

姜黄素对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用

徐丙发, 吴华璞, 祝晓光

[摘要]目的: 探讨不同浓度的姜黄素 (Cur) 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法: 采用线栓法阻塞大鼠大脑中动脉 (MCAO), 建立大鼠局灶性脑缺血实验模型, 观察不同浓度姜黄素 (20 mg/kg, 40 mg/kg, 60 mg/kg) 对脑缺血再灌注损伤后大鼠神经学评分、脑梗死体积的改变, 并用免疫组化法检测热休克蛋白 70 (HSP70) 的表达情况。结果: 假手术组无神经行为改变; 各用药组神经学评分明显低于缺血再灌注组。各用药组脑梗死体积明显小于缺血再灌注组; Cur 20 mg/kg 组明显大于其它两组。各用药组 HSP70 阳性率较缺血再灌注组明显增多; Cur 40 mg/kg 组优于其它两组。结论: 姜黄素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用; 其机制可能与增加脑缺血再灌注损伤时 HSP70 的表达, 增强其对神经细胞的保护作用有关。

[关键词] 脑缺血; 再灌注; 姜黄素; 栓塞; 大脑中动脉; 梗死体积; 热休克蛋白 70 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 743.31 [文献标识码] A

Protective effect of curcumin on rats after focal cerebral ischemia/reperfusion damage

XU Bing-fa, WU Hua-pu, ZHU Xiao-guang

(Department of Pharmacology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] Objective: To explore the protective effect of curcumin (Cur) on the injury caused by focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) of rats and its mechanism. Methods: The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) and reperfusion was set up. Cur of 20 mg/kg, 40 mg/kg and 60 mg/kg was intraperitoneally injected into the rats respectively and the changes of the neurologic deficiency scores and the infarct volume were observed. The expression of HSP70 in brain tissue was detected by the method of immunohistochemistry. Results: Sham-operated group presented no neurologic changes. The neurologic deficiency scores in Cur groups were obviously elevated compared with those in I/R group. The infarct volume in Cur groups was obviously less than that of I/R group and the infarct volume of Cur 20 mg/kg group was obviously larger than that of the other two groups. Compared with I/R group, the number and the rate of HSP70 positive cells increased obviously in Cur groups, and Cur 40 mg/kg group was superior to the other two groups. Conclusion: Cur can prevent rats from focal cerebral ischemia/reperfusion damage. The mechanism may be that Cur can elevate the expression of HSP70 in focal cerebral ischemia/reperfusion damage, thus protecting the neurons more effectively.

[Key words] cerebral ischemia; reperfusion; curcumin; embolism; middle cerebral artery; infarct volume; heat shock protein 70; rats

缺血性脑血管病又称脑卒中, 是临床常见病, 死亡率及致残率高, 预防和治疗缺血性脑血管疾病, 减少其致残, 加强脑缺血后的脑保护已成为当前最重要的公共健康问题之一。其损伤机制涉及脂质过氧化、自由基损伤^[1]、兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载^[2]、血液流变学改变及神经细胞凋亡等多环节。这些因素互为因果、共同作用, 形成损伤级联反应, 最终导致神经细胞损伤。姜黄素 (curcumin, Cur) 是从姜科姜黄属植物姜黄 (curcuma longa) 根茎中提取的一种酚性色素, 由于其色泽稳定, 且毒性很低, 目前已广泛应用于食品添加剂和染料中。研究表明, 姜黄素是以保护正常细胞免受各种不良因素的损伤为基础, 发挥其抗炎^[3]、抗肿瘤^[4]、抗氧

化^[5]、抗真菌等药理作用, 还可用于重要器官缺血性损伤的治疗^[6], 对缺血性脑血管病产生影响^[7]。本文通过大鼠局灶性脑缺血模型观察姜黄素对脑缺血再灌注损伤的保护作用, 并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂 姜黄素, BIOMOL公司生产, 二甲亚砜助溶, 配制成浓度为 0.4% 的姜黄素溶液; 氯化-2,3,5-三苯基四氮唑 (TTC 分析纯); 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司生产, 批号: 20030815。HSP70 免疫组化试剂盒: 福州迈新生物技术开发公司。

1.2 动物 健康雄性 SD 大鼠, 清洁级, 体重 260 ~ 310 g 购于郑州大学医学院实验动物中心。

1.3 大鼠局灶性脑缺血模型的制备及实验分组 取 SD 大鼠 96 只, 随机分成 6 组, 每组 16 只, 即假手术组、缺血再灌注 (I/R) 组、尼莫地平 (0.4 mg/kg) 组、姜黄素 (20 mg/kg, 40 mg/kg, 60 mg/kg) 组, 其中 8 只用于 TTC 染色检测, 另 8 只用于免疫组化检测。

