

牟海军,金海,陈幸幸,等. 姜黄素对肝癌模型小鼠 Keap1/ARE 信号通路及胆汁酸肝肠循环的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 8-14.

Mou HJ, Jin H, Chen XX, et al. Effects of curcumin on the Keap1/ARE signaling pathway and bile acid hepatointestinal circulation in hepatoma model mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 8-14.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 09. 002

姜黄素对肝癌模型小鼠 Keap1/ARE 信号通路及胆汁酸肝肠循环的影响

牟海军,金海*,陈幸幸,肖宏,刘黔,朱蓉

(遵义医科大学附属医院 消化科, 贵州 遵义 563003)

【摘要】 目的 探讨姜黄素对肝癌模型小鼠胞质蛋白伴侣分子(Keap1)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路及胆汁酸肝肠循环的影响。**方法** C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、姜黄素低剂量(10 μg/g)组、姜黄素中剂量(20 μg/g)组、姜黄素高剂量组(30 μg/g)、顺铂(10 μg/g)组,每组 12 只,除对照组外,其余各组以二乙基亚硝胺灌胃诱导建立肝癌模型,分组处理后,苏木精-伊红(HE)染色检测各组小鼠肝组织病理形态;测量小鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平、总胆红素(TB)、总胆汁酸(TBA)含量;酶联免疫吸附(ELISA)实验检测大鼠血清白细胞介素-6(IL-6)、转化生长因子-β1(TGF-β1)水平;实时荧光定量(qRT-PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织 Keap1/ARE 通路相关蛋白 Keap1、核转录因子相关因子 2(Nrf2)表达。**结果** 与对照组比较,模型组小鼠肝组织出现癌变等病理损伤,血清 ALT、AST、TB、TBA、IL-6 及 TGF-β1 水平、肝组织 Keap1 mRNA 及蛋白水平显著升高($P<0.05$),Nrf2 mRNA 及蛋白水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,姜黄素低、中、高剂量组、顺铂组小鼠肝组织病理损伤减轻,血清 ALT、AST、TB、TBA、IL-6 及 TGF-β1 水平、肝组织 Keap1 mRNA 及蛋白水平降低,Nrf2 mRNA 及蛋白水平升高,且各指标随姜黄素剂量升高而呈梯度改变($P<0.05$);姜黄素高剂量组与顺铂组小鼠比较,各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 姜黄素可减轻肝癌小鼠肝损伤,改善胆汁酸肝肠循环,可能是通过下调 Keap1 表达,激活下游 ARE 信号实现的。

【关键词】 姜黄素;肝癌;Keap1/ARE 信号通路;胆汁酸肝肠循环

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 09-0008-07

Effects of curcumin on the Keap1/ARE signaling pathway and bile acid hepatointestinal circulation in hepatoma model mice

MOU Haijun, JIN Hai*, CHEN Xingxing, XIAO Hong, LIU Qian, ZHU Rong

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China)

【Abstract】 Objective We investigated the effects of curcumin on the Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway and on bile acid hepatointestinal circulation in hepatoma model mice. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, a low dose (10 μg/g) curcumin group, a medium dose (20 μg/g) curcumin group, a high dose (30 μg/g) curcumin group, and a cisplatin (10 μg/g) group, with 12 mice in each group. except for the control group, the other groups were given diethylnitrosamine to

[基金项目] 贵州省科技计划项目(黔科合 LH 字[2017]7095 号)。

[作者简介] 牟海军(1978—),男,硕士,副教授,从事消化道肿瘤研究。E-mail:mzz6148@163.com

[通信作者] 金海(1982—),男,高级实验师,从事消化道肿瘤研究。E-mail:jinhai1115@aliyun.com

induce the establishment of liver cancer models. After grouping, the pathological morphology of liver tissue was detected by hematoxylin eosin (HE). The alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TB), and total bile acid (TBA) serum contents of the mice were measured. The levels of serum interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) of mice were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of the Keap1/ARE pathway related proteins, Keap1 and nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2), were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) fluorescence analysis and Western blot. **Results**

