

# 姜黄素对肝纤维化大鼠CTGF及TIMP-1和NF- $\kappa$ B表达的影响

舒建昌, 皮新军, 何雅军, 吕霞, 方力, 叶国荣 (暨南大学医学院附属广州红十字会医院, 广州 510220)

**摘要:** 目的 观察姜黄素预防肝纤维化过程中肝脏组织中结缔组织生长因子(CTGF)、金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)表达的变化, 探讨姜黄素预防肝纤维化的作用机制。方法 四氯化碳腹腔注射8周以建立大鼠肝纤维化模型, 同时每只大鼠按每100g体重分别给予20 mg、10 mg、5 mg姜黄素灌胃处理, 3次/周, 共8周; 所有大鼠随机分为6组(正常组、肝纤维化模型组、高剂量姜黄素组、中剂量姜黄素组、低剂量姜黄素组和阴性对照组)。8周后处死大鼠, 留取肝脏组织, 免疫组化方法检测肝组织中CTGF、TIMP-1、NF- $\kappa$ B的表达水平, 进行图像分析并统计各组阳性表达率差别。结果 模型组大鼠肝组织中CTGF、TIMP-1、NF- $\kappa$ B大量表达, 姜黄素可明显抑制上述因子的表达( $P < 0.01$ )。结论 姜黄素预防肝纤维化作用可能与其抑制CTGF、TIMP-1、NF- $\kappa$ B的表达有关。

**关键词:** 纤维化; 姜黄素; 结缔组织生长因子; 金属蛋白酶组织抑制剂-1; 核因子- $\kappa$ B

## Effects of Curcumin on expressions of CTGF, TIMP-1 and NF- $\kappa$ B in rats with hepatic fibrosis

SHU Jian-chang, PI Xin-jun, HE Ya-jun, LU Xia, FANG Li, YE Guo-rong (Guangzhou Red Cross Hospital Affiliated to Jinan University Medical College, Guangzhou 510220, China)

**Abstract: Objective** To investigate the changes of expression of connective tissue growth factor (CTGF), tissue inhibitor of metalloproteinases -1 (TIMP-1) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in fibrotic liver tissue of rats while receiving curcumin prophylactic treatment and to discuss the mechanism of the prophylactic effect of curcumin on hepatic fibrosis. **Methods** Hepatic fibrosis models of rat were established by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride. Curcumin of 20 mg, 10 mg, 5 mg per 100 gram weight of rat were given to these rats at the same time, respectively. Normal, fibrosis and positive groups were divided. After eight weeks, all rats were executed and livers were kept. Expressions of CTGF, TIMP-1 and NF- $\kappa$ B in liver were detected by immunohistochemical method. **Results** Expressions of CTGF, TIMP-1 and NF- $\kappa$ B in fibrotic group increased significantly compared with those of normal group, which were depressed obviously in curcumin groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Prophylactic effect of curcumin on hepatic fibrosis may be related to expressions inhibition of CTGF, TIMP-1 and NF- $\kappa$ B.

**Key words:** Liver fibrosis; Curcumin; Connective tissue growth factor; Tissue inhibitor of metalloproteinases-1; Nuclear factor- $\kappa$ B

肝纤维化是各种损伤因素长期作用于肝脏的一种结果, 可发展为肝硬化, 进一步发展为肝癌。肝纤维化发病机制复杂, 尚未完全明了。目前认为肝星状细胞(HSC)的活化、增殖与肝纤维化的发生发展密切相关, 抑制HSC活化增殖有助于逆转肝纤维化。姜黄素是从姜科植物姜黄中提取

的一种天然酚类抗氧化剂, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理和生物学作用。本课题组前期研究已证明, 姜黄素具有预防肝纤维化作用<sup>[1,2]</sup>, 本研究进一步探讨姜黄素预防大鼠肝纤维化作用可能的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物和材料** ①实验动物: 雄性清洁级SD大鼠72只, 购自南方医科大学动物研究所,

通讯作者: 舒建昌 Email: shujc62@hotmail.com

体重 120 ~ 160 g; ②材料: 四氯化碳为天津市北宏试剂厂产品; 姜黄素为上海三爱思试剂有限公司产品; 羧甲基纤维素钠为广州器化医疗设备有限公司进口分装产品; 秋水仙碱为昆明制药集团股份有限公司产品。即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒、兔抗鼠 CTGF、TIMP-1 多克隆抗体为武汉博士德公司产品; 兔抗鼠 NF- $\kappa$ B 多克隆抗体为美国 NeoMark 公司产品。

