DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2015.06.005

·基础医学·

姜黄素以端粒酶为靶点治疗 Aβ 损伤的体外研究

肖子建，谢　明*，周桂娟，兰　芳，邓　琦
（南华大学附属第一医院神经内科，湖南 衡阳 421001）

摘　要：目的　探讨端粒酶在姜黄素治疗 β 淀粉样蛋白（Aβ）损伤的神经保护效应中的作用。　**方法**　用 Aβ1-42（10 μg/mL）预处理 SK-N-SH 细胞建立损伤的细胞模型后，用姜黄素（10 μg/mL）干预治疗组，处理前后检测细胞存活率、细胞内氧化应激水平及 hTERT 的表达水平，并通过 RNA 干扰技术降低 hTERT 的表达，以此验证端粒酶在姜黄素的干预作用中所起的作用。　**结果**　Aβ1-42 预处理组的氧化应激水平及细胞毒性均有显著增高（$P<0.001$），hTERT 的表达水平明显下降（$P<0.001$）。姜黄素干预使 SK-N-SH 细胞免受 Aβ1-42 损伤（$P<0.001$）并上调 hTERT 的表达水平（$P<0.001$）。而当端粒酶活性被 TERT 的小分子干扰 RNA 抑制后，姜黄素的神经保护作用也随之消失（$P>0.05$）。　**结论**　姜黄素对抗 Aβ 毒性的神经保护作用有赖于端粒酶活性，端粒酶则可能是姜黄素治疗效应的靶点。

关键词： β 淀粉样蛋白；　姜黄素；　端粒酶；　人端粒酶逆转录酶
中图分类号：R741　　**文献标识码：**A

Telomerase: a Target for Therapeutic Effects of Curcumin and a Curcumin Derivative in Aβ Insult in vitro

XIAO Zijian, XIE Ming, ZHOU Guijuan, et al
(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan* 421001, *China*)

Abstract: Objective　To investigate whether telomerase was involved in the neuroprotective effect of curcumin against Aβ.　**Methods**　Aβ1-42 (10 μg/mL) was used to establish a damaged cell model and curcumin (10 μg/mL) was used in treatment groups. Cell survival and cell growth, intracellular oxidative stress and hTERT expression was measured. After RNA interference, the effects of curcumin on cells were verified.　**Results**　Exposure to Aβ1-42 resulted in significant oxidative stress and cell toxicity, and the expression of hTERT was significantly decreased ($P<0.001$). Curcumin protected SK-N-SH cells from Aβ1-42 and up-regulated the expression of hTERT ($P<0.001$). However, when telomerase activity was inhibited by TERT siRNA, the neuroprotection by curcumin was whittled ($P>0.05$).　**Conclusion**　The neuroprotective effect of curcumin against Aβ depends on telomerase activity, and thus telomerase may be a target for therapeutic effect of curcumin.

Key words: amyloid-beta;　curcumin;　telomerase;　human telomerase reverse transcriptase

β 淀粉样蛋白（amyloid-beta peptide, Aβ）普遍被认为是导致阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）一切神经损伤的根源[1]，Aβ 的聚积在 AD 发生及发展过程中起着重要作用[2]。在一些以 Aβ 为靶点进行抑制 Aβ 聚积并抑制其神经毒性的研究中，已发现一些天然中药成分可抑制 Aβ 聚积并且对抗 Aβ 神经毒性，姜黄素就是这些天然中药成分中首当其冲的典型代表。姜黄素能以脂类介导的自由扩散的方式穿过血脑屏障进入脑组织，与 Aβ 沉淀形成特异性结合。本研究团队先期体外实验研究发现其中姜黄素能有效对抗 Aβ 的神经毒性，促进细胞骨架蛋白表达，维持细胞的正常形态[3]。本研究通过观察姜黄素对细胞存活率及细胞内氧化应激水平、hTERT 表达水平的影响，通过观察 RNA 干扰导

收稿日期：2015－07－26；**修回日期：**2015－10－13
* **通讯作者，**E-mail：634029592@qq.com.

