

文章编号:2095-7386(2023)06-0037-10

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2023.06.006

姜黄素对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的预防机制

张 维¹,张运超²,胡丞铭¹,叶奥奇¹,邓 琴¹,余泽军¹,邱银生³,徐凌云¹

(1. 武汉轻工大学 生命科学与技术学院,武汉 430023;2. 武汉回盛生物科技有限公司 武汉 430042;

3. 武汉轻工大学 动物科学与营养工程学院,武汉 430023)

摘 要:研究姜黄素(Curcumin,CUR)对四氯化碳(CCl_4)诱导小鼠急性肝损伤的预防作用及其机制。ICR 雄性小鼠随机分为正常对照组、模型组、姜黄素(50、100、200 mg/kg)组、联苯双酯(150 mg/kg)组。姜黄素组和联苯双酯组给予相应剂量的药物灌胃,每天 1 次,连续 8 d。末次给药后,除正常对照组外,每只小鼠腹腔注射 0.1% CCl_4 花生油溶液,禁食不禁水 16 h 后收集小鼠血清和肝脏。检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)活性及肝组织谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,观察各组小鼠肝脏组织病理学变化。检测肝脏中活性氧(ROS)水平和硫氧还蛋白 1(Trx-1)、硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的表达水平。结果显示,与模型组相比,CUR 预处理组肝组织的炎症细胞浸润和肝细胞坏死程度均明显降低,血清 ALT、AST、AKP 和 LDH 活性显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肝组织 GSH、CAT、T-SOD 活性显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA 含量和 ROS 活性显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);CUR 显著提高 Trx-1 蛋白和 mRNA 表达,降低 TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1 β 的蛋白和 mRNA 表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。综上所述,姜黄素可通过调控 ROS/TXNIP/NLRP3 通路预防 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤。

关键词:姜黄素;四氯化碳;急性肝损伤;氧化应激;ROS/TXNIP/NLRP3 通路

中图分类号:R 931.71

文献标识码:A

Study on the preventive effect and mechanism of curcumin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice

ZHANG Wei¹,ZHANG Yunchao²,HU Chengming¹,YE Aoqi¹,

DENG Qin¹,YU Zejun¹,QIU Yinsheng³,XU Lingyun¹

(1. School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Wuhan HVSEN Biotechnology Co., Ltd, Wuhan 430042, China;

3. School of Animal Science and Nutrition Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: To study the preventive effect of curcumin (Curcumin, CUR) on acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in mice and its mechanism. ICR male mice were randomly divided into normal con-

收稿日期:2023-10-23

作者简介:张维(1998—),女,硕士研究生,研究方向为抗炎免疫药理学,E-mail:2863134661@qq.com.

通信作者:徐凌云(1967—),女,教授,博士,硕士生导师,研究方向为抗炎免疫药理学,E-mail:doctorxly9898@163.com.

trol group, model group, curcumin (50, 100, 200 mg/kg) groups and bifendate (150 mg/kg). The curcumin groups and the bifendate group were given the corresponding dose of drugs by gavage, once a day for 8 days. After the last administration, except the mice in the normal control group, the other mice were intraperitoneally injected with 0.1% CCl_4 peanut oil solution, and the serum and liver of the mice were collected after fasting for 16 h. The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (AKP) and lactate dehydrogenase (LDH) in serum and the activities of glutathione (GSH), catalase (CAT), total superoxide dismutase (T-SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in liver tissue were detected. The histopathological changes of liver in each group were observed. The level of reactive oxygen species (ROS) and the expression levels of thioredoxin-1 (Trx-1), thioredoxin-interacting protein (TXNIP), NOD-like receptor hot protein domain-related protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), cysteine aspartic protease 1 (Caspase-1) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the liver were detected. The results showed that compared with the model group, the degree of inflammatory cell infiltration and hepatocyte necrosis in the liver tissue of the CUR pretreatment groups were significantly decreased, the activities of ALT, AST, AKP and LDH in serum were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the activities of GSH, CAT, T-SOD and ROS in liver tissue were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the content of MDA and the acting of ROS were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CUR significantly increased the expression of Trx-1 protein and mRNA, and decreased the expression of TXNIP, NLRP3, ASC, Caspase-1 and IL-1 β protein and mRNA ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In summary, curcumin prevented CCl_4 -induced acute liver injury in mice by inhibiting the ROS/TXNIP/NLRP3 pathway.

Key words: curcumin; carbon tetrachloride; acute liver injury; oxidative stress; ROS/TXNIP/NLRP3 pathway

1 引言

肝脏被药物、病毒或有毒化学物质等多种肝毒性因素刺激时会导致肝细胞受损, 如果不及时控制, 短时间内可引起大量肝组织坏死, 造成不同程度的肝损伤^[1]。 CCl_4 是一种经典的肝毒物, 其诱导的肝损伤模型是研究保护肝脏药物疗效和作用机制的经典模型^[2]。 CCl_4 刺激肝细胞, 在细胞色素 P450 的作用下分解为三氯甲烷自由基和过氧化三氯甲烷自由基等毒性物质, 然后共价结合肝组织中的蛋白质、核酸、脂质等干扰细胞功能, 从而引发肝脏脂质过氧化并破坏肝脏结构和功能^[3,4]。目前防治肝损伤的药物疗效有限, 易产生副作用, 因此, 研发安全有效的药物对预防和保护肝损伤有重要意义。