[收稿日期] 2006-07-11

[作者单位] 蚌埠医学院 药理学教研室, 安徽 蚌埠 233030 (现在单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 安徽 合肥 230032)

[作者简介] 徐丙发 (1978-), 男, 硕士。

[通讯作者] 吴华璞, 研究生导师, 教授。

按 Zea Longa法^[8]稍加改进制作 MCAO动物模型。大鼠称重后用水合氯醛 400 mg/kg腹腔注射麻醉,仰卧位固定,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)及翼颞动脉(ICA分支),用动脉夹暂时阻断CCA,在距CCA分叉0.8~1.0 cm处用双重丝线结扎并剪断ECA,在ECA近心端剪一小口,用直径0.2 mm的尼龙线经小口插入,经分叉处轻轻推入ICA,当将尼龙线插入距CCA分叉1.8~2.0 cm处并有轻微阻力,表明栓线穿过大脑中动脉起始端至近端,阻塞了大脑中动脉主干的起始部。假手术组只需将栓线插入5 mm左右。1 h后将栓线抽至ECA起始部实现再灌注。

1.4 行为学评分 在大鼠清醒后参考 Longa等^[9]的方法进行行为障碍评分:无神经功能缺失症状,活动正常者0分;提尾时病灶对侧前肢不能完全伸直者1分;爬行时出现向对侧转圈者2分;爬行时身体向对侧倾倒者3分;不能自行行走,意识丧失者4分。

1.5 TIC染色和脑梗死体积测定 缺血再灌注后24 h立即断颅处死大鼠,取出脑组织,置于-20℃冰箱10 min,取出后间隔2 mm连续作6个脑冠状粗切片,立即将切片置于37℃2%TIC中避光恒温孵育30 min,后用10%甲醛固定24 h,正常组织染色呈红色,坏死组织呈白色。

1.6 HSP70表达测定 将再灌24 h的大鼠麻醉,用37℃生理盐水200 ml经左心室插管快速灌注冲洗出血液,再用4℃4%甲醛($\text{pH} 7.4, 0.01 \text{ mol/L}$ PBS)400 ml灌注30~40 min,固定脑组织。灌注完毕后立即断头取脑,置4%甲醛溶液保存备用。常规石蜡包埋,自视交叉前缘向后作连续冠状切片,片厚4 μm。取相同层面切片5张分别做苏木精伊红染色和免疫组织化学染色。HSP70免疫组化染色参照试剂盒说明书进行,DAB显色后显微镜观察并摄片。胞质被染成棕黄色环状者为阳性细胞。每张切片各取5个相互不重叠的高倍视野(10×40),计HSP70阳性细胞数及神经细胞总数,取平均值,并计算阳性率(阳性率=阳性细胞数/神经细胞总数×100%)。

1.7 统计学方法 采用多个样本比较的秩和检验和 Poisson分布资料的 χ^2 检验。

2 结果

2.1 大鼠神经学评分 假手术组大鼠肢体活动自如,无神经功能缺失,行为学评分均为0分,余5组动物均在再灌清醒后即有症状,并在3~6 h达到高

峰,再灌后12 h症状开始减轻,主要表现为提尾时左前肢屈曲,爬行时向左侧倾倒并有右侧Homer's征阳性。缺血再灌注组与Cu组比较有统计学意义($P < 0.05$),Cu组间两两比较无统计学意义($P > 0.05$) (见表1)。

表1 Cur对大鼠神经学评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n_i = 16$)

分组	剂量 (mg/kg)	神经学评分	Hc	P
假手术组	0.0	0.00±0.00		
缺血再灌(I/R)组	0.0	2.73±0.59	5.134*	0.000
I/R+尼莫地平组	0.4	1.53±0.64	3.867 Δ	0.000
I/R+Cu组	20.0	2.07±0.70	2.766 Δ	0.010
I/R+Cu组	40.0	1.60±0.74	3.604 Δ	0.000
I/R+Cu组	60.0	1.93±0.70	3.090 Δ	0.003

两两比较秩和检验: *与假手术组比较, Δ 与缺血再灌注组比较

2.2 脑梗死体积测定 假手术组未发现梗死;缺血再灌注组脑梗死明显,与假手术组比较有统计学意义($P < 0.01$);各用药组脑梗死体积明显小于缺血再灌注组;Cur20 mg/kg组脑梗死体积明显大于Cur40 mg/kg组($P < 0.01$)、Cur60 mg/kg组($P < 0.01$)。说明Cu能减少脑梗死体积,Cur40 mg/kg组、Cur60 mg/kg组优于Cur20 mg/kg组(见表2)。