Compared with the control group, the liver tissue of mice in the model group showed canceration and other pathological damage. The levels of serum ALT, AST, TB, TBA, IL-6, TGF- β 1, and Keap1 mRNA and protein in liver tissues were significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of Nrf2 mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the liver tissue pathological damage of mice in the low, middle and high dose curcumin groups, and in cisplatin group was alleviated; the levels of serum ALT, AST, TB, TBA, IL-6, TGF- β 1, and Keap1 mRNA and protein in liver tissue were decreased; and the levels of Nrf2 mRNA and protein were increased, with each index changing in a gradient fashion with the increase of curcumin dose ($P < 0.05$). There was no significant difference between the high dose curcumin group and the cisplatin group of mice ($P > 0.05$). **Conclusions** Curcumin can reduce liver damage and improve the circulation of bile acid in the liver and intestine. This may be achieved by the down-regulation of the expression of Keap1 and the activation of downstream ARE signals.

【Keywords】 curcumin; liver cancer; Keap1/ARE signaling pathway; bile acid hepatointestinal circulation

肝癌是临床常见的消化系统恶性肿瘤,病情进展快、恶性程度高,易复发转移,预后差、死亡率高,我国是肝癌大国,其患者人数约占全球的半数以上,死亡率在所有恶性肿瘤中居第 2 位,严重威胁居民的生命健康^[1-2],因此探讨肝癌的发病机制,寻找安全有效的治疗药物具有重要的临床和社会意义,氧化应激损伤是引发肝癌的一个因素,氧化应激可导致肝细胞坏死,损害肝功能,引发胆汁酸肝肠循环障碍,造成胆汁淤积于肝内,进一步损害肝组织,因而减轻氧化应激反应是治疗肝癌的关键^[3-4],胞质蛋白伴侣分子(Kelch-like ECH-associated protein-1, Keap1)/核转录因子相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)是机体主要的抗氧化信号通路,Keap1 是 Nrf2/ARE 的负调控因子,下调其表达,可激活 Nrf2/ARE 信号,增强机体抗氧化应激能力,减轻糖尿病引起的肾组织损伤,并通过减轻氧化损伤而抑制乳腺癌细胞增殖,发挥抗肿瘤作用,由此可知,Keap1/ARE 信号是治疗肝癌的一个潜在作用靶点^[5-6]。姜黄素是提取自中药材姜黄的一种酚类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤作用等广泛的药理作用,姜黄素可促进肝癌细胞 HepG2 凋亡,抑制其增殖,降低其迁移、侵袭能力^[7],并可改善肝癌兔肝功能,抑制其肿瘤血管生成,提高其生存时间^[8],但姜黄素对肝癌小鼠 Keap1/ARE 信号通路及胆汁酸肝肠循环的影响,目前还不清楚,本文通过二乙基亚硝胺诱导建立肝癌

小鼠模型,对此进行研究,可为临床治疗肝癌提供新的参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠(75 只),6 周龄,体重 18~22 g。购于遵义医科大学实验动物中心[SCXK(黔)2018-0001],于本院 SPF 级动物房中饲养[SYXK(黔)2018-0001],光照/黑暗交替照明(光照期 6:00~18:00),自由饮水、进食,温度 23℃ 左右,相对湿度 50% 左右,适应饲养一周后进行实验。本实验已通过遵义医科大学动物伦理委员会审批批准(KLLY(A)-2019-095),实验过程中遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

二乙基亚硝胺(N0756-10ML),美国 sigma 公司;姜黄素(CY11354),北京凯瑞基生物科技有限公司;注射用顺铂(每支 20 mg,批号:FA4A8029B),齐鲁制药有限公司;大鼠转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) ELISA 试剂盒(EK-0514),上海和序生物科技有限公司;大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(ab100712)、兔源 GAPDH 一抗(ab181602)、兔源 Nrf2 一抗(ab137550)、兔源 Keap1 一抗(ab139729)、羊抗兔二抗(ab150077),美国 Abcam 公司;TRIzol(10296010)、逆转录试剂盒(18091050)、荧光定量试剂盒(F415S),美国

Thermo Fisher Scientific 公司;RIPA 裂解液(P0013 K)、BCA 试剂盒(P0011)、HE 染色试剂盒(C0105),上海碧云天公司等。PUZS-300 全自动生化分析仪,上海帝博思生物科技有限公司;RM2035 轮转切片机,德国 Leica 公司;SMZ745 光学显微镜,日本尼康公司;Model 680 酶标仪、Trans-Blot SD 转膜仪、CFX96 Touch Deep Well 荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;3900 型高通量 DNA 合成仪,美国应用生物系统公司;DYCZ-25D 型双垂直电泳仪,北京六一生物科技有限公司;2500 凝胶成像系统,上海天能公司等。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立及分组给药

