

李林明, 张子平, 王若璇, 等. 姜黄素对过氧化氢诱导的罗非鱼肝细胞热休克蛋白基因表达的影响 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (9): 1030–1036.

LI L M, ZHANG Z P, WANG R X, et al. Effect of Curcumin on *HSP* Expression in Tilapia Hepatocytes under Hydrogen Peroxide Stress [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (9): 1030–1036.

姜黄素对过氧化氢诱导的罗非鱼肝细胞热休克蛋白基因表达的影响

李林明^{1,2}, 张子平^{1,2*}, 王若璇^{1,2}, 黄一帆³

(1. 福建农林大学海洋研究院福建省海洋生物技术重点实验室, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学海洋学院, 福建 福州 350002; 3. 福建农林大学福建省兽医中药与动物保健重点实验室, 福建 福州 350002)

摘 要:【目的】探究热休克蛋白基因在氧化应激和姜黄素作用下的表达差异, 了解姜黄素药效的发挥与热休克蛋白基因表达变化的关系, 进一步探讨热休克蛋白对氧化应激条件下鱼类肝细胞中的功能, 为鱼类氧化应激的毒理学机制及姜黄素的药理学机制提供理论资料。【方法】对 24 h 姜黄素预处理 (保护组) 与无姜黄素预处理 (对照组) 的罗非鱼肝细胞分别进行 0、1、2.5 h 的 H_2O_2 应激, 并对肝细胞 5 种高分子热休克蛋白基因 (*HSP70*、*HSP90 α* 、*HSP90 β* 、*HSP60*、*HSP75*) 和 5 种小分子热休克蛋白基因 (*HSP30*、*HSPB1*、*HSPB7*、*HSPB8*、*HSPB11*) 的表达水平进行 qPCR 检测。【结果】与不经 H_2O_2 处理 (0 h) 相比, H_2O_2 作用 1 h 能显著提升 *HSPB1* 表达量, 降低 *HSP30* 表达量; H_2O_2 作用 2.5 h 能显著提升 *HSP90 α* 、*HSPB1* 的表达量。姜黄素预处理 24 h 能显著提升 *HSP70*、*HSP90 α* 、*HSP30*、*HSPB1* 的表达量; 姜黄素预处理 24 h 后再进行 H_2O_2 应激 1 h 时, *HSP70*、*HSP90 α* 、*HSP30* 的表达量显著高于 H_2O_2 单独应激 (对照组); 姜黄素预处理 24 h 后再进行 H_2O_2 应激 2.5 h 时, *HSP90 α* 、*HSP30*、*HSPB1* 的表达量显著高于 H_2O_2 单独应激。其余热休克蛋白在试验过程中无显著差异。【结论】 H_2O_2 单独应激可引起罗非鱼肝细胞 *HSP90 α* 、*HSP30*、*HSPB1* 基因的表达量变化, 而姜黄素预处理能提高多种热休克蛋白基因的表达, 提高了罗非鱼肝细胞的抗氧化能力, 最终抵御 H_2O_2 引起的氧化应激并维持细胞活力。

关键词: 罗非鱼; 姜黄素; 热休克蛋白; 氧化应激

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 09-1030-07

Effect of Curcumin on *HSP* Expression in Tilapia Hepatocytes under Hydrogen Peroxide Stress

LI Linming^{1,2}, ZHANG Ziping^{1,2*}, WANG Ruoxuan^{1,2}, HUANG Yifan³

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Fujian Province, Institute of Oceanology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. College of Marine Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 3. Fujian Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine and Animal Health, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: 【Objective】Expression of heat shock protein (HSP) gene under oxidative stress in the presence of curcumin was studied to understand the toxicological function of the protein and the pharmacological mechanism of curcumin in hepatocytes of *Oreochromis nilotica*. 【Methods】Tilapia hepatocytes and those pretreated with curcumin for 24 h were subjected to H_2O_2 stress for 0, 1, or 2.5 h. The expressions of *HSP70*, *HSP90 α* , *HSP90 β* , *HSP60*, and *HSP75*, as well as 5 small molecule HSP genes, i.e., *HSP30*, *HSPB1*, *HSPB7*, *HSPB8*, and *HSPB11*, in the cells were determined by qPCR. 【Results】The H_2O_2 treatment for 1 h significantly increased the expression of *HSPB1* and decreased that of *HSP30* in the tilapia hepatocytes, while the treatment that lasted for 2.5 h significantly increased the expressions of *HSP90 α* and *HSPB1*. A pretreatment of curcumin

收稿日期: 2023-02-13 修回日期: 2023-06-21

作者简介: 李林明 (1985—), 男, 博士, 实验师, 主要从事水产动物药理学相关研究, E-mail: 444853510@qq.com

* 通信作者: 张子平 (1964—), 男, 博士, 教授, 主要从事水产生物技术相关研究, E-mail: zhangziping@fafu.edu.cn

基金项目: 福建省高校领军人才项目 (660160010); 福建省自然科学基金项目 (2023J01488)

for 24 h on the cells not only significantly elevated the expressions of *HSP70*, *HSP90α*, *HSP30*, and *HSPB1* over control but also on those of *HSP70*, *HSP90α*, and *HSP30* under 1 h H_2O_2 stress, as well as those on *HSP90α*, *HSP30*, and *HSPB1* under 2.5 h H_2O_2 stress. However, no significant differences in other HSPs were observed. 【Conclusion】 As a spontaneous response of tilapia hepatocytes to oxidative stress, H_2O_2 affected significantly the expressions of *HSP90α*, *HSP30*, and *HSPB1* in the cells. By pretreating the hepatocytes with curcumin, expressions of these genes could be uplifted boosting the cellular antioxidant capacity to better resist the stress and maintain viability.