表2 Cu对大鼠脑梗死体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n_i = 8$)

分组	剂量 (mg/kg)	脑梗死体积 (mm ³)	Hc	P
假手术组	0.0	0.0±0.0		
缺血再灌(I/R)组	0.0	306.0±58.0	3.590*	0.000
I/R+尼莫地平组	0.4	107.0±30.0	3.361 $\#$	0.001
I/R+Cu组	20.0	183.0±37.0	3.361 Δ	0.001
I/R+Cu组	40.0	118.0±34.0	3.361 $\#$	0.001
I/R+Cu组	60.0	125.0±18.0	3.361 $\#$	0.001

两两比较秩和检验: *与假手术组比较; Δ 与缺血再灌注组比较, $\#$ 与Cur20 mg/kg组比较

2.3 HSP70表达 假手术组见少许散在HSP70阳性细胞;缺血再灌注组可见较多HSP70阳性细胞;各用药组可见许多HSP70阳性细胞,阳性率均较缺血再灌注组明显增多(见图1)。组间比较可见Cur40 mg/kg组阳性细胞率高于Cur20 mg/kg组和Cur60 mg/kg组($P < 0.05$)。这表明Cu可增强脑缺血再灌注组织HSP70的表达,其中以40 mg/kg组效果为优(见表3)。

3 讨论

姜黄为姜黄属植物,药用其根茎,是常用的天然食品添加剂。中医认为姜黄能行气、散风活血、通经止痛。姜黄的黄色物质为略带酸性的酚性物质,是

表 3 Cu对 HSP70 阳性细胞数和阳性细胞率 (%) 的影响 (n₁=8)

分组	剂量 (mg/kg)	神经细胞总数	阳性细胞数	阳性细胞率 (%)	u	P
假手术组	0.0	22.08	1.37	6.13	—	—
缺血再灌 (I/R)组	0.0	17.88	4.38	24.258	—	—
I/R+尼莫地平组	0.4	23.44	12.50	49.00 ^{△△}	4.822*	0.000
I/R+Cu组	20.0	21.70	9.00	37.88 ^{△△}	2.963*	0.010
I/R+Cu组	40.0	25.40	13.63	49.25 ^{△△}	4.433*	0.001
I/R+Cu组	60.0	22.02	8.75	36.38 ^{△△}	2.674*	0.018

u检验与 I/R组比较[△]P<0.05 ^{△△}P<0.01; 与尼莫地平组比较, #P<0.05 与 Cu₄₀ mg/kg组比较[▲]P<0.05; 与 I/R组比较 *P<0.05

姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的混合物,称之为姜黄色素,是姜黄发挥药理作用的主要成分,而姜黄素是其中最重要的活性成分,其分子式为 C₂₁H₂₀O₆。主链为不饱和脂族及芳香族基团。近年来,随着对姜黄素的深入研究,发现其除具有抗癌、抗凝、抗炎、抗病毒、抗氧化、调血脂等作用外,还可用于重要器官缺血性损伤的治疗,对缺血性脑血管病多个环节产生影响。

本研究结果显示,姜黄素可改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经症状,并减少梗死体积,表明姜黄素对脑缺血再灌注损伤有明显保护作用;同时发现 Cu可进一步增强缺血再灌注后大鼠 HSP70 的表达。

热休克蛋白 (HSP) 是生物体 (或离体培养细胞) 在不良环境因素作用下所产生的一组特殊蛋白质,具有保护机体 (或细胞) 不受或少受伤害的功能。HSP70 是 HSP 家族中最保守、最丰富和最主要的一种,根据其表达形式的不同可分为结构型 HSP70 (在未应激前即已存在) 及诱生型 HSP70 (在未应激的细胞中很少,应激后明显增加) 两大类。HSP70 对细胞有明显的保护作用: (1) HSP70 作为分子伴侣,可帮助新合成的蛋白质肽链正确折叠和装配以维持蛋白质的正确构型,同时也可以帮助修复蛋白质的可复性损伤; (2) HSP70 通过抑制凋亡基因表达、抗氧化作用及免疫调节作用等产生细胞保护作用。Har^[10]观察到, HSP70 mRNA 在大鼠 MCAO1 h 末于皮质半暗带已开始轻度表达,再灌注后 3 h 达到高峰,继而下降,直到 3 天后消失。范德义等^[11]通过夹闭双侧颈总动脉 2.6 和 12 min 后,发现脑缺血 6 min 和 12 min 组脑组织 HSP70 的表达较正常组明显增高,提示 HSP70 在脑缺血时的脑组织存在高表达,脑缺血时间越长, HSP70 的表达越高。结扎沙土鼠双侧颈动脉引起的脑缺血,可造成

