

示,药物作用后 G₀/G₁ 期 HSC-T6 不能向 M 期过渡,造成 G₀/G₁ 期细胞堆积。

诱导 HSC 的凋亡也是减少 HSC 数目的途径之一。本实验研究了红花注射液对活化的 HSC-T6 细胞凋亡的影响。研究发现药物干预后细胞出现 DNA 断裂,细胞膜出泡、内陷等细胞凋亡的典型特征。PI/Annexin V 双染色流式细胞仪测定结果表明红花注射液能诱导 HSC 凋亡,且作用呈剂量依赖性。Gong 等^[5,6] 实验表明,HSC 与 MFB 对 Fas 诱导凋亡的不同表达是由于二者 bcl 基因家族的表达不同,静止的 HSC 强烈表达抗凋亡基因 bcl-2 和 bcl-xL,而活化的 HSC 的 bcl-2 和 bcl-xL 表达明显下降,且促凋亡基因 bax 的表达增加。(bcl-2 + bcl-xL)/bax 值下降,从而引起 Fas 诱导的凋亡发生^[7-9]。本实验结果发现红花注射液使 bcl-2/bax 值明显下降,说明其可通过下调抗凋亡基因 bcl-2 和上调促凋亡基因 bax 的表达来促进活化的 HSC-T6 的凋亡。

本实验结果对进一步研究红花用于肝纤维化治疗提供了基础实验依据。

参考文献:

- [1] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [2] Chen M H, Chen S H, Wang Q F, et al. The molecular mechanism of gypenosides-induced G₁ growth arrest of rat hepatic stellate cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 309-317.
- [3] 刘 璐. 星状细胞活化及其作用研究进展 [J]. *中国医师杂志*, 2008, 10(1): 140-142.
- [4] Watson M R, Wallace K, Geling R, et al. NF- κ B is a critical regulator of the survival of rodent and human hepatic myofibroblasts [J]. *J Hepatol*, 2008, 48(4): 589-597.
- [5] Gong W, Pecci A, Roth S, et al. Transformation-dependent susceptibility of rat hepatic stellate cells to apoptosis induced by soluble Fas ligand [J]. *J Hepatol*, 1998, 28(2): 492-502.
- [6] Wang X Z, Zhang S J, Chen Y X, et al. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fas2 ligand and bcl-2/bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(18): 2706.
- [7] Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, et al. Expression of P53, Bax and bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(38): 6198.
- [8] Sánchez-Munoz D, Castellano-Megias V M, Romero-Gomez M. Expression of bcl-2 in ductular proliferation is related to periportal hepatic stellate cell activation and fibrosis progression in patients with autoimmune cholestasis [J]. *Digest Liver Dis*, 2007, 36: 262-266.
- [9] Park C, Moon D O, Rhu C H, et al. Beta-sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of bax/bcl-2 ratio [J]. *Biol Pharm*, 2007, 30: 1317-1323.

姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究

谌 辉¹, 张景辉², 刘文琪^{3*}

- (1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 传染科, 湖北 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 外科实验室, 湖北 武汉 430022; 3. 华中科技大学同济医学院 寄生虫学研究室, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨姜黄素抗血吸虫病肝纤维化的作用及可能机制。方法 小鼠随机分为 4 组:对照组、感染模型组、吡喹酮治疗组和姜黄素治疗组,除对照组外,各组建立血吸虫病肝纤维化小鼠动物模型,用实时荧光定量 PCR 反应观察小鼠肝组织过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) mRNA 的表达。应用 HE 染色,免疫组化法及多媒体病理图文定量分析,观察各组小鼠肝脏的病理改变及转化生长因子₁ (TGF- β ₁), α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 I、III 型胶原表达的变化。结果 姜黄素可显著减轻肝脏纤维组织增生。感染模型组及吡喹酮治疗组 PPAR mRNA 表达较对照组及姜黄素治疗组显著减弱 ($P < 0.05$);姜黄素治疗组 TGF- β ₁, α -SMA 及 I、III 型胶原水平均明显低于吡喹酮治疗组和感染模型组 ($P < 0.05$)。结论 姜黄素有明显的抗日本血吸虫病肝纤维化作用,其抗纤维化机制与其激活 PPAR 的表达、抑制肝星状细胞 (HSC) 表达 α -SMA 及分泌 TGF- β ₁, 并减少 I、III 型胶原的合成有密切关系。

