

[文章编号] 1000-4718(2019)11-2050-05

姜黄素对 ERS 诱导 NASH 大鼠 肝细胞保护作用的研究*

李 敏¹, 黄婷婷², 姜双燕¹, 杨 洋¹, 陈莎莎¹, 张文佳¹, 赵丽娟^{3△}
(¹锦州医科大学研究生学院, 辽宁 锦州 121001; ²燕达医院消化内科, 北京 101601;
³锦州医科大学附属第三医院消化科, 辽宁 锦州 121000)

[摘要] 目的: 探讨姜黄素是否通过抑制内质网应激(ERS)来减轻非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠肝细胞凋亡,从而发挥对肝脏的保护作用。方法: 30 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组($n = 10$)、模型组($n = 10$)及姜黄素组($n = 10$)。模型组和姜黄素组采用高脂饮食喂养 4 周以建立 NASH 模型。继续喂养 4 周,姜黄素组每日给予姜黄素(200 mg/kg)灌胃,模型组与正常对照组给予等量生理盐水。4 周后处死大鼠,留取血液及肝脏组织,检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平;HE 染色观察肝组织病理学变化;Western blot 法检测葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)和 C/EBP 同源蛋白(CHOP)蛋白的表达;TUNEL 法检测细胞凋亡情况。结果:与正常对照组相比,模型组大鼠血清 ALT 和 AST 水平均显著升高,姜黄素组大鼠血清 ALT 和 AST 较模型组显著降低($P < 0.05$);同时,姜黄素组大鼠的肝细胞脂肪变性及炎性程度均较模型组减轻,未见明显坏死灶。模型组 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达水平均较正常对照组显著增加,姜黄素组 GRP78 和 CHOP 的表达水平较模型组显著降低($P < 0.01$)。TUNEL 结果表明,模型组大鼠肝组织内凋亡细胞较正常对照组增多,姜黄素组大鼠的凋亡肝细胞较模型组减少。结论:高脂饮食能诱发肝脏细胞发生过度 ERS,从而启动细胞凋亡,导致 NASH 的发生。姜黄素减轻肝细胞凋亡的作用机制可能与其抑制 ERS 有关。

[关键词] 姜黄素; 内质网应激; 非酒精性脂肪性肝炎; 葡萄糖调节蛋白 78; C/EBP 同源蛋白

[中图分类号] R363.2; R575

[文献标志码] A

doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.11.019

Protective effect of curcumin on ERS-induced NASH rat hepatocytes

LI Min¹, HUANG Ting-ting², JIANG Shuang-yan¹, YANG yang¹, CHEN Sha-sha¹, ZHANG Wen-jia¹, ZHAO Li-juan³

(The Graduate School of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; ²Department of Gastroenterology, Yanda Hospital, Beijing 101601, China; ³Department of Digestive Diseases, Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China. E-mail: 739168659@qq.com)

[ABSTRACT] AIM: To investigate whether curcumin reduces hepatocyte apoptosis in the rats with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by inhibiting endoplasmic reticulum stress (ERS) and thus exerting a protective effect on the liver. METHODS: Male SD rats ($n = 30$) were randomly divided into normal control group ($n = 10$), model group ($n = 10$) and curcumin group ($n = 10$). NASH model was established by feeding the rats with high-fat diet for 4 weeks. The rats in curcumin group was given curcumin (200 mg/kg) daily by gavage, while the rats in model group and normal control group were given the same volume of saline. Four weeks later, the rats were killed, and their blood and liver tissues were collected. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected, liver histopathological changes were observed by HE staining, the expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) and C/EBP homologous protein (CHOP) was determined by Western blot, and apoptosis was detected by TUNEL method. RESULTS: Compared with normal control group, the levels of serum ALT and AST in model group were significantly increased, and the levels of serum ALT and AST in curcumin group were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$). At the same time, the steatosis and inflammation of hepatocytes in curcumin group were less than those in model group, and no obvious necrosis was observed. Compared with normal control group, the protein expression levels of GRP78 and CHOP in model group were increased, while the protein expression levels of GRP78 and CHOP in curcumin group were