Key words: Tilapia; curcumin; heat shock proteins; oxidative stress

0 引言

【研究意义】热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSP) 是一类较为保守的蛋白质超家族。早期人们发现温度上升会使得细胞内的这种蛋白质的表达量升高, 于是称其为热休克蛋白^[1]。HSP 常以分子伴侣的形式参与蛋白质的折叠、转运和降解^[2-4]。HSP 家族成员众多, 根据其分子量的大小可以分为两类, 即高分子量 HSP (如 *HSP90*、*HSP70*、*HSP60* 等) 和小分子量 HSP (sHSP)^[5]。sHSP 又包含有组织特异性表达的 *HSPB2*、*HSPB3*、*HSPB4*、*HSPB7* 等和无组织特异性表达的 *HSPB1*、*HSPB5*、*HSPB6*、*HSPB8* 等^[5-6]。鱼类作为一种重要的水生动物, 其对水环境中的温度、盐度、氧气等环境因子高度依赖。面对复杂环境, 热休克蛋白的调节对鱼类适应环境有着特殊的意义。越来越多的研究表明热休克蛋白能诱导鱼类细胞响应各种环境因子胁迫, 如高温^[7]、低氧^[8]、声波^[9]、污染物暴露^[10-12]、病原体感染^[13] 等。因此, 探究热休克蛋白在鱼类对抗应激方面的作用机制对于鱼类的毒理学研究和药物研发有着现实意义。【前人研究进展】外界环境的不利因素会引起养殖鱼类的氧化应激^[14]。氧化应激产生的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 作用于蛋白质会导致氨基酸碳链断裂、二硫键形成以及其他的氧化修饰, 从而改变蛋白质的高级结构, 最终导致蛋白质失活。热休克蛋白常参与蛋白质的折叠与对错误折叠蛋白质的降解等生物学过程, 因此在氧化应激过程中构象异常的蛋白质能否被热休克蛋白重新折叠或降解是维持细胞存活的必要条件之一^[15]。研究表明氧化应激能改变鱼类热休克蛋白的基因表达, 例如, 铜和镉作用下鲤 (*Cyprinus carpio*) 脑与肝脏中 *HSP60*、*HSP70* 和 *HSP90* 的基因表达和蛋白质含量出现不同程度的升高^[11]。另一方面, 上调热休克蛋白的基因表达有益于细胞抵抗氧化应激。Franco 等^[16] 发现外源热休克蛋白能保护人淋巴瘤细胞免于 H_2O_2 引起的死亡。过表达 *HSP70* 能提高心肌细胞内超氧化物歧化酶的活性, 降低 ROS 引起的损伤^[17]。

过表达 *HSP70* 能通过抑制细胞凋亡信号通路, 减少大鼠肝细胞因 H_2O_2 引起的氧化损伤^[18]。在骨肉瘤细胞 (Saos-2) 的研究中发现, 高表达 *HSP75* 有助于抑制 H_2O_2 造成的 DNA 损伤^[19]。在鱼类的研究中, 热休克蛋白基因 (*HSP70* 和 *HSP90*) 表达的上升反映了细胞对氨氮造成的氧化应激的防御性反应^[20]。此外, 鲤鱼在重金属暴露下肝脏内的 *HSP70* 和 *HSP90* 表达呈现上升的趋势^[21]。姜黄素 (Curcumin) 是植物姜黄中的有效成分, 是一种具有抗氧化、抗炎症、抗癌功能的多元酚, 能通过 NF- κ B、Nrf2 等转录因子调节相关的信号通路起作用, 在养殖中常用于鱼类的保肝护肝^[22], 但其机制还不清楚。【本研究切入点】笔者在先前的研究中发现姜黄素预处理能保护 H_2O_2 应激下罗非鱼肝细胞的活力, 并通过上调 Nrf2 信号通路提高抗氧化酶活力和血红素加氧酶 1 (Heme Oxygenase-1, HO-1) 的基因的表达量^[22], 而 HO-1 也是热休克蛋白的一种 (*HSP32*)。此外其他研究也表明姜黄素对热休克蛋白也有调节功能^[23]。本文在前期研究的基础上进一步探究在氧化应激条件下姜黄素对罗非鱼热休克蛋白基因表达的影响, 分析姜黄素的应激保护水平。【拟解决的关键问题】在罗非鱼体外肝细胞氧化应激模型下, 采用姜黄素进行预处理, 研究姜黄素预处理保护对罗非鱼肝细胞氧化应激过程中热休克蛋白家族基因表达的影响, 为鱼类氧化应激的毒理学机制及姜黄素的药理学机制提供理论资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