关键词:姜黄素; 肝纤维化; 血吸虫病; 过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)08-1274-04

* 收稿日期:2008-10-27

作者简介:谌 辉(1972—),女,湖北省武汉市人,主治医师,博士,主要研究方向为慢性肝病及肝纤维化。

Tel: (027) 85726132 E-mail: chenhui0515@yahoo.com.cn

姜黄素 (curcumin) 是从姜黄 *Curcuma longa* L. 中提取的天然色素。近年研究发现姜黄素具有良好的保肝和抗肝纤维化作用^[1],但其具体机制尚不明确。肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 的激活是肝纤维化发生发展的中心环节^[2]。过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activator receptor, PPAR) 作为肝纤维化形成机制中与 HSC 相关的重要信号转导通路之一已受到研究者的重视^[3]。本课题组前期研究表明姜黄素能减轻血吸虫病小鼠肝纤维化,降低 α 、 β 型胶原及血清 ALT、AST 水平^[4]。本实验研究姜黄素对日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏 PPAR mRNA、转化生长因子 β_1 (type beta transforming growth factor, TGF- β_1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和 α 、 β 型胶原表达的影响,并观察肝脏的病理变化,以探讨姜黄素抗血吸虫病肝纤维化的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物:昆明种小鼠,体质量 16~22 g,购于华中科技大学同济医学院动物中心。

1.2 药品、试剂与仪器:姜黄素为美国 Sigma 公司产品(批号 A0218404)。 α -SMA 单抗购自 Sigma 公司,兔抗小鼠 TGF- β_1 单抗、 α 型及 β 型胶原抗体、SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。PPAR 引物购自上海博亚生物技术有限公司,SYBR Green 荧光染料购自美国 Biotium 公司,Trizol 溶液购自美国 Gibco 公司。上海枫岭生物技术有限公司生产的 FTC-2000 型实时荧光定量 PCR 仪。

1.3 动物分组与处理:40 只小鼠随机分为 4 组,每组 10 只,雌雄各半,除对照组外均经皮感染日本血吸虫尾蚴 40 条,8 周后按以下方案处理。对照组 ig 等量的生理盐水 6 周;感染模型组 ig 等量的生理盐水 6 周;吡喹酮治疗组:用吡喹酮 500 mg/kg ig 杀虫治疗 2 d 后用等量的生理盐水 ig 6 周;姜黄素治疗组:用吡喹酮 500 mg/kg ig 杀虫治疗 2 d 后用姜黄素 300 mg/kg^[5,6] ig 治疗 6 周。最后断颈法处死小鼠,取部分肝组织置液氮中保存备检,另一部分置于甲醛中固定,制成石蜡切片。

1.4 病理学检查:小鼠肝组织石蜡切片经 HE 染色后进行病理检查。

1.5 免疫组化分析:切片常规脱腊,30% H₂O₂ 封闭内源性过氧化氢酶,室温孵育 15 min, PBS 洗 15 min;置 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中微波修复 10

min,自然冷却后 PBS 洗 15 min,滴加封闭液孵育 20 min,甩去多余液体;分别滴加 TGF- β_1 、 α -SMA 和 α 、 β 型胶原单抗,37℃ 孵育 1 h, PBS 洗 2 min \times 3 次;滴加生物素二抗 IgG 抗体,37℃ 孵育 20 min, PBS 洗 2 min \times 3 次;滴加 SABC 试剂,37℃ 孵育 20 min, PBS 洗 5 min \times 4 次, DAB 显色,蒸馏水洗涤。苏木素复染,脱水,透明,封片,显微镜下观察。 α -SMA, TGF- β_1 , α 、 β 型胶原染色呈棕黄色,采用 MPZAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统,在偏振光显微镜 40 倍视野下,每张切片随机选取 10 个视野,图像以 BMP 格式存入电脑。计算平均积分吸光度。

1.6 肝组织 mRNA 提取:每份标本取 100 mg 肝组织加入玻璃匀浆器中,加入 Trizol 溶液 1 mL 提取总 RNA 以总 RNA 为模板,逆转录合成 cDNA。

