

姜黄素对氧应激致大鼠肝星状细胞增殖 及 TGF- β_1 表达的抑制作用

赵珍东^{1,2*}, 段启^{1,2}, 张雷红^{1,2}, 张现涛^{1,2}, 晏亦林^{1,2}, 孙师家¹

(1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2. 南药资源保护与利用工程技术开发中心, 广州 510520)

[摘要] 目的:探讨姜黄素体外对氧化应激致肝星状细胞(HSC-T6)增殖、表达转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的抑制作用。方法:以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢(H_2O_2)致 HSC 氧应激,将细胞分成对照组、 H_2O_2 组和 H_2O_2 + 姜黄素干预组(终质量浓度分别为 25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)5 组,用四甲基偶氮唑(MTT)比色法检测 HSC 细胞增殖;用流式细胞术检测姜黄素对 HSC 细胞周期的影响;硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化酶法和消化法分别检测细胞培养液丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和羟脯氨酸(HyP)的含量;用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 HSC 表达 TGF- β_1 的水平。结果:HSC 经 H_2O_2 诱导后,细胞增殖显著($P < 0.01$),细胞培养液上清中 MDA, HyP 含量明显上升, SOD 活力下降($P < 0.01$);经姜黄素各剂量干预后,MDA, HyP 含量下降, SOD 活力升高,以 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素浓度作用明显($P < 0.01$); H_2O_2 刺激 HSC 后, TGF- β_1 mRNA 表达被上调($P < 0.001$),经姜黄素干预后, TGF- β_1 mRNA 表达水平下降($P < 0.01$)。结论:姜黄素可显著抑制氧化应激致 HSC 的增殖,该作用可能与其抗氧化、抑制 TGF- β_1 的表达有关,表明姜黄素作为抗氧化剂在肝纤维化防治中具有重要价值。

[关键词] 姜黄素;肝星状细胞;氧化应激;转化生长因子 β_1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0203-04

Inhibitory Effect of Curcumin on Hepatic Stellate Cell Proliferation and Transforming Growth Factor- β_1 mRNA Expression Induced by Oxidative Stress

ZHAO Zhen-dong^{1,2*}, DUN Qi^{1,2}, ZHANG Lei-hong^{1,2}, ZHANG Xian-tao^{1,2}, YAN Yi-lin^{1,2}, SUN Shi-jia¹

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;

2. Engineering Center for Protection and Utilization of Herbal Medicinal Resources
in South China, Guangzhou 510520, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effect of curcumin on hepatic stellate cell(HSC)-T6 cell proliferation and transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) mRNA expression induced by oxidative stress. **Method:** The proliferation of HSC-T6 cell was examined by MTT colorimetry. The methods of thiobarbituric acid, xanthine oxidase and digestion were respectively applied to determine the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase(SOD) and hydroxy proline(HyP) of culture mediums. The mRNA expression of TGF- β_1 by HSC was determined by RT-PCR. **Result:** HSC cell proliferation was remarkably increased in the presence of H_2O_2 ($P < 0.01$), the content of MDA and HyP of HSC in culture mediums was remarkably increased, and SOD activity was decreased ($P < 0.01$). Curcumin could concentration-dependently inhibit HSC-T6 cell proliferation. After the intervention of different content curcumin, the content of MDA and HyP was remarkably decreased, SOD activity was increased, especially for those treated by 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of curcumin($P < 0.01$). Moreover, TGF- β_1 mRNA

[收稿日期] 20101117(008)

[基金项目] 广东省中医药局项目(2009276);广东食品药品职业学院院级项目(2007012)

[通讯作者] * 赵珍东,博士,讲师,从事中药抗肝纤维化作用机制研究, Tel:020-28854936, E-mail:Zhaozd2008@126.com

expression of HSC was remarkably increased induced by H_2O_2 ($P < 0.001$). After the intervention of different concentration of curcumin, TGF- β_1 mRNA expression level was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** All the results indicated curcumin could remarkably inhibit HSC-T6 cell proliferation and TGF- β_1 mRNA expression induced by oxidative stress suggesting that curcumin, as an antioxidative stress factor, may have a potential therapeutic value for liver fibrosis.

