

张春云, 曹丽萍, 杜金梁, 等. Nrf2 介导姜黄素对四氯化碳诱导鲫鱼肝损伤的保护作用[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 114-121.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.017

Nrf2 介导姜黄素对四氯化碳诱导鲫鱼肝损伤的保护作用

张春云¹, 曹丽萍^{2,3}, 杜金梁^{2,3}, 贾睿^{2,3}, 顾郑琰¹, 殷国俊^{1,2,3}, Galina Jeney^{3,4}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081; 3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部鱼类免疫药理学国际联合实验室, 江苏 无锡 214081; 4. Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, Anna light 8, Szarvas H-4440, Hungary)

摘要: 为了评价姜黄素对四氯化碳(CCl_4)诱导鲫鱼肝损伤的保护作用以及核因子 NF-E2 相关因子(Nrf2)的调控作用, 采用精密肝切片技术(Precision-cut liver slices, PCLS)分离肝组织并进行体外培养, 以四氯化碳诱导建立急性肝损伤模型, 同时用不同浓度(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的姜黄素处理肝组织切片, 收集上清液及肝组织。检测谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酶(AKP)活性, 以及丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)含量和总抗氧化能力(T-AOC)等生化指标, 同时检测 Nrf2 和 Keap1 基因表达。结果表明: 姜黄素可以改善 CCl_4 诱导的肝损伤, 其浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能有效抑制 GPT、GOT、LDH 和 AKP 活性的升高, 提高 SOD、GSH-Px 活性及 T-AOC 和 GSH 含量, 降低 MDA 的生成, 上调 Nrf2 基因表达。可见, 姜黄素对 CCl_4 诱导的鲫鱼肝损伤有保护的作用, 其作用机制可能是姜黄素能激活 Nrf2 基因在肝细胞中的表达, 调节氧化应激, 从而减轻 CCl_4 对肝损伤。

关键词: 核因子 E2 相关因子 2(Nrf2); 姜黄素; 四氯化碳; 肝损伤; 鲫鱼

中图分类号: S965.117 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)01-0114-08

Nrf2 mediate protective effects of curcumin against carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury in *Carassius auratus*

ZHANG Chun-yun¹, CAO Li-ping^{2,3}, DU Jin-liang^{2,3}, JIA Rui^{2,3}, GU Zheng-yan¹, YIN Guo-jun^{1,2,3}, GALINA Jeney^{3,4}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resource Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. International Joint Research Laboratory for Fish Immunopharmacology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 4. Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, Anna light 8, Szarvas H-4440, Hungary)

Abstract: To evaluate the protective effects of curcumin on liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) and the regulatory role of nuclear factor NF-E2 related factor (Nrf2) in *Carassius auratus*, the liver tissue was isolated by precision-cut liver slices (PCLS) and cultured *in vitro*. The PCLS was treated with carbon tetrachloride and curcumin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,

5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Then the culture supernatants and slices were collected for the analyses of biochemical parameters, such as activities of glutamate pyruvate transaminase (GPT), glutamate oxalate transaminase (GOT), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and alkaline phosphatase (AKP), and contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), total pro-

收稿日期: 2017-10-12

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2017JBFZ01); 国家自然科学基金项目(31702318); 江苏省自然科学基金项目(BK20170218)

作者简介: 张春云(1989-), 女, 安徽宿州人, 硕士, 研究方向为鱼类免疫药理学。(E-mail) shanyun0729@163.com

通讯作者: 殷国俊, (E-mail) yingj@ffrc.cn

tein (TP), albumin (Alb), and total antioxidant capacity (T-AOC) and gene expression of *Nrf2* and *Keap1*. The results showed that curcumin could inhibited the liver damage caused by CCl_4 . Curcumin at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ significantly reduced the levels of *GPT*, *GOT*, *LDH* and *AKP*, increased the activities of *SOD* and *GSH-Px*, T-AOC and GSH content, suppressed the production of MDA, and up-regulated the expression of *Nrf2* in the CCl_4 -induced liver. In conclusion, curcumin had protective effect on liver injury induced by CCl_4 . The hepatoprotective action of curcumin was probably accomplished by regulating *Nrf2* expression to elevate cellular antioxidative capacity and inhibit lipid peroxidation.

Key words: Nrf2; curcumin; CCl_4 ; hepatic injury; *Carassius auratus*

近年来中国集约化水产养殖规模不断提高,但也随之产生诸多问题,如养殖密度过高、过度投喂、养殖水体污染、药物滥用、饲料营养成分不平衡等,造成鱼类病害频发,其中以肝损伤为特征的疾病尤为频繁,给水产养殖业带来极大的经济损失^[1]。肝脏是鱼类物质和能量代谢的重要器官^[2],肝损伤或病变往往导致鱼类机体代谢机能紊乱和抗病力降低,甚至导致死亡。鱼类肝损伤致病因素很多,但其共同点为均伴随着严重的氧化应激,产生大量的活性氧自由基(ROS),引发脂质过氧化反应,破坏细胞膜的正常结构和功能。因此,有研究者认为可通过抑制肝组织内氧化应激或提高抗氧化能力来防治肝损伤^[3]。

