

姜黄素诱导 Nrf2 核转位对脂多糖引起库普弗细胞分泌炎症细胞因子的影响 *

赵曙光 李 强 王景杰 王旭霞 刘震雄 闻勤生[△]

(第四军医大学唐都医院消化内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究姜黄素诱导大鼠 Kupffer 细胞 Nrf2 核转位对脂多糖(LPS)引起的炎症细胞因子分泌的影响。方法:分别用 10 μ M、20 μ M 和 30 μ M 干预 Kupffer 细胞 8 h,诱导 Nrf2 核转位水平,将 Kupffer 细胞随机分为对照组、LPS 组和干预组,对照组正常培养未加姜黄素和 LPS,LPS 组用 10 μ g/mL 的 LPS 加入 Kupffer 细胞培养液共同培养 2 h;干预组用 30 μ M 姜黄素干预 8h 后,余处理同 LPS 组。Western blot 检测 Nrf2 核转位水平,分光光度法检测细胞 MDA、GSH 水平,ELISA 法检测上清液 TNF- α 和 IL-6,放免法检测 IL-1 β 。结果:①姜黄素诱导 Kupffer 细胞 Nrf2 核转位,核转位水平随浓度增加而增高。②LPS 组 MDA 水平较对照组显著升高($P<0.01$),干预组 MDA 水平较 LPS 组显著降低($P<0.01$),仍显著高于对照组($P<0.01$)。LPS 组 GSH 水平较对照组显著降低($P<0.01$),干预组 GSH 水平较 LPS 组显著升高($P<0.01$),仍显著低于对照组($P<0.01$)。③LPS 组上清液 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 显著高于对照组($P<0.01$),干预组均显著低于模型组($P<0.01$),但显著高于对照组($P<0.01$)。结论:姜黄素通过诱导 Kupffer 细胞 Nrf2 核转位,降低 LPS 诱导的氧化应激损伤,抑制 Kupffer 细胞分泌炎症细胞因子。

关键词 Nrf2;内毒素;Kupffer 细胞;氧化应激;细胞因子

中图分类号:Q95-3 R575 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)17-3204-04

The Effect of Nrf2 Nuclear Translocation Induced by Curcumin on Lipopolysaccharide Mediated Inflammatory Cytokine Expression in Rat Kupffer Cells*

ZHAO Shu-guang, LI Qiang, WANG Jing-jie, WANG Xu-xia, LIU Zhen-xiong, WEN Qin-sheng[△]

(Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, 710038, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) translocation induced by curcumin on lipopolysaccharide (LPS) mediated inflammatory cytokine expression in rat Kupffer cells. **Methods:** Kupffer cells were incubated in culture with 10 μ M, 20 μ M and 30 μ M curcumin for 8 h to induce Nrf2 nuclear translocation. Kupffer cell was divided into control group, LPS and curcumin group. Cells in control group were incubated in culture only with RPMI 1640, cells in LPS group were treated with 10 μ g/mL LPS for 2 h, cells in curcumin group were treated with 30 μ M curcumin for 8 h and subsequently treated with 10 μ g/mL LPS for 2 h. The Nrf2 in nuclear and cytosolic fraction was assayed by western blot analysis. The levels of MDA and GSH were measured by spectrophotometric method. The levels of TNF- α and IL-6 in culture medium were detected by the ELISA method, and the level of IL-1 β was measured by radioimmunoassay. **Results:** ①The levels of Nrf2 in the nucleus increased markedly in Kupffer cells treated by different concentrations of curcumin compared with that of the cells in control group, and the level of nuclear Nrf2 increased with the concentration of curcumin. ②The level of MDA increased significantly in LPS group compared with that in the control group ($P<0.01$), which was significantly abrogated in curcumin group ($P<0.01$). Compared with that of the control group, the level of GSH decreased significantly in model group($P<0.01$), the decreased GSH level in LPS group significantly abrogated in curcumin group ($P<0.01$). ③The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in culture medium increased significantly in LPS group compared with that in control group($P<0.01$), the increased level was significantly abrogated in curcumin group ($P<0.01$). **Conclusion:** Curcumin can induce Nrf2 nuclear translocation in cultured Kupffer cells and decrease intercellular ROS, subsequently inhibit LPS-mediated inflammatory cytokine expression.

