

# 姜黄素对大鼠肝星状细胞中 TGF- $\beta$ 调节的 NADPH 氧化酶 4 的激活及 Smad 信号通路的影响

王雅蕊<sup>1,2,3</sup>, 李俊<sup>1,2,3</sup>, 黄成<sup>1,2,3</sup>, 李小枫<sup>1,2,3</sup>, 李晓慧<sup>1,2,3</sup>, 王欢<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 研究姜黄素潜在的抗纤维化作用,以及转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 诱导大鼠肝星状细胞(HSC-T6) 激活的机制。方法 不同浓度的姜黄素(0、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 HSC-T6 后,用 MTT 法测定其对 HSC-T6 增殖作用的影响;用 RT-PCR 法检测其 mRNA 水平的表达;用 Western blot 法检测表达  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、细胞外基质主要成分  $\alpha$ 1I 胶原(Coll $\alpha$ 1)、NADPH 氧化酶 4 (NOX 4)、Smad 2、Smad 3 及其磷酸化的水平。结果 40  $\mu\text{mol/L}$  的姜黄素组刺激 HSC-T6 48 h 后,其抑制率达到最大,显著低于仅 TGF- $\beta$ 1 刺激组、5、10 及 20  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素组 ( $P < 0.05$ )。姜黄素可显著降低激活型 HSC-T6 的  $\alpha$ -SMA、 $\alpha$ 1I 胶原 mRNA 与蛋白表达,从而可以降低细胞外基质的沉积;有效降低了 NOX 4 的蛋白水平,减少了活性氧的水平;还明显降低 Smad 2、Smad 3 的磷酸化程度,呈浓度依赖性。结论 姜黄素在体外能够明显地抑制 HSC-T6 激活,对肝纤维化的发生发展具有一定抑制作用,其机制可能与抑制 TGF- $\beta$  诱导的 NOX4 的激活及 Smad 信号通路有关。

**关键词** 姜黄素;大鼠肝星状细胞;转化生长因子  $\beta$ ; NADPH 氧化酶 4; Smad 蛋白

**中图分类号** R 962.1; R 967

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)03-0319-05

肝纤维化是指各种致病因子所致肝脏内弥漫性细胞外基质(extracellular matrix, ECM) 过度沉积的一个慢性肝损伤的病理过程。若控制不及时,可最终发展为肝硬化<sup>[1-2]</sup>。肝纤维化的标志是肝星状细胞的活化过程,而转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 通过其下游的 Smad 等可促进大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC-T6) 活化、增殖,从而在肝纤维化发生发展的进程中有重要作用<sup>[3]</sup>。NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX 4) 是肝脏中活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) 的一个主要来源。姜黄素是姜黄根茎

中的一种黄色成分,具有抗癌、抗氧化和抗感染等特性<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5-7]</sup>表明,姜黄素具有抗肝纤维化作用,但其分子机制仍有待进一步研究。该研究旨在探讨姜黄素对 TGF- $\beta$  诱导 HSC-T6 中 NOX 4 的激活和 Smad 表达的影响,对肝纤维化和姜黄素干预的分子机制的研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系** HSC-T6 细胞由上海中科院细胞库提供。细胞在常规培养基(DMEM 高糖 + 10% 胎牛血清 + 100 kU/L 青霉素 + 100 mg/L 链霉素),在含 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度恒温培养箱条件(37  $^{\circ}\text{C}$ ) 下孵育。取对数生长期细胞用于实验。

**1.2 药品和试剂** 姜黄素(批号: BCBL0424V, 质量分数  $\geq 99.8\%$ )、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、DMSO(美国 Sigma 公司); TGF- $\beta$ 1(美国 R&D Systems 公司); 胎牛血清(杭州四季青公司); DMEM 高糖培养基(美国 HyClone 公司); 胰蛋白酶、PBS、RIPA 强裂解液、PMSF(上海碧云天生物技术有限公司); MML-V 逆转录试剂盒、TRIzol(日本 TaKaRa 公司); 100 次 RT-PCR 扩增试剂盒(美国 Invitrogen 公司); RT-PCR 引物的合成(上海生工生物工程技术有限公司); BCA 法蛋白浓度定量试剂盒(武汉生物技术有限公司);  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、 $\alpha$ 1I 胶原(collagen type I, Coll $\alpha$ 1)、NOX4 单克隆抗体(美国 Bioworld Technology); 磷酸化 Smad 2 和 Smad 3 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司); 总 Smad 2 和 Smad 3 单克隆抗体(美国 Bioworld 公司);  $\beta$ -actin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶标记抗兔和抗鼠 IgG(北京中杉金桥公司); ECL 化学发光试剂盒(美国 Pierce 公司)。

