘤有向邻近组织侵犯的倾向相似,翼状胬肉有自结膜逐渐向角膜中央侵犯的倾向。MMP2 可通过降解 IV 型胶原蛋白使基底膜形成缺损进而促进细胞的迁移<sup>[20]</sup>。翼状胬肉组织和翼状胬肉成纤维细胞中 MMP2 和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9) 的表达高于正常结膜组<sup>[21]</sup>。紫外线照射可以增强 HPF 细胞的移行能力,而姜黄素可以抑制紫外线照射后翼状胬肉上皮细胞中 MMP2 和 MMP9 的表达<sup>[22-23]</sup>。本研究结果表明姜

黄素能抑制 HPF 细胞的迁移,还能下调其 MMP2 的表达水平。

综上所述,本研究发现姜黄素可通过抑制 Cyclin D1 的表达来抑制 HPF 细胞的增殖,通过下调 Bcl-2 并上调 Bax 的表达来诱导 HPF 细胞的凋亡,通过下调 MMP2 的表达来抑制 HPF 细胞的迁移,这为姜黄素成为一种临床治疗翼状胬肉的药物提供了一定理论依据。

#### 参考文献

- Rezvan F, Khabazkhoob M, Hooshmand E, et al. Prevalence and risk factors of pterygium: a systematic review and meta-analysis. *Surv Ophthalmol* 2018;63(5):719-735
- 贺梦璇, 石海红. 翼状胬肉相关生物标志物的研究. *国际眼科纵览* 2021;45(3):251-256
- Lindquist TP, Lee WB. Mitomycin C-associated scleral stromalysis after pterygium surgery. *Cornea* 2015;34(4):398-401
- Liu C, Yan XJ, Zhang YJ, et al. Oral administration of turmeric-derived exosome-like nanovesicles with anti-inflammatory and pro-resolving bioactions for murine colitis therapy. *J Nanobiotechnology* 2022;20(1):206
- Miao L, Huang F, Sun YY, et al. Curcumin plays a local anti-inflammatory and antioxidant role via the HMGB1/TLR4/NF-KB

pathway in rat masseter muscle under psychological stress. *J Oral Rehabil* 2022;49(2):249-257

6 Ji P, Wang XL, Yin JB, et al. Selective delivery of curcumin to breast cancer cells by self-targeting apoferritinnanocages with pH-responsive and low toxicity. *Drug Deliv* 2022;29(1):986-996

7 Islam R, Dash D, Singh R. Intranasal curcumin and sodium butyrate modulates airway inflammation and fibrosis via HDAC inhibition in allergic asthma. *Cytokine* 2022;149:155720

8 刘仓仓, 曹小彪, 黄建波, 等. 基质细胞衍生因子-1 及其受体 CXCR4 在翼状胬肉中的表达及意义. *国际眼科杂志* 2020;20(3):517-521

9 Rokohl AC, Heindl LM, Cursiefen C. Pterygium: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Ophthalmologe* 2021;118(7):749-763

10 陈杨, 魏超群, 弥禹, 等. 翼状胬肉相关致病因子的研究进展. *国际眼科杂志* 2022;22(7):1133-1136

11 任红燕, 李霞, 蔡岩. 翼状胬肉个体化临床治疗现状及展望. *眼科学报* 2020;35(4):255-261

12 苏敬. 新修本草. 合肥:安徽科学技术出版社 1981:244

13 Zeng Y, Du Q, Zhang Z, et al. Curcumin promotes cancer-associated fibroblasts apoptosis via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress. *Arch Biochem Biophys* 2020;694:108613

14 Chung CC, Kao YH, Liou JP, et al. Curcumin suppress cardiac fibroblasts activities by regulating proliferation, migration, and the extracellular matrix. *Acta Cardiol Sin* 2014;30(5):474-482

15 Yu WK, Wei LH, Wang YC, et al. Curcumin suppresses TGF- $\beta$ 1-induced myofibroblast differentiation and attenuates angiogenic activity of

orbital fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2021;22(13):6829

16 Doello K, Ortiz R, Alvarez PJ, et al. Latest *in vitro* and *in vivo* assay, clinical trials and patents in cancer treatment using curcumin: a literature review. *Nutr Cancer* 2018;70(4):569-578

17 边芳, 张明昌. 姜黄素抑制翼状胬肉成纤维细胞增生的研究. *临床眼科杂志* 2005;13(3):198-201, 289

18 Sare H, Jamshidkhan C, Mohadeseh S, et al. The effect of nanomicelle curcumin, sorafenib, and combination of the two on the cyclin D1 gene expression of the hepatocellular carcinoma cell line (HUH<sub>7</sub>). *Iran J Basic Med Sci* 2019;22(10):1198-1202

19 Song W, Ren YJ, Liu LL, et al. Curcumin induced the cell death of immortalized human keratinocytes (HaCaT) through caspase-independent and caspase-dependent pathways. *Food Funct* 2021;12(18):8669-8680

20 柳森森, 毛玉宁, 张彩勤, 等. MMP2 在肿瘤侵袭和转移中的调控机制研究. *中国比较医学杂志* 2022;32(3):123-128

21 Yang SF, Lin CY, Yang PY, et al. Increased expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in pterygia and pterygium fibroblasts with disease progression and activation of protein kinase C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(10):4588-4596

22 彭娟, 毛雁, 姚达强, 等. 单侧与双侧翼状胬肉成纤维细胞生物学行为的差异及紫外线对其的影响. *中华实验眼科杂志* 2020;38(5):388-394

23 陈月芹, 吴艳, 黄振平, 等. 姜黄素抑制转录因子- $\kappa$ B 信号通路影响基质金属蛋白酶在胬肉上皮细胞的表达. *医学研究生学报* 2018;31(10):1038-1042