致 hTERT 表达降低后,姜黄素对细胞存活率及细胞内氧化应激水平的影响,探讨端粒酶在姜黄素对抗 Aβ 毒性的神经保护作用中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂 人神经母细胞瘤细胞(SK-N SH)细胞株购自中山大学实验动物中心。

姜黄素、Aβ1-42 均购自 Sigma 公司,兔抗人端粒酶逆转录酶(hTERT)单克隆抗体购自 Millipore 公司,活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所,谷胱甘肽测定试剂盒购自凯基生物科技发展有限公司,小分子 RNA 购自苏州吉玛公司。

1.2 模型建立及分组 对照组:正常培养 5 天的 SK-N SH 细胞,无特殊处理。Aβ1-42 损伤组:将 10 μg/mL 经老化处理的 Aβ1-42 加入传代后培养第 3 天的 SK-N SH 细胞中,置于 37℃ 培养箱继续培养 24 h。姜黄素干预组:将 10 μg/mL 经老化处理的 Aβ1-42 以及姜黄素(终浓度为 10 μg/mL)加入传代后培养第 3 天的 SK-N SH 细胞中,置于 37℃ 培养箱继续培养 24 h。

1.3 MTT 法检测细胞存活率 二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲臜,用酶标仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值,在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。根据测得的吸光度值(OD 值),来判断活细胞数量,OD 值越大,细胞活性越强。

1.4 Western Blot、实时定量 PCR Western Blot 检测 hTERT 蛋白的表达,实时定量 PCR 测定 hTERT mRNA 的表达。小分子 RNA 转染至细胞内,验证转染率及转染效率,然后再次利用上述方法进行细胞检测。

1.5 统计学分析 所有结果均将对照组设定为 100%,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,而率以百分比表示。各组之间的差异进行了秩和检验分析,两两比较采用 χ^2 检验分析。$P<0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结 果

2.1 姜黄素的神经保护作用 MTT 检测细胞生存率的结果显示,SK-N-SH 细胞在 Aβ1-42 处理了 24 h 之后,生存率约降低至正常水平的 61.67%($P<0.001$),而姜黄素对细胞有保护作用(图 1),姜黄素组与 Aβ1-42 组比较具有显著的统计学差异($P<0.001$),这说明姜黄素能对抗 Aβ1-42 的毒性作用,从而改善细胞存活率。

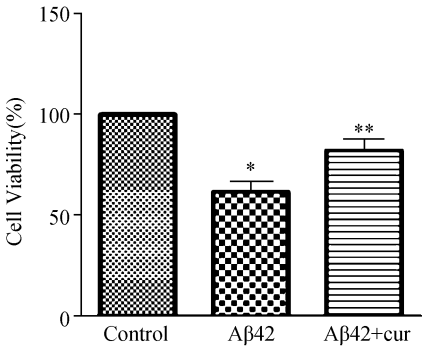

图 1 姜黄素处理细胞后细胞存活率 MTT 检测结果 Aβ1-42 组与对照组比较,*:$P<0.001$;姜黄素组与 Aβ1-42 组比较,**:$P<0.001$

2.2 姜黄素上调 hTERT 的表达 经过 Aβ1-42 处理以后,hTERT 的蛋白及 mRNA 水平明显下降($P<0.001$),说明 Aβ1-42 可明显抑制 hTERT 表达;在姜黄素预处理后,hTERT 的蛋白及 mRNA 水平下降的趋势得以逆转($P<0.001$,图 2),姜黄素可明显上调 SK-N-SH 细胞中 hTERT 的表达,说明姜黄素可明显上调 hTERT 表达。

2.3 筛选最高效的 siRNA 下调 hTERT 表达 经过实时定量 PCR 及 western blot 检测,结果发现所有 siRNA 转染后都可下调 hTERT 的表达,在这 3 条 siRNA 中,TERT-homo-2919 是最高效的(图 3)。本研究选用 TERT-homo-2919(GAG CCA GUC UCA CCU UCA ATT UUG AAG GUG AGA CUG GCU CTT)组作为随后实验的干扰组。

2.4 细胞经 RNA 干扰后姜黄素无神经保护作用 经 MTT 检测细胞存活率,发现在 Aβ1-42 处理24 h 以后,SK-N-SH 细胞的存活率大约下降至正常水平的 61.67%($P<0.001$);在 siRNA 干扰后,细胞存活率大约下降至正常水平的 55.81%($P<0.001$)。此外,经 siRNA 干扰随后用 Aβ1-42 处理 24 h 的胞存活率大约下降至正常水平的 36.63%($P<0.001$,图 4)。此时,姜黄素(36.26%)不再显示出对细胞的保护作用。2919 + Aβ42 组与 2919 + Aβ42 + curcumin 组之间比较无统计学差异($P>0.05$)。结果提示在细胞经过 siRNA 干扰后,姜黄素对细胞丧失了改善细胞存活率的功能。

