

姜黄素对内质网应激诱导小鼠肝损伤的保护作用

马晓磊^{1,2} 李晓明³ 储 菲³ 董清清³ 刘 浩³ 张 磊¹

摘要 目的 探讨姜黄素对内质网应激(ERS)诱导小鼠急性肝损伤的保护作用。方法 建立衣霉素诱导ERS的肝损伤模型,测定肝损伤小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平、肝匀浆中还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量及肝指数。实时荧光定量PCR法检测小鼠肝组织中葡萄糖调节蛋白78(GRP78/Bip)mRNA表达及半定量免疫组化法检测肝组织GRP78/Bip蛋白水平,并行肝组织病理学检查。结果 姜黄素能降低衣霉素诱导ERS肝损伤小鼠血清中ALT、AST水平和肝组织匀浆中MDA含量;提高肝组织匀浆中SOD、GSH活性;同时姜黄素能明显抑制肝组织中GRP78/Bip mRNA和蛋白的表达。HE染色结果显示姜黄素能明显改善模型组小鼠肝脏组织病变范围与程度,使炎细胞浸润减少。结论 姜黄素可能通过抗氧化作用对ERS诱导的肝损伤小鼠发挥保护作用。

关键词 姜黄素;内质网应激;肝损伤;衣霉素

2014-06-27 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A174)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²蚌埠市第三人民医院药学部,蚌埠 233000

³蚌埠市医学院药学系,蚌埠 233000

作者简介:马晓磊 男,药师,硕士研究生;

张 磊,女,硕士生导师,副教授,责任作者,E-mail:573345149@qq.com;

刘 浩,男,硕士生导师,教授,责任作者,E-mail:liuhao6886@foxmail.com

中图分类号 R 965.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1629-05

内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)是由各种原因导致内质网(endoplasmic reticulum,ER)功能紊乱,钙稳态失衡,错误折叠或未折叠蛋白质在ER腔内聚集的一种亚细胞器的病理状态。ERS发生时伴随脂质合成和促炎症反应^[1],是导致脂肪肝、酒精肝、慢性肝炎等肝脏损伤疾病的重要原因之一。姜黄素是从姜黄中提取出来的一种脂溶性酚类色素,是姜黄中主要的活性成分。研究^[2]证明,姜黄素具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、清除自由基等多方面的药理作用。对肝脏的相关研究^[3]显示,姜黄素可通过清除肝脏自由基、抑制肝脏炎症反应等作用发挥抗肝脏损伤作用。该研究采用衣霉素诱导小鼠ERS肝损伤模型,以ERS标志蛋白、氧化应激指标为对象,研究其在肝损伤中的变化并探讨姜黄素的干预作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 衣霉素(T062-10UG)购自美国Sigma公司(批号:2013094);丙二醛(malondialdehyde,MDA)测试盒(批号:2013062)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)测试盒(批号:2010064)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,

rats were treated with adenine for 7 weeks, then intraperitoneally injected with STS [0.5 g/(kg·w), Tid for 5 weeks] and killed at last. Blood was used to test serum SOD and MDA level and determine MGP and fetuin A (FA) level. **Results** Compared with the normal control groups, the plasma SOD activity of uremic rats decreased and the MDA level increased. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The plasma SOD activity of the STS treatment rats group decreased and the increase of MDA level was controlled to some extent. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The MGP and FA level of the uremic rats group decreased obviously. The MGP and FA level of the STS treatment rats group increased. The difference between the STS treatment rats group and the uremic rats group was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** STS can treat and ease the vascular calcification of the uremic rats. STS can restrain vascular calcification by increasing the MGP and FA level of the uremic rats. STS also has antioxidant activity, which can alleviate oxidative stress injury and improve the function of vascular endothelium. This is probably one of the mechanisms that can prevent calcification.