Key words: Curcumin; Nrf2; Kupffer cell; Oxidative stress; Inflammatory cytokine

Chinese Library Classification: Q95-3, R575 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3204-04

前言

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是 G⁻ 杆菌细胞壁的重要成分,通过活化 Kupffer 细胞,合成释放炎症因子及生物活性物

* 基金项目 陕西省中医药管理局中医药科研课题(2009jc53)

作者简介 赵曙光(1971-)男,博士,主治医师,主要研究方向:非酒精性脂肪性肝病的基础及临床研究,

E-mail: zsg1203@yahoo.com.cn

[△]通讯作者 闻勤生,电话:029-84777721, E-mail: qswen421@126.com

(收稿日期:2011-02-22 接受日期:2011-03-15)

质引起肝脏损伤。研究表明高脂饮食诱发代谢性内毒素血症, LPS 刺激 Kupffer 细胞分泌的炎症细胞因子是触发胰岛素抵抗和肥胖的初始环节^[1-4]。核转录因子 NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 是在转录水平调节细胞通过上调 II 相抗氧化酶和蛋白的表达而发挥对氧化应激的保护作用, 是细胞抗氧化反应的中枢调节者。姜黄素是一种天然的抗氧化物质, 已证实能上调多种细胞 Nrf2 核转位, 发挥抗炎、抗氧化、抗肿瘤作用^[5-8]。研究证实姜黄素能够抑制 LPS 诱导的 Kupffer 细胞分泌炎症因子^[9]。但是姜黄素能否上调 Kupffer 细胞 Nrf2 核转位及对 LPS 刺激 Kupffer 细胞分泌炎症因子的影响目前尚不清楚。本研究观察姜黄素对 Kupffer 细胞 Nrf2 核转位的影响及对 LPS 刺激 Kupffer 细胞氧化应激损伤及炎症因子分泌的影响, 以更好理解姜黄素的肝脏保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

雄性 SD 大鼠购自第四军医大学动物中心; LPS、姜黄素、胶原酶和胰蛋白酶购自 Sigma 公司; RPMI-1640 培养基和小牛血清购自 GIBCO 公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒购自北京普利莱生物技术有限公司; 兔抗 Nrf2 多克隆抗体购自美国 Abzoom 公司; 羊抗兔 IgG 抗体(二抗)购自北京博奥森公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 Kupffer 细胞分离、培养和纯度检测 大鼠肝脏 Kupffer 细胞的分离、纯化参照文献^[10]方法加以改进, 采用原位灌注、percoll 密度梯度离心的方法进行。最终分离得到的细胞沉淀, 用 RPMI-1640 培养液吹打重悬, 接种于培养瓶中, 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 30 min 后洗去未贴壁的细胞, 贴壁者为 Kupffer 细胞, 更换含 10% 小牛血清、双抗的 RPMI-1640 培养基继续培养。行台盼蓝染色, 细胞活存率 >90%。细胞计数后调整浓度为 1×10^6 个/mL, 接种于培养瓶内, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 30 min 后弃去未贴壁细胞, 行吞噬墨汁实验, 细胞纯度 >90%。

1.2.2 姜黄素对 kupffer 细胞 Nrf2 核转位的影响 将分离、纯化培养的 kupffer 细胞培养 48 h 后, 按 1×10^6 个/孔细胞接种至 24 孔细胞培养板上, 分为对照组和姜黄素组, 姜黄素组分为 10 μ M、20 μ M 和 30 μ M 亚组, 每组设立 4 个复孔。对照组: 普通 RPMI 1640 培养液加入生理盐水继续培养, 姜黄素组: 普通 RPMI 1640 培养液加入终浓度为 10 μ M、20 μ M 和 30 μ M 姜黄素培养 8 h, 收集培养细胞进行相关实验。

1.2.3 Kupffer 细胞实验分组 Kupffer 细胞培养 48 h 后, 按 1×10^6 个/孔细胞接种至 24 孔细胞培养板上, 分为对照组、LPS 组和姜黄素组, 每组设立 4 个复孔。对照组: 普通 RPMI 1640 培养液加入生理盐水继续培养; LPS 组: 普通 RPMI 1640 培养液培养, 加入终浓度为 10 μ g/mL 的 LPS 继续培养 2 h; 姜黄素组: RPMI 1640 培养液培养, 用终浓度为 30 μ M 培养 8 h, 再加入终浓度为 10 μ g/mL 的 LPS 继续培养 2 h。收集培养细胞和上清液, 进行相关实验。

