

# 姜黄素对高糖培养下大鼠神经胶质瘤细胞 C6 中 p53、Siah-1 和突触素蛋白表达的影响<sup>Δ</sup>

刘晓惠\*, 赵延欣, 刘学源<sup>#</sup>(同济大学医学院附属第十人民医院神经内科, 上海 200072)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)23-3178-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.23.03

**摘要** 目的:体外研究姜黄素对高糖培养下大鼠神经胶质瘤细胞 C6 中抑癌基因 p53、E3 泛素连接酶 Siah-1 和认知相关蛋白突触素(Synaptophysin)表达的影响。方法:采用 CCK-8 法检测 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μmol/L 姜黄素在高糖培养下作用 C6 细胞 24、48 h 后的细胞存活率。采用 Western blot 法和实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测作用 24 h 后正常对照组(无任何处理)、高糖培养组和姜黄素低、高浓度组(高糖+10、30 μmol/L 姜黄素)细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin 蛋白及 mRNA 的表达情况;另同法检测高糖培养下小干扰 RNA(siRNA)沉默 C6 细胞中 p53 基因后对 Siah-1 蛋白及 mRNA 表达的影响。结果:姜黄素在 10~40 μmol/L 浓度范围内对 C6 细胞存活率无明显影响,大于 40 μmol/L 浓度后呈浓度依赖性降低细胞存活率。与正常对照组比较,高糖培养组 C6 细胞中 p53、Siah-1 蛋白及 mRNA 表达增强, Synaptophysin 蛋白及 mRNA 表达减弱,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与高糖培养组比较,姜黄素低、高浓度组 C6 细胞中 p53、Siah-1 蛋白及 mRNA 表达减弱, Synaptophysin 蛋白及 mRNA 表达增强,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。高糖培养下,沉默 p53 基因后的 C6 细胞中 Siah-1 蛋白及 mRNA 表达均明显减弱( $P < 0.05$ )。结论:高糖条件下,姜黄素可通过下调 C6 细胞中 p53、Siah-1 表达,进而上调 Synaptophysin 表达。

**关键词** 姜黄素;高糖;p53;大鼠神经胶质瘤细胞 C6;突触素

## Effects of Curcumin on the Expression of p53, Siah-1 and Synaptophysin in Glioma Cells C6 of Rats Cultured in High Glucose

LIU Xiaohui, ZHAO Yanxin, LIU Xueyuan (Dept. of Neurology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China)

- www.statcan.gc.ca/daily-quotidien/140714/dq140714a-eng.htm.
- [18] 吴永佩, 颜青. 国外医院药学的地位与药师的价值[J]. 中国医院, 2013, 10(17): 55-56.
- [19] MCDONALD A. Pharmacists part of prescription for medicare[EB/OL]. [2018-01-12]. <http://news.gallup.com/poll/8980/Pharmacists-Part-Prescription-Medicare.aspx>.
- [20] MILLER P. Physician appointment wait times up 30% from 2014[EB/OL]. [2018-01-12]. <https://www.merri-thawkins.com/news-and-insights/media-room/press/Physician-Appointment-Wait-Times-Up-from-2014/>.
- [21] HALE JC, MURAWSKI MM, IVES TJ. Practice characteristics and geographic distribution of clinical pharmacist practitioners in North Carolina[J]. *N C Med J*, 2015, 76(4): 205-210.
- [22] SIMPSON S. Six in ten (61%) ontarians would visit their pharmacist for administration of drugs and immunizations, if they had the proper training and government authorization[EB/OL]. [2018-01-12]. <https://www.ipsos.com/en-ca/six-ten-61-ontarians-would-visit-their-pharmacist-administration-drugs-and-immunizations-if-they>.
- [23] 徐敢. 借鉴国外经验推动高等药学教育向服务型人才培养转型[J]. 中国药事, 2017, 31(8): 833-837.
- [24] 区政强. 美国零售连锁药店的特点与借鉴[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(67): 289-291.
- [25] 倪新兴, 陶钊, 李玲, 等. 论我国临床药师处方权[J]. 中国药房, 2016, 27(17): 2422-2424.
- [26] DOUCET G. CPhA national survey: Canadians trust pharmacists and support their enhanced role in the delivery of quality care and services[J]. *Can Pharm J (Ott)*, 2015, 148(3): 160.
- [27] American College of Clinical Pharmacy. Standards of practice for clinical pharmacists[J]. *Pharmacotherapy*, 2014, 34(8): 794-797.

