

姜黄素抗肝纤维化作用及机理研究

赵珍东*

(广东食品药品职业学院, 广州 510520)

[摘要] 目的: 探讨姜黄素抗肝纤维化作用及可能的作用机制。方法: 以二甲基亚硝胺(DMN)诱导大鼠肝纤维化模型, 然后给予姜黄素治疗, 并以水飞蓟素做对照, 检测肝纤维化血清学指标, 肝组织羟脯氨酸(Hyp)水平, 光镜观察肝组织的病理变化, 免疫组化检测血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)及细胞外信号调节激酶(ERK₁) 在肝组织的表达, RT-PCR方法检测 PDGFR 及 ERK₁mRNA 的表达。结果: 姜黄素可明显降低肝纤维化大鼠血清透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PCIII)含量, 降低肝组织 Hyp 含量, 可明显改善肝纤维化大鼠病理损害, 能抑制肝组织 PDGF-BB、PDGFR 及 ERK₁ 的表达, 并下调肝组织 PDGFR 及 ERK₁ mRNA 的表达。结论: 姜黄素具有良好的抗肝纤维化作用, 其机理与抑制 PDGF-BB 及受体、ERK₁ 表达有关。

[关键词] 姜黄素; 肝纤维化; 机理

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)01-0122-04

Experimental Study on Curcumin on Anti-liver Fibrosis and Its Mechanism

ZHAO Zhen-dong*

(Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of curcumin on anti-liver fibrosis and its mechanism. **Methods:** Model of liver fibrosis was induced by intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine. Rats were divided into 5 groups after four weeks, each group of rats were treated with corresponding drug. The serum HA, PCIII and Hyp in liver tissue were determined. The changes of liver and expression of PDGF-BB, PDGFR, ERK₁ of liver were observed by immunohistochemistry. The level and of PDGFR, ERK₁ mRNA were observed by RT-PCR. **Results:** Curcumin could obviously decrease relevant index on liver fibrosis and the level of Hyp. Pathological results indicated curcumin could obviously improve the pathological lesion of rat liver fibrosis. The protein expression of PDGF-BB, PDGFR, ERK₁ was inhibited, and the mRNA expression of PDGFR, ERK₁ mRNA was down regulated by curcumin. **Conclusion:** Curcumin is effective in treatment of liver fibrosis, and its mechanism of anti-liver fibrosis is related to inhibiting the expression of PDGFR, ERK₁ in liver.

[Key words] curcumin; experimental liver fibrosis; mechanism of action

姜黄素是从姜黄 *Curcuma longa* L. 中提取的天然色素, 可用于慢性肝病、糖尿病等病治疗。初步研究表明, 姜黄素能预防实验性肝纤维化的形成, 本研究探讨了姜黄素对肝纤维化的治疗作用及机理, 现

报道如下。

1 材料

1.1 试验药物 姜黄素, 购自陕西旭煌植物科技有限公司, 经 HPLC 检测纯度达 90% 以上。使用前用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成不同浓度的混悬液。阳性对照药: 水飞蓟素(利加隆 140 胶囊): 德国生产, 临用时用蒸馏水配成 2.4 mg · mL⁻¹ 的供试品液。

[收稿日期] 2009-08-20

[通讯作者] * 赵珍东, Tel: (020) 28854936; E-mail: Zhaozd2008@126.com

1.2 实验动物 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重(200 ±20) g,购自广州中医药大学实验动物中心,普通大鼠饲料喂养。

1.3 试剂 二甲基亚硝胺(DMN)购自日本株式会社,使用前用生理盐水配成 0.5% 溶液备用;透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PCIII)由北京北方生物技术研究所提供;羟脯氨酸(Hyp)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;多克隆抗体血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、细胞外信号调节激酶(ERK₁)和抗生物素蛋白链菌素免疫组化检测试剂盒(SABC,武汉博士德);总 RNA 提取试剂盒 Trizol(北京赛百盛)、TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)试剂盒(大连宝生物)、DNA marker、焦碳酸二乙酯(DEPC)等。

