姜黄素诱导 Nrf2 核转位对氧化应激诱导人肝细胞胰岛素抵抗的影响 *

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:研究姜黄素诱导转录因子 NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2,Nrf2) 核转位对氧化应激诱导人肝细胞 L02 胰岛素抵抗的影响。方法:用 15 μ M 和 30 μ M 姜黄素干预 L02 肝细胞 6 h 和 l2 h,Western blot 检测 Nrf2 核转位水平;将肝细胞分为对照组、模型组、干预组,对照组用 RPMI1640 正常培养,模型组用 100U / L 葡萄糖氧化酶 (GO) 干预 2 h,干预组用 15 μ M 和 30 μ M 姜黄素分别干预 12 h 后给予 100 U/L GO 干预 2 h,各细胞均给予 100 nM 胰岛素干预 30 min。流式细胞术检测细胞内活性氧簇(ROS),用荧光强度 (FI) 来表示 ROS 水平。分光光度法检测检测细胞 MDA、GSH,葡萄糖氧化酶 - 过氧化物酶法检测细胞培养液中葡萄糖的水平,Western blot 检测胰岛素受体底物 -1 (IRS-l) 磷酸化水平。结果:①姜黄素明显诱导 Nrf2 核转位。②模型组 FI、MDA 水平较对照组显著升高(P<0.01),干预组 FI、MDA 水平均较模型组显著降低(P<0.01),姜黄素 15 μ M 组 FI、MDA 水平高于 30 μ M 组 (P<0.01)。模型组 GSH 水平较对照组显著降低(P<0.01),干预组 GSH 水平较模型组显著升高(P<0.01),姜黄素 15 μ M 组 FI、MDA 水平高于 30 μ M 组 (P<0.01)。③模型组上清液葡萄糖浓度显著高于对照组 (P<0.01),干预组上清液葡萄糖浓度显著低于模型组 (P<0.01),姜黄素 15 μ M 组上清液葡萄糖浓度高于 30 μ M 组 (P<0.01)。模型组 IRS-1 磷酸化水平较对照组降低,干预组 IRS-1 磷酸化水平均较模型组增高,姜黄素 30 μ M 组 IRS-1 磷酸化水平高于 15 μ M 组。结论:姜黄素通过诱导 Nrf2 核转位,降低细胞内氧化应激水平,进而逆转氧化应激诱导的胰岛素抵抗。

关键词:Nrf2;姜黄素;肝细胞系 L02;氧化应激;胰岛素抵抗

中图分类号:R575 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273 (2011) 01-48-04

The Effect of Nrf2 Nuclear Translocation Induced by Curcumine on Oxidative Stress-Mediated Insulin Resistance in Human Hepatocyte*

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 curcumine on oxidative stress mediated insulin resistance (IR) in human LO2 hepatocyte. Methods: The Nrf2 in nuclear fractions was assayed by western blot analysis. The intercellular ROS level was analyzed on a flow cytometer by dihydroethidium and was indicated with fluorescence intensity (FI). The levels of MDA and GSH were measured by spectrophotometric method. The glucose in culture medium was detected by the glucose oxidizes peroxides method. The levels of IRS-1/p-IRS-1 were measured by western blot. Results: ①The levels of Nrf2 in the nucleus increased markedly in hepatocytes treated by curcumine compared with that of the cells in control group. At the same time point, nuclear Nrf2 was higher in cells treated by 30 μ M curcumine than that in cells treated by 15 μ M curcumine. Treated by the same curcumine concentration, the nuclear Nrf2 level was higher in cells treated for 12 h than that in cells treated for 6 h. ②The levels of FI and MDA increased significantly in model compared with that in the control group (P<0.01), both of which were significantly abrogated in curcumine group (P<0.01). However, the levels of FI and MDA in 15 μ M curcumine group were significantly higher than those in 15 μ M curcumine group (P<0.01). Compared with control group, the level of GSH decreased significantly in model group(P<0,01), the decreased GSH levels in model group were significantly abrogated in curcumine group (P<0.01), and the GSH levels in 15 μ M curcumine group were significantly higher than that in 30 μ M curcumine group (P<0.01). ③The glucose in culture medium increased significantly in model group compared with that in control group (P<0.01), the increased level was significantly abrogated in curcumine group (P<0.01). However, the level in 15 μ M curcumine group were significantly lower than that in 30 μ M curcumine group (P<0.01). IRS-1 phosphorylation in model group decreased compared with that in control group and IRS-1 phosphorylation in curcumine group increased in comparison with model group. The level of IRS-1 phosphorylation in 15 μ M curcumine group was markedly lower than that in 30 μ M curcumine group. Conclusion: Curcumine could induce Nrt2 nuclear translocation in cultured hepatocyte L02 and decrease intercellular ROS, subsequently improve oxidative stress-mediated IR.