成年罗非鱼由福建省淡水水产研究所榕桥试验基地提供。罗非鱼暂养于 100 L 玻璃养殖缸内 2 周, 以适应实验室养殖条件。期间保持养殖水体持续曝气并维持水温于 28 °C, 每日投喂饲料 2 次。

姜黄素购于 Sigma-Aldrich 公司。将姜黄素预溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 再用 DMEM/F12 细胞培养液溶解姜黄素至工作浓度 ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时确保 DMSO 在细胞培养液中的终浓度小于 0.1%。

1.2 罗非鱼原代肝细胞培养

罗非鱼原代肝细胞培养方法见先前发表的论文^[22]，具体方法如下：挑选体色正常、活力好的罗非鱼，经 MS-222（100 mg·L⁻¹）麻醉后用注射器插入心脏放血。75% 医用酒精消毒体表后迅速剖开鱼腹取出肝脏并置于无菌培养皿中。将肝脏组织切碎成约 1 mm³ 的组织块，并去除脂肪、血管等无关的组织。Hank's 缓冲液反复清洗组织块至血色减退。0.25% 胰蛋白酶溶液消化肝脏组织（28 ℃），共消化 3 次，每次 15 min，并在每个消化终点收集肝细胞。细胞悬液经 75 μm 不锈钢筛过滤后得到单细胞悬液。将此细胞悬液在 50×g 离心力下低速离心 3 min，收集细胞沉淀，重复 2 次。DMEM/F12 培养液（含 100 IU·mL⁻¹ 青霉素、100 mg·mL⁻¹ 链霉素和 10% 胎牛血清）重新悬浮细胞，并调整密度为 1×10⁶ 个·mL⁻¹，接种于 6 孔板中，放入 CO₂ 培养箱培养。培养箱温度设定为 28 ℃，CO₂ 浓度为 5%。

1.3 试验处理

试验分为对照组和保护组。对照组细胞在试验前 24 h 正常更换培养液，保护组则用含 40 μmol·L⁻¹ 姜黄素的培养液预处理 24 h。24 h 过后 2 组分别采集样品并标记为第一个时间点（0 h），随后分别用 5 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理 1 h 和 2.5 h，并在作用时间终点采样。每个样品约为 2×10⁶ 个细胞。

1.4 RNA 提取及热休克蛋白家族各基因 qPCR 检测

罗非鱼肝细胞经药物处理后，去除培养液。每孔加入 1 mL 磷酸缓冲液清洗并去除细胞碎屑，再加入 1 mL Trizol 试剂（Invitrogen, USA）并反复吹打至细胞全部脱落。按说明书步骤提取总 RNA。总 RNA 经电泳检测后，采用 NanoDrop 检测样品的 OD 值与核酸浓度。采用反转录试剂盒（Yeasten, 中国上海）制备各样品 cDNA 模板。

采用 LightCycler 480 Roche 实时热循环仪的 384 孔模块对各组细胞 cDNA 模板进行 qPCR 检测，反应体系为 10 μL，包含上下游引物（引物序列参见表 1）（10 μmol·L⁻¹）各 0.25 μL，5 μL SYBR Green Master Mix（Promega, USA）和 4.5 μL cDNA 模板。用于 PCR 的循环条件如下：在 95 ℃ 下 1 min，95 ℃ 15 s（40 次循环），60 ℃ 孵育 1 min。数据结果采用 2^{-ΔΔCt} 值方法计算基因相对表达水平^[2]。

1.5 数据处理

使用 IBM SPSS Statistics 19 软件对数据进行统计学分析，t 检验确定同一时间不同处理的 2 个样本之间是否存在显著差异（P < 0.05）。采用单因素方差分析和 Tukey's HSD 方法分析同一处理组不同时间