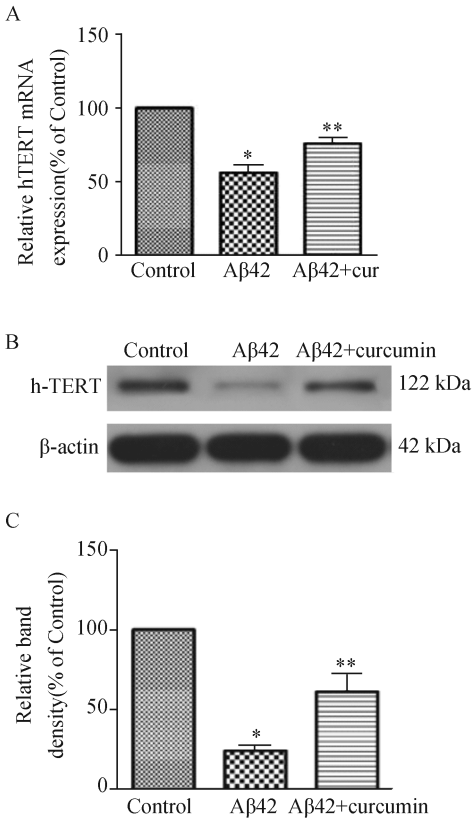

图 2　hTERT mRNA 水平(A)及蛋白水平(B、C)的定量　Aβ1-42 组与对照组比较，*：$P<0.001$；姜黄素组与 Aβ1-42 组比较，**：$P<0.001$

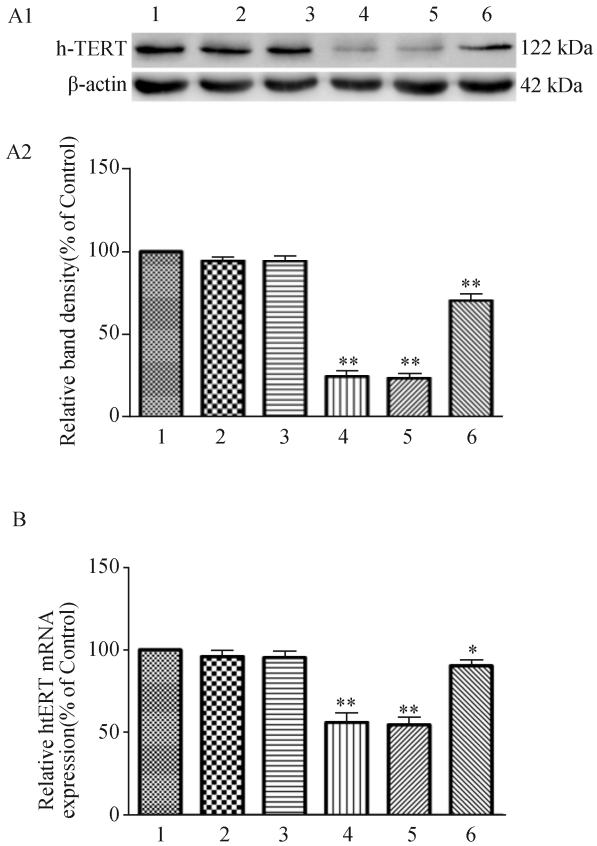

图 3　检验 siRNA 的干扰效果　A1：western blot 检测 hTERT 蛋白表达；A2：对 western blot(A1)的定量分析；B：实时定量 PCR 检测 hTERT mRNA 表达.　1：Control；2：trasfection reagent control；3：negative control；4：1797 组；5：2919 组；6：3042 组.　与对照组比较，*：$P<0.01$；与对照组比较，**：$P<0.001$

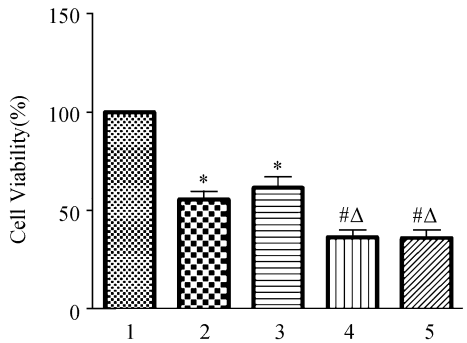

图 4　细胞经过 siRNA 干扰后，MTT 检测姜黄素对 SK-N-SH 细胞存活率的影响　1：Control；2：2919 组；3：Aβ42 组；4：2019 + Aβ42 组；5：2019 + Aβ42 + curcumin 组. 与对照组比较，*：$P<0.001$；与 2919 组比较，#：$P<0.001$；与 Aβ42 组比较，Δ：$P<0.001$