硫氧还蛋白 1 (Thioredoxin-1, Trx-1) 是一种抗氧化蛋白, 能够抑制炎症反应, 在抗氧化系统中通过清除活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 来调节还原与氧化平衡^[5]。硫氧还蛋白互作蛋白 (Thioredoxin-interacting protein, TXNIP) 为 Trx-1 的抑制剂, 是细胞抗氧化反应的重要调节剂, 与炎症有关^[6]。ROS 过多会触发 NLRP3 炎症小体的活化,

引起 Trx-1 与 TXNIP 解离, TXNIP 随之与 NLRP3 结合, 激活 NLRP3 炎症小体^[7]。姜黄素 (Curcumin, CUR) 是一种从姜科类植物根部提取的多酚物质, 是中药姜黄的主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、保肝等多种药理活性^[8]。已有研究报道姜黄素通过抑制氧化应激和炎症来预防 CCl_4 诱导的急性肝损伤, 其机制涉及 Nrf2/HO-1 的激活和 TGF- β 1/Smad3 通路的抑制^[9]。已有研究表明 ROS/TXNIP/NLRP3 在肝损伤中发挥重要作用^[7]。但是目前尚不清楚姜黄素是否能通过 ROS/TXNIP/NLRP3 通路抑制氧化应激和炎症反应保护 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤。因此本文建立 CCl_4 诱导的急性肝损伤模型, 以 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路为靶标, 探讨姜黄素预防 CCl_4 诱导小鼠急性肝损伤的作用及机制。

2 材料与方法

2.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠, 体重为 20 ± 2 g, 购自湖北贝恩特生物科技有限公司。动物生产许可证号: SCXK(鄂)2019-0010。所有小鼠饲养在适宜温度

(22~25 ℃)、湿度(50%~60%)、12 h 黑暗和 12 h 光照周期的环境中,自由饮水和进食。实验方案经由武汉轻工大学实验动物福利伦理委员会审批(批号:WPU202204004),符合实验室动物管理与使用准则。

2.2 药品与试剂

姜黄素(Curcumin,纯度 $\geq 99\%$,批号:AF91122.522),由武汉回盛生物科技有限公司提供;四氯化碳(CCl_4 ,批号:20220308),购于天津市天力化学试剂有限公司;联苯双酯(Bifendate,纯度 $> 98\%$,批号:D250010G100857),购于上海源叶生物科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号:C009-1-1)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST,批号:20221216)、乳酸脱氢酶(LDH,批号:20230306)、碱性磷酸酶(AKP,批号:20220627)、谷胱甘肽(GSH,批号:20220424)、过氧化氢酶(CAT,批号:20221128)、总超氧化物歧化酶(T-SOD,批号:20220316)、丙二醛(MDA,批号:20220512)试剂盒均购于南京建成生物研究所;活性氧(ROS,批号:S0033S)试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010)、RIPA 裂解液(批号:P0013B)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(批号:P1045)均购于碧云天生物科技有限公司;彩色-快速凝胶试剂盒(批号:WB812C)、PAGE-SDS 蛋白上样缓冲液(批号:WB6002)、蛋白分子量标准 maker(批号:WB0173)、EX ECL pico 化学发光液(批号:AP34L024)均购自上海威奥生物科技有限公司; β -actin 鼠单克隆一抗(批号:66009-1-Ig)、Trx-1 兔多克隆一抗(批号:1499-1-AP)和 TXNIP 兔多克隆一抗(批号:18243-1-AP)均购自武汉三鹰科技有限公司;NLRP3 兔多克隆一抗(批号:DF7438)、ASC 兔多克隆一抗(批号:DF6304)、Caspase-1 兔多克隆一抗(批号:AF4022)、IL-1 β 兔多克隆一抗(批号:AF5103)和 HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号:S0001)购自美国 Affinity Biosciences;RNAiso Plus(批号:9108Q)、q-PCR 反转录试剂盒(批号:RR047A)、q-PCR 上机试剂盒(批号:RR420Q)均购自日本 TaKaRa 公司。

2.3 仪器

高速匀浆机(金坛市医疗仪器厂,型号:FSH-2A),光学显微镜(日本 Nikon 公司,型号:80i),紫外可见分光光度计(翱艺仪器上海有限公司,型号:UV-1000 型),酶标仪(上海科华实验系统有限公司,型号:ST-360),荧光多功能酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司,型号:970-CRT),光学显微镜(日本 O-

lympus 公司,型号:CX330),电泳仪电源(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-8C),迷你双垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYCZ-24DN),四板转印电泳槽(北京六一生物科技有限公司,型号:DYCZ-40S),脱色摇床(北京六一生物科技有限公司,型号:WD-9405F),凝胶成像分析系统(美国 BIO-RAD 公司,型号:ChemiDocTMXRS+),超微量分光光度计(美国 ThermoFisher 公司,型号:MD2000D),荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:ABI 7500)。

2.4 方法

2.4.1 动物分组及给药

60 只小鼠适应性喂养 3 d 后随机分为 6 组($n=10$),分别为正常对照组、模型组,及姜黄素低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg)和阳性对照联苯双酯组(150 mg/kg)。姜黄素给药组及联苯双酯组每天灌胃给药,正常对照组及模型组每天灌胃 0.5% CMC-Na 溶液,连续给药 8 d。末次给药 2 h 后,正常对照组腹腔注射花生油溶液,其余各组腹腔注射 0.1% CCl_4 花生油溶液建立急性肝损伤模型,每只给药容积均为 10 ml/kg,所有小鼠禁食不禁水 16 h 后,摘取眼球取血并脱颈椎处死小鼠。血清分离后-20 ℃冰箱保存,用于生化指标测定;肝脏摘取后拍照,肉眼观察肝脏损伤情况,取部分肝组织用 4%多聚甲醇固定,另取部分肝脏保存于-80 ℃冰箱备用。