[**Key words**] curcumin; hepatic stellate cells; oxidative stress; transforming growth factor beta 1

肝纤维化是肝脏在受到慢性损伤后的一系列自我降解及自我修复过程,在这一过程中,发病机制复杂,部分与氧应激有关。姜黄素是从姜黄 *Curcuma longa* 中提取的天然色素,常用做食品添加剂,具有广泛的药理活性,包括抗炎、抗癌、保肝等^[1],可用于慢性肝病、糖尿病等病治疗。本文在建立体外过氧化氢(H_2O_2)致肝星状细胞(HSC)氧应激的基础上,研究了姜黄素对 H_2O_2 诱导 HSC 增殖、分泌羟脯氨酸(HyP)、产生丙二醛(MDA)和对超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响,以期进一步探讨其抗氧化的作用及机制。

1 材料

1.1 药物 姜黄素,购自陕西旭煌植物科技有限公司,经高效液相色谱法检测纯度达 98%,批号 XH100301。使用前以少量二甲基亚砷溶(DMSO)助溶,加入 DMEM 配制成 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的贮存液,分装,避光 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,2 周内有效。

1.2 细胞 HSC 细胞株,为 SV40 转染的 SD 大鼠肝星状细胞,其表现型为活化的 HSC,表达高水平的 Col-I, TIMP-1 mRNA 等。

1.3 试剂 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)染色液(Sigma 公司),总 RNA 提取试剂 Trizol(批号 I8229),Tanscrit cDNA KR104(批号 J8607), $2\times$ Taq PCR KT201(批号 J8312),DNA marker(批号 J8221,天根公司);转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)引物,由上海英伟创津合成;SOD,MDA,HyP 试剂盒(批号 20100518),均为南京建成生物研究所产品。

1.4 仪器 MK3 型酶标仪、CT14RD 高速台式冷冻离心机、Model 311 CO_2 培养箱,均为美国 Thermo Forma 公司;DNA 扩增仪(MyCycler)、凝胶分析仪 Gel Doc1000(美国 Bio-Rad 公司)、电泳槽(北京六一仪器厂)、ZWF 紫外投射反射分析仪、倒置相差生物显微镜、721 分光光度计等。

2 方法

2.1 HSC 细胞培养 将冻存细胞置于 $38\text{ }^\circ\text{C}$ 水中快

速复温直至完全融化,接种细胞,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下培养。当细胞呈单层致密状时,0.25% 胰蛋白酶消化后传代,传 3~4 代待细胞生长稳定后开始实验。

2.2 姜黄素对氧应激致 HSC 增殖的影响 以 MTT 比色法检测 HSC 的增殖的影响,将细胞悬液以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 密度种植含 10% 胎牛血清的 96 孔培养板中,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$,并设空白孔(不加细胞和药物,8 孔),细胞培养 24 h 后,弃去培养基,换含 1% 的 DMEM 培养过夜后,进行分组:①对照组,HSC 细胞含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基中正常培养;②模型组,用含 1% 胎牛血清的 DMEM 加入终浓度为 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 共同培养 48 h;③药物处理组,HSC 细胞用终浓度为 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 共同温育 4 h,然后每孔加入终浓度为 25,50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素温育。继续培养至 48 h,加入 MTT 溶液 $10\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ 后继续孵育 4 h,弃上清并每孔加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ DMSO 裂解细胞内结晶,恒温振荡器震荡 10 min,酶标仪 492 nm 波长测定吸光度(A)。

2.3 流式细胞仪检测姜黄素对氧应激致 HSC 细胞周期的影响 将单层贴壁培养的细胞培养至对数生长期后,换含 1% 胎牛血清 DMEM 过夜,将细胞分成对照组、 H_2O_2 组和 H_2O_2 + 姜黄素干预组(终浓度分别为 25,50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)5 组,分别加入正常培养基和相应干预因素,继续培养 48 h。胰酶消化,收集各瓶细胞,加入预冷 PBS 缓冲液,再加入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰乙醇,调整细胞密度为 $(5\sim 8)\times 10^5/\text{mL}$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 固定。检测时加入 PI 染色液 1 mL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育,避光保存,流式细胞仪检测。

