

眼科疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001532

姜黄素抑制脂多糖诱导视网膜色素上皮细胞炎症反应

李彦, 李化, 周善璧

(重庆医科大学附属大学城医院眼科、重庆市眼科学重点实验室, 重庆 401331)

【摘要】目的:探讨姜黄素(curcumin)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cells, RPE)炎症反应的抑制作用。**方法:**体外培养人 RPE 细胞株 ARPE-19, CCK-8 测定不同浓度姜黄素(5、10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$)或不同浓度姜黄素和脂多糖(5 $\mu\text{g/mL}$)刺激后细胞的活性, 以此确定姜黄素的最适作用浓度。实时荧光定量(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)检测白细胞介素(interleukin, IL)-8 和 IL-6 的 mRNA 表达变化, 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定 IL-6 和 IL-8 的蛋白表达水平。Western blot 检测 IkB- α 、p-IkB- α 蛋白表达变化。**结果:**CCK-8: 不同浓度姜黄素对 ARPE-19 细胞活性无影响($P_{5\mu\text{mol/L}}=0.998$, $P_{10\mu\text{mol/L}}=1.000$, $P_{20\mu\text{mol/L}}=0.124$, $P_{30\mu\text{mol/L}}=0.092$, $P_{40\mu\text{mol/L}}=0.078$), 预先作用不同浓度的姜黄素对细胞活性有保护作用, 20 $\mu\text{mol/L}$ 保护作用明显($P=0.041$)。PCR: 姜黄素+LPS 组 IL-8 的 mRNA 相对表达量(4.965 ± 3.863)比 LPS 组(106.331 ± 37.314)明显降低($P=0.000$), 姜黄素+LPS 组 IL-6 的 mRNA 相对表达量(0.992 ± 0.374)比 LPS 组(2.175 ± 0.560)明显降低($P=0.005$)。ELISA: 姜黄素+LPS 组 IL-8 的蛋白表达量[(191.600 ± 18.773) pg/mL]比 LPS 组[(589.025 ± 38.880) pg/mL]明显降低($P=0.000$), 姜黄素+LPS 组 IL-6 的蛋白表达量[(113.906 ± 27.947) pg/mL]比 LPS 组[(243.380 ± 38.001) pg/mL]明显降低($P=0.000$)。Western blot: 与 LPS 组相比较, 姜黄素+LPS 组的 p-IkB- α 蛋白的表达水平降低($P=0.001$)。**结论:**姜黄素通过抑制 NF- κB 活性抑制了脂多糖诱导视网膜色素上皮细胞的炎症反应, 保护视网膜色素上皮细胞。**【关键词】**姜黄素; 视网膜色素上皮细胞; 炎症反应

【中图分类号】R774.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-11-17

Inhibitory effect of curcumin on inflammatory responses induced by LPS
in human retinal pigment epithelial cells

Li Yan, Li Hua, Zhou Shanbi

(Department of Ophthalmology, University-Town Hospital of Chongqing Medical University;
Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology)