**1.3 主要仪器** NAPCO-6100 型细胞恒温培养箱由美国 SHELLAB 公司提供; SWCJ-4F 型单人双面超净工作台由江苏苏州安泰空气技术有限公司提供; MLS-3020 型自动高压灭菌锅由日本 Sanyo 公司提供; 3-46K 型高速冷冻离心机由美国 Sigma 公司提供; PCR 梯度扩增仪由德国 Eppendorf 公司提供;

2014-11-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273526)

作者单位: 安徽医科大学<sup>1</sup> 药学院、<sup>2</sup> 肝病研究所, 合肥 230032

<sup>3</sup> 安徽创新药物产业共性技术研究所, 合肥 230032

作者简介: 王雅蕊, 女, 硕士研究生;

李俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 仪由美国 BioRad 公司提供。

**1.4 MTT 检测** 调整传代 HSC-T6 细胞悬液浓度, 约为  $1 \times 10^4$  个/ml 后接种于两个 96 孔板中, 每孔 200  $\mu$ l 细胞悬液, 放于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  恒温箱培养。待细胞贴壁后除对照组和仅加 TGF- $\beta$  刺激组外, 其他加药组分别加入终浓度各为 5、10、20、40  $\mu$ mol/L 的姜黄素, 作用 30 min 后, 除对照组外每组加入 TGF- $\beta$  (10 ng/ml) 刺激细胞同时分别培养 24 h 和 48 h, 分成 6 组: 对照组, TGF- $\beta$  刺激组, TGF- $\beta$  + 5  $\mu$ mol/L 姜黄素组, TGF- $\beta$  + 10  $\mu$ mol/L 姜黄素组, TGF- $\beta$  + 20  $\mu$ mol/L 姜黄素组, TGF- $\beta$  + 40  $\mu$ mol/L 姜黄素组, 至作用时间后加入 5 mg/ml MTT 溶液 20  $\mu$ l, 培养 4 h。移除上清液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ l, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪检测波长 490 nm 处各孔的吸光度 (absorbance, A) 值。评估姜黄素对 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用。

**1.5 RT-PCR 检测** 按 TRIzol 试剂说明书提取经处理后的 HSC-T6 总 RNA, 再立即用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 测定  $A_{260} : A_{280}$  比值, 重复 3 次, 测得该比值稳定于 1.8 ~ 2.0。逆转录得到的 cDNA 后进行扩增, 以  $\beta$ -actin 作为检测的内参物, RT-PCR 扩增的反应体系为 25  $\mu$ l, 包括 cDNA 1  $\mu$ l, 上下游引物各 0.5  $\mu$ l, Mix 12.5  $\mu$ l, 用无酶水补至总体积 25  $\mu$ l。PCR 反应参数: 95  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 总共扩增 35 个循环。最终所得的扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色。通过光密度扫描, 以目的条带与内参条带的灰度值比值作为目的基因的相对转录量再进行统计学分析。引物序列、产物片段长度及反应条件见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

| 基因              | 引物序列                                                          | 退火温度<br>( $^{\circ}$ C) | 产物长度<br>(bp) |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------|
| $\alpha$ -SMA   | 5'-TGGCCACTGCTGCTTCTTCTT-3'<br>5'-GGGGCCAGCTTCGTCATACTCCT-3'  | 60                      | 422          |
| Coll $\alpha$ 1 | 5'-TACAGCAGCCTTGTGGATG-3'<br>5'-TTGAGTTTGGGTTGTTGCTC-3'       | 51                      | 256          |
| $\beta$ -actin  | 5'-TGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'<br>5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' | 51                      | 345          |

**1.6 Western blot 法检测** HSC-T6 细胞用冰冷的 RIPA 裂解缓冲液加 PMSF 冰上裂解 30 min, 收集细胞裂解物, 于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样量为 50

