

## · 实验研究 ·

姜黄素对 IL-1 $\beta$  诱导的兔 RPE 细胞中核因子- $\kappa$ B 相关炎症因子表达的抑制作用

刘丽娅 马景学 刘丹岩 安建斌 周娜磊 马月磊

050000 石家庄,河北医科大学第二医院眼科

通信作者:马景学,Email:15803210925@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.09.008

**【摘要】** 背景 白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )是增生性玻璃体视网膜病变(PVR)早期释放的重要炎症因子,研究证实姜黄素能抑制 IL-1 $\beta$  诱导的兔视网膜色素上皮(RPE)细胞的增生,但其是否能够对 PVR 发挥抗炎作用尚不清楚。目的 观察姜黄素对 IL-1 $\beta$  诱导的兔 RPE 细胞移行的影响,探讨姜黄素对 IL-1 $\beta$  诱导的 RPE 细胞中炎症因子表达的影响。方法 采用对数生长期原代培养的第 4 代兔 RPE 细胞进行实验,在无血清 DMEM 培养基中分别添加 0、0.1、1.0 和 10.0  $\mu$ g/L 的 IL-1 $\beta$  作用于细胞 24 h,分别采用 Western blot 和逆转录 PCR 法检测细胞中环氧化酶-2(COX-2)蛋白和 mRNA 的表达以筛选 IL-1 $\beta$  最佳质量浓度。将培养的 RPE 细胞分为 IL-1 $\beta$  组和姜黄素+IL-1 $\beta$  组,分别在无血清培养基中添加 1.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  和 1.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  联合 10  $\mu$ g/ml 姜黄素作用于细胞 24、48 和 72 h,仅用无血清培养基培养的细胞作为对照组。培养的细胞行苏木精-伊红染色,于光学显微镜下计算进入损伤区的细胞数,比较各组细胞的移行能力;分别采用 Western blot 法和逆转录 PCR 法检测各组 RPE 细胞中 COX-2 蛋白及其 mRNA 的相对表达量,采用 Western blot 法检测并比较各组细胞中核因子- $\kappa$ Bp65(NF- $\kappa$ Bp65)蛋白和核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白- $\alpha$ (I $\kappa$ B- $\alpha$ )的相对表达量;采用免疫化学染色法检测 NF- $\kappa$ Bp65、I $\kappa$ B- $\alpha$  和 COX-2 在各组 RPE 细胞中的表达和定位。结果 初分离的兔 RPE 细胞呈球形,细胞中可见大量黑色素颗粒;第 4 代细胞色素颗粒明显减少,接近融合的细胞形态为长梭形,呈拉网状分布。免疫细胞化学染色法结果显示,细胞角蛋白(AE1/AE3)在细胞质呈阳性表达。对照组在培养 24、48 和 72 h 移行的细胞数分别为(31.93 $\pm$ 1.21)、(36.27 $\pm$ 2.50)和(38.33 $\pm$ 2.40)个,IL-1 $\beta$  组分别为(45.73 $\pm$ 2.30)、(71.13 $\pm$ 1.92)和(80.60 $\pm$ 1.71)个,而姜黄素+IL-1 $\beta$  组分别为(13.13 $\pm$ 2.20)、(14.93 $\pm$ 1.10)和(12.60 $\pm$ 1.51)个,各时间点 IL-1 $\beta$  组细胞移行细胞数均明显高于对照组,而姜黄素+IL-1 $\beta$  组移行细胞数均明显低于对照组和 IL-1 $\beta$  组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。IL-1 $\beta$  质量浓度为 1.0  $\mu$ g/L 时,RPE 细胞中 COX-2 蛋白及其 mRNA 的相对表达量达峰,以 1.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  的剂量进行后续实验。细胞培养后 24、48 和 72 h,姜黄素+IL-1 $\beta$  组细胞中 COX-2 蛋白及其 mRNA 的相对表达量均明显低于 IL-1 $\beta$  组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。IL-1 $\beta$  作用于细胞后 48 h,细胞中 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白的相对表达量最高,与 IL-1 $\beta$  组相比,各时间点姜黄素+IL-1 $\beta$  组细胞中 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白相对表达量降低,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。IL-1 $\beta$  组药物作用于细胞后 48 h 细胞中 I $\kappa$ B- $\alpha$  降至最低,各时间点姜黄素+IL-1 $\beta$  组细胞中 I $\kappa$ B- $\alpha$  值均明显高于 IL-1 $\beta$  组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。免疫细胞染色结果显示,IL-1 $\beta$  组 RPE 细胞的细胞核及细胞质中 NF- $\kappa$ Bp65 呈强阳性表达,对照组表达较弱,姜黄素+IL-1 $\beta$  组细胞中 NF- $\kappa$ Bp65 的表达强度较 IL-1 $\beta$  组明显降低;与对照组相比,IL-1 $\beta$  组细胞的细胞质中 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达强度明显减弱,而 COX-2 表达明显增强;与 IL-1 $\beta$  组比较,姜黄素+IL-1 $\beta$  组细胞中 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达明显增强,而 COX-2 表达明显减弱。结论 姜黄素可抑制 IL-1 $\beta$  引起的兔 RPE 细胞的移行,IL-1 $\beta$  通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路刺激细胞中 COX-2 的表达,姜黄素可通过阻断这一途径而抑制炎症因子的表达,从而发挥抗炎作用。

**【关键词】** 姜黄素/药理学; 视网膜色素上皮/细胞学; 细胞移行/药物作用; 白细胞介素-1 $\beta$ /拮抗剂和抑制剂; 细胞因子/代谢; 炎症/病因; 增生性玻璃体视网膜病变/药物疗法; 细胞培养; 兔

**Inhibition of curcumin on the expression of IL-1 $\beta$ -induced nuclear factor- $\kappa$ B-dependent inflammatory gene in rabbit RPE cells** Liu Liya, Ma Jingxue, Liu Danyan, An Jianbin, Zhou Nalei, Ma Yuelei

Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Ma Jingxue, Email: 15803210925@163.com

**【Abstract】** **Background** Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) is an important inflammation-related factor in the initial stage of proliferative vitreoretinopathy (PVR). The previous research showed that curcumin can inhibit IL-1 $\beta$ -induced proliferation of rabbit retinal pigment epithelium (RPE) cells, but the anti-inflammatory mechanism and effect of curcumin are still undefined. **Objective** This study was to observe the migration of IL-1 $\beta$ -induced rabbit RPE

cells, and evaluate the function and mechanism of inhibition of *curcumin* on IL-1 $\beta$ -induced inflammation of RPE cells.

