

姜黄素调控 Cav-1 抑制 Ang II 诱导的人肝星状细胞 LX-2 焦亡和活化缓解肝纤维化

宋爽, 赵婷婷, 李晓英, 张秀芝, 李宁宁*

河南医学高等专科学校, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 运用网络药理学结合体外实验探讨姜黄素对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的肝星状细胞系 LX-2 焦亡和活化的影响, 为姜黄素治疗肝纤维化提供参考。 **方法** 应用网络药理学筛选姜黄素对 LX-2 细胞活化作用的关键靶点和通路。体外培养 LX-2 细胞, Ang II ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导活化 24 h 后加药, 经 CCK-8 法筛选后, 确定姜黄素加药浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 药物干预 48 h; 显微镜下观察细胞形态; Hoechst 33342/PI 染色法观察细胞焦亡; DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧 (ROS) 含量; ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-18 水平; 采用 Western blotting 检测细胞中焦亡相关蛋白 [NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3 (NLRP3)、半胱氨酸蛋白酶 (Caspase)-1、gasdermin D-N (GSDMD-N)、IL-18、IL-1 β]、肝纤维化相关蛋白 [胶原蛋白 I (Collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)] 和小窝蛋白-1 (Cav-1) 蛋白表达。使用 GV146-CAV1 质粒过表达 Cav-1, 设置对照组、模型组、姜黄素 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、CAV1 组、姜黄素 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + CAV1 组, ELISA 法检测细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平; Western blotting 检测焦亡相关蛋白、肝纤维化相关蛋白和 Cav-1 蛋白的表达。 **结果** 共获得 13 个姜黄素和 LX-2 活化共有靶点。蛋白质-蛋白质互作网络 (PPI) 网络中的 IL-1 β 为核心靶点。基因本体 (GO) 富集分析发现姜黄素干预 LX-2 活化与小窝 (caveola) 等多种生物功能相关。京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 结果显示, 细胞焦亡密切相关的 NOD 样受体信号通路与 PPI 网络中的核心靶点 IL-1 β 紧密联系。体外实验表明, 与模型组相比, 姜黄素能够显著抑制活化状态下的 LX-2 细胞增殖, 显著下调肝纤维化相关蛋白 Collagen-I 和 α -SMA 水平, 显著改善 LX-2 细胞焦亡, 显著降低 LX-2 细胞内 ROS 含量, 显著降低 Ang II 诱导 LX-2 细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平, 显著下调 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-18 和 IL-1 β 蛋白表达水平, 显著上调 Cav-1 蛋白表达, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 此外, 过表达 Cav-1 能够降低 Ang II 诱导 LX-2 细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平 ($P < 0.01$), 下调焦亡相关蛋白和 Collagen-I 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01)。 **结论** 姜黄素抑制 Ang II 诱导的 LX-2 活化减轻肝纤维化, 机制可能与调控 Cav-1 密切相关。

关键词: 姜黄素; LX-2 活化; 细胞焦亡; 小窝蛋白-1; 肝纤维化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)10-2841-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.10.012

Curcumin inhibits Ang II induced pyroptosis and activation of human hepatic stellate cells LX-2 by regulating caveolin-1

SONG Shuang, ZHAO Tingting, LI Xiaoying, ZHANG Xiuzhi, LI Ningning

Henan Medical College, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of curcumin on pyroptosis and activation of hepatic stellate cell line LX-2 induced by angiotensin II (Ang II) using network pharmacology combined with *in vitro* experiments, and to provide a reference for the treatment of liver fibrosis with curcumin. **Methods** Network pharmacology was used to screen the key targets and pathways of curcumin on the activation of LX-2 cells. LX-2 cells were cultured *in vitro*, and after 24 h of activation induced by Ang II ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), curcumin was added. After screening by CCK-8 method, the curcumin concentration was determined to be 5, 10, and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the drug intervention lasted for 48 h. Cell morphology was observed under a microscope; pyroptosis was observed by Hoechst 33342/PI staining, intracellular reactive oxygen species (ROS) content was detected by DCFH-DA fluorescent probe, levels of interleukin (IL)-

收稿日期: 2025-04-19

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (222102310408); 河南省科技攻关项目 (252102310135)

作者简介: 宋爽 (1983—), 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为中医药治疗肝纤维化的机制。E-mail: songsvip@163.com

*通信作者: 李宁宁 (1982—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为慢性肝损伤的防治机制。E-mail: ningning0703@126.com

IL-1 β and IL-18 in the cell supernatant were detected by ELISA, expressions of pyroptosis-related proteins [NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3), caspase-1, gasdermin D-N (GSDMD-N), IL-18, IL-1 β], liver fibrosis-related proteins [collagen type I (Collagen-I), α -smooth muscle actin (α -SMA)], and caveolin-1 (Cav-1) were detected by Western blotting. The GV146-CAV1 plasmid was used to overexpress Cav-1, and the control group, model group, curcumin (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, CAV1 group, and curcumin (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + CAV1 group were set up. Levels of IL-1 β and IL-18 in the cell supernatant were detected by ELISA, expressions of pyroptosis-related proteins, liver fibrosis-related proteins, and Cav-1 were detected by Western blotting. **Results** A total of 13 common targets of curcumin and LX-2 activation were obtained. IL-1 β was the core target in the protein-protein interaction (PPI) network. Gene Ontology (GO) enrichment analysis revealed that curcumin intervention on LX-2 activation was related to multiple biological functions such as caveola. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) results showed that the NOD-like receptor signaling pathway closely related to cell pyroptosis was closely linked to the core target IL-1 β in the PPI network. *In vitro* experiments showed that compared with the model group, curcumin could significantly inhibit the proliferation of activated LX-2 cells, significantly down-regulate the levels of liver fibrosis-related proteins Collagen-I and α -SMA, significantly improve LX-2 cell pyroptosis, significantly reduce intracellular ROS content, significantly reduce the levels of IL-1 β and IL-18 in the LX-2 cell supernatant induced by Ang II, significantly down-regulate the expression levels of NLRP3, caspase-1, GSDMD-N, IL-18, and IL-1 β proteins, and significantly up-regulate the expression of Cav-1 protein, and the differences were statistically significant ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); In addition, overexpression of Cav-1 could reduce the levels of IL-1 β and IL-18 in the LX-2 cell supernatant induced by Ang II ($P < 0.05, 0.01$), and down-regulate the expressions of pyroptosis and liver fibrosis-related proteins ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Curcumin inhibits Ang II-induced LX-2 activation and alleviates liver fibrosis, likely through the regulation of Cav-1, although the specific mechanisms require further investigation.