$\mu$ g, 进行 10% 或 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h, 再转移到活化的 PVDF 膜上, 非特异性封闭 3 h, 加入一抗, 4  $^{\circ}$ C 过夜。次日含辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h, 后用 TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, 最后用 ECL 发光剂进行检测, 曝光、显影, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 分别以目的蛋白与  $\beta$ -actin 光密度比值作为该目的蛋白的相对表达量。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用方差分析、 $t$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ , 所有检验均为双侧检验。

## 2 结果

**2.1 姜黄素对 TGF- $\beta$  诱导活化的 HSC-T6 细胞增殖的影响** MTT 法检测显示, 与对照组相比, 经 TGF- $\beta$  10 ng/ml 刺激后, HSC-T6 细胞的增殖活性明显增强; 与 TGF- $\beta$  刺激组相比, 姜黄素组 HSC-T6 增殖能力明显减弱, 差异有统计学意义 ( $P_{24h} < 0.05$ 、 $0.01$ ,  $F = 37.318$ ), ( $P_{48h} < 0.01$ ,  $F = 165.123$ ), 且呈浓度相关性, 当浓度达到 40  $\mu$ mol/L 时抗增殖作用非常显著。见图 1。

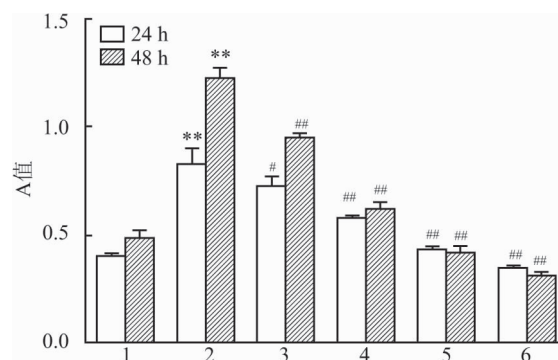


图 1 姜黄素对 TGF- $\beta$  诱导活化的 HSC-T6 增殖的影响

1: 对照组; 2: TGF- $\beta$  刺激组; 3: TGF- $\beta$  + 5  $\mu$ mol/L 姜黄素组; 4: TGF- $\beta$  + 10  $\mu$ mol/L 姜黄素组; 5: TGF- $\beta$  + 20  $\mu$ mol/L 姜黄素组; 6: TGF- $\beta$  + 40  $\mu$ mol/L 姜黄素组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TGF- $\beta$  刺激组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.2 姜黄素对 TGF- $\beta$  刺激 HSC-T6 的激活及细胞外基质沉积的影响** 扩增产物凝胶电泳结果见图 2。与未处理的对照组相比, 经 TGF- $\beta$  10 ng/ml 刺激后  $\alpha$ -SMA 和  $\alpha$ 1I 胶原 mRNA 明显增高; 与 TGF- $\beta$  刺激组相比, TGF- $\beta$  加不同浓度姜黄素组通过减少  $\alpha$ -SMA mRNA 与  $\alpha$ 1I 胶原 mRNA 水平的表达, 从而减少了细胞外基质的沉积, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $F = 58.102$ ;  $P < 0.01$ ,  $F = 315.856$ )。免疫印

迹检测结果显示,HSC-T6 细胞经姜黄素处理后, $\alpha$ -SMA 和  $\alpha$ 11 胶原表达均有不同程度的下降,且呈浓度相关性,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $F = 356.227$ ;  $P < 0.01$ ,  $F = 28.952$ ),见图 3。