## 1.2 方法

1.2.1 分组及处理 72 只 SD 大鼠, 适应饲养 1 周后, 随机分为 6 组。A 组 (正常对照组): 正常饲养, 不作任何处理; B 组 (肝纤维化模型组): 给予四氯化碳 0.025 ml (与花生油以 1 : 6 混合) 腹腔注射, 3 次/周, 共 8 周制作肝纤维化模型, 制模同时按照 1 ml/100 g 体重给予 0.5% 羧甲基纤维素钠灌胃液灌胃, 3 次/周, 共 8 周; C 组 (高剂量姜黄素组)、D 组 (中剂量姜黄素组)、E 组 (低剂量姜黄素组): 同前方法制模, 同时按每 100 g 体重分别给予 20 mg、10 mg、5 mg 姜黄素与 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液 1 ml/100 g 灌胃, 3 次/周, 共 8 周; F 组 (阴性对照组): 制模同时按每 100 g 体重给予秋水仙碱 0.01 mg 灌胃, 5 次/周, 共 8 周。

1.2.2 取材 8 周后处死大鼠, 留取全血并分离血清; 取部分新鲜肝脏组织于液氮冻存, 另取肝组织置于 10% 中性甲醛溶液中至少 24 小时。

1.2.3 免疫组织化学染色 取定的肝脏组织包埋制作蜡块, 常规切片, 脱腊入水, 3%  $H_2O_2$  室温孵育 10 分钟, 以灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗 3 分钟  $\times$  3 次, 将切片于 0.01 mmol/L 柠檬酸缓冲液中微波煮沸修复 10 分钟, 常温冷却, PBS 洗 3 分钟  $\times$  2 次, 加 5% 小牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液室温封闭 20 分钟, 甩去多余液体, 直接加兔抗鼠多克隆抗体 (CTGF、TIMP-1、NF- $\kappa$ B, 稀释度 1:100) 50  $\mu$ l, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 4℃ 冰箱过夜, PBS 洗 3 分钟  $\times$  3 次, 滴加生物素化羊抗鼠 IgG, 于 37℃ 温箱中孵育 20 分钟, 同上洗涤, 滴加 SABC 试剂室温孵育 20 分钟, PBS 洗 5 分钟  $\times$  4 次, 新鲜配置的 DAB 显色, 显微镜下控制反应时间, 终止反应, 蒸馏水洗, 苏木素复染, 盐

酸酒精分化, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察结果。

结果判定: 组织中出现棕色或黄色的部位为阳性表达部位。在高倍镜 (200 $\times$ ) 下, 每张切片随机选择 10 个视野, 采用 Leica Qwin 专业显微彩色图像分析软件计算每个视野下阳性部位面积, 取其均值为该张切片的阳性表达面积。