2.4.2 小鼠血清 AST、ALT、AKP 和 LDH 活性测定

血液在室温下静置 2 h 后,于 4 000 r/min,4 ℃条件下离心 10 min,收集血清,参照试剂盒说明书检测各组小鼠血清中 AST、ALT、AKP 和 LDH 水平。

2.4.3 小鼠肝脏 GSH、CAT、T-SOD 活性和 MDA 含量测定

称取组织重量,按照重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的预冷生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,制备成 10%的肝脏匀浆液。于 2 500 r/min,4 ℃条件下离心 15 min,收集上清液。参照试剂盒说明书测定 GSH、CAT、T-SOD 活性和 MDA 含量活性。

2.4.4 小鼠肝组织 ROS 水平检测

参考文献^[10,11]方法检测小鼠肝组织中 ROS 的水平,并进行部分改进。在全黑色 96 孔板中加入 80 μL 新鲜的 10%的肝组织匀浆上清液,各孔再加入 20 μL DCFH-DA 溶液(10 $\mu\text{mol/L}$),充分混匀后,在避光环境下于 37 ℃反应 1 h,反应结束后,使

用荧光多功能酶标仪在 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长下扫描以检测各孔荧光强度,使用 BCA 试剂盒测定肝组织匀浆液中的蛋白质浓度,结果定义为每微克蛋白质的荧光强度,以正常对照组为参照,并表示为相对于正常对照组的百分比。

2.4.5 小鼠肝脏系数的测定

小鼠处死后,分离肝脏并称重,计算肝脏系数:肝脏系数(%)=A(mg)/B(g)×100,其中 A 为小鼠处死时的肝脏质量,B 为小鼠处死前的体质量。

2.4.6 小鼠肝脏大体观察和组织病理学检测

剖取处置后的小鼠肝脏并置于预冷的生理盐水中,滤纸吸干组织表面生理盐水,肉眼观察小鼠肝脏大体外观并拍照记录。

小鼠肝组织用 4% 多聚甲醛充分固定 24 h 以上,制作组织石蜡包埋切片,进行苏木精-伊红染色并在光学显微镜下观察肝组织病理形态变化情况、采集图像。

2.4.7 Western blot 法测定小鼠肝组织蛋白表达

每组随机取三只小鼠肝脏共 1.0 g 加入 1 mL RIPI 裂解液,在冰浴条件下机械匀浆并裂解 30 min,于 12 000 r/min,4 °C 条件下离心 10 min,收集上清液,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度并煮沸使蛋白变性。使用蛋白印迹法检测各组小鼠肝组织中 Trx-1、TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1β 的蛋白表达水平,使用 Image J 软件计算相关蛋白灰度值及相对于 β-actin 的表达量。

2.4.8 qRT-PCR 法测定肝组织 mRNA 表达水平

用 RNAiso Plus 提取肝组织总 RNA,以 260/280 nm 吸光度比值判断 RNA 纯度。取 1 μg RNA 使用 Prime Script RT 酶混合物按照制造商的说明转录成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex TaqTMII 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 检测。最终反应体积为 20 μL,扩增条件为:95 °C,30 s;95 °C,5 s;55 °C,30 s;72 °C,30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对 mRNA

表达量。引物序列如下:Trx-1 上游引物:5'-GCGCTCCGCCCTATTTCTAT-3',下游引物:5'-TCACCATTTTGGCTGTTGCG-3';TXNIP 上游引物:5'-TCCTGTGGATGCAAGGGTCT-3';下游引物:5'-CATCTCGTTCTCACCTGCTG-3';NLRP3 上游引物:5'-GTACCCAAG GCTGCTATCTGG-3',下游引物:5'-GGACACTCGTCATCT TCAGCA-3';ASC 上游引物:5'-TGAGCAGCTGCAAACGACTA-3',下游引物:5'-CAGAACTGCCTGGTACT GT-3';Caspase-1 上游引物:5'-ACTGACTGGGACCCTCAAGT-3',下游引物:5'-GCA AGACGTGTACGAGTGGT-3';IL-1β 上游引物:5'-TGCCACCTTTTGACAGTG ATG-3',下游引物:5'-TGTGCT GCTGCGAGATTTGA-3';GAPDH 上游引物:5'-AGAGGGATGCTGCCCTTACC-3',下游引物:5'-CCAAATCCGTTCACACCGAC-3'。

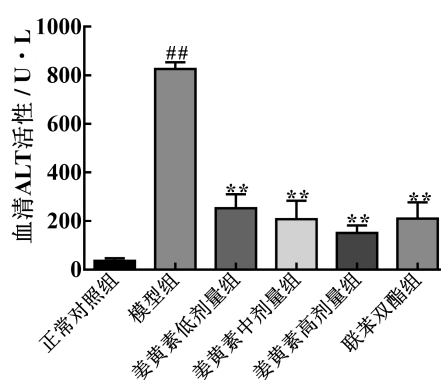
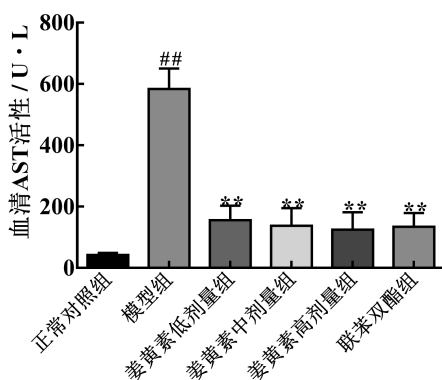
2.5 统计学分析