Key words: curcumin; LX-2 activation; pyroptosis; caveolin-1; liver fibrosis

血管紧张素 II (Ang II)、转化生长因子 β (TGF- β) 刺激肝星状细胞 (HSC) 的激活与肝纤维化密切相关, 抑制 HSC 的活化是抗肝纤维化的有效策略^[1-2]。细胞焦亡是一种细胞程序性死亡方式, 表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂, 并会伴随白细胞介素 (IL) -1 β 等大量促炎症因子的释放。研究表明, IL-1 β 与 HSC 的活化密切相关, 通过使用 IL-1 β 中和抗体能够显著抑制 HSC 的活化^[3-4]。此外, HSC 焦亡也会导致肝纤维化相关蛋白胶原蛋白 I (Collagen I) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 高表达^[5]。肝纤维化的发生发展与 HSC 焦亡密切相关。研究表明, 肾素-血管紧张素系统 (RAS) 在肝纤维化过程中发挥重要作用, 其关键分子 Ang II 可激活 HSC 系 LX-2 细胞, 促进肝纤维化进程^[6]。

姜黄素是从姜科植物姜黄的根茎中提取的多酚类化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗癌和抗动脉粥样硬化等多种药理活性^[7]。研究表明, 姜黄素能够明显降低肝纤维化发生发展密切相关的 HSC 的激活^[8]。然而, 有关姜黄素抗肝纤维化的作用机制尚不完善。因此, 本研究基于网络药理学探索姜黄素抗肝纤维化的作用靶点, 并采用 Ang II 体外干预 LX-2 细胞构建模型, 进一步探讨姜黄素抑制 HSC 激活的分子机制, 为姜黄素治疗肝纤维化提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人源肝星状细胞系 LX-2 (iCell-h128) 购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。

1.2 主要试剂

姜黄素 (批号 08511, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自 Sigma 公司; Ang II (货号 VTY25704) 购自 Virtue-Clara 公司; LY294002 (货号 HY-10108) 购自 MCE 公司; RPMI 1640 基础培养基 (货号 11875093) 购自于 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS, 货号 AFD500) 购自于赛文创新生物科技有限公司; DCFH-DA 活性氧检测试剂盒 (货号 S0033S)、CCK-8 试剂盒 (货号 C0037)、Hoechst33342/PI 染色试剂盒 (货号 C1056) 购自于碧云天生物技术有限公司; IL-18 (货号 KE00193)、IL-1 β (货号 KE00021) ELISA 检测试剂盒、鼠抗 NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3 (NLRP3, 货号 27458-1-AP)、兔抗 Collagen I (货号 14695-1-AP)、 α -SMA (货号 14395-1-AP)、半胱氨酸蛋白水解酶 (Caspase) -1 (货号 22915-1-AP)、IL-18 (货号 10663-1-AP)、IL-1 β (货号 16806-1-AP)、小窝蛋白-1 (Cav-1, 货号 27458-1-AP)、山羊抗兔二抗 (货号 SA00001-2) 抗体购自于 Proteintech 公司; 兔抗 gasdermin D-N (GSDMD-N, 货号 ab215203) 抗体购至于 Abcam 公司。

1.3 主要仪器

ix 73 倒置荧光显微镜 (Olympus 公司); FC 型酶标仪、Forma 3 系列 CO₂ 培养箱 (Thermo Fisher 公司); ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统、Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳系统 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

通过 PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 和 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>) 数据库进行姜黄素靶点预测。通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库以“LX-2 cell activation”为关键词等得到 LX-2 活化靶点。LX-2 活化靶点与姜黄素靶点取交集得到共有靶点; 通过 STRING (<https://STRING-db.org>) 进行蛋白质-蛋白质互作网络 (PPI) 网络构建, 导入 Cytoscape 3.9.1 构建网络模型并分析; 通过 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行基因本体 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。

2.2 LX-2 细胞的培养、模型构建及给药

LX-2 细胞在 RPMI 1640 完全培养基 (含 10% FBS) 中, 置于 37 °C、5% CO₂、湿度 70%~80% 的恒温培养箱中常规培养。细胞模型构建: RPMI 1640 基础培养基配制 Ang II (10 μmol·L⁻¹), 刺激 LX-2 细胞 24 h^[9]。细胞给药: 将浓度为 10 mmol·L⁻¹ 的姜黄素母液 [溶剂为二甲基亚砷 (DMSO)] 加入 RPMI 1640 完全培养基 (DMSO 体积分数小于 0.1%) 后, 涡旋混匀至所需浓度。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖率

姜黄素浓度筛选: LX-2 细胞以每孔 5×10³ 个接种于 96 孔板中, 贴壁后姜黄素 (2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μmol·L⁻¹) 干预 48 h。

造模后姜黄素浓度筛选: LX-2 细胞以每孔 5×10³ 个接种于 96 孔板中, 贴壁后使用 10 μmol·L⁻¹ Ang II 刺激 LX-2 细胞 24 h 后^[9], 采用姜黄素 2.5、5.0、10.0、20.0 μmol·L⁻¹ 干预 LX-2 细胞 48 h。

干预完成后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 置于培养箱中孵育 1 h。采用酶联免疫检测仪在波长为 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算每组细胞的存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 Hoechst 33342/PI 染色法

LX-2 细胞以每孔 2×10⁴ 个接种于 6 孔板中, 贴壁后分为对照组、模型组和姜黄素低、中、高浓度 (5、10、20 μmol·L⁻¹) 组, 除对照组外, 使用 10 μmol·L⁻¹ Ang II 刺激 LX-2 细胞 24 h; 然后姜黄素组加药干预 48 h, 对照组和模型组加入等量的 DMSO。处理完成后, 显微镜下观察细胞形态。加入 4 °C 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 每孔加入染色液 (5 μL·mL⁻¹ Hoechst 染色液和 5 μL·mL⁻¹ PI 染色液) 覆盖, 4 °C、避光孵育 25 min 后, 4 °C PBS 洗涤 1 次, 并于荧光显微镜下观察和拍照。使用 Image-Pro Plus 软件分析荧光强度。

2.5 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧 (ROS) 含量

按“2.4”项下方法, 细胞接种、分组、造模及给药处理后, 使用无血清培养基将 10 mmol·L⁻¹ DCFH-DA 稀释成 10 μmol·L⁻¹。去除细胞培养液后, 加入 1 mL 10 μmol·L⁻¹ DCFH-DA, 于 37 °C 细胞培养箱中孵育 20 min, 无血清培养基洗涤细胞 3 次, 充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 并于荧光显微镜下观察和拍照。使用 Image-Pro Plus 软件分析荧光强度。

2.6 ELISA 检测细胞上清液中炎症因子水平

按“2.4”项下方法, 细胞接种、造模及给药处理后, 收集各组细胞上清液, 按照 IL-1β 和 IL-18 的 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测各组细胞炎症因子的释放水平。

2.7 Western blotting 检测焦亡、纤维化相关蛋白表达

按“2.4”项下方法, 细胞接种、造模及给药处理后, 收集细胞, 裂解液抽提总蛋白质, 测定蛋白质浓度。采用 Western blotting 检测细胞中焦亡相关蛋白 (NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-18、IL-1β)、肝纤维化相关蛋白 (Collagen I、α-SMA) 和 Cav-1 蛋白表达。总蛋白进行 6%~15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以恒定电流 290 mA 转膜至 PVDF 膜上; 室温下 5% 脱脂奶粉封闭膜 3 h, 用相应的一抗 4 °C 孵育膜过夜; 洗涤后换二抗室温孵育 2 h 洗涤后采用化学发光辣根过氧化物酶底物显影; 使用 Image-Pro Plus 软件分析蛋白质条带积分灰度值。

2.8 细胞转染实验

LX-2 细胞以每孔 2×10⁴ 个接种于 6 孔板中, 贴壁后分为对照组、模型组、姜黄素组、CAV1 组、姜

黄素+CAV1 组。使用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ang II 刺激 LX-2 细胞 24 h, 姜黄素组加入 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素干预 48 h; CAV1 组转染 GV146-CAV1, 姜黄素+CAV1 组转染 GV146-CAV1 的同时加药姜黄素。使用 GeneChem 公司(中国上海)合成的 GV146-CAV1 质粒进行过表达 Cav-1: LX-2 细胞每孔加入 $2.5 \mu\text{g}$ 的 GV146-CAV1 质粒与 $7.5 \mu\text{L}$ 的 Lipofectamine 3000, 在无血清培养基中孵育 6 h 后, 换为 RPMI 1640 完全培养基。