(收稿日期: 2018-03-19 修回日期: 2018-10-09)

(编辑: 刘明伟)

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81771131、81571033); 上海市科研计划项目(No.17411950100)

\* 医师, 硕士。研究方向: 认知功能障碍。E-mail: hantwom-en@yeah.net

<sup>#</sup> 通信作者: 主任医师, 教授, 博士。研究方向: 脑血管病与早期认知功能障碍。E-mail: hantwom-en@yeah.net

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of curcumin on the expression of tumor suppressor gene p53, E3 ligase Siah-1 and cognitive associated protein Synaptophysin in glioma cells C6 of rats cultured in high glucose. METHODS: CCK-8 assay was used to detect survival rate of C6 cells after treated with 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu\text{mol/L}$  curcumin for 24, 48 h under high glucose environment. Western blot method and RT-PCR method were adopted to detect the protein and mRNA expressions of p53, Siah-1 and Synaptophysin in C6 cells of normal control group (without any treatment), high glucose treatment group, curcumin low-concentration and high-concentration groups (high glucose+10, 30  $\mu\text{mol/L}$  curcumin) after cultured for 24 h. Same method was used to determine the effects of P53 gene of C6 cells on protein and mRNA expression of Siah-1 after transfected with siRNA under high glucose environment. RESULTS: Curcumin had no significant effect on the survival rate of C6 cells in the range of 10-40  $\mu\text{mol/L}$ . The survival rate of C6 cells decreased significantly in a concentration-dependent manner when the concentration of curcumin was higher than 40  $\mu\text{mol/L}$ . Compared with normal control group, the protein and mRNA expressions of p53 and Siah-1 in C6 cells were enhanced in high glucose treatment group, while the protein and mRNA expressions of Synaptophysin were decreased, with statistical significance ( $P<0.05$ ). Compared with high glucose treatment group, the protein and mRNA expressions of p53 and Siah-1 in C6 cells were decreased in curcumin low-concentration and high-concentration groups, while the protein and mRNA expressions of Synaptophysin were enhanced, with statistical significance ( $P<0.05$ ). Under treated with high glucose, the protein and mRNA expressions of Siah-1 in C6 cells were decreased significantly after silencing p53 gene ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: Under high glucose environment, curcumin can up-regulate the expression of Synaptophysin in C6 cells by down-regulating the expression of p53 and Siah-1.

**KEYWORDS** Curcumin; High glucose; p53; Glioma cells C6 of rats; Synaptophysin

姜黄素(Curcumin)是一种相对分子量较小的酚类化合物,提取于姜科黄属植物的根茎,是疏肝药物郁金、姜黄、莪术中的主要活性成分。姜黄素具有抗肿瘤、抗炎、降血脂、降血糖的功效<sup>[1]</sup>,同时由于姜黄素含有阿魏酸钠的活性成分,而后者在临床上具有改善脑微循环、清除氧自由基、抗凋亡等作用,并且毒副作用小<sup>[2]</sup>,具有巨大的临床应用潜力。

糖尿病是认知功能障碍发生的独立危险因素之一,其与认知功能障碍的发展有关。据报道,在65岁以上的住院患者中,约有26%患有糖尿病<sup>[3]</sup>。流行病学研究<sup>[4-5]</sup>和生物学证据<sup>[6-8]</sup>支持老年糖尿病患者更容易患各种类型的痴呆症<sup>[9]</sup>。同时动物实验也表明,糖尿病可明显减少海马苔藓纤维末梢和突触小泡的数量,导致实验动物的认知功能下降<sup>[10]</sup>。本研究将以大鼠的神经胶质瘤细胞C6为研究对象,通过体外模拟高糖环境重点探究不同浓度姜黄素对C6细胞中抑癌基因p53、E3泛素连接酶Siah-1和突触素(Synaptophysin)表达的影响,以期为改善糖尿病患者的认识功能障碍提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Genesys 10型紫外分光光度计、BB15型CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo公司);Microfuge 20R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司);TE22型蛋白转膜系统(美国GE公司);聚丙烯酰胺垂直电泳系统(德国Biometra公司);Elx800型酶联免疫检测仪(美国Bio-Tek公司);Licor Odyssey型双色红外荧光成像系统(美国Li-Cor公司);2720型聚合酶链式反应仪(美国ABI公司)。

