

RIP140 在姜黄素抑制 MIN6 细胞凋亡中的作用机制

薛君力 代喆 曾姣娥 徐焱成

【摘要】 目的 明确受体相互作用蛋白 140 (RIP140) 在姜黄素抑制胰岛 β 细胞株 MIN6 细胞凋亡中的作用。**方法** 将 MIN6 细胞分为对照组、高糖高脂处理组、姜黄素干预组、O-RIP140-MIN6 组 (过表达 RIP140 细胞株)、GFP-MIN6 组 (对照细胞株)。除对照组外,其余各组细胞给予 25 mmol/L 葡萄糖 + 500 μ mol/L 棕榈酸处理 24 h。姜黄素干预组与 O-RIP140-MIN6 组、GFP-MIN6 组均在 25 mmol/L 葡萄糖 + 500 μ mol/L 棕榈酸处理 24 h 前给予 20 μ mol/L 姜黄素预处理 2 h。流式细胞仪检测细胞凋亡率、Western 印迹检测 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、细胞外信号调节激酶 (ERK) 及其磷酸化水平。**结果** 与对照组相比,高糖高脂处理组 RIP140 蛋白表达、细胞凋亡率及 ERK 磷酸化水平均明显增加, Bcl-2 表达下降 ($F = 22.42 \sim 111.43$, $P < 0.01$); 与高糖高脂处理组相比,姜黄素干预组细胞凋亡率及 RIP140 蛋白表达均明显下降、ERK 磷酸化水平明显降低, Bcl-2 表达升高 ($F = 22.42 \sim 111.43$, $P < 0.01$); 与 GFP-MIN6 组相比, O-RIP140-MIN6 组细胞凋亡率明显升高 ($t = 7.16$, $P < 0.01$)、ERK 的磷酸化水平升高 ($t = 8.37$, $P < 0.01$), Bcl-2 表达降低 ($t = 5.88$, $P < 0.05$)。**结论** 姜黄素通过下调 RIP140 的表达来抑制高糖高脂诱导的胰岛 β 细胞凋亡。

【关键词】 受体相互作用蛋白 140; 姜黄素; 胰岛 β 细胞; 细胞凋亡

基金项目: 国家自然科学基金 (81170769, 81370872); 湖北省卫生计生科研基金 (WJ2016-YZ-06)

Role of RIP140 in the inhibition of curcumin on apoptosis in MIN6 cells Xue Junli*, Dai Zhe, Zeng Jiao'e, Xu Yancheng. * Department of Endocrinology, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, China
Corresponding author: Xu Yancheng, Email: xjl100901@whu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the role of receptor interaction protein 140 (RIP140) in the inhibition of curcumin on apoptosis in MIN6 cells. **Methods** MIN6 cells were divided into five groups: control group, high glucose and lipid group, curcumin group, O-RIP140-MIN6 group (MIN6 cells with overexpressed RIP140) and GFP-MIN6 group (empty vector group). Except for control group, all other groups were treated with 25 mmol/L glucose and 500 μ mol/L palmitic acid for 24 hours. Cells in curcumin group, O-RIP140-MIN6 group and GFP-MIN6 group were pretreated with 20 μ mol/L curcumin for 2 hours before the treatment of 25 mmol/L glucose and 500 μ mol/L palmitic acid for 24 hours. Apoptosis rate was detected by flow cytometry, the expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), extracellular regulated protein kinases (ERK) and phosphorylated-ERK were tested by Western blotting. **Results** Compared with control group, the expression of RIP140 protein, apoptosis rate and the level of phosphorylated-ERK were significantly increased whereas the expression of Bcl-2 was decreased in high glucose and lipid group ($F = 22.42-111.43$, all $P < 0.01$). However, compared with high glucose and lipid group, the apoptosis rate and the expression of RIP140 and phosphorylated-ERK were inhibited whereas the expression of Bcl-2 was increased in curcumin group ($F = 22.42-111.43$, all $P < 0.01$). Compared with GFP-MIN6 group, the apoptosis rate ($t = 7.16$, $P < 0.01$) and the level of phosphorylated-ERK ($t = 8.37$, $P < 0.01$) were increased and the expression of Bcl-2 ($t = 5.88$, $P < 0.05$) was decreased in O-RIP140-MIN6 group. **Conclusion** Curcumin inhibits glucolipotoxicity-induced apoptosis in islet β cells via the downregulation of RIP140 expression.