**Methods** Cultured rabbit RPE cells of generation 4 were used in this experiment. The cells were cultured in serum-free DMEM and 0, 0.1, 1.0 and 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  were separately added in the medium for 24 hours. The expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein and mRNA in the cells were detected by Western blot and reverse transcription PCR to determine the optimal concentration of IL-1 $\beta$ . The cells were divided into IL-1 $\beta$  group and *curcumin*+IL-1 $\beta$  group, and 1.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 or 1.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  combined with 10  $\mu\text{g/ml}$  *curcumin* was respectively added into the medium for 24, 48 and 72 hours. The cells cultured by only serum-free medium served as the control group. Hematoxylin and eosin staining was conducted for the cells to count the number of cells migrating into the injured area under the optical microscope. The relative expression levels of COX-2 protein and mRNA in the cells were detected by Western blot and reverse transcription PCR, and the relative expression levels of nuclear factor (NF)- $\kappa\text{B}$ p65 and inhibitor of NF- $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  (I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$ ) protein were also detected by Western blot assay. The expression intensity and location of NF- $\kappa\text{B}$ p65, I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  and COX-2 in the cells were detected by immunochemistry. **Results** RPE cells just isolated from the rabbit eyes were in round shape and abundant in melanin. The melanin significantly decreased in the fourth generations of RPE cells. The shape of cells became long and narrow, and net shaped distribution. Immunochemistry demonstrated the strong positive response of RPE cells for keratin (AE1/AE3). There were (31.93 $\pm$ 1.21), (36.27 $\pm$ 2.50) and (38.33 $\pm$ 2.40) migratory cells in the control group after 24, 48 and 72 hours respectively. The number of migratory cells increased to 45.73 $\pm$ 2.30, 71.13 $\pm$ 1.92 and 80.60 $\pm$ 1.71 in the IL-1 $\beta$  group, but obviously decreased to 13.13 $\pm$ 2.20, 14.93 $\pm$ 1.10 and 12.60 $\pm$ 1.51 in the *curcumin*+IL-1 $\beta$  group. A significant increase in the migrating cell number was found in the IL-1 $\beta$  group compared with the control group and the *curcumin*+IL-1 $\beta$  group in various time points (all at  $P<0.05$ ). The relative expression levels of COX-2 protein and mRNA peaked in the 1.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  group, so 1.0  $\mu\text{g/L}$  of IL-1 $\beta$  was determined as the optimal concentration in the experiment. In 24, 48 and 72 hours after culture, the expression levels of COX-2 protein and mRNA in the cells were significantly lower in the *curcumin*+IL-1 $\beta$  group than those in the control group (all at  $P<0.05$ ). The relative expression level reached peak in NF- $\kappa\text{B}$ p65 protein and lowed bottom in I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  proteins at 48 hours after cultured in the IL-1 $\beta$  group, and the reverse trend was seen in the *curcumin*+IL-1 $\beta$  group, with the significant differences between the two groups (both at  $P<0.05$ ). Immunochemistry showed that NF- $\kappa\text{B}$ p65 was expressed strongly in the cell nuclei and cytoplasm in the IL-1 $\beta$  group and presented the weaker expression in the control group and the *curcumin*+IL-1 $\beta$  group. Compared with the control group, the expression was weaker in I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  and stronger in COX-2 in the IL-1 $\beta$  group. In addition, the expression of I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  was enhanced and that of COX-2 was attenuated in the *curcumin*+IL-1 $\beta$  group in comparison with the IL-1 $\beta$  group. **Conclusions** *Curcumin* inhibits the movement of rabbit RPE cells induced by IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  up-regulates the expression of COX-2 by activating NF- $\kappa\text{B}$  signal pathway, and *curcumin* plays an anti-inflammatory role by blocking this pathway.

[**Key words**] *Curcumin*/pharmacology; Retinal pigment epithelium/cytology; Cell migration/drug effect; Interleukin-1beta/antagonists & inhibitors; Cytokines/metabolism; Inflammation/etiology; Vitreoretinopathy, proliferative/drug therapy; Cells, cultured; Rabbits

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是以玻璃体和视网膜前后表面形成的纤维增生膜的收缩和牵拉引起视网膜脱离为特征的一类疾病。白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 是在 PVR 早期发现的重要炎性因子, 主要由血液中活化的单核巨噬细胞释放。体外实验证实, IL-1 $\beta$  可刺激视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞分泌多种细胞因子, 进而促进 RPE 细胞的移行、增生及细胞外基质的形成, 导致 PVR 的发生<sup>[1]</sup>。还有研究证实, IL-1 $\beta$  诱导的炎症反应可能与激活核因子- $\kappa\text{B}$  (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ ), 从而促进环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的表达有关<sup>[2]</sup>。有关姜黄素的研究中发现, 天然中药的提取物姜黄素具有抗炎、抗增生、抗肿瘤等多重生物活性, 如通过抗炎机制防治糖尿病大鼠肾病、抑制人晶状体上皮细胞增生、促进白

血病细胞凋亡发挥抗肿瘤作用等<sup>[3-5]</sup>, 因此我们推测姜黄素有望成为防治 PVR 的理想用药。姜黄素防治 PVR 的相关研究虽已证实姜黄素可抑制体外培养的兔 RPE 细胞的增生并诱导其凋亡<sup>[6]</sup>, 但仍然缺乏姜黄素对 PVR 早期抗炎作用及相关机制的研究。本研究中拟观察姜黄素对 IL-1 $\beta$  诱导的兔 RPE 细胞内相关因子表达的影响, 探讨姜黄素的抗炎作用及其机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 RPE 细胞** 原代兔 RPE 细胞的分离和培养参照我们以往的报道<sup>[7]</sup>, 取对数生长期的第 4 代兔 RPE 细胞用于实验。

**1.1.2 主要试剂** 姜黄素 (美国 ALEXIS 公司, 纯度 $\geq$ 98.5%); 重组人 IL-1 $\beta$  (美国 eBioscience 公司); 兔抗

人 NF- $\kappa$ B p65 多克隆抗体(052708D, 1:150, 美国 Lab Vision 公司); 兔抗人核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白- $\alpha$  (inhibitor of NF- $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 多克隆抗体(sc-371, 1:1 000, 美国 RayBiotech 公司); 兔抗小鼠 COX-2 多克隆抗体(160116, 1:1 000, 美国 Cayman 公司); 小鼠抗大鼠 Lamin B1 多克隆抗体(1:500, 美国 Abcam 公司); 小鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体(1:500)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:4 000)、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 二抗(1:4 000)(美国 Santa Cruz 公司); DMEM 培养液(美国 Gibco 公司); 细胞裂解液(美国 ScienCell 公司); 核蛋白和细胞质蛋白提取试剂盒(南京凯基公司); BCA 蛋白定量试剂盒(北京普利莱公司); SDS-PAGE 凝胶试剂盒(南通碧云天生物公司); PVDF 膜(美国 Millipore 公司); Western blot 化学发光法显色试剂盒、总 RNA 提取试剂盒(北京天根公司); 琼脂糖(西班牙 Biowest 公司); RNA 聚合酶链反应试剂盒、Taq 酶(日本 TaKaRa 生物公司); 逆转录 PCR 引物(北京赛百盛公司); SP 免疫组织化学染色试剂盒(北京博奥森公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 兔 RPE 细胞移行率的测定

兔 RPE 细胞以  $2 \times 10^4$ /ml 的密度接种于 96 孔培养板进行培养, 待细胞生长至融合状态后更换无血清 DMEM 继续培养 24 h, 然后根据干预措施的不同进行分组。(1) 对照组: 用无血清 DMEM 进行培养。(2) IL-1 $\beta$  组: 在无血清 DMEM 中添加 IL-1 $\beta$  1.0  $\mu$ g/L。(3) 姜黄素 + IL-1 $\beta$  组: 在添加了 1.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  的无血清 DMEM 中添加姜黄素 10  $\mu$ g/ml。以 10  $\mu$ l 移液器枪头在培养板上刮出无细胞区, PBS 轻柔冲洗以清除脱落细胞。按分组的不同加入处理的细胞培养液, 每孔 200  $\mu$ l, 每组设 3 个复孔, 分别于培养后 24、48 及 72 h 各组任意抽取一块培养板, 用质量分数 4% 预冷多聚甲醛液固定 30 min, 然后行苏木精-伊红染色。光学显微镜下每孔选择 5 个视野(100 倍)照相, 取其平均值, 计算进入损伤区的细胞数(个)。计算公式: 促移行率 = [(IL-1 $\beta$  组移行细胞数 - 对照组移行细胞数) / 对照组移行细胞数]  $\times$  100%; 移行抑制率 = [(IL-1 $\beta$  组移行细胞数 - 姜黄素 + IL-1 $\beta$  组移行细胞数) / IL-1 $\beta$  组移行细胞数]  $\times$  100%。实验重复 3 次。