### 1.2 药品与试剂

姜黄素对照品(货号:458-37-7,纯度:98%)、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶、牛血清白蛋白(BSA)均购自美国Sigma公司;DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素和链霉素均购自美国Gibco公司;CCK-8细胞活性检测试剂盒(日本Dojindo公司);实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒和PrimeScript RT reagent Kit逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司);KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix试剂盒(北京普凯瑞生物科技有限公司);兔抗Synaptophysin单克隆抗体(货号:ab52636)、小鼠抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(货号:ab6276)、山羊抗Siah-1多克隆抗体(货号:ab131442)和兔抗p53多克隆抗体(货号:sc-5505)均购自美国Abcam公司;抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体(美国Li-Cor公司);磷酸酶抑制剂PhosStop(美国Sigma公司,货号:P0044,纯度:98%)、RIPA裂解液、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液、20 $\times$ 磷酸盐缓冲溶液(PBS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)均购自碧云天生物技术有限公司;Tris缓冲液、甘氨酸、脱脂奶粉、无水乙醇、甲醇均购自上海生工生物有限公司;小干扰RNA(siRNA)委托上海领科生物有限公司构建完成。

### 1.3 细胞

大鼠神经胶质瘤细胞C6购于中国科学院上海生物化学和细胞生物研究所。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养、分组与给药

取C6细胞,以含1%双抗(青霉素、链霉素)、10% FBS、25 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基培养,设为正常对照组;以含1%双抗(青霉素、链霉素)、10% FBS、50 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基培养,设为高糖培养组;

取 10 mg 姜黄素溶于 2.714 5 mL DMSO 中得到浓度为 10 mmol/L 的母液,用培养基稀释,加入到高糖培养 3 d 后的细胞培养皿中,使姜黄素终浓度分别达到 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100  $\mu\text{mol/L}$ ,分别作用 24、48 h,设为姜黄素处理组。

## 2.2 CCK-8 法检测细胞存活率

按 CCK-8 细胞活性检测试剂盒操作方法,检测“2.1”项下不同浓度姜黄素处理组作用 24、48 h 后细胞的存活率,根据结果筛选出不影响细胞存活率的姜黄素浓度和作用时间。细胞存活率(%)=[给药组吸光度(OD 值) - 空白组 OD 值]/(对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)  $\times 100\%$ ,其中对照组中不加姜黄素,空白组中不加姜黄素和 C6 细胞。

## 2.3 Western blot 法检测细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin 蛋白表达

将 10  $\mu\text{L}$  PMSF 加入至 1 mL RIPA 裂解液中配制成蛋白裂解液,分别裂解抽提“2.1”项下正常对照组、高糖培养组和姜黄素低、高浓度组(10、30  $\mu\text{mol/L}$ )作用 24 h 后细胞中的总蛋白,以二喹啉甲酸(BCA)试剂盒对蛋白浓度进行定量,得到不同样品的蛋白浓度后按照 1:6 的比例加入 6 $\times$ 上样缓冲液,100  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。按照总蛋白量为 40  $\mu\text{g}$  计算上样量,用移液枪将适量蛋白样品加入上样孔,成功上样后将电泳仪调至恒压 80 V,待溴酚蓝指示剂在浓缩胶与分离胶交界处成线状,电泳仪调至恒压 120 V,至溴酚蓝指示剂到凝胶底部,转膜,置于一抗孵育液[小鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(1:1 000)、山羊抗 Siah-1 多克隆抗体(1:500)、兔抗 p53 多克隆抗体(1:1 000)、兔抗 Synaptophysin 单克隆抗体(1:500)]中 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,再置于兔抗 IgG(1:1 000)孵育液中 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h,显色曝光后分析条带灰度值,以目标条带与内参  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。

## 2.4 RT-PCR 法检测细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin mRNA 表达

采用 Trizol 法分别提取正常对照组、高糖培养组、姜黄素处理组(10、30  $\mu\text{mol/L}$ )作用 24 h 后细胞的总 RNA,将总 RNA 沉淀 5~10 min,溶于 20  $\mu\text{L}$  焦碳酸二乙酯(DEPC)水中。取溶解后的 RNA 1  $\mu\text{L}$  用 DEPC 水稀释 200 倍后,紫外分光光度计测定其 260、280 nm 波长处的 OD 值,并计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值,若 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值在 1.8~2.0 之间表明满足试验要求。将总 RNA 放于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存备用。采用 PrimeScript RT reagent Kit 逆转录试剂盒,将提取的 RNA 逆转录为 cDNA,采用 KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 试剂盒,将 cDNA 稀释 10 倍后进行 RT-PCR 检测,反应体系按说明书操作。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  3 min,95  $^{\circ}\text{C}$  3 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,共进行 40 个循环,结束后以 mRNA 的实时荧光强度的变化值为纵坐标