* 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:2010-10-07 接受日期:2010-10-31)

Key words: Curcumine; Nrf2; L02; Oxidative stress; Insulin resistance
Chinese Library Classification: R575 Document code: A
Article ID: 1673-6273 (2011) 01-48-04

前言

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是肥胖、II 型糖尿病、高脂血症共存的基本病理生理异常。正常情况下,胰岛素与胰岛素受体结合,通过促进胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate,IRS)酪氨酸磷酸化而发挥作用。在多种组织中,氧化应激通过激活多种应激敏感通路,引起 IR,如 JNK 通路活化可增加 IRS-1 的丝氨酸磷酸化、抑制胰岛素刺激的酪氨酸磷酸化,进而抑制胰岛素信号通路转导,产生 IR[1-3]。姜黄素是一种天然的抗氧化物质,能有效促进细胞转录因子 NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2,Nrf2) 核转位[4-7], 从而发挥对氧化应激的保护作用。我们前期研究[8,9]也证实,姜黄素能够诱导人肝细胞 LO2 Nrf2 核转位,降低肝细胞氧化应激水平。那么,姜黄素能否改善氧化应激诱导的肝细胞 IR,目前尚不清楚。本研究观察姜黄素诱导 Nrf2 核转位对氧化应激诱导的肝细胞胰岛素抵抗的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人肝细胞系 LO2 购自中国典型培养物保藏中心 (武汉);姜黄素和葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase,GO)购自美国 Sigma 公司;超氧化物阴离子荧光探针购自江苏碧云天公司;丙二醛 (malondialdehyde,MDA)、还原型谷胱甘肽 (glutathione,GSH) 检测试剂盒购自南京建成公司。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、IRS-1/p-IRS-1 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 姜黄素诱导肝细胞 Nrf2 核转位 用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养 LO2 细胞 48 h 后,将细胞分为对照组、干预组,每组细胞数为 $5x10^6$ 个。对照组正常培养未给予姜黄素干预;干预组用 15 μ M 和 30 μ M 的姜黄素分别干预 6 h 和 12 h,收集细胞,Western-blot 法检测 Nrf2 核转位情况。

1.2.2 姜黄素对肝细胞胰岛素抵抗的影响 将肝细胞分为对照组、模型组、干预组,干预组分别用 15 μ M 和 30 μ M 姜黄素干预,每组细胞数为 $5x10^6$ 个。对照组正常培养未给予任何干预;模型组加入 100 mU/ml 的 GO 干预 2 h 诱导肝细胞氧化应激;干预组加入 15 μ M 和 30 μ M 姜黄素干预 12 h,然后给予 100 mU/ml GO 干预 2 h。各组细胞经 PBS 冲洗 2 遍后,用含 100 nM 胰岛素的 RPMI1640 处理 30 min。

1.2.3 Western-blot 检测 Nrf2、IRS-1/p-IRS-1 蛋白水平 按照核-胞浆蛋白提取试剂盒说明,提取不同处理组别的细胞的胞浆蛋白和核蛋白,Braford 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 、IRS-1/p-IRS-1 一抗 (1:500) 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。

1.2.4 MDA 和 GSH 的检测 收集各组细胞,用硫代巴比妥酸 (TBA) 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。

1.2.5 细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)水平的检测 各组细胞用 4 μ M 的 ROS 荧光探针—二氢乙啶 (Dihydroethidium, DHE) 标记 30 min 后,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,用流式细胞仪检测。最大激发波长 370 nm,最大发射波长 610 nm。ROS 水平用荧光强度(Fluorescence intensity, FI)表示,每 10000 个细胞中阳性标记的细胞个数来表示。

1.2.6 细胞上清液残余葡萄糖检测 收集不同组别细胞培养取上清液,用葡萄糖氧化酶 - 过氧化物酶法 (GOD-POD) 法检测培养液中残存的葡萄糖含量。

1.3 统计学分析

各组所得计量数据采用均数± 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 姜黄素对肝细胞 Nrf2 核转位的影响

姜黄素干预 12 h 后,干预组核内 Nrf2 蛋白水平均较对照组增加,其中 30 μ M 姜黄素诱导作用优于 15 μ M,各浓度时 12 h 诱导作用优于 6 h。各组胞浆 Nrf2 蛋白水平无明显差别 (图 1)。