[收稿日期] 2019-01-23

[修回日期] 2019-05-31

* [基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(201602336)

△通讯作者 Tel: 0416-3999143; E-mail: 739168659@qq.com

decreased compared with model group ($P < 0.01$). TUNEL results showed that apoptotic hepatocytes in model group were significantly more than those in normal control group, while those in curcumin group were significantly fewer than those in model group. **CONCLUSION:** Hyperlipidemia induces excessive ERS in the hepatocytes, thus triggering apoptosis and leading to NASH. The mechanism of curcumin reducing hepatocyte apoptosis may be related to its inhibition of ERS.

[KEY WORDS] Curcumin; Endoplasmic reticulum stress; Nonalcoholic steatohepatitis; Glucose-regulated protein 78; C/EBP homologous protein

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是全球最常见的慢性肝病之一, 成人患病率介于 6.3% ~ 45%, 其中 10% ~ 30% 可发展为非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)^[1]。NASH 是全球范围内较为严重的一种 NAFLD 病理类型^[2], 发展成为肝纤维化、肝硬化等的风险性大。Herbert 等^[3] 提出的“多重平行打击”认为 NASH 是多种机制共同作用的结果, 较为准确地解释了 NASH 的发病机制, 提出包括内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS)、细胞凋亡、自噬、相关脂肪因子紊乱和肠道菌群因素等在内的多种因素参与了其发病过程。蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 是内质网上的一种跨膜蛋白, 随着内质网中错误及非折叠蛋白量的积累, 葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 从 PERK 上脱离下来, 大量 PERK 通过自身磷酸化被激活, 空出的 GRP78 过表达还会进一步促进 PERK 的激活^[4]。激活的 PERK 使得真核细胞翻译起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor-2 α , eIF-2 α) 第 51 位的丝氨酸磷酸化, 使其磷酸化而被激活^[5-7]。正常情况下, eIF-2 α 无磷酸化, 活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 上游 5' 端存在抑制 ATF4 翻译的特定区域; 只有当 eIF-2 α 磷酸化时才可直接翻译 ATF4。ATF4 下游是转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 [CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein, CHOP], 是 ERS 引发凋亡的信号。研究表明 NASH 的发病过程中, 大量的游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 介导脂质过氧化反应, 并通过 PERK-eIF-2 α -ATF4-CHOP 通路导致肝细胞发生凋亡坏死^[8], 这条通路中 GRP78 和 CHOP 被认为是其中重要的标志性信号^[9]。

由于 NASH 发病机制极其复杂, 临床至今仍缺乏针对其发病机制的药物。研究表明, 姜黄素 (curcumin) 能抑制肝细胞凋亡来减轻肝脏损伤^[10], 同时过度的 ERS 参与了肝细胞凋亡的发生^[9]。目前姜黄素的肝脏保护作用是否与 ERS 有关鲜有报道^[11]。本项工作主要通过分子生物学的方法, 探讨姜黄素对 ERS 诱导的 NASH 大鼠肝细胞的保护作用是否与

抑制 ERS 中的 PERK 通路有关, 为临床上 NASH 的治疗提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 动物

选取 SPF 级 6 周龄 SD 雄性大鼠 30 只, 体重 (200 ± 10) g, 购自锦州医科大学实验动物中心, 许可证号为 SCXK(辽)2017-0003。

2 主要试剂

普通饲料: 由锦州医科大学实验动物中心提供; 高脂食物组成: 79.5% 玉米面 (粮食杂货店) + 0.5% 胆固醇 (河南万邦实业有限公司, 批号: 2017031625) + 20% 猪油 (粮食杂货店); 姜黄素 (上海瑞永生物科技有限公司); 甲醛溶液 (沈阳天罡化学试剂厂); 抗 GRP78 和 CHOP 抗体 (沈阳万类生物有限公司); PVDF 膜 (Millipore); SDS-PAGE 凝胶 (武汉博士德生物有限公司)。

