

· 论 著 ·

姜黄素对肝星状细胞 MyD88 蛋白表达 及细胞凋亡的影响

宋慧东, 叶国荣, 罗国彪, 欧阳鹏, 舒建昌

暨南大学医学院附属广州红十字会医院消化内科, 广东 广州 510220

摘要: **目的** 观察姜黄素干预对肝星状细胞(HSC)中髓样分化因子 88(MyD88)蛋白表达及 HSC 凋亡的影响。**方法** 将常规传代培养的 HSC 分为对照组、MyD88 高表达组、MyD88 阻断剂组和姜黄素组。MyD88 高表达组将构建的重组原核表达质粒 pET-32a-pMyD88 转染至 HSC; 转染 72 h 后, MyD88 阻断剂组加入氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂继续作用 24 h, 姜黄素组加入姜黄素继续作用 24 h。收集各组细胞, 采用流式细胞术检测 MyD88 蛋白的相对表达量[以荧光指数(FI)表示], 采用 CCK-8 法检测各组细胞凋亡率。**结果** 流式细胞术结果显示, MyD88 表达水平(FI 值)在对照组、MyD88 高表达组、MyD88 阻断剂组和姜黄素组间比较差异有统计学意义(6.10 ± 0.37 , 14.10 ± 0.23 , 7.50 ± 0.65 , 8.60 ± 0.53 , $P < 0.05$), 其中 MyD88 高表达组、MyD88 阻断剂组和姜黄素组相对表达量明显高于对照组, MyD88 阻断剂组和姜黄素组的相对表达量低于 MyD88 高表达组。CCK-8 法结果显示, 对照组、MyD88 高表达组、MyD88 阻断剂组、姜黄素组细胞凋亡率组间比较差异有统计学意义[(23.6 ± 1.3)%, (56.8 ± 2.9)%, (33.4 ± 1.1)%, (35.8 ± 2.2)%, $P < 0.01$], 其中 MyD88 高表达组、MyD88 阻断剂组和姜黄素组 HSC 细胞的凋亡率明显高于对照组, MyD88 阻断剂组和姜黄素组的 HSC 细胞的凋亡率低于 MyD88 高表达组。**结论** 姜黄素和氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂均可显著下调 HSC 细胞 MyD88 蛋白表达, 并降低 HSC 细胞的凋亡率。

关键词: 髓样分化因子 88; 姜黄素; 人肝星状细胞; 氨基噻唑类; 髓样分化因子 88 特异性抑制剂; 流式细胞术; CCK-8

中图分类号: R 57 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)09-1171-04

Effect of curcumin on expression of MyD88 protein in hepatic stellate cell and cell apoptosis

SONG Hui-dong, YE Guo-yong, LUO Guo-biao, OU Yang-peng, SHU Jian-chang

Department of Gastroenterology, Guangzhou Red Cross Hospital Affiliated to Medical College
of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510220, China

Abstract: Objective To observe the effects of curcumin intervention on myeloid differentiation-88 (MyD88) protein expression in hepatic stellate cells (HSCs) and HSCs apoptosis. **Methods** HSCs were divided into four groups after conventional subculture: control group, MyD88 high-expression group, MyD88 blocker group, and curcumin group. In MyD88 high-expression group, the constructed recombinant prokaryotic expression plasmid pET-32a-pMyD88 were transfected to HSCs for 72 hours, then the HSCs were continuously treated by aminothiazoles (a specific inhibitor of MyD88) for 24 hours in MyD88 blocker group, and the HSCs were continuously treated by curcumin for 24 hours in curcumin group. After collecting the cells, flow cytometry was used to detect MyD88 protein relative expression quantity (fluorescence index, FI); cell counting kit-8 (CCK-8) was used to observe the cell apoptosis. **Results** Flow cytometry results showed that there was significant difference in MyD88 protein expression level (FI value) in control group, MyD88 high-expression group, MyD88 blocker group, and curcumin group (6.10 ± 0.37 , 14.10 ± 0.23 , 7.50 ± 0.65 , 8.60 ± 0.53 , $P < 0.05$). MyD88 protein relative expression quantity in MyD88 high-expression group, MyD88 blocker group, and curcumin group were significantly higher than that in control group and were lower in MyD88 blocker group and curcumin group than that in MyD88 high-expression group. CCK-8 results showed that there was significant difference in the apoptosis rates of HSCs in control group, MyD88 high-expression group, MyD88 blocker group and curcumin group [(23.6 ± 1.3)%, (56.8 ± 2.9)%, (33.4 ± 1.1)%, (35.8 ± 2.2)%, $P < 0.01$]. The apoptosis rates of HSCs in MyD88 high-expression group, MyD88 blocker group and