参考文献^[9]制备肝癌小鼠模型:将二乙基亚硝胺溶于生理盐水,进行剂量换算后,以 18 μg/g 剂量每天灌胃,持续 4 周后,检测小鼠血清 ALT、AST、TB、TBA 值,出现明显异常,解剖后肉眼观察肝形态,肝呈现体积增大,表面生有大小不等的结节,切面灰白,表明模型建立成功,共造模 63 只,成功 60 只,随机分为模型组、姜黄素低剂量(10 μg/g)组、姜黄素中剂量(20 μg/g)组、姜黄素高剂量(30 μg/g)组、顺铂(10 μg/g)组,每组 12 只,另取 12 只以等剂量生理盐水每天灌胃,持续 4 周,设为对照组。

以生理盐水溶解姜黄素配制为 1、2、3 μg/μL 的姜黄素^[10]溶液,姜黄素低、中、高剂量组小鼠以 10 μg/g、20 μg/g、30 μg/g 灌胃,顺铂组^[11]小鼠以 10 μg/g 的剂量腹腔注射顺铂注射液,模型组和假手术组以等剂量的生理盐水灌胃,同时同剂量腹腔注射生理盐水,持续 14 d。

1.3.2 标本采集及大鼠肝组织病理形态检测

用药结束后 24 h,断头处死小鼠,腹主动脉取血 3 mL,静置离心后提取血清储存在-80℃冰箱中备用,解剖后取出肝,剪取约 1 g 肝组织储存于液氮中备用,其余肝组织经生理盐水漂洗、4%多聚甲醛溶液固定、低浓度到高浓度梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,以石蜡包埋,以切片机做常规病理切片,行脱蜡、高浓度到低浓度的梯度乙醇处理后,参照 HE 染色试剂盒说明书的步骤进行染色,经再次脱水、透明后封片,以光学显微镜观察肝组织病理形态,任选 5 个视野拍照。

1.3.3 血清生化检测及 IL-6、TGF-β1 水平测定

取 1.3.2 中血清放置在 4℃冰箱只解冻,取 500

μL 以全自动生化分析仪检测其中 ALT、AST、TB、TBA 水平,以 ELISA 试剂盒检测剩余血清中 IL-6、TGF-β1 水平,具体步骤参照各自的说明书进行。

1.3.4 肝组织中 Keap1、Nrf2 mRNA 检测

取 1.3.2 中的肝组织 0.5 g 剪碎后加入 TRIzol 试剂,参照 TRIzol 说明书的步骤提取总 RNA,以逆转录试剂盒及荧光定量试剂盒将其逆转录为 cDNA 后进行荧光定量 PCR 反应,反应体系的配制、反应条件的设定参照各自说明书进行,以 GAPDH 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 算法分析各组实验数据,qRT-PCR 引物序列见表 1。

1.3.5 肝组织中 Keap1、Nrf2 蛋白检测

将 1.3.2 中剩余的肝组织剪碎,加入蛋白裂解液,匀浆后离心提取总蛋白,参照 BCA 试剂盒说明书的步骤测定其浓度,根据测定结果调整各组蛋白浓度至相同,取 20 μL 样品液上样进行 SDS-PAGE 电泳后湿转,将蛋白全部转移至 PVDF 膜上,经 5% 的脱脂奶粉封闭后依次加入兔源 Keap1、Nrf2、GADPH 一抗溶液(稀释比例为 1:2000),4℃孵育过夜,TBST 溶液漂洗后以羊抗兔二抗溶液(稀释比例为 1:1000)室温孵育 2 h,TBST 再次漂洗后以 ECL 显色,使用凝胶成像仪观察条带并拍照,并以 Quantity One 软件分析图像,得出各组蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件对实验数据进行统计分析。计量数据采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对小鼠肝组织病理形态的影响