ELISA 检测细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平; Western blotting 检测焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β 和肝纤维化相关蛋白 Collagen I、 α -SMA 以及 Cav-1 蛋白的表达。

2.9 统计学处理

用 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据分布的正态性和方差齐性分别以 Kolmogorov-Smirnov 和 Levene 检验确定。两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间有差异进一步采用 SNK-*q* 检验进行两两比较。

3 结果

3.1 网络药理学研究

3.1.1 姜黄素-LX-2 活化共有靶点 通过 PharmMappe 等数据库得到 142 个姜黄素相关靶点。通过 NCBI 和 GeneGeneCards 等数据库删除重复后得到 354 个 LX-2 活化相关靶点。构建韦恩图得到 13 个姜黄素-LX-2 活化共有靶点。见图 1。

3.1.2 姜黄素-LX-2 活化网络构建 将 PPI 导入 Cytoscape3.8.1 进行可视化, 该网络中的核心靶点 IL-1 β 与细胞焦亡密切相关。见图 2。

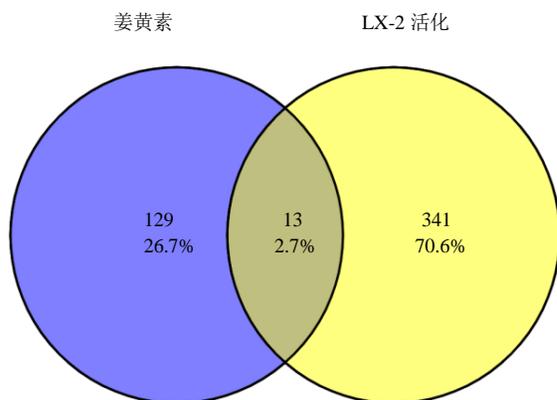


图 1 姜黄素-LX-2 活化共有靶点韦恩图
Fig. 1 Venn diagram illustrating common targets of Curcumin-LX-2 activation

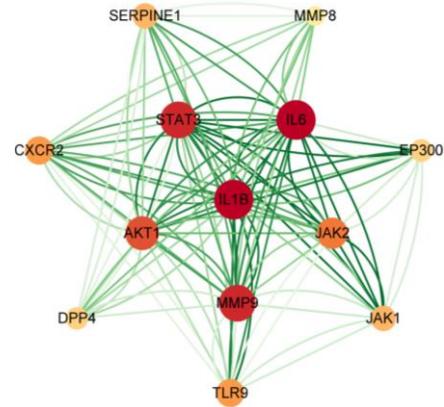


图 2 姜黄素-LX-2 活化共有靶点相互作用网络
Fig. 2 Curcumin-LX-2 activation shared target interaction network

3.1.3 姜黄素-LX-2 活化的靶点的 GO 富集分析 对姜黄素对 LX-2 活化的靶点进行 GO 富集分析, 分别得到 1 355 个生物进程 (BP)、5 个细胞组成 (CC)、36 个分子功能 (MF), 根据 $P < 0.05$, 选出排名靠前的条目。见图 3。Go 富集分析发现姜黄素抑制 LX-2 细胞焦亡与细胞组成中的小窝 (caveola) 密切相关。

3.1.4 姜黄素-LX-2 活化的靶点的 KEGG 富集分析 姜黄素活化 LX-2 细胞的通路涉及 34 条, 根据 $P < 0.05$, 选出排名前 10 的通路 (图 4)。其中, 主要涉及 NOD 样受体信号通路、PI3K/AKT 信号通路、Toll 样受体信号通路等。其中 NOD 样受体信号通路中的 IL-1 β 是 PPI 网络中的核心靶点, 与细胞焦亡密切相关。

3.2 体外实验研究

3.2.1 姜黄素对 LX-2 增殖的影响 如图 5-A 所示, 与对照组比较, $2.5 \sim 20.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素对 LX-2 细胞增殖无显著影响, 而 $30 \sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素具有细胞毒性 ($P < 0.05, 0.01$)。

如图 5-B 所示, 与对照组比较, 模型组 LX-2 细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, $5, 10, 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素可显著抑制活化状态下的 LX-2 细胞增殖 ($P < 0.05, 0.01$), 后续实验选取 $5, 10, 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.2.2 姜黄素对 Ang II 干预后 LX-2 细胞形态的影响 结果如图 6 所示, 对照组细胞生长状态良好; 模型组细胞表现出较小的肿胀 (焦亡垂体), 并在质膜破裂前产生多个气泡状突起, 呈现典型的细胞焦亡特征; 经过姜黄素干预后, 发生焦亡的细胞数量较模型组减少, 且呈浓度相关性。

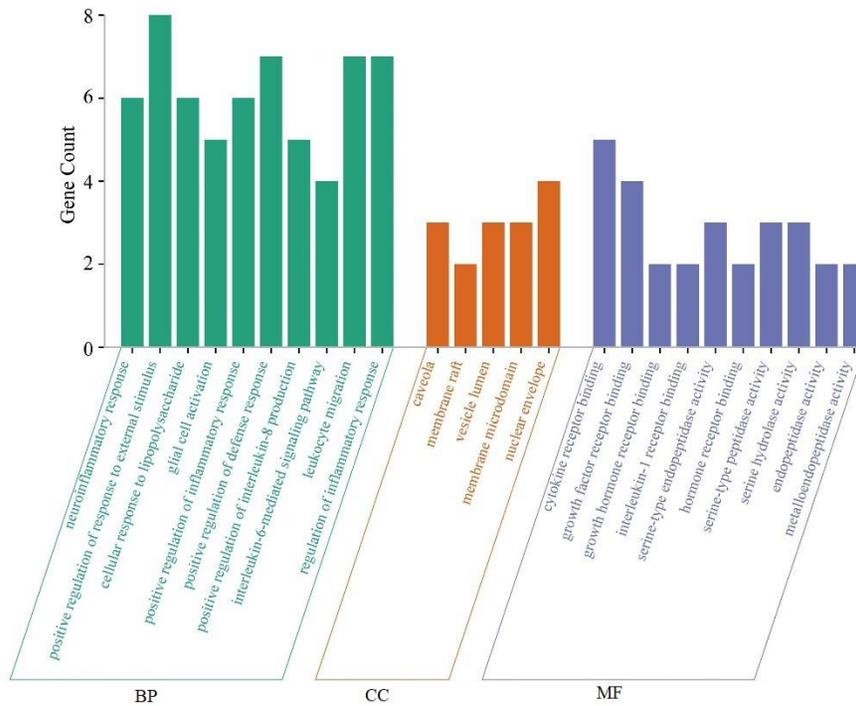


图 3 姜黄素-LX-2 活化靶点 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO functional enrichment analysis of curcumin-LX-2 activation