Key words uremic rats; vascular calcification; thiosulfate; fetuin A

GSH) 测试盒(批号:2013064)、考马斯亮蓝测定试剂盒(批号:20130623)均购自南京建成试剂公司;联苯双酯购自广州市星群药业有限公司(批号:2013055);RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成;TRI Reagent 试剂(批号 tr118)购自美国 MRC 公司;K1622 逆转录试剂盒(批号 20130205)、K0171 扩增试剂盒(批号 20130205)购自立陶宛 Fermentas 公司。

1.2 实验动物 72 只雄性昆明种小鼠,普通级,18~20 g,8~10 周龄,购于安徽医科大学实验动物中心。实验前适应性喂养 1 周,自由饮食,温度 20~25 ℃,湿度(50±5)%,光照周期 12 h:12 h。

1.3 动物模型制备及给药方案 72 只小鼠随机分为 6 组,每组 12 只,分别为正常组、姜黄素组(75、150、300 mg/kg)、模型组、联苯双酯组(150 mg/kg)。用药方案:姜黄素组给予 3 种剂量的姜黄素灌胃,联苯双酯组给予联苯双酯灌胃,1 次/d,持续 12 d。末次灌胃后 2 h,除正常组外,其余各组分别灌胃衣霉素 1 mg/kg。禁食 16 h 后处死小鼠,排除死亡小鼠,每组分配 10 只小鼠,眼球摘除取血分离血清,剖杀后取肝脏组织,置于-80 ℃保存备用。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 生化指标检测 取小鼠血清和肝组织匀浆,测定血清谷丙转氨酶(alanine transaminase,ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase,AST)活性与肝脏中谷胱甘肽(glutathione,GSH)、丙二醛(malondi-aldehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)含量,以上各指标测定操作步骤均按照相关试剂盒说明书进行。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 检测肝组织 GRP78/Bip

取 50 mg 肝组织,加入 1 ml TRI Reagent 试剂后,用组织匀浆器进行匀浆;室温 20~25 ℃ 放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离,取上清液。加入 0.2 ml 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min;4 ℃ 离心(12 000 r/min,15 min),取上层水相,用异丙醇沉淀水相中的 RNA。每使用 1 ml TRI Reagent 加入 0.5 ml 异丙醇,室温放置 10 min;4 ℃ 离心 10 min,分离白色沉淀即 mRNA。加入 0.1 % DEPC 水溶解总 RNA,用分光光度计在 260 nm 波长下测定样品总 RNA 的吸光度值,计算样品中总 RNA 含量,所有样品总 RNA 均定量至 0.5 μg/μl。用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳总 RNA,观察总 RNA 的完整性。用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 对总 mRNA 进行

逆转录,合成 cDNA。取 0.5 μl 的 cDNA 于 25 μl 反应体系中进行 PCR 扩增。以磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)作为 PCR 扩增实验的内对照,用 Light-cycler 480 软件(Roche,version 1.5.0)按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 GRP78/GAPDH 比值。上游引物序列为:5'-AAT-GTCTTTGTTGCCACC-3',下游引物序列为:5'-TC-CTATGTCGCCCTCACTCC-3'。

1.4.3 半定量免疫组化染色检测肝组织 GRP78/Bip 取部分肝组织 10% 甲醛固定,石蜡包埋 4 μm 切片,切片入 60 ℃ 温箱内,经脱蜡水化后,PBS 液洗;切片上滴 A 液 1 滴,孵育 10 min,PBS 液洗;切片滴 B 液,10 min 后吸去多余液体,不必冲洗;切片滴 1 滴第一抗体,37 ℃ 下孵育 20 min,PBS 液洗;切片滴 C 液,室温下孵育 10 min,PBS 液洗;切片滴 D 液,室温下孵育 10 min,PBS 液洗;切片加 100 μl DAB 液显色,苏木精染淡核,封片。阳性结果在胞质处显棕黄色颗粒。在 200 倍视野下,随机采集 20 个视野,每个视野计数 100 个细胞,根据细胞染色强度和染色阳性细胞所占百分数进行半定量。根据阳性细胞数所占的百分数计分:<5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分^[4]。阳性细胞染色强度计分:无着色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分。根据两者相加所得的总分进行结果判定:0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中度阳性(++) 5 分以上为强阳性(++)。

1.4.4 病理组织学检查 取受试动物肝左叶相同部位置于 10% 甲醛固定,石蜡包埋 4 μm 切片,经 HE 染色,采用光学显微镜观察组织病理变化并拍照。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 水平明显升高($P < 0.01$);姜黄素(150、300 mg/kg)能显著降低肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 水平($F_{ALT} = 270.69$, $F_{AST} = 83.91$, $P < 0.01$),见表 1。