curcumin group increased compared with control group and decreased in MyD88 blocker group and curcumin group compared with MyD88 high-expression group. **Conclusion** Both curcumin and aminothiazoles (MyD88 specific inhibitor) can significantly down-regulate expression of MyD88 protein in HSCs and decrease the apoptosis of HSCs.

Key words: Myeloid differentiation-88; Curcumin; Human hepatic stellate cells; Aminothiazoles; Myeloid differentiation-88 specific inhibitor; Flow cytometry; Cell counting kit-8

肝纤维化是肝脏对一系列慢性损伤刺激的自我修复反应,主要以细胞外基质的过度沉积为特征。已有研究证明肝纤维化形成的中心环节是人肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的增殖与活化^[1]。了解肝纤维化的机制是控制肝纤维化进展及逆转肝纤维化的关键。有研究表明,姜黄素可干扰 QGY 细胞的周期分布,具有细胞毒作用、抗增殖、诱导细胞凋亡的作用^[2]。目前,临床应用的热点之一是从 HSC 激活途径中寻找作用靶点。有研究表明,促进 HSC 凋亡,抑制其 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ [Collagen $\alpha 1$ (I)] 的表达是姜黄素抗肝纤维化的部分机制^[3]。同时, HSC 活化是多条信号通路共同作用的结果^[4]。目前,髓样分化因子 88 (MyD88) 依赖性途径在临床上的意义还需要进一步观察, HSC 中髓样分化因子 (MyD88) 蛋白是 MyD88 依赖性信号通路中一个关键蛋白。本文探讨姜黄素通过下调 MyD88 表达诱导 HSC 凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞株:人 HSC 购于上海拜力生物有限公司。主要试剂:姜黄素(美国 Sigma 公司);载体 pET-32a(索莱宝生物有限公司); lipofectamine2000 转染试剂盒(Invitrogen); CCK-8(日本同仁化学研究所);髓样分化蛋白抗体(Thermo); TRIzol(森贝伽); FBS(美国 Gibco 公司); PCR 试剂盒; DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); PBS 粉末、DMSO、胰蛋白酶(碧云天技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人 HSC 生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 5% CO₂, 37 °C 培养箱内孵育。当生长密度达到 90% 时开始进行细胞传代。

1.2.2 RT-PCR 设计 MyD88 引物序列如下:正义链:5'-CCT TTA TCT GCT ACT GCC CCA ACG A-3'; 反义链:5'-GTG ATG AAC CGC AGG ATA CTG GGA AA-3'。参照 PCR 试剂盒说明书,获取 PCR 产物,进行琼脂糖凝胶电泳。用凝胶成像分析系统(GENE-GENIUS)摄像分析,采集图像并保存。

1.2.3 MyD88 重组质粒的构建 使用 TRIzol 裂解细胞并提取 RNA(按 TRIzol 说明书操作),采用上述

引物两步法 RT-PCR 扩增 MyD88 片段,定向连接到载体质粒,筛选后提取重组原核表达质粒 pET-32a-pMyD88,测序检查,进行双酶切鉴定及送交测序。