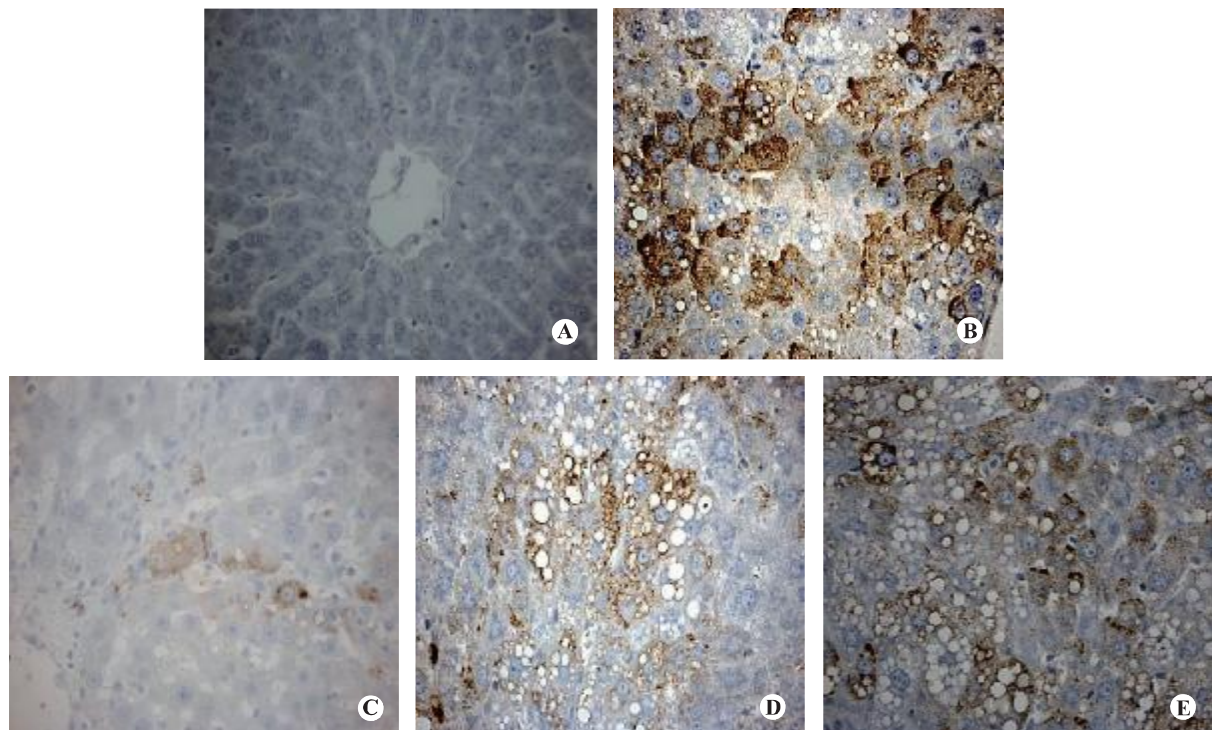
1.2.4 统计分析 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 取  $P < 0.05$  为显著性检验水准。

## 2 结果

2.1 肝组织 CTGF 表达 阴性对照未见阳性表达, 正常组仅见少量肝细胞表达, 其余各组均可见表达, 位于变性的肝细胞及其周围肝窦壁、纤维间隔和汇管区。其中, 模型组大量表达; 高剂量姜黄素组仅少量表达, 与模型组比较, 差异具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 中剂量姜黄素组和阴性组 CTGF 表达较模型组减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 低剂量姜黄素组表达较模型组减少, 但差异无统计学意义 (图 1)。各组图像分析结果见表 1。

2.2 肝组织 TIMP-1 表达 阴性对照未见阳性表达; 正常组仅见汇管区极少量表达; 模型组可见纤维间隔和汇管区大量表达; 高剂量姜黄素组仅见汇管区少量表达, 与模型组比较, 差异具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 中剂量姜黄素组和阴性组可见纤维间隔和汇管区表达, 较模型组减少, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 低剂量姜黄素组可见纤维间隔和汇管区表达明显, 较模型组减少, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。各组图像分析结果见表 1。

2.3 肝组织 NF- $\kappa$ B 表达 阴性对照未见阳性表达; 正常组仅见汇管区极少量表达; 模型组可见纤维间隔和汇管区大量表达; 高剂量姜黄素组仅见汇管区少量表达, 与模型组比较, 差异具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 中、低剂量姜黄素组和阴性组可见纤维间隔和汇管区表达明显, 较模型组减少, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。各组图像分析结果见表 1。



■ 1 CTGF免疫组织化学染色 (SABC法, 400 ×)

A: 阴性表达很少; B: 大量肝细胞表达; C: 少量肝细胞及其周围窦壁表达;  
D: 肝细胞及其周围窦壁表达较模型组减少; E: 大量肝细胞及其周围窦壁表达较模型组减少

表 1 免疫组织化学图像分析面积百分比 (%)

分组	CTGF	TIMP-1	NF-κB
A	4.01 ± 3.08 <sup>△</sup>	1.16 ± 0.43	1.34 ± 0.33 <sup>△</sup>
B	30.94 ± 3.19	11.56 ± 1.80	13.95 ± 2.36
C	12.00 ± 1.50 <sup>△</sup>	5.33 ± 0.60 <sup>△</sup>	7.16 ± 2.35 <sup>△</sup>
D	20.83 ± 2.98 <sup>*</sup>	7.75 ± 1.63 <sup>*</sup>	11.27 ± 3.21
E	27.51 ± 1.60	10.30 ± 1.95	12.77 ± 3.07
F	23.33 ± 4.13 <sup>*</sup>	9.37 ± 1.92 <sup>*</sup>	11.73 ± 2.02