1.7 实时荧光定量 PCR 反应检测 PPAR mRNA 表达:应用 SYBR Green 荧光染料技术行实时定量 PCR 反应,以适量 cDNA 为模板,以磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 为内参照,PCR 扩增 PPAR 基因片断。PPAR 引物,上游:5'-TTTCAAGGGT-GCCA GTTTCG-3', 下游:5'-TCTTTATTCA-T-CAGGGAGGC-3'。GAPDH 引物,上游:5'-GAT-GGTGAAGGTCGGTGTG-3', 下游:5'-GAGGT-CAATGAAGGGGTTCG-3'。PCR 反应参数:预变性 94℃, 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 45 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。在延伸的过程中搜集荧光信号。于每次扩增的同时设置无 cDNA 的阴性对照,将 PCR 产物做熔解曲线,65℃, TOUCH-DOWN PCR, 每个循环温度上升 0.2℃, 150 个循环,证实以上 PCR 反应产物特异性良好。计算方法:待测样品相对值 = 2^{-Ct} , $Ct = Ct_{\text{待测样品}} - Ct_{\text{-actin}}$, $Ct = Ct_{\text{对照}} - Ct_{\text{待测样品}}$ 。本实验统计 Ct 值以比较各组 PPAR mRNA 的表达。

1.8 统计学处理:以上数据均用 SPSS 11.5 软件处理。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析。

2 结果

2.1 肝组织病理形态学变化:对照组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,无变性及坏死,无炎性细胞浸润及纤维化病灶。感染模型组小鼠,肝内汇管区及虫卵肉芽肿周围纤维增生明显,大部分虫卵肉芽肿出现坏死病灶及纤维化,肝血窦扩张充血,细胞颗粒变性,大量炎性细胞浸润。吡喹酮治疗组小鼠肝脏汇管区及肉芽肿内少量纤维组织增生,肝细胞

颗粒变性少,可见炎性细胞浸润。姜黄素治疗组肝脏病变更轻,肝细胞排列清晰,少量炎性细胞浸润,肝脏

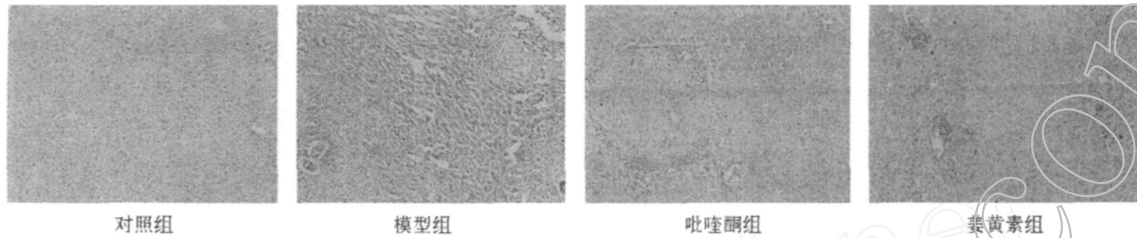


图 1 姜黄素对肝纤维化小鼠肝组织病理改变的影响

Fig. 1 Effect of curcumin on pathology change of liver tissue in hepatic fibrosis mice

与表达的定量比较:对照组小鼠肝脏 TGF- β_1 阳性细胞主要位于中央小叶和窦周细胞。姜黄素治疗组小鼠肝脏 TGF- β_1 阳性细胞主要位于中央小叶,窦周细胞的细胞质及虫卵肉芽肿,呈棕黄色,肝细胞不着色。感染模型组及吡嗪酮治疗组除上述部位外,还可见于少数肝细胞和肝星状细胞、炎性细胞、门静脉周围纤维带及纤维间隔中,呈深棕黄色。对照组 -SMA 在血管壁有少许表达,姜黄素治疗组 -SMA 在血管壁和虫卵肉芽肿有少量表达,模型组及吡嗪酮治疗组小鼠肝脏血管壁、汇管区、炎性细胞浸润区、虫卵肉芽肿周围纤维增生区及靠近中央静脉的肝窦均有表达。对照组及姜黄素治疗组 α_1 型胶原分布仅见于汇管区和中央静脉管壁,感染模型组及吡嗪酮治疗组,还可见于狄氏间隙、纤维间隔及纤维组织增生区。