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2018.03.003

作者单位: 434020 湖北省荆州市中心医院内分泌科 (薛君力、曾姣娥); 430071 武汉大学中南医院内分泌科 (代喆、徐焱成)

通信作者: 徐焱成, Email: xjl100901@whu.edu.cn

【Key words】 Receptor interaction protein 140; Curcumin; Islet β cells; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170769, 81370872); Hubei Province Health and Family Planning Scientific Research Project (WJ2016-YZ-06)

胰岛 β 细胞数量减少是糖尿病发病的重要机制,糖、脂毒性损伤是胰岛 β 细胞分泌功能下降和凋亡增加的主要原因,减少糖、脂毒性能抑制胰岛 β 细胞凋亡、改善胰岛 β 细胞功能^[1]。姜黄素提取自草本植物姜黄的根茎,具有抗氧化、抗炎、抗癌及抗菌作用,目前被应用于多种疾病如阿尔茨海默病、胃溃疡、银屑病及糖尿病等的治疗^[2]。预先给予纳米水平姜黄素能够使 1 型糖尿病模型大鼠血糖水平降低 37%^[3]。姜黄素能够改善胰岛 β 细胞凋亡、增加葡萄糖刺激的胰岛素分泌,其作用机制与促进蛋白激酶 B 磷酸化及人叉头框蛋白 O1 的核移除有关^[4]。

受体相互作用蛋白 140 (RIP140) 作为代谢性核受体辅助调节因子,其功能除与糖、脂代谢的调控有关外,还与胰岛 β 细胞的增殖、凋亡有关^[5-6]。姜黄素不仅可以通过增加过氧化物酶体增殖物活化受体协同刺激因子-1 α 的表达来改善线粒体功能,而且可以通过抑制 RIP140 的表达来减轻高浓度脂肪酸诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应^[5,7]。结合现有研究及前期基础研究考虑姜黄素抑制胰岛 β 细胞凋亡的作用可能与 RIP140 表达的调控有关。因此本研究通过调控胰岛 β 细胞系 MIN6 细胞内 RIP140 的表达,进一步明确姜黄素抑制胰岛 β 细胞凋亡与 RIP140 表达调控间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠胰岛素瘤细胞 MIN6 细胞、pEGFP-N1 载体由本实验室保存,过表达 RIP140 的 MIN6 细胞株 O-RIP140-MIN6 及对照细胞株 GFP-MIN6 由本实验室构建^[6]。低糖 DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, ECL 显色试剂盒购自美国 Thermo 公司, 兔抗小鼠 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抗体购自美国 Bioworld 公司, 兔抗小鼠细胞外信号调节激酶 (ERK) 及磷酸化 ERK (p-ERK) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 兔抗小鼠 RIP140 抗体购自美国 Abcam 公司, 兔抗小鼠 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, Annexin V-PE/7-AAD 试剂盒购自凯基生物, 棕榈酸及姜黄素购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 加入含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基,置于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养,隔日换液,待细胞生长至 70% ~ 80% 融合时按 1:3 传代扩大培养。实验重复 3 次。

1.2.2 细胞分组及处理 细胞共分为 5 组:对照

组、高糖高脂处理组、姜黄素干预组、O-RIP140-MIN6 组、GFP-MIN6 组^[6]。其中高糖高脂处理条件为 25 mmol/L 葡萄糖 + 500 μ mol/L 棕榈酸作用 24 h。姜黄素干预组与 O-RIP140-MIN6 组、GFP-MIN6 组均为 25 mmol/L 葡萄糖 + 500 μ mol/L 棕榈酸处理前给予 20 μ mol/L 姜黄素预处理 2 h。