对照组小鼠肝组织形态正常,无病理损伤;模

表 1 qRT-PCR 引物序列	
Table 1 qRT-PCR primer sequences	
引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence
Keap1	F:GGCTGGTATCTGAAACCCGTCTA
	R:ATGGGAATAAAGAATGGACTAGGCA
Nrf2	F:CTCAGCTCCTTCTGAAA
	R:CGGCAGCGTCAGTTCAAGGT
GADPH	F:AGTCAGGTATCCACAGGAAACAG
	R:TGTGTCCGTCGTGCATCTGA

型组小鼠肝组织出现肝小叶结构破坏结构改变,细胞形态多变,大小不一,细胞核病理性分裂象增多,并有大量炎性细胞、成纤维细胞浸润等病理损伤,姜黄素低、中、高剂量组、顺铂组小鼠肝组织病理损伤减轻,且随姜黄素剂量升高而损伤逐渐减轻;姜黄素高剂量组与顺铂组小鼠比较,肝组织病理损伤程度无明显差异,见图 1。

2.2 姜黄素对小鼠血清生化指标的影响

与对照组比较,模型组小鼠血清 ALT、AST、TB、TBA 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,姜黄素低、中、高剂量组、顺铂组小鼠血清 ALT、AST、TB、TBA 水平降低 ($P<0.05$);与姜黄素低剂量组比较,姜黄素中、高剂量组、顺铂组小鼠血清 ALT、AST、TB、TBA 水平降低 ($P<0.05$);与姜黄素中剂量组比较,姜黄素高剂量组、顺铂组小鼠血清 ALT、AST、TB、TBA 水平降低 ($P<0.05$);姜黄素高剂量组与顺铂组小鼠比较,血清 ALT、AST、TB、TBA 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 2。

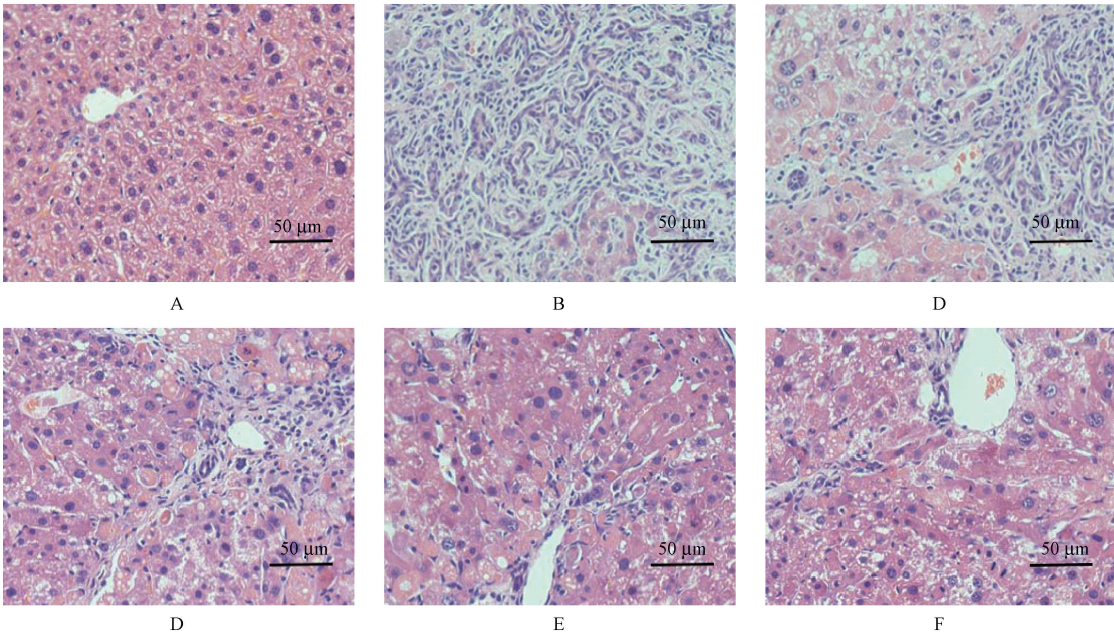
2.3 姜黄素对小鼠血清 IL-6、TGF-β1 水平的影响

与对照组比较,模型组小鼠血清 IL-6、TGF-β1 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,姜黄素低、中、高剂量组、顺铂组小鼠血清 IL-6、

TGF-β1 水平降低 ($P<0.05$);与姜黄素低剂量组比较,姜黄素中、高剂量组、顺铂组小鼠血清 IL-6、TGF-β1 水平降低 ($P<0.05$);与姜黄素中剂量组比较,姜黄素高剂量组、顺铂组小鼠血清 IL-6、TGF-β1 水平降低 ($P<0.05$);姜黄素高剂量组与顺铂组小鼠比较,血清 IL-6、TGF-β1 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 3。