3　讨　　论

Aβ 促氧化应激假说[4]指出 Aβ 的生成及其产生的细胞损伤都会导致 AD 患者脑内氧化应激水平升高。氧化应激增加时，出现内质网蛋白折叠功能受损，同时还出现自吞噬介导和蛋白酶体介导的受损蛋白质的清除缺陷，这些加速 AD 中淀粉样肽和 tau 蛋白的聚集[5]。活性反应组分会造成细胞膜脂质被破坏、DNA 裂解、蛋白氧化，最后引起细胞凋亡[6]。在本研究中，10 μg/mL Aβ1-42 处理 24 h 后产生细胞毒性，导致 SK-N-SH 细胞产生明显的氧化应激，这进一步证实了 Aβ 可引发氧化应激，产生大量自由基，最后诱导细胞发生衰老及凋亡。本研究采用的 Aβ 浓度要远高于生理浓度，此时可溶的 Aβ 会发生构象改变，形成 β 片层样结构[7]，这个状态下的 Aβ 易发生纤维聚积，并诱导更多的 Aβ 片段发生错误折叠[8]。Aβ 浓度过高、发生 β 折叠及纤维形成正是 Aβ 具有神经毒性作用的基础。

人端粒酶包含 3 个亚单位，分别是人端粒酶逆

转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR)以及角化不良蛋白(dyskerin, DKC1)[9]。hTERT 可用单链 RNA 为模板复制出单链 DNA。某些早老综合征的研究中可发现较短的端粒[10],一些研究表明基于端粒酶的治疗策略在对于抗衰老的治疗中起重要作用。早前的体外研究发现低浓度的 Aβ 可明显地抑制端粒酶的活性[11],用 Aβ 及反义核苷酸技术抑制 PC12 细胞中 TERT 的表达后,未分化的 PC12 细胞发生凋亡率明显超过对照组,端粒酶受体受到 Aβ 抑制的细胞的凋亡也明显加速[12]。本实验发现 Aβ1-42 处理 SK-N-SH 细胞后,实时定量 PCR 及蛋白质印迹的结果进一步证实 hTERT 的表达明显减少。结果进一步表明 SK-N-SH 细胞的活性发生改变很有可能是由于 Aβ1-42 抑制 hTERT 的表达所致,此时细胞的端粒酶活性下降,Aβ 诱导氧化应激、线粒体功能障碍及细胞凋亡的毒性作用明显增强。

姜黄素被证实具有广泛的药理学活性,在传统医学中已经有数千年的应用历史,已逐渐成为医学界的研究热点[13]。姜黄素具有独特的抗氧化活性,并通过降低氧化应激水平改善淀粉样病变,这主要是通过刺激转录因子 Nrf2 的表达[14],抑制 MAP 激酶信号以及影响细胞分裂周期来对抗氧化的谷氨酸毒性[15],从而抑制氧化应激对 AD 脑中 Aβ 所诱导神经毒性的影响。本研究结果发现,10 μg/mL 姜黄素能明显改善细胞存活率,保护 SK-N-SH 细胞免受 Aβ1-42 的损伤。结果还发现,姜黄素预处理细胞还可对抗 Aβ1-42 损伤而上调 hTERT 的表达,免疫荧光结果显示 SK-N-SH 细胞数目增多,细胞形态也得以明显改善。这有悖于之前一些关于癌症的研究[16-17]得出的结论,这些研究发现姜黄素会抑制肿瘤细胞中端粒酶的活性而促使肿瘤细胞凋亡,然而本研究却发现姜黄素非但没有抑制端粒酶的活性,而且还能上调 hTERT 的表达,使端粒酶活性增加。因此,在仔细研读了这些关于姜黄素治疗癌症的相关文献后,发现这些研究中所采用的姜黄素浓度要远远高于本研究采用的浓度,猜测姜黄素的剂量可能是造成本研究结果与那些研究存在差异的根本原因,另外还有一个可以用来解释矛盾的原因就是用于实验的细胞类型有所不同。

然而,端粒酶的活性被 TERT 小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)干扰以后,端粒酶活性丧失,姜黄素的神经保护作用也随之消失,不再具有改善细胞存活率以及抗氧化应激的作用。由此推测姜黄素的神经保护作用很有可能是建立在端粒酶具有活性的前提之下的,换而言之,端粒酶很可能是姜黄素治疗 Aβ 损伤的靶点之一。端粒酶及 TERT 在 AD 模型中可以增强神经细胞对包括 Aβ 在内的细胞毒性物质损伤的抵抗,姜黄素有可能是通过增加 hTERT 表达,增加端粒酶的活性,使端粒延长,促进细胞的有丝分裂且抑制细胞产生衰老或凋亡,从而保护细胞免受 Aβ 损伤。

