

# 姜黄素对 ALD 小鼠的肝保护作用及机制

董雪娜<sup>1</sup>, 徐力力<sup>2</sup>

(1 山东省立医院, 济南 250021; 2 济南市传染病医院)

**摘要:**目的 探讨姜黄素对酒精性肝病( ALD) 小鼠的肝保护作用及其可能的作用机制。方法 选择昆明小鼠 50 只, 随机分为对照组、模型组和姜黄素低、中、高剂量组, 每组 10 只。模型组及姜黄素低、中、高剂量组采用持续乙醇灌胃法建立小鼠 ALD 模型。同期, 对照组和模型组给予等量蒸馏水灌胃, 姜黄素低、中、高剂量组分别给予姜黄素 50、100、200 mg/( kg · d) 灌胃, 持续 4 周。观察各组体质量、肝质量、肝脏指数以及肝脏病理形态变化, 检测各组血清 ALT、AST、TG 及肝组织匀浆超氧化物歧化酶( SOD)、丙二醛( MDA)、谷胱甘肽( GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶( GSH-Px), Western blotting 法检测肝组织 TNF- $\alpha$ 、单核细胞趋化蛋白 1( MCP-1) 的表达。结果 姜黄素低、中、高剂量组病理改变较模型组均有不同程度改善, 姜黄素中、高剂量组肝脏指数及血清 ALT、AST 和 TG 水平均显著低于模型组(  $P$  均  $< 0.05$ ); 与模型组比较, 姜黄素高剂量组肝组织 MDA 含量显著降低, 姜黄素中、高剂量组肝组织 GSH 含量以及 SOD、GSH-Px 酶活性显著升高(  $P$  均  $< 0.05$ ); 姜黄素高剂量组肝组织 TNF- $\alpha$ 、MCP-1 表达明显低于模型组(  $P$  均  $< 0.05$ )。结论 姜黄素对 ALD 小鼠具有肝保护作用, 以姜黄素高剂量组效果最显著; 其机制可能与抑制氧化应激和炎症反应有关。

**关键词:** 酒精性肝病; 姜黄素; 氧化应激; 炎症反应; 小鼠

doi: 10.3969/j.issn.1002-266X.2017.08.012

中图分类号: R575.5 文献标志码: A 文章编号: 1002-266X(2017)08-0041-03

酒精性肝病( ALD) 是酒精摄入过多导致的肝脏损伤性疾病, 其发病机制涉及酒精及其代谢产物的直接肝毒性、氧化应激与脂质过氧化反应、免疫炎症反应等多个方面<sup>[1-3]</sup>。姜黄素作为天然姜黄属植物根茎中提取出来的一种多酚类色素, 具有广泛的生物活性和药理作用, 在抗炎、抗氧化以及抗肿瘤等方面效果显著。研究发现, 姜黄素还能缓解 ALD 所致的肝损伤, 具有护肝作用<sup>[4-6]</sup>。2014 年 3 月 ~ 2015 年 1 月, 我们观察了姜黄素对 ALD 小鼠的肝保护作用。现分析结果并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 材料 雄性昆明小鼠 50 只, SPF 级, 体质量 18 ~ 22 g, 由山东大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SYXK(鲁) 20130001。所有小鼠分笼喂养, 自由进食, 任意饮水, 温度为 18 ~ 20  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 50% ~ 60%, 明暗周期 12 h。主要仪器: DYY-15D 型电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; BS-490 全自动生化分析仪, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; UV759S 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。主要试剂: 市售 56  $^{\circ}\text{C}$  二锅头白酒, 北京红星股份有限公司; 姜黄素, 纯度 95%, 陕西森弗生物技术有限公司; 丙二醛( MDA)、谷胱甘肽( GSH)、谷胱甘肽过

氧化物酶( GSH-Px)、超氧化物歧化酶( SOD) 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; TG、ALT、AST 检测试剂盒, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; MCP-1 羊多克隆抗体、TNF- $\alpha$  羊多克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司;  $\beta$ -actin 兔多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物分组及处理 所有小鼠适应性饲养 1 周, 随机分为对照组、模型组及姜黄素低、中、高剂量组, 每组 10 只。姜黄素低、中、高剂量组预先给予姜黄素 50、100、200 mg/( kg · d) 灌胃, 连续 7 天。模型组及姜黄素低、中、高剂量组均给予 56  $^{\circ}\text{C}$  二锅头白酒 15 mL/( kg · d) 灌胃。每天白酒灌胃前 30 min, 对照组和模型组给予等量蒸馏水灌胃, 姜黄素低、中、高剂量组给予姜黄素 50、100、200 mg/( kg · d) 灌胃。各组均连续灌胃 4 周。