绘制溶解曲线,最终数据以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  进行分析。 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{试验样品})} - \Delta C_{t(\text{基准样品})}$ ;  $\Delta C_{t(\text{试验样品})} = C_{t(\text{试验组目的基因数值})} - C_{t(\text{试验组内参基因数值})}$ ;  $\Delta C_{t(\text{基准样品})} = C_{t(\text{对照组目的基因数值})} - C_{t(\text{对照组内参基因数值})}$ 。按照引物设计的原则,应用 Primer Premier 5.0 软件,设计 RT-PCR 引物序列,该引物生成委托上海生工生物技术有限公司完成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因	引物	引物序列	片段长度, bp
p53	上游	5'-ACCTATGGAAGACTTCTCCTGAAA-3'	24
	下游	5'-CTGGCATTTCTGGGAGCTTCA-3'	20
Siah-1	上游	5'-CAAAGTGTCCACCATCCAGAG-3'	22
	下游	5'-GGTGGCAATACATAGTCAAAGCAG-3'	24
Synaptophysin	上游	5'-AAAGGCCTGTCCGATGTGAA-3'	20
	下游	5'-CAGGAAGCCAACACCACTGA-3'	21
$\beta$ -actin(内参)	上游	5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3'	24
	下游	5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'	24

## 2.5 沉默 p53 对 Siah-1 的影响

试验分为正常对照组、高糖培养组、正常 siRNA 干扰组和高糖 siRNA 干扰组。细胞培养方法同“2.1”; siRNA 沉默 p53 基因方法:取对数生长期 C6 细胞,胰酶消化后接种于 6 孔板中,接种时细胞密度为  $2.5 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ ,在细胞培养达到 30%~50% 汇合度时行 siRNA 转染,沉默 p53 基因。按 Western blot 法和 RT-PCR 法分别检测 3 组细胞中 p53、Siah-1 蛋白和 mRNA 表达。

## 2.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,数据采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。所有实验均重复至少 3 次。

## 3 结果

### 3.1 细胞存活率

10、20、30、40、50、60、70、80、90、100  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素作用 24 h 后 C6 细胞存活率分别为  $(98.120 \pm 0.69)\%$ 、 $(97.144 \pm 2.35)\%$ 、 $(92.876 \pm 2.08)\%$ 、 $(92.530 \pm 1.57)\%$ 、 $(84.636 \pm 0.54)\%$ 、 $(66.587 \pm 1.38)\%$ 、 $(56.740 \pm 1.75)\%$ 、 $(23.521 \pm 1.59)\%$ 、 $(3.046 \pm 1.18)\%$ 、 $(2.879 \pm 0.23)\%$ ,经单因素方差分析发现  $P < 0.05$ ,表明作用 24 h 时姜黄素浓度对 C6 细胞存活率有影响;作用 48 h 后 C6 细胞存活率分别为  $(91.381 \pm 1.03)\%$ 、 $(86.739 \pm 2.82)\%$ 、 $(85.478 \pm 2.34)\%$ 、 $(77.318 \pm 3.66)\%$ 、 $(62.085 \pm 0.71)\%$ 、 $(58.214 \pm 1.26)\%$ 、 $(43.619 \pm 3.65)\%$ 、 $(19.104 \pm 2.85)\%$ 、 $(6.067 \pm 4.63)\%$ 、 $(2.100 \pm 0.251)\%$ ,经单因素方差分析发现  $P < 0.05$ ,表明作用 48 h 时姜黄素浓度对 C6 细胞存活率有影响。上述结果可以看出,姜黄素浓度为 10~40  $\mu\text{mol/L}$  时不会显著降低 C6 细胞存活率,浓度大于 40  $\mu\text{mol/L}$  时,随着作用浓度的升高,C6 细胞存活率随之降低,呈剂量依赖性;同时药物作用时间 24 h 优于 48 h。不同浓度姜黄素对细胞存活率的影响见图 1。

