

姜黄素对高浓度葡萄糖培养的 RF/6A 细胞活力的影响

张 强,左中夫,刘学政

基金项目:国家自然科学基金(No. 31140072);辽宁省自然科学基金资助项目(No. 20102140)

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:张强,在读硕士研究生,研究方向:糖尿病视网膜病变发病机制及治疗。

通讯作者:刘学政,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:糖尿病视网膜病变发病机制及治疗。liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期:2012-05-11 修回日期:2012-08-06

Effects of curcumin on viability of high-glucose-concentration-cultured RF/6A

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

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 31140072); National Natural Science Foundation of Liaoning, China (No. 20102140)

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:2012-05-11 Accepted:2012-08-06

Abstract

• **AIM:** To explore effects of curcumin on viability of high glucose concentration (HGC) cultured rhesus choroid-retinal endothelial cell (RF/6A).

• **METHODS:** RF/6A was assigned into 4 groups ($n=6$ /group). Control group (CONT group), high glucose concentration group (HGC group): 30mmol/L glucose was administered, curcumin group (CUR group): 30 μ mol/L curcumin was administered, curcumin-glucose group (C-G group): 30mmol/L glucose and 30 μ mol/L curcumin were administered. Cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) at 1, 3 and 5 day after cultivation. Moreover, malonaldehyde (MDA), activity of superoxide dismutase (SOD) and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and anti-oncogene protein 27 (p27) were detected at day 5.

• **RESULTS:** Compared with CONT group, HGC group showed decrease of cell viability, increase of MDA, decrease of activity of SOD, down-regulation of PCNA and up-regulation of p27 ($P<0.01$). While, no difference could be detected in CUR group or C-G group compared with CONT group ($P>0.05$).

• **CONCLUSION:** Curcumin inhabits HGC-induced oxidative stress, reverses expression of PCNA and p27, and, therefore, contribute to curcumin maintaining RF/6A

viability.

• **KEYWORDS:** high glucose concentration; curcumin; RF/6A; oxidative stress; cell viability

Citation: Zhang Q, Zuo ZF, Liu XZ. Effects of curcumin on viability of high-glucose-concentration-cultured RF/6A. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(9):1636-1638

摘要

目的:探讨姜黄素对高浓度葡萄糖培养的猴脉络膜-视网膜内皮细胞(rhesus choroidoretinal endothelial cell, RF/6A)活力的影响及其机制。

方法:RF/6A分4组培养($n=6$):对照组;高浓度葡萄糖组(培养基添加30mmol/L葡萄糖);姜黄素组(培养基添加30 μ mol/L姜黄素);姜黄素-葡萄糖组(培养基添加30mmol/L葡萄糖及30 μ mol/L姜黄素)。以噻唑蓝比色法(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测培养1,3,5d后各组细胞活力的变化;试剂盒检测分组5d后各组细胞丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性;Western-blot检测分组5d后各组增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及抑癌基因p27蛋白(protein 27, p27)表达。

结果:与对照组相比,高浓度葡萄糖组RF/6A活性明显降低,MDA含量增加,SOD活力降低,PCNA表达下调,p27表达上调($P<0.01$);而姜黄素组及姜黄素-葡萄糖组RF/6A活力、MDA含量、SOD活力、PCNA与p27的表达均无明显变化($P>0.05$)。

结论:姜黄素维持高浓度葡萄糖培养的RF/6A活力,可能与姜黄素抑制高浓度葡萄糖诱发的氧化应激,恢复RF/6A的PCNA及p27蛋白表达有关。

关键词:高浓度葡萄糖;姜黄素;猴脉络膜-视网膜内皮细胞;氧化应激;细胞活力

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.09.08

引用:张强,左中夫,刘学政.姜黄素对高浓度葡萄糖培养的RF/6A细胞活力的影响.国际眼科杂志2012;12(9):1636-1638

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)时血糖增高可诱发视网膜内皮细胞氧化应激,进而发生糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR),导致患者视力下降甚至失明^[1]。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及抑癌基因p27蛋白(protein 27)是与细胞增殖分化关系密切的两种蛋白,氧化应激可下调DM大鼠睾丸组织PCNA表达^[2],上调p27蛋白的表达^[3]。研究表明,姜黄素可抑制SH-SY5Y细胞的氧化应激^[4],抑制脑神经元氧化应激反应^[5]。因此,本研究以猴脉络膜-视网膜内皮细胞(rhesus choroidoretinal endothelial cell, RF/6A)为研究