### 1.2.2 Western blot 法和逆转录 PCR 法检测筛选 IL-1 $\beta$ 作用的最佳质量浓度

采用 Western blot 法和逆转录 PCR 法测定不同质量浓度 IL-1 $\beta$  作用后细胞中 COX-2 蛋白及 mRNA 的表达量。待培养的细胞生长至近融合状态时更换无血清 DMEM, 继续培养 24 h, 然

后将细胞分为 4 个组。对照组用无血清 DMEM 进行培养, 0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  组分别于无血清 DMEM 中添加 0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$ , 继续培养 24 h, 收集细胞, 每组  $5 \times 10^6$  个, 按照 1.2.3 和 1.2.4 的方法, 分别采用 Western blot 和逆转录 PCR 法测定 RPE 细胞中 COX-2 蛋白及其 mRNA 的相对表达量, 确定最适 IL-1 $\beta$  质量浓度。

### 1.2.3 Western blot 法测定各组 RPE 细胞中 COX-2、NF- $\kappa$ Bp65、I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白的相对表达量

将无血清 DMEM 培养 24 h 的细胞分为对照组、IL-1 $\beta$  组、姜黄素 + IL-1 $\beta$  组, 对照组细胞继续用无血清 DMEM 进行培养, IL-1 $\beta$  组在细胞培养液中添加 1.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$ , 姜黄素 + IL-1 $\beta$  组在细胞培养液中添加 1.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  和 10.0  $\mu$ g/ml 姜黄素, 各组细胞培养 24、48 和 72 h, 对照组和各实验组分别提取总蛋白以检测目的蛋白, 并按照核蛋白提取试剂盒说明提取核蛋白及细胞质蛋白以检测 COX-2、NF- $\kappa$ Bp65 和 I $\kappa$ B- $\alpha$ , 采用 BCA 法进行蛋白定量。核蛋白、细胞质蛋白均上样 50  $\mu$ g, SDS-PAGE 电泳, 水浴电转膜, 膜封闭。分别添加一抗 4  $^{\circ}$ C 过夜。洗膜, 添加相应二抗, 37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h。洗膜, 化学发光法显影, 凝胶成像系统照相。采用 Quantity One 4.6.2 软件分析条带吸光度(A)值, 计算各指标与内参吸光度(A)值的比值。

### 1.2.4 逆转录 PCR 法检测各组 RPE 细胞中 COX-2 mRNA 的表达

细胞准备方法同 1.2.3, 细胞分组方法同 1.2.3。参照 RNA 提取试剂盒的步骤提取 RNA, 用分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度。以提取的总 RNA 为模板, Oligo(dT)15 为引物, 按 RNA PCR 试剂盒说明书的步骤, 合成 cDNA 第一链。从 NCBI-Nucleotide 数据库中查找目的基因原始 cDNA 序列, 采用 Primer 5.0 软件设计 PCR 引物。COX-2 的上游引物为 5'-TGTGCTCAAACAGGAGCATC-3', 下游引物为 5'-AAAAGCAGCTCTGGGTCAA-3', 扩增片段长度为 159 bp; GAPDH 上游引物为 5'-CACCATCTTCCAGGAGCGATCC-3', 下游引物为 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGATGGC-3', 扩增片段长度为 339 bp。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 分别于 56  $^{\circ}$ C (COX-2 mRNA) 和 64  $^{\circ}$ C (GAPDH mRNA) 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 ~ 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果分析同 1.2.4。

### 1.2.5 免疫细胞化学染色法检测各组 RPE 细胞中 NF- $\kappa$ Bp65、I $\kappa$ B- $\alpha$ 和 COX-2 的表达

将细胞接种于 6 孔板内盖玻片上, 24 h 后更换无血清培养基继续培养 24 h。将培养的 RPE 细胞分为 4 个组, 空白对照组

用 PBS 进行培养,对照组用无血清 DMEM 进行培养, IL-1 $\beta$  组在培养液中添加 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ ,姜黄素+IL-1 $\beta$  组于无血清 DMEM 中添加姜黄素(10.0  $\mu\text{g/ml}$ )+IL-1 $\beta$ (10.0  $\mu\text{g/L}$ )。处理后 24 h 取出爬片, PBS 冲洗 3 次,冷丙酮固定 30 min;分别滴加兔抗小鼠 COX-2 多克隆抗体、兔抗人 NF- $\kappa$ Bp65 多克隆抗体、兔抗人 I $\kappa$ B- $\alpha$ 多克隆抗体,按 SP 免疫组织化学染色试剂盒说明进行操作,细胞质中呈黄色或棕黄色染色者为阳性细胞,每张切片选择 10 个高倍视野,显微镜照相,采用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统进行分析,以阳性细胞的平均 A 值计算目的蛋白的相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。IL-1 $\beta$  质量浓度的筛选采用单因素干预多水平实验设计,不同质量浓度 IL-1 $\beta$  组间 COX-2 蛋白及其 mRNA 在 RPE 细胞中相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析;NF- $\kappa$ B 相关炎性因子在细胞中的表达量及移行细胞数的比较采用两因素干预多水平实验设计,各组细胞培养不同时间点细胞中 NF- $\kappa$ B 相关炎性因子和细胞移行数的总体比较采用两因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检验法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 培养细胞的形态及鉴定

初分离的兔 RPE 细胞呈球形,多数细胞中充满黑色素,少数细胞可见中央透明细胞核及周围大量黑色素颗粒。随传代次数的增加,细胞内黑色素颗粒逐渐减少,至第 4 代细胞色素颗粒明显减少,形态更加狭长,排列紧密,呈拉网状分布。免疫细胞化学染色结果显示,细胞角蛋白(AE1/AE3)在细胞质呈阳性表达。

### 2.2 各组 RPE 细胞的移行情况

正常对照组移行的 RPE 细胞数极少,培养后 24、48 及 72 h 进入损伤区的移行细胞数未见明显增加。IL-1 $\beta$  组细胞移行能力明显增强,移行细胞体伸展、形态狭长,进入损伤区的细胞数较对照组明显增多,培养后 24、48 及 72 h 的细胞促移行率分别为 43.17%、96.52% 和 110.74%, IL-1 $\beta$  组各个时间点移行细胞数明显多于对照组,且随时间延长各时间点的移行细胞数均多于相邻的前一时间点,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。姜黄素+IL-1 $\beta$  组细胞处理后 24、48 和 72 h 移行细胞数较 IL-1 $\beta$  组均显著减少,各时间点细

胞移行抑制率分别为 71.32%、78.97% 和 84.36%。随时间延长各时间点的移行细胞数均多于相邻的前一时间点,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 1,表 1)。

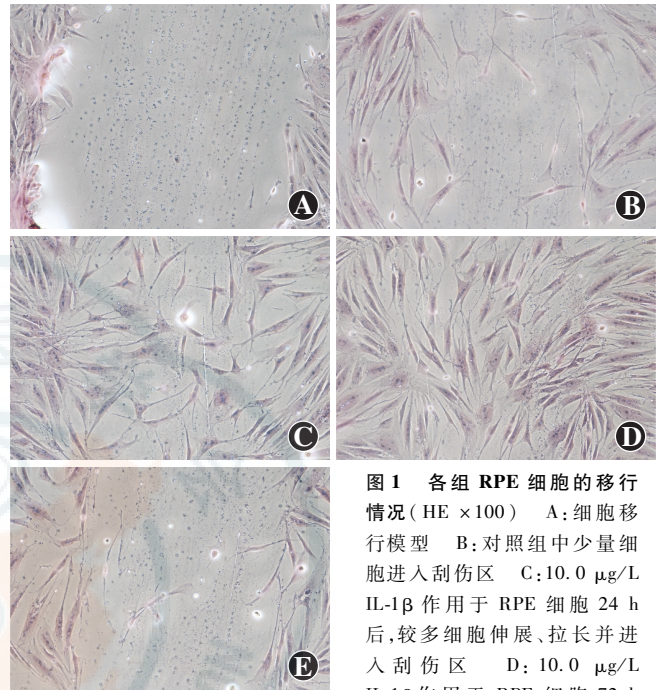


图 1 各组 RPE 细胞的移行情况(HE  $\times 100$ ) A: 细胞移行模型 B: 对照组中少量细胞进入刮伤区 C: 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  作用于 RPE 细胞 24 h 后,较多细胞伸展、拉长并进入刮伤区 D: 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  作用于 RPE 细胞 72 h 后,大量细胞进入刮伤区,与刮伤边缘相连 E: 姜黄素及 IL-1 $\beta$  作用于 RPE 细胞 72 h 后,进入刮伤区细胞明显减少