1.2.4 转染 HSC 常规传代培养,取生长状态良好的细胞用 lipofectamine2000 转染试剂,按照操作说明书构建 pET-32a-pMyD88 重组质粒。实验分 4 组:(1)对照组;(2) MyD88 高表达组;(3) MyD88 阻断剂组;(4)姜黄素组。MyD88 高表达组将重组质粒转染给 HSC 细胞,转染 72 h 后, MyD88 阻断剂组继续加入氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂(10 μ mol/L)作用 24 h,姜黄素组继续加入姜黄素(50 μ mol/L)作用 24 h。收集各组细胞。

1.2.5 流式细胞术检测 MyD88 表达水平 采用间接免疫荧光标记法,取 1×10^6 个细胞/100 μ l,加入髓样分化蛋白抗体(Anti-MyD88)混匀,置室温下避光反应 30 min。用 PBS 洗涤细胞 2 次,离心弃上清。PBS 重悬细胞,按说明书要求加入 FITC 混匀,室温下反应 30 min。PBS 洗涤细胞 2 次,加入 500 μ l PBS 重悬成单细胞悬液,上机分析。使用 FACS420 型流式细胞仪(BD 公司),采用光源 488 nm 的氩离子激光, FITC 受激发后发出荧光。按照 Morkve 等提出的分析方法,以荧光指数(Fluorescence Index, FI)表示蛋白的相对表达量。

1.2.6 CCK-8 法检测不同处理组 HSC 细胞的凋亡率 取对数期生长的 HSC 细胞制成单细胞悬液,将 4 组细胞(对照组、MyD88 高表达组、MyD88 阻断剂组、姜黄素组)按每孔 5×10^3 接种于 96 孔板中,置于 37 °C,含 5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中 24 h 过夜孵育。待细胞贴壁生长融合至 80% 时,设置 4 个复孔。继续于 37 °C,含 5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中孵育 24 h。取出 96 孔板,加入 CCK-8 试剂(每孔 10 μ l),与孵箱中放置 2 h 后酶标仪 450 nm 波长下分别检测各组细胞的吸光度值(OD),计算凋亡率。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组数据间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 pET-32a-pMyD88 重组质粒的鉴定 将质粒

pET-32a-pMyD88 和回收的 MyD88 全长片段经双酶酶切,电泳检测酶切完全后进行相连、转化,得到的转化子经过菌落 PCR 验证筛选出阳性克隆。提取其质粒,测序结果证实 MyD88 已经成功克隆到 pET-32a 中,将此重组质粒命名为 pET-32a-pMyD88。

2.2 不同处理组 MyD88 表达水平比较 姜黄素和氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂可显著下调 HSC 细胞 MyD88 蛋白表达。MyD88 (FI 值)在对照组为 6.10 ± 0.37 , MyD88 高表达组为 14.10 ± 0.23 , MyD88 阻断剂组为 7.50 ± 0.65 , 姜黄素组为 8.60 ± 0.53 。MyD88 高表达组表达水平明显高于对照组, MyD88 阻断剂组、姜黄素组明显低于 MyD88 高表达组 (P 均 < 0.05)。组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 不同处理组 HSC 细胞的凋亡率比较 MyD88 高表达组凋亡率明显高于对照组, MyD88 阻断剂组和姜黄素组的凋亡率均低于 MyD88 高表达组,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。见表 1。

表 1 不同处理组 HSC 细胞的凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	凋亡率 (%)
对照组	1.62 ± 0.06	$23.6 \pm 1.3^*$
MyD88 高表达组	0.67 ± 0.04	56.8 ± 2.9
MyD88 阻断剂组	1.38 ± 0.03	$33.4 \pm 1.1^*$
姜黄素组	1.33 ± 0.07	$35.8 \pm 2.2^*$