1.2.3 流式细胞仪检测 细胞凋亡率收集各组细胞, PBS 洗 3 遍,按 Annexin V-PE/7-AAD 试剂盒说明依次加入相应试剂,上机检测细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.4 Western 印迹检测 RIP140、Bcl-2、ERK 及 p-ERK 水平 抽提总蛋白,测定蛋白浓度,每孔上样约 40 μ g,常规 SDS-PAGE 电泳转膜后,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,分别加入不同稀释比例的一抗 (1:500 兔抗小鼠 Bcl-2 抗体; 1:1 500 兔抗小鼠 ERK 及 p-ERK 抗体; 1:1 000 兔抗小鼠 RIP140 抗体; 1:1 500 兔抗小鼠 β -actin 抗体) 4℃ 摇床过夜;漂洗后加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:5 000) 37℃ 孵育 1 h, 0.05% PBS-T 清洗 3 遍, ECL 显影曝光,利用 AlphaEaseFC 4.0 软件分析蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理。正态分布的计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 *LSD-t* 检验,两组间均数比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 MIN6 细胞内 RIP140 表达的影响 利用 Western 印迹检测对照组、高糖高脂处理组及姜黄素干预组细胞 RIP140 表达,结果显示,3 组间 RIP140 蛋白表达量差异有统计学意义 ($F = 30.17$, $P < 0.01$)。与对照组相比,高糖高脂处理组 RIP140 的蛋白表达升高 ($P < 0.01$);与高糖高脂处理组相比,姜黄素干预组 RIP140 蛋白表达明显下降 ($P < 0.01$, 图 1);姜黄素干预组与对照组间 RIP140 表达差异无统计学意义。

2.2 RIP140 参与姜黄素对细胞凋亡的调节 流式细胞检测各组细胞凋亡率,结果显示对照组、高糖高脂处理组及姜黄素组细胞早期凋亡率差异有统计学意义 ($F = 60.96$, $P < 0.01$)。与对照组相比,高糖高脂处理组早期凋亡率明显增加 [(37.23% \pm 6.09%) 比 (2.47% \pm 0.71%), $P < 0.01$],与高糖高脂处理组相比,姜黄素干预组细胞早期凋亡率明显下降

[(12.09% ± 3.15%), $P < 0.01$]。与 GFP-MIN6 组 [(15.33% ± 2.19%)] 相比, O-RIP140-MIN6 组早期细胞凋亡率均明显增加 [(29.07% ± 2.51%), $t = 7.16$, $P < 0.01$], 见图 2。

2.3 姜黄素对 ERK 磷酸化及 Bcl-2 蛋白表达的调控 对照组、高糖高脂处理组及姜黄素干预组间 Bcl-2 ($F = 22.42$, $P < 0.01$) 及 p-ERK 水平 ($F = 111.43$, $P < 0.01$) 差异有统计学意义。与对照组相比, 高糖高脂处理组 Bcl-2 表达下降 ($P < 0.01$), 而 p-ERK 水平明显增加 ($P < 0.01$)。与高糖高脂处理组相比, 姜黄素干预组中 Bcl-2 表达水平升高 ($P < 0.01$), 而 p-ERK 水平明显抑制 ($P < 0.01$, 图 3)。与 GFP-MIN6 组 (1.42 ± 0.09) 相比, O-RIP140-MIN6 组 Bcl-2 表达水平降低 ($t = 5.88$, $P < 0.05$), p-ERK 水平明显升高 ($t = 8.37$, $P < 0.01$, 图 4)。

3 讨论

脂毒性所致的胰岛 β 细胞损伤是 2 型糖尿病发病的重要机制^[9]。高糖高脂条件下胰岛 β 细

胞系 MIN6 中 RIP140 表达升高及细胞凋亡增加, 同时凋亡相关基因 Bcl-2 的表达下降, ERK 的磷酸化水平增加, 而 ERK 的磷酸化水平与高糖诱导的胰岛 β 细胞凋亡明显相关^[10]。RIP140 能够增加 ERK 的磷酸化水平^[11]。因此, 高糖高脂条件下上调的 RIP140 表达导致 ERK 磷酸化增加, 这可能是胰岛 β 细胞早期凋亡的可能机制。