【Abstract】Objective: To explore the inhibitory effect of curcumin on inflammatory responses induced by lipopolysaccharide (LPS) in retinal pigment epithelial (RPE) cells. **Methods:** ARPE-19 cells were cultured *in vitro*. Before being stimulated with or without LPS (5 $\mu\text{g/mL}$), ARPE-19 cells were pre-incubated with different concentrations of curcumin (5, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol/L}$). The optimum concentration of curcumin was detected by CCK-8 assay. The mRNA level of IL-6 and IL-8 was measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and their protein expression was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Protein expression levels of IkB- α and p-IkB- α were examined by Western blot. **Results:** The CCK-8 results showed that the activities of ARPE-19 cells were not affected by different concentrations of curcumin ($P_{5\mu\text{mol/L}}=0.998$, $P_{10\mu\text{mol/L}}=1.000$, $P_{20\mu\text{mol/L}}=0.124$, $P_{30\mu\text{mol/L}}=0.092$, $P_{40\mu\text{mol/L}}=0.078$). Curcumin was indicated to be able to protect ARPE-19 cells since pre-treatment with different concentrations of curcumin following by LPS administration. This protection resulted with a maximal protective effect at 20 $\mu\text{mol/L}$ ($P=0.041$). The RT-PCR results indicated that the relative mRNA level of IL-8 in curcumin+LPS group (4.965 ± 3.863) was significantly lower than that in LPS group (106.331 ± 37.314) ($P=0.000$) and the relative mRNA level of IL-6 in curcumin+LPS group (0.992 ± 0.374) was significantly lower than that in LPS group (2.175 ± 0.560) ($P=0.005$). The ELISA results showed that protein expression of IL-8 in curcumin+LPS group [(191.600 ± 18.773) pg/mL] was significantly lower than that in LPS group [(589.025 ± 38.880) pg/mL] ($P=0.000$) and protein expression of IL-6 in curcumin+LPS group [(113.906 ± 27.947) pg/mL] was significantly lower than that in LPS group [(243.380 ± 38.001) pg/mL] ($P=0.000$). Meanwhile, the Western blot results indicated that pre-treatment with curcumin inhibit-

作者介绍: 李彦, Email: 378162189@qq.com,

研究方向: 眼底病学。

通信作者: 周善璧, Email: zhou@uhcmu.org。

基金项目: 重庆市医学科研计划资助项目 (编号: 2013-1-033)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180321.1025.028.html>

(2018-03-21)

ed the phosphorylation of I κ B- α ($P=0.001$) mediated by LPS stimulation. **Conclusion:** Curcumin inhibits the inflammatory responses induced by LPS via suppression NF- κ B activity and protects retinal pigment epithelial cells.

【Key words】curcumin; retinal pigment epithelial cells; inflammatory response

视网膜炎症反应是许多眼科疾病的主要原因,包括葡萄膜炎、糖尿病性视网膜病变以及年龄相关性黄斑变性^[1-2],脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)在葡萄膜炎及细菌性眼内炎等眼科炎症疾病中能诱导视网膜色素上皮细胞的炎症反应^[3-4],LPS 通过激活白细胞介素(interleukin, IL)-6 及 IL-8 的自分泌途径诱导 ARPE-19 细胞发生炎症反应^[4],其中,IL-6 在眼科的炎症中起重要作用,IL-8 可引起嗜中性粒细胞的浸润^[5],LPS 通过活化核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)炎症信号通路导致炎症因子的释放^[6]。文献研究发现姜黄素可以通过抑制炎症信号通路来抑制多种细胞分泌的炎症因子^[7-9],同时,姜黄素还具有抗肿瘤、抗氧化、抗凋亡、神经保护等广泛的药理作用^[10-12]。为探究姜黄素治疗眼科炎症性疾病的可能性,本研究以 IL-6 和 IL-8 为主要的炎症因子,检测其在 LPS 刺激 ARPE-19 细胞后的表达情况,以为视网膜炎症性疾病治疗的新思路提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 ARPE-19 细胞购于美国 ATCC 公司。

1.1.2 药物及试剂 姜黄素(美国 Sigma 公司,纯度 $\geq 98\%$),DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司),青霉素及链霉素、裂解液、蛋白上样缓冲液(5 $\times$)、BCA 试剂盒、Marker、凝胶配制试剂盒(上海碧云天公司),LPS、DMSO、CCK-8 试剂(美国 Sigma-Aldrich 公司),Trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司),Prime Script[®] RT reagent Kit(大连 Takara Biotechnology 公司),定量 PCR 试剂(美国 Bio-rad 公司),抗 I κ B- α 抗体、抗 p-I κ B- α 抗体(美国 CST 公司),抗 β -actin 抗体(南京钟鼎生物公司),ELISA 试剂(美国 R&D 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ARPE-19 细胞按照常规培养在完全 DMEM/F12 培养基(DMEM/F12 培养基、10%胎牛血清、1%的 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)中,培养条件为体积分数 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵化箱,2~3 d 更换培养液,细胞长至 90%融合后,0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液将贴壁的细胞完全消