1.4 仪器 SN-695B 型放免测量仪,上海原子核研究所日环仪器厂;UV-754 型分光光度计, BX50 显微镜, Olympus 公司;2035 石蜡切片机,德国 Walldorf 公司;E 990 数码摄像机, Nikon 公司;PCR 扩增仪 2400(美国 PE 公司);DY 6040-30-10 型电泳槽(鼎国生物);高速台式冷冻离心机 3K18(Sigma)。

2 方法

2.1 造模及给药 将 1 mL DMN 原液溶于 200 mL 生理盐水中,配制 0.5% DMN 溶液,避光保存。除正常组外,其余大鼠参照文献^[1] ip 0.5% DMN 2 mL · kg⁻¹,持续 4 周。造模结束后,将存活的大鼠随机分为 4 组,分别为模型组、水飞蓟素组、姜黄素高、低剂量组。正常组和模型组大鼠 ig 蒸馏水,水飞蓟素组给药量为 0.024 g · kg⁻¹,姜黄素给药剂量为 0.1 g · kg⁻¹和 0.2 g · kg⁻¹。每天 ig 1 次,每周 6 日。治疗 4 周后,实验结束。眼眶采血,留取肝组织固定,并取肝组织冻存于液氮中。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 观察大鼠一般状态如饮食变化、行为及毛发改变等。

2.2.2 肝纤维化血清学指标及肝组织 Hyp 含量检测 采用放射免疫法检测 PCIII、HA 的含量,碱水解法检测肝组织 Hyp 含量。

2.2.3 肝组织标本切片 HE 和 VG 胶原染色,光镜观察 重点观察肝内纤维组织增生的情况和肝纤维化的程度。

2.2.4 PDGF-BB, PDGFR, ERK₁ 免疫组化染色 选取正常组、模型组、姜黄素大剂量组做免疫组化观

察,常规 SABC 法染色, DAB 显色。PDGF-BB、PDGFR、ERK₁ 均为兔多克隆抗体,工作浓度为 1:100。按下列标准进行判定:—无染色信号;+染色信号呈颗粒状,棕黄色,阳性细胞数占总细胞数的 50% 以下;++染色信号呈颗粒状,棕黄色,阳性细胞数占总细胞数的 50% 以上;或染色信号呈粗颗粒状、块状,棕黑色,阳性细胞数占总细胞数的 50% 以下;+++阳性信号呈粗颗粒状或块状,棕黑色,阳性细胞数占总细胞数的 50% 以上。

2.2.5 RT-PCR 法检测纤维化大鼠肝组织 PDGFR, ERK₁ mRNA 的表达 取各组冻存的肝组织 0.1g 进行细胞总 RNA 抽提后,逆转录 cDNA:合成引物选用 Oligo dT。在 200 μL PCR 管中,加入 MgCl₂ 2 μL, 10 ×RT Buffer 1 μL, RNase Free dH₂O 3.75 μL, dNTP Mixture 1 μL, RNase Inhibitor 0.25 μL, AMV Reverse Transcriptase XL 0.5 μL, Oligo dT 0.5 μL,再加入总 RNA 1 μL,混匀,离心,30℃ 孵育 10 min,然后 45℃ 加热 30 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min 终止反应。PCR 扩增:引物序列、产物片段长度参见文献^[2,3]。PCR 反应条件:(1) PDGFR:上游引物 5'-CACCATTTCGAGCACCTTTGT-3,下游引物 5'-AGGGCACTCCGAAGAGGTAA-3,产物 677 bp,PCR 反应参数:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,59℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 32 循环,然后 72℃ 延伸 2 min;(2) ERK₁:上游引物 5'-GCTGACCCTGAGCACGACCA-3,下游引物 5'-CTGGTTCATCTGTCGGATCA-3,产物 451 bp,退火温度 62℃,其余反应条件同 PDGFR;GAPDH:上游引物 5'-CTTCCAGGAGCGAGAT-3,下游引物 5'-CAGGATGCCCTTTAGT-3,产物 592 bp。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统进行摄像。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。