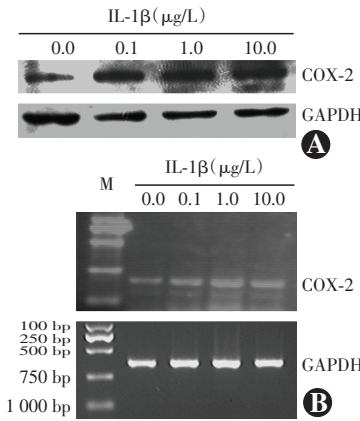
表 1 各组 RPE 细胞培养不同时间移行细胞数( $\bar{x} \pm s$ , 个)

| 组别                 | 样本量 | 培养不同时间细胞移行数                    |                                 |                                  |
|--------------------|-----|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                    |     | 24 h                           | 48 h                            | 72 h                             |
| 对照组                | 6   | 31.93 $\pm$ 1.21               | 36.27 $\pm$ 2.50 <sup>c</sup>   | 38.33 $\pm$ 2.40 <sup>cd</sup>   |
| IL-1 $\beta$ 组     | 6   | 45.73 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>  | 71.13 $\pm$ 1.92 <sup>ac</sup>  | 80.60 $\pm$ 1.71 <sup>acd</sup>  |
| 姜黄素+IL-1 $\beta$ 组 | 6   | 13.13 $\pm$ 2.20 <sup>ab</sup> | 14.93 $\pm$ 1.10 <sup>abc</sup> | 12.60 $\pm$ 1.51 <sup>abcd</sup> |

注:  $F_{\text{分组}} = 115.79, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 8.53, P = 0.00$ 。与同时时间点对对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与同时时间 IL-1 $\beta$  组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自组内 24 h 值比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与各自组内 48 h 值比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) RPE: 视网膜色素上皮; IL: 白细胞介素

### 2.3 IL-1 $\beta$ 作用于 RPE 细胞的最适质量浓度

0.1 ~ 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  作用于 RPE 细胞后 24 h, 细胞中 COX-2 蛋白和 mRNA 的相对表达量较对照组明显增加,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), 其中 1.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  组细胞中 COX-2 蛋白和 mRNA 相对表达水平最高, 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  组细胞中 COX-2 蛋白 mRNA 相对表达水平较 1.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  组轻度下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 1.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  组与 0.1  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 故 1.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  是最佳实验质量浓度(图 2, 表 2)。



**图 2 不同质量浓度 IL-1β 作用于 RPE 细胞后 COX-2 的表达** A: Western blot 法检测细胞中 COX-2 蛋白的表达, 可见 1.0 μg/L IL-1β 作用后细胞中 COX-2 蛋白表达条带最强 B: 逆转录 PCR 法检测细胞中 COX-2 mRNA 的表达, 可见 1.0 μg/L IL-1β 作用后细胞中 COX-2 mRNA 表达条带最强 IL: 白细胞介素; COX: 环氧合酶; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; M: 分子蛋白标志物

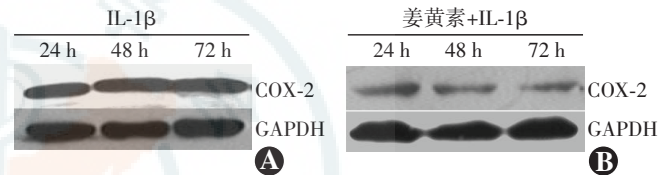
**表 2 不同质量浓度 IL-1β 作用于 RPE 细胞 24 h 后 COX-2 蛋白及 mRNA 相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

| IL-1β (μg/L) | 样本量 | COX-2 蛋白                   | COX-2 mRNA                 |
|--------------|-----|----------------------------|----------------------------|
| 0.0          | 6   | 0.44 ± 0.01                | 0.21 ± 0.12                |
| 0.1          | 6   | 1.33 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.43 ± 0.04 <sup>a</sup>   |
| 1.0          | 6   | 1.50 ± 0.02 <sup>ab</sup>  | 0.88 ± 0.02 <sup>ab</sup>  |
| 10.0         | 6   | 1.42 ± 0.05 <sup>abc</sup> | 0.67 ± 0.08 <sup>abc</sup> |
| F            |     | 1 066.59                   | 191.15                     |
| P            |     | 0.00                       | 0.00                       |

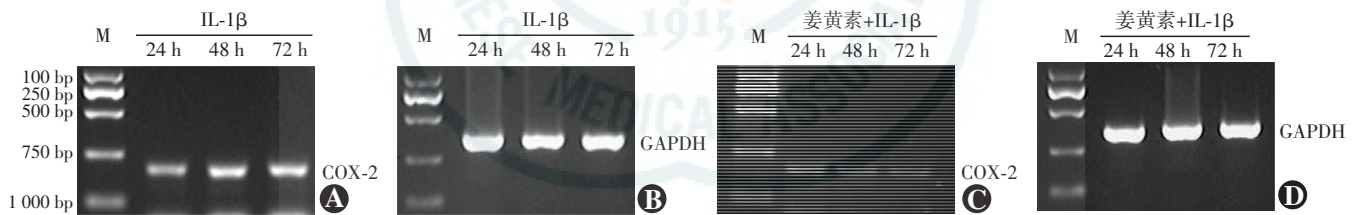
注: 与各自的 0.0 μg/L IL-1β 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的 0.1 μg/L IL-1β 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的 1.0 μg/L IL-1β 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) IL: 白细胞介素; RPE: 视网膜色素上皮; COX: 环氧合酶

**2.4 各组 RPE 细胞中 COX-2 蛋白及其 mRNA 相对表达量的比较**

1.0 μg/L IL-1β 作用于 RPE 细胞后 48 h COX-2 蛋白相对表达量明显高于作用后 24 h 和 72 h 测量值, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 作用后 72 h 与作用后 24 h 测量值比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。姜黄素+IL-1β 组各时间点细胞中 COX-2 蛋白相对表达量较 IL-1β 组均明显下降; 且随时间延长姜黄素+IL-1β 组 COX-2 蛋白相对表达量逐渐下降, 相邻两时间点间 COX-2 蛋白相对表达量的差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 3)。COX-2 mRNA 的表达情况与蛋白表达趋势大致相同 (图 4, 表 3)。



**图 3 Western blot 法检测各组 RPE 细胞中 COX-2 蛋白的表达** A: IL-1β 作用后不同时间点细胞中 COX-2 蛋白表达条带 B: 姜黄素+IL-1β 作用后各时间点细胞中 COX-2 蛋白表达条带 IL: 白细胞介素; COX: 环氧合酶; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶



**图 4 各组 RPE 细胞培养后不同时间点 COX-2 mRNA 表达情况** A: IL-1β 作用后不同时间点细胞中 COX-2 mRNA 表达条带 B: GAPDH 内参条带 C: 姜黄素+IL-1β 作用后各时间点细胞中 COX-2 mRNA 表达条带 D: GAPDH 内参条带 M: 分子蛋白标志物; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; IL: 白细胞介素; COX: 环氧合酶