注: \*与肝纤维化模型组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>△</sup>与肝纤维化模型组比较,  $P < 0.01$

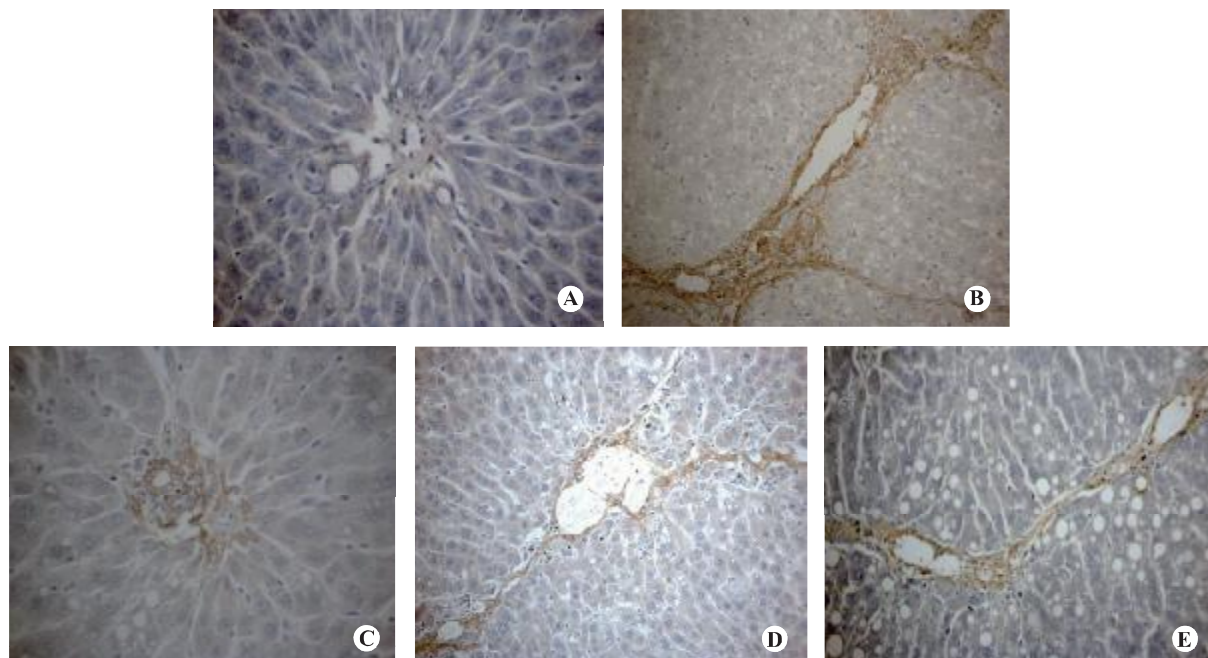
### 3 讨论

肝纤维化是慢性肝病共同病理学基础, 虽然不同肝病的致病机理不完全相同, 但发生的最终共同途径是 HSC 的激活, 转化为肌成纤维细胞。目前认为, HSC 的活化和增殖是肝纤维化发生发展的中心环节。细胞因子作为活化 HSC 的产物, 又反馈调节 HSC 活化, 在肝纤维化的进一步发展发挥重要作用。