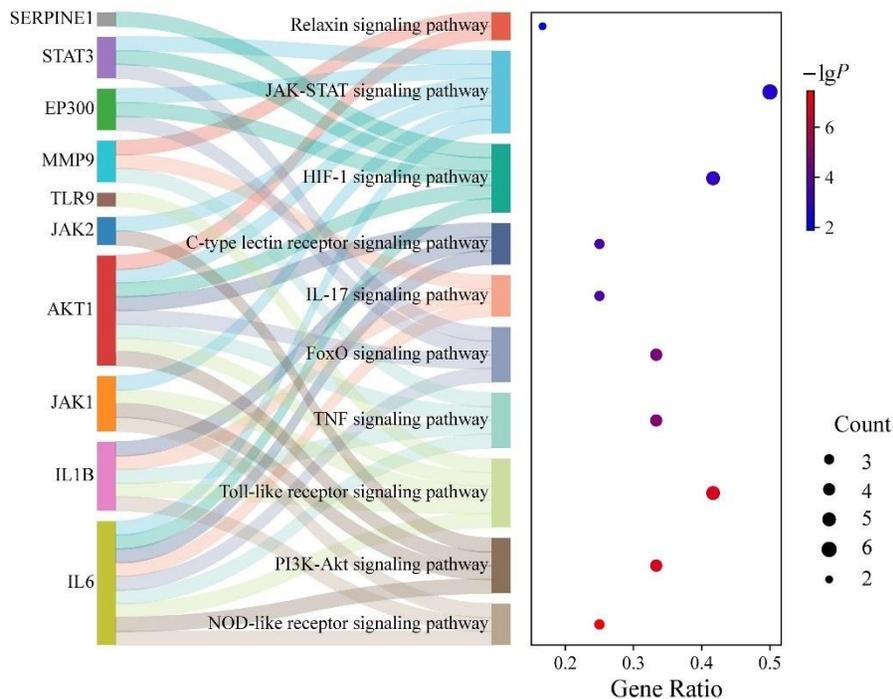
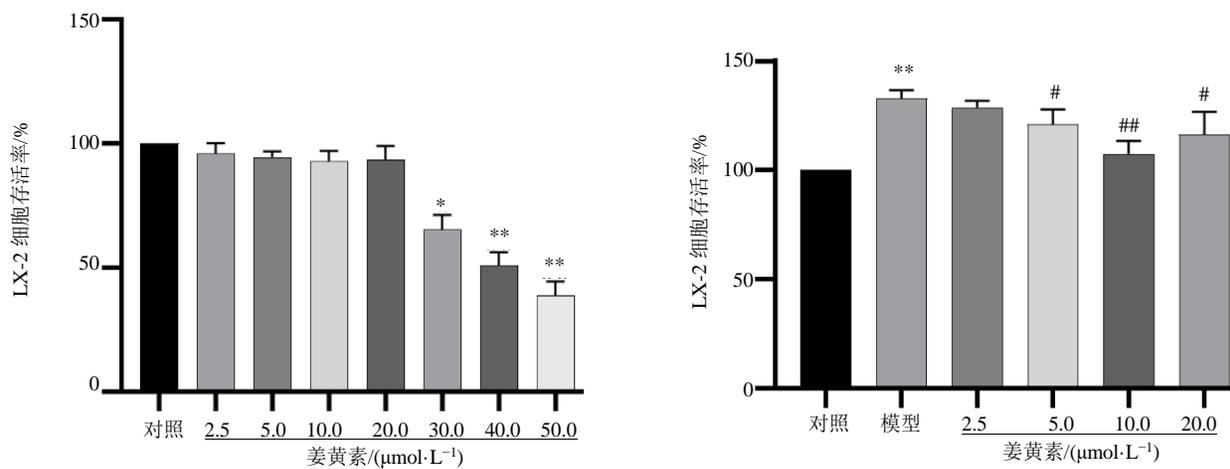


图 4 姜黄素-LX-2 活化靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of curcumin-LX-2 activation

3.2.3 姜黄素对 Ang II 干预后 LX-2 细胞肝纤维化相关蛋白的影响 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组肝纤维化相关蛋白 Collagen- I 和 α -SMA 水平

显著增加 ($P < 0.01$); 10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素干预后, 与模型组相比, 上述肝纤维化相关蛋白表达水平平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 5 不同姜黄素浓度处理对 LX-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 5 Effects of different concentrations of curcumin on proliferation of LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

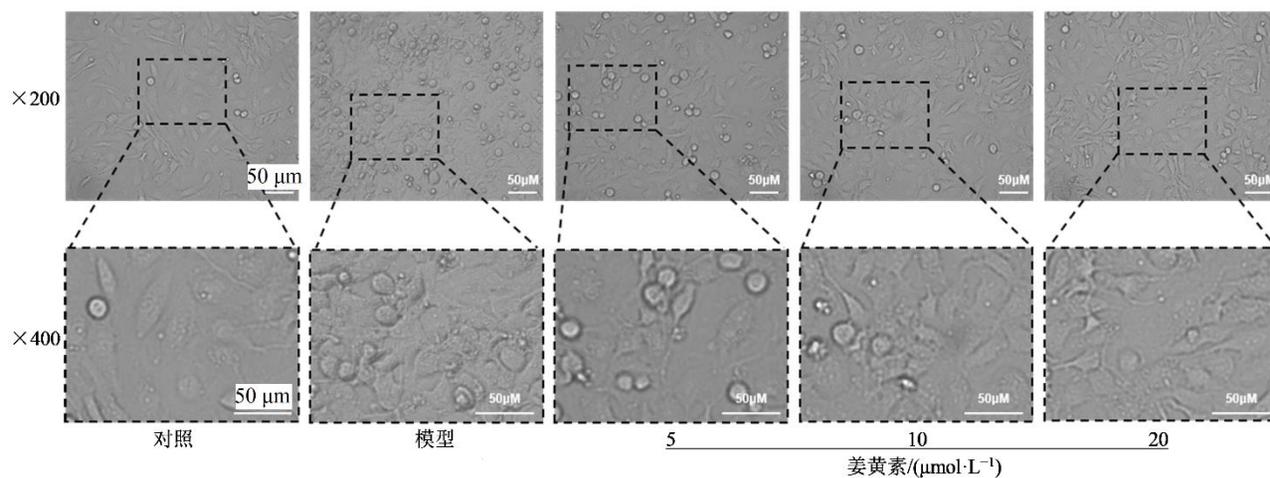
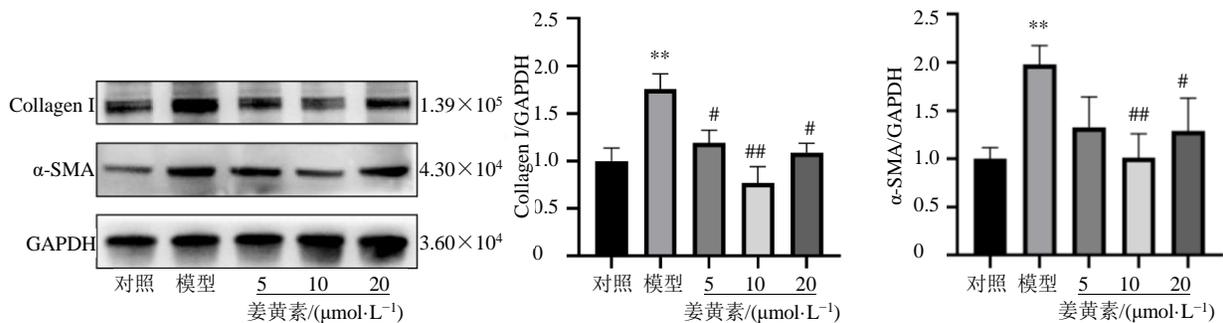


图 6 姜黄素对 Ang II 干预后 LX-2 细胞形态的影响

Fig. 6 Effects of curcumin on morphology of LX-2 cells after Ang II intervention.