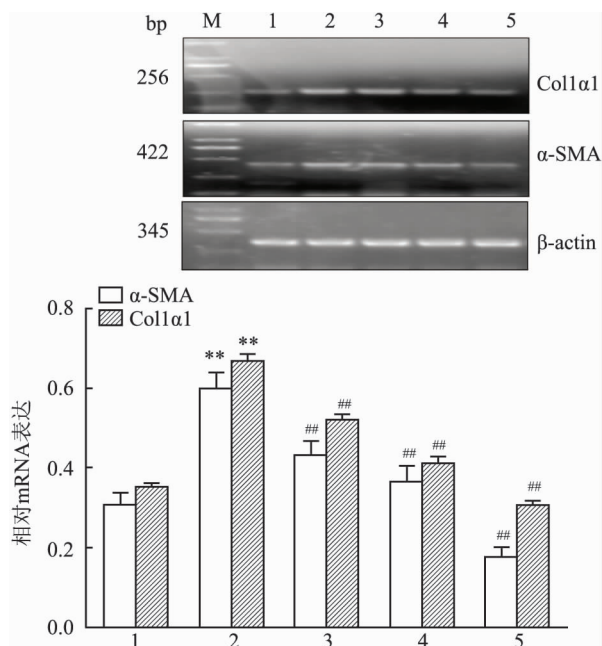


图2 姜黄素对 TGF-β1 诱导活化的 HSC-T6 细胞  $\alpha$ -SMA、Col1α1 mRNA 表达

1: 对照组; 2: TGF-β 刺激组; 3: TGF-β + 5 μmol/L 姜黄素组; 4: TGF-β + 10 μmol/L 姜黄素组; 5: TGF-β + 20 μmol/L 姜黄素组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TGF-β 刺激组比较: ##  $P < 0.01$

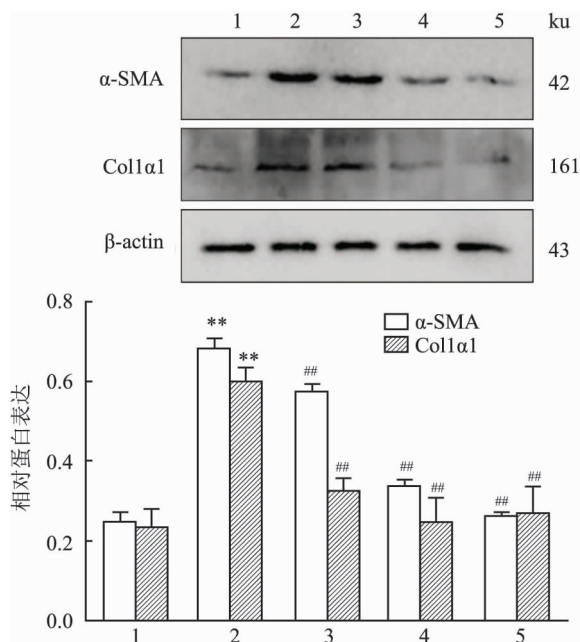


图3 姜黄素对 TGF-β1 诱导活化的 HSC-T6 细胞  $\alpha$ -SMA、Col1α1 蛋白表达

1: 对照组; 2: TGF-β 刺激组; 3: TGF-β + 5 μmol/L 姜黄素组; 4: TGF-β + 10 μmol/L 姜黄素组; 5: TGF-β + 20 μmol/L 姜黄素组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TGF-β 刺激组比较: ##  $P < 0.01$

## 2.3 姜黄素对 TGF-β 诱导的 NOX4 表达的影响

NOX4 的蛋白水平在激活的 HSC-T6 (TGF-β 刺激组) 中上调。而经不同浓度的姜黄素处理后,明显稀释了 TGF-β 诱导的 NOX4 的上调作用,而且呈浓度依赖性,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $F = 30.888$ ),见图 4。

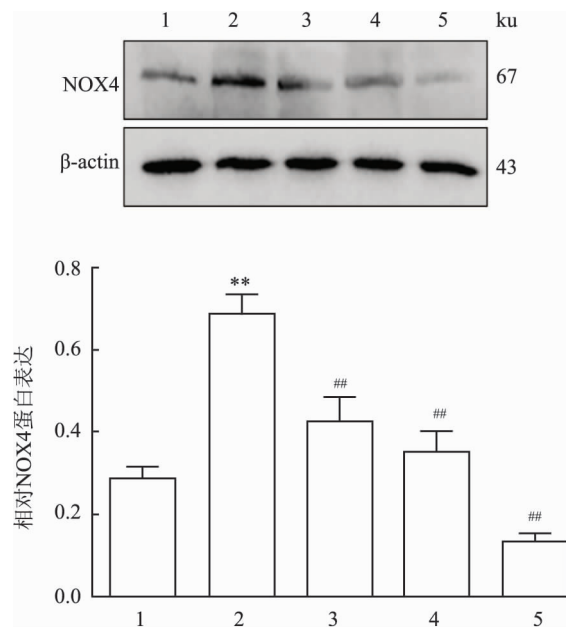


图4 姜黄素对 TGF-β 诱导活化的 HSC-T6 细胞 NOX4 蛋白表达

1: 对照组; 2: TGF-β 刺激组; 3: TGF-β + 5 μmol/L 姜黄素组; 4: TGF-β + 10 μmol/L 姜黄素组; 5: TGF-β + 20 μmol/L 姜黄素组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TGF-β 刺激组比较: ##  $P < 0.01$