对象,探讨姜黄素对高浓度葡萄糖培养的 RF/6A 氧化应激的影响,对 PCNA 和 P27 蛋白表达的调节,以及 RF/6A 细胞活力的变化。

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(Gibco 生物公司),D-葡萄糖(华美生物工程公司),姜黄素(南京泽朗医药科技有限公司),甲基噻唑基四唑、SOD 活性检测试剂盒、MDA 含量检测试剂盒(均购自碧云天生物公司),PCNA 及 P27 蛋白抗体(均购自 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 各组细胞以 DMEM 高糖培养基+10% FBS 为基础培养基,添加 D-葡萄糖和/或姜黄素分组培养。实验分组如下($n=6$):对照组(基础培养基);高浓度葡萄糖组(基础培养基+30mmol/L 葡萄糖);姜黄素组(基础培养基+30 μ mol/L 姜黄素);姜黄素-葡萄糖组(基础培养基+30mmol/L 葡萄糖+30 μ mol/L 姜黄素)。

1.2.2 细胞活力检测及生长状态观察 调整 RF/6A 浓度为 $1 \times 10^4/200\mu\text{L}$,取 $200\mu\text{L}$ 细胞混悬液铺于 96 孔板,24h 后分组培养,分组后 1,3,5 d 以 MTT 法检测细胞活力。以酶标仪 490nm 波长检测各孔光吸收值(A 值),计算细胞活力:细胞活力=实验组 A 值/正常组 A 值 $\times 100\%$ 。镜下观察分组 5d 后细胞生长状态。

1.2.3 氧化应激检测 分组培养 5d 后,收集细胞,预冷 PBS 洗涤后,以超声匀浆,1 600g 离心 10min,取上清备用。按照试剂盒说明书进行操作,采用黄嘌呤氧化酶法检测各组细胞 SOD 含量,以酶标仪于 560nm 测定吸光度,测算 SOD 活力。采用硫代巴比妥酸法检测各组细胞 MDA 含量,以酶标仪于 532nm 测定吸光度,根据标准曲线测算 MDA 含量。

1.2.4 Western-blot 检测 PCNA 及 p27 蛋白表达 分组 5d 后,以细胞粉碎仪粉碎细胞,12000r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15min,收集上清,测定并调节样品蛋白浓度,以 150V 电压行 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,分别以 PCNA 和 p27 蛋白及 β -actin 一抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2h,再以辣根过氧化物酶标记的相应二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h,以 ECL 发光试剂盒显影。以 β -actin 为内参,以目的条带与 β -actin 灰度值之比判断目的蛋白表达变化。

统计学分析:数据以均数 \pm 标准差表示,利用 SPSS for Windows 17.0 行重复测量方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对高浓度葡萄糖培养的 RF/6A 活力的影响

1d 时,各组 RF/6A 活力无明显差异($P > 0.05$),3d 及 5d 高糖组 RF/6A 活力均明显降低($P < 0.01$),5d 较 3d 更低($P < 0.01$)。姜黄素组,姜黄素-葡萄糖组分组培养 3d 及 5d 较对照组 RF/6A 活力均无明显差异($P > 0.05$,表 1)。

2.2 姜黄素对高浓度葡萄糖培养的 RF/6A 生长状态的影响 对照组 RF/6A 呈铺路石样外观,细胞界限明显,生长致密。与对照组相比,高浓度葡萄糖组 RF/6A 胞体萎缩,变圆,形态不规则,细胞间隙增大,数量减少。与对照组相比姜黄素组及姜黄素-葡萄糖组无明显变化(图 1)。