**表 3 各组细胞培养不同时间点 COX-2 蛋白及 mRNA 相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别          | 样本量 | 培养后不同时间点 COX-2 蛋白表达      |                           |                            | 培养后不同时间点 COX-2 mRNA 表达   |                           |                            |
|-------------|-----|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
|             |     | 24 h                     | 48 h                      | 72 h                       | 24 h                     | 48 h                      | 72 h                       |
| IL-1β 组     | 6   | 1.23 ± 0.15              | 1.54 ± 0.19 <sup>a</sup>  | 1.12 ± 0.20 <sup>b</sup>   | 0.72 ± 0.06              | 0.91 ± 0.11 <sup>a</sup>  | 0.84 ± 0.10 <sup>b</sup>   |
| 姜黄素+IL-1β 组 | 6   | 0.82 ± 0.11 <sup>c</sup> | 0.50 ± 0.02 <sup>ac</sup> | 0.22 ± 0.04 <sup>abc</sup> | 0.53 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.31 ± 0.08 <sup>ac</sup> | 0.11 ± 0.05 <sup>abc</sup> |

注: COX-2 蛋白:  $F_{\text{时间}} = 6.36, P = 0.01; F_{\text{分组}} = 70.69, P = 0.00$ 。COX-2 mRNA:  $F_{\text{时间}} = 2.18, P = 0.00; F_{\text{分组}} = 61.61, P = 0.03$ 。与各自组内 24 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自组内 48 h 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同时间点 IL-1β 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析检验, LSD-*t* 检验) COX: 环氧合酶; IL: 白细胞介素

**2.5 Western blot 法检测各组 RPE 细胞中 NF-κBp65、IκB-α 蛋白的相对表达量**

对照组 RPE 细胞中 NF-κBp65 蛋白仅有少量表达。1.0 μg/L IL-1β 作用于 RPE 细胞后 24、48 和 72 h, 细胞中 NF-κBp65 蛋白的相对表达量较对照组均明显升高, 其中作用后 48 h 细胞中 NF-κBp65 蛋白的相对

表达量达峰, 明显高于作用后 24 h 和 72 h, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 但作用后 72 h 与作用后 24 h 细胞中 NF-κBp65 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。姜黄素+IL-1β 组作用后 24、48 和 72 h, 细胞中 NF-κBp65 蛋白的相对表达量较 IL-1β 组均明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 姜黄

素+IL-1β组作用后 24、48 和 72 h 细胞中 NF-κBp65 蛋白的相对表达量逐渐降低,相邻时间点细胞中 NF-κBp65 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。IL-1β 组作用后 24、48 和 72 h 细胞中 IκB-α 蛋白相对表达量均明显低于对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),其中 IL-1β 组作用后 48 h 细胞中 IκB-α 蛋白相对表达量最低,IL-1β 组作用后 72 h 细胞中 IκB-α 蛋白相对表达量较作用后 48 h 升高,但仍低于作用后 24 h,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。姜黄素+IL-1β 组作用后 24、48 和 72 h 细胞中 IκB-α 蛋白的相对表达量较 IL-1β 组均明显升高,随着作用时间的延长,姜黄素+IL-1β 组细胞中 IκB-α 蛋白

的相对表达量均逐渐升高(图 5,表 4)。

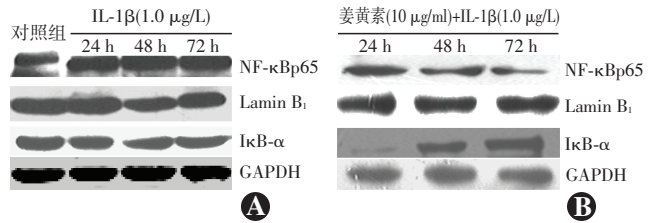


图 5 Western blot 法检测各组细胞中 NF-κBp65 和 IκB-α 蛋白的相对表达量 A:IL-1β 作用后各时间点 NF-κBp65、Lamin B<sub>1</sub>、IκB-α 蛋白的表达条带 B:姜黄素+IL-1β 作用后各时间点 NF-κBp65、Lamin B<sub>1</sub>、IκB-α 蛋白的表达条带 IL:白细胞介素;NF-κB:核因子-κB;IκB:核因子 κB 抑制蛋白;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;Lamin:核纤层蛋白

表 4 各组 RPE 细胞培养不同时间点 NF-κB 蛋白和 IκB 蛋白相对表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别          | 样本量 | 培养不同时间点 NF-κBp65 蛋白相对表达量 |                          |                           | 培养不同时间点 IκB-α 蛋白相对表达量  |                          |                           |
|-------------|-----|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
|             |     | 24 h                     | 48 h                     | 72 h                      | 24 h                   | 48 h                     | 72 h                      |
| 对照组         | 6   | 0.35±0.06                | 0.46±0.03 <sup>a</sup>   | 0.45±0.03 <sup>a</sup>    | 0.79±0.01              | 0.60±0.02 <sup>a</sup>   | 0.83±0.02 <sup>b</sup>    |
| IL-1β 组     | 6   | 0.84±0.06 <sup>c</sup>   | 1.33±0.04 <sup>ac</sup>  | 0.91±0.05 <sup>bc</sup>   | 0.59±0.05 <sup>c</sup> | 0.21±0.09 <sup>ac</sup>  | 0.40±0.04 <sup>abc</sup>  |
| 姜黄素+IL-1β 组 | 6   | 0.55±0.10 <sup>cd</sup>  | 0.31±0.35 <sup>acd</sup> | 0.13±0.03 <sup>abcd</sup> | 0.84±0.09 <sup>d</sup> | 1.12±0.18 <sup>acd</sup> | 1.31±0.06 <sup>abcd</sup> |

注: NF-κBp65:  $F_{\text{分组}} = 49.95, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 3.68, P = 0.04$ . IκB:  $F_{\text{分组}} = 41.63, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 3.59, P = 0.04$ . 与组内 24 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与组内 48 h 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同一时间点对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与同一时间点 IL-1β 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) RPE: 视网膜色素上皮; NF-κB: 核因子-κB; IκB: 核因子 κB 抑制蛋白; IL: 白细胞介素

## 2.6 免疫细胞化学染色法检测各组 RPE 细胞中 NF-κBp65、IκB-α 和 COX-2 蛋白的表达

NF-κBp65、IκB-α、和 COX-2 在空白对照组细胞中均未见表达,对照组部分细胞的细胞质中可见 NF-κBp65 表达,极少数细胞的细胞核中可表达 NF-κBp65。IL-1β 组细胞核及细胞质中均可见 NF-κBp65 的强阳性表达,部分细胞的细胞核中 NF-κBp65 表达明显强于细胞质中。IL-1β 组细胞中 NF-κBp65 的表达明显强于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。姜黄素+IL-1β 组细胞中 NF-κBp65 表达较 IL-1β 组明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),部分细胞的细胞质中可见 NF-κBp65 的表达,但是在细胞核中未见

NF-κBp65 的表达(图 6,表 5)。对照组细胞的细胞质中 IκB-α 呈阳性表达,IL-1β 组细胞中 IκB-α 表达呈弱阳性,较对照组明显降低,对照组与 IL-1β 组间细胞中 NF-κBp65 表达的 A 值差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),姜黄素+IL-1β 组细胞中 IκB-α 表达明显高于 IL-1β 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 7,表 5)。对照组细胞的细胞质中 COX-2 呈弱阳性表达,IL-1β 组细胞的细胞质中 COX-2 呈阳性表达,其表达量明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),姜黄素+IL-1β 组与 IL-1β 组比较细胞中 COX-2 的表达明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 8,表 5)。