1.2.4 Western-blot 检测 Nrf2 蛋白水平 按照核-胞浆蛋白提取

试剂盒说明, 提取不同处理组别 Kupffer 细胞的胞浆蛋白和核蛋白, Bradford 法蛋白定量。取 80 μ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 按湿转法将电泳产物转移到 PVDF 膜, 5% 的脱脂奶粉 4℃ 封闭 2 h, 滴加抗 Nrf2 一抗(1:50)4℃ 过夜, TBS/T 洗 3 次 (5 min/T), 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:500)室温下孵育 2 h, 15 ml TBS/T 洗 3 次 (5 min/T), TBS 洗膜 10 min, NBT / BCIP 显色, GelDoc 凝胶成像仪采集图像。

1.2.5 MDA 和 GSH 的检测 收集不同组别细胞培养液, 用硫代巴比妥酸法进行 MDA 检测, 在 532 nm 处读取吸光度值, 得出 MDA 水平。将各组细胞裂解后按说明书测定 GSH, 在 412 nm 处读取吸光度值, 得出 GSH 水平。

1.2.6 上清液 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 检测 不同组别 Kupffer 细胞处理 12 h 后, 收集细胞培养上清液, 严格按照试剂盒说明进行检测, ELISA 法检测 TNF- α 和 IL-6, 放免法检测 IL-1 β 。

1.3 统计学分析

各组所得计量数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS14.0 软件处理数据, 用完全随机设计资料的方差分析, 组间均数比较用 SNK-q 检验。P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 Kupffer 细胞 Nrf2 表达的影响

姜黄素刺激 Kupffer 细胞 8 h, Western-blot 检测显示不同浓度组别胞核 Nrf2 水平均较对照组均明显增加, 胞核 Nrf2 水平随浓度增高而增加(图 1)。各浓度组胞浆 Nrf2 水平无明显差别。

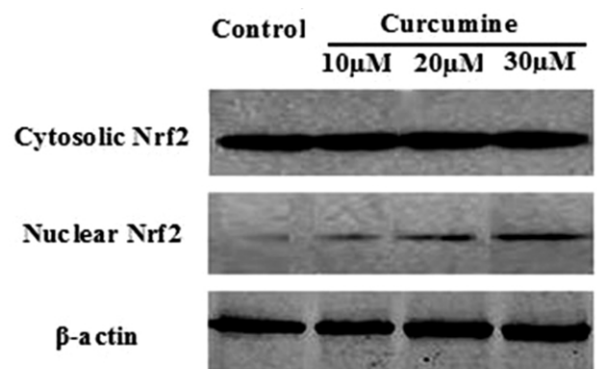


图 1 姜黄素对 Kupffer 细胞 Nrf2 表达水平的影响

Fig.1 Effect of curcumin on the level of Nrf2 in Kupffer cell

2.2 姜黄素对 LPS 刺激的 Kupffer 细胞氧化应激水平的影响

不同组别细胞处理后, LPS 组 MDA 水平较对照组显著升高(P<0.01), 姜黄素组显著低于 LPS 组(P<0.01), 仍显著高于对照组(P<0.01)。LPS 组细胞 GSH 水平较对照组显著降低(P<0.01), 姜黄素组显著高于 LPS 组(P<0.01), 仍显著低于对照组(P<0.01)(表 1)。

2.3 姜黄素对 LPS 刺激的 kupffer 细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的影响

不同组别细胞处理后, LPS 组培养液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平较对照组显著升高(P<0.01), 姜黄素组显著低于 LPS 组(P<0.01), 仍显著高于对照组(P<0.01)。(表 2)。

表 1 各组细胞氧化应激水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of oxidase stress of each group ($\bar{x} \pm s$)

	对照组 (control group)	LPS 组 (model group)	干预组 (curcumine group)
MDA (nM)	701.32± 120.45	3110.25± 259.51*	1640.41± 280.40*#
GSH (μ M)	21.02± 0.84	8.90± 1.42*	15.08± 1.21*#

注 :与对照组比较 ,*P<0.01 ;与 LPS 组比较 #P<0.01
Note : *P<0.01,compared with control group;#P<0.01,compared with LPS group

表 2 各组细胞上清液炎症细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of supernatant inflammatory cytokines of each group ($\bar{x} \pm s$)