3 主要方法

3.1 建立模型 30 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 将其随机分为 3 组, 分别为正常对照 (normal control) 组 ($n = 10$)、模型 (model) 组 ($n = 10$) 及姜黄素 (curcumin) 组 ($n = 10$)。各组均行普通饲料喂养, 模型组与姜黄素组在普通饲料喂养基础上予高脂食物 ($3 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 灌胃 4 周, 正常组予等量生理盐水灌胃, 喂养 4 周后, 每组随机处死 2 只大鼠, 留取血液行肝功能检测、肝组织行病理学检测。观察到模型组及姜黄素组大鼠丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 较正常对照组显著升高, 同时, 光镜下可见明显肝细胞脂肪变性及大量炎细胞浸润, 造模成功^[11]。

3.2 药物干预 从第 5 周开始, 在喂养方法不变基础上, 姜黄素组给予姜黄素灌胃, 给药剂量为 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 模型组与正常对照组予等量生理盐水灌胃, 灌胃 4 周, 第 8 周末结束实验。称重, 禁食 12 h 后麻醉, 解剖, 采心脏血, 检测 ALT 和 AST; 迅速取出肝脏并称重, 取部分肝脏组织制作石蜡切片, 另一部分肝脏组织至于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于制作肝组织匀浆。

3.3 检测方法 (1)生化检测:全自动生物化学分析仪检测 ALT 和 AST 水平;(2)病理组织学:制作石蜡切片,行 HE 染色,光镜下观察肝脏脂肪变性及炎症程度;(3)Western blot 检测:精确称取相同部位的肝脏组织 300 mg,制备肝组织匀浆,检测 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达;(4)TUNEL 法检测细胞凋亡:按试剂盒说明书操作。细胞核中出现棕褐色颗粒者为阳性细胞。

4 统计学处理

SPSS 21.0 进行统计学分析,计量资料用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 来表示,计数资料比较经正态分

布检验,采用两组独立样本 *t* 检验分析。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义,病理形态学结果用对比描述方法分析。

结 果

1 各组大鼠血生化相关指标(ALT 和 AST)变化

第 4 周末,模型组和姜黄素组分别与正常对照组对比,大鼠血清 ALT 和 AST 均升高 ($P < 0.05$)。实验结束时,与正常对照组相比,模型组大鼠血清 ALT 和 AST 显著升高,姜黄素组大鼠血清 ALT 和 AST 与模型组比较显著降低 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 肝功指标的变化

Table 1. The changes of liver function index (U/L. Mean ± SD)

Group	End of the 4th week (n = 2)		End of the 8th week (n = 8)	
	ALT	AST	ALT	AST
Normal control	41.23 ± 5.34	121.20 ± 8.62	43.00 ± 7.64	139.25 ± 10.30
Model	53.93 ± 7.37*	177.05 ± 11.56*	58.50 ± 8.73**	250.75 ± 13.05**
Curcumin	55.60 ± 3.29#	159.88 ± 12.87#	50.63 ± 9.29##	147.88 ± 12.87##

* $P < 0.05$, ** $P < 0.05$ vs normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.05$ vs model group.

2 各组大鼠肝脏组织病理学变化

第 4 周末,模型组和姜黄素组大鼠较正常对照组肝细胞胞质内见脂肪滴,炎症细胞明显增多,结合生化指标结果,提示造模成功,见图 1;第 8 周末,正常对照组大鼠肝小叶结构完整,肝索排列整齐,肝细

胞大小、形态规则;模型组大鼠肝小叶边界模糊,肝索排列紊乱,可见炎症细胞浸润,肝细胞体积明显增大,胞质内可见大泡性脂肪滴;姜黄素组大鼠肝细胞脂肪变性及炎症程度均明显减轻,未见明显坏死灶,见图 2。