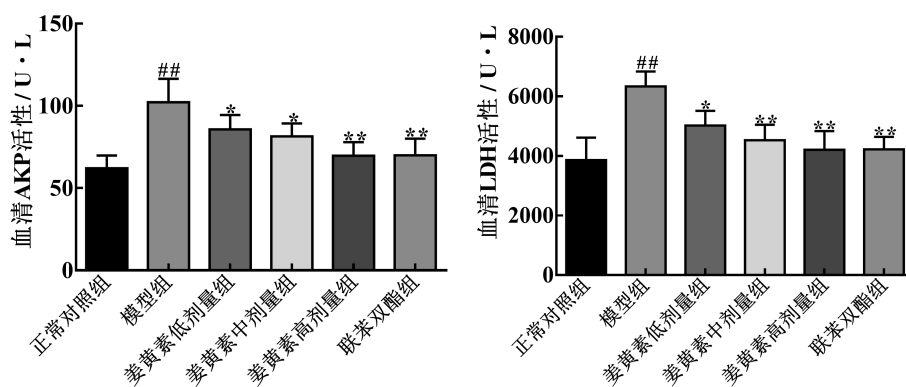
使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行分析,结果以“平均值±标准差”表示。组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CUR 对小鼠血清 AST、ALT、AKP 和 LDH 活性的影响

如图 1 所示,与正常对照组相比,模型组小鼠血清 AST、ALT、AKP 和 LDH 水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,50、100、200 mg/kg 的 CUR 预给药可以显著降低小鼠血清 AST、ALT、AKP 和 LDH 的水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),联苯双酯也能显著降低以上血清指标活性($P<0.01$)。综上所述,这些结果提示,本实验成功建立小鼠急性肝损伤模型,不同剂量的姜黄素预防给药可以改善 CCl₄ 诱导的急性肝损伤。





注:与正常对照组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

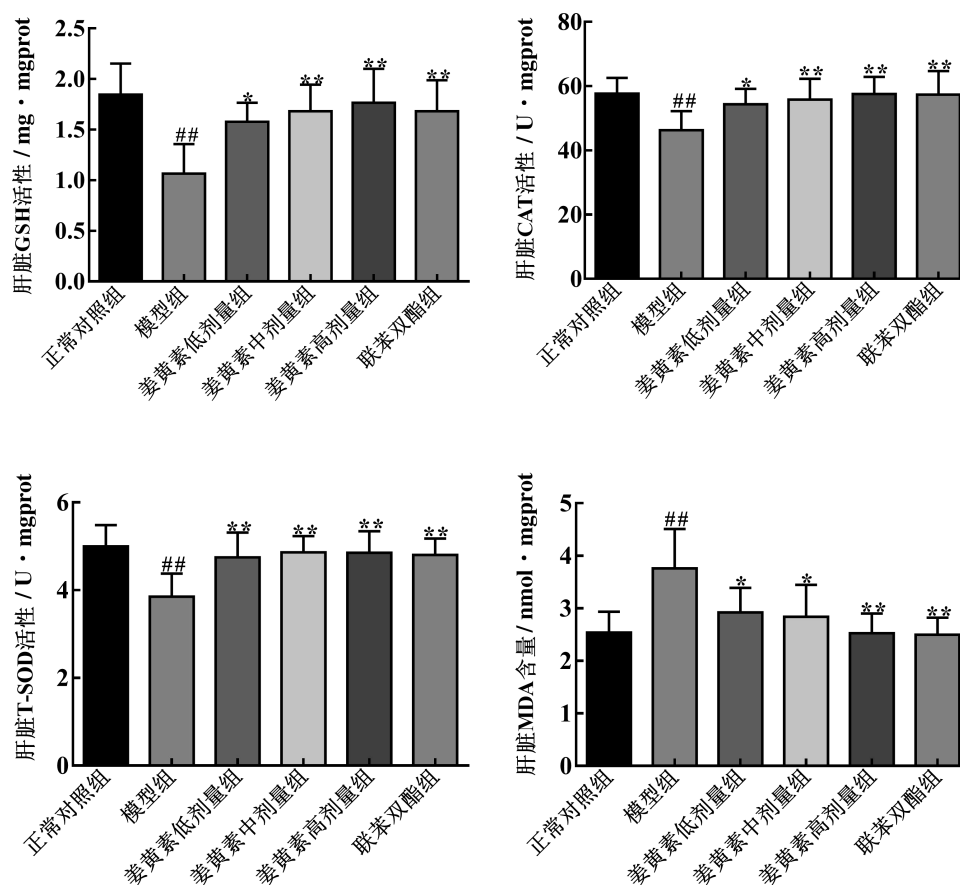
图1 姜黄素对 CCl_4 所致肝损伤小鼠血清AST、ALT、AKP和LDH的影响($x \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effects of curcumin on serum AST, ALT, AKP and LDH in mice with CCl_4 -induced liver injury ($x \pm s, n=10$)

3.2 CUR对小鼠肝组织GSH、CAT、T-SOD活性和MDA含量的影响

如图2所示,与正常对照组相比,模型组小鼠肝组织中GSH、CAT和T-SOD的活性显著降低($P<0.01$),脂质过氧化物MDA的含量显著升高($P<0.01$);与模型组相比,CUR低、中、高剂量组及联苯