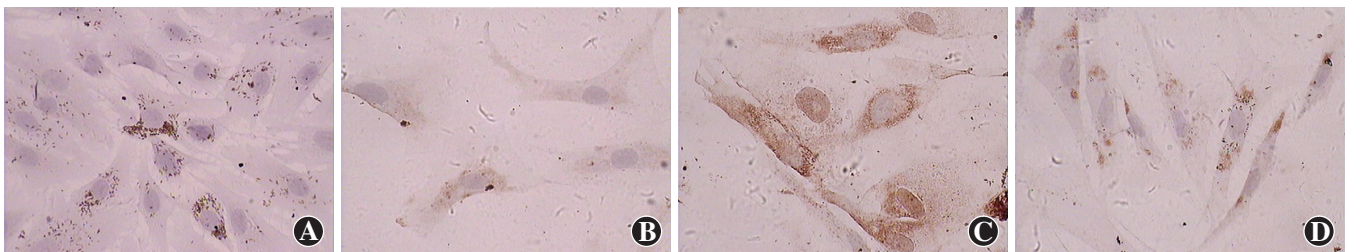


图 6 各组 RPE 细胞中 NF-κBp65 的表达(DAB ×400) A:空白对照组细胞中未见 NF-κBp65 的表达 B:对照组细胞的细胞质中可见 NF-κBp65 呈阳性表达,呈淡棕色染色 C:IL-1β 组细胞的细胞核和细胞质中 NF-κBp65 呈强阳性表达 D:姜黄素+IL-1β 组细胞质中可见 NF-κBp65 表达,强度低于 IL-1β 组,细胞核中无 NF-κBp65 表达

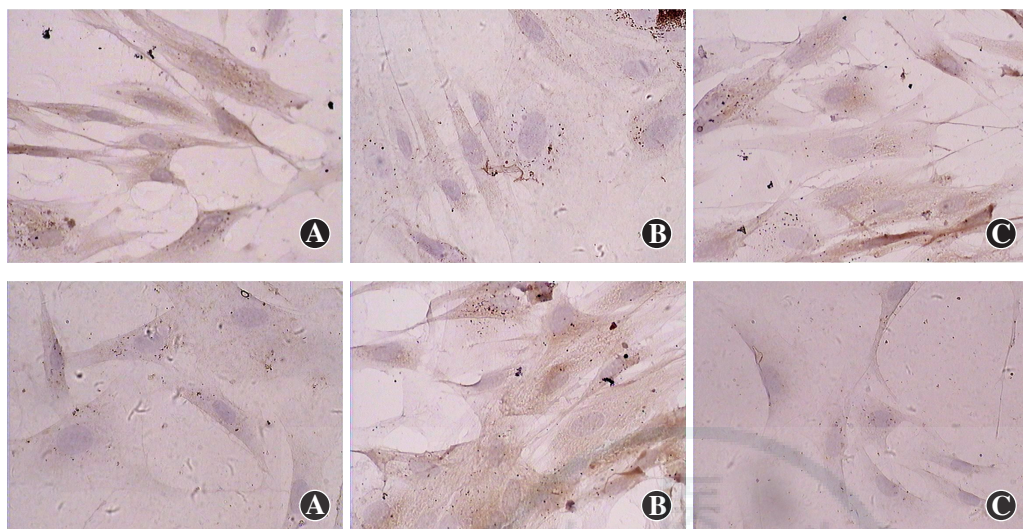


图 7 各组 RPE 细胞中 IκB-α 的表达 (DAB ×400) A: 对照组可见细胞质中 IκB-α 呈阳性表达 B: IL-1β 组细胞质中 IκB-α 呈弱阳性表达 C: 姜黄素+IL-1β 组细胞中 IκB-α 表达较 IL-1β 组增强

图 8 各组 RPE 细胞中 COX-2 的表达 (DAB ×400) A: 对照组细胞质中可见 COX-2 呈弱阳性表达 B: IL-1β 组细胞的细胞质中 COX-2 呈阳性表达, 较对照组细胞表达明显增强 C: 姜黄素+IL-1β 组细胞中 COX-2 表达明显弱于 IL-1β 组

表 5 各组 RPE 细胞中 NF-κBp65、IκB-α 和 COX-2 的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, A$ )

| 组别          | 样本量 | NF-κBp65               | IκB-α                  | COX-2                  |
|-------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|
| 对照组         | 6   | 0.39±0.02              | 0.44±0.03              | 0.26±0.02              |
| IL-1β 组     | 6   | 0.57±0.03 <sup>a</sup> | 0.21±0.02 <sup>a</sup> | 0.39±0.02 <sup>a</sup> |
| 姜黄素+IL-1β 组 | 6   | 0.32±0.02 <sup>b</sup> | 0.45±0.02 <sup>b</sup> | 0.27±0.01 <sup>b</sup> |
| F           |     | 88.06                  | 163.00                 | 52.33                  |
| P           |     | 0.00                   | 0.00                   | 0.00                   |

注:与各自的对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与各自的 IL-1β 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-t 检验) NF-κB:核因子-κB; IκB:核因子 κB 抑制蛋白; COX:环氧合酶; IL:白细胞介素

### 3 讨论

PVR 病理过程的最初阶段是炎症期,其中 RPE 细胞的移行是始动因素。IL-1β 作为 PVR 早期重要的炎症因子,对 RPE 细胞的移行发挥重要作用。天然中药提取物姜黄素具有抗增生、抗炎、抗肿瘤等多重功效,目前已广泛用于多种疾病的基础及临床研究。本研究中选择姜黄素作为研究药物,探讨其在抑制 RPE 细胞移行和抗炎方面的作用,旨在寻找早期防治 PVR 的有效药物。

IL-1β 的促炎机制可能与激活 NF-κB 信号转导通路有关。NF-κB 是重要的转录因子,正常情况下以 p65-p50 二聚体的形式存在于细胞质中,与抑制物 IκB 结合,呈非活性状态<sup>[8]</sup>。经 IL-1β、脂多糖 1、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 等刺激后, NF-κB 被激活, IκB 发生磷酸化和泛素化,并被蛋白酶降解,与 NF-κB 脱离<sup>[9-11]</sup>, NF-κB 进入细胞核内,调节相关基因的转录活性。COX-2 是前列腺素合成限速酶,与炎症的发生和发展密切相关。正常组织或细胞不表达或仅少量表达 COX-2。COX-2 基因具有 NF-κB 的作用位点,在 IL-1β 刺激下, NF-κB 活化并进入细胞

核,与 COX-2 基因上暴露的 NF-κB 位点结合,促使 COX-2 表达显著增加<sup>[2,12-13]</sup>。此外,脂多糖、TNF-α、缓激肽等也可激活 COX-2<sup>[13-16]</sup>,但细胞类型或刺激因子不同,激活途径亦存在差异,如 IL-1β 和 TNF-α 可同时刺激肺泡上皮细胞或单核细胞中 COX-2 的高表达<sup>[13,15]</sup>,但 IL-1β 可引起人呼吸道平滑肌细胞高表达 COX-2<sup>[17-18]</sup>, TNF-α 则无明显影响。IL-1β、脂多糖、TNF-α 引起的 COX-2 高表达均与 NF-κB 信号通路相关<sup>[2,12-15]</sup>,而缓激肽引起的 COX-2 高表达与 NF-κB 信号通路无关,仅与前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 通路有关<sup>[16]</sup>。