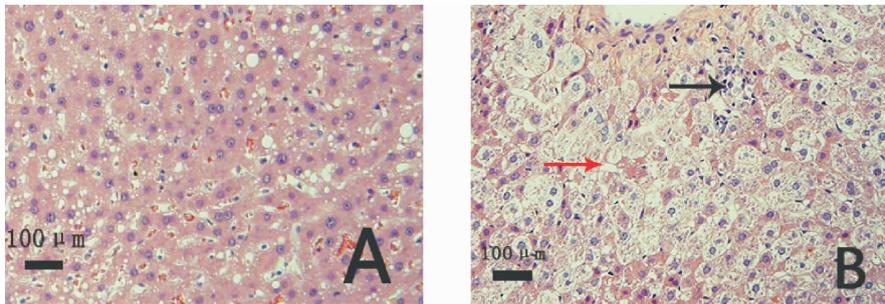


Figure 1. Pathological results for rat liver at the end of the 4th week (HE staining). A: normal control group; B: model group. Red arrow: fat drop; black arrow: inflammatory cell infiltration.

图 1 第 4 周末各组大鼠肝脏病理学结果

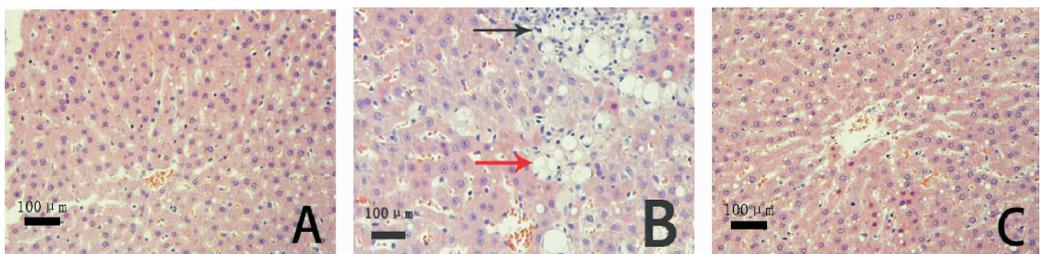


Figure 2. Pathological results for rat liver at the end of the 8th week (HE staining). A: normal control group; B: model group; C: curcumin group. Red arrow: fat drop; black arrow: inflammatory cell infiltration.

图 2 第 8 周末各组大鼠肝脏病理学结果

3 各组大鼠肝组织相关蛋白表达

Western blot 检测肝组织 ERS 相关蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达,得到相应条带,可见:模型组较正常对照组 GRP78 和 CHOP 表达显著上调,姜黄素组较模型组 GRP78 和 CHOP 表达显著下调 ($P < 0.01$),见图 3。

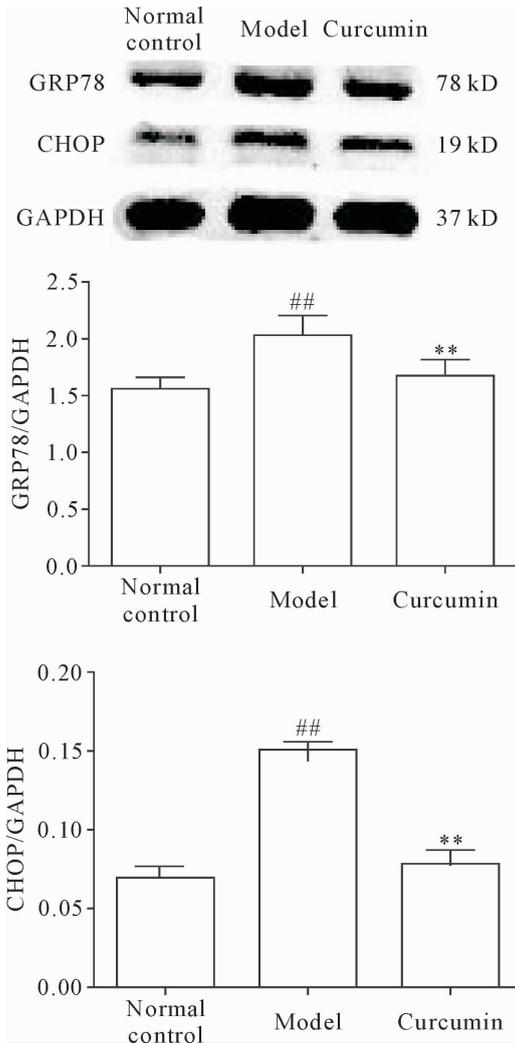


Figure 3. The expression levels of GRP78 and CHOP in liver tissues of rats in each group. Mean \pm SD. $n = 8$. ^{##} $P < 0.01$ vs normal control group; ^{**} $P < 0.05$ vs model group.