## 2.4 姜黄素对 TGF-β 诱导的 Smad 表达的影响

Western blot 法实验结果表明,HSC-T6 细胞经 TGF-β (10 ng/ml) 作用 24 h 后,与对照组相比,Smad 磷酸化水平 phospho-Smad 2 (p-Smad 2)、phospho-Smad 3 (p-Smad3) 明显上调,但经和姜黄素一起作用后,与仅 TGF-β 10 ng/ml 相比,Smad2 的磷酸化水平逐步下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $F = 72.400$ ),而且 Smad3 的磷酸化水平也逐步下降 ( $P < 0.01$ ,  $F = 13.303$ ),见图 5。Smad 2 和 Smad 3 蛋白本身无显著变化。

## 3 讨论

多个复杂信号通路,包括氧化应激和 Smad 信号,参与 TGF-β 诱导的 HSC-T6 激活。氧化应激在各种疾病中起着重要作用,通过超氧化物和过氧化氢的形式产生活性氧。之前的研究<sup>[8]</sup>表明,氧化应激在各种细胞中参与调节 TGF-β 诱导的各种细胞反应。而在 HSC-T6 中,氧化应激的主要来源来

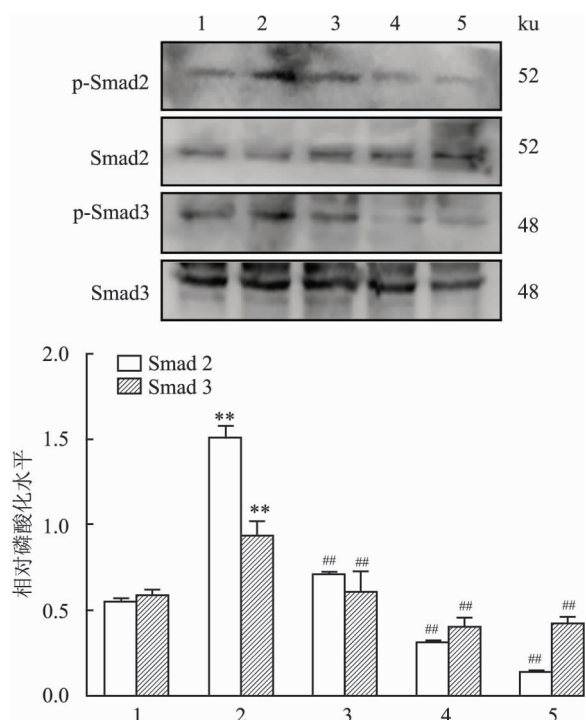


图5 姜黄素对 TGF- $\beta$  诱导活化的 HSC-T6 的 Smad 2、Smad 3 蛋白表达及其磷酸化水平

1: 对照组; 2: TGF- $\beta$  刺激组; 3: TGF- $\beta$  + 5  $\mu$ mol/L 姜黄素组; 4: TGF- $\beta$  + 10  $\mu$ mol/L 姜黄素组; 5: TGF- $\beta$  + 20  $\mu$ mol/L 姜黄素组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TGF- $\beta$  刺激组比较: ##  $P < 0.01$

自 NADPH 氧化酶; 是一个由多种亚单位组成的, 含有 6 个  $\alpha$  螺旋跨膜结构域的酶复合体。NADPH 氧化酶家族包括 7 个成员, 其中, NOX 4 在 HSC-T6 表达并通过特定的细胞内信号使 HSCs 活化, 从而促进肝纤维化形成。因此, 通过阻断 NOX 4 产生 ROS, 可能会阻止肝纤维化形成。