2.4 姜黄素对小鼠肝组织 Keap/ARE 通路相关蛋白 mRNA 表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠肝组织 Keap mRNA 水平显著升高 ($P<0.05$),Nrf2 mRNA 水平显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,姜黄素低、中、高剂量组、顺铂组小鼠肝组织 Keap mRNA 水平降低 ($P<0.05$),Nrf2 mRNA 水平升高 ($P<0.05$);与姜黄素低剂量组比较,姜黄素中、高剂量组、顺铂组小鼠肝组织 Keap mRNA 水平降低 ($P<0.05$),Nrf2 mRNA 水平升高 ($P<0.05$);与姜黄素中剂量组比较,姜黄素高剂量组、顺铂组小鼠肝组织 Keap mRNA 水平降低 ($P<0.05$),Nrf2 mRNA 水平升高 ($P<0.05$);姜黄素高剂量组与顺铂组小鼠比较,Keap、Nrf2 mRNA 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 4。



注:A:对照组;B:模型组;C:姜黄素低剂量组;D:姜黄素中剂量组;E:姜黄素高剂量组;F:顺铂组。

图 1 各组小鼠肝组织损伤情况

Note. A, Control group. B, Model group. C, Curcumin low dose group. D, Curcumin medium dose group. E, Curcumin high dose group. F, Cisplatin group.

Figure 1 Liver tissue damage in each group

表 2 各组小鼠血清 ALT、AST、TB、TBA 水平($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Table 2 Serum ALT, AST, TB and TBA levels of mice in each group

组别 Groups	ALT(U/L)	AST(U/L)	TB(μ mol/L)	TBA(μ mol/L)
对照组 Control group	42. 32±10. 02	119. 47±18. 93	6. 63±0. 13	61. 23±12. 81
模型组 Model group	251. 57±53. 24 ^a	547. 72±70. 12 ^a	42. 76±8. 16 ^a	143. 17±25. 60 ^a
姜黄素低剂量组 Curcumin low dose group	187. 79±36. 01 ^b	412. 57±51. 23 ^b	31. 04±6. 03 ^b	116. 08±20. 15 ^b
姜黄素中剂量组 Curcumin medium dose group	119. 02±24. 63 ^{bc}	278. 47±37. 33 ^{bc}	19. 65±4. 20 ^{bc}	89. 32±16. 12 ^{bc}
姜黄素高剂量组 Curcumin high dose group	46. 86±10. 01 ^{bcd}	136. 08±23. 41 ^{bcd}	7. 89±1. 02 ^{bcd}	63. 75±12. 85 ^{bcd}
顺铂组 Cisplatin group	44. 95±8. 73 ^{bcd}	124. 83±21. 68 ^{bcd}	8. 02±1. 07 ^{bcd}	65. 06±13. 17 ^{bcd}

注：与对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组相比，^b $P<0.05$ ；与姜黄素低剂量组相比，^c $P<0.05$ ；与姜黄素中剂量组相比，^d $P<0.05$ 。下同。
Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the low dose group of curcumin, ^c $P<0.05$. Compared with the middle dose group of curcumin, ^d $P<0.05$. The same as below.

表 3 各组小鼠血清 IL-6、TGF-β1 水平($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Table 3 Serum levels of IL-6 and TGF-β1

组别 Groups	IL-6(ng/L)	TGF-β1(ng/L)
对照组 Control group	214. 56±33. 18	982. 63±186. 72
模型组 Model group	389. 65±40. 37 ^a	2750. 82±487. 53 ^a
姜黄素低剂量组 Curcumin low dose group	332. 53±39. 02 ^b	2092. 15±276. 18 ^b
姜黄素中剂量组 Curcumin medium dose group	278. 74±36. 13 ^{bc}	1507. 74±201. 13 ^{bc}
姜黄素高剂量组 Curcumin high dose group	220. 07±32. 14 ^{bcd}	997. 82±120. 62 ^{bcd}
顺铂组 Cisplatin group	215. 84±31. 46 ^{bcd}	989. 76±131. 70 ^{bcd}