表 1 qPCR 检测所用的各基因引物
Table 1 Primers used for qPCR

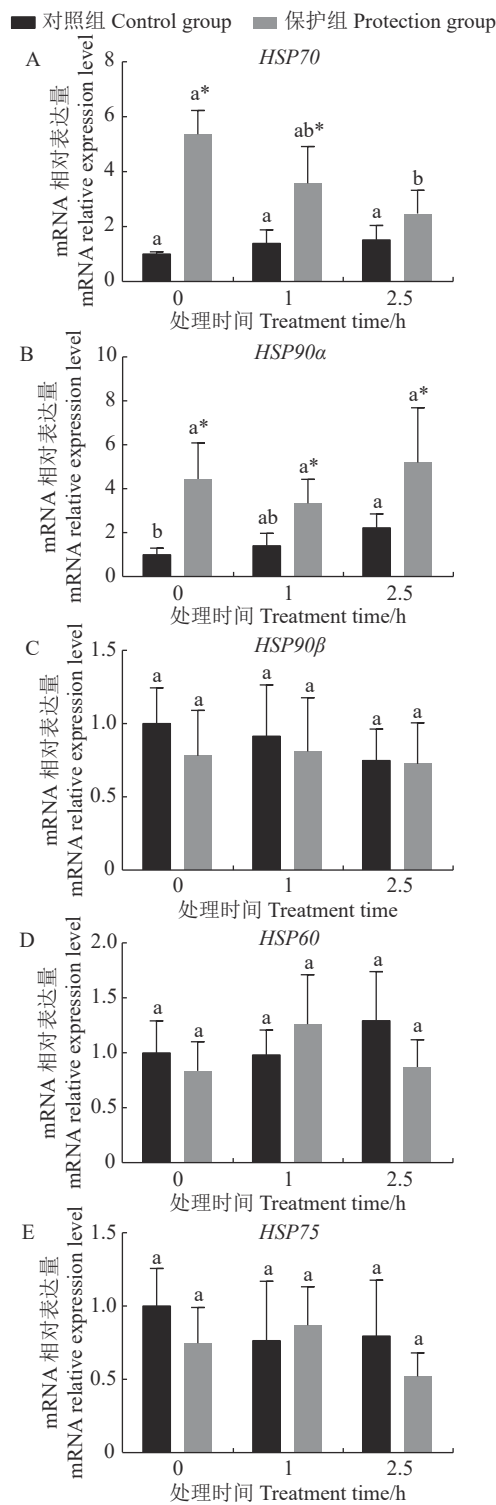
基因 Gene	长度 Length/bp	引物序列（5'-3'） Sequence (5'-3')
HSP70	107	HSP70F: CATCGCCTACGGTCTGGACAA
		HSP70R: TGCCGTCTTCAATGGTCAGGAT
HSP90α	128	HSP90αF: ATTGCTCAGCTGATGTCCTT
		HSP90αR: GTGGGATCCGTCAGCTTTTC
HSP90β	117	HSP90βF: AGAACCTCAAGCTGGGTGTG
		HSP90βR: TCACGTACTCCGAGAGGGAG
HSP60	115	HSP60F: GCGGCTAGCAGTAAGCCTTT
		HSP60R: CGTAGGCTCGTGTGAGGTG
HSP75	103	HSP75F: GTTGGGCCACCATTCATCC
		HSP75R: TTCTCAACCATCCACGCCAT
HSP30	111	HSP30F: GACTCTGGACCTCCTCCACT
		HSP30R: TGAAACACTCTTCAGGTGTCTGT
HSPB1	106	HSPB1F: CTTTGACCAGACCTTCGGCA
		HSPB1R: TAGTTCTGGGGCCAGGATGG
HSPB7	119	HSPB7F: ACTTTCACCCACAAGTGCCA
		HSPB7R: AGCTCATGCTTGGCTGGATT
HSPB8	104	HSPB8F: TGGAAAGTCTGCGTGAACGTC
		HSPB8R: TCCTGTTTCTCTTCGTGCTTTC
HSPB11	100	HSPB11F: CAGCTTGTTTGGCGATGACC
		HSPB11R: CCGGTTGAAGAAGTCTCGCT
β-Actin	129	β-Actin-F: TGC GGATATCATTTGCCTGA
		β-Actin-R: GAATCCGGCCTTGCACATAC

点之间的显著差异（P < 0.05）。

2 结果与分析

2.1 姜黄素预处理下高分子量 HSP 的基因表达差异

不同处理对高分子量热休克蛋白 HSP70、HSP90α、HSP90β、HSP60、HSP75 的基因相对表达量的影响如图 1 所示。各处理 HSP90β、HSP75、HSP60 基因表达量在氧化应激作用下变化趋势不明显，且保护组与对照组间并无显著性差异（P > 0.05）。保护组 HSP70 在 H₂O₂ 处理下呈逐渐下降的趋势，对照组呈逐渐升高的趋势；保护组 HSP70 在 H₂O₂ 处理 0、1 h 的表达显著高于对照组（P < 0.05），而处理 2.5 h 与对照组无显著差异（P > 0.05）（图 1-A）。说明姜黄素提高了罗非鱼肝细胞中 HSP70 的表达量，并在 H₂O₂ 应激 1 h 内维持 HSP70 的高表达，而单纯 H₂O₂



*表示同一处理时间保护组与对照组间差异显著 ($P < 0.05$), 不同字母小写字母表示同一处理组中不同时间点之间相比差异显著 ($P < 0.05$)。图 2 同。

* indicates significant difference from control at relevant time point at $P < 0.05$; data with different lowercase letters indicate significant differences at different time points in same group at $P < 0.05$. Same for Fig. 2.