总之,本研究结果表明 Aβ 可促使 SK-N-SH 细胞凋亡、抑制 hTERT 表达,姜黄素具备对抗 Aβ1-42 神经毒性的作用,能抑制 Aβ1-42 诱导的细胞衰老及细胞凋亡,对神经细胞形态及功能均有保护作用。鉴于姜黄素具有特异性结合 Aβ、易穿过血脑屏障[18]以及中药低毒性等一些天然优势,因而有理由相信姜黄素在治疗 AD 方面有十分广阔的应用前景。RNA 干扰后 SK-N-SH 细胞上的端粒酶失去活性,姜黄素对抗 Aβ 毒性的细胞保护作用随之消失,提示姜黄素的神经保护作用可能是建立在端粒酶活性的基础上的,端粒酶可能是姜黄素治疗 Aβ 损伤的靶点。若能明确端粒酶的特性及其活化条件,重建 hTERT 及端粒酶活性,延缓细胞衰老,抵抗细胞凋亡,或许能为 AD 的防治提供更好更有效的方法。

参考文献:

[1] Clark JK, Furgerson M, Crystal JD, et al. Alterations in synaptic plasticity coincide with deficits in spatial working memory in presymptomatic 3xTg-AD mice[J]. Neurobiol Learn Mem, 2015, 125: 152-162.

[2] Williams TL, Urbanc B, Marshall KE, et al. Europium as an inhibitor of Amyloid-beta(1-42) induced membrane permeation[J]. FEBS Lett, 2015, 589(21): 3228-3236.

[3] Xiao Z, Lin L, Liu Z, et al. Potential therapeutic effects of curcumin: relationship to microtubule-associated proteins 2 in Abeta1-42 insult[J]. Brain Res, 2010, 1361: 115-123.

[4] Parsi S, Smith PY, Goupil C, et al. Preclinical Evaluation of miR-15/107 family members as multifactorial drug targets for alzheimer's disease[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2015, 4: e256.

[5] Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, et al. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus[J]. Am J Pathol, 2009, 174(4): 1241-1251.

(下转第 650 页)

(上接第 621 页)

[6] Axelsen PH, Komatsu H, Murray IV. Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Physiology (Bethesda), 2011, 26(1): 54-69.

[7] 闫秀明,单可人,官志忠. Aβ 在 AD 发病中的作用及中药有效成分对其神经保护作用的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 27(3): 286-288.

[8] Mclean CA, Cherny RA, Fraser FW, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. Ann Neurol, 1999, 46(6): 860-866.

[9] Chiba K, Johnson JZ, Vogan JM, et al. Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing [J]. Elife, 2015, 4.

[10] Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(8): 611-622.

[11] Chiu WT, Shen SC, Yang LY, et al. Inhibition of HSP90-dependent telomerase activity in amyloid beta-induced apoptosis of cerebral endothelial cells[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(8): 2041-2051.

[12] Fu W, Begley JG, Killen MW, et al. Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cells [J]. J Biol Chem, 1999, 274(11): 7264-7271.

[13] 李熠,匡双玉,王北冰,等. 姜黄素对巨噬细胞源性荷脂细胞胆固醇水平及 caveolin-1 表达的影响[J]. 南华大学学报:医学版, 2009, 37(1): 18-20.

[14] Salvioli S, Sikora E, Cooper EL, et al. Curcumin in cell death processes: a challenge for CAM of age-related pathologies[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2007, 4(2): 181-190.

[15] Suh HW, Kang S, Kwon KS. Curcumin attenuates glutamate-induced HT22 cell death by suppressing MAP kinase signaling[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 298(1-2): 187-194.

[16] Khaw AK, Hande MP, Kalthur G, et al. Curcumin inhibits telomerase and induces telomere shortening and apoptosis in brain tumour cells[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(6): 1257-1270.

[17] Ramachandran C, Fonseca HB, Jhabvala P, et al. Curcumin inhibits telomerase activity through human telomerase reverse transcritpase in MCF-7 breast cancer cell line[J]. Cancer Lett, 2002, 184(1): 1-6.

[18] Lim GP, Chu T, Yang F, et al. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse [J]. J Neurosci, 2001, 21(21): 8370-8377.

(此文编辑:朱雯霞)