化,细胞悬浮液进行离心 1 350 r/min,5 min,离心后弃上清,1 mL 完全 DMEM/F12 培养基混匀细胞以 1:3 或者 1:4 传代。

1.2.2 CCK-8 检测细胞活性 ARPE-19 细胞接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,置于 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 饱和湿度的培养箱中,等待 ARPE-19 细胞长至 90%融合后,将含有胎牛血清的完全培养基换成无血清,无抗生素的 DMEM/F12 培养基饥饿细胞 24 h,设正常组(未做任何处理的正常 ARPE-19 细胞)、对照组(5 μ g/mL LPS 刺激 ARPE-19 细胞 24 h)、姜黄素组(上述浓度作用 ARPE-19 细胞 24 h)、姜黄素+LPS 组(上述浓度预先作用 ARPE-19 细胞 1 h,5 μ g/mL LPS 刺激 24 h),药物作用 ARPE-19 细胞 24 h 后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L,放入培养箱孵育 4 h,用 450 nm 波长的酶标仪检测各孔的吸光度(absorbance, A)值。

1.2.3 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 ARPE-19 细胞接种于 6 孔板,待细胞培养至 90%融合后,换成无血清,无抗生素的 DMEM/F12 培养基饥饿 24 h,姜黄素组及姜黄素+LPS 组加入 20 μ mol/L 姜黄素预先作用 1 h,5 μ g/mL LPS 刺激 6 h,收集细胞,加入 Trizol 试剂,提取总 RNA,检测 RNA 浓度及纯度,按照逆转录试剂盒要求依次加入各试剂,将总 RNA 逆转录成 cDNA,根据 GenBank 上查找人 IL-6 和 IL-8 基因组全序列设计引物,序列见表 1,PCR 热循环参数:95 $^{\circ}$ C 10 min,然后三步反应:95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 15 s,进行 40 个循环,于每个循环第 3 步(72 $^{\circ}$ C 15 s)收集荧光信号。扩增完毕后,PCR 仪可自动生成荧光值曲线图,采用 2^{- $\Delta\Delta$} 法计算炎症基因的相对表达量。

表 1 IL-6、IL-8 及 β -actin 的引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
IL6-F	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC
IL6-R	CAGGGGTGTTATTGCATCT
IL8-F	GACATACTCCAAACCTTTCCACCC
IL8-R	CCAGACAGAGCTCTCTTCCATCAG
β -actin-F	GGATGCAGAAGGAGATCACTG
β -actin-R	CGATCCACACGGAGTACTTG

1.2.4 ELISA 检测蛋白表达 将 ARPE-19 细胞接种于 6 孔板,细胞长满 80%后,饥饿细胞 24 h,给予 20 μ mol/L 姜黄素预先作用 1 h,再加入 5 μ g/mL LPS 刺激 24 h,收集各孔细胞上清,样本检测前在-80 $^{\circ}$ C 储存,按照 ELISA 检测试剂盒的说明书操作。

1.2.5 Western blot 检测蛋白 I κ B- α 和 p-I κ B- α 的表达 去

掉上清,收集细胞,洗涤细胞 3 次,按照 Western blot 步骤提取总蛋白,测定样本蛋白浓度,电泳,电转和封闭蛋白,然后在相应的条带分别加入一抗,抗体 IkB- α (1:1 000),抗体 p-IkB- α (1:1 000)和抗体 β -actin (1:5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗涤 3 次,加入二抗,HRP 标记 (1:5 000),室温孵育 1 h;洗涤后加入化学发光试剂显影。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对实验结果统计和分析,所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,单因素方差分析结合 Dunnett- t 检验对数据进行统计分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 姜黄素或姜黄素与 LPS 对 ARPE-19 细胞活性的影响