CTGF 是一种新发现的致肝纤维化因子, 不

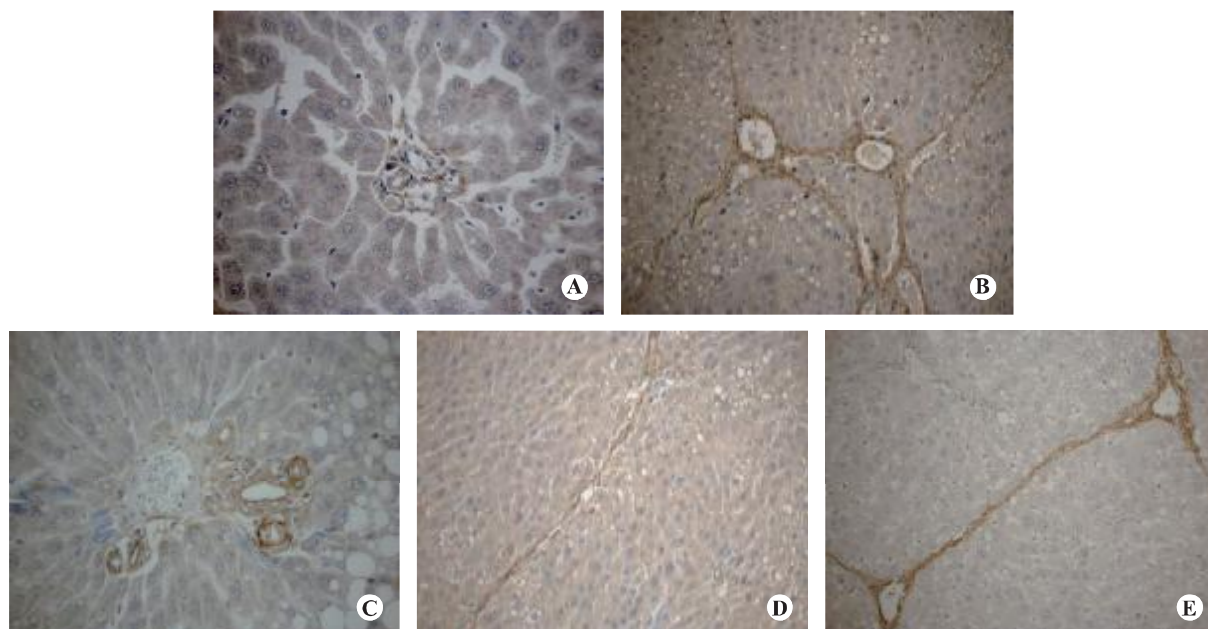
仅可促进 HSC 的活化、转化、增殖及迁移, 还可促进 ECM 基质的表达。而 CTGF 与 TGF- $\beta_1$  密切相关: TGF- $\beta_1$  能强烈诱导 CTGF 的表达<sup>[3]</sup>; 在刺激间质细胞增生和 ECM 合成方面, CTGF 表现出与 TGF- $\beta_1$  相似的生物学功能; 最近发现在 CTGF 基因启动子序列存在着 TGF- $\beta_1$  顺式调控元件, 位于启动子序列的 -162 bp 和 -128 bp 之间<sup>[4]</sup>, 这个反应元件是 TGF- $\beta_1$  诱导 CTGF 不可缺乏的要素, 它的任何一点突变都会导致 TGF- $\beta_1$  诱导功能





■ 2 TIMP-1免疫组织化学染色 (SABC法)

A: 汇管区极少量表达 (400×); B: 纤维间隔大量表达 (200×); C: 汇管区少量表达 (400×);  
D: 纤维间隔表达较模型组减少 (200×); E: 纤维间隔表达明显较模型组减少 (200×)



■ 3 NF-κB免疫组织化学染色 (SABC法)

A: 汇管区极少量表达 (400×); B: 纤维间隔大量表达 (200×); C: 汇管区少量表达 (400×);  
D: 纤维间隔表达较模型组减少 (200×); E: 纤维间隔表达明显, 较模型组减少 (200×)

的完全丧失。故 CTGF 被认为是针对 TGF- $\beta_1$  的某些生物学活性的下游效应介质。

TGF- $\beta_1$  是一种多功能的细胞因子,除对纤维化的影响外,该细胞因子还有很强的抗炎、免疫和肿瘤抑制作用,因此完全阻断其表达可能有很多难以预料不良后果,有报道称缺乏 TGF- $\beta_1$  基因的小鼠可出现致死性的严重感染<sup>[5]</sup>。故长期应用其抑制剂治疗肝纤维化的安全性值得进一步研究。CTGF 作为 TGF- $\beta_1$  的下游介质,作用相对单一,只介导 TGF- $\beta_1$  部分生物学效应如促进组织和器官纤维化等。因此,针对 CTGF 的抗肝纤维化治疗可抑制 TGF- $\beta_1$  所致肝纤维化的发生发展,而不会影响其抗炎、免疫和肿瘤抑制功能,从而使 CTGF 成为防治肝纤维化的一个新的治疗靶标。本研究发现:肝纤维化大鼠肝脏中 CTGF 在肝细胞、窦旁细胞、纤维间隔中大量表达,给予不同剂量姜黄素预防,CTGF 表达较肝纤维化组明显减少,说明姜黄素能明显抑制 CTGF 表达而发挥预防肝纤维化作用。