2.6 数据处理 数据以均数 ±标准差(̄±s)表示,采用 F 检验,两两比较用 q 检验,用统计软件 SPSS11.0 进行分析。

3 结果

3.1 姜黄素对大鼠一般情况的影响 正常组大鼠生长状态良好,体重增加显著,皮毛光滑,二便如常;大鼠注射 DMN 后,活动少,精神萎靡,喜睡少动,体重不增加甚至较前下降,尿黄,有腹泻,腹水产生率达 70%。经姜黄素治疗后大鼠一般状态明显好于

模型组,腹水的发生率明显降低。

3.2 姜黄素对肝纤维化大鼠血清 PCIII、HA 和肝组织 Hyp 含量的影响 结果见表 1。

表 1 姜黄素对大鼠血清 PCIII、HA、肝组织 Hyp 含量的影响 (̄±s, n=8)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	HA (ng·mL ⁻¹)	PCIII (μg·L ⁻¹)	Hyp (μg·g ⁻¹)
正常组	—	219.18 ±19.00 ²⁾	34.52 ±1.84 ²⁾	227.74 ±18.90 ²⁾
模型组	—	332.09 ±32.30	56.12 ±4.54	452.83 ±44.03
水飞蓟素组	0.024	252.95 ±39.15 ¹⁾	40.99 ±7.79 ¹⁾	311.26 ±15.32 ²⁾
姜黄素组	0.1	262.76 ±11.64 ¹⁾	43.08 ±6.30 ¹⁾	350.31 ±12.56 ¹⁾
	0.2	255.05 ±13.00 ¹⁾	38.87 ±7.62 ²⁾	328.97 ±20.84 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(下同)

从表 1 可以看出,使用 DMN 造模后,模型组大鼠血清中 HA、PCIII 和肝组织中 Hyp 含量明显升高,与正常组比较有显著性差异;经姜黄素治疗后,大鼠血清中 HA、PCIII 含量明显下降,各组大鼠肝脏组织中 Hyp 的含量降低明显,与模型组比较,差异显著。

3.3 病理组织观察 正常组大鼠肝脏呈红褐色,表面光滑,质软;模型组大鼠肝萎缩,表面较粗糙,部分肝表面有细小结节,质硬,肝表面全部出现颗粒,大鼠腹水发生率达 87.5%。经姜黄素治疗后肝脏略变小,表面欠光滑,质地较韧,均较模型组为轻,大鼠腹水发生率为 37.5%。

HE、VG 染色观察结果:正常组肝小叶结构正常,可见极少量胶原纤维,主要分布于汇管区和中央静脉周围。模型组可见肝小叶结构、肝索排列均紊乱,肝小叶中央区明显坏死,胶原纤维增生显著,肝小叶被纤维间隔分割,形成大小不等的假小叶,由胶原纤维构成的纤维间隔完全或部分包绕假小叶。水飞蓟素组可见肝小叶结构较正常,肝细胞体积略增大,间质胶原纤维较少,纤维化程度轻于模型组。姜黄素低剂量组可见肝组织结构有一定的改善,肝小叶中央区可见肝细胞坏死,有少量纤维组织增生,未见假小叶形成;姜黄素高剂量组肝小叶结构基本完整,纤维组织增生不明显。

3.4 肝纤维化大鼠 PDGF-BB, PDGFR, ERK₁ 表达结果 阳染色为棕黄色。正常组 PDGF-BB 仅在门静脉血管内呈轻微表达,模型组在汇管区间隔内细胞、炎细胞、窦旁细胞内均有表达。其分布与肝星状细胞、胶原沉积部位相一致,染色强度主要集中在 ++ ~ +++ 级。姜黄素组 PDGF-BB 表达明显减少,