2.3 姜黄素对高浓度葡萄糖诱导的氧化应激的影响 与对照组相比,葡萄糖组 SOD 活力降低,MDA 含量升高($P < 0.01$),而姜黄素组及姜黄素-葡萄糖组均无明显改变($P > 0.05$,表 2)。

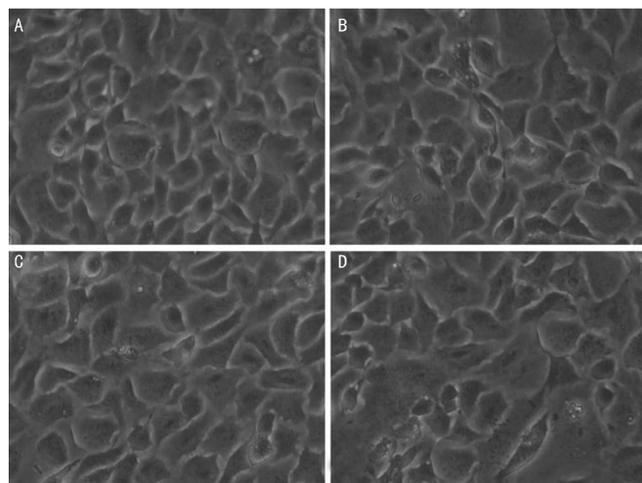


图 1 培养 5d 后 RF/6A 细胞形态学观察($\times 400$) A:对照组; B:姜黄素组;C:姜黄素-葡萄糖组;D:高浓度葡萄糖组。

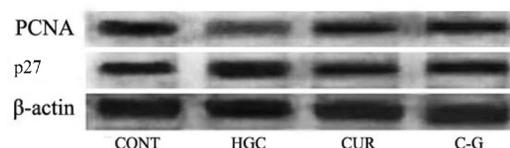


图 2 PCNA 及 p27 蛋白 Western-blot 电泳条带。

表 1 姜黄素对高浓度葡萄糖培养的 RF/6A 活力的影响

组别	$(\bar{x} \pm s, n=6)$		
	1d	3d	5d
对照组	100.00 \pm 6.21	100.00 \pm 5.37	100.00 \pm 5.24
姜黄素组	98.81 \pm 6.35	97.48 \pm 9.24	95.25 \pm 8.61
姜黄素-葡萄糖组	95.54 \pm 5.21	95.12 \pm 4.82	96.16 \pm 6.13
高浓度葡萄糖组	97.63 \pm 8.36	78.46 \pm 5.64 ^b	65.15 \pm 7.21 ^{b,d}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 3d。

表 2 姜黄素对高浓度葡萄糖诱导的氧化应激的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)
对照组	1.79 \pm 0.12	28.63 \pm 4.12
葡萄糖组	3.29 \pm 0.53 ^b	14.89 \pm 3.47 ^b
姜黄素组	2.13 \pm 0.34	29.58 \pm 5.28
姜黄素-葡萄糖组	1.93 \pm 0.21	26.73 \pm 5.63

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表 3 姜黄素对高浓度葡萄糖刺激的 RF/6A 细胞 PCNA 与 p27 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	p27 蛋白/ β -actin	PCNA/ β -actin
对照组	28.1 \pm 2.5	39.2 \pm 3.2
葡萄糖组	40.0 \pm 6.1 ^b	20.3 \pm 4.5 ^b
姜黄素组	32.3 \pm 5.2	37.6 \pm 3.1
姜黄素-葡萄糖组	30.6 \pm 4.3	33.2 \pm 5.1

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

2.4 姜黄素对高浓度葡萄糖刺激的 RF/6A 细胞 PCNA 与 p27 蛋白表达的影响 与对照组相比,高浓度葡萄糖组 PCNA 表达下调,p27 表达上调($P < 0.01$),姜黄素组及姜黄素-葡萄糖组 PCNA 及 p27 表达均无明显变化($P > 0.05$,图 2,表 3)。