图 3 各组大鼠 GRP78 和 CHOP 的表达变化

4 各组大鼠肝细胞凋亡情况

正常对照组大鼠肝细胞可见极少凋亡细胞,模型组凋亡细胞增多;姜黄素组大鼠的凋亡肝细胞较模型组减少,见图 4。

讨 论

NASH 的发病机制仍不十分明确,被广泛接受的是“二次打击”学说,即脂类在肝细胞沉积为第 1 次打击过程,由此引发的一系列细胞毒性反应为第 2 次打击^[12-13],进一步导致肝脏损伤。目前研究表明,NASH 的发病过程是多因素共同作用的结果,过度的 ERS 能造成肝细胞功能失调,诱发肝细胞凋亡的发生^[14],而肝细胞凋亡可被游离脂肪酸诱导引起脂肪代谢紊乱并进一步诱发 ERS,最终导致 NASH 的出现^[15-17]。GRP78 是位于内质网膜上辅助内质网中新生肽形成正确构象的蛋白,当内质网中未折叠及错误折叠蛋白蓄积增加时,GRP78 蛋白与 PERK 分离^[15],表达上调,故被认为是 ERS 启动信号,这为临床判断肝细胞内质网的应激状态提供了思路,即检测 GRP78 蛋白表达水平高低^[18]。CHOP 存在于细胞质中,在 ERS 激活时而转至细胞核,通过下调抗凋亡基因 Bcl-2 以及上调促凋亡成员 Bim 的表达促进细胞凋亡,因此被认为是 ERS 最主要的凋亡因子。

本研究采用高脂饮食构建 NASH 模型,显示模型组 ALT 和 AST 高于正常对照组,并出现了肝细胞脂肪变性和炎症因子浸润,凋亡细胞明显增多,提示造模成功;而经姜黄素治疗后,肝细胞脂肪变性、炎症细胞浸润及肝细胞凋亡程度、以及肝功能(ALT 和 AST)均显著下降,提示姜黄素对 NASH 大鼠肝脏具有保护作用。姜黄素是从植物姜黄中提取的有效物质,国内外研究发现姜黄素具有抗炎、抗氧化应激、抗肿瘤和抗纤维化等药理作用^[19];姜黄素可减轻衣霉素诱导 ERS 引起的肝损伤^[20],同时能够清除自由基,防止脂质过氧化。随着临床对姜黄素的抗肿瘤作用的持续关注 and 深入,有研究指出姜黄素能够通

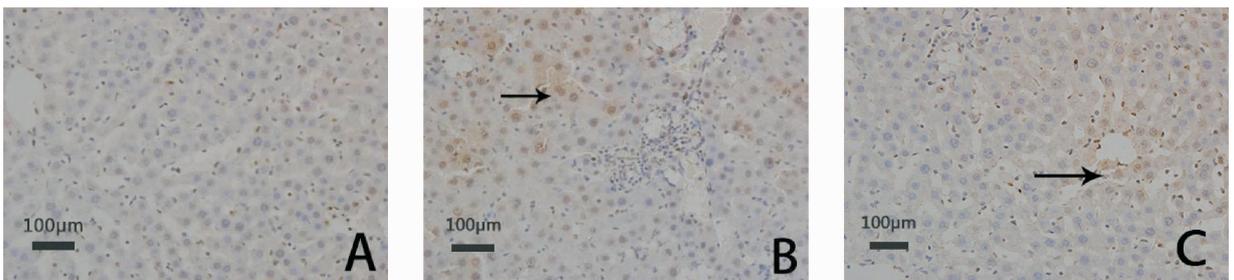


Figure 4. Results for hepatocyte apoptosis. A: normal control group; B: model group; C: curcumin group. Black arrow: apoptotic cells.