主要见于血窦旁、汇管区,多集中在 + ~ ++ 级。正常组肝组织未见 PDGFR 表达,模型组内汇管区、假小叶纤维隔内均可见阳性表达,在纤维间隔区表达最明显,炎细胞浸润聚集区也有分布,尤其见纤维间隔和炎细胞浸润区有分支突起的梭形细胞内有粗糙的阳性表达,阳染强度多在 +++ 级。而姜黄素组肝内 PDGFR 阳性表达均有所下降,阳性表达集中在汇管区、间质细胞胞浆内,染色强度比模型组为低。正常组肝 ERK₁ 呈针尖状棕黄色弱阳性表达,主要见于汇管区、中央静脉周围及肝索中。模型组,ERK₁ 的表达明显增多、增强,小叶中央静脉周围、汇管区以及肝小叶内均有大量条索状、星芒状的 ERK₁ 阳性表达,+++ 级表达占半数。姜黄素组 ERK₁ 在肝内的表达减弱,汇管区及纤维组织内表达较少,汇管区及整个肝小叶阳性染色均较弱。

3.5 肝纤维化大鼠 PDGFR、ERK₁ mRNA 的表达情况 与正常组比较,模型组 PDGFR, ERK₁ mRNA 表达水平明显增加,经姜黄素干预后,肝组织 PDGFR, ERK₁ mRNA 的表达被抑制,结果见表 2。

表 2 肝组织 PDGFR、ERK₁ mRNA 表达水平的变化(̄±s, n=8)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	PDGFR mRNA/GAPDH	ERK ₁ mRNA/GAPDH
正常组	—	0.35 ±0.01 ¹⁾	0.56 ±0.04 ²⁾
模型组	—	0.53 ±0.02	1.83 ±0.02
水飞蓟素组	0.024	0.38 ±0.01 ¹⁾	1.15 ±0.01 ²⁾
姜黄素组	0.1	0.40 ±0.04 ¹⁾	1.10 ±0.02 ²⁾
	0.2	0.33 ±0.02 ²⁾	1.05 ±0.03 ²⁾

4 讨论

DMN 具有肝毒性、基因毒性和免疫毒性,它主要引起肝内出血性病变、肝细胞坏死,进一步引起细胞外基质蛋白尤其是胶原在肝脏的沉积,该模型具有 HSC 活化明显、所致纤维化呈渐进性、不随诱因去除而自行停止,有利于观察肝纤维化的程度^[4]。HA、PCIII 是肝纤维化血清学检查的常用指标,联合检测有利于肝纤维化的早期诊断,并与肝纤维化活动水平及程度呈正相关。测定肝组织 Hyp 含量,可反映肝纤维化程度。

PDGF-BB 是 HSC 强有力的有丝分裂原,在肝纤维化的发生发展中起着重要的作用。研究表明,PDGF 可使 HSC-T6 DNA 合成增加 18 倍,是 HSC DNA 合成及细胞增殖作用中最有效的刺激因子之一。肝纤维化时,HSC 活化后表达 PDGFR 以 亚

单位为主,与 PDGF-BB 更具有亲和力,PDGF-BB 及 PDGFR 在促肝纤维化形成中作用只至关重要^[5]。ERK 是 PDGF 信号转导途径之一,PDGF 促增殖的作用机制是 PDGF 受体与调节蛋白 Grb2 结合后可聚集交换因子 mSOS,从而激活 Ras,进一步促使 ERK、Raf-1 及 MEK 的激活。在转录因子 Elk-1 和 SAP 磷酸化作用下,ERK 转位至细胞核,使 c-fos 表达增加,进一步作用于 DNA 转录因子,从而启动了 HSC 增殖^[6]。

姜黄素具有广泛的药理活性,能清除自由基,调节细胞周期、诱导细胞凋亡、调控基因表达,目前是抗肝纤维化作用及机理研究的试验药物。本实验结果表明,模型组 PDGF、PDGFR 及 ERK₁ 表达增强,经姜黄素干预后,肝组织内 PDGFR 表达有一定的减弱,表明姜黄素可下调 PDGF-BB、PDGFR 的表达,从而削弱了 PDGF 与其受体结合,抑制了 PDGF 的促增殖效应。同时,姜黄素能抑制 PDGF 下游信号的传递蛋白 ERK₁ 的表达,阻断了 PDGF 的信号转导通路。可见,姜黄素对 PDGF-BB 的促分裂活性有