图 1 姜黄素预处理对 H_2O_2 胁迫下罗非鱼肝细胞高分子 HSP 基因表达的影响

Fig. 1 Effect of curcumin pretreatment on HSP expressions of tilapia hepatocytes under H_2O_2 stress

应激不会引起罗非鱼肝细胞 $HSP70$ 的表达显著变化。

氧化应激作用下, 保护组 $HSP90\alpha$ 表达量呈先降低后升高的趋势, 对照组则呈现缓慢上升趋势, 2.5 h 的表达量显著高于 0 h; 各个时间点保护组 $HSP90\alpha$ 均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 1-B)。说明姜黄素提升了肝细胞中 $HSP90\alpha$ 的表达量。此外对照组 H_2O_2 应激后 2.5 h 的 $HSP90\alpha$ 表达水平显著高于应激前 (0 h) ($P < 0.05$), 表明 H_2O_2 应激 2.5 h 也能显著提升肝细胞 $HSP90\alpha$ 的表达水平, 但表达水平低于姜黄素预处理后再进行 H_2O_2 应激 2.5 h 的肝细胞 (图 1-B)。

2.2 姜黄素预处理下小分子 HSP 的基因表达差异

不同处理对高分子量热休克蛋白 $HSP30$ 、 $HSPB1$ 、 $HSPB7$ 、 $HSPB8$ 、 $HSPB11$ 的基因相对表达量的影响如图 2 所示。各处理 $HSPB7$ 、 $HSPB8$ 、 $HSPB11$ 在氧化应激作用下变化趋势不明显, 且保护组与对照组间无显著性差异 (图 2-C、D、E)。保护组 $HSP30$ 的表达量在氧化应激的作用下变化不显著, 但显著高于对照组 (图 2-A) ($P < 0.05$), 说明承受氧化应激前后阶段姜黄素都能提升细胞 $HSP30$ 的表达量; 对照组 $HSP30$ 的基因表达呈现先下降后上升趋势, H_2O_2 应激后 1 h $HSP30$ 显著低于应激前 (0 h) ($P < 0.05$), 而应激 2.5 h 后 $HSP30$ 的表达量又恢复到应激前水平 (图 2-A)。

对照组 $HSPB1$ 基因表达量在 H_2O_2 应激后显著上升, 1 h 和 2.5 h 的 $HSPB1$ 表达量与 0 h 相比显著升高 ($P < 0.05$), 即 H_2O_2 应激导致了细胞 $HSPB1$ 表达量的上升。保护组 $HSPB1$ 基因表达量在氧化应激各个时间点差异不显著 ($P > 0.05$)。保护组 $HSPB1$ 在应激前和应激后 2.5 h 时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 说明姜黄素能提升肝细胞在 H_2O_2 应激时的 $HSPB1$ 的表达 (图 2-B)。

3 讨论

3.1 H_2O_2 诱导的氧化应激对罗非鱼肝细胞 HSP 基因表达的影响

$HSP90$ 蛋白家族是一类进化上高度保守的分子家族, 参与许多细胞生物学过程^[24]。研究表明, 在氧化应激条件下, 鱼类细胞中 $HSP90$ 的基因表达发生了变化。在鲤鱼肝细胞中, H_2O_2 诱导的氧化应激显著改变了超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性, 并增强了 $HSP90$ 的表达^[25]。水体中的 H_2O_2 暴露后使鲤鱼不同组织中碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、溶菌酶的活性和 $HSP90$ 基因的表达产生显著差异^[26]。本研究急性 H_2O_2 应激 (2.5 h) 可提高 $HSP90\alpha$ 的表达,