吡嗪酮治疗组 TGF- β_1 及 α_1 型胶原水平明显低于感染模型组 ($P < 0.05$),但 -SMA 及 α_2 型胶原水平两组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。姜黄素治疗组 TGF- β_1 、-SMA 及 α_1 型胶原水平均明显低于吡嗪酮治疗组和感染模型组,差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 姜黄素对肝纤维化小鼠肝组织内 TGF- β_1 、-SMA 及 α_1 、 α_2 型胶原表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of curcumin on expression of TGF- β_1 , -SMA, type α_1 and type α_2 collagen in liver tissue of hepatic fibrosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF- β_1	-SMA	α_1 型胶原	α_2 型胶原
对照	-	0.386 ± 0.155	0.639 ± 0.128	0.373 ± 0.137	0.387 ± 0.142
模型	-	0.936 ± 0.137*	0.988 ± 0.164*	0.702 ± 0.196*	0.815 ± 0.186*
吡嗪酮	500	0.682 ± 0.129*	0.927 ± 0.163*	0.565 ± 0.123*	0.771 ± 0.158*
姜黄素	300	0.476 ± 0.107*	0.696 ± 0.142#	0.395 ± 0.115#	0.486 ± 0.131#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $P < 0.05$;

与吡嗪酮组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group;

$P < 0.05$ vs praziquantel group

汇管区及肉芽肿内纤维组织增生不明显(图 1)。

2.2 肝内 TGF- β_1 、-SMA 和 α_1 型胶原的分布

2.3 PPAR mRNA 在小鼠肝组织的表达:感染模型组及吡嗪酮治疗组 PPAR mRNA 表达较对照组及姜黄素治疗组显著减弱 ($P < 0.05$),姜黄素治疗组虽比对照组值低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 姜黄素对肝纤维化小鼠肝组织 PPAR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of curcumin on expression of PPAR mRNA in liver tissue of hepatic fibrosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PPAR mRNA
对照	-	- 15.668 ± (- 4.132)
模型	-	- 28.563 ± (- 7.417)*
吡嗪酮	500	- 25.647 ± (- 6.564)*
姜黄素	300	- 17.655 ± (- 4.385)

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $P < 0.05$;

与吡嗪酮组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group;

$P < 0.05$ vs praziquantel group

3 讨论

大量研究证实,姜黄素具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、清除自由基、抗微生物以及对心血管系统、消化系统等多方面的药理作用,而且毒性低,受到国内外的广泛关注^[5]。近年研究发现姜黄素具有良好的保肝和抗肝纤维化作用^[6]。Rukkumani^[7]实验发现,姜黄素在体内外对各种毒性物质如 CCl₄、黄曲霉素、对乙酰氨基酚、环磷酰胺诱导的肝损害均有防护作用。对肝纤维化大鼠,连续 30 d 给予姜黄素 300 mg/kg,可减少肝脏胶原沉积和 α_1 型胶原 mRNA 的表达。在体外,可减少 HSC 的合成,下调 α_1 型胶原蛋白及其 β_1 链 mRNA 的表达^[8]。但姜黄素抗肝纤维化的具体机制尚不明确。

HSC 在肝纤维化的发生发展中发挥重要作用^[9]。HSC 是一种兼具间质与实质性细胞功能的两性细胞,可表达结蛋白与胶原纤维酸性蛋白。慢

性肝损伤时 HSC 大量增殖,并转化为肌成纤维细胞,产生肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。ECM 由胶原及结构糖蛋白组成,肝脏的胶原又以 I 型和 III 型胶原为主^[10]。活化的 HSC 表达 α -SMA, 获得收缩性。HSC 表达 α -SMA 是其活化的显著特征之一^[11]。激活的 HSC 可分泌多种细胞因子,其中 TGF- β 1 是最关键的致纤维化因子,具有抑制肝细胞再生,促进 HSC 产生胶原、纤维黏连蛋白等细胞外基质,减少基质降解以及诱导肝细胞凋亡的作用^[12]。TGF- β 1 是调控肝纤维化的重要因子,在肝纤维化形成中发挥重要作用^[13]。