中草药由于其毒副作用小,不易在鱼体内富集,在水产动物病害防治中被广泛应用。已有研究结果表明,一些中草药提取物具有抗氧化作用,对鱼类肝胆综合征肝损伤有一定的治疗作用^[4-5]。姜黄为常用中草药,主要来源于姜科植物姜黄(*Curcuma longa* L.)的干燥根茎。姜黄素为姜黄中主要药用活性成分,是一种酸性多酚类物质。在哺乳动物中,研究证实姜黄素具有抗炎^[6]、抗氧化^[7]、抗突变^[8]、护肝^[9-10]等功效。在水生动物中,研究发现姜黄素可促进鱼类生长,改变肠道酶活性^[11-12]。

精密肝切片(Precision-cut liver slices, PCLS)技术是一种新的介于器官与细胞水平间的肝脏体外实验技术。该技术无需使用胶原酶,避免了细胞分离过程中胶原酶对细胞造成的损伤,且能够保存较完整的组织结构,维持细胞间及细胞与基质间的联系,既保留了游离肝细胞的功能特点,又维持了组织的完整性,因而能最大限度地模拟体内状态,被广泛应用于哺乳动物药理学和毒理学研究^[13-15]。而在水产动物中,通过该技术研究姜黄素保肝机理的报道还未发现。

核因子 NF-E2 相关因子(Nuclear factor-erythroid 2-related, Nrf2)是机体对抗氧化应激最主要的

调节因子^[16]。正常状态下, Nrf2 与胞浆蛋白伴侣分子 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein1) 结合处于相对抑制状态。当受到氧化应激刺激时, Nrf2 被激活与 Keap1 解离进入胞质启动 II 相解毒酶及抗氧化基因的表达,随后 Nrf2 与抗氧化反应元件(Antioxidant response element, ARE)相结合,启动下游相关抗氧化酶基因表达,使细胞抗氧化应激能力增强^[17]。在小鼠中,姜黄素可抑制四氯化碳(CCl_4)诱导的肝损伤并促进 Nrf2 mRNA、Keap1 mRNA 及蛋白质表达^[18-19]。在水产生物中还未见相关报道。

本研究采用 PCLS 技术分离鲫鱼肝组织,并进行体外培养。以 CCl_4 诱导建立肝组织损伤模型。通过一些肝功能生化指标的变化,评价姜黄素对鲫鱼肝组织的保护作用。同时在分子水平探究 *Nrf2* 和 *Keap1* 基因在姜黄素保肝中的作用,为鱼类保肝药物的研究和开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

鲫鱼(*Carassius auratus*)取自中国水产科学院淡水渔业研究中心养鱼场。大小规格为 500 g 左右,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 循环水中饲养 7 d。

1.2 药品、试剂及仪器

姜黄素(Curcumin)、二甲基亚砩(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、1640 培养基、链霉素和青霉素购自 Sigma 公司(美国),胎牛血清(FBS)、48 孔板、12 孔板购于 GIBCO 公司(美国), CCl_4 (分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司(上海),谷丙转氨酶(*GPT*)、谷草转氨酶(*GOT*)、超氧化物歧化酶(*SOD*)、碱性磷酸酶(*AKP*)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(*GSH-Px*)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、乳酸脱氢酶(*LDH*)、过氧化氢酶(*CAT*)、总抗氧化能力(T-AOC)及谷胱甘肽(GSH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所科技有限公司, Nrf2 mRNA

NA、Keap1 mRNA 总 RNA 抽提试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司(大连)。

1.3 鲫鱼肝切片的制备和培养

将鲫鱼消毒麻醉后,无菌条件下于超净台内取肝组织,置于含青链霉素混合液(Penicillin-Streptomycin solution)的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered solution, PBS)中,持续通入含 95% O₂和 5% CO₂的混合气体。将肝组织在 PBS 中清洗 3 遍,修整肝组织成体积为 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小,包埋于低熔点胶内进行切片操作,切片厚度为 300 μm。选取完整切片置于含 5% 新生小牛血清(FCS) 1640 培养基的 48 孔培养板中,每组 4 孔,每孔 6 片,于 27 ℃、5% CO₂条件下培养备用。

1.4 肝切片分组与处理

将肝组织切片放置 48 孔板内,预培养 1 h 后,吸出培养基。加入 CCl₄和不同浓度的姜黄素培养基,观察姜黄素对四氯化碳致肝损伤的保护作用。分组如下:空白对照组,加入 1640 培养基培养 8 h,弃培养基,用 1640 培养基洗 1 遍,加入新的 1640 培养基继续培养 4 h,收集上清液及肝组织切片。CCl₄损伤对照组,用 1640 培养基培养 8 h,弃培养基,用 1640 培养基洗 1 遍,加入 12 mmol/L CCl₄继续培养 4 h,收集上清液及肝组织切片。姜黄素对照组,加入 1640 培养基培养 8 h 后,弃培养基,用 1640 培养基洗 1 遍,换 10 μg/ml 姜黄素继续培养 4 h,收集上清液与组织切片。姜黄素处理组,用 1640 培养基培养 4 h 后,弃培养基,加入含不同浓度(1 μg/ml、5 μg/ml 和 10 μg/ml)姜黄素的 1640 培养基继续培养 4 h,用 1640 培养基洗 1 遍后,再加入含 12 mmol/L CCl₄的 1640 培养基,继续培养 4 h,收集上清液与组织切片。每组设 4 个重复。