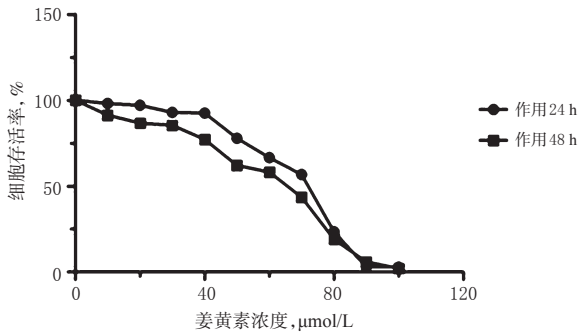
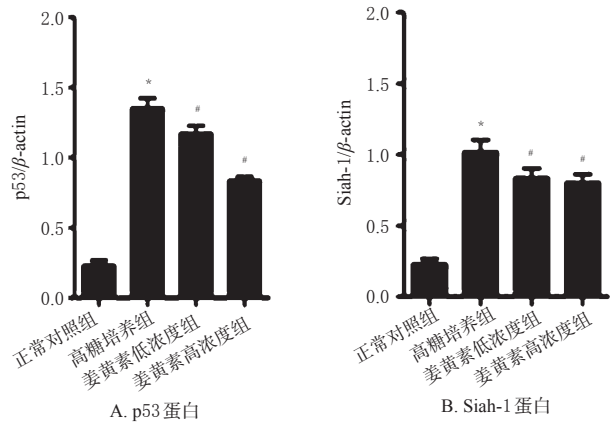


图1 不同浓度姜黄素作用后细胞存活率测定结果

Fig 1 Survival rate of cells after treated with different concentrations of curcumin

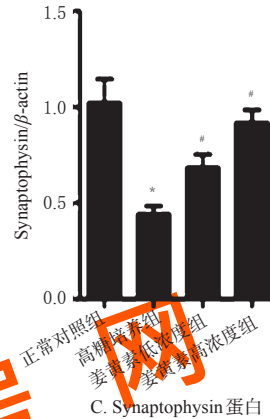
### 3.2 细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin 蛋白表达

与正常对照组比较,高糖培养组细胞中 p53、Siah-1 蛋白表达明显增强, Synaptophysin 蛋白表达明显减弱, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与高糖培养组比较, 姜黄素低、高浓度组细胞中 p53、Siah-1 蛋白表达明显减弱, Synaptophysin 蛋白表达明显增强, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各组细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin 蛋白表达的电泳图见图 2, 测定结果见图 3。



A. p53 蛋白

B. Siah-1 蛋白



C. Synaptophysin 蛋白

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与高糖培养组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. normal control group,\* $P < 0.05$ ; vs. high glucose treatment group,# $P < 0.05$

图3 各组细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin 蛋白表达的测定结果

Fig 3 Results of protein expression of p53, Siah-1 and Synaptophysin in cells of each group

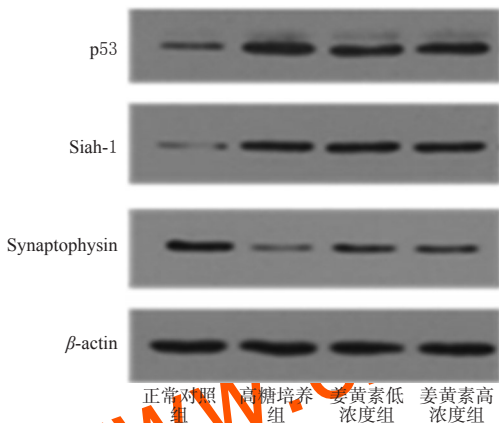


图2 各组细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin 蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophorograms of protein expressions of p53, Siah-1 and Synaptophysin in cells of each group

### 3.3 细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin mRNA 表达

与正常对照组比较,高糖培养组细胞中 p53、Siah-1 mRNA 表达明显增强, Synaptophysin mRNA 表达明显减弱, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与高糖培养组比较, 姜黄素低、高浓度组细胞中 p53、Siah-1 mRNA 表达明显减弱, Synaptophysin mRNA 表达明显增强, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各组细胞中 p53、Siah-1、Synaptophysin mRNA 表达的测定结果见图 4。