有关 IL-1β 作用于各种细胞后激活 NF-κB 信号转导通路研究较多,而对于 RPE 细胞的研究很少。有研究显示,蛋白酶体抑制剂 MG-132 可以抑制 IL-1β 介导的人 RPE 细胞 NF-κB 信号通路,从而降低 RPE 细胞中人巨噬细胞集落刺激因子、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、细胞间黏附分子-1 等的表达<sup>[19]</sup>。另有研究将 NF-κB 抑制剂 PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) 作用于 IL-1β 刺激下的人 RPE 细胞,显示 PDTC 可抑制细胞中 COX-2 和 PGE2 的表达,因此认为 NF-κB 参与调控了 IL-1β 诱导的 RPE 细胞中炎症因子的表达<sup>[12]</sup>。姜黄素是从中药姜黄中提取的有效成分,可作为食品添加剂使用<sup>[20]</sup>,安全性很高。在姜黄素抗炎作用的实验研究中, Sun 等<sup>[3]</sup>发现姜黄素可通过降低 Toll 样受体 4、前炎症因子及小窝蛋白-1 的磷酸化防治糖尿病大鼠肾病; Kant 等<sup>[21]</sup>证实姜黄素可通过抑制 TNF-α、IL-1β 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-9 的表达以促进糖尿病大鼠皮肤伤口的愈合; Lim 等<sup>[10]</sup>的研究显示,姜黄素可抑制脂多糖刺激下的胎盘和胎膜中 IL-6、

IL-8 的表达,降低子宫平滑肌细胞中 IL-1 $\beta$  诱导的 COX-2 的表达,同时降低 PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub> $\alpha$  的表达和 MMP-9 的活性;另有研究证实姜黄素可通过 NF- $\kappa$ B 和 STAT3 途径抑制电磁场作用下小神经胶质细胞内前炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的表达<sup>[22]</sup>。有关姜黄素对 IL-1 $\beta$  诱导的 NF- $\kappa$ B 通路在 RPE 细胞中的作用目前尚未见文献报道,因此,本研究重点探讨姜黄素对体外培养 RPE 细胞抗炎作用及机制。本研究结果显示,10.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  作用于 RPE 细胞后 24 h 细胞即开始移行进入刮伤区,且移行的细胞伸展,形态更加狭长,随着时间的延长,移行细胞数逐渐增加,由此可见 IL-1 $\beta$  对 RPE 细胞的移行作用具有时间依赖性,而对对照组仅有少数细胞移行。姜黄素作用后细胞的移行程度较 IL-1 $\beta$  组显著降低,姜黄素对细胞移行的抑制作用随着时间的延长逐渐增强,同样存在时间依赖性,说明姜黄素具有抗炎作用,且有起效早、作用持续的特点。我们的前期研究证实,姜黄素能有效抑制 IL-1 $\beta$  刺激的 RPE 细胞增生<sup>[6]</sup>,本研究结果亦说明 RPE 细胞移行和增生是相辅相成的过程。关于 IL-1 $\beta$  引起 RPE 细胞移行的相关机制研究发现,IL-1 $\beta$  可以刺激体外培养的 RPE 细胞表达 MCP-1<sup>[1,23]</sup>,促进 PVR 早期各种炎症细胞聚集于病变部位,也可促进 RPE 细胞的移行。Han 等<sup>[24]</sup> 分别将 MCP-1、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  作用于培养的人 RPE 细胞,发现 MCP-1 促移行作用较 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  更为明显,加入抗 MCP-1 抗体后可明显抑制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的促移行作用,因此认为 IL-1 $\beta$  对 RPE 细胞的移行作用可能是通过刺激 RPE 细胞产生 MCP-1 来实现的。Karthikeyan 等<sup>[25]</sup> 的研究则证实,IL-1 $\beta$  可通过激活 Src 酶而促进牛 RPE 细胞的移行和增生。

为了探讨姜黄素的抗炎机制,本研究中先观察了不同质量浓度 IL-1 $\beta$  对 RPE 细胞表达 COX-2 蛋白和 mRNA 的影响,结果显示 3 种质量浓度的 IL-1 $\beta$  作用 24 h 后均可使 RPE 细胞中 COX-2 蛋白表达升高,而 IL-1 $\beta$  质量浓度对 COX-2 蛋白的表达产生一定影响,当 IL-1 $\beta$  质量浓度达 1.0  $\mu$ g/L 时 COX-2 蛋白表达量最高,1.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  作用于 RPE 细胞 48 h 时作用最强。Chin 等<sup>[14]</sup> 研究了 0.001 ~ 10.000  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  作用于体外培养的人 RPE 细胞后 24 h COX-2 蛋白的表达情况,发现 IL-1 $\beta$  质量浓度达 0.5  $\mu$ g/L 时 COX-2 蛋白表达水平最高,这些结果均提示 IL-1 $\beta$  刺激 COX-2 蛋白表达存在阈值,但各研究中引起 COX-2 蛋白表达量最高时的 IL-1 $\beta$  质量浓度值有所不同,可能与细胞种属、实验条件等多种因素有关。

本研究中还对 IL-1 $\beta$  和姜黄素作用于细胞后细胞

中 NF- $\kappa$ Bp65、I $\kappa$ B- $\alpha$  及 COX-2 的表达变化,结果显示 1.0  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  作用于 RPE 细胞后 24、48 和 72 h, COX-2 蛋白和 mRNA、NF- $\kappa$ Bp65 蛋白均较对照组明显升高,作用后 48 h 表达量最高,而 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达则呈相反的趋势。RPE 细胞中 NF- $\kappa$ Bp65 和 COX-2 蛋白表达的一致性以及 COX-2 mRNA 与蛋白表达的一致性充分说明,COX-2 的表达与 IL-1 $\beta$  诱导的 NF- $\kappa$ B 转录活性激活密切相关,COX-2 基因于转录水平被激活,进而引起蛋白的表达。免疫细胞化学染色法显示,IL-1 $\beta$  刺激后 RPE 细胞的细胞核中 NF- $\kappa$ Bp65 表达明显升高,而细胞质中 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达量明显降低,同时细胞质中 COX-2 表达也明显升高,进一步说明 IL-1 $\beta$  可激活 RPE 细胞的细胞质内的 NF- $\kappa$ B,使其进入细胞核后发挥转录活性。姜黄素与 IL-1 $\beta$  共同作用于 RPE 细胞后,细胞中 NF- $\kappa$ Bp65 及 COX-2 的表达均显著抑制,且随着时间的延长抑制作用逐渐增强,说明姜黄素可明显抑制 IL-1 $\beta$  引起的 NF- $\kappa$ Bp65 的核转位及 COX-2 的表达,且作用效果可持续。以上结果提示我们,姜黄素可以通过阻断 NF- $\kappa$ Bp65 信号通路来抑制 RPE 细胞中炎症因子 COX-2 的表达。

综上所述,IL-1 $\beta$  作用于体外培养的兔 RPE 细胞后可通过激活 NF- $\kappa$ B 转导通路来刺激细胞表达炎症因子 COX-2,而姜黄素可显著抑制此过程,该结果为 PVR 治疗中的抗炎措施提供了新的思路,但其疗效尚待进一步的临床研究加以证实。

## 参考文献

- [1] Qin SF, Ni M, de Vries GW, et al. Implication of S-adenosylhomocysteine hydrolase in inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induced expression of inflammatory mediators by AICAR in RPE cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(3): 1274-1281. DOI: 10.1167/iops.07-1109.
- [2] Nie M, Pang L, Inoue H, et al. Transcriptional regulation of cyclooxygenase 2 by bradykinin and interleukin-1 $\beta$  in human airway smooth muscle cells involvement of different promote element, transcription factors, and histone H4 acetylation [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(24): 9233-9244. DOI: 10.1128/MCB.23.24.9233-9244.2003.
- [3] Sun LN, Yang ZY, Lv SS, et al. Curcumin prevents diabetic nephropathy against inflammatory response via reversing caveolin-1 Tyr14 phosphorylation influenced TLR4 activation [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(1): 236-246. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.023.
- [4] 胡艳红, 祁明信, 黄秀榕, 等. 姜黄素对晶状体上皮细胞增殖的抑制作用 [J]. 眼科研究, 2006, 24(2): 122-124.
- [5] Hu YH, Qi MX, Huang XR, et al. Inhibitory effect of curcumin on proliferation of lens epithelial cells [J]. Chin Ophthalmic Res, 2006, 24(2): 122-124.
- [6] Nagy LI, Fehér LZ, Szebeni GJ, et al. Curcumin and its analogue induce apoptosis in leukemia cells and have additive effects with bortezomib in cellular and xenograft models [J/OL]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 968981 [2015-12-23]. http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/968981. DOI: 10.1155/2015/968981.
- [6] 安建斌, 马景学, 高彦军, 等. 姜黄素和苏拉明抑制兔 RPE 细胞增生的对比研究 [J]. 眼科研究, 2008, 26(7): 490-493.
- [6] An JB, Ma JX, Gao YJ, et al. Inhibition effect of curcumin and suramin on proliferation of rabbit retinal pigment epithelial cells [J]. Chin Ophthalmic Res, 2008, 26(7): 490-493.