1.5 生化指标测定

按照试剂盒操作说明分别测定培养上清液中 GPT、GOT、LDH、AKP 活性,以及肝组织匀浆中 SOD、GSH-Px 活性和腺苷三磷酸(ATP)、MDA、GSH、TP、Alb 含量。

1.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *Nrf2* mRNA 和 *Keap1* mRNA 表达

收集肝切片组织,加入适量 TRIZOL 试剂(TaKaRa 公司产品)进行匀浆,参照 RNAiso Reagent (TaKaRa 公司产品)说明书提取总 RNA。

采用紫外-可见分光光度计(Gene Quant1300),

测定 RNA 浓度和纯度(OD_{260}/OD_{280} 值达到 1.8~2.0 为符合标准),用 DEPC 水调至适当浓度。RT-PCR 反应体系:总 RNA 10 μg, OligodT (50 μmol/L) 2 μl, 反转录缓冲液 8 μl, dNTP (10 mmol/L) 4 μl, RNase inhibitor (40 U/μl) 1 μl, M-MLV 反转录酶 (200 U/μl) 1 μl, 其余为 RNase free dH₂O, 反应体系总体积 40 μl。实时荧光定量 PCR 反应按照 Ex-Script™ RT-PCR Kit (TaKaRa 公司产品)说明书,在荧光定量 PCR 检测系统(ABI PRISM7500 sequence detection system)上进行。反应条件:95 ℃ 30 s; 95 ℃ 30 s, 62 ℃ 34 s, 72 ℃ 45 s, 33 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。内参引物及基因特异引物采用 Primer premier 5.0 软件设计,由上海杰瑞生物技术有限公司合成。目的基因引物序列如下: *Nrf2* 基因正向引物为 5'-GCCAGCGTAGCTCCAGTCTGA-3', 反向引物 5'-AAGGCTTGCCGTGCTCGTCT-3'; *Keap1* 基因正向引物为 5'-TGCGTGTGTTTCGGGCTCCT-3', 反向引物 TCTGGGCGTGTTGAGCGGAG-3'; *β-actin* 基因正向引物为 5'-TTGAGCAGGAGATGGAACCG-3', 反向引物 5'-AGAGCCTCAGGGCAACGGAAA-3'。

1.7 数据分析

试验数据用 SPSS19.0 进行处理分析。采用 One-Way ANOVA 检验法进行显著性分析,结果以平均值±标准差表示。

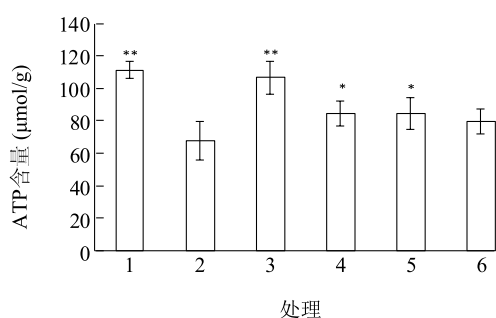
2 结果

2.1 姜黄素对鲫鱼肝切片活力的影响

图 1 显示,鲫鱼肝切片经 CCl₄处理后 ATP 含量明显降低,仅为空白对照的 60.8% ($P<0.01$)。加入不同浓度姜黄素后,肝切片 ATP 活力明显上升,姜黄素浓度为 1 μg/ml 和 5 μg/ml 时,肝切片 ATP 活力活性显著提高($P<0.05$)。

2.2 姜黄素对鲫鱼肝切片中 GPT、GOT、LDH 及 AKP 活性的影响

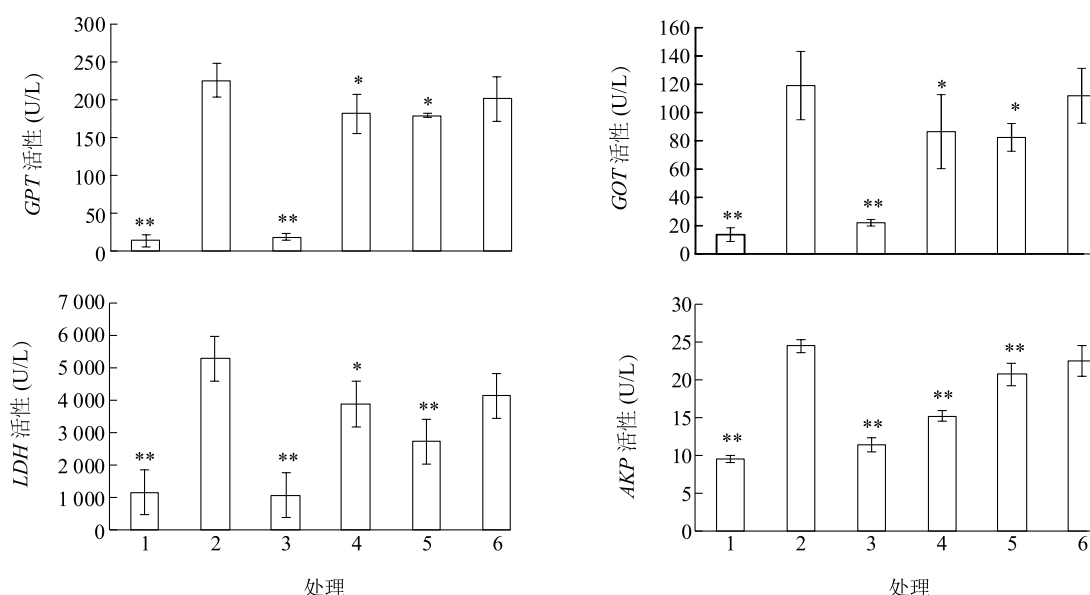
鲫鱼肝切片经过 CCl₄损伤后,引起细胞内酶的释放,培养上清液中 GPT、GOT、LDH 及 AKP 的活性明显增加($P<0.01$) (图 2)。姜黄素处理组中, GPT、GOT、AKP 及 LDH 酶活性较 CCl₄对照组降低,其中 1 μg/ml 和 5 μg/ml 姜黄素处理组中,4 种酶的活性被显著抑制($P<0.01$ 或 $P<0.05$),但 10 μg/ml 姜黄素对 4 种酶活性的影响不显著。