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 7 姜黄素对 LX-2 细胞肝纤维化相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

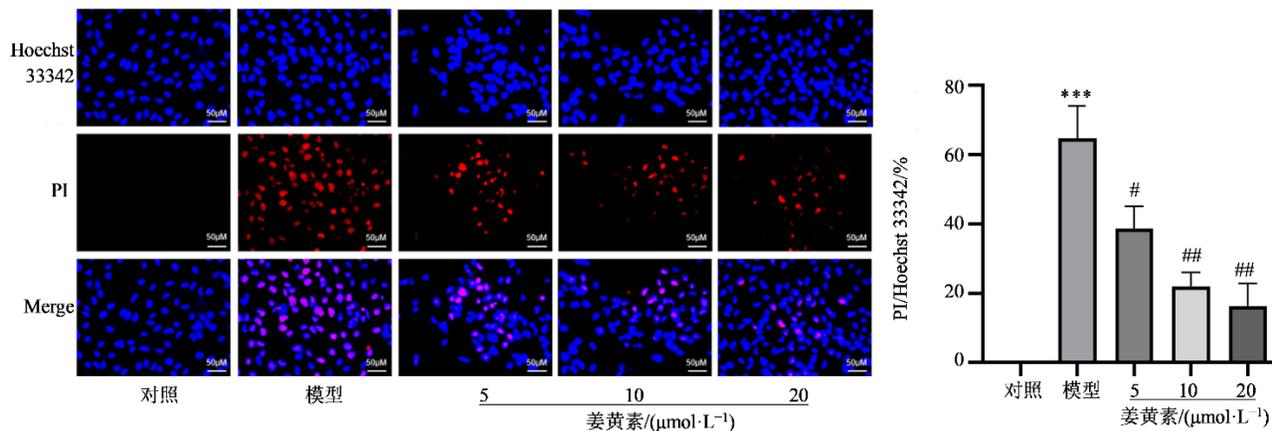
Fig. 7 Effects of curcumin on fibrosis-related proteins in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.4 姜黄素抑制 LX-2 细胞发生焦亡 Hoechst 33342 能够通过完整的细胞膜而显蓝光, PI 仅能通过受损的细胞膜并嵌合到双链 DNA 和 RNA 的碱基对中显示红光。如图 8 所示, 与对照组相比, 模型组中荧光颜色呈高红色 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 低、中、高浓度姜黄素组红色荧光强度降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈浓度相关性。

3.2.5 姜黄素对 LX-2 细胞 ROS 的影响 通过 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内 ROS 含量, 结果显

示 (图 9), 与对照组相比, 模型组 ROS 含量显著增加 ($P < 0.001$), 与模型组相比, 低、中、高浓度姜黄素组荧光强度显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且呈现一定的浓度相关性。

3.2.6 姜黄素对 LX-2 细胞炎症因子的影响 如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 水平显著增加 ($P < 0.001$); 不同浓度姜黄素干预后, 与模型组相比, 上述炎症因子水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

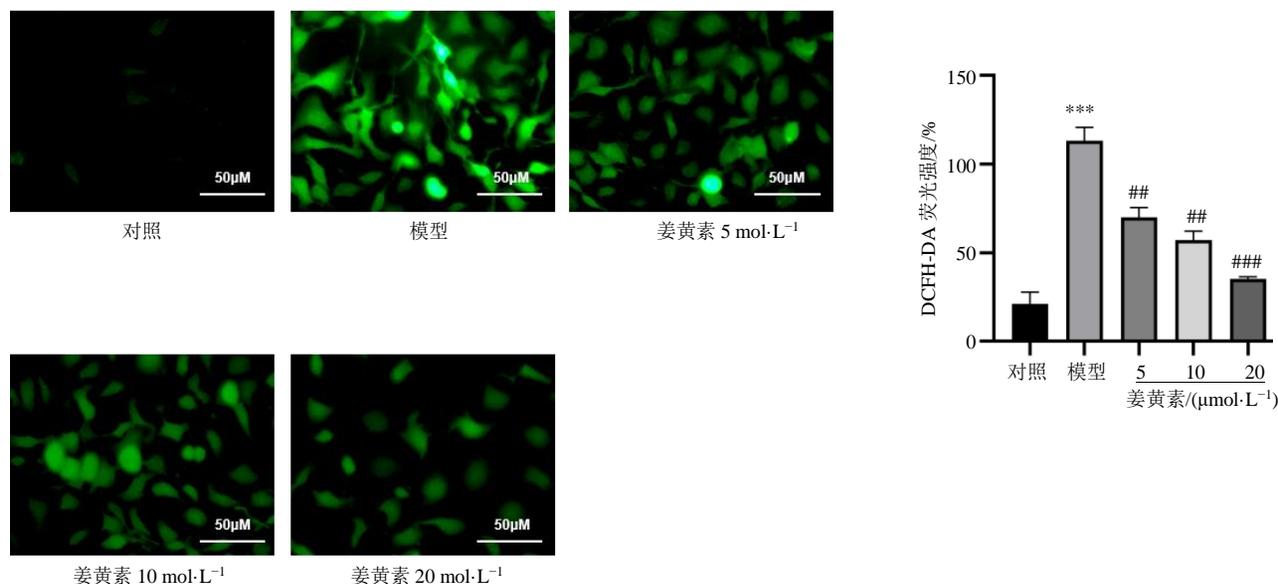


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 8 姜黄素对 LX-2 细胞焦亡的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effects of curcumin on pyroptosis of LX-2 cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

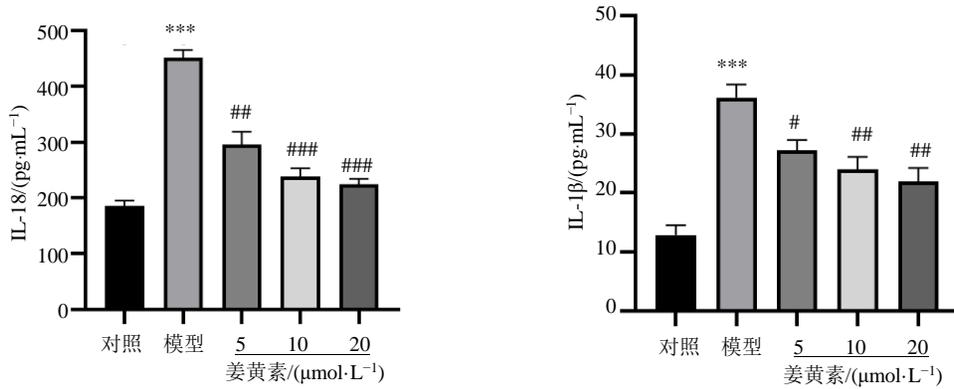


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 9 姜黄素对 LX-2 细胞 ROS 的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effects of curcumin on ROS in LX-2 cells ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