## 1.3 相关指标观察

1.3.1 肝脏指数及肝脏病理形态 各组末次灌胃后禁食 16 h、不禁水, 摘除眼球采血 1 mL, 保存备检。处死前称取体质量, 断颈处死, 立即取出肝脏, 称质量, 计算肝脏指数。肝脏指数 = 肝脏质量/体质量  $\times 100\%$ 。取部分肝组织 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋 5  $\mu\text{m}$  厚连续切片, HE 染色, 光镜下观察肝组织病理形态变化。

1.3.2 血清 ALT、AST、TG 及肝组织匀浆 MDA、

通信作者: 徐力力( E-mail: xull0531@126.com)

SOD、GSH、GSH-Px 水平 所有血样静置 2 h, 4 ℃ 3 500 r/min 离心 10 min, 取上层血清, -20 ℃ 保存。采用全自动生化分析仪、速率法检测血清 ALT、AST、TG。称取各组肝组织 0.4 g, 置于组织匀浆器中, 加入生理盐水 4 mL, 冰上研磨, 制成 10% 组织匀浆; 采用硫代巴比妥酸法检测组织匀浆 MDA 含量, 黄嘌呤氧化酶法检测组织匀浆 SOD 活性, 可见光法检测组织匀浆 GSH 含量, 二硫代二硝基苯甲酸法检测组织匀浆 GSH-Px 活性。所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 肝组织匀浆 MCP-1 和 TNF-α 水平 采用 Western blotting 法。称取肝组织 100 mg, 置于组织匀浆器中, 加入预冷的裂解液(含 PMSF 1 μL) 1 mL, 冰上研磨, 制备组织裂解液。冰浴上充分裂解, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清。BCA 法进行蛋白定量, 取蛋白样品 30 μg 行 SDS-PAGE 电泳, 采用湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, 分别加入 MCP-1、TNF-α、β-actin 多克隆抗体, 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 胶片曝光、显影后进行灰度分析。以目的条带灰度值/β-actin 条带灰度值作为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组肝组织病理形态变化 对照组可见正常

表 3 各组肝组织匀浆 MDA、SOD、GSH、GSH-Px 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MDA(nmol/mg)	GSH(mg/g)	SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)
对照组	10	6.01 ± 3.34	13.29 ± 2.19	103.09 ± 16.91	298.85 ± 53.01
模型组	10	11.07 ± 6.53*	8.89 ± 2.27*	59.98 ± 8.04*	110.03 ± 21.92*
姜黄素低剂量组	10	8.45 ± 4.23	11.67 ± 3.81	68.97 ± 11.64*	198.66 ± 38.68*#
姜黄素中剂量组	10	7.49 ± 4.07	12.07 ± 2.21#	81.46 ± 16.19*#	237.37 ± 46.52*#
姜黄素高剂量组	10	6.81 ± 3.81#	12.66 ± 3.27#	93.67 ± 17.38*#	276.63 ± 69.63*#

注: 与对照组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, #P < 0.05; 与姜黄素低剂量组比较, ◆P < 0.05。

果提示, 姜黄素高剂量组肝保护效果最显著。故本研究仅比较对照组、模型组、姜黄素高剂量组肝组织 MCP-1、TNF-α 表达。结果见表 4。

表 4 各组肝组织 MCP-1、TNF-α 相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TNF-α	MCP-1
对照组	10	1.00 ± 0.51	1.00 ± 0.89
模型组	10	6.09 ± 3.01*	10.39 ± 4.47*
姜黄素高剂量组	10	3.55 ± 0.82*#	4.16 ± 1.27*#

注: 与对照组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, #P < 0.05。

## 3 讨论

酒精在肝脏中代谢会导致肝细胞内氧化还原状态失衡, 氧化应激水平升高, 继而肝细胞的肿胀坏死, 肝功能失常, 最终导致 ALD<sup>[1-3]</sup>。肝脏指数是肝

肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 形态、结构正常。模型组肝小叶结构紊乱, 肝细胞出现大量空泡性脂肪病变, 胞质疏松, 局部可见肝细胞点状坏死和炎性细胞浸润, 说明模型制备成功。姜黄素低、中、高剂量组肝组织脂肪变性、细胞肿胀坏死及炎性病变更得到不同程度改善, 以姜黄素高剂量组效果最明显。见插页 II 图 3。

2.2 各组体质量、肝质量和肝脏指数比较 见表 1。

表 1 各组体质量、肝质量和肝脏指数比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	体质量(g)	肝质量(g)	肝脏指数(%)
对照组	10	42.79 ± 4.21	1.93 ± 0.34	4.53 ± 0.81
模型组	10	31.34 ± 6.43*	2.15 ± 0.56	6.08 ± 0.89*
姜黄素低剂量组	10	33.93 ± 5.02*	1.94 ± 0.36	5.71 ± 0.71*
姜黄素中剂量组	10	35.72 ± 4.85*#	1.84 ± 0.33#	5.16 ± 0.68#
姜黄素高剂量组	10	37.56 ± 5.79#	1.85 ± 0.42#	4.93 ± 0.73*#

注: 与对照组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, #P < 0.05; 与姜黄素低剂量组比较, ◆P < 0.05。

2.3 各组血清 ALT、AST、TG 及肝组织匀浆 MDA、SOD、GSH 和 GSH-Px 水平比较 见表 2、3。

表 2 各组血清 ALT、AST、TG 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG(mmol/L)
对照组	10	22.79 ± 4.21	67.01 ± 14.34	1.67 ± 0.38
模型组	10	44.34 ± 6.43*	121.51 ± 17.27*	2.82 ± 0.41*
姜黄素低剂量组	10	36.93 ± 7.02*	100.45 ± 22.96*	2.42 ± 0.39*
姜黄素中剂量组	10	27.72 ± 4.85*#	92.06 ± 21.75*#	1.99 ± 0.33*#
姜黄素高剂量组	10	23.56 ± 5.79*#	80.11 ± 19.39*#	1.85 ± 0.26*#

注: 与对照组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, #P < 0.05; 与姜黄素低剂量组比较, ◆P < 0.05。

2.4 各组肝组织 MCP-1、TNF-α 表达比较 上述结

脏质量与体质量的比值。肝脏受损后, 肝脏指数可发生明显变化, 能反映肝脏病变程度<sup>[7]</sup>。ALD 以肝细胞微管受损和脂质代谢紊乱为主要表现, 细胞肿胀、胞质疏松, 可见散在或广泛脂滴, 是 ALD 最早和最常见的病理改变<sup>[8-9]</sup>。本研究结果发现, 模型组肝脏指数明显增高, 细胞内可见典型脂肪和炎性病理改变, 证实 ALD 模型制备成功; 与模型组比较, 姜黄素各剂量组肝脏指数升高和细胞肿胀程度明显缓解, 尤其是姜黄素高剂量组效果更明显, 说明姜黄素对 ALD 具有肝保护作用。

ALT 和 AST 是评价肝细胞损伤的特异性指标, TG 是肝脏脂肪合成和代谢的重要指标, 临床上一般

通过 ALT、AST 和 TG 水平来判断肝损伤程度<sup>[10]</sup>。本研究结果发现,模型组血清 ALT、AST、TG 水平均显著升高,说明 ALD 模型制备成功,而姜黄素各剂量组能显著缓解这一状况,进一步说明姜黄素对 ALD 具有一定的肝保护作用。

SOD 和 GSH-Px 是肝脏抗氧化的关键酶系,具有清除自由基和过氧化物的作用;GSH 是主要的还原剂,对维持机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用;MDA 是最主要的脂质过氧化产物之一,可反映体内脂质氧化的程度和自由基的生成情况,并可间接反映自由基攻击机体细胞的严重程度<sup>[2,3]</sup>。大量乙醇在氧化代谢时会迅速消耗肝内的抗氧化物质,从而无法清除过多的自由基,导致脂质过氧化产物迅速增加,肝细胞膜受损。以往研究证实,姜黄素具有很强的抗氧化作用<sup>[4-6]</sup>。本研究模型组肝组织 GSH 含量以及 SOD、GSH-Px 酶活性均显著降低,MDA 含量显著增加,说明模型组肝脏存在明显的氧化应激反应,这可能是诱发 ALD 的主要原因,与以往文献<sup>[11,12]</sup> 研究结果基本一致。与模型组比较,姜黄素各剂量组上述指标均有不同程度改善,以姜黄素高剂量组效果最显著,表明姜黄素能保护肝细胞,改善乙醇所致肝脏的氧化应激反应,从侧面说明姜黄素可能作为抗氧化剂发挥 ALD 的肝保护作用。