### 3.4 siRNA 沉默 p53 基因后对 Siah-1 的影响

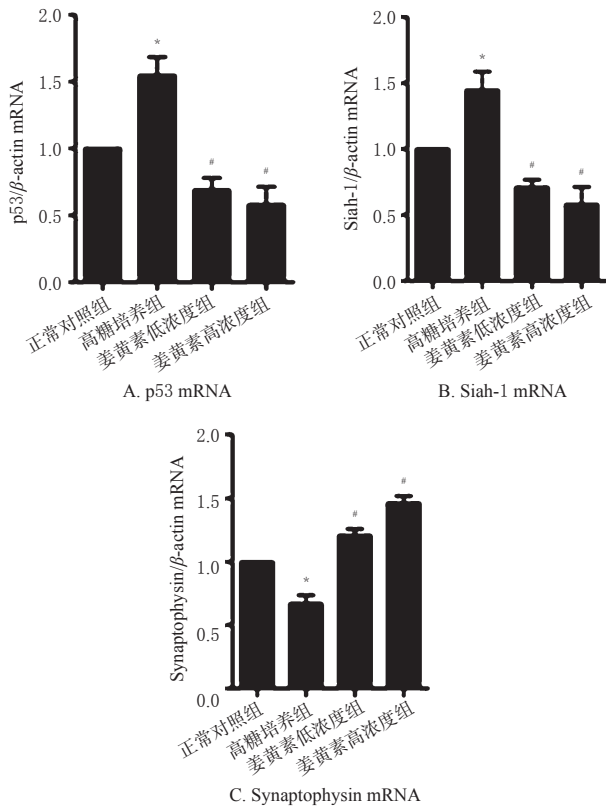
3.4.1 正常培养 与正常对照组比较,正常 siRNA 干扰组细胞中 p53 蛋白和 mRNA 表达均明显减弱,差异均有

统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示 siRNA 干扰组成功沉默 p53 基因。正常条件下 siRNA 干扰后细胞中 p53 蛋白表达的电泳图见图 5, p53 蛋白及 mRNA 表达的测定结果见图 6。

3.4.2 高糖培养 与正常对照组比较,高糖培养组细胞中 p53、Siah-1 蛋白和 mRNA 表达均明显增强 ( $P < 0.05$ )。与高糖培养组比较,高糖 siRNA 干扰组细胞中 p53、Siah-1 蛋白及 mRNA 表达均明显减弱 ( $P < 0.05$ )。提示沉默 p53 基因可明显抑制高糖培养下 C6 细胞中 Siah-1 蛋白及 mRNA 表达的增强。高糖条件下 siRNA 干扰后细胞中 p53、Siah-1 蛋白表达的电泳图见图 7, p53、Siah-1 蛋白及 mRNA 表达的测定结果见图 8。

## 4 讨论

Synaptophysin 是突触小泡中的主要蛋白质,在整个大脑的神经元和神经内分泌细胞中普遍存在,并被证明与认知功能密切相关<sup>[1]</sup>。突触传递过程是认知功能表达的重要环节, Synaptophysin 作为突触的特异性标记,已有研究证实其实参与了神经递质释放、突触可塑性、突触小泡形成以及再利用的过程,涉及学习、记忆等认知



注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与高糖培养组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.05$ ; vs. high glucose treatment group, # $P < 0.05$

图4 各组细胞中p53、Siah-1、Synaptophysin mRNA表达的测定结果

Fig 4 Results of mRNA expression of p53, Siah-1 and Synaptophysin in cells of each group

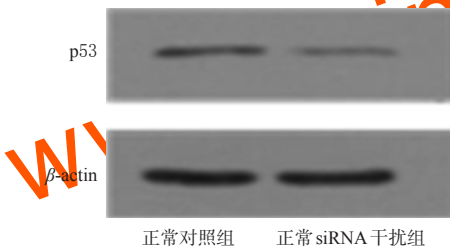
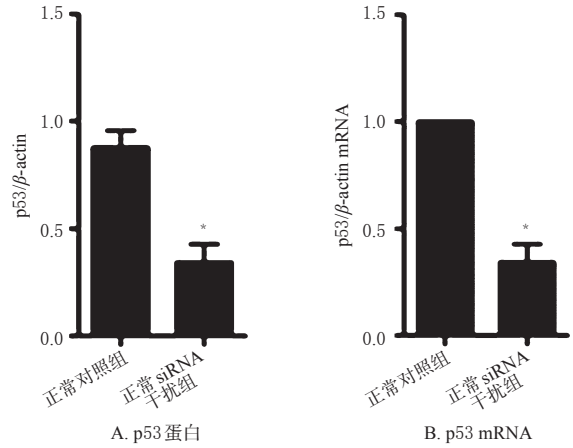