注:与 MyD88 高表达组相比, $*P < 0.01$ 。

3 讨论

各种原因引起的肝衰竭病死率高达 70% ~ 80%。各种肝疾病中,肝细胞损伤可导致肝细胞凋亡,抑制细胞凋亡可达到保护肝细胞损伤的目的。慢性肝病的病理特征是肝纤维化,同时也是肝硬化形成的病理基础。随着肝组织的持续损伤,可能最终进展为肝癌。HSC 是参与肝纤维化发生发展的重要细胞^[4]。HSC 的活化是肝纤维化发生的中心环节^[5]。姜黄素是从姜科姜黄属植物姜黄、郁金、莪术的干燥根茎中提取的一种天然有效成分,药理作用广泛,毒性低,耐受性好,由于其特有的经济价值,已成为了开发热点^[6-7]。有研究表明,姜黄素在低浓度内能够呈浓度依赖性地降低 HSC 内氧化应激水平,抑制 HSC 活化进而减轻细胞纤维化^[8]。本研究选择了姜黄素进行研究,以期为进一步的临床应用提供实验参考。

Toll 样受体 (TLR)4 可通过以下两条途径来传导信号活化:MyD88 依赖性途径和 TRIF 依赖性途径,与肝脏的炎症损伤有关^[9]。MyD88 是 MyD88 依赖性信号通路中一个关键蛋白,在启动核因子 (NF)- κ B 依赖的信号级联反应中发挥重要的作用。TLR 识别

病原相关分子模式,TLR 与配体和 IL-1 作用后,使受体二聚化,与 MyD88 蛋白结合,激活下游丝/苏氨酸蛋白激酶,使蛋白激酶自身磷酸化,活化两条信号转导途径,c-Jun N 末端激酶和 p38 丝裂原蛋白激酶家族,进一步激活 NF- κ B,后者活化后转位进核,引起特定基因表达^[9-10]。HSC 能直接识别脂多糖及其他 TLR 配体,并促进纤维组织增生^[11-12]。MyD88 可阻断 MyD88 依赖性 NF- κ B 信号传导通路^[11]。已有研究表明,自身免疫性肝炎小鼠肝脏中 TLR4 和 MyD88 表达水平升高,通过 TLR4/MyD88 依赖性信号途径发挥作用,并可促进肝纤维化,在自身免疫性肝炎发生发展过程中发挥重要作用^[12-13]。经姜黄素作用的人 HSC 可出现明显的增殖受抑、细胞凋亡的形态学改变^[14-15]。姜黄素可有效升高纤维间隔中 Bax/Bcl-2 比值,并能抑制 HSC 活化增殖,诱导活化的 HSC 凋亡,具有治疗肝纤维化的作用,在一定有效剂量范围内,其抗肝纤维化作用强度与剂量无明显依赖性^[16]。故本实验选择 MyD88 作为研究靶点,以期明确 HSC 发生凋亡的具体机制。

本研究在细胞水平通过观察姜黄素下调人 HSC 后 MyD88 蛋白的表达以及降低细胞凋亡率分析 MyD88 依赖性途径与人 HSC 凋亡的关联。本实验将 HSC 给予不同刺激而分为对照组、MyD88 高表达组、MyD88 阻断剂组、姜黄素组。结果显示,姜黄素和氨基噻唑类 MyD88 阻断剂均可显著下调 HSC 细胞 MyD88 蛋白表达。MyD88 高表达组 MyD88 蛋白表达率明显高于对照组,且 MyD88 阻断剂组和姜黄素组的 MyD88 蛋白表达率明显低于 MyD88 高表达组。说明姜黄素与氨基噻唑类 MyD88 阻断剂有类似的作用,可特异性降低 MyD88 蛋白的表达。CCK-8 实验结果显示,MyD88 高表达组 HSC 凋亡率明显高于对照组,MyD88 阻断剂组和姜黄素组的 HSC 凋亡率低于 MyD88 高表达组。说明姜黄素和 MyD88 特异性阻断剂可通过干预 MyD88 表达从而降低细胞凋亡率,具有良好的临床应用前景。

参考文献

- [1] Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells; unique characteristics in cell biology and phenotype [J]. Cell Structure & Function, 2003, 28(2): 105-112.
- [2] 厉红元, 车艺, 汤为学. 姜黄素对人肝癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2002, 10(6): 449-451.
- [3] 舒建昌, 朱海燕, 吴海恩, 等. 姜黄素对人肝星状细胞形态学的影响 [J]. 郑州大学学报 (医学版), 2009, 44(6): 1141-1143.