在动物水平, 姜黄素不仅可以提高胰岛 β 细胞功能以及改善胰岛素抵抗, 而且可以通过增加肝脏葡萄糖激酶的活性, 降低血葡萄糖浓度^[12-13]。最近人群试验表明, 它还可以明显降低糖尿病前期人群最终发展为糖尿病的几率, 改善糖尿病前期人群的胰岛 β 细胞功能、胰岛素抵抗指数以及增加脂联素的分泌水平^[14]。与动物及人体研究一致, 在体外, 姜黄素也能明显抑制高糖高脂诱导的 MIN6 细胞凋亡。本研究发现, 姜黄素能够抑制 ERK 磷酸化水平, 增加 Bcl-2 表达, 而 ERK 磷酸化及 Bcl-2 均与凋亡有关, 因此姜黄素抑制凋亡的作用可能与此相关^[10, 15]。

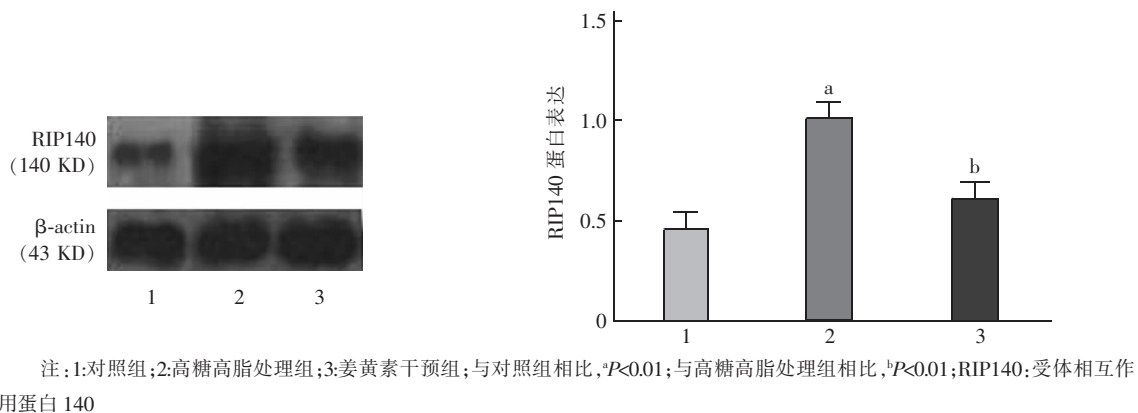


图 1 姜黄素对 MIN6 细胞 RIP140 表达的影响

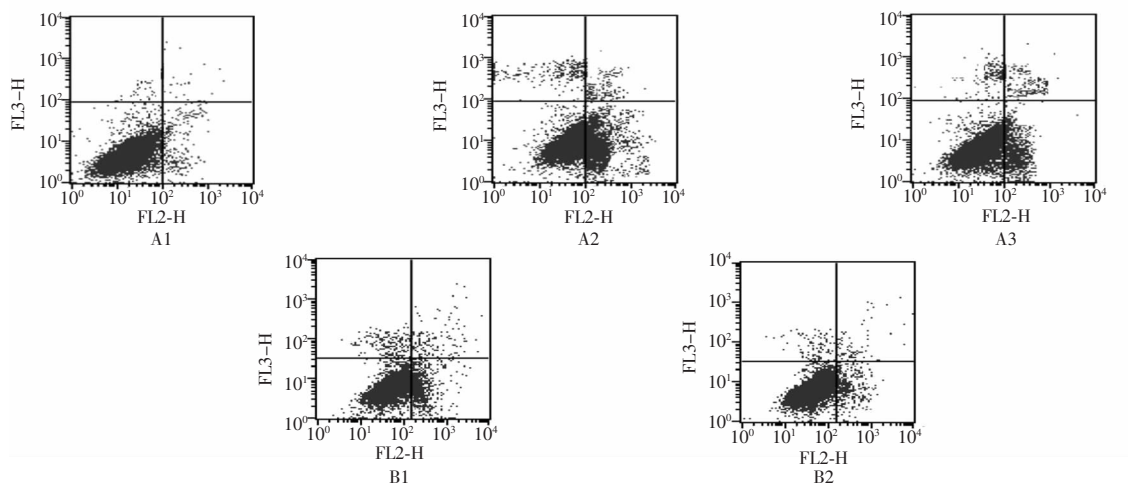
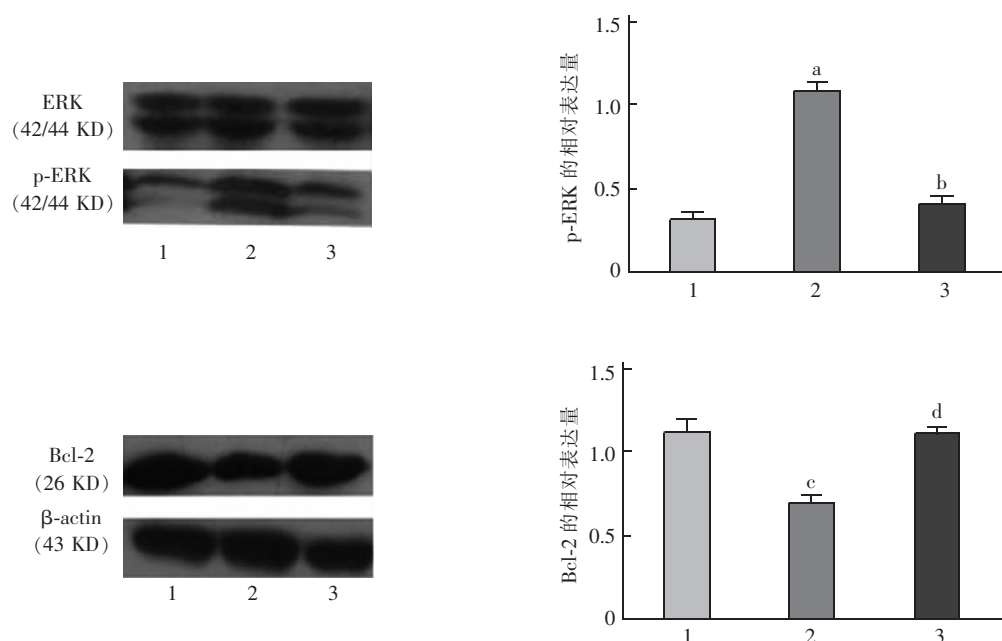
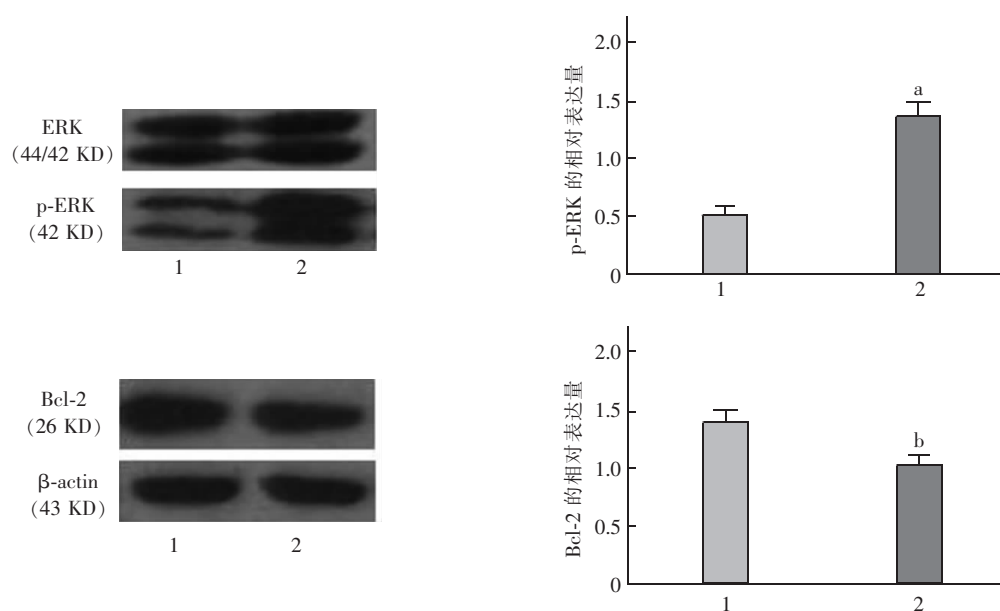