图5 正常条件下siRNA干扰后细胞中p53蛋白表达的电泳图

Fig 5 Electrophorograms of protein expression of p53 in cells after siRNA interference under normal environment

方面<sup>[12-13]</sup>,同时在糖尿病认知功能障碍的动物模型中可以观察 Synaptophysin 的表达下降<sup>[14]</sup>。研究表明,Siah-1 是降解 Synaptophysin 的主要蛋白酶,在神经元中主要通过泛素-蛋白酶体途径进行降解<sup>[15]</sup>。

在本研究中,笔者体外模拟高血糖症模型培养大鼠的神经胶质瘤细胞C6,探讨高糖条件下姜黄素对认知保护蛋白 Synaptophysin 的调节作用,并探讨了其相关作用机制。笔者将姜黄素配制成 10~100  $\mu\text{mol/L}$  的溶液,分



注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.05$

图6 正常条件下siRNA干扰后细胞中p53蛋白及mRNA表达的测定结果

Fig 6 Results of the protein and mRNA expression of p53 in cells after siRNA interference under normal environment

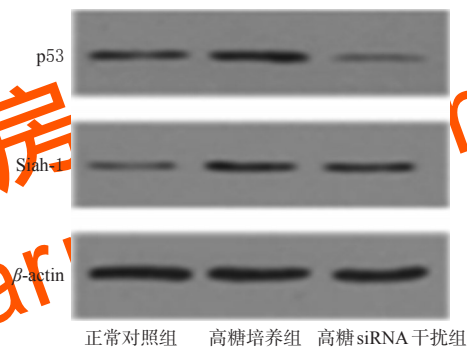
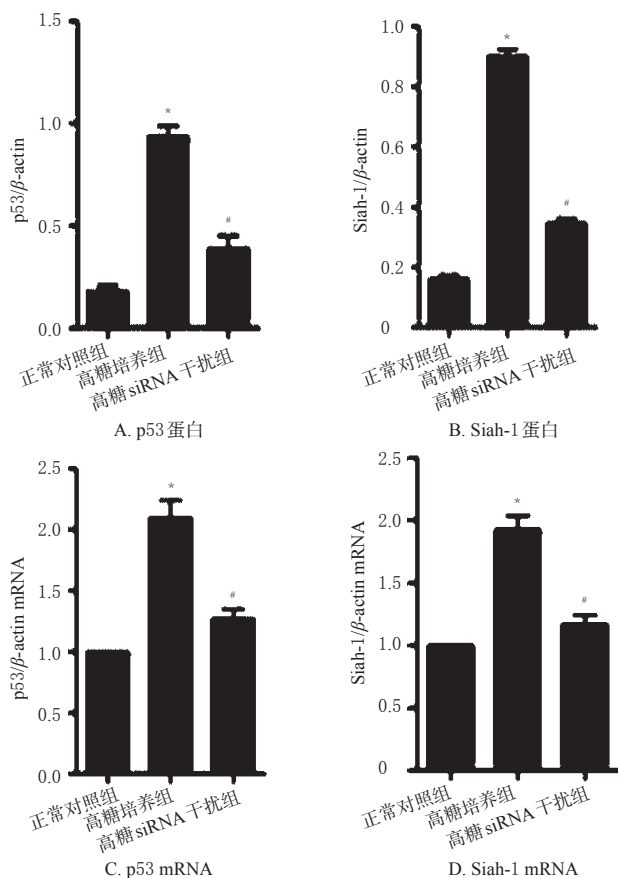


图7 高糖条件下siRNA干扰后细胞中p53、Siah-1蛋白表达的电泳图

Fig 7 Electrophorograms of protein expression of p53 and Siah-1 in cells after siRNA interference under high glucose environment