PPAR 是一类由配体激活的核转录因子,属型核受体超家族成员,是重要的肝脏代谢功能调节分子,其功能改变与一些肝脏疾病有相关性^[14]。研究证实,静止状态人类 HSC 表达 PPAR γ , 而活化状态的 HSC 表达明显减少,PPAR 在维持 HSC 作为静止状态的表型上具有重要作用,PPAR 表达减少与 HSC 激活密切相关^[15]。肝脏 HSC 活化时,PPAR 表达和 PPAR 反应元件结合成分减少。在体外用 PPAR 配体可逆转这一反应。PPAR 作为肝纤维化机制中的重要信号转导通路已成为肝纤维化研究领域里的一个新热点。

本实验用日本血吸虫尾蚴感染小鼠建立肝纤维化模型,在肝纤维化早期采用姜黄素治疗,观察肝组织病理形态学变化,显示姜黄素可显著减轻肝脏纤维组织增生。并通过检测 PPAR mRNA 在各组小鼠肝组织的表达,发现感染模型组及吡喹酮治疗组肝组织 PPAR mRNA 表达较对照组显著减弱,用姜黄素治疗可明显提高 PPAR mRNA 的表达。应用免疫组化技术和多媒体彩色病理图文分析系统对肝脏 TGF- β 1, α -SMA 和 I、III 型胶原进行定量研究,显示姜黄素可显著降低血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏 I、III 型胶原水平及 TGF- β 1、 α -SMA 的表达。表明姜黄素有明显的抗日本血吸虫病肝纤维化作用,其抗纤维化机制与激活 PPAR 的表达,抑制 HSC 表达 α -SMA 及分泌 TGF- β 1, 并减少 I、III 型胶原的合成有密切关系。但姜黄素是如何激活 PPAR 的表达,是否具有 PPAR 配体样作用,通

过何种途径作用于 HSC 细胞等问题还有待进一步明确。

参考文献:

- [1] Nail R S, Mujumdar A M, Ghaskadbi S. Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 95(1): 31-37.
- [2] Bartley P B, Ramm G A, Jones M K, *et al.* A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of Schistosoma Japonicum egg-induced fibrosis [J]. *Int J Parasitol*, 2006, 36(9): 993-1001.
- [3] Yang L, Chan C C, Kwon O S, *et al.* Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in liver fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291(5): G902-911.
- [4] 谌 辉, 刘文琪. 姜黄素对日本血吸虫病小鼠肝纤维化的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(19): 1679-1682.
- [5] 许东晖, 王 胜, 金 晶, 等. 姜黄素的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1737-1740.
- [6] Eybl V, Kotyzova D, Bludovska M. The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice [J]. *Toxicology*, 2004, 151(1): 78-85.
- [7] Rukkumani R, Sri Balasubashini M, Vishwanathan P, *et al.* Comparative effects of curcumin and photo-irradiated curcumin on alcohol- and polyunsaturated fatty acid-induced hyperlipidemia [J]. *Pharmacol Res*, 2002, 46(3): 257-264.
- [8] Kang H C, Nan J, Park P H, *et al.* Curcumin inhibits collagen synthesis and hepatic stellate cell activation *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54(1): 119-126.
- [9] Randao D F, Ramalho L N, Ramalho F S, *et al.* Liver cirrhosis and hepatic stellate cells [J]. *Acta Cir Bras*, 2006, 21(Suppl1): 54-57.
- [10] Tsukada S, Parsons C J, Rippe R A. Mechanisms of liver fibrosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1-2): 33-60.
- [11] Reeves H L, Friedman S L. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis [J]. *Front Biosci*, 2002, 7(1): 808-826.
- [12] 刘 芳, 刘金星. 转化生长因子 β 1 在肝纤维化中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(4): 86-88.
- [13] Jiang W, Yang C Q, Liu W B, *et al.* Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(11): 1634-1638.
- [14] Inoue M, Ohtake T, Motomura W, *et al.* Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(1): 215-222.
- [15] Sung C K, She H, Xiong S, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at a posttranslational level in hepatic stellate cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286(5): G722-G729.