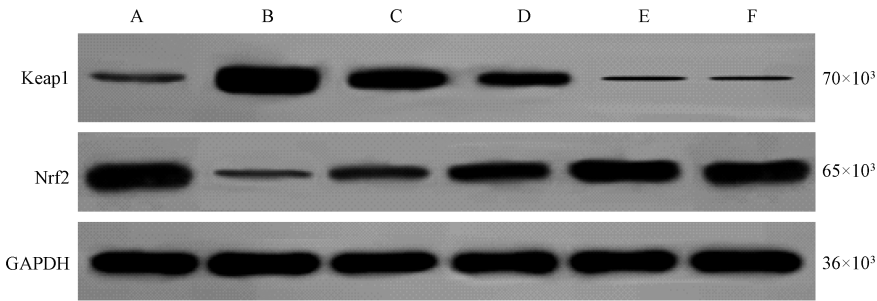
表 4 各组小鼠肝组织 Keap/ARE 通路相关蛋白 mRNA 相对表达($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 4 Relative expression of Keap/ARE pathway related protein mRNA in liver tissue of mice in each group

组别 Groups	Keap1/GAPDH	Nrf2/GAPDH
对照组 Control group	0. 99±0. 11	1. 03±0. 17
模型组 Model group	2. 26±0. 22 ^a	0. 28±0. 05 ^a
姜黄素低剂量组 Curcumin low dose group	1. 82±0. 17 ^b	0. 51±0. 08 ^b
姜黄素中剂量组 Curcumin medium dose group	1. 43±0. 12 ^{bc}	0. 74±0. 12 ^{bc}
姜黄素高剂量组 Curcumin high dose group	1. 01±0. 12 ^{bcd}	0. 98±0. 16 ^{bcd}
顺铂组 Cisplatin group	1. 02±0. 13 ^{bcd}	0. 99±0. 17 ^{bcd}

2.5 姜黄素对小鼠肝组织 Keap/ARE 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠肝组织 Keap 蛋白表达显著升高($P<0.05$),Nrf2 蛋白表达显著降低($P<0.05$);与模型组比较,姜黄素低、中、高剂量组、顺铂组小鼠肝组织 Keap 蛋白表达降低($P<0.05$),Nrf2 蛋白表达升高($P<0.05$);与姜黄素低剂量组比较,姜黄素中、高剂量组、顺铂组小鼠肝组织 Keap 蛋白表达降低($P<0.05$),Nrf2 蛋白表达升高($P<0.05$);与姜黄素中剂量组比较,姜黄素高剂量组、顺铂组小鼠肝组织 Keap 蛋白表达降低($P<0.05$),Nrf2 蛋白表达升高($P<0.05$);姜黄素高剂量组与顺铂组小鼠比较,Keap、Nrf2 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2、表 5。



注:A;对照组;B:模型组;C:姜黄素低剂量组;D:姜黄素中剂量组;E:姜黄素高剂量组;F:顺铂组。

图 2 免疫印迹检测各组小鼠肝组织 Keap/ARE 通路相关蛋白表达

Note. A, Control group. B, Model group. C, Curcumin low dose group. D, Curcumin medium dose group. E, Curcumin high dose group. F, Cisplatin group.

Figure 2 Western blot to detect the expression of Keap/ARE pathway related proteins in liver tissues of mice

表 5 各组小鼠肝组织 Keap/ARE 通路相关蛋白相对表达($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 5 Relative expression of Keap/ARE pathway related proteins in liver tissue of mice in each group

组别 Groups	Keap1/GAPDH	Nrf2/GAPDH
对照组 Control group	0.13±0.03	1.27±0.24
模型组 Model group	0.87±0.14 ^a	0.09±0.02 ^a
姜黄素低剂量组 Curcumin low dose group	0.52±0.08 ^b	0.29±0.06 ^b
姜黄素中剂量组 Curcumin medium dose group	0.33±0.06 ^{bc}	0.65±0.14 ^{bc}
姜黄素高剂量组 Curcumin high dose group	0.15±0.04 ^{bcd}	1.18±0.27 ^{bcd}
顺铂组 Cisplatin group	0.14±0.03 ^{bcd}	1.16±0.26 ^{bcd}