图 2 流式细胞检测 MIN6 细胞早期凋亡率



注:1:对照组;2:高糖高脂处理组;3:姜黄素干预组;与对照组相比,^a $P<0.01$;与高糖高脂处理组相比,^b $P<0.01$;与对照组相比,^c $P<0.01$;与高糖高脂处理组相比,^d $P<0.01$;ERK:细胞外信号调节激酶;p-ERK:磷酸化 ERK

图 3 姜黄素对 MIN6 细胞 ERK 磷酸化及 Bcl-2 蛋白表达的调控



注:1:GFP-MIN6 组;2:O-RIP140-MIN6 组;与 O-RIP140-MIN6 组相比,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;ERK:细胞外信号调节激酶;p-ERK:磷酸化 ERK;RIP140:受体相互作用蛋白 140

图 4 RIP140 对姜黄素调控 ERK 磷酸化及 Bcl-2 蛋白表达的影响

本研究发现,姜黄素能够抑制高糖高脂诱导的 MIN6 细胞凋亡及 RIP140 表达,而当利用稳定过表达 RIP140 的 O-RIP140-MIN6 细胞重新恢复 RIP140 表达时,姜黄素抗凋亡作用减弱。此结果进一步支持姜黄素抑制 MIN6 细胞凋亡可能与下调 RIP140 的表达有关。

综上所述,本研究中发现,姜黄素能够改善高脂高糖对胰岛 β 细胞的损伤,其作用的发挥与 RIP140 介导的 ERK 磷酸化有关。

参 考 文 献

- [1] van Raalte DH, Diamant M. Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 93 Suppl 1: S37-S46. DOI: 10.1016/S0168-8227(11)70012-2.

(下转第 162 页)

- [20] Barrio-Barrio J, Sabater AL, Bonet-Farriol E, et al. Graves' ophthalmopathy: VISA versus EUGOGO classification, assessment, and management [J]. J Ophthalmol, 2015, 2015; 249125. DOI: 10.1155/2015/249125.
- [21] Bartalena L, Baldeschi L, Boboridis K, et al. The 2016 European thyroid association/European group on Graves' orbitopathy guidelines for the management of Graves' orbitopathy [J]. Eur Thyroid J, 2016, 5(1): 9-26. DOI: 10.1159/000443828.
- [22] Matheis N, Okrojek R, Grus FH, et al. Proteomics of tear fluid in thyroid-associated orbitopathy [J]. Thyroid, 2012, 22(10): 1039-1045. DOI: 10.1089/thy.2012.0119.
- [23] Aass C, Norheim I, Eriksen EF, et al. Comparative proteomic analysis of tear fluid in Graves' disease with and without orbitopathy [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2016, 85(5): 805-812. DOI: 10.1111/cen.13122.
- [24] Aass C, Norheim I, Eriksen EF, et al. Establishment of a tear protein biomarker panel differentiating between Graves' disease with or without orbitopathy [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175274. DOI: 10.1371/journal.pone.0175274.
- [25] Matheis N, Lantz M, Grus FH, et al. Proteomics of orbital tissue in thyroid-associated orbitopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(12): E1523-E1530. DOI: 10.1210/je.2015-2976.
- [26] Fiore E, Rago T, Latrofa F, et al. Hashimoto's thyroiditis is associated with papillary thyroid carcinoma: role of TSH and of treatment with L-thyroxine [J]. Endocr Relat Cancer, 2011, 18(4): 429-437. DOI: 10.1530/ERC-11-002.
- [27] Chen YK, Lin CL, Cheng FT, et al. Cancer risk in patients with Hashimoto's thyroiditis: a nationwide cohort study [J]. Br J Cancer, 2013, 109(9): 2496-2501. DOI: 10.1038/bjc.2013.597.
- [28] Pagni F, De Sio G, Garancini M, et al. Proteomics in thyroid cytopathology: relevance of MALDI-imaging in distinguishing malignant from benign lesions [J]. Proteomics, 2016, 16(11-12): 1775-1784. DOI: 10.1002/pmic.201500448.