双酯组小鼠肝组织中GSH、T-SOD和CAT的活性均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA的含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。综上所述,这些结果提示, CCl_4 引起小鼠肝脏氧化应激失衡,CUR通过降低氧化应激减轻 CCl_4 诱导的急性肝损伤。



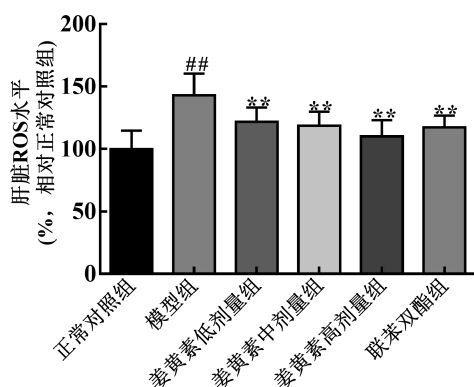
注:与正常对照组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

图2 姜黄素对 CCl_4 所致肝损伤小鼠肝组织GSH、CAT、T-SOD和MDA的影响($x \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of curcumin on GSH, CAT, T-SOD and MDA in liver of mice with CCl_4 -induced liver injury ($x \pm s, n=10$)

3.3 CUR 对小鼠肝组织 ROS 含量的影响

如图 3 所示,与正常对照组相比,模型组小鼠肝组织 ROS 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,不同剂量 CUR 及联苯双酯显著降低肝脏中 ROS 水平($P<0.01$)。



注:与正常对照组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;

与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

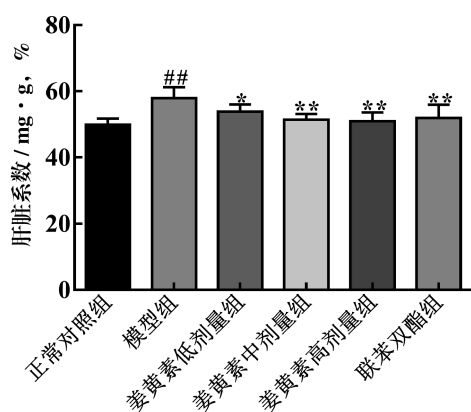
图 3 姜黄素对 CCl_4 所致肝损伤

小鼠肝脏 ROS 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Effect of curcumin on ROS in liver of mice with CCl_4 -induced liver injury($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.4 CUR 对小鼠肝脏系数的影响

如图 4 所示,与正常对照组相比,模型组肝系数显著增加;与模型组相比,CUR 预给药和联苯双酯显著降低小鼠肝脏系数($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注:与正常对照组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;

与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

图 4 姜黄素对 CCl_4 所致肝损伤

小鼠肝脏系数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

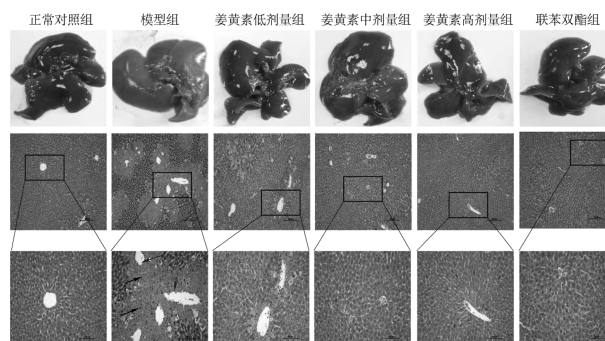
Fig. 4 Effect of curcumin on liver index in mice with CCl_4 -induced liver injury($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.5 CUR 对小鼠肝脏大体和组织病理学的影响

如图 5 所示,肉眼观察发现正常对照组小鼠肝

脏体积正常,表面光滑质软,富有弹性,肝脏色泽鲜亮。模型组肝脏颜色呈现不正常的乳白色,表面可见乳白色的颗粒状物体,肝脏质地较硬弹性差;不同剂量 CUR 组和联苯双酯组表现为肝脏颜色和质地逐渐趋于正常,色泽较模型组更鲜亮。

HE 染色结果显示:正常对照组小鼠肝组织结构正常,肝细胞大小均一,无炎症细胞浸润和坏死细胞。模型组小鼠肝组织损伤明显,肝索、肝小叶结构紊乱严重,肝细胞大面积坏死(绿色箭头所指),坏死相互融合形成中央静脉-中央静脉桥接坏死(黄色箭头所指),在坏死中观察到较多的炎症细胞浸润(红色箭头所指)。与模型组比较,各 CUR 给药组小鼠肝组织的炎症细胞浸润和肝细胞坏死程度均明显降低。CUR 低剂量能观察到少量坏死和炎症细胞浸润,坏死减少;CUR 中剂量、高剂量组和联苯双酯组肝索排列整齐、肝细胞大小均一,炎症细胞浸润明显减少,细胞坏死明显减轻,且没有桥接坏死。