目前, 许多研究<sup>[8]</sup>表明, TGF- $\beta$  是肝纤维化发展的关键因子。因此, TGF- $\beta$  信号级联就成为了研究种种致病因子所导致肝脏病变的潜在目标。TGF- $\beta$  结合其受体后激活, 其信号传递需要一系列受体后信号分子。之前有研究<sup>[9]</sup>表明, Smad 蛋白是 TGF- $\beta$  受体作用的胞内激酶底物, 有效地介导了 TGF- $\beta$  在细胞内的信号转导。Smad 家族蛋白由受体调节型 Smad 蛋白 (Smad 2、Smad 3)、共同调节型 Smad 蛋白 (Smad 4) 和抑制型 Smad 蛋白 (Smad 6、Smad 7) 3 类组成。TGF- $\beta$  刺激激活其受体, 作用于胞质内下游分子, 激活的 Smad 2、Smad 3 与 Smad 4 形成异源寡聚物, 将 TGF- $\beta$  信号从胞质移到细胞核中, 同时招募其他转录调节因子共同调节下游靶基因的转录。TGF- $\beta$ /Smads 是经典的信号转导通路之一, 其信号转导的基本过程为: TGF- $\beta$  首先在细胞外与

细胞膜表面 T $\beta$ R II 结合, 同时激活 T $\beta$ R I, 作用于下游因子, 使 Smad 2/3 磷酸化, Smad 2/3 激活与 Smad 4 形成 R-Smad-Smad 4 复合物进入胞核发挥转录调节作用<sup>[10]</sup>。因此, 本实验通过检测 p-Smad 2/3 水平作为 TGF- $\beta$  信号通路的激活水平和强度。在慢性肝损伤的情况下, 通过 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路激活 HSC-T6, 导致 HSC-T6 活化增殖, 转化为成纤维细胞, 刺激 ECM 的合成, 而且增加金属蛋白酶组织抑制因子表达, 从而抑制细胞外基质 ECM 降解, 使 ECM 降解和合成严重失衡, ECM 沉积过度, 促进肝纤维化的进展<sup>[11]</sup>。

既往研究<sup>[12]</sup>结果显示, 姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗感染及抗肿瘤等作用。但是, 姜黄素的作用分子机制复杂, 可能有各种信号分子参与。本实验将培养的 HSC-T6 细胞为研究对象, 在体外 TGF- $\beta$  诱导的 HSC-T6 细胞 NOX4 的表达和 Smads 信号转导通路姜黄素的干预作用, 进一步探讨姜黄素防治肝纤维化的作用机制。本研究显示, NOX4 蛋白表达在 TGF- $\beta$  刺激下上调, 而姜黄素剂量依赖性地降低其上调作用, 由此得出姜黄素在 HSCs 中通过改变 NOX4 的表达从而调控 ROS 信号。相似地, HSC-T6 细胞经 TGF- $\beta$  (10 ng/ml) 作用 24 h 后, 与对照组相对比, Smad2、Smad3 的磷酸化水平显著增强, 差异有统计学意义。结果说明, TGF- $\beta$  过表达激活了 Smad 信号转导途径, 使 R-Smad (Smad2、3) 表达增强, 进而使信号得以传递。但经姜黄素干预后, Smad2、3 的磷酸化程度受到抑制, 与仅 TGF- $\beta$  刺激组相比有显著性差异。说明姜黄素具有下调 NOX4 及 Smad 2、Smad 3 的表达, 并抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导, 进一步揭示了肝纤维化的预防和治疗机制。

## 参考文献

- [1] Koller T, Kollerova J, Huorka M, et al. Noninvasive scoring algorithm to identify significant liver fibrosis among treatment-naive chronic hepatitis C patients [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014, 26(10): 1108-15.
- [2] Fuchs B C, Hoshida Y, Fujii T, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2014, 59(4): 1577-90.
- [3] 邓燕红, 沈能, 凌宁, 等. 姜黄素衍生物对四氯化碳诱导肝纤维化的治疗作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 17(2): 147-53.
- [4] Oelkrug C, Lange C M, Wenzel E, et al. Analysis of the tumoricidal and anti-cachectic potential of curcumin [J]. Anticancer Res, 2014, 34(9): 4781-8.
- [5] Zhang F, Zhang Z, Chen L, et al. Curcumin attenuates angiogen-