用四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )致肝脏慢性损伤后,MMP mRNA 在整个实验过程中始终保持恒定,与对照组之间并无显著性差异,而 TIMP-1 mRNA 表达一直明显高于正常<sup>[6]</sup>,这个研究结果说明:在肝纤维化的形成过程中,起关键作用的并非 MMPs 表达减少,而是由于 TIMPs 表达增加。因此,TIMPs 在肝纤维化的发生发展中发挥重要作用。各国学者一致认为:肝纤维化过程中,目前发现的 4 种 TIMPs,仅 TIMP-1、TIMP-2 在肝中表达,而以 TIMP-1 升高最明显。针对 TIMP-1 的治疗,可以改善肝纤维化。Duburisson 等实验表明去甲肾上腺素拮抗剂 O-HAD 及哌唑嗪可显著降低 TIMP-1 mRNA 的表达水平,明显减轻肝纤维化程度。Liu 等<sup>[8]</sup>证实枳椇提取物抗肝纤维化作用与其抑制 TIMP-1 mRNA 的表达有关。利用反义技术抑制 TIMP-1 基因表达,也可明显促进 ECM 降解,减轻大鼠肝纤维化程度<sup>[9-11]</sup>。本实验证实:肝纤维化大鼠肝脏中 TIMP-1 在纤维间隔、窦旁细胞中大量表达,给予不同剂量姜黄素预防,TIMP-1 表达较肝纤维化组明显减少。以上说明姜

黄素能明显抑制 TIMP-1 表达,促进 ECM 降解,而发挥预防肝纤维化作用。

NF- $\kappa\text{B}$  是一个多向性核转录调节因子,可调节细胞因子、趋化因子、黏附分子、生长因子、免疫受体、氧化应激相关酶、转录因子、急性时相蛋白等基因的表达,功能涉及许多相应的生理病理过程。近年来,众多研究发现 NF- $\kappa\text{B}$  有抗凋亡作用:一些凋亡刺激可以使 NF- $\kappa\text{B}$  活化<sup>[12]</sup>;缺失 NF- $\kappa\text{B}$  p65 基因的胚胎期小鼠死于大面积肝细胞凋亡<sup>[13]</sup>;活化的 NF- $\kappa\text{B}$  阻断了 TNF- $\alpha$  介导的细胞凋亡效应<sup>[14]</sup>;Wang 等在既往研究的基础上,将 I $\kappa\text{B}\alpha$  的第 32、36 位的丝氨酸突变成丙氨酸而形成超抑制物,从而抑制了 I $\kappa\text{B}\alpha$  的磷酸化和降解。这种超抑制物与 NF- $\kappa\text{B}$  结合后抑制了其核易位,结果使凋亡细胞数量增加。在上述突变型 I $\kappa\text{B}\alpha$  细胞系中重新导入正常的 NF- $\kappa\text{B}$  的 p50 和 p65/RelA 亚基,凋亡细胞数明显减少<sup>[15]</sup>。Murat 等实验证实,NF- $\kappa\text{B}$  可直接上调凋亡抑制因子-1(IAP-1)、BCL-2、护骨素等抗凋亡基因的表达而发挥抗凋亡作用<sup>[16]</sup>。因此,在慢性肝病过程中,各种炎症因子促使 HSCs 活化后,同时维持 HSC 内的 NF- $\kappa\text{B}$  的持续激活,促进 NF- $\kappa\text{B}$  易位入细胞核与相应的靶基因  $\kappa\text{B}$  基序“GGGRNYYCC”结合,进而上调上述抗凋亡基因的表达,从而抑制 HSC 凋亡,使其数量维持在一定水平,最终导致胶原合成的增加而发展为纤维化。本研究发现:肝纤维化大鼠肝脏中 NF- $\kappa\text{B}$  在纤维间隔、汇管区中大量表达,给予姜黄素处理,NF- $\kappa\text{B}$  表达较肝纤维化组明显减少。通过抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的激活所导致的抗凋亡作用,进而促进 HSC 凋亡,可能是姜黄素预防肝纤维化作用的机制之一。