注:深色箭头表示细胞坏死,浅色箭头表示桥接坏死,

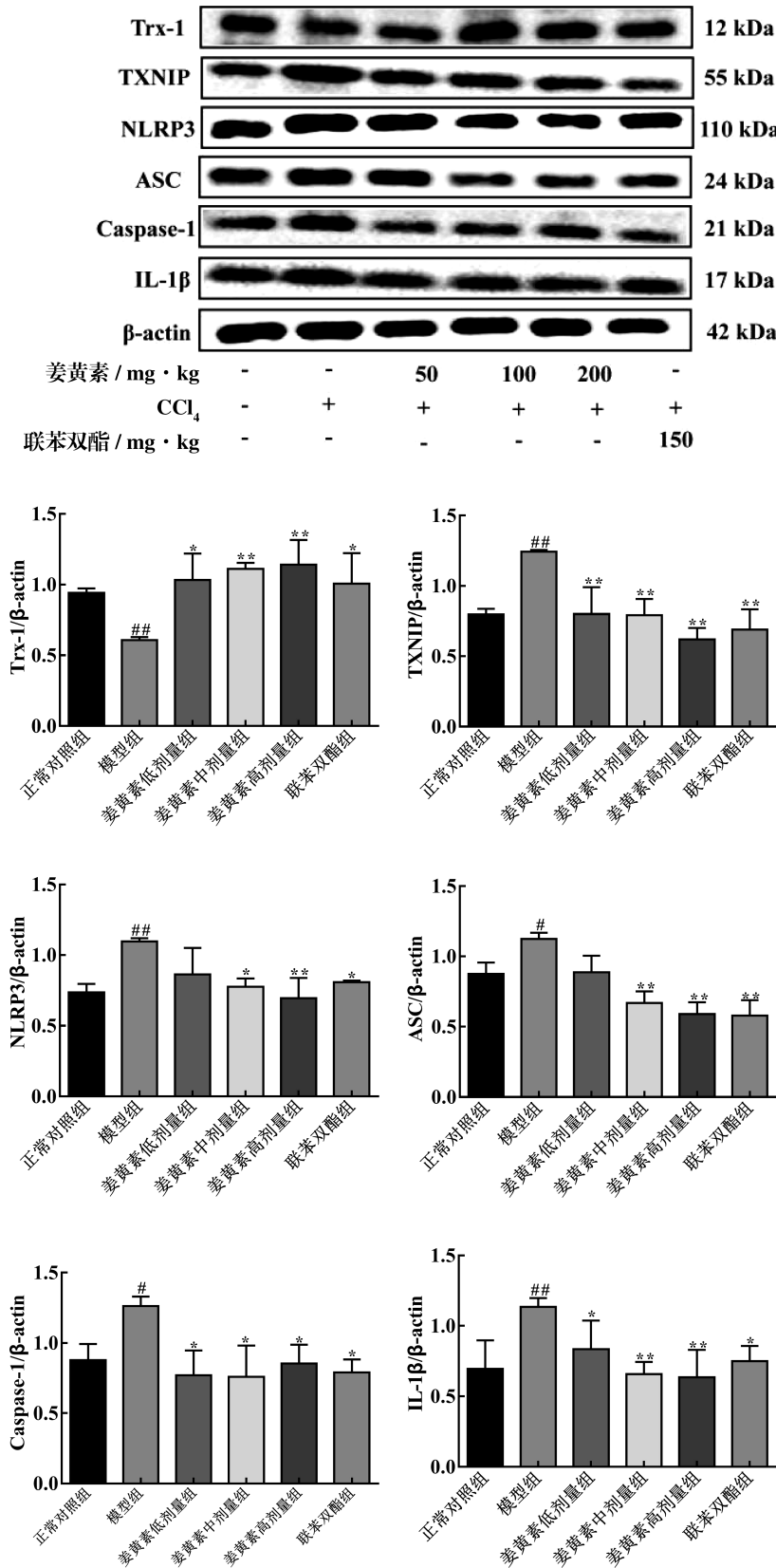
红色箭头表示炎症细胞浸润

图 5 姜黄素对小鼠肝脏大体和组织病理学的影响 (HE,放大倍数分别为 $100\times$ 和 $200\times$)

Fig. 5 Effects of curcumin on gross and histopathological changes of liver in mice (HE, magnification of $100\times$ and $200\times$, respectively)

3.6 CUR 对小鼠肝组织中 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路蛋白表达的影响

如图 6 所示,与正常对照组相比,模型组小鼠肝组织 Trx-1 蛋白表达显著降低($P<0.01$),TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,各剂量 CUR 组和联苯双酯组小鼠肝组织 Trx-1 蛋白表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注:与正常对照组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