- esis in liver fibrosis and inhibits angiogenic properties of hepatic stellate cells [1]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(7): 1392–406.
- [6] Zhang Z, Guo Y, Zhang S, et al. Curcumin modulates cannabinoid receptors in liver fibrosis *in vivo* and inhibits extracellular matrix expression in hepatic stellate cells by suppressing cannabinoid receptor type-1 *in vitro* [1]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 721(1–3): 133–40.
- [7] Vera-Ramirez L, Pérez-Lopez P, Varela-Lopez A, et al. Curcumin and liver disease [M] // José L. Quiles. *Biofactors*, 2013, 39(1): 88–100.
- [8] Tobar N, Toyos M, Urrea C, et al. C-Jun N terminal kinase modulates NOX-4 derived ROS production and myofibroblasts differentiation in human breast stromal cells [1]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 640.
- [9] Presser L D, McRae S, Waris G. Activation of TGF- $\beta$ 1 promoter by hepatitis C virus-induced AP-1 and Sp1: role of TGF- $\beta$ 1 in hepatic stellate cell activation and invasion [1]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56367.
- [10] Ding Z Y, Jin G N, Liang H F, et al. Transforming growth factor beta induces expression of connective tissue growth factor in hepatic progenitor cells through Smad independent signaling [1]. *Cell Signal*, 2013, 25(10): 1981–92.
- [11] Park S H, Cho H J, Jeong Y J, et al. Melittin inhibits TGF- $\beta$ -induced pro-fibrotic gene expression through the suppression of the TGF $\beta$ RII-Smad, ERK1/2 and JNK-Mediated signaling pathway [1]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(5): 139–52.
- [12] Yoshida K, Matsuzaki K. Differential Regulation of TGF- $\beta$ /Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries [M] // Yoshida K. *Front Physiol*, 2012, 3: 53.
- [13] Ali S O, Darwish H A, Ismail N A. Modulatory effects of curcumin, silybin-phytosome and alpha-R-lipoic acid against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats [1]. *Chem Biol Interact*, 2014, 216: 26–33.

## Curcumin attenuates hepatic fibrogenesis through interrupting TGF- $\beta$ -mediated NADPH oxidase 4 activation and Smad signaling *in vitro*

Wang Yarui<sup>1,2,3</sup>, Li Jun<sup>1,2,3</sup>, Huang Cheng<sup>1,2,3</sup>, et al

(<sup>1</sup>School of Pharmacy, <sup>2</sup>Institute for Liver Diseases, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>3</sup>Institute for Innovative Drug Industrial Generic Technology Research of Anhui, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To observe the effects of curcumin on activation and proliferation of hepatic stellate cells (HSCs) and, their expression of NADPH oxidase 4 (NOX 4) and smad signaling factors of rat hepatic stellate cells line *in vitro* using a rat HSC line. **Methods** Synchronized HSC-T6 cells were treated with different dose of purified curcumin (0, 5, 10, 20, 40  $\mu$ mol/L). Untreated cells were viewed as controls. MTT technique analysis was used to examine the proliferation of the hepatic stellate cells stimulated by different concentration of curcumin; the mRNA expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and main constituents in extracellular matrix I procollagen ( $\alpha$ 1I collagen) were determined by RT-PCR in TGF- $\beta$ -stimulated HSCs, and the antifibrotic effects on the protein expression of  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ 1I collagen, NADPH oxidase (NOX) protein (NOX 4) and the phosphorylation level of smad 2 and smad 3 was assessed by western blot; beta-actin ( $\beta$ -actin) was detected as the normalization control in the hepatic stellate cells was examined by Western blot analysis. **Results** The inhibition rate of HSC-T6 cells was the largest with curcumin for 48 h, significantly lower than that of TGF- $\beta$ -stimulated group, 5  $\mu$ mol/L, 10  $\mu$ mol/L and 20  $\mu$ mol/L group ( $P < 0.05$ ). Notably, curcumin could obviously reduce the expression of  $\alpha$ -SMA and  $\alpha$ 1I collagen at both mRNA and protein levels and reduce the deposition of extracellular matrix. Treatment of curcumin markedly blocks up-regulation of NOX4 by TGF- $\beta$ . It also significantly reduced TGF- $\beta$ -induced Smad 2/3 phosphorylation, and this effect observed dose-dependent. **Conclusion** Curcumin inhibited TGF- $\beta$ -mediated HSC activation *in vitro*, which was involved in Smad signaling pathway, and consequently influenced the profibrotic actions of TGF- $\beta$  on HSC-T6 cells. Our results suggest that curcumin could become potential candidate for the therapeutic applications by inhibiting the TGF- $\beta$  induced NOX activation and Smad signaling.

**Key words** curcumin; rat hepatic stellate cell; transforming growth factor- $\beta$ ; NADPH oxidase 4; drosophila mothers against decapentaplegic protein