图 4 肝细胞凋亡结果

过 ERS 途径诱导癌细胞的细胞周期阻滞和凋亡,抑制癌细胞活性^[21]。姜黄素可通过 CHOP 途径抑制肝癌细胞增值,其增殖抑制作用与药物浓度及作用时间有关^[22]。而本研究结果也证实模型组大鼠 GRP78 及 CHOP 蛋白的表达较正常对照组均增高,说明 NASH 大鼠肝细胞发生内质网应激并诱导产生肝细胞凋亡;姜黄素组大鼠 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达降低。由此可见,姜黄素可通过下调 GRP78 和 CHOP 表达抑制 ERS 发生,从而减轻肝细胞凋亡,发挥保护肝脏的作用。

综上所述,姜黄素能改善 NASH 大鼠肝功能、减轻其病理学改变、减轻肝细胞凋亡的生理作用可能与其抑制 ERS 有关,为临床应用姜黄素治疗 NASH 提供了依据。但因本研究样本量有限,需要扩大样本量进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1):73-84.

[2] Schuppan D, Schattenberg JM. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(Suppl 1):68-76.

[3] Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis[J]. *Hepatology*, 2010, 52(5):1836-1846.

[4] Han KS, Li N, Raven PA, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum chaperone protein glucose-regulated protein 78 potentiates anti-angiogenic therapy in renal cell carcinoma through inactivation of the PERK/eIF-2 α pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33):34818-34830.

[5] Bravo R, Parra V, Gatica D, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, 301: 215-290.

[6] Ji C, Kaplowitz N, Lau MY, et al. Liver-specific loss of glucose-regulated protein 78 perturbs the unfolded protein response and exacerbates a spectrum of liver diseases in mice[J]. *Hepatology*, 2011, 54(1):229-239.

[7] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease[J]. *J Hepatol*, 2011, 54(4):795-809.

[8] Ji C. Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling

in alcoholic and non-alcoholic liver injury[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(Suppl 1):S16-S24.

[9] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3):184-90.

[10] Afrin R, Arumugam S, Soetikno V, et al. Curcumin ameliorates streptozotocin-induced liver damage through modulation of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in diabetic rats[J]. *Free Radic Res*, 2015, 49(3):279-289.

[11] 黄婷婷, 赵丽娟, 姜双燕, 等. 快速复制大鼠非酒精性脂肪性肝病模型及主要脏器的病理变化[J]. *西北国防医学杂志*, 2017, 39(2):71-74.

[12] 董 姝, 刘 平, 孙明瑜. 非酒精性脂肪肝发病机制——“二次打击”学说研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(7):551-555.

[13] Ahmed M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(11):1450-1459.

[14] 吴 涛, 季 光, 郑培永, 等. 内质网应激与肝细胞凋亡[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(23):2507-2515.

[15] Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(17):12093-12101.

[16] 翟 丽, 杨 月, 郭秀丽, 等. 内质网应激介导的细胞凋亡途径及新靶点药物[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(18):1361-1364.

[17] 张海峰, 薛明明. 非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(6):1020-1022.

[18] Wu H, Ng BS, Thibault G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans[J]. *Biosci Rep*, 2014, 34(4):116-118.

[19] 周晶晶, 郑昱辰, 李明月, 等. 姜黄素的药理作用研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2016, 37(4):304-307.

[20] 马晓磊, 李晓明, 储 菲, 等. 姜黄素对内质网应激诱导小鼠肝损伤的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(11):1629-1633.

[21] Huang YF, Zhu DJ, Chen XW, et al. Curcumin enhances the effects of irinotecan on colorectal cancer cells through the generation of reactive oxygen species and activation of the endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):40264-40275.

[22] 徐新明, 陈 健, 陆荣柱, 等. 姜黄素通过内质网应激信号通路诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用研究[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2018, 37(1):12-17.

(责任编辑:林白霜, 罗 森)