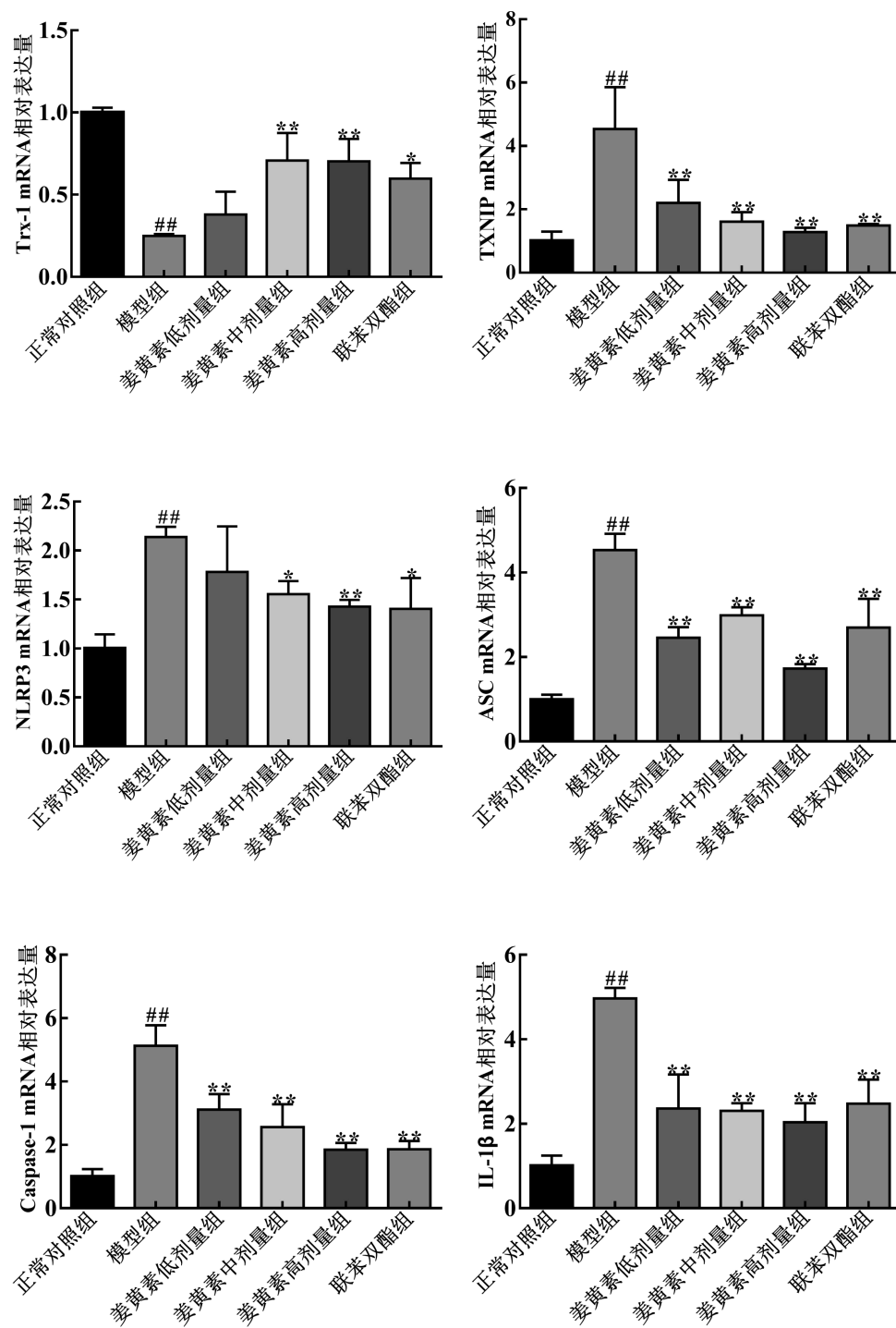
图 6 姜黄素对 CCl₄所致肝损伤小鼠肝脏 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路蛋白表达的影响($x \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of curcumin on Trx-1/TXNIP/NLRP3 pathway proteins in liver of mice with CCl₄-induced liver injury($x \pm s, n=3$)

3.7 CUR 对小鼠肝组织中 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路 mRNA 表达的影响

如图 7 所示,与正常对照组相比,模型组小鼠肝组织 Trx-1 mRNA 表达显著降低($P<0.01$),TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达

显著升高($P<0.01$);与模型组比较,CUR 给药组和联苯双酯组小鼠肝组织 Trx-1 mRNA 表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注:与正常对照组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

图 7 姜黄素对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠肝脏 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路 mRNA 表达的影响($x\pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of curcumin on Trx-1/TXNIP/NLRP3 pathway mRNA in liver of mice with CCl₄-induced liver injury($x\pm s, n=3$)

4 讨论与结论

CCl₄诱导的急性肝损伤模型能够体现肝损伤临床病理状态,其发病机制涉及体内各种酶的激活、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡和自噬等,常用于保肝药物的药效和机制研究^[12,13]。当 CCl₄ 刺激机体时,肝细胞膜功能和结构受损,细胞内的 ALT、AST、AKP、LDH 等会释放入血,检测血清 AST、ALT、ALP 活性在一定范围内反映肝细胞的损伤程度^[14,15]。本实验中模型组血清 AST、ALT、AKP 和 LDH 活性均显著升高,表明本次实验肝损伤模型成功建立。各剂量 CUR 预处理后血清 AST、ALT、AKP 和 LDH 活性显著降低,肝脏指数恢复接近正常,病理结果显示肝细胞炎症浸润和坏死面积减少,以上实验结果提示,CUR 预防给药对急性肝损伤具有保护作用。

姜黄素具有抗氧化的药理活性,这也是其发挥肝保护作用的机制之一。CCl₄刺激会扰乱机体氧化应激平衡,导致肝细胞发生脂质过氧化反应^[16]。GSH、T-SOD 和 CAT 是体内重要的抗氧化酶,能抑制体内自由基引起的脂质过氧化,其活性的强弱可反映机体的抗氧化能力^[19,20]。MDA 作为脂质过氧化的最终代谢产物,可以反映 CCl₄引起的氧化应激的程度^[21]。本研究结果表明,CUR 通过增加肝脏中 GSH、T-SOD 和 CAT 活性并降低 MDA 含量改善 CCl₄诱导的肝损伤,表明 CUR 的保肝作用与其抗氧化作用有关。