别加入到高糖培养 3 d 后的 C6 细胞模型中,分别作用 24、48 h,采用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测细胞活性。结果显示,姜黄素浓度为 10~40  $\mu\text{mol/L}$  时不会显著降低细胞存活率,同时药物作用时间 24 h 优于 48 h,所以后续试验选取了 10、30  $\mu\text{mol/L}$  作为姜黄素的实验浓度,24 h 作为作用时间。这一结果说明姜黄素的药物浓度在较小的一定范围内不会对细胞活性造成损伤,但超过一定的浓度范围,会显著降低细胞存活率,对细胞活性造成损伤。相同药物浓度下作用 48 h 后的细胞存活率依次低于作用 24 h 的细胞存活率,表明药物作用时间越长对细胞存活率损伤越大。通过对 p53、Siah-1、Synaptophysin 蛋白和 mRNA 表达水平的检测结果提示,高糖培养 3 d 后细胞中 p53、Siah-1 蛋白和 mRNA 表达均明显增强,同时 Synaptophysin 蛋白和 mRNA 表达均明显减弱;之后姜黄素作用 24 h 后细胞中 p53、Siah-1 蛋白



注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ;与高糖培养组比较,\* $P<0.05$ 。

Note: vs. normal control group, \* $P<0.05$ ; vs. high glucose treatment group, # $P<0.05$

图8 高糖条件下siRNA干扰后细胞中p53、Siah-1蛋白及mRNA表达的测定结果

Fig 8 Result of protein and mRNA expressions of p53 and Siah-1 in cells after siRNA interference under high glucose environment

和mRNA表达均明显减弱,同时Synaptophysin蛋白和mRNA表达均明显增强。为了进一步研究姜黄素是否是通过调控p53、Siah-1进而上调Synaptophysin的,本文还构建了p53基因沉默C6细胞,结果显示,高糖siRNA干扰组细胞中Siah-1基因也随之下调,提示高糖条件诱导沉默p53可抑制Siah-1上调,进而介导泛素化降解Synaptophysin,使Synaptophysin表达上调。

综上所述,高糖条件下,姜黄素可通过下调C6细胞中p53、Siah-1表达,进而上调Synaptophysin表达。

### 参考文献

[1] 张英,李冬梅,邢颖.姜黄素的药理作用与载体研究进展[J].中国药房,2015,26(13):1850-1853.

[2] REN Z, ZHANG R, LI Y, et al. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(5): 1444-1456.

[3] XU Y, WANG L, HE J, et al. 2010 China noncommunicable disease surveillance group prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-959.

[4] MURTHY SB, JAWAID A, QURESHI SU, et al. Does diabetes mellitus alter the onset and clinical course of vascular dementia [J]. *Behav Neurol*, 2010, 23(3): 145-151.

[5] YOSHITAKE T, KIYOHARA Y, KATO I, et al. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the hisayama study[J]. *Neurology*, 1995.DOI: 10.1212/wnl.45.6.1161.

[6] LEIBSON CL, ROCCA WA, HANSON VA, et al. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study[J]. *Am J Epidemiol*, 1997.DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009106.

[7] OTT A, STOLK RP, VAN HARSKAMP F, et al. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the rotterdam study[J]. *Neurology*, 1999.DOI: 10.1212/wnl.53.9.1937.

[8] PEILA R, RODRIGUEZ BL, LAUNER LJ, et al. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: the honolulu-asia aging study[J]. *Diabetes*, 2002.DOI: 10.2337/diabetes.51.4.1256.

[9] SZENDROEDI E, PHIELIX M, RODEN, et al. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2001, 8(2): 92-103.

[10] GORDON SL, LEUBE RE, COUSIN MA, et al. Synaptophysin is required for synaptobrevin retrieval during synaptic vesicle endocytosis[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(39): 14032-14036.

[11] TARSA L, GODA Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(2): 1012-1016.

[12] TAMPELLINI D, CAPETILLO-ZARATE E, DUMONT M, et al. Effects of synaptic modulation on beta-amyloid, synaptophysin, and memory performance in Alzheimer's disease transgenic mice[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(43): 14299-14304.

[13] GRASSELLI G, HANSEL C. Cerebellar long-term potentiation: cellular mechanisms and role in learning[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2014. DOI: 10.1016/b978-0-12-420247-4.00003-8.

[14] DUPUIS JP, BIOULAC BH, BAUFRETON J. Long-term depression at distinct glutamatergic synapses in the basal ganglia[J]. *Rev Neurosci*, 2014, 25(6): 741-754.

[15] ZHAO Y, LI Q, JIN A, et al. E3 ubiquitin ligase Siah-1 downregulates synaptophysin expression under high glucose and hypoxia [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(1): 15-27.

(收稿日期:2018-05-23 修回日期:2018-10-17)

(编辑:邹丽娟)