2.4 姜黄素对 HSC 细胞形态学的影响 按 2.3 方法处理分组后,48 h 后于倒置显微镜下观察 HSC 形态学变化。

2.5 细胞培养上清液 SOD 活性,MDA,HyP 含量测定 按 2.3 方法处理分组后,48 h 后收集细胞培养基上清液,分别按黄嘌呤氧化酶法、硫代巴比妥酸法

和消化法检测相关指标含量。

2.6 姜黄素对 HSC 表达 TGF- β_1 的影响 实验分组、H₂O₂ 处理及药物干预同 2.3。药物处理 48 h 后,PBS 洗涤,胰酶消化。细胞总 RNA 抽提并逆转录成 cDNA,合成引物选用 Oligo dT。在 200 μ L PCR 管中,加入总 RNA 2.5 μ L,Oligo dT 2 μ L,dNTP Mixture 2 μ L,RNase Free dH₂O 8 μ L,70 $^{\circ}$ C 加热 5 min,再加入 4 μ L 5 \times First-Strand Buffer,1 μ L 0.1 mol \cdot L⁻¹ DTT,0.5 μ L Rnasin,1 μ L TIANScript M-MLV,混匀,42 $^{\circ}$ C 温育 50 min,99 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应。引物序列、产物片段长度^[2]和反应条件如下:TGF- β_1 :上游引物 5'-CGGCAGCTGTACATTGACTT-3',下游引物 5'-TCAGCTGCACTTGCAGGAGC-3',产物 278 bp,PCR 反应参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 后延伸 7 min;GAPDH:上游引物 5'-CTTCCAGGAGCGAGAT-3',下游引物 5'-CAGGATGCCCTTTAGT-3',产物 592 bp。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统进行摄像。通过对凝胶成像图进行灰度值的采集分析,计算目的基因/GAPDH 的比值,以此反应基因表达的高低。

2.7 统计方法 用 SPSS 16.0 统计软件处理,结果

表 2 姜黄素对 H₂O₂ 诱导 HSC 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI
对照	-	60.50 \pm 1.88 ²⁾	32.84 \pm 3.77 ²⁾	7.00 \pm 1.89	39.5 \pm 1.89 ²⁾
H ₂ O ₂	-	48.33 \pm 2.33	45.49 \pm 1.54	6.38 \pm 2.31	51.87 \pm 2.32
姜黄素 + H ₂ O ₂	25	56.89 \pm 3.95 ¹⁾	36.89 \pm 1.45 ¹⁾	6.22 \pm 4.40	43.11 \pm 3.96 ¹⁾
	50	55.27 \pm 2.17 ¹⁾	35.55 \pm 1.57 ¹⁾	9.18 \pm 1.73	44.73 \pm 2.17 ¹⁾
	100	57.95 \pm 2.13 ²⁾	30.27 \pm 3.61 ²⁾	11.77 \pm 2.34 ¹⁾	32.04 \pm 2.13 ²⁾

3.3 姜黄素对大鼠 HSC 细胞生长形态的影响 对照组 HSC 呈梭形或形态不规则,胞体近中央处有椭圆形的胞核,胞质内外伸出 2~3 个长短不同的突起,呈典型的成纤维细胞样表型。经 H₂O₂ 干预后,细胞长势良好,突触增多,在镜下可见大片状细胞团;经姜黄素不同浓度作用后,细胞则逐渐变圆,体积变小,部分细胞皱缩、松散易脱落,培养液中悬浮细胞随药物浓度的增加而增多。细胞生长状态明显受到抑制,细胞密度则随姜黄素浓度增加而减少。

3.4 姜黄素对 HSC 培养上清的 SOD,MDA,HyP 含量的影响 见表 3。H₂O₂ 组 MDA,HyP 水平明显升高,SOD 含量下降,与对照组比较,差异显著。姜黄素各组能够不同程度降低 MDA,HyP 水平,升高 SOD 活力,呈剂量-效应关系。

以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 姜黄素对 H₂O₂ 诱导 HSC 增殖的影响 H₂O₂ 能刺激 HSC 细胞增殖,与 H₂O₂ 组比较,姜黄素各剂量组能不同程度抑制 HSC 细胞增殖,且呈量效关系。结果见表 1。