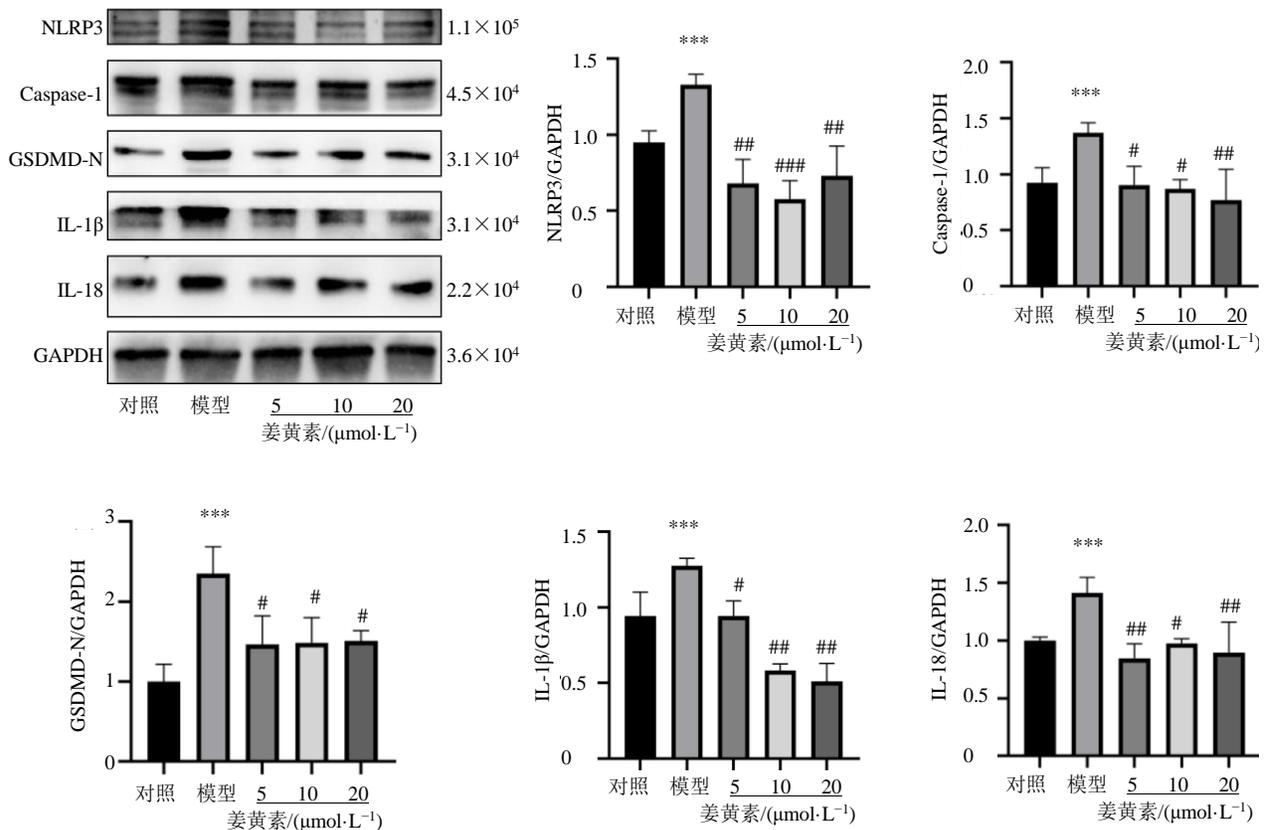
与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 10 姜黄素对 LX-2 细胞炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effects of curcumin on inflammatory factors in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.7 姜黄素对 Ang II 干预后 LX-2 细胞焦亡相关蛋白的影响 如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、

IL-1β、IL-18 水平显著增加 ($P < 0.001$); 不同浓度姜黄素干预后, 与模型组相比, 上述细胞焦亡相关蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 11 姜黄素对 LX-2 细胞焦亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Effects of curcumin on pyroptosis related proteins in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.8 姜黄素抑制 Ang II 诱导的 LX-2 细胞焦亡与 Cav-1 相关 Go 富集分析发现姜黄素抑制 LX-2 细胞焦亡与细胞组成中的小窝 (caveola) 密切相关。如图 12 所示, 与对照组比较, 模型组 Cav-1 表达降低 ($P < 0.05$); 不同浓度姜黄素干预后, 与

模型组相比, Cav-1 表达升高 ($P < 0.05$)。因此, 本研究进一步采用 GV146-CAV1 转染, 过表达 LX-2 细胞中的 Cav-1 进行验证, 结果表明 GV146-CAV1 干预后, LX-2 细胞中 Cav-1 的表达升高, 可用于后续实验。

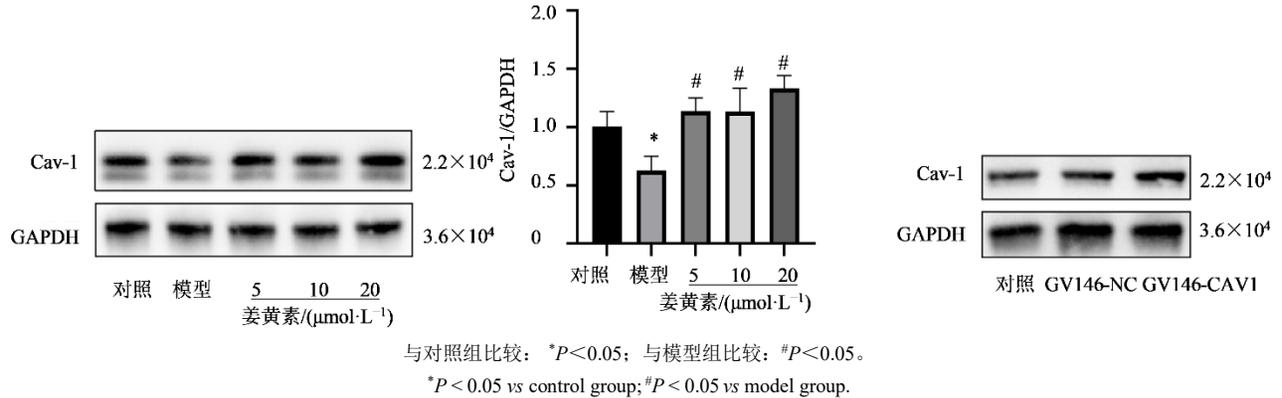


图 12 姜黄素抑制 Ang II 诱导的 LX-2 细胞焦亡与 Cav-1 相关 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 12 Curcumin inhibits Ang II-induced pyroptosis in LX-2 cells related to Cav-1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.9 姜黄素通过调控 Cav-1 可降低 Ang II 诱导的 LX-2 细胞炎症因子水平 结果如图 13 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 水平增加 ($P < 0.001$); 且姜黄素干预后, 与

模型组相比, 上述炎症因子水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 转染 GV146-CAV1 后, 过表达 Cav-1 可降低上述炎症因子水平 ($P < 0.01$), 且与姜黄素组无显著性差异。