通过测量各组 A 值来进行统计分析,以正常组 (未做任何处理) 结果为参照,正常组、5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组、10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组、20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组、30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组的平均 A 值分别为: 1.000 ± 0.021 、 1.010 ± 0.041 、 1.008 ± 0.050 、 0.909 ± 0.061 、 0.902 ± 0.063 、 0.899 ± 0.079 ,不同组别间有组间差异 ($F=4.086$, $P=0.012$),两两比较结果显示:不同浓度姜黄素对细胞的活性影响没有统计学差异 ($P_{5 \mu\text{mol/L}}=0.998$, $P_{10 \mu\text{mol/L}}=1.000$, $P_{20 \mu\text{mol/L}}=0.124$, $P_{30 \mu\text{mol/L}}=0.092$, $P_{40 \mu\text{mol/L}}=0.078$) (图 1),说明姜黄素对细胞活性没有影响。将不同浓度的姜黄素预先作用细胞 1 h 后,在各组中分别加入 LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) 作用 24 h,以对照组 (只加入 LPS) 结果为参照,对照组、5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+LPS 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+LPS 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+LPS 组、30 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+LPS 组、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素+LPS 组的平均 A 值分别为: 0.787 ± 0.092 、 0.855 ± 0.035 、 0.887 ± 0.073 、 0.923 ± 0.067 、 0.841 ± 0.065 、 0.846 ± 0.073 ,不同组别间有组间差异 ($F=3.951$, $P=0.008$),两两比较结果显示:不同浓度姜黄素对细胞活性的影响在 20 $\mu\text{mol/L}$ 这一浓度有统计学差异 ($P_{5 \mu\text{mol/L}}=0.524$, $P_{10 \mu\text{mol/L}}=0.182$, $P_{20 \mu\text{mol/L}}=0.041$, $P_{30 \mu\text{mol/L}}=0.725$, $P_{40 \mu\text{mol/L}}=0.655$) (图 2),选用 20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素这一浓度用于之后的实验。

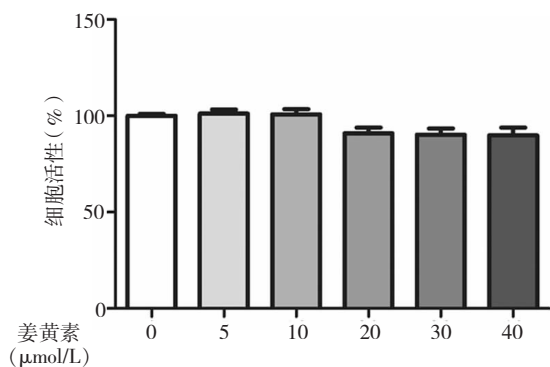


图 1 CCK-8 检测姜黄素对细胞活性的影响

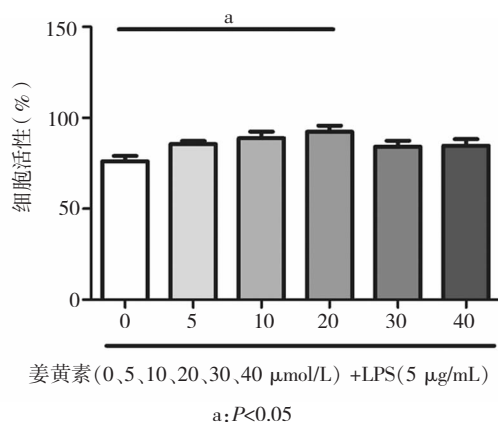


图 2 CCK-8 检测姜黄素和 LPS 对细胞活性的影响

2.2 姜黄素对 LPS 诱导 ARPE-19 细胞中 IL-6 和 IL-8 表达的影响

qRT-PCR 结果显示,在 mRNA 水平 IL-6 表达有组间差异 ($F=10.928$, $P=0.002$), IL-8 表达也有组间差异 ($F=30.324$, $P=0.000$), LPS 组中 IL-6 和 IL-8 在细胞中的相对表达量分别为 2.175 ± 0.560 、 106.331 ± 37.314 ,与正常组相比,其差异有统计学意义 ($P_{\text{IL-6}}=0.003$, $P_{\text{IL-8}}=0.000$)。与 LPS 组相比,姜黄素+LPS 组中 IL-6 和 IL-8 的 mRNA 相对表达量分别为 0.992 ± 0.374 、 4.965 ± 3.863 , IL-6 和 IL-8 表达水平降低,差异有统计学意义 ($P_{\text{IL-6}}=0.005$, $P_{\text{IL-8}}=0.000$) (表 2), RT-PCR 结果说明姜黄素能在转录水平抑制炎症因子的表达。