表 1 姜黄素对 H₂O₂ 诱导 HSC 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A
对照	-	0.57 \pm 0.04 ¹⁾
H ₂ O ₂	-	0.70 \pm 0.06
姜黄素 + H ₂ O ₂	25	0.66 \pm 0.05
	50	0.58 \pm 0.08 ¹⁾
	100	0.48 \pm 0.06 ²⁾

注:与 H₂O₂ 刺激组相比¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.001$ (表 2~3 同)。

3.2 姜黄素对大鼠 HSC 细胞周期的影响 见表 2。HSC 经 H₂O₂ 刺激后,S 期比例显著提高,增殖指数(PI)显著上升,与对照组相比,差异显著。经姜黄素不同浓度作用后,HSC 的 S 期比例明显下降,PI 值显著减小,与 H₂O₂ 组相比,有显著性差异。

表 3 姜黄素对 H₂O₂ 诱导 HSC 细胞培养上清的 SOD 活力,MDA,HyP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HyP / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	-	28.80 \pm 0.75 ²⁾	1.06 \pm 0.24 ²⁾	0.94 \pm 0.03 ²⁾
H ₂ O ₂	-	16.38 \pm 0.78	2.68 \pm 0.34	1.49 \pm 0.16
姜黄素 + H ₂ O ₂	25	20.49 \pm 1.14 ²⁾	2.21 \pm 0.15 ¹⁾	1.37 \pm 0.09 ¹⁾
	50	24.13 \pm 1.23 ²⁾	1.71 \pm 0.25 ²⁾	1.18 \pm 0.05 ²⁾
	100	26.75 \pm 0.48 ²⁾	1.32 \pm 0.23 ²⁾	1.11 \pm 0.04 ²⁾

3.5 姜黄素对 HSC 表达 TGF- β_1 mRNA 的影响 TGF- β_1 mRNA 的表达用 TGF- β_1 mRNA/GAPDH 表示。对照组 TGF- β_1 mRNA/GAPDH 为 0.315 \pm 0.011, H₂O₂ 刺激组 TGF- β_1 mRNA/GAPDH 为 0.489 \pm 0.033,姜黄素 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 TGF- β_1 mRNA/GAPDH 为 0.451 \pm 0.038,姜黄素 50 μmol

·L⁻¹组 TGF-β₁mRNA/GAPDH 为 0.414 ± 0.098, 姜黄素 100 μmol · L⁻¹组 TGF-β₁mRNA/GAPDH 为 0.365 ± 0.032。可见, 对照组表达 TGF-β₁mRNA 水平较低, 经 H₂O₂ 刺激后, TGF-β₁mRNA 水平被上调 (P < 0.001), 给予姜黄素 (50, 100 μmol · L⁻¹) 干预后, HSC 细胞 TGF-β₁mRNA 表达受到抑制, 与 H₂O₂ 组比较, 有显著性差异 (P < 0.01)。见图 1。

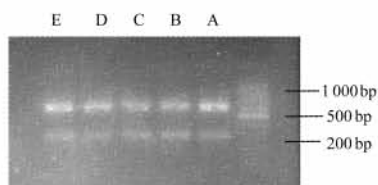


图 1 姜黄素对 HSC 表达 TGF-β₁mRNA 的影响

A. 对照组; B. H₂O₂ 组; C. 姜黄素 25 μmol · L⁻¹ 组;

D. 姜黄素 50 μmol · L⁻¹ 组; E. 姜黄素 100 μmol · L⁻¹ 组

4 讨论

肝纤维化是慢性肝病共有的病理改变, 其主要特征是 HSC 的增殖及细胞外基质的过度沉积。在肝纤维化发生发展过程中, HSC 的激活、增殖是肝纤维化发生发展的中心环节^[3], HSC 活化后, 分泌大量细胞外基质 (ECM) 导致肝纤维化, 因此抑制 HSC 增殖是防治肝纤维化的有效手段之一。研究表明, 姜黄素具有抗增殖、抗氧化、诱导细胞凋亡、抗肝纤维化作用, 本研究实验发现姜黄素能抑制 H₂O₂ 诱导的细胞增殖, 表明姜黄素能抗氧应激, 具有抗肝纤维化作用。