1:空白对照组;2:CCl₄损伤对照组(肝切片与 12 mmol/L CCl₄共培养);3:姜黄素对照组(肝切片与 10 μg/ml 姜黄素共培养);4:1 μg/ml 姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;5:5 μg/ml 姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;6:10 μg/ml 姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组。*、** 分别表示与 CCl₄对照组相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

图1 姜黄素对 CCl₄损伤的鲫鱼肝切片中 ATP 含量的影响

Fig.1 Effects of curcumin on ATP content in CCl₄-treated precision-cut liver slices in *Carassius auratus*



1:空白对照组;2:CCl₄损伤对照组(肝切片与 12 mmol/L CCl₄共培养);3:姜黄素对照组(肝切片与 10 μg/ml 姜黄素共培养);4:1 μg/ml 姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;5:5 μg/ml 姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;6:10 μg/ml 姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组。*、** 分别表示与 CCl₄对照组相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

图2 姜黄素对 CCl₄损伤的鲫鱼肝切片中 GPT、GOT、LDH 及 AKP 酶活性的影响

Fig.2 Effects of curcumin on GPT, GOT, LDH and AKP activities in CCl₄-treated precision-cut liver slices in *Carassius auratus*

2.5 姜黄素对鲫鱼肝切片中 GSH-Px 活性及 GSH 和 MDA 含量的影响

图5显示,CCl₄可显著降低 GSH-Px 活性和 GSH 含量,导致 MDA 大量生成($P<0.05$)。与 CCl₄对照组相比,1 μg/ml 姜黄素显著抑制 GSH-Px 活性和 GSH 含量的降低。MDA 含量在不同浓度姜黄素处理组中

2.3 姜黄素对鲫鱼肝切片中 Alb、TP 含量的影响

图3表明,与空白对照组相比,鲫鱼肝组织中 TP、Alb 含量因 CCl₄的作用而明显下降($P<0.01$)。用 5 μg/ml 姜黄素处理后,鲫鱼肝切片中 TP、Alb 含量显著高于 CCl₄对照组。

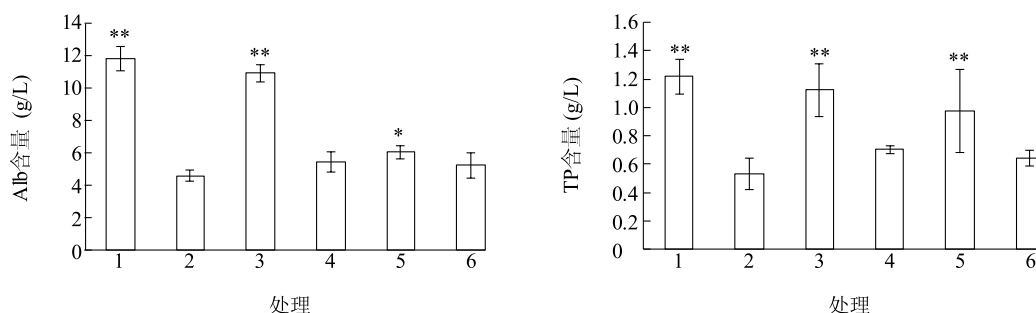
2.4 姜黄素对鲫鱼肝切片中 SOD、CAT、POD 活性及总抗氧化能力(T-AOC)的影响

CCl₄可显著降低鲫鱼肝组织中 SOD、CAT、POD 活性和 T-AOC(图4)。而 1 μg/ml 姜黄素处理后, SOD、CAT、POD 活性及 T-AOC 均明显升高($P<0.05$),同时 5 μg/ml 姜黄素处理后,POD 和 CAT 活性也显著提高。