表 2 姜黄素对 LPS 诱导 ARPE-19 细胞中 IL-6 和 IL-8 的 mRNA 水平的影响

组别	IL-8	IL-6
正常组	1.169 ± 0.842	0.775 ± 0.122
LPS 组	106.331 ± 37.314	2.175 ± 0.560
姜黄素组	3.280 ± 1.454	0.741 ± 0.294
姜黄素 + LPS 组	4.965 ± 3.863	0.992 ± 0.374
F 值	30.324	10.928
P 值	0.000	0.002

ELISA 结果表明,在蛋白表达水平, IL-6 蛋白表达有组间差异 ($F=64.726$, $P=0.000$), IL-8 蛋白表达有组间差异 ($F=570.401$, $P=0.000$),与正常组相比, LPS 组中 IL-6 和 IL-8 的蛋白表达水平明显升高 ($P_{\text{IL-6}}=0.000$, $P_{\text{IL-8}}=0.000$)。与 LPS 组相比,姜黄素+LPS 组中两者的蛋白表达水平明显降低 ($P_{\text{IL-6}}=0.000$, $P_{\text{IL-8}}=0.000$) (表 3),说明姜黄素能够从蛋白水平抑制炎症因子的表达。

2.3 姜黄素对 LPS 诱导 ARPE-19 细胞中 IkB- α 、p-IkB- α 蛋白表达的影响

Western blot 结果表明, p-IkB- α 的表达在各组有组间差异 ($F=45.990$, $P=0.000$) (表 4),与正常组相比, LPS 组 p-IkB- α 表达水平明显增加 ($P=0.000$),而姜黄素预处理后, p-IkB- α 明显降低 ($P=0.001$) (图 3),这表明姜黄素能够抑制 NF- κB 这条经典的炎症通路。

表 3 姜黄素对 LPS 诱导 ARPE-19 细胞中 IL-6 和 IL-8 的蛋白水平的影响

组别	IL-8 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
正常组	39.950 ± 5.562	71.271 ± 9.232
LPS组	589.025 ± 38.880	243.380 ± 38.001
姜黄素组	33.205 ± 3.678	43.388 ± 10.042
姜黄素 +LPS 组	191.600 ± 18.773	113.906 ± 27.947
F 值	570.401	64.726
P 值	0.000	0.000

表 4 姜黄素对 LPS 诱导 ARPE-19 细胞中 p-IκB-α 和 IκB-α 相对灰度值比较

组别	p-IκB-α	IκB-α
正常组	0.999 ± 0.029	1.000 ± 0.118
LPS组	4.673 ± 0.529	0.709 ± 0.074
姜黄素组	1.585 ± 0.382	1.266 ± 0.283
姜黄素 +LPS 组	2.592 ± 0.502	1.386 ± 0.218
F 值	45.990	7.357
P 值	0.000	0.011

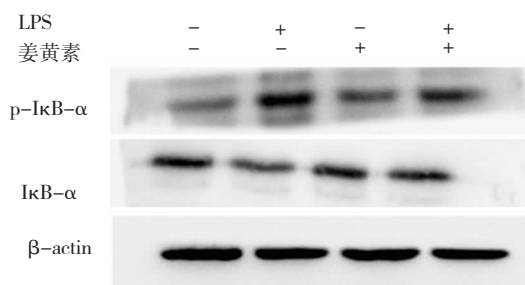


图 3 姜黄素对 LPS 诱导 ARPE-19 细胞中 IκB-α, p-IκB-α 的蛋白表达水平变化

响,而姜黄素具有保护作用。LPS 刺激细胞后,IL-6 和 IL-8 的 mRNA 和蛋白水平较正常组明显升高,用姜黄素预处理 1 h,两者的 mRNA 和蛋白水平表达较 LPS 组均明显降低。