氧化应激在肝纤维化增生中发挥关键的作用, 其发展与活性氧簇 (ROS) 的增加相关。ROS 包括过氧化物、H₂O₂、羟自由基以及需氧反应中产生的各种有害产物^[4]。乙醇、四氯化碳、二甲基亚硝胺、各种类型肝炎及铁过载等引起的肝纤维化模型中均发现大量自由基, 如三氯甲基自由基、超氧阴离子 (O₂⁻) 和 H₂O₂ 以及脂质过氧化物如 MDA 等。研究发现, 肝细胞受损后细胞内及细胞外的 H₂O₂ 及脂质过氧化产物显著增加, 导致 HSC 激活、增殖和 I 型胶原的合成^[5]。有报道库普弗细胞与 HSC 共培养后引起了 HSC 的激活与增殖, 库普弗细胞产生的 H₂O₂ 介导了 HSC 内 I 型胶原蛋白 A1 和 A2 启动子的转录激活, 使 I 型胶原表达增加, H₂O₂ 还诱导了 IL-6 产生和 TIMP-1 的表达^[6]。可见, 氧化应激能刺激 HSC 增殖及胶原合成, 并进一步损伤细胞形成恶性循环, 脂质过氧化产物如 MDA 等能促进 HSC 合

成胶原。检测 MDA 的量常可反映体内脂质过氧化物的程度, 间接反映细胞受自由基攻击的严重程度; SOD 能够清除超氧化阴离子自由基, 保护细胞免受损伤, 测定二指标来反映机体清除氧自由基的能力; 测定 HyP 可显示 HSC 细胞合成和分泌 HyP 的含量。抗氧化剂可通过作用于肝细胞、枯否细胞和 HSC 等多种环节减慢或阻止肝纤维化的发展^[7-8]。本实验用 H₂O₂ 与 HSC 共同培养, 研究姜黄素对氧应激所致 HSC 纤维化效应的影响, 结果表明, 姜黄素各剂量组均明显抑制因 H₂O₂ 诱导的 HSC 增殖, 姜黄素各剂量组能够不同程度降低细胞培养上清 MDA, HyP, 升高 SOD 活力。

研究表明, 氧应激可诱导 HSC 表达 TGF-β₁, 而 TGF-β₁ 是促进 HSC 激活和 ECM 合成的主要细胞因子之一, 抑制 TGF-β₁ 及其信号转导将抑制 HSC 的激活, 具有持久的抗肝纤维化作用^[9]。本实验结果亦表明, H₂O₂ 能刺激 HSC 表达细胞因子 TGF-β₁, 姜黄素各剂量能不同程度抑制 TGF-β₁ 在 HSC 中的表达, 这可能是姜黄素抗肝纤维化作用的关键机制之一。

[参考文献]

- [1] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. Mol Pharm, 2007, 4(6): 807.
- [2] Rajasekaran M, Kasyan A, Jain A, et al. Altered growth factor expression in the aging penis: the Brown-Norway rat model [J]. J Androl, 2002, 23(3): 393.
- [3] Jiao J J, Friedman S L, Costica A. Hepatic fibrosis [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(3): 223.
- [4] Kisseleva T, Brenner D A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(1): S73.
- [5] Nieto N, Friedman S L, Cederbaum A I. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2 E1-derived reactive oxygen species [J]. Hepatology, 2002, 35(1): 62.
- [6] Nieto N. Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of Rodent Kupffer cells in stellate cells [J]. Hepatology, 2006, 44(6): 1487.
- [7] Trappoliere M, Tuccillo C, Federico A, et al. The treatment of NAFLD [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2005, 9(5): 299.
- [8] Shen X H, Cheng W F, Li H H, et al. Effects of dietary supplementation with vitamin E and selenium on rat hepatic stellate cell apoptosis [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(32): 4975.
- [9] Gressner O A, Weiskirchen R, Gressner A M. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options [J]. Comp Hepatol, 2007, 6(6): 7.

[责任编辑 聂淑琴]