- 国急救医学, 2002, 22(6): 365-366.
- [8] 许国根, 陈澜, 陈雯, 等. 心肺复苏病人脑缺血-再灌注损伤后炎性细胞因子的监测及其意义[J]. 中国急救医学, 2001, 21(7): 385-386.
- [9] Søreide K. The role of high-mobility group box-1 (HMGB-1) in the management of suspected acute appendicitis: useful diagnostic biomarker or just another blind alley [J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2011, 19: 28.
- [10] 邵伯云. 重症肺炎并发 ARDS 患者血清高迁移率族蛋白 B1 水平及其与病情严重程度的关系[J]. 中国临床研究, 2015, 28(2): 167-169.
- [11] Mersmann J, Iskandar F, Latsch K, et al. Attenuation of myocardial injury by HMGB1 blockade during ischemia/reperfusion is toll-like receptor 2-dependent [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 174168.
- [12] Oda Y, Tsuruta R, Fujita M, et al. Prediction of the neurological outcome with intrathecal high mobility group box 1 and S100B in cardiac arrest victims: a pilot study [J]. Resuscitation, 2012, 83(8): 1006-1012.
- [13] Huo TT, Zeng Y, Liu XN, et al. Hydrogen-rich saline improves survival and neurological outcome after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in rats [J]. Anesth Analg, 2014, 119(2): 368-380.
- [14] Abdulhad DA, Westra J, Bijzet J, et al. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(3): 1-9.
- [15] Kohno T, Anzai T, Naito K, et al. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodeling [J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3): 565-573.
- [16] Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H, Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(3): 1-10.
- 收稿日期: 2016-04-15 修回日期: 2016-06-07 编辑: 周永彬

(上接第 1173 页)

- [4] 秦桢楠, 钟耀刚, 李铮. 人肝星状细胞激活和抑制及其相关分子机制的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(10): 1127.
- [5] 杨悦杰, 黄芬. 肝星状细胞及相关细胞因子在肝纤维化形成中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(27): 2885-2890
- [6] Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis [J]. Frontiers in Bioscience, 2002, 7(1): d808-d826.
- [7] 梁若筋, 蒋学禄, 姚庆华, 等. 姜黄素逆转 P-gp 介导卵巢癌多药耐药机制的研究 [J]. 中华全科医学, 2014, 12(6): 932-934.
- [8] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 18-附 20.
- [9] 郑媛媛, 刘震雄, 赵曙光, 等. 姜黄素对氧化应激中肝星状细胞活化及细胞外基质分泌的影响 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(4): 309-312.
- [10] Kawai T, Akira S. TLR signaling [J]. Cell Death & Differentiation, 2006, 13(5): 816-825.
- [11] 李雅娟, 鲁凤民, 庄辉. 髓样分化蛋白 88 在炎症感染相关原发性肝癌发生中的作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 232-234.
- [12] Seki E, Brenner DA, Schwabe RF. Toll-like receptor signaling in the liver [J]. Gastroenterology, 2006, 130(6): 1886-1900.
- [13] 贾媛媛, 高晓唯, 田艳明, 等. MyD88 依赖性 NF- κ B 信号途径改变对家兔 PVR 模型玻璃体内 TNF- α 变化的影响 [J]. 眼科新进展, 2010, 30(10): 933-936.
- [14] 艾国, 肖芳, 范翔雪, 等. TLR4/MyD88 在实验性自身免疫性肝炎小鼠中的表达和意义 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(8): 800-803.
- [15] 何航, 沈晓君, 华海婴. 姜黄素对人肝星状细胞 LX-2 凋亡及 Collagen $\alpha 1(I)$ mRNA 表达的影响 [J]. 中药材, 2009, 32(12): 1880-1882.
- [16] 王礼凤, 刘莉君, 孙守才, 等. 姜黄素对肝纤维化大鼠肝组织 Bcl-2 及 Bax 表达的影响 [J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(4): 224-225.
- 收稿日期: 2016-04-03 修回日期: 2016-05-16 编辑: 王国品