TNF- $\alpha$  是在炎症刺激下由巨噬细胞、单核细胞等特定细胞产生的促炎性细胞因子,在诱发慢性炎症、促进器官纤维化的进程中起着重要作用<sup>[12]</sup>;MCP-1 属于趋化因子家族,主要与 CCR2 结合,介导细胞内的信号传导,MCP-1 的异常表达与多种炎症和器官纤维化密切相关<sup>[13,14]</sup>。Mandrekar 等<sup>[15]</sup> 研究发现,MCP-1 和 TNF- $\alpha$  主要生成于激活的 Kuffer 细胞和肝星状细胞,在乙醇喂饲的正常小鼠肝脏中均高表达,而 MCP-1 敲除小鼠肝脏 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、KC/IL-8 等促炎性细胞因子表达明显受到抑制,说明 MCP-1 和 TNF- $\alpha$  在 ALD 的发生中具有重要作用。本研究模型组肝组织 TNF- $\alpha$ 、MCP-1 相对表达量均明显升高,表明 TNF- $\alpha$ 、MCP-1 可用于评价 ALD 的肝损伤;姜黄素高剂量组 TNF- $\alpha$ 、MCP-1 相对表达量明显低于模型组。说明姜黄素可能通过降低 TNF- $\alpha$ 、MCP-1 表达发挥抗炎作用。

总之,姜黄素对 ALD 小鼠具有肝保护作用,以 200 mg/(kg·d) 效果最显著;其机制可能与抗氧化和抗炎活性有关。姜黄素可能通过提高清除自由基的酶活性,抑制自由基介导的脂质过氧化反应和炎

症因子表达,减轻 ALD 所致的肝损伤。

#### 参考文献:

- [1] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141 (5): 1572-1585.
- [2] Zhu R, Wang Y, Zhang L, et al. Oxidative stress and liver disease [J]. *Hepatol Res*, 2012, 42(8): 741-749.
- [3] Nagy LE. The role of innate immunity in alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Res*, 2015, 37(2): 237-250.
- [4] Xiong ZE, Dong WG, Wang BY, et al. Curcumin attenuates chronic ethanol-induced liver injury by inhibition of oxidative stress via mitogen-activated protein kinase/nuclear factor E2-related factor 2 pathway in mice [J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(44): 707-715.
- [5] Rong S, Zhao Y, Bao W, et al. Curcumin prevents chronic alcohol-induced liver disease involving decreasing ROS generation and enhancing antioxidative capacity [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(6): 545-550.
- [6] Vera-Ramirez L, Pérez-Lopez P, Varela-Lopez A, et al. Curcumin and liver disease [J]. *Biofactors*, 2013, 39(1): 88-100.
- [7] 彭勃, 苗明三, 朱平生, 等. 橄榄解酒饮对大小鼠急性酒精性肝损伤脂质代谢的影响 [J]. *河南中医学院学报*, 2003, 18(1): 16-17.
- [8] Mathews S, Xu M, Wang H, et al. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(10): G819-G823.
- [9] Sid B, Verrax J, Calderon PB. Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(11): 894-904.
- [10] Rao KN, Virji MA, Moraca MA, et al. Role of serum markers for liver function and liver regeneration in the management of chloroform poisoning [J]. *J Anal Toxicol*, 1993, 17(2): 99-102.
- [11] Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(47): 17756-17772.
- [12] Zelová H, Hošek J. TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(7): 641-651.
- [13] Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(21): 1570-1579.
- [14] 方向群, 朱元钰, 胡晓玲, 等. 氯沙坦对大鼠肺纤维化模型的干预作用及对 MCP-1 和 bFGF 表达的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(5): 268-272.
- [15] Mandrekar P, Ambade A, Lim A, et al. An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice [J]. *Hepatology*, 2011, 54(6): 2185-2197.

(收稿日期: 2016-03-18)