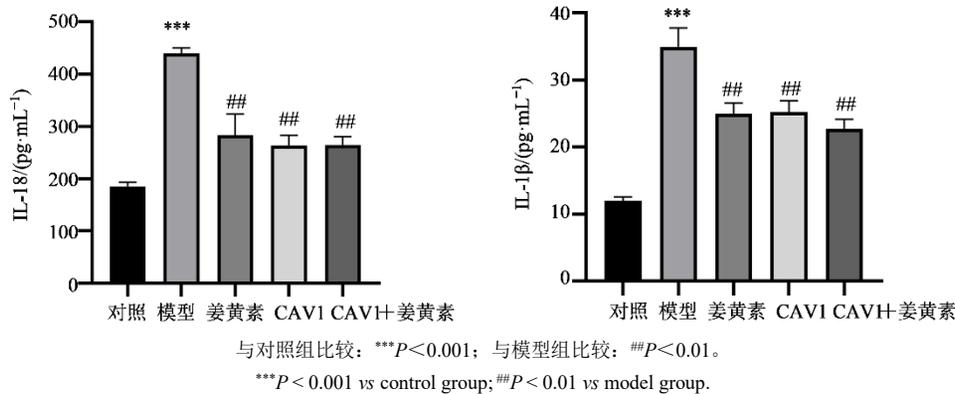


图 13 姜黄素通过调控 Cav-1 降低 Ang II 诱导的 LX-2 细胞炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 13 Effect of curcumin on levels of inflammatory factors in Ang II-induced LX-2 cells by regulating Cav-1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.10 Cav-1 在姜黄素抑制 LX-2 细胞焦亡中的作用 如图 14 所示, 与对照组比较, 模型组焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18 和纤维化相关蛋白 Collagen-I 和 α -SMA 表达显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), Cav-1 表达显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 姜黄素组、姜黄素+CAV1 组焦亡和纤维化相关蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 、0.01), Cav-1 表达升高 ($P < 0.05$ 、0.01); 转染 GV146-CAV1 后, 过表达 Cav-1 可降低焦亡相关蛋白和 Collagen-

I 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01)。与姜黄素组比较, 姜黄素+CAV1 组 Cav-1 表达显著升高 ($P < 0.05$), Collagen-I、NLRP3、GSDMD-N 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与 CAV1 组比较, α -SMA、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 表达显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

肝纤维化是肝硬化和肝细胞癌等疾病的发展基础, 其能够通过早期及时有效的措施抑制促肝纤维化因子被逆转^[10]。研究表明姜黄素能够通过不

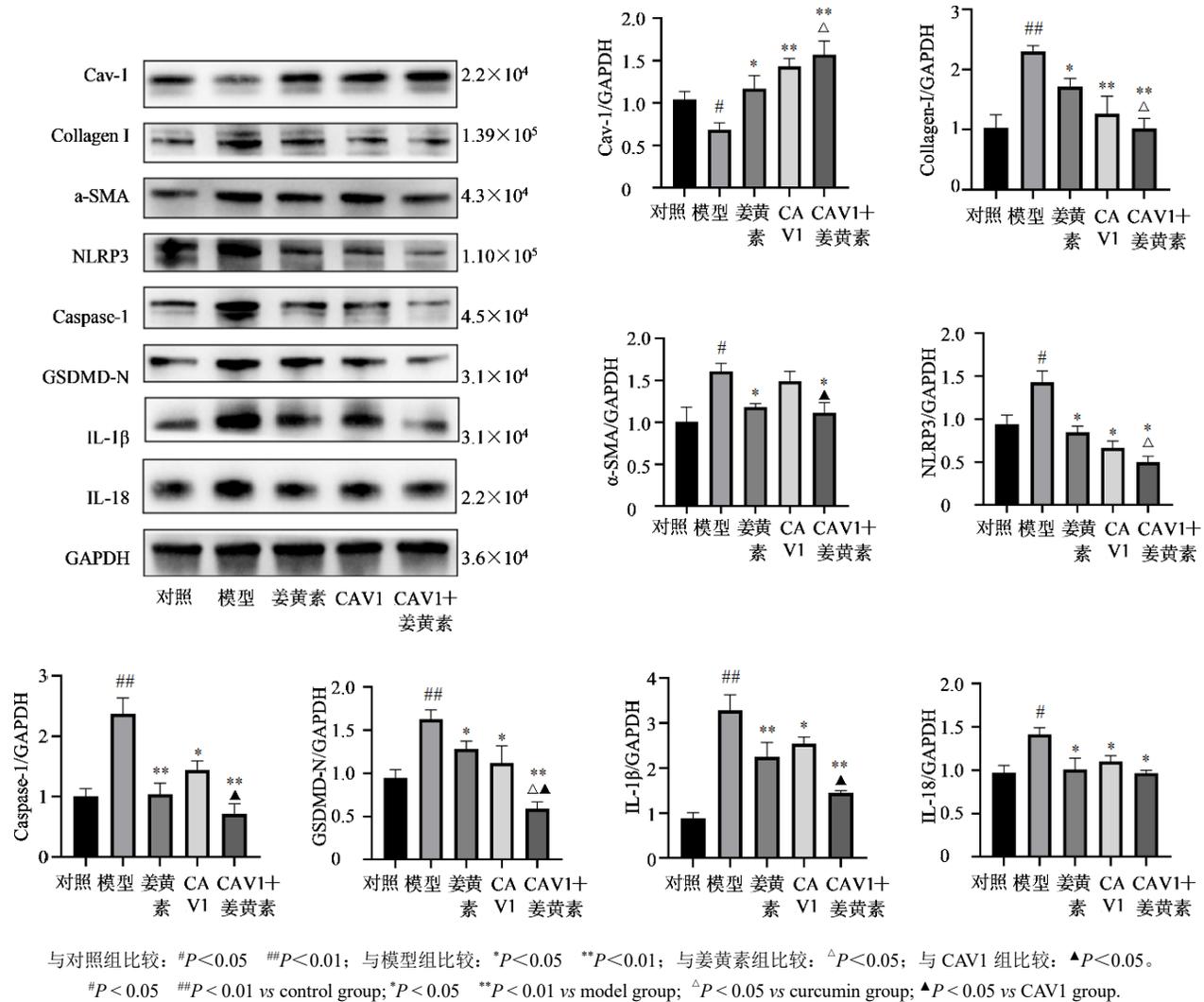


图 14 Cav-1 在姜黄素抑制 LX-2 细胞焦亡中的作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 14 Role of Cav-1 in curcumin inhibiting pyroptosis of LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

同的途径抑制 TGF- β 诱导的 HSC 活化, 抑制肝纤维化^[11-12]。然而 HSC 的活化不仅与 TGF- β 的刺激相关, Ang II 也是其活化的一个关键刺激因素, 但目前尚未发现姜黄素对 Ang II 诱导的 HSC 活化是否有抑制作用的相关研究。因此, 探索姜黄素抑制 Ang II 诱导 HSC 活化介导的肝纤维化具有重要的意义。

基于此, 本研究首先通过相关实验探索姜黄素对 Ang II 刺激 LX-2 活化后增殖和肝纤维化相关蛋白的影响, 结果显示, 不同浓度的姜黄素能够抑制 LX-2 细胞的增殖, 并且姜黄素能够显著降低肝纤维化相关蛋白 Collagen-I 和 α -SMA 的表达。提示姜黄素能够抑制 Ang II 诱导 LX-2 活化介导的肝纤维化。为了进一步研究姜黄素治疗肝纤维化的相关靶点和机制, 本研究采用网络药理学方法进行初步探

索。结合 PPI 网络和 KEGG 富集分析发现, 姜黄素抑制 LX-2 活化与关键靶点 IL-1 β 和关键通路 NOD 样受体信号通路密切相关。并且上述靶点和通路与细胞焦亡密切相关^[13]。谢泽宇等^[14]也发现, Ang II 能够通过诱导 HSC-LX-2 细胞焦亡, 进而激活 LX-2 细胞。细胞焦亡是一种程序性细胞死亡, 表现为细胞肿胀破裂进而释放大量 IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子并激活强烈的炎症反应^[15]。并且本研究通过 Hoechst 33342/PI 实验也证实, Ang II 能够通过诱导 LX-2 细胞发生焦亡并释放 IL-1 β 和 IL-18 炎症因子, 而姜黄素干预后, 细胞焦亡数量减少, 且细胞释放的 IL-1 β 和 IL-18 炎症因子水平显著降低, 表明姜黄素能够抑制 Ang II 诱导的 LX-2 细胞焦亡。另有研究表明, Ang II 能够通过促进 ROS 的生成诱导肝纤维化的发生发展^[16]。此外, ROS 也是 NLRP3