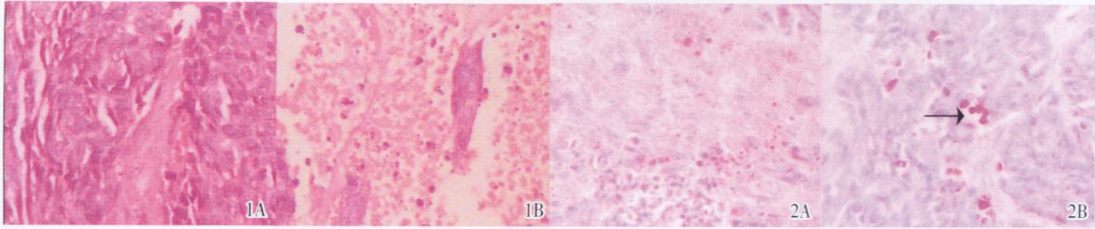
海马 CA1 区神经元死亡。与单纯 5 min 缺血组相比,先给予 2 min 缺血预处理后 7 天内再给予 5 min 缺血组的海马 CA1 区神经元出现选择性 HSP70 表达。HSP70 合成增加能减轻细胞凋亡,并阻止细胞开启自杀途径,而应用 HSP70 的抑制剂则能促使细胞凋亡^[12]。HSP70 可通过抑制 NF-κB 的表达,抑制细胞凋亡^[13]。本实验观察到缺血再灌注后大鼠 HSP70 的表达增加,与文献报道一致; Cu 可进一步增强缺血再灌注后大鼠 HSP70 的表达,其中 Cu₄₀ mg/kg 对其影响最大,与尼莫地平 (0.4 mg/kg) 作用相当。以上实验提示 Cu 增强 HSP70 的表达可能是其抗脑缺血再灌注损伤的新的机制之一。

(本文图 1 见封三)

[参 考 文 献]

- [1] Ginsberg MJ. Role of free radical reactions in ischemic brain injury [J]. Drug News Perspect, 2001, 14(2): 81-88.
- [2] 张芳, 谢敬霞, 韩鸿宾. 兔脑缺血区扩散、灌注成像及细胞内钙的对照研究 [J]. 中华放射学杂志, 2003, 37(8): 712-717.
- [3] Ramsewak RS, Dawit DL, Nair MG. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumin III from Curcuma longa [J]. Phytotherapy, 2000, 7(4): 303-308.
- [4] An RJ, Mukhopadhyay A, Denny K, et al. Curcumin induces apoptosis through activation of caspase-2, Bcl-2 cleavage and cytochrome C release. Its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL [J]. Carcinogenesis, 2002, 23(1): 143-150.
- [5] 王舒然, 陈炳刚, 孙长颢. 姜黄素对大鼠调节血脂及抗氧化作用的研究 [J]. 卫生研究, 2000, 29(4): 240-242.
- [6] 程虹, 刘惟莞. 姜黄素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(10): 1238-1242.
- [7] Brouet J, Ohshina H. Curcumin: an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 206(2): 533-540.
- [8] Petmann B, Henderson CE. Neuronal cell death [J]. Neuron, 1998, 20(4): 633-647.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rat [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] Haru Maeda K, Hermann D, et al. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(6): 937-946.
- [11] 范德义, 谢俊刚. 脑缺血大鼠脑组织热休克蛋白 70 的表达 [J]. 心脑血管病防治, 2003, 3(6): 20-21.
- [12] Fourie AM, Hupp TR, Lane DP, et al. HSP70 binding sites in the tumor suppressor protein p53 [J]. J Biol Chem, 1997, 272(31): 19471-19479.
- [13] Wong HR, Ryan M, Wise JR. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I-kappa-B degradation and NF-kappa-B nuclear translocation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231(2): 257-263.