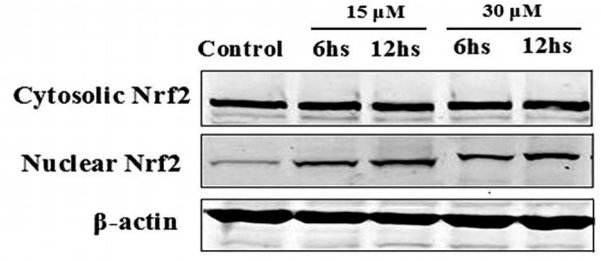

图 1 姜黄素对肝细胞 Nrf2 核转位的影响

Fig.1 Effect of curcumine on Nrf2 nuclear translocation in hepatocytes

2.2 姜黄素诱导 Nrf2 核转位对肝细胞氧化应激水平的影响

模型组 FI、MDA 较对照组显著升高 ($P<0.01$),干预组 FI、MDA 显著低于模型组 ($P<0.01$),高于对照组 ($P<0.01$)。姜黄素干预组内 30 μ M 组 FI、MDA 显著低于 15μ M 组 ($P<0.01$)。模型组 GSH 较对照组显著减低 ($P<0.01$),干预组 GSH 较模型组显著升高 ($P<0.01$),但干预组 GSH 显著低于对照组 ($P<0.01$),姜黄素干预组内 30 μ M 组 GSH 水平显著高于 15 μ M 组 ($P<0.01$) (表 1)。

表 1 各组细胞氧化应激及葡萄糖水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of level oxidative stress and glucose of each group ($\bar{x}\pm s$)

	对照组 (control group)	模型组 (model group)	姜黄素干预组 (curcumine group)	
			15μM	30μM
FI	111.74± 9.28	280.31± 7.89*	207.09± 12.23*#	172.30± 11.91*#
MDA (nM)	700.32± 120.45	3110.25± 259.51*	2560.72± 290.42*#	1660.41± 280.40*#
GSH (μM)	21.02± 0.84	8.90± 1.42*	12.35± 1.25*#	15.08± 1.21*#
Glucose(mM)	10.75± 0.13	17.56± 0.38	15.11± 0.34*#	14.09± 0.17*#

注：与对照组比较，*P<0.01；与模型组比较，#P<0.01，与干预组 15μM 比较，P<0.01

Note : *P<0.01, compared with control group; #P<0.01, compared with model group; P<0.01, compared with curcumine 15μM group.

2.3 姜黄素诱导 Nrf2 核转位对肝细胞胰岛素抵抗的影响

模型组上清液残余葡萄糖浓度较对照组显著升高 (P<0.01)，姜黄素干预组上清液残余葡萄糖浓度均较模型组显著降低 (P<0.01)，但干预组上清液残余葡萄糖浓度仍显著高于对照组 (P<0.01)，姜黄素干预组内 30μM 组葡萄糖水平显著低于 15μM 组 (P<0.01) (表 1)。

模型组的 IRS-1 磷酸化水平较对照组降低，干预组 IRS-1 磷酸化水平均较模型组增高，但仍低于对照组，干预组内 30μM 组 IRS-1 磷酸化水平高于 15μM 组 (P<0.01)。非磷酸化的 IRS-1 各组间未见明显差别 (图 2)。

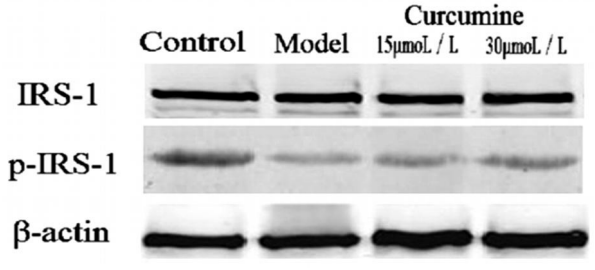

图 2 姜黄素对肝细胞 IRS-1 磷酸化水平的影响

Fig.2 Effect of curcumine on the level of IRS-1 phosphorylation in hepatocytes

3 讨论

IR 是肥胖、II 型糖尿病、高脂血症共存的基本病理生理异常，非酒精性脂肪性肝病 (Non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD) 患者存在周围组织和肝脏的 IR，严重程度与 NAFLD 病情进展相关。正常情况下，胰岛素与胰岛素受体结合，通过促进 IRS 酪氨酸磷酸化而发挥作用，氧化应激可通过活化氧化应激敏感性信号通路引起 IR。

姜黄素能有效促进细胞 Nrf2 核转位，发挥其多种细胞保护作用[4-7]。我们前期研究[8,9]也证实，姜黄素能够诱导人 LO2 肝细胞 Nrf2 核转位，降低肝细胞氧化应激水平。本研究结果表明，GO 预处理肝细胞 LO2 可以引起细胞内 ROS 水平增高，诱导 IR。姜黄素通过诱导的 Nrf2 核转位，降低细胞内活性氧的水平，从而减轻氧化应激诱导的 IR。