姜黄素为中药姜黄的提取物,毒副作用小,长期使用没有明显的肝肾毒性<sup>[17]</sup>,因此具有良好的临床应用前景。本研究证实姜黄素能够抑制 CTGF、TIMP-1、NF- $\kappa\text{B}$  的表达而发挥预防肝纤维化的作用,为临床应用姜黄素抗肝纤维化治疗进行了有益的探索。

#### 参考文献

- [1] 何雅军,舒建昌,吕霞,等.姜黄素预防肝纤维化作用与肝星

- 状细胞关系的观察[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14: 337-340.
- [2] 舒建昌, 何雅军, 曹霞, 等. 姜黄素预防大鼠肝纤维化效果的观察[J]. 中药材, 2006, 29: 1347-1348.
- [3] Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, et al. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells [J]. Lab invest, 2002, 82: 767-774.
- [4] Grotendorst GR, Lau LF, Perbal B. CCN proteins are distinct from and Should not be considered members of the insulin-like growth factor-binding protein superfamily [J]. Endocrinology, 2000, 141: 2254-2256.
- [5] Bedossa P, Paradis V. Transforming growth factor-beta(TGF-beta): a key role in liver fibrogenesis [J]. J Hepatol, 1995, 22(Suppl 2): 37-42.
- [6] Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis [J]. Hepatology, 1996, 24: 176-184.
- [7] Jia JD, Bauer M, Cho JJ, et al. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha(1) and TIMP-1 [J]. J Hepatol, 2001, 35: 392-398.
- [8] 刘秀玲, 张洪, 王飞. 槲寄生提取物对实验大鼠肝组织TIMP-1与MMP-13表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31: 1097-1100.
- [9] Hironaka K, Sakaida I, Matsumura Y, et al. Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig-serum-induced rat liver fibrosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 267: 290-295.
- [10] 聂青和, 周永兴, 谢玉梅, 等. 硫代反义寡核苷酸对实验性肝纤维化大鼠TIMP-1基因及蛋白表达的抑制作用[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19: 208-211.
- [11] 杨长青, 胡国龄, 谭德明, 等. 基质金属蛋白酶-1、反义金属蛋白酶组织抑制因子-1表达质粒对大鼠肝纤维化的影响[J]. 中华传染病杂志, 2000, 18: 29-32.
- [12] Kang KH, Lee KH, Kim MY, et al. Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis [J]. Methods Enzymol, 2001, 333: 73-87.
- [13] Beg AA, Sha WC, Bronson RT, et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B [J]. Nature, 1995, 376: 167-170.
- [14] Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, et al. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells [J]. J Hepatol, 2000, 33: 49-58.
- [15] Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS. TNF and cancer therapy induce apoptosis: potentiation by inhibition of NF Kappa B [J]. Science, 1996, 274: 784-787.
- [16] Toruner M, Fernandez-Zapico M, Sha JJ, et al. Antiankist effect of nuclear factor-kappaB through up-regulated expression of osteoprotegerin, BCL-2, and IAP-1 [J]. J Biol Chem, 2006, 281: 8686-8696.
- [17] 沃兴德, 洪行球, 高承贤, 等. 姜黄素长期毒性试验[J]. 浙江医学院学报, 2000, 24: 61-65.

收稿日期: 2007-07-31

## • 消息 •

## 《现代肝炎病毒分子生物学》第二版即将出版

■北京地坛医院副院长、内科传染病学专业博士生导师、生物化学与分子生物学专业博士生导师成军教授主编、全■63位专家参与编写的《现代肝炎病毒分子生物学》第二版即将于2008年下半年出版, 科学出版社的编辑对本专著的内容有很高的评价。《现代肝炎病毒分子生物学》第二版全书约120万字, 是在1997年第一版的基础上重新修订, 增添了新的章节, 体现了近十年来■内外在肝炎病毒分子生物学研究领域的最新进展, 特别是成军教授课题组在过去十年间, 在肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学研究领域的最新研究成果和独到见解。《现代肝炎病毒分子生物学》第二版的出版, 必将进一步推动病毒性肝炎的研究和学术水平的进步。敬请予以关注。

《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》编辑部

地址: 北京市朝阳区京顺东街8号, 100015

网址: [www.j-ditan.org.cn](http://www.j-ditan.org.cn)Email: [editor.ditan@gmail.com](mailto:editor.ditan@gmail.com)

电话: 010-8432 2058

传真: 010-8432 2059