	对照组 (control group)	LPS 组 (model group)	干预组 (curcumine group)
TNF-α (ng·mg.pro ⁻¹)	1.21± 1.28	217.32± 26.35*	46.09± 12.13*#
IL-1β (ng·mg.pro ⁻¹)	0.37± 2.44	2.25± 1.25*	0.62± 0.42*#
IL-6(pg·mg.pro ⁻¹)	35.43± 9.44	420.34± 39.54*	93.24± 27.28*#

注 :与对照组比较 ,*P<0.01 ;与 LPS 组比较 #P<0.01
Note :*P<0.01 compared with control group #P<0.01 ,compared with LPS group

3 讨论

肝脏 Kupffer 细胞占全身单核吞噬细胞系统的 80%~90%，研究证实 Kupffer 细胞参与高脂饮食触发的胰岛素抵抗和肥胖 ,进而导致非酒精性脂肪性肝病的发生^[1-4]。LPS 作为 G-杆菌细胞壁的重要成分 ,能够刺激 Kupffer 细胞分泌炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等。LPS 强力诱导 Kupffer 细胞产生 TNF-α ,是肝脏 TNF-α 的最主要来源 ,作为肝损伤中 LPS 发挥毒性效应最重要细胞因子 ,也是导致肝脏损伤中最重要的具有始动效应的细胞因子之一^[10-12]。Kupffer 细生成的 TNF-α 又可以自分泌形式激活 NF-κ B ,产生 IL-1β、IL-6 等使炎症反应扩大化^[11-14]。因此 ,抑制 LPS 所致的 Kupffer 细胞过度或持续活化 ,对于防治内毒素引起的肝脏损伤具有重要意义。本研究观察到姜黄素对 LPS 刺激 Kupffer 细胞分泌炎症细胞因子具有显著的抑制作用,与以前观察结果一致^[9]。

Nrf2 和它的细胞质接头蛋白 Keap-1 是细胞抗氧化反应的中枢调节者。Nrf2 通过与 ARE 相互作用调节编码抗氧化蛋白和 相代谢酶的表达 ,发挥对细胞的多种保护作用^[12]。姜黄素作为一种天然的抗氧化物质 ,在生物体内显出较强的抗氧化性活性。姜黄素能促进多种细胞 Nrf2 核转位 ,启动对靶基因的调控表达 ,发挥对氧化应激损伤的保护作用^[5-8]。本研究表明 ,姜黄素能有效促进 Kupffer 细胞 Nrf2 核转位 ,且与剂量相关 ,在一定范围内 随剂量的增加其促进 Nrf2 核转位水平增高 ,促抗氧化酶和蛋白的表达的能力更强 ,提示高浓度的姜黄素具有更强的抗氧化作用。

MDA 作为脂质过氧化产物之一 ,间接反映细胞氧化损伤程度。GSH 的活性成份为还原型谷胱甘肽 ,参与体内氧化还原过程 ,其下降程度反映细胞氧化损伤程度。本研究证实 ,LPS 刺激 Kupffer 细胞引起显著氧化应激损伤 ,MDA 水平升高 ,GSH 水平降低。姜黄素预处理 ,通过增加抗氧化酶和蛋白的表达可

以显著降低 LPS 引起的氧化应激损伤 ,部分逆转 LPS 引起的 MDA 水平升高和GSH 水平降低。

LPS 作用于 Kupffer 细胞 CD14 受体 ,经 Toll 受体家族将外来信号传入胞内 ,激活 NF-κ B/Iκ B 信号途径 ,启动靶基因转录 ,TNF-a、IL-1β、IL-6 等炎症细胞因子的分泌和释放显著增加^[11,12,15-18]。本研究显示 ,LPS 刺激刺激 Kupffer 细胞引起细胞培养液中 TNF-a、IL-1β、IL-6 水平显著增高 ,姜黄素干预有效抑制 LPS 刺激引起 Kupffer 细胞分泌炎症细胞因子 ,提示姜黄素有可能通过降低细胞氧化应激损伤而减轻炎症因子的分泌。