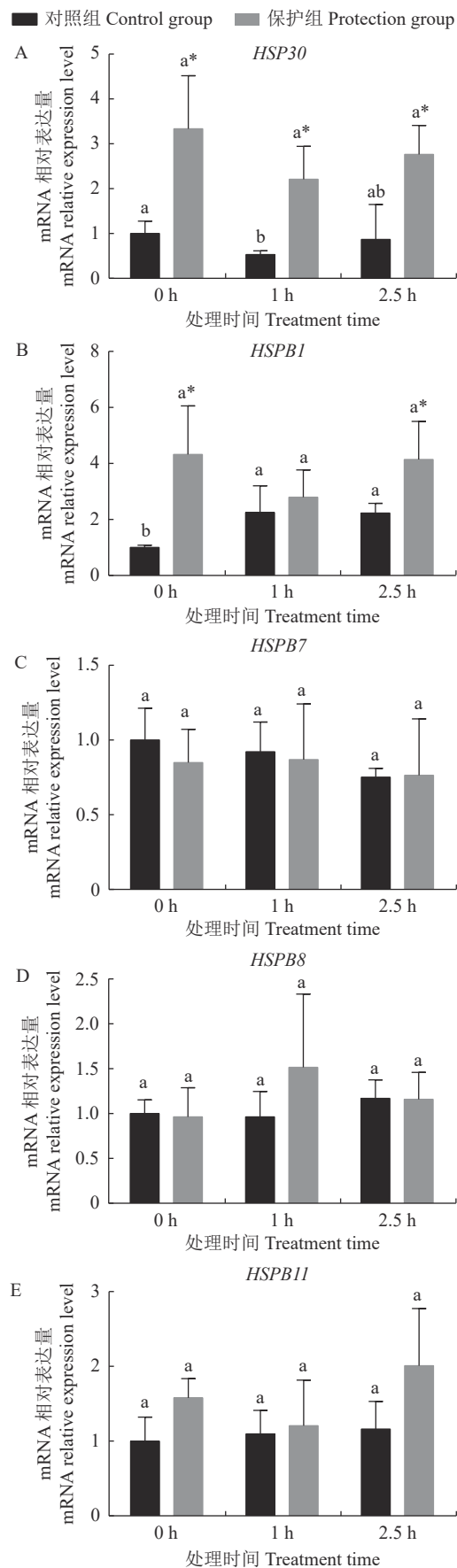


图 2 姜黄素与 H_2O_2 处理对罗非鱼肝细胞 sHSP 基因表达的影响

Fig. 2 Effect of curcumin pretreatment on sHSP expressions of tilapia hepatocytes under H_2O_2 stress

但对 $HSP90\beta$ 无显著影响。这可能是由于当细胞受到应激时, $HSP90\alpha$ 往往倾向于受应激诱导而呈现基因表达的变化, 而 $HSP90\beta$ 表现为组成性表达, 不易随应激而变化^[27-28]。另一项研究得到了与本研究相似的结果: 高氨诱导的氧化应激可显著提高黄鳝 (*Monopterus albus*) $HSP90\alpha$ mRNA 基因及其翻译蛋白质的水平; 而 $HSP90\beta$ 的表达水平无明显变化^[29]。HSP75 是 HSP90 家族的一员, 定位于线粒体基质中^[24]。HSP75 可以维持线粒体的完整性, 防止过多 ROS 引起的细胞死亡^[24]。在本研究中, HSP75 在各组间无显著差异表达。鉴于目前对鱼类 HSP75 的研究相对较少, 未来应进一步研究鱼类 HSP75 的抗氧化应激相关机制。

HSPB1 被认为能降低细胞内 ROS 水平、维持谷胱甘肽 (GSH) 水平并在稳定线粒体膜电位中发挥重要作用^[30]。在大鼠 (*Rattus norvegicus*) 心肌细胞中, HSPB1 能改善包括谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GR)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPx) 和 硫 氧 还 蛋 白 (Thioredoxin, Trx) 的抗氧化系统^[30-31]。目前, 在硬骨鱼的多个物种中已经鉴定出 HSPB1, 有学者观察到鱼类在病毒感染过程中 $HSPB1$ 的表达增加的现象^[32-33]。目前鱼类 HSPB1 的抗氧化机制尚不清楚。在本研究中, H_2O_2 显著增加了 $HSPB1$ 的表达, 而 $HSPB1$ 的高表达有助于细胞激活抗氧化系统。因此可以推测, $HSPB1$ 表达的显著增加是罗非鱼肝细胞对抗氧化应激的自发防御。

3.2 姜黄素对罗非鱼肝细胞的保护作用

直接或间接增加细胞内热休克蛋白的含量有助于提升细胞的抗氧化能力^[34-36]。因此, 许多药物通过诱导热休克蛋白的表达来发挥药效, 热休克蛋白也常作为相关药物作用的靶标^[24]。研究表明姜黄素对热休克蛋白的表达有促进作用, 姜黄素能上调低温应激下的胰岛组织中的 $HSP70$ 并保护胰岛组织的完整性^[37]。另一项研究表明姜黄素有助于提升人肺癌组织中 $HSP70$ 的表达水平^[38]。饲喂姜黄素和白藜芦醇 (resveratrol) 能有效提高大鼠睾丸的 $HSP60$ 、 $HSP70$ 与 $HSP90$ 表达量, 并减轻邻苯二甲酸二乙基己酯 (Diethylhexyl phthalate, DEHP) 引起的氧化应激与睾丸损伤^[39]。这些研究说明姜黄素对一些热休克蛋白的表达有促进作用, 这与本研究结果是一致的。本试验中姜黄素预处理能提升 $HSP70$ 、 $HSP90\alpha$ 、 $HSP30$ 、 $HSPB1$ 的表达量, 而这种提升在有 H_2O_2 应激的情况下仍然维持较高水平并显著高于 H_2O_2 单独作用, 表明姜黄素可能通过提升相关热休克蛋白的