Nrf2 与其细胞质接头蛋白 Keap-1 是细胞抗氧化反应的中枢调节者。Nrf2 通过调节编码抗氧化蛋白和 II 相代谢酶的表达，发挥其对细胞氧化应激的保护作用[10-12]。DHE 被肝细胞摄入后，在细胞内产生溴化乙锭，溴化乙锭与 RNA 或 DNA 结合产生红色荧光，荧光强度反映了细胞内 ROS 水平。MDA 作为脂质过氧化产物之一，反映体内脂质过氧化的程度，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，其下降程度也能反映细胞氧化损伤程度。本研究通过 GO 与培养基中葡萄糖反应产生的 H_2O_2 对细胞造成氧化应激，引起细胞内 ROS、MDA 增高，GSH 降低，细胞培养液葡萄糖浓度增高，产生胰岛素抵抗，姜黄素干预能改善这些异常。提示姜黄素通过促进 Nrf2 核转位，减低氧化应激损伤，改善氧化应激诱导的肝细胞 IR。

氧化应激导致 IRS-1 磷酸化水平减低，而姜黄素干预可改善 IRS-1 磷酸化水平，且与姜黄素浓度相关，30μM 干预效果优于 15μM，与 30μM 促进更多 Nrf2 核转位，降低 ROS 程度更明显有关。氧化应激引起 IR 与其激活多种氧化应激敏感性通路有关。肝细胞中，ROS 可激活 c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun N-terminal kinasse，JNK) 通路，增加 IRS-1 的丝氨酸磷酸化、抑制胰岛素刺激的酪氨酸磷酸化，进而抑制胰岛素信号通路转导，产生 IR[1-3]。

本研究结果显示，姜黄素诱导的 Nrf2 核转位，能够减轻肝细胞氧化应激水平，进而改善氧化应激诱导的 IR。

参考文献(References)

[1] Kaneto H, Katakami N, Kawamori D, et al. Involvement of Oxidative Stress in the Pathogenesis of diabetes [J] . Antioxid Redox Signal, 2007,9:355-366

[2] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance[J]. Nature,2002,420:333-336

[3] Beyer TA, Xu W, Teupser D,et al . Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance [J]. EMBO J, 2008,27(1): 212-223

[4] 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

[5] 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

[6] 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

[7] Pugazhenthi S, Akhov L, Selvaraj G, et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression by demethoxy curcuminoids through Nrf2 by a PI3-kinase/Akt-mediated pathway in mouse beta-cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007,293: E645-55

[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]胃肠病学和肝病学杂志,2010,19(2):154-156
Li Qiang, Zhao Shu-guang, Wang Xu-xia, et al. Effect of curcumine 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] 李强,赵曙光,王旭霞,等. 姜黄素对人肝细胞氧化应激及胰岛素抵抗的影响[J].山西医科大学学报,2010, 42(4):300-303,382
Li Qiang, Zhao Shu-guang, Wang Xu-xia, et al. Effect of curcumine on intracellular reactive oxygen species and insulin resistance in cultured human hepatocytes [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2010, 42(4):300-303,382 (In Chinese)

[10] Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression[J]. Free Radic Biol Med, 2004,36:1199-1207

[11] Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001,98:4611-4616

[12] Itoh K, Chiba T, Takahashi S. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the inductionof phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements[J].Biochemical,1997,24(30): 313-322

(上接第 83 页)

[4] Zampeli, E. and E. Tiligada. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders [J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(1): 24-33

[5] Cricco G, Mohamad NA, Sambuco LA, et al. Histamine regulates pancreatic carcinoma cell growth through H3 and H4 receptors [J]. Inflamm Res, 2008, 57 Suppl 1: S23-24

[6] Medina V, Croci M, Crescenti E, et al. The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7 (1): 28-35

[7] Boer K, Helinger E, Helinger A, et al. Decreased expression of histamine H1 and H4 receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine [J]. Eur J Cell Biol, 2008, 87(4): 227-236

[8] Wirts CW. Histamine gastric analysis as a screening method in gastric cancer detection[J]. Am J Med Sci, 1955, 229(1): 1-7

[9] La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, et al. Histamine-2-receptor antagonists and gastric cancer risk[J]. Lancet, 1990, 336(8711): 355-357

[10] Sander LE, Lorentz A, Sellge G, et al. Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract[J]. Gut, 2006, 55(4): 498-504

[11] Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408

[12] Kenneth J, Livak TDS. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-Delta Delta CT Method [J]. METHODS, 2001, 25: 402-408

[13] Masini E, Fabbroni V, Giannini L, et al. Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage[J]. Inflamm Res, 2005, 54 Suppl 1: S80-1

[14] Medina MA, Quesada AR, Nunez de Castro I, et al. Histamine, polyamines, and cancer [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 57 (12): 1341-1344