抑制作用,从而减弱其促 HSC 增殖效应,可能是姜黄素抗肝纤维化的作用机制。

[参考文献]

- [1] Kim MR, Kim HS, Lee MS, *et al.* Cell cycle protein profile of the hepatic stellate cells (HSCs) in dimethylnitrosamine-induced rat hepatic fibrosis[J]. *Exp Mol Med*, 2005; 37(4): 335-342.
- [2] Aversa A, Basciani S, Visca P, *et al.* Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors in rat corpus cavernosum: changes in expression after transient in vivo hypoxia[J]. *J Endocrinol*, 2001; 170: 395-402.
- [3] 张晓岚,姜慧卿,路新卿,等. 细胞外信号调节激酶在精-甘-天冬-丝氨酸四肽诱导肝星状细胞凋亡中的作用[J]. *中华消化杂志*, 2004, 24(3): 162-166.
- [4] Kanemura H, Iimuro Y, Takeuchi M, *et al.* Hepatocyte growth factor gene transfer with naked plasmid DNA ameliorates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats[J]. *Hepato Res*, 2008; 38(9): 930-939.
- [5] Carmen G, Zamira H, Elizabeth H, *et al.* PI3K is involved in PDGF- receptor upregulation post-PDGF-BB treatment in mouse HSC[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006; 291: G1051-G1061.
- [6] Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells[J]. *Front Biosci*, 2002; 7: 1720-1726.

全国第十次中药鉴定学术会议征文通知(第一轮)

中华中医药学会中药鉴定分会定于 2010 年 7 月在陕西省咸阳市召开“全国第十次中药鉴定学术研讨会”,会期 3 天。会议将邀请著名专家及相关人士就中药鉴定与品质评价、中药质量标准化、信息化、网络化进展情况;中药资源开发及可持续利用、中药鉴定学和生药学教学及实验、教材与标本等问题做专题报告。相关征文事宜通知如下:

一、征文内容

1. 中药鉴定学及生药学的新方法、新技术、新思路、新观点。2. 中药质量标准研究、品质评价相关内容。3. 中药品种考证及相关内容。4. 道地药材、中药资源开发与可持续利用研究及中药材规范化种植(GAP)、采收期、加工、储藏、保管等相关内容;5. 中药珍稀、濒危物种的开发及可持续发展战略问题的讨论;6. 民族药的开发、保护与可持续利用。7. 分子生物学技术、信息技术、生物工程技术在中药现代化研究中的应用。8. 中药化学成分及有效成分的提取、分离及鉴定研究、药效学研究以及其它相关领域的研究论文。9. 有关《中药鉴定学》和《生药学》的教学内容、教学方法、教学手段、教学改革等方面的论文。10. 中药标本的采集、制做、保存新方法、新技术;11. 标本馆现代化管理及网络技术平台的建设。

二、征文要求

1. 征文为未公开发表的论文。请在论文及信封右上角注明中药鉴定或中药标本研讨会稿件字样。2. 稿件一律用 Microsoft Word 文档标准 A4 版面。3. 请附 400 字以内摘要及关键词。4. 截止日期 2010 年 5 月 15 日,请自留底稿,概不退稿。请将论文发送如下 E-mail 地址,注明中药鉴定研讨会稿件字样。5. 论文一经采用,将收入会议论文集,并通知作者出席会议,会议期间颁发论文证书,参会代表计国家级 类继续教育学分 6 分。

三、联系方式

地 址: 陕西中医学院生药教研室(陕西省咸阳市世纪大道)

邮 编: 712046

联系人: 刘阿萍 讲师 手机: 13818946096, Tel/Fax: 029-38185178

E-mail: shengyaojysh@163.com

沈 霞 讲师 手机: 13991046336, E-mail: shengyaojysh@163.com

胡本祥 教授 手机: 13891085127, E-mail: hubenxiang@tom.com