目前对于氧化应激对 Kupffer 细胞分泌炎症因子影响的机制尚未阐明。血红素氧合酶 -1(HO-1)广泛参与组织细胞的抗氧化应激损伤 ,是维持细胞氧化和抗氧化动态平衡的关键因素。HO-1 具有强大的抗炎效应 ,通过抑制炎症反应减轻组织损害。研究表明 LPS 刺激 Kupffer 细胞时 HO-1 表达上调 ,是细胞对氧化应激损伤的一种保护性机制^[19,20]。目前认为 ,Nrf2 是在转录水平调节 HO-1 表达的关键因素 ,姜黄素通过促进 Nrf2 核转位 ,上调多种细胞 HO-1 的表达^[14,21,22]。本研究中观察到姜黄素干预减轻 LPS 刺激 Kupffer 细胞引起的炎症细胞因子分泌 ,可能与其促进 Nrf2 核转位 ,上调 HO-1 表达减轻氧化应激水平有关。

本研究结果表明 ,姜黄素能够抑制 LPS 刺激引起 Kupffer 细胞分泌炎症细胞因子 ,可能与姜黄素促进 Nrf2 核转位 ,上调 HO-1 的表达有关。

参 考 文 献(References)

[1] DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(4):460-469
[2] Esposito E, Iacono A, Bianco G, et al. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats[J]. J Nutr, 2009,139:905-911
[3] Les Lang. Gut Bacteria as Key Players in Obesity-Associated Inflam-

- mation and Insulin Resistance[J]. *Gastroenterol*, 2010,139:1435
- [4] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2007, 56:1761-1772
- [5] Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element[J]. *Biochem J*, 2003,371:887-895
- [6] Farombi EO, Shrotriya S, Na HK, et al. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008,46:1279-1287
- [7] Kang ES, Woo IS, Kim HJ, et al. Up-regulation of aldose reductase expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Nrf2 is involved in the protective effect of curcumin against oxidative damage[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43:535-545
- [8] 李强,赵曙光,王旭霞,等.姜黄素激活转录因子 Nrf2 对人肝细胞氧化应激的影响[J].*胃肠病学和肝病杂志*,2010,19(2):154-156
LI Qiang, ZHAO Shu-guang, WANG Xu-xia, et al. Effect of curcumin on intracellular ROS in cultured human hepatocyte by upregulating the activity of Nrf2 [J].*Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2010,19(2):154-156(In Chinese)
- [9] 彭景华,曹健美,王晓柠,等.姜黄素对内毒素脂多糖诱导的库普弗细胞分泌炎症细胞因子的抑制作用 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2006,14(4):211-214
Peng Jing-hua, Cao Jian-mei, Wang Xiao-ning, et al. Inhibiting effects of curcumin on expression of inflammatory cytokines in Kupffer cells induced by lipopolysaccharides [J]. *Chin J Integr Trad West Med Dig*, 2006, 14(4):211-214(In Chinese)
- [10] Xu FL, You HB, Li XH, et al. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells [J]. *Am J Surg*, 2008,196(1):139-148
- [11] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB [J]. *Genes Dev*, 2004,18: 2195-2224
- [12] Hayden MS, and Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling [J]. *Cell*, 2008,132: 344-362
- [13] Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling [J]. *Semin Immunol*, 2000,12(1):85-98
- [14] Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001,98:4611-4616
- [15] Parsons SA, Greer PA. The Fps/Fes kinase regulates the inflammatory response to endotoxin through down-regulation of TLR4, NF-kappaB activation, and TNF-alpha secretion in macrophages[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(6):1522-1528
- [16] Chhikara M, Wang S, Kern SJ, et al. Carbon monoxide blocks lipopolysaccharide-induced gene expression by interfering with proximal TLR4 to NF-kappaB signal transduction in human monocytes[J]. *PLoS One*, 2009, 4(12):e8139
- [17] Ando K, Hasegawa K, Shindo K, et al. Human lactoferrin activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling [J]. *FEBS J*, 2010, 277(9): 2051-2066
- [18] Yu M, Shao D, Yang J, Feng S, et al. Ketamine suppresses intestinal TLR4 expression and NF-kappaB activity in lipopolysaccharide-treated rats [J]. *Croat Med J*, 2006, 47(6):825-831
- [19] Song Y, Shi Y, Ao LH, et al. TLR4 mediates LPS-induced HO-1 expression in mouse liver: role of TNF-alpha and IL-1beta [J]. *World J Gastroenterol*, 2003,9:1799-1803
- [20] Rushworth SA, Chen XL, Mackman N, et al. Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C [J]. *J Immunol*. 2005 175(7): 4408-4415
- [21] Farombi EO, Shrotriya S, Na HK, et al. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008,46:1279-1287
- [22] Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element[J]. *Biochem J*, 2003,371:887-895