炎症小体活化的关键调控信号, NLRP3 激活剂能够促进 ROS 产生, 并且生成的 ROS 能够协同激活 NLRP3 炎症小体, 进而诱导 Caspase-1 依赖性细胞焦亡^[17]。细胞焦亡是 Gasdermin 介导的重要的天然免疫组成部分, 包括 Caspase-1 依赖性的经典焦亡途径和 Caspase-4/5/11 介导的非经典焦亡途径^[18]。其中, NLRP3 是介导经典焦亡途径的一种模式识别受体, 当其被内源性或外源性的信号刺激后, 能够与 Caspase-1 通过接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 结合, 激活 Caspase-1, 活化的 Caspase-1 一方面切割 Gasdermin D (GSDMD), 形成 N 端片段 (GSDMD-N), GSDMD-N 能够和细胞膜上的磷脂蛋白结合, 形成孔洞, 释放内容物, 诱导焦亡; 另一方面, 活化的 Caspase-1 对 IL-1 β 和 IL-18 的前体进行切割, 形成有活性的 IL-1 β 和 IL-18, 并释放到细胞外, 造成炎症反应^[19]。本实验结果表明, 姜黄素能显著降低 Ang II 诱导的 LX-2 细胞内 ROS 含量, 并下调 LX-2 细胞 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 蛋白水平。上述结果表明, 姜黄素可通过调控 NLRP3/Caspase-1 途径抑制 Ang II 诱导的 LX-2 活化, 减轻肝纤维化。GO 富集分析结果显示, 姜黄素抑制 LX-2 活化与细胞组成中的小窝 (caveola) 密切相关。Caveolae 是细胞膜上形态呈球状或瓶状的小囊泡状结构, Caveolae 由脂质和特定的蛋白质组成。Cav-1 是 Caveolae 的主要结构蛋白, 负责其形成和维持。Cav-1 不仅是 Caveolae 的结构成分, 还参与调节多种细胞信号通路, 包括参与脂质代谢、细胞增殖和凋亡等^[20]。本研究发现, 姜黄素能够促进 Ang II 刺激 LX-2 活化后细胞中 Cav-1 的表达, 使用 GV146-CAV1 转染 LX-2 后, 结果显示, LX-2 中过表达 Cav-1 能够显著降低 Ang II 诱导 LX-2 细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 炎症因子水平。此外, GV146-CAV1 和姜黄素单独干预均可抑制 Ang II 诱导的 LX-2 焦亡和活化, 且同时干预具有一定的协同作用。提示姜黄素可能通过调控 Cav-1 抑制 Ang II 诱导的 LX-2 焦亡和活化进程。

姜黄素可能通过调控 Cav-1 抑制焦亡减轻 Ang II 诱导的 LX-2 细胞活化, 缓解肝纤维化进程。本研究为姜黄素治疗肝纤维化提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Roehlen N, Crouch E, Baumert T F. Liver fibrosis:

Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.

[2] Higashi T, Friedman S L, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 27-42.

[3] Zhang Y P, Wang Y, Di L Q, et al. Mechanism of interleukin-1 β -induced proliferation in rat hepatic stellate cells from different levels of signal transduction [J]. *APMIS*, 2014, 122(5): 392-398.

[4] Li J J, Xue J C, Wang D P, et al. Regulation of gasdermin D by miR-379-5p is involved in arsenite-induced activation of hepatic stellate cells and in fibrosis via secretion of IL-1 β from human hepatic cells [J]. *Metallomics*, 2019, 11(2): 483-495.

[5] Kong D L, Kong F Y, Liu X Y, et al. Soluble egg antigen of *Schistosoma japonicum* induces pyroptosis in hepatic stellate cells by modulating ROS production [J]. *Parasit Vectors*, 2019, 12(1): 475.

[6] Xie Z Y, Xu Y X, Yao L. Angiotensin II can trigger HSC-LX2 pyroptosis through both classical and non-classical pathways [J]. *Life Sci*, 2022, 307: 120878.

[7] Corson T W, Crews C M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: Triumphs and trials [J]. *Cell*, 2007, 130(5): 769-774.

[8] Chan Y T, Wang N, Tan H Y, et al. Targeting hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis by natural products: Is it the dawning of a new era?[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 548.

[9] 陈杭萍, 董文珠, 曹晓倩, 等. 合欢皮-白蒺藜药对对 Ang II-ROS 诱导下 HSC-LX2 细胞增殖及 PKC/Nrf2/HO-1 通路的影响 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2020, 44(3): 240-246, 251.

Chen H P, Dong W Z, Cao X Q, et al. Effect of albizzia cortex-Tribulus terrestris drug pair on HSC-LX2 cell proliferation and PKC/Nrf2/HO-1 pathway induced by Ang II-ROS [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2020, 44(3): 240-246, 251.

[10] Friedman S L, Bansal M B. Reversal of Liver fibrosis -- fact or fantasy ? [J]. *Hepatology*, 2006: 82-88.

[11] 王国泰, 李京涛, 魏海梁, 等. 姜黄素通过抑制 TGF- β /smad2 信号通路抑制人肝星状细胞纤维化作用研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(4): 422-427.

Wang G T, Li J T, Wei H L, et al. Curcumin inhibits fibrosis of human hepatic stellate cells by inhibiting TGF- β /smad2 signaling pathway [J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36(4): 422-427.

[12] Abolfazli S, Butler A E, Jamialahmadi T, et al. A golden shield: The protective role of curcumin against liver fibrosis [J]. *Curr Med Chem*, 2025, 32(10): 1987-

- 2004.
- [13] Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 642-654.
- [14] 谢泽宇, 许一笑, 郑梦圆, 等. 基于网络药理学探究合欢皮-白蒺藜药对抑制肝星状细胞系 LX2 的抗凋亡作用 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(2): 481-491.
- Xie Z Y, Xu Y X, Zheng M Y, et al. Anti-pyroptosis effect of *Albiziae Cortex-Tribuli Fructus* combination on hepatic stellate cell line LX2: Based on network pharmacology [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(2): 481-491.
- [15] Kovacs S B, Miao E A. Gasdermins: Effectors of pyroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9): 673-684.
- [16] Huang Y, Li Y, Lou A N, et al. Alamandine attenuates Liver fibrosis by regulating autophagy induced by NOX4-dependent ROS [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(7): 853-869.
- [17] Tian K J, Yang Y, Zhou K, et al. The role of ROS-induced pyroptosis in CVD [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1116509.
- [18] Rao Z P, Zhu Y T, Yang P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer [J]. *Theranostics*, 2022, 12(9): 4310-4329.
- [19] Coll R C, Schroder K, Pelegrín P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(8): 653-668.
- [20] Xing Y, Wen Z, Gao W, et al. Multifaceted functions of host cell Caveolae/Caveolin-1 in virus infections [J]. *Viruses*, 2020, 12(5): 487.

[责任编辑 兰新新]