也显著降低($P<0.05$)。

2.6 姜黄素对鲫鱼肝切片中 Nrf2、Keap1 mRNA 表达的影响

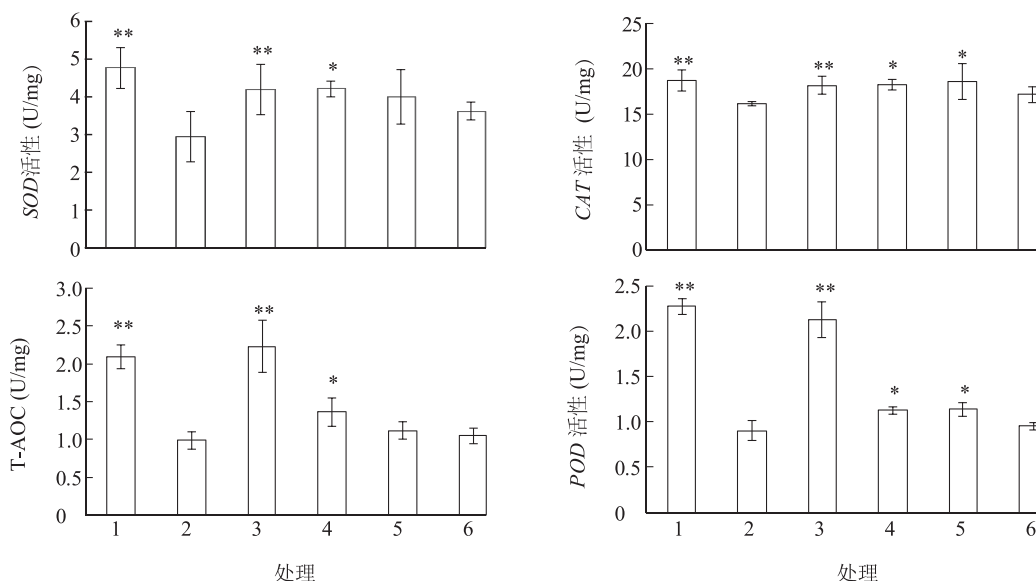
与空白对照相比,CCl₄显著抑制了 Nrf2、Keap1 基因表达(图6)。而姜黄素处理后,Nrf2 基因表达量明显提升,但姜黄素对 Keap1 基因表达量无明显影响。



1:空白对照组;2:CCl₄损伤对照组(肝切片与 12 mmol/L CCl₄共培养);3:姜黄素对照组(肝切片与 10 μg/ml姜黄素共培养);4:1 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;5:5 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;6:10 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组。*、** 分别表示与 CCl₄对照组相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

图 3 姜黄素对 CCl₄损伤的鲫鱼肝切片中 Alb 和 TP 含量的影响

Fig.3 Effects of curcumin on contents of Alb and TP in CCl₄-treated precision-cut liver slices in *Carassius auratus*



1:空白对照组;2:CCl₄损伤对照组(肝切片与 12 mmol/L CCl₄共培养);3:姜黄素对照组(肝切片与 10 μg/ml姜黄素共培养);4:1 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;5:5 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;6:10 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组。*、** 分别表示与 CCl₄对照组相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

图 4 姜黄素对 CCl₄损伤的鲫鱼肝切片中 SOD、CAT、POD 活性及总抗氧化能力(T-AOC)的影响

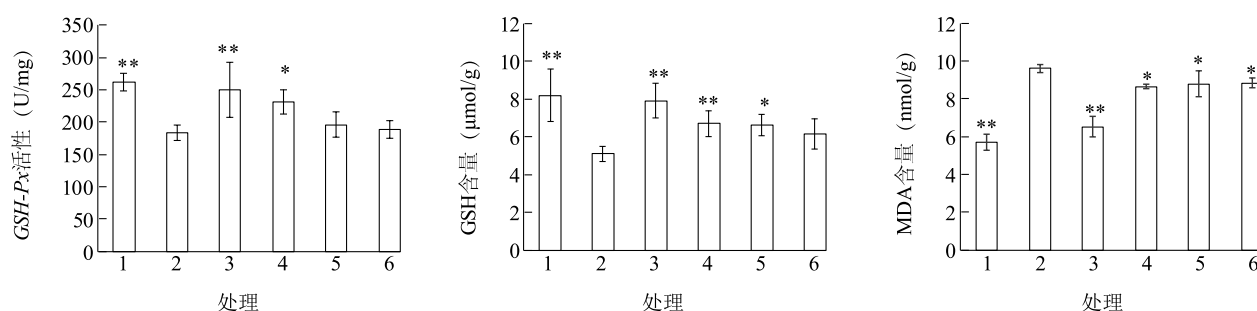
Fig.4 Effects of curcumin on the activities of SOD, CAT and POD and total antioxidant capacity (T-AOC) in CCl₄-treated precision-cut liver slices in *Carassius auratus*

3 讨论

CCl₄是一种常见的肝脏毒物,可诱导肝细胞或组织构建损伤模型^[20-21]。本实验室前期的研究结果显示,CCl₄也适用于鱼类肝损伤模型的构建^[22]。CCl₄主要是经过细胞色素 P450 酶进行代谢,产生三氯甲基和氯自由基,引起脂质过氧化,最终导致肝细胞坏死^[23]。本试验通过 CCl₄损伤鲫鱼肝切片,探讨