2.2 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝指数的影响 各组动物体重在给药前后差异均无统计学意义($P > 0.05$);与正常组比较,模型组小鼠肝重和肝指数明显升高($P < 0.01$);姜黄素(75、150、300 mg/kg)能

降低肝损伤小鼠的肝重和肝指数 ($F_{\text{肝重}} = 5.86$, $F_{\text{肝指数}} = 68.08$; $P < 0.05$, $P < 0.01$) ,见表2。

表1 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 的影响 ($n = 10$ $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常	-	182.0 \pm 11.1	285.6 \pm 21.4
模型	-	400.4 \pm 10.2 **	458.1 \pm 26.5 **
联苯双酯	150	285.8 \pm 15.3 ##	382.6 \pm 28.7 ##
姜黄素	75	357.2 \pm 16.8 ##	452.9 \pm 19.0
	150	264.2 \pm 23.1 ##	356.4 \pm 30.5 ##
	300	189.3 \pm 20.8 ##	305.0 \pm 21.9 ##

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表2 姜黄素对 ERS 肝损伤的小鼠肝指数的影响 ($n = 10$ $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	体重 (g)	肝重 (g)	肝指数 (%)
	(mg/kg)			
正常	-	31.6 \pm 1.53	1.30 \pm 0.22	4.15 \pm 0.19
模型	-	30.4 \pm 4.35	1.87 \pm 0.23 **	6.11 \pm 0.26 **
联苯双酯	150	31.1 \pm 9.35	1.42 \pm 0.32 ##	4.49 \pm 0.34 ##
姜黄素	75	27.5 \pm 3.61	1.58 \pm 0.18 #	5.80 \pm 0.20 #
	150	31.4 \pm 3.93	1.57 \pm 0.21 #	5.06 \pm 0.24 ##
	300	30.1 \pm 2.61	1.42 \pm 0.35 ##	4.68 \pm 0.45 ##

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝匀浆中 GSH、MDA、SOD 的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝匀浆中 MDA 水平显著提高,同时 GSH、SOD 水平显著降低 ($P < 0.01$)。姜黄素(75、150、300 mg/kg)能降低肝损伤小鼠肝匀浆中 MDA 水平 ($F_{\text{MDA}} = 114.51$, $P < 0.01$),姜黄素(150、300 mg/kg)能提高肝损伤小鼠肝匀浆中 GSH、SOD 水平 ($F_{\text{GSH}} = 10.43$, $F_{\text{SOD}} = 5.85$; $P < 0.05$, $P < 0.01$) ,见表3。

表3 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝匀浆 GSH、MDA、SOD 的影响 ($n = 10$ $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	GSH	MDA	SOD
	(mg/kg)	($\mu\text{mol/g} \cdot \text{Prot}$)	($\text{nmol/mg} \cdot \text{Prot}$)	($\text{U/mg} \cdot \text{Prot}$)
正常	-	19.93 \pm 2.37	0.35 \pm 0.14	124.63 \pm 18.03
模型	-	10.85 \pm 2.41 **	1.35 \pm 0.10 **	68.42 \pm 28.36 *
联苯双酯	150	15.35 \pm 2.57 #	0.52 \pm 0.13 ##	104.11 \pm 25.85 #
姜黄素	75	12.92 \pm 4.54	0.82 \pm 0.11 ##	91.67 \pm 30.02
	150	15.75 \pm 4.77 #	0.60 \pm 0.08 ##	107.38 \pm 14.36 #
	300	19.43 \pm 3.36 ##	0.44 \pm 0.07 ##	120.66 \pm 38.14 ##

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝组织中 GRP78/Bip mRNA 表达的影响 与正常组相比,模型组小鼠肝组织中 GRP78/Bip mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.01$);姜黄素(75、150、300 mg/kg)能明显降低

肝组织中 GRP78/Bip mRNA 的表达 ($P < 0.05$),见图1、2。

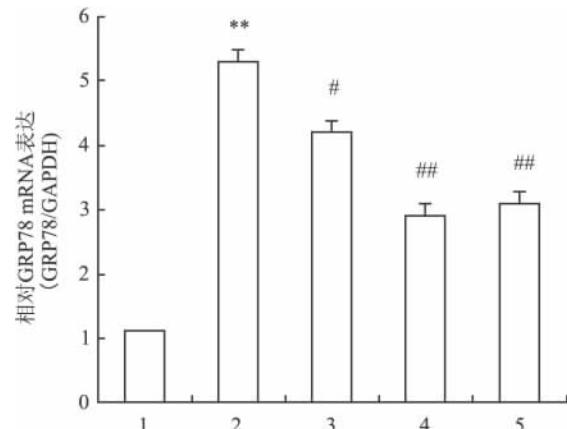


图1 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝组织中 GRP78/Bip mRNA 表达的影响