Trx-1 是一种抗氧化蛋白,通过清除脂质 ROS 和调节还原氧化蛋白维持氧化还原稳态,在抵抗氧化应激、调节炎症和抑制细胞凋亡等方面发挥作用^[17,18]。TXNIP 作为 Trx-1 的负性调控蛋白,其作用在于与 Trx-1 的抗氧化性质相结合,进一步抑制了其对氧化还原的调控效果,因此可能导致氧化应激、炎症反应以及细胞死亡^[19]。Western blot 和 qRT-PCR 结果揭示,Trx-1 在模型组中的蛋白和 mRNA 表达显著降低,而 TXNIP 表达明显升高;CUR 预处理能逆转上述结果,说明姜黄素能调控 Trx-1/TXNIP 通路通过减轻 CCl₄诱导的小鼠急性肝损伤。ROS 是触发机体氧化应激和炎症反应的重要信号分子,过量的 ROS 导致 Trx-1 与 TXNIP 解离,激活的 TXNIP 与 NLRP3 结合促进炎症小体激活,促使致炎因子分泌引起肝脏炎症反应^[7]。本文检测与 ROS 和 TXNIP 密切相关的 NLRP3 炎症小体的表达,发现模型组中 ROS 水平显著升高,姜

黄素预处理后显著下调 CCl₄引起的小鼠急性肝损伤中 ROS 含量增高。Western blot 和 qRT-PCR 结果表明模型组中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 的蛋白和 mRNA 表达显著增加,姜黄素亦能抑制 NLRP3 炎症小体的表达。所以我们认为姜黄素可能通过抑制 ROS 的产生,上调 Trx-1 和下调 TXNIP,抑制 NLRP3 炎症小体活化,从而发挥防治 CCl₄诱导的小鼠急性肝损伤的作用。

综上所述,本研究结果表明姜黄素能预防 CCl₄诱导的小鼠急性肝损伤,通过降低小鼠血清转氨酶水平,降低肝脏氧化应激,减轻肝脏病理损伤,其机制是通过增加 Trx-1 的表达和抑制 ROS-TXNIP 介导的 NLRP3 炎症小体。本文为姜黄素防治急性肝损伤提供了新的靶标。

参考文献:

- [1] 肖冬焱,何伟,肖志滢,等.淫羊藿苷对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用机制[J].中国组织工程研究,2024,28(23):3654-3660.
- [2] Zhang X, Kuang G, Wan J, et al. Salidroside protects mice against CCl₄-induced acute liver injury via down-regulating CYP2E1 expression and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. Int Immunopharmacol. 2020, 85: 106662-670.
- [3] Wu S, Liu L, Yang S, et al. Paeonol alleviates CCl₄-induced liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cells activation via inhibiting the TGF- β /Smad3 signaling[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2019, 41(3): 438-445.
- [4] Khan A, Shal B, Naveed M, et al. Matrine ameliorates anxiety and depression-like behaviour by targeting hyperammonemia-induced neuroinflammation and oxidative stress in CCl₄ model of liver injury[J]. Neurotoxicology. 2019, 72: 38-50.
- [5] He L, He T, Farrar S, et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species [J]. Cell Physiol Biochem. 2017, 44(2): 532-553.
- [6] Mohamed IN, Li L, Ismael S, et al. Thioredoxin interacting protein, a key molecular switch between oxidative stress and sterile inflammation in cellular response[J]. World J

- Diabetes. 2021,12(12):1979-1999.
- [7] Li Z, Liu T, Feng Y, et al. PPAR γ alleviates sepsis-induced liver injury by inhibiting hepatocyte pyroptosis via inhibition of the ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*. 2022,2022:1269747-62.
- [8] Fu YS, Chen TH, Weng L, et al. Pharmacological properties and underlying mechanisms of curcumin and prospects in medicinal potential[J]. *Biomed Pharmacother*. 2021,141:111888-97.
- [9] Peng X, Dai C, Liu Q, et al. Curcumin attenuates on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice via modulation of the Nrf2/HO-1 and TGF- β 1/Smad3 pathway[J]. *Molecules*. 2018,23(1):215-31.
- [10] Pang C, Zheng Z, Shi L, et al. Caffeic acid prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system[J]. *Free Radic Biol Med*. 2016,91:236-46.
- [11] Zhang J, Liang X, Li J, et al. Apigenin attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity by activating AMP-activated protein kinase/carnitine palmitoyltransferase I pathway[J]. *Front Pharmacol*. 2020,11:549057-69.
- [12] Ullah H, Khan A, Baig MW, et al. Poncirin attenuates CCL $_4$ -induced liver injury through inhibition of oxidative stress and inflammatory cytokines in mice[J]. *BMC Complement Med Ther*. 2020,20(1):115.
- [13] 刘宇,王园园,李智涛,等. α -常春藤皂苷对小鼠急性肝损伤自噬相关蛋白表达的影响[J]. *中国临床药理学杂志*,2023,39(2):226-230.
- [14] 陈俊,廖彭莹,张新锐,等. 小分子多肽 LK-5 对 CCL $_4$ 致急性肝损伤小鼠的保护作用研究[J]. *中国畜牧兽医*,2023,50(9):3833-3841.
- [15] 盛昌婷,郭阳,张本印,等. 沙棘甾醇对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用研究[J]. *中国食品添加剂*,2021,32(4):63-69.
- [16] 金华,蔡克瑞,董建将,等. 淫羊藿苷预处理对急性肝损伤大鼠肝功能的保护作用及机制[J]. *山东医药*,2018,58(38):32-34.
- [17] Liu Y, Xue N, Zhang B, et al. Role of thioredoxin-1 and its inducers in human health and diseases[J]. *Eur J Pharmacol*. 2022,919:174756-65.
- [18] Bai J, Wang S. Panaxatriol saponin ameliorated liver injury by acetaminophen via restoring thioredoxin-1 and pro-caspase-12[J]. *Liver Int*. 2014,34(6):963-73.
- [19] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. *Nat Immunol*. 2010,11(2):136-40.