姜黄素对肝组织的保护作用及对 Nrf2-ARE 抗氧化通路的影响。

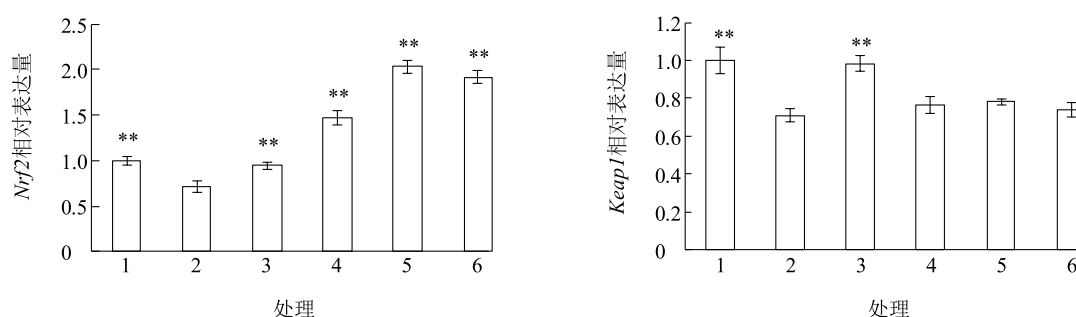
腺苷三磷酸(Adenosine triphosphate, ATP)是生物体内组织细胞生命活动所需能量的直接来源,ATP 含量的变化直接影响器官的能量代谢^[24]。细胞内缺少 ATP,会导致损伤甚至死亡。因此,ATP 含量常作为评价器官活力的重要指标^[25]。本试验中,CCl₄处理后,肝切片活力明显降低,而经不同浓



1:空白对照组;2:CCl₄损伤对照组(肝切片与12 mmol/L CCl₄共培养);3:姜黄素对照组(肝切片与10 μg/ml姜黄素共培养);4:1 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;5:5 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;6:10 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组。*、**分别表示与CCl₄对照组相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

图5 姜黄素对CCl₄损伤的鲫鱼肝切片中GSH-Px活性及GSH和MDA含量的影响

Fig.5 Effects of curcumin on GSH-Px activity and contents of GSH and MDA in CCl₄-treated precision-cut liver slices in *Carassius auratus*



1:空白对照组;2:CCl₄损伤对照组(肝切片与12 mmol/L CCl₄共培养);3:姜黄素对照组(肝切片与10 μg/ml姜黄素共培养);4:1 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;5:5 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组;6:10 μg/ml姜黄素+12 mmol/L CCl₄处理组。*、**分别表示与CCl₄对照组相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

图6 姜黄素对CCl₄损伤的鲫鱼肝切片中Nrf2及Keap1基因表达量的影响

Fig.6 Effects of curcumin on Nrf2 and Keap1 gene expression in CCl₄-treated precision-cut liver slices in *Carassius auratus*

度的姜黄素处理后,肝切片活力有所上升。表明姜黄素可有效抑制四氯化碳对肝组织的损伤。

GPT和GOT为肝脏内两种转氨酶,当肝细胞受到损伤或膜通透性增大时,该酶就会从肝细胞浆中逸出细胞外^[26]。GPT活性升高表明胞浆受损,细胞膜通透性增加,GOT活性升高表明肝细胞线粒体受损^[27-28]。本试验中,经CCl₄处理后,肝切片培养上清液中GPT、GOT、LDH及AKP活性明显上升,表明肝细胞受到损伤。而用姜黄素干预后,这些酶活性显著降低,表明姜黄素可促进鲫鱼肝细胞膜系统的修复。在小鼠的研究中也发现了类似的结果,Naik等^[29]用酒精诱导小鼠肝组织损伤后,GPT、GOT和LDH活性显著升高,而用姜黄素处理后,这些酶活性显著降低。

白蛋白(Albumin, Alb)的合成与分泌是由肝脏实质部分完成的。当肝脏受到自由基(ROS)损害

时,机体内质网的完整性被破坏^[30],蛋白质的合成速率降低。试验结果表明CCl₄可明显降低蛋白质(Alb、TP)含量,这与Folmar等^[31]研究结果一致。姜黄素处理显著抑制CCl₄诱导的Alb和TP含量降低,与宁康健等^[32]研究结果类似,说明姜黄素可以促进蛋白质合成,保护受损伤的肝组织。

诸多研究结果表明,鱼类肝损伤与抗氧化系统的破坏以及脂质过氧化有关^[32-33]。在鱼类中,CCl₄可诱导大量ROS形成,导致抗氧化物质如SOD、CAT和GSH等的大量消耗。同时ROS还可以攻击细胞膜,引起脂质过氧化,导致细胞膜结构和功能的变化^[34]。本试验中也有类似现象,当鲫鱼肝切片在CCl₄中暴露4 h后,其抗氧化物质(SOD、CAT、POD、GSH-Px活性及GSH含量和T-AOC)显著降低,同时脂质过氧化产物MDA含量显著升高,这些变化反映了肝细胞受自由基损坏的程度^[35]。在哺乳动物

中,姜黄素的保肝作用主要与其抗氧化能力相关^[36]。姜黄素通过提高机体抗氧化能力,减少细胞膜受到的损伤,同时改善脂质过氧化作用,发挥保护肝脏的作用^[37-38]。Magda等^[39]研究发现姜黄素可以显著抑制酒精诱导的肝细胞损伤中抗氧化酶(SOD、CAT及GSH-Px)活力的降低。钟越等^[37]也报道姜黄素对CCl₄诱导的脂质过氧化物MDA的产生具有显著的抑制作用。本试验结果显示,1 μg/ml和5 μg/ml姜黄素可抑制鲫鱼肝组织中抗氧化酶(SOD、CAT、POD和GSH-Px)活性以及GSH含量的降低,有利于清除由CCl₄诱导产生的自由基,进而降低脂质过氧化物的形成,保护肝细胞。