(收稿日期: 2017-09-15)

(上接第 157 页)

- [2] Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from *in vitro*, animal and human studies [J]. Br J Nutr, 2010, 103(11): 1545-1557. DOI: 10.1017/S0007114509993667.
- [3] Ganugula R, Arora M, Jaisamut P, et al. Nano-curcumin safely prevents streptozotocin-induced inflammation and apoptosis in pancreatic beta cells for effective management of type 1 diabetes mellitus [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(13): 2074-2084. DOI: 10.1111/bph.13816.
- [4] Hao F, Kang J, Cao Y, et al. Curcumin attenuates palmitate-induced apoptosis in MIN6 pancreatic β -cells through PI3K/Akt/FoxO1 and mitochondrial survival pathways [J]. Apoptosis, 2015, 20(11): 1420-1432. DOI: 10.1007/s10495-015-1150-0.
- [5] Nautiyal J, Christian M, Parker MG. Distinct functions for RIP140 in development, inflammation, and metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab, 2013, 24(9): 451-459. DOI: 10.1016/j.tem.2013.05.001.
- [6] Xue JL, He LJ, Shang GL, et al. Distribution and role of receptor interaction protein 140 in pancreatic-cells in rodents, *in vivo* and *in vitro* [J]. Acta Endo (Buc), 2014, 10(1): 41-52. DOI: 10.4183/aeb.2014.41.
- [7] Zhang M, Tang J, Li Y, et al. Curcumin attenuates skeletal muscle mitochondrial impairment in COPD rats: PGC-1 α /SIRT3 pathway involved [J]. Chem Biol Interact, 2017, 277: 168-175. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.09.018.
- [8] 邹润梅, 薛君力, 赵红丽, 等. 姜黄素抑制棕榈酸诱导的巨噬细胞炎症反应的机制研究 [J]. 中华糖尿病杂志, 2013, 5(1): 44-48. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2013.01.011.
- [9] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2003, 52(1): 102-110.
- [10] Maedler K, Størling J, Sturis J, et al. Glucose- and interleukin-1 beta-induced beta-cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets [J]. Diabetes, 2004, 53(7): 1706-1713.
- [11] Feng X, Yu W, Liang R, et al. Receptor-interacting protein 140 overexpression promotes neuro-2a neuronal differentiation by ERK1/2 signaling [J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(1): 119-124. DOI: 10.4103/0366-6999.147850.
- [12] Shao W, Yu Z, Chiang Y, et al. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e28784. DOI: 10.1371/journal.pone.0028784.
- [13] Gutierrez VO, Pinheiro CM, Assis RP, et al. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes [J]. Br J Nutr, 2012, 108(3): 440-448. DOI: 10.1017/S0007114511005769.
- [14] Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Luechapudiporn R, et al. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2012, 35(11): 2121-2127. DOI: 10.2337/dc12-0116.
- [15] Jaisin Y, Thampithak A, Meesarapee B, et al. Curcumin I protects the dopaminergic cell line SH-SY5Y from 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity through attenuation of p53-mediated apoptosis [J]. Neurosci Lett, 2011, 489(3): 192-196. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.12.014.

(收稿日期: 2017-10-16)