1:正常组;2:模型组;3:姜黄素 75 mg/kg 组;4:姜黄素 150 mg/kg 组;5:姜黄素 300 mg/kg 组;与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

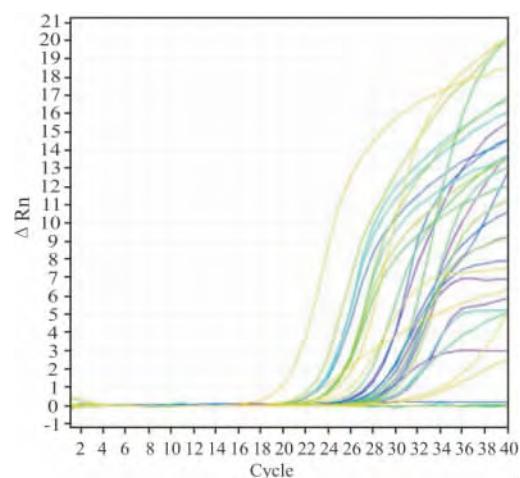


图2 GRP78/Bip mRNA 实时荧光定量 PCR 检测荧光图

2.5 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝组织中 GRP78/Bip 蛋白表达的影响 正常组肝脏胞质内几乎无棕黄色颗粒,染色反应为阴性。模型组图片中出现大量棕黄色颗粒,颜色深、体积粗且密集;姜黄素(75 mg/kg)组棕黄色颗粒颜色变淡,但仍然保持棕黄色颗粒也较模型组变细且稀疏;姜黄素(150、300 mg/kg)组胞质内棕黄色颗粒大幅减少,颗粒细且稀疏,趋于正常组。半定量分析显示:与正常组相比,模型组阳性率为 98%,肝组织 GRP78/Bip 蛋白的表达显著升高;姜黄素(75、150、300 mg/kg)能显著降低肝组织中 GRP78/Bip 蛋白的表达。见表4、图3。

表4 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝组织中 GRP78/Bip 蛋白半定量结果的影响

组别	剂量 (mg/kg)	GRP78/Bip 蛋白表达(n)				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
正常	-	20	2	0	0	2
模型	-	2	1	4	13	98
联苯双酯	150	12	2	2	4	40
姜黄素	75	3	4	4	9	85
	150	11	2	3	4	45
	300	18	1	1	0	10

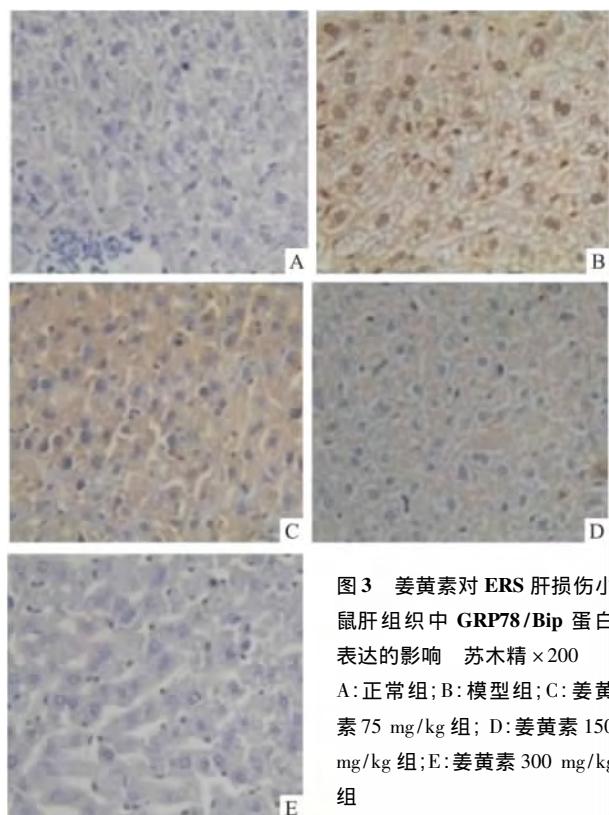


图3 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝组织中 GRP78/Bip 蛋白表达的影响 苏木精 $\times 200$
A:正常组; B:模型组; C:姜黄素 75 mg/kg 组; D:姜黄素 150 mg/kg 组; E:姜黄素 300 mg/kg 组