Keap1-Nrf2/ARE信号通路对抗氧化酶表达起着调控的作用^[39-40],其中Nrf2是该通路中的关键因子。在细胞质中Nrf2与其负调控蛋白Keap1偶联后以失活状态固定于胞质内,在自由基的作用下,Keap1结构改变,与Nrf2解偶联通过氧化应激调节其转录活性,激活抗氧化反应元件(ARE)和抗氧化酶II相解毒酶,启动下游抗氧化酶基因的转录^[41-43],调控细胞内抗氧化酶的表达,因而Keap1-Nrf2信号通路是抗氧化应激机制中较为重要的通路^[44-45]。CCl₄诱导大鼠肝损伤中,增强Nrf2蛋白表达可显著提高抗氧化酶活性,有效改善肝组织损伤程度^[46-47]。本试验结果显示,CCl₄损伤后,鲫鱼肝组织Nrf2 mRNA、Keap1 mRNA相对含量明显低于空白对照,同时对应的抗氧化酶(SOD、GSH-Px、POD及CAT)活性也明显降低,表明CCl₄诱导的自由基,抑制Keap1基因表达,同时促使Nrf2移出细胞核,导致机体中抗氧化酶表达水平降低^[48]。用姜黄素处理后,肝细胞中Nrf2 mRNA水平升高,其效果随着剂量升高而增加,而Keap1 mRNA增加趋势不明显,说明姜黄素主要通过促进Nrf2基因表达,促进抗氧化酶产生,抑制肝细胞受损。

总之,本研究中1 μg/ml和5 μg/ml姜黄素对CCl₄致鲫鱼肝损伤具有保护作用,其作用机制可能与姜黄素激活Keap1/Nrf2-ARE通路,促进抗氧化蛋白生成,增强机体对自由基清除能力有关。但是,高浓度(10 μg/ml)的姜黄素保肝作用不明显,其原因还需进一步研究。

参考文献:

[1] OTTU O J, ATAWODI S E, ONYIKE E. Antioxidant hepatopro-

TECTIVE AND HYPO-LIPIDEMIC EFFECTS OF METHANOLIC ROOT EXTRACT OF *Cassia singueana* IN RATS FOLLOWING ACUTE AND CHRONIC CARBON TETRACHLORIDE INTOXICATION[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2013, 2: 609-615.

[2] 黄燕平,杨先乐,湛嘉,等. 水产动物疾病控制的研究和进展[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(1): 60-66.

[3] CABELLO F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(7): 1137-1344.

[4] 贾睿,曹丽萍,杜金梁,等. 水飞素对四氯化碳致鲫鱼肝(细胞)损伤的保护和抗氧化作用[J]. 中国水产科学, 2012, 3: 551-560.

[5] 苏岭,刘红柏,王荻,等. 四种复方中药和黄芪多糖对鲫鱼生长、组织中NO含量与NOS活性的影响[J]. 水产学杂志, 2010, (23)3: 11-15.

[6] GALINA J, YIN G, ARD L, et al. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2009, 35(4): 669-676.

[7] LIU X, WANG D, LU T Y. The effects of compound Chinese medicine immune additives on growth performance and antioxidant capacity of *Acipenser schrenckii*[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2012, 4(5): 221-225.

[8] 李霞,宋其林,陈炳卿. 姜黄素抗诱变的研究[J]. 卫生研究, 1998, 27(4): 145-147.

[9] 石晶,顾军,邓心新,等. 姜黄素对大鼠心肌缺血性损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(2): 145-147.

[10] 石晶,王中孝,田亚平,等. 姜黄素对高脂血症大鼠血浆和肝脏超氧化物歧化酶和脂质过氧化物的影响[J]. 中草药, 1997, 28(5): 285-287.

[11] 汪海慧,成扬. 姜黄素药理作用的研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(6): 73-76.

[12] 胡忠泽,杨久峰,谭志静,等. 姜黄素对草鱼生长和肠道酶活性的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2003(11): 29-30.

[13] FRYER J L, LANNAN C N. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes[J]. Journal of Tissue Culture Methods, 1994, 16: 87-94.

[14] HONG Y, SCHARTL M. Establishment and growth responses of early medakafish (*Oryzias latipes*) embryonic cells in feeder layer-free cultures[J]. Molecular Marine Biology & Biotechnology, 1996, 5(5): 93-104.

[15] KELLY R K, MILLER H R, NIELSON O, et al. Fish cell culture: characteristics of a continuous fibroblastic cell line from wall-eye (*Stizostedion vitreum*) [J]. Fish Aquatic Science, 1980, 37: 1070-1075.

[16] 刘永刚,赵进军. 姜黄素对四氯化碳损伤原代培养大鼠肝细胞的影响[J]. 中成药, 2003, 25(3): 222-224.

[17] FAROMBI E O, SHROTRIYA S, NA H K, et al. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1[J]. Food & Chemical Toxicology, 2008, 46(4): 1279-1287.