表达量来提升鱼类肝细胞的抗氧化能力,最终保护肝细胞活力。笔者在前期研究发现姜黄素能显著提高罗非鱼肝细胞氧化应激模型下的细胞活力,姜黄素的这种保护作用与其对肝细胞氧化应激通路Nrf2的调控密切相关^[22],而本研究结果显示姜黄素的这种保护作用还和其对HSP的调控有关。至于姜黄素提升细胞热休克蛋白表达量的相关机制还需进一步研究。近年研究表明,姜黄素通过提高HSP70的转录因子——热休克因子1(HSF1)的磷酸化水平,有效提高人肠上皮细胞HSP70水平,从而增强肠上皮的完整性^[23]。在医学研究中,姜黄素被认为是HSF1和Nrf2的双重激活剂^[40]。这为研究姜黄素与HSPs的调控机制提供了新的思路,今后可从热休克蛋白的上游转录因子入手进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] 郭文亮,徐元庆,金晓,等.热休克蛋白在冷应激引起的炎症反应和氧化应激中的调节作用[J].*畜牧兽医学报*,2022,53(6):1668-1677.
GUO W L, XU Y Q, JIN X, et al. Moderating role of heat shock protein under inflammatory response and oxidative stress caused by cold stress [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53 (6) : 1668-1677. (in Chinese)
- [2] ZHANG X, LI Y T, SUN Y L, et al. Regulatory effect of heat shock transcription factor-1 gene on heat shock proteins and its transcriptional regulation analysis in small abalone *Haliotis diversicolor* [J]. *BMC Molecular and Cell Biology*, 2020, 21 (1) : 83.
- [3] LI Y T, ZHANG T, ZHANG X, et al. Heat shock cognate 70 gene in *Haliotis diversicolor*: Responses to pathogen infection and environmental stresses and its transcriptional regulation analysis [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2018, 23 (3) : 335-346.
- [4] FANG Z Q, SUN Y L, ZHANG X, et al. Responses of HSP70 gene to *Vibrio parahaemolyticus* infection and thermal stress and its transcriptional regulation analysis in *Haliotis diversicolor* [J]. *Molecules*, 2019, 24 (1) : 162.
- [5] 李艳,张国强,邵东燕,等.小分子热休克蛋白的结构与功能[J].*生命科学*,2017,29(1):55-61.
LI Y, ZHANG G Q, SHAO D Y, et al. The structure and function of the small heat shock proteins [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2017, 29 (1) : 55-61. (in Chinese)
- [6] 李婷婷,孙继红,韩森荣,等.水产动物小分子热休克蛋白家族研究进展[J].*水产学杂志*,2022,35(4):101-109.
LI T T, SUN J H, HAN S R, et al. A review: Research progress on small molecule heat shock protein family in animals in aquaculture [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2022, 35 (4) : 101-109. (in Chinese)
- [7] 张晨光,丁炜东,曹哲明,等.急性高温胁迫对翘嘴鲌幼鱼抗氧化酶和消化酶活性及热休克蛋白基因表达的影响[J].*南方农业学报*, 2021, 52 (3) : 815-826.
- [8] 狄治朝,周涛,许强华.低氧胁迫与常氧条件下斑马鱼鳃中热休克蛋白基因家族的表达差异比较[J].*大连海洋大学学报*,2018,33(6):690-695.
DI Z C, ZHOU T, XU Q H. Expression comparisons of heat shock proteins gene in gills of zebrafish exposed to both normoxia and hypoxia [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 33 (6) : 690-695. (in Chinese)
- [9] 林海霞.声胁迫对斜带石斑鱼生理生化指标和Hsp70表达的影响[D].湛江:广东海洋大学,2019.
LIN H X. Effects of acoustic stress on physiological and biochemical indexes and Hsp70 expression of *Epinephelus coioides*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019. (in Chinese)
- [10] 贾利兴.壬基酚暴露对斑马鱼热休克蛋白表达量的影响[D].广州:暨南大学,2016.
JIA L X. Effects of exposure to nonylphenol on expression of heat shock protein of zebrafish[D]. Guangzhou: Jinan University, 2016. (in Chinese)
- [11] 姜旭阳.铜和镉单一及联合亚急性暴露对鲤鱼热休克蛋白的影响[D].哈尔滨:东北农业大学,2015.
JIANG X Y. Effects of single and joint subacute exposure of copper and cadmium on heat shock proteins in common carp(*Cyprinus carpio*)[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [12] LI Z, ALI SHAH S W, ZHOU Q, et al. The contributions of miR-25-3p, oxidative stress, and heat shock protein in a complex mechanism of autophagy caused by pollutant cadmium in common carp (*Cyprinus carpio* L.) hepatopancreas [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 287: 117554.
- [13] CHENG J, LI H H, HUANG Z Y, et al. Expression analysis of the heat shock protein genes and cellular reaction in dojo loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) under the different pathogenic invasion [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 95: 506-513.
- [14] 周俊豪,刘念,杨映.硬骨鱼类Keap1-Nrf2/ARE信号通路研究进展[J].*水产学杂志*,2022,35(4):117-124.
ZHOU J H, LIU N, YANG Y. Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway and its antioxidant regulation in teleost fish: A review [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2022, 35 (4) : 117-124. (in Chinese)
- [15] 柯湘宇.氧化应激中热休克蛋白90对MRN复合物相关的DNA双链断裂损伤修复通路的调控机制研究[D].广州:南方医科大学,2017.
KE X Y. The role of Hsp90 in MRE11-RAD50-NBS1 complex related DNA double strands break repair signaling pathway in oxidative stress[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2017. (in Chinese)
- [16] FRANCO L, TERRINCA J, RODRÍGUEZ A B, et al. Extracellular heat shock proteins protect U937 cells from H₂O₂-induced apoptotic