2.5 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠病理组织学的影响

光镜下显示:正常肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝小叶结构完整,肝细胞大小正常,无变性和坏死,间质无炎症细胞浸润。模型组小鼠肝组织均出现明显病变,小叶内大多数肝细胞肿胀,细胞质疏松化,有的呈气球样变,有些可见凋亡和坏死的改变。姜黄素(75、150、300 mg/kg)可减轻肝细胞病变范围与程度,炎细胞浸润减少,并且肝细胞病变减轻程度随姜黄素用量增大而增强,见图4。

3 讨论

衣霉素是一种天然的核苷抗生素,可通过抑制蛋白糖基化途径中十四糖二磷酸长萜醇的生成,使糖链加工受阻,形成脱糖蛋白,阻碍 ER 内新生蛋白质糖基化修饰,介导细胞凋亡^[5]。国内外许多研究^[6]报道了使用衣霉素在神经系统、胰腺细胞、胃癌细胞、脾脏细胞诱导 ERS 体外细胞模型^[7]。近年来亦有报道^[8-9]使用衣霉素体内给药诱导 ERS 及衣霉素能够导致肝脏损伤、肝细胞凋亡的研究,故本研究以衣霉素灌胃给药诱导建立 ERS 肝损伤模型。

GRP78 广泛存在于 ER 上,被认为是 ERS 的标志性蛋白。本研究结果显示,模型组小鼠肝小叶内可见肝细胞肿胀,有些可见凋亡和坏死;作为肝细胞损伤的“金标准”^[10]的血清中 ALT 和 AST 水平明显升高;同时模型组小鼠肝组织中 GRP78/Bip mRNA 和蛋白水平明显升高。上述结果提示,由衣霉素诱导的 ERS 肝损伤模型构建成功。姜黄素灌胃给药后,可明显减轻肝脏炎症细胞浸润和坏死;显著降低

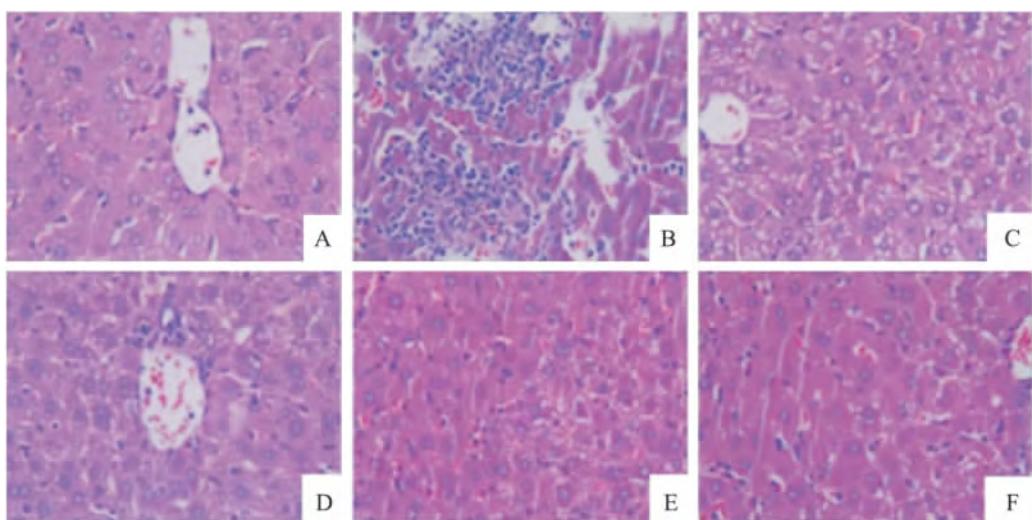


图4 姜黄素对 ERS 肝损伤小鼠肝脏病理组织学的影响 HE $\times 200$

A:正常组; B:模型组; C:姜黄素 75 mg/kg 组; D:姜黄素 150 mg/kg 组; E:姜黄素 300 mg/kg 组; F:联苯双酯 150 mg/kg 组

肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 水平;显著降低小鼠肝组织中的 GRP78/Bip mRNA 和蛋白水平。提示姜黄素对衣霉素诱导 ERS 肝损伤小鼠具有较好的保护作用。

GSF 和 SOD 是体内的抗氧化剂和抗脂质过氧化作用的酶性保护系统的主要成分,而 MDA 是脂质过氧化终末产物^[11-12]。本研究结果显示,模型组肝匀浆中 MDA 明显升高,SOD、GSF 含量明显减少。姜黄素能显著降低肝匀浆中 MDA 水平,提高肝匀浆中 SOD、GSF 含量水平。姜黄素有清除自由基的作用,机制为其邻位的酚羟基可增加 DPPH 自由基和三氯过氧自由基的反应,从而减少其产生。本研究结果提示姜黄素对衣霉素诱导的 ERS 肝损伤的保护作用可能与增强机体清除自由基及抑制自由基的反应,防止过度的脂质过氧化有关。

参考文献

- [1] Kaplowitz N, Than T A, Shionhara M, et al. Endoplasmic reticulum stress and liver injury [J]. *Semin Liver Dis*, 2007, 27(4):367-77.
- [2] 刘红艳,王海燕,叶松.姜黄素药理作用及其机制研究进展[J].中国现代医学杂志,2012,22(6):48-51.
- [3] 彭景华.姜黄素抗肝损伤研究进展[J].国外医学(消化系疾病分册),2005,25(6):373-5.
- [4] 王燕燕,陈俊虎,张秀果,等.水通道蛋白 9 在子痫前期患者胎盘中的表达及意义[J].广东医学,2013,34(17):2663-5.
- [5] 邢俊丽,冯若,李海春,等.衣霉素诱导胃癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡[J].世界华人消化杂志,2010,18(10):1037-40.
- [6] Hosoi T, Noguchi J, Takakuwa M, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and interleukin-1 β expression by tunicamycin in cultured glial cells exposed to lipopolysaccharide [J]. *Brain Res*, 2014, 1558:11-7.
- [7] Finnie J W. Effect of tunicamycin on hepatocytes *in vitro* [J]. *J Comp Pathol*, 2001, 125(4):318-21.
- [8] 姜巍,刘栋,杨帆,等.内质网应激预处理条件下大鼠肝脏缺血再灌注损伤模型的建立[J].现代生物医学进展,2010,10(11):2037-9.
- [9] Finnie J W, Read S H, Swift J G, et al. Apoptosis in liver damage produced by tunicamycin [J]. *Aust Vet J*, 2004, 82(1-2):87-90.
- [10] Verslype C. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients [J]. *Acta Clin Belg*, 2004, 59(9):285-9.
- [11] 孔明,戴菁,孙旖,等.药物性肝损伤生物标志物研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(3):290-3.
- [12] Kato N, Yanaka K, Hyodo K, et al. Stable nitroxide tempol ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient focal cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2003, 979(1-2):188-93.

Protective effect of curcumin on liver injury induced by endoplasmic reticulum stress in mice

Ma Xiaolei^{1,2}, Li Xiaoming³, Chu Fei³, et al

(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pharmacy, The Third People's Hospital of Bengbu, Bengbu 233000; ³Dept of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu 233000)

Abstract **Objective** To investigate the protective effect of curcumin on liver injury induced by endoplasmic reticulum stress (ERS) in mice. **Methods** The liver injury model with endoplasmic reticulum stress was induced by tunicamycin. The levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in serum and reduced glutathione (GSF) and malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver homogenate were determined by colorimetry. The mRNA and protein expression level of GRP78/Bip was detected by RT-PCR and immunohistochemical staining. **Results** Curcumin could not only markedly decrease ALT, AST activities in plasma, MDA contents in liver homogenates and GRP78/Bip mRNA and protein expression level, but also evidently increase the activity of SOD and GSF of liver homogenates in liver injury mice with endoplasmic reticulum stress. Liver histopathological examination showed curcumin evidently reduced inflammatory cell infiltrations and liver cell necrosis. **Conclusion** Curcumin has protective effect on liver injury with endoplasmic reticulum stress through antioxidant effects.

Key words curcumin; endoplasmic reticulum stress; liver injury; tunicamycin