3 讨论

高血糖可损伤视网膜毛细血管内皮细胞,导致血-视网膜屏障破坏,是DR视力下降的重要原因之一^[6]。本研究显示,高浓度葡萄糖抑制了RF/6A细胞活力,贴壁细胞数量减少,而姜黄素或姜黄素+高浓度葡萄糖对RF/6A细胞活力,贴壁细胞数量及形态无显著影响。结果提示,高浓度葡萄糖损伤了RF/6A,姜黄素可抑制高浓度葡萄糖对RF/6A的损伤,对生理环境中的RF/6A无显著影响。

氧化应激是DR内皮细胞损伤的重要机制之一^[1]。姜黄素可抑制多种因素所致的SH-SY5Y细胞氧化应激^[4],抑制脑缺血引发的大脑神经元氧化应激^[5]。本研究发现,高浓度葡萄糖培养导致RF/6A中MDA含量增高,SOD活性降低,出现了明显的氧化应激表现,而姜黄素或姜黄素+高浓度葡萄糖中培养的RF/6A细胞中MDA含量及SOD活性无明显改变。结果提示,姜黄素抑制了高浓度葡萄糖诱发的RF/6A细胞氧化应激反应,但不影响生理条件培养的RF/6A细胞氧化应激。研究表明,氧化应激可下调PCNA表达,上调p27蛋白表达^[2,3]。PCNA及p27蛋白与细胞分裂增殖关系密切,PCNA表达上调可促进细胞增殖分裂,而p27蛋白表达上调则抑制细胞增殖分裂^[2,3]。细胞增殖分裂或凋亡相关基因的异常表达,是氧化应激影响细胞分裂增殖、调节细胞活力的重要机制。本研究发现,高浓度葡萄糖导致RF/6A细胞氧化应激的同时,PCNA表达明显下调,而p27蛋白表达上调;姜黄素抑制高浓度葡萄糖诱发RF/6A细胞氧化应激的同时,上调PCNA的表达,下调p27蛋白的表达,使二者表达恢复到对照组水平。此外,姜黄素对生理条件培养的RF/6A细胞氧化应激无显著影响,对PCNA及p27蛋白表达也无影响。因此,高浓度葡萄糖可能通过诱发RF/6A细胞氧化

应激,下调PCNA表达并上调p27蛋白表达,从而抑制细胞增殖分裂,降低RF/6A细胞活力。姜黄素可能通过抑制高浓度葡萄糖诱导的氧化应激,上调PCNA表达并下调p27蛋白表达,从而恢复RF/6A细胞活力。

尽管本研究与其他抗氧化应激研究结果一致^[2],但与姜黄素促进肿瘤细胞凋亡相反^[7]。因此,姜黄素在抗氧化应激抑制细胞凋亡及促进肿瘤细胞凋亡中发挥不同的作用,其机制仍有待进一步探索。

参考文献

- 1 Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxid Redox Signal* 2005;7(11-12):1581-1587
- 2 Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chem Toxicol* 2012;50(3-4):719-725
- 3 Quintos L, Lee IA, Kim HJ, et al. Significance of p27 as potential biomarker for intracellular oxidative status. *Nutr Res Pract* 2010;4(5):351-355
- 4 Yin W, Zhang X, Shi X, et al. Curcumin protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by up-regulating HO-1 via Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt/Nrf-2 and down-regulating HO-2. *Mol Neurodegener* 2012;7(Suppl 1):S14
- 5 Liu L, Zhang P, Li Y, et al. Curcumin protects brain from oxidative stress through inducing expression of UCP2 in chronic cerebral hypoperfusion aging-rats. *Mol Neurodegener* 2012;7(Suppl 1):S10
- 6 Chibber R, Ben-mahmud BM, Chibber S, et al. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2007;3(1):3-14
- 7 Giri B, Gomes A, Sengupta R, et al. Curcumin synergizes the growth inhibitory properties of Indian toad (*Bufo melanostictus* Schneider) skin-derived factor (BM-ANF1) in HCT-116 colon cancer cells. *Anticancer Res* 2009;29(1):395-401