3 讨论

近年来,我国肝癌发病率呈上升趋势,对其发病机制及病理过程进行研究,找到安全有效的临床治疗方法,对保障居民生命健康具有重要的意义。肝癌动物模型是进行肝癌研究的重要材料,其中二乙基亚硝胺诱发的肝癌模型,成功率较高,对肝致癌有较好的专一性^[12]。二乙基亚硝胺具有较强的肝毒性,可促使致纤维化因子 TGF-β1 和炎症因子 IL-6 大量合成释放,诱导肝内炎症发生,损伤肝细胞,造成肝组织纤维化,并导致胆汁酸肝肠循环障碍,使肝内胆汁淤积,进一步加重肝损伤,继而发生肝细胞结节性增生及肝硬化,最后诱发肝癌,其病变过程与人类肝癌病程相似,因而广泛用于肝癌的临床及基础研究中^[5,13-15]。本文以二乙基亚硝胺灌胃诱导建立肝癌小鼠模型,结果显示,模型组小鼠肝组织出现肝小叶结构破坏结构改变,细胞形态多

变,大小不一,细胞核病理性分裂象增多,并有大量炎性细胞、成纤维细胞浸润等病理损伤,血清 ALT、AST、TB、TBA、IL-6 及 TGF-β1 水平显著升高,表明二乙基亚硝胺可引发肝内炎症,造成肝纤维化,导致反映胆汁淤积型肝损伤的指标^[16] ALT、AST、TB、TBA 异常升高,损坏肝功能及胆汁酸肝肠循环,并诱导肝细胞癌变,模型建立成功。

肝癌的临床治疗以手术、放化疗为主,但治疗效果不佳,且有较多副作用,中药因毒副作用小,因而在肿瘤的治疗中越来越受重视,姜黄素是中药材姜黄中含有的一种天然抗氧化物质,可调节细胞周期、增殖、清除氧自由基、抑制肿瘤生长,还具有较强的抗病毒和肝功能保护作用,可降低 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达,抑制炎症发生,诱导肝癌细胞凋亡,起到抗癌作用^[17-19]。但姜黄素对肝癌小鼠胆汁酸肝肠循环的影响,目前还未见研究,本文结果显示,肝癌小鼠经姜黄素处理后,肝组织病理损伤减轻,其血清 ALT、AST、TB、TBA、IL-6 及 TGF-β1 水平降低,且呈剂量依赖性,表明姜黄素能抑制肝内炎症发生,减轻肝纤维化,并缓解肝癌变,改善胆汁酸肝肠循环及肝功能。

研究发现机体主要的抗氧化通路 Keap1/ARE 在乳腺癌、非小细胞肺癌的治疗中发挥着重要作用。Keap1 作为 Nrf2 的负调控因子,当其受氧化应激源刺激后,可大量降解,导致 Nrf2 水平升高,并转运入核结合抗氧化反应元件 ARE,启动 ARE,促进抗氧化酶基因表达,减轻氧化应激,进而发挥抗肿瘤作用^[6,20-21],因此 Keap1/ARE 通路可作为肝癌的一个潜在治疗靶点。本文研究揭示姜黄素对肝癌的具有一定的治疗效果,但其作用机制目前还不清楚,以上研究提示姜黄素缓解肝癌病情进展的作用

机制可能是调控二乙基亚硝胺诱导的肝癌小鼠肝组织中 Keap1/ARE 信号传导,本文对此进行了研究。结果显示,肝癌小鼠肝组织中 Keap1 mRNA 及蛋白水平显著升高,Nrf2 mRNA 及蛋白水平显著降低,以姜黄素处理后,肝组织 Keap1 mRNA 及蛋白水平降低,Nrf2 mRNA 及蛋白水平升高,表明 Keap1/ARE 信号参与介导肝癌发生发展,姜黄素可下调 Keap1 表达,上调 Nrf2/ARE 信号表达,减轻肝组织癌变,改善肝功能及胆汁酸肝肠循环。

综上所述,姜黄素可抑制 Keap1 表达,激活下游 Nrf2/ARE 信号,减轻肝内炎症及肝组织纤维化,修复肝功能,改善胆汁酸肝肠循环,缓解肝癌变,为肝癌的临床治疗提供了新的思路,调节 Keap1/ARE 信号传导可能是其药理机制,但本文只进行了初步研究,关于其药理机制的证据不足,还需要后续使用 Keap1/ARE 信号的激动剂及抑制剂进行对照验证。

参考文献:

[1] Ma X, Tan YT, Yang Y, et al. Pre-diagnostic urinary 15-F_{2t}-isoprostane level and liver cancer risk: Results from the Shanghai Women's and Men's health studies [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(8): 1896-1903.