姜黄素是一种酸性多酚类物质,近几十年来因其可调节多种细胞因子的表达而发挥多种生物学效应得到广泛的关注和研究,目前已广泛用于骨关节炎^[15]、阿尔茨海默病^[16]、动脉粥样硬化^[17]等多系统多器官疾病的治疗研究。有报道,姜黄素通过抑制一些炎症因子的产生,可阻断炎症信号通路的转导,发挥抗炎作用^[10]。本研究中发现姜黄素明显抑制了 LPS 诱导 ARPE-19 细胞分泌的 IL-6 和 IL-8。其表达是诱导炎症反应的重要途径,若是下调炎症因子的表达,那么炎症反应也将减弱,而 NF-κB 信号级联过程是 LPS 刺激产生炎症的经典信号通路,静息状态时,NF-κB 与抑制复合体 IκB 结合,NF-κB 不会进入细胞核内,细胞一旦受到刺激,IκB 激酶复合体将 IκB 磷酸化,这时 NF-κB 解离,NF-κB 将会进入细胞核,调控相关炎症基因的转录。本研究中 LPS 刺激 ARPE-19 细胞后,p-IκB-α 蛋白表达明显上升,同时 IκB-α 表达也有下降的趋势,而在姜黄素预处理后抑制了 p-IκB-α 蛋白的表达,这提示姜黄素参与了 NF-κB 信号通路调控炎症过程。本实验结果显示,姜黄素能够通过抑制 NF-κB 信号通路来调控 ARPE-19 细胞产生的 IL-6 和 IL-8 炎症因子,对人视网膜色素上皮细胞有保护作用,因此可为视网膜炎症引起的眼科疾病提供更多的防治策略。

3 讨论

炎症是一种可以引起严重细胞和组织损伤的病理过程^[13],眼科疾病中很多致盲性眼病的病理生理过程都涉及炎症反应。RPE 细胞在视网膜代谢中起着重要作用,同时也会参与眼内炎症反应。RPE 细胞表达许多细胞因子受体,包括 IL-1R、IL-6R、IL-8RA 和 IFNGR1/2 等,同时分泌一系列促炎和抗炎的细胞因子,包括 IL-6、IL-8、IFN-α、MCP-1 和 VEGF^[4]。LPS 是革兰阴性杆菌的一种内毒素,可用于诱导炎症反应,在葡萄膜炎和细菌性眼内炎等眼科炎症性疾病中均能诱导视网膜色素上皮细胞的炎症反应^[3],LPS 刺激 RPE 细胞会分泌一系列的炎症因子^[14]。本研究中,用不同浓度的姜黄素作用于 ARPE-19 细胞,CCK-8 法检测细胞活性未受到明显的影响。姜黄素预先作用 1 h 后 LPS 再作用 24 h,CCK-8 的结果显示,LPS 对 ARPE-19 细胞的活性有影

参 考 文 献

- [1] Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, et al. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye[J]. Am J Ophthalmol, 2002, 134(3):411-431.
- [2] Yu Y, Chen H, Su SB. Neuroinflammatory responses in diabetic retinopathy[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 141.
- [3] Pollreis A, Rafferty B, Kozarov E, et al. Klebsiella pneumoniae induces an inflammatory response in human retinal-pigmented epithelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(1):33-37.
- [4] Leung KW, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling[J]. Mol Immunol, 2009, 46(7):1374-1386.
- [5] Meleth AD, Agrón E, Chan CC, et al. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(11):4295-4301.
- [6] Qiu Y, Tao L, Lei C, et al. Downregulating p22phox ameliorates inflammatory response in Angiotensin II-induced oxidative stress by regulating MAPK and NF-κB pathways in ARPE-19 cells[J]. Sci Rep,