赖氨匹林对小鼠移植乳腺癌的生长抑制和诱导凋亡作用(正文见第 633 页)



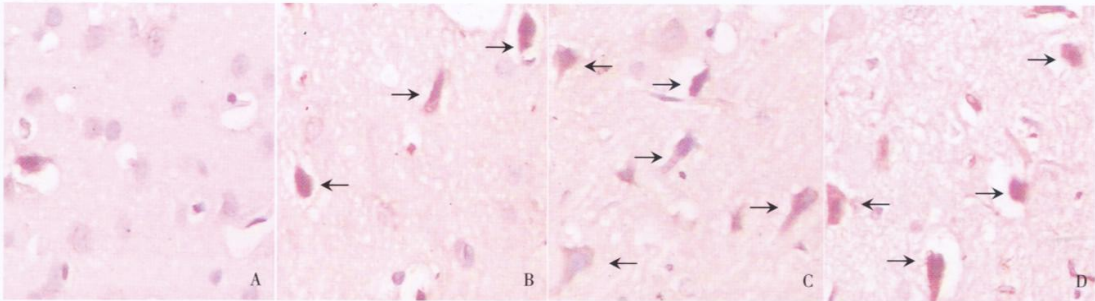
A: NS 组 B: Aspirin 350 mg/kg 组

A: NS 组 B: Aspirin 350 mg/kg 组

图1 NS组和 Aspirin 350 mg/kg 组对小鼠肿瘤的组织学影响(x400)

图2 NS组和 Aspirin 350 mg/kg 组诱导荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡(x400)

姜黄素对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用(正文见第 637 页)



A:假手术组 B:缺血再灌注组 C:尼莫地平组 D:Cur 40 mg/kg 组

图1 姜黄素对 HSP70 阳性细胞的影响(免疫组化标记,箭头标示的为阳性细胞,x400)

γ -干扰素对肝纤维化大鼠肝 Fas、Fas-L 表达的影响(正文见第 643 页)

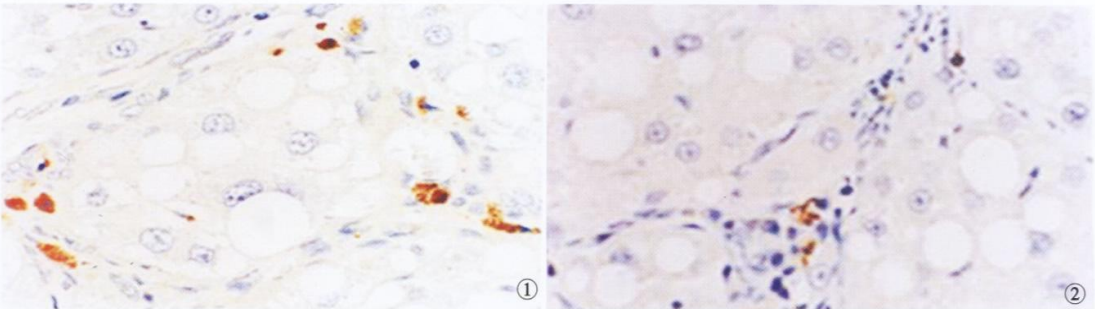


图1 Fas 在纤维间隔、肝窦的表达(EnVision 法,DAB 显色,x400)

图2 Fas-L 在纤维间隔中的表达(EnVision 法,DAB 显色,x400)

S100A4 蛋白在口腔鳞状细胞癌的表达及其意义(正文见第 662 页)

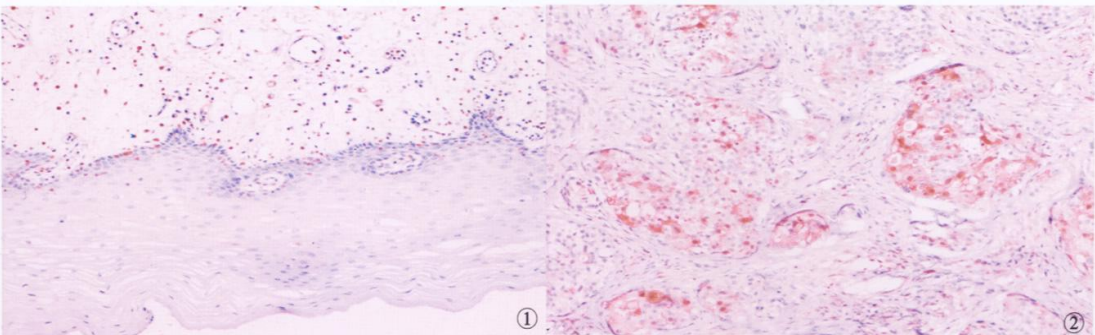


图1 正常口腔黏膜组织中 S100A4 蛋白不表达(SP 法 x200)

图2 中分化口腔鳞癌中 S100A4 蛋白表达(SP 法 x200)