- cell death [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016, 412 (1) : 19–26.
- [17] SABIRZHANOV B, STOICA B A, HANSCOM M, et al. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2012, 123 (4) : 542–554.
- [18] 王慧. 腺病毒介导的hsp70过表达对H₂O₂诱导BRL细胞凋亡的保护作用研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2014.
- WANG H. Study on the protective effect of adenovirus-mediated transfer of hsp70 in BRL cells against apoptosis by hydrogen peroxide[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [19] MONTESANO GESUALDI N, CHIRICO G, PIROZZI G, et al. Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis [J]. *Stress*, 2007, 10 (4) : 342–350.
- [20] CHENG C H, YANG F F, LING R Z, et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 164: 61–71.
- [21] MONIRUZZAMAN M, MIDDAY P, DHARA A, et al. Change in redox state and heat shock protein expression in an Indian major carp *Cirrhinus cirrhosus* exposed to zinc and lead [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2017, 42 (6) : 731–740.
- [22] LI L M, ZHANG Z P, HUANG Y F. Integrative transcriptome analysis and discovery of signaling pathways involved in the protective effects of curcumin against oxidative stress in tilapia hepatocytes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2020, 224: 105516.
- [23] GUO M Z, XU W X, YAMAMOTO Y, et al. Curcumin increases heat shock protein 70 expression via different signaling pathways in intestinal epithelial cells [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2021, 707: 108938.
- [24] HOTER A, EL-SABBAN M E, NAIM H Y. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (9) : 2560.
- [25] MONIRUZZAMAN M, GHOSAL I, DAS D, et al. Melatonin ameliorates H₂O₂-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NFκB pathway [J]. *Biological Research*, 2018, 51 (1) : 17.
- [26] JIA R, DU J L, CAO L P, et al. Immune, inflammatory, autophagic and DNA damage responses to long-term H₂O₂ exposure in different tissues of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 757: 143831.
- [27] BUGG W S, YOON G R, BRANDT C, et al. The effects of population and thermal acclimation on the growth, condition and cold responsive mRNA expression of age-0 lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) [J]. *Journal of Fish Biology*, 2021, 99 (6) : 1912–1927.
- [28] 段丹萍. Hsp90α与过氧化氢诱导的人肝癌细胞和人正常肝细胞氧化应激损伤的相关性探讨[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- DUAN D P. Hsp90α is involved in stress response of HepG2 liver carcinoma cells and L02 hepatocytes to hydrogen peroxide induced oxidative stress[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2013. (in Chinese)
- [29] HANGZO H, BANERJEE B, SAHA S, et al. Ammonia stress under high environmental ammonia induces Hsp70 and Hsp90 in the mud eel, *Monopterus albus* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43 (1) : 77–88.
- [30] LIU X H, XIAO W, JIANG Y, et al. Bmal1 regulates the redox rhythm of HSPB1, and homooxidized HSPB1 attenuates the oxidative stress injury of cardiomyocytes [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 5542815.
- [31] TERRA L F, WAILEMANN R A M, DOS SANTOS A F, et al. Heat shock protein B1 is a key mediator of prolactin-induced beta-cell cytoprotection against oxidative stress [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 134: 394–405.
- [32] LE Y, JIA P, JIN Y L, et al. The antiviral role of heat shock protein 27 against red spotted grouper nervous necrosis virus infection in sea perch [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 185–194.
- [33] LI P H, CAI Y J, ZHU X L, et al. *Epinephelus coioides* Hsp27 negatively regulates innate immune response and apoptosis induced by Singapore grouper iridovirus (SGIV) infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 120: 470–480.
- [34] KIM W, KWON H J, JUNG H Y, et al. Tat-HSP70 protects neurons from oxidative damage in the NSC34 cells and ischemic damage in the ventral horn of rabbit spinal cord [J]. *Neurochemistry International*, 2019, 129: 104477.
- [35] KIM W K, KIM W H, KWEON O K, et al. Heat-Shock Proteins can potentiate the therapeutic ability of cryopreserved mesenchymal stem cells for the treatment of acute spinal cord injury in dogs [J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2022, 18 (4) : 1461–1477.
- [36] CHEN Z Y, SHEN X L, SHEN F Y, et al. TAK1 activates AMPK-dependent cell death pathway in hydrogen peroxide-treated cardiomyocytes, inhibited by heat shock protein-70 [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2013, 377 (1) : 35–44.
- [37] KANITKAR M, BHONDE R R. Curcumin treatment enhances islet recovery by induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during cryopreservation [J]. *Life Sciences*, 2008, 82 (3/4) : 182–189.
- [38] CHEN H W, YU S L, CHEN J J W, et al. Anti-invasive gene expression profile of curcumin in lung adenocarcinoma based on a high throughput microarray analysis [J]. *Molecular Pharmacology*, 2004, 65 (1) : 99–110.
- [39] ABD EL-FATTAH A A, FAHIM A T, ABDEL HAMID SADIK N, et al. Resveratrol and curcumin ameliorate di-(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular injury in rats [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 225: 45–54.
- [40] DAYALAN NAIDU S, KOSTOV R V, DINKOVA-KOSTOVA A T. Transcription factors Hsf1 and Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2015, 36 (1) : 6–14.