[2] Chai S, Ng KY, Tong M, et al. Octamer-4/microRNA-1246 signaling axis drives Wnt/ β -catenin activation in liver cancer stem cells [J]. *Hepatology*, 2016, 64(6): 2062-2076.

[3] Wang S, Sugamori KS, Tung A, et al. N-hydroxylation of 4-aminobiphenyl by CYP2E1 produces oxidative stress in a mouse model of chemically induced liver cancer [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 144(2): 393-405.

[4] Fu T, Zhao X, Evans RM. Liver cancer checks in when bile acid clocks out [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(6): 827-828.

[5] Huang K, Gao X, Wei W. The crosstalk between Sirt1 and Keap1/Nrf2/ARE anti-oxidative pathway forms a positive feedback loop to inhibit FN and TGF- β 1 expressions in rat glomerular mesangial cells [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 361(1): 63-72.

[6] Chang J, Zhang Y, Li Y, et al. Nrf2/ARE and NF- κ B pathway regulation may be the mechanism for lutein inhibition of human breast cancer cell [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(8): 719-726.

[7] 孙萌,邵亮,刘攀,等.姜黄素联合顺铂对 HepG2 肝癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(5): 774-776.

[8] 杨传玉,徐政,柯恩明,等.姜黄素联合防粘连膜经多途径血供阻断治疗兔 VX2 肝癌及其对残癌组织新生血管的影响

[J]. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(10): 775-777.

[9] 申秀云,陈曦,赵雁力.莪芪抗癌方对二乙基亚硝胺(DEN)诱导肝癌模型鼠肿瘤微环境调控机制的研究 [J]. *新中医*, 2016, 48(3): 234-236.

[10] 胡金杰,王文生,陶然.姜黄素对乙型病毒性肝炎模型大鼠转化生长因子- β 1、肿瘤坏死因子- α 表达水平的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(17): 4247-4249.

[11] 李洁,母慧娟,张淑娜.枇杷叶协同顺铂对小鼠抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *现代中药研究与实践*, 2019, 33(3): 32-35.

[12] Chen R, Zhu S, Fan XG, et al. High mobility group protein B1 controls liver cancer initiation through yes-associated protein - dependent aerobic glycolysis [J]. *Hepatology*, 2018, 67(5): 1823-1841.

[13] Sakurai T, Yada N, Watanabe T, et al. Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) promotes the development of liver cancer [J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(4): 352-358.

[14] Gehrke N, Nagel M, Straub BK, et al. Loss of cellular FLICE-inhibitory protein promotes acute cholestatic liver injury and inflammation from bile duct-ligation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018, 314(3): G319-G333.

[15] 吕磊,赵亮,兰红涛,等.应用 HPLC-MS 技术测定健康受试者和肝癌患者血浆中 13 种胆汁酸的含量 [J]. *药学实践杂志*, 2014, 32(4): 270-272,293.

[16] 葛煦,张彩勤,赵勇,等.七甲川菁染料介导的近红外荧光成像和对肝癌的靶向药物递送 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(6): 746-751.

[17] 陈浩,李甲,胡蕾,等.基于 Sirt1-FXR 通路探究京尼平苷酸对胆汁淤积大鼠胆汁酸肝肠循环的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 787-795.

[18] 马娜,李佳佳,宋来阳,等.姜黄素预处理对干热环境热射病大鼠心肌氧化应激及细胞凋亡的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(12): 14-18.

[19] 周宁,戴旖旎,白旭光,等.姜黄素对肝癌细胞凋亡及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子影响的机制研究 [J]. *癌症进展*, 2017, 15(11): 1282-1285.

[20] Han J, Shi X, Du Y, et al. Schisandrin C targets Keap1 and attenuates oxidative stress by activating Nrf2 pathway in Ang II-challenged vascular endothelium [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(3): 779-790.

[21] Arbour KC, Jordan EJ, Kim HR, et al. Effects of co-occurring genomic alterations on outcomes in patients with KRAS-mutant non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(2): 334-340.

[收稿日期]2020-01-14