[7] 刘丽娅, 马景学, 高彦军, 等. 兔眼与猪视网膜色素上皮细胞分离及培养方法的对比[J]. 眼科研究, 2010, 28(1): 11-14. DOI: 10.3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 01. 004.  
Liu LY, Ma JX, Gao YJ, et al. Comparison of *in vitro* isolation and culture of retinal pigment epithelial cells in rabbit eye and pig eye[J]. Chin Ophthalmic Res, 2010, 28(1): 11-14. DOI: 10.3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 01. 004.

[8] Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after[J]. Cell, 1996, 87(1): 13-20. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81318-5.

[9] Cao WG, Morin M, Metz C, et al. Stimulation of macrophage migration inhibitory factor expression in endometrial stromal cells by interleukin 1, beta involving the nuclear transcription factor NF-kappa B [J]. Biol Reproduct, 2005, 73(3): 565-570. DOI: 10.1095/biolreprod.104.038331.

[10] Lim R, Barker G, Wall CA, et al. Dietary phytophenols curcumin, naringenin and apigenin reduce infection-induced inflammatory and contractile pathways in human placenta, foetal membranes and myometrium [J]. Mol Human Reprod, 2013, 19(7): 451-462. DOI: 10.1093/molehr/gat015.

[11] Yang P, McKay BS, Allen JB. Effect of mutant I-kappa B on cytokine-induced activation of NF-kappa B in cultured human RPE cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(3): 1339-1347.

[12] Chin MS, Nagineni CN. Cyclooxygenase-2 gene expression and regulation in human retinal pigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(10): 2338-2346.

[13] Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, et al. Evidence for involvement of NF-kappa B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237(1): 28-32. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7064.

[14] Inoue H, Tanabe T. The transcriptional role of the nuclear factor kappa B site in induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244(1): 143-148. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8222.

[15] Jobin C, Morteau O, Han DS, et al. Specific NF-kappa B blockade selectively inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells[J]. Immunology, 1998, 95(4): 537-543. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1998.00646.x.

[16] Pang L, Knox AJ. PGE2 release by bradykinin in human airway smooth muscle cells; involvement of cyclooxygenase-2 induction [J]. Am J Physiol, 1997, 273(6 Pt 1): L1132-1140.

[17] Belvisi MG, Saunders MA, Haddad EB, et al. Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells; novel inflammatory role of this cell type [J]. Br J Pharmacol, 1997, 120(5): 910-916. DOI: 10.1038/sj.bjpp.0700963.

[18] Pang L, Knox AJ. Effect of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the induction of cyclooxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells[J]. Br J Pharmacol, 1997, 121(3): 579-587. DOI: 10.1038/sj.bjpp.0701152.

[19] Wang XC, Jobin C, Allen JB. Suppression of NF-kappa B-dependent proinflammatory gene expression in human RPE cells by a proteasome inhibitor[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(2): 477-486.

[20] Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of curcuma longa [J]. Planta Medica, 1991, 57(1): 1-7. DOI: 10.1055/s-2006-960004.

[21] Kant V, Gopal A, Pathak NN, et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20(2): 322-330. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.03.009.

[22] He GL, Liu Y, Li M, et al. The amelioration of phagocytic ability in microglial cells by curcumin through the inhibition of EMF-induced proinflammatory responses [J/OL]. J Neuroinflammation, 2014, 19(11): 49 [2015-11-21]. <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-11-49>. DOI: 10.1186/1742-2094-11-49.

[23] Bian ZM, Elner SG, Yoshida A, et al. Activation of p38, ERK1/2 and NIK pathways is required for IL-1b and TNF-a-induced chemokine expression in human retinal pigment epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2001, 73(1): 111-121. DOI: 10.1006/exer.2001.1019.

[24] Han QH, Hui YN, Du HJ. Migration of retinal pigment epithelial cells in vitro modulated by monocyte chemoattractant protein-1: enhancement and inhibition [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2001, 239(7): 531-538.

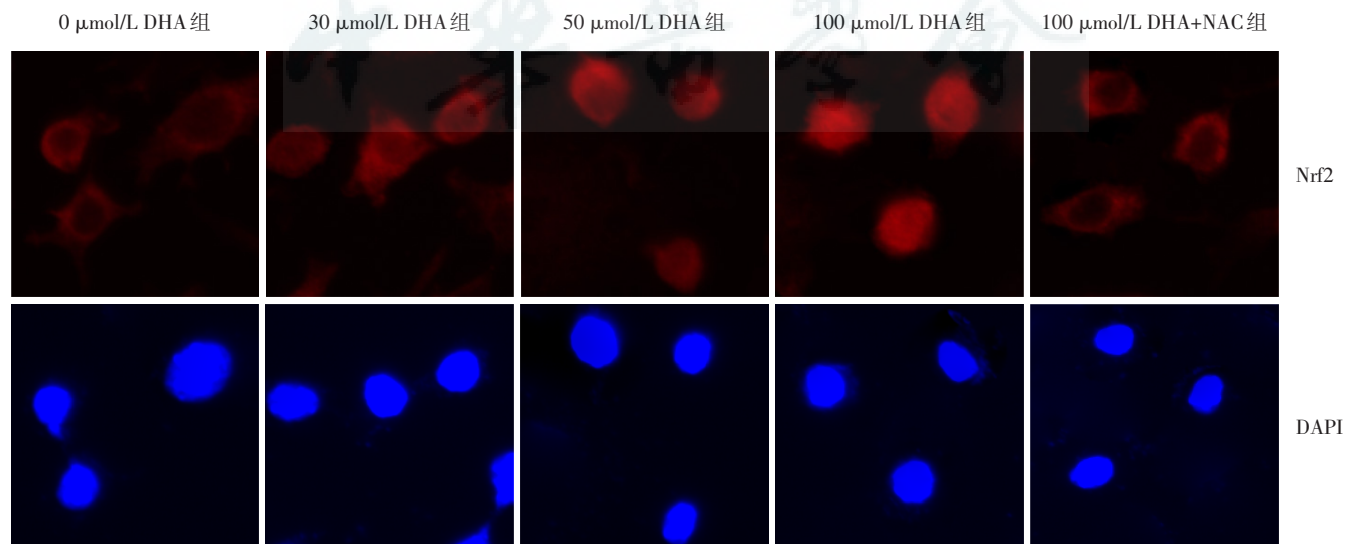
[25] Karthikeyan B, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, et al. Gold nanoparticles downregulate VEGF and IL-1beta-induced cell proliferation through Src kinase in retinal pigment epithelial cells [J]. Exp Eye Res, 2010, 91(5): 769-778. DOI: 10.1016/j.exer.2010.09.003.

(收稿日期: 2016-02-04)

(本文编辑: 尹卫靖)

### 更正

本刊 2016 年第 34 卷第 8 期第 682 页刊出的刘越峰等作者的文章《二十二碳六烯酸对人视网膜色素上皮细胞中血红素氧合酶-1 表达的诱导作用》中图 9A 由于排版问题发生错误, 应改正如下, 特此更正。



(本刊编辑部)