[18] BALOGAN E, HEQUE M, GONG P, et al. Curcumin activatr

- the haem oxygenase-I gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element[J]. *Biochemical Journal*, 2003,371(3): 887-895.
- [19] LEE H S, LI L, KIM H K, et al. The protective effects of *Curcuma longa* Linn. Extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats via upregulation of Nrf2[J]. *Journal Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(9): 1331-1338.
- [20] MALEKINEJAD H, ALIZADEH A, CHERAGHI H, et al. The protective effect of liquorice plant extract on CCl₄-induced hepatotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Veterinary Research Forum*, 2010, 1(3): 158-165.
- [21] HAN J, GAO C, YANG S, et al. Betanin attenuates carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Fish Physiology & Biochemistry*, 2014, 40(3): 865-874.
- [22] 曹丽萍,贾睿,丁炜东,等. 建鲤急性肝损伤模型的建立及当归提取物的保肝和抗氧化作用研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2012,27(6): 551-557.
- [23] ZHOU J F, CAO D, ZHU Y G, et al. A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chrinic cholestyities[J]. *World Journal Gastroente ROL*, 2000, 6: 501-507.
- [24] 杨吉文,谭小艳,茆永琴,等. 组织细胞内 ATP 的动态变化研究[J]. *现代生物医学进展*, 2009,9(21): 4142-4145.
- [25] 高见,董凌月,安威,等. GFER 抑制四氯化碳对 eHepG2 细胞的损伤[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2015,24(5): 447-451.
- [26] BASU S. Carbon tetrachlotide-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients[J]. *Toxicology*, 2003, 189: 113-127.
- [27] BERRY M N, HALLS H J, GRIVELL M B, et al. Techniques for pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocyte suspensions[J]. *Life Sciences*, 1992,51(1): 1-16.
- [28] ROMERTO F J, BOSCH-MORELL F, ROMERO M J, et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998,106(Suppl5): 1229-1234.
- [29] NAIK R S, MUJUMDAR A M, GHASKADBI S, et al. Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture *in vitro* [J]. *Ethnopharmaacol*, 2004,95(1): 31-37.
- [30] SMUCKLER E A, BENDITT E P. Studies on carbon tetrachloride intoxication. Iii A subcellular defect in protein synthesis[J]. *Biochemistry*, 1965,4(4): 671-679.
- [31] FOLMAR L C, BONOMELLI S, MOODY T, et al. The effect of short-term exposure to three chemicals on the blood chemistry of the pinfish (*Lagodon rhomboides*) [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1993,24(1): 83-86.
- [32] 宁康健,丁建华,代守志,等. 黄芩苷对小鼠四氯化碳肝损伤保护的研究[J]. *畜牧与饲料科学*, 2009,30(1): 4-5.
- [33] 熊文静. 姜黄素的醇提工艺及其对动物的肝保护研究[D]. 武汉:华中农业大学,2016.
- [34] NAYAK S, SASHIDHAR R B. Metabolic intervention of aflatoxin B1 toxicity by curcumin [J]. *Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 641-652.
- [35] 荣爽,李珂,宋方方,等. 姜黄素对乙醇诱导的大鼠原代细胞损伤的防护作用[J]. *环境与健康杂志*, 2009,26(6): 487-489.
- [36] 邹国良. 姜黄素对 CCl₄所致急性肝损伤的保护研究[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2010,8(12): 229-230.
- [37] 钟越,钟秀宏,孙燕美,等. 姜黄素拮抗四氯化碳致肝纤维作用[J]. *中国公共卫生*, 2015,31(4): 447-449.
- [38] E1-AGAMY D S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats [J]. *Archives of Toxicology*, 2010,84(5): 389-396.
- [39] MAGDA K, EZZ, GERMINE M HMDY, et al. The synergistic hepatoprotective effect of curcumin and ginger against carbon tetrachloride induced-liver fibrosis in rats [J]. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2011,5(9): 1962-1971.
- [40] ELISABETH B, MARTHA H, PENGFEI G, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element [J]. *Biochemical*, 2003, 1371(3): 887-895.
- [41] 戈孟雪,屈强,周宏灏,等. 调控 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路的中药有效成分研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015,20(6): 707-712.
- [42] ESMAEILI M A, ALILOU M. Naringenin attenuates CCl₄-induced hepatic inflammation by the activation of an Nrf2-mediated pathway in rats [J]. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*, 2014,41(6): 416-422.
- [43] WU T, LI J, LI Y, et al. Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 2017,41(6): 22-42.
- [44] CHEN B, LU Y, CHEN Y, et al. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries [J]. *J Endocrinol*, 2015, 225(3): 83-99.
- [45] QUE L L, WANG H X, CAO B S, et al. The regulation and functions of transcription factor Nrf2 in cancer chemoprevention and chemoresistance[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2011,20(1): 5-19.
- [46] WU S C, YUAN Y, HUI T, et al. Carthamus red from *Carthamus tinctorius* L. exerts antioxidant and hepatoprotective effect against CCl₄-induced liver damage in rats via the Nrf2 pathway [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013,148: 570-578.
- [47] 宋永周,关键,李明,等. Nrf2介导姜黄素对软骨细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *中国组织工程研究*, 2015,51(19): 8218-8222.
- [48] KEUM Y S, CHOI B Y. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 10074-10089.

(责任编辑:张震林)