

姜黄素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

王 凤¹ 吴 江¹ 马飞煜¹

摘要 **目的:**研究姜黄素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨其作用的机制。**方法:**采用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,50 只 Wistar 雄性大鼠被随机分为假手术组、缺血组和 100mg/kg、300mg/kg 姜黄素治疗组。缺血组和姜黄素治疗组分别在脑缺血再灌注后 24h 处死,观察大鼠神经功能缺失的评分,应用 TTC 染色观察梗死体积,应用 TUNEL 法及免疫组化染色检测脑组织凋亡细胞数及 Bcl-2、Bax 蛋白表达。**结果:**与损伤模型组比较,姜黄素治疗组改善大鼠神经功能的受损程度和减少脑梗死体积,各剂量姜黄素治疗组均可明显减少 TUNEL 染色阳性细胞数($P<0.01$),明显增加 Bcl-2 蛋白表达($P<0.01$),并且姜黄素治疗组 Bax 表达低于缺血组($P<0.05$)。**结论:**姜黄素可通过上调 Bcl-2 蛋白下调 Bax 蛋白表达而减少脑缺血再灌注后神经细胞凋亡,从而改善受损的神经功能,对脑缺血再灌注损伤起保护作用。

关键词 姜黄素;脑缺血;再灌注损伤;细胞凋亡

中图分类号:R493,R741, R28 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2007)-02-0115-03

Study on protective effects of curcumin on cerebral ischemia reperfusion/WANG Feng,WU Jiang, MA Feiyu//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(2): 115—117

Abstract Objective:to investigate the protective effects and mechanisms of curcumin after cerebral ischemia/reperfusion(I/R) injury in rats. **Method:**The model of middle cerebral artery occlusion(MCAO) and reperfusion was set up using an intraluminal filament method. Fifty Wistar male rats were randomly divided into sham operation group, ischemic group and 100mg/kg, 300mg/kg curcumin treated group. The rats in ischemic group and curcumin treated group were killed 24 hours after cerebral ischemia and reperfusion. We studied neurological scores and infarct size. Using the method of TUNEL and immunohistochemical staining to measure the number of neural apoptotic cells and Bcl-2, Bax protein expression. **Result:** Compared with the ischemic group, Curcumin decreased the neurological scores, infarct size and the number of neural apoptotic cells. The expression of Bcl-2 protein was increased significantly($P<0.01$) and the expression of Bax protein in curcumin treated group were decreased($P<0.05$). **Conclusion:** Curcumin can decrease apoptosis by up-regulating Bcl-2 protein expression and down-regulating Bax protein expression. It has protective effect on the injury of ischemia and reperfusion.

Author's address Dept. of Neurology, The first hospital of Jilin University, Jilin, 130021

Key words curcumin; ischemia; reperfusion injury; apoptosis

近几年来脑缺血后再灌注损伤受到人们广泛关注。大量研究表明,脑缺血再灌注损伤主要与氧化应激反应、炎症反应、钙超载、脑水肿和细胞凋亡等有关。其中细胞凋亡更是研究的热点问题。姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、降血脂等作用。国外从 70 年代就对其药用价值进行了报道。姜黄素用于治疗脑血管疾病,是个新的研究领域,由于氧化应激反应在脑血管病病理生理中扮演着非常重要的角色,目前国内外的动物和临床实验都把重点放在了其抗氧化作用上,抗炎作用也有所涉及。研究表明,姜黄素对脑缺血再灌注损伤的保护机制包括影响超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化酶(GPX)、丙二醛(MDA)、黄嘌呤脱氢酶/黄嘌呤氧化酶(XD/XO)、一氧化氮(NO)、脑组织钙和肿瘤坏死因子的含量。最近,国外开始探讨姜黄素对脑缺血中凋亡的影响,本研

究观察了姜黄素对局灶性脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响,旨在探讨其对缺血性脑卒中起保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

姜黄素购自 Sigma 公司,用 1%羟甲基纤维素钠混悬液助溶后备用,兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗人 Bax 多克隆抗体、SABC 试剂盒、DAB 试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,其余试剂为国产分析纯。

1 吉林大学第一医院,吉林长春,130021

作者简介:王凤,女,博士,住院医师

收稿日期:2006-04-03

1.2 实验动物分组及给药方法

50 只 Wistar 大鼠, 体重 240—260g, 均为雄性, 由吉林大学实验动物中心提供。随机分为假手术组 (A 组), 缺血再灌注损伤模型组 (B 组), 姜黄素 (100mg/kg, i.p.) 治疗组 (C 组), 姜黄素 (300mg/kg, i.p.) 治疗组 (D 组), 每组各 12 只。脑缺血 30min 后, 分别给予不同剂量姜黄素腹腔注射。

1.3 动物模型制作及神经功能缺损程度评价

大鼠大脑中动脉缺血模型参照 Longa 等的线栓法^[1]。10%水合氯醛(350mg/kg)腹腔内注射麻醉, 仰卧固定, 颈部正中切口, 分离并暴露左侧颈总动脉及颈内外动脉, 结扎左侧颈总动脉及颈外动脉根部, 由颈总动脉近分叉处剪一小口插入尼龙线, 插入长度约 (18.5±0.5)mm 感到有轻微阻力时停止, 扎紧并固定插线, 缝合皮肤, 阻断血流 2h 后, 拔线实现再灌注。假手术组除不插线外, 余步骤同手术组。评价神经功能缺损程度: 采用 Zea-Longa 氏神经功能损失评分法^[3]。0 分: 正常; 1 分: 不能完全伸展右前肢; 2 分: 行走时向右转圈; 3 分: 行走时向右跌倒; 4 分: 不能行走及意识水平下降。评分为 1—3 分者为模型成功。

1.4 脑梗死体积测定

大鼠缺血 2h 再灌注 24h 后断头取脑, 置于冰箱中冷冻后, 取左侧大脑半球, 去除嗅球、小脑和低位脑干, 将脑从额极向后连续冠状切片, 每片厚 2—3mm, 共切 5—6 张; 将脑片置于 2% 红四氮唑 (TTC) 磷酸缓冲液中避光, 37℃ 恒温孵育 20min, 经 4% 多聚甲醛液固定 24h, 正常脑组织为鲜红色, 梗死脑组织为白色。固定后封片, 数码相机照相, 用图像分析系统计算各层面梗死面积, 总面积之和乘以层厚即为体积 (mm³)。

1.5 脑组织标本制备

实验动物在缺血再灌注后 24h 经 10% 水合氯醛深度麻醉 (600mg/kg), 迅速打开胸腔, 经心脏 4℃、4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定, 断头取脑, 取左侧大脑半球, 于视交叉后 2mm 处取 2mm 厚组织, 同样固定液中固定 24h, 常规脱水、透明、石蜡包埋, 连续冠状切片, 片厚约 4—6μm, 切片贴服于预处理的载玻片上。

1.6 原位末端 TdT 酶标 (TUNEL) 技术对神经细胞凋亡的检测

取缺血再灌注 24h 的脑切片脱蜡至水, 按试剂盒说明书操作。高倍镜下观察, 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。

1.7 凋亡调控蛋白的检测

采用 SABC 法染片, 取缺血再灌注 24h 的脑切

片脱蜡至水, 按试剂盒说明书操作。高倍镜下观察, 胞浆着色呈棕黄色为阳性细胞。

1.8 统计学分析

在高倍物镜下, 取每张切片中梗死灶边缘区域相互不重叠的 4 个视野, 计数阳性细胞数。采用 *t* 检验, 组间采用方差分析, 结果用均数±标准差表示。

2 结果

2.1 姜黄素对神经学评分的影响

如表 1 所示, 经姜黄素治疗后, 神经功能缺失程度较缺血再灌注损伤模型组明显减轻 ($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。

2.2 脑梗死体积

假手术组未发现梗死灶, 缺血组梗死灶位于缺血侧额顶叶皮质及纹状体区域, 与 MCA 支配区一致。各剂量组梗死体积均明显小于缺血组 ($P<0.01$) (表 1)。

2.3 姜黄素对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响

凋亡神经元细胞主要分布于梗死灶周围的皮质和纹状体内, 可见胞体缩小, 核膜皱缩, 染色不均, 浓集于核膜附近, 胞核呈棕褐色, 可见核固缩和核碎裂。假手术组未见或仅见少量凋亡细胞出现。缺血组和治疗组各时点凋亡细胞数均明显多于假手术组 ($P<0.01$), 姜黄素治疗组缺血周边区内凋亡细胞数较缺血组明显减少 ($P<0.01$) (表 2)。

2.4 姜黄素对脑缺血再灌注后 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Bcl-2 阳性细胞主要见于梗死灶周围的皮质和纹状体内, 假手术组可见 Bcl-2、Bax 呈少量表达。在缺血周边区, 缺血组及姜黄素治疗组 Bcl-2 蛋白表达较假手术组增加 ($P<0.01$)。各剂量姜黄素治疗组 Bcl-2 表达显著高于缺血组 ($P<0.01$)。缺血组及姜黄

表 1 大鼠在脑缺血再灌注 24h 后姜黄素对神经学评分及梗死体积的影响 (n=6)

组别	神经功能评分	脑梗死体积 (mm ³)
假手术组	0	0
缺血组	2.86±0.14	198.71±30.23
姜黄素 100mg/kg 组	1.83±0.57 ^①	138.00±12.80 ^②
姜黄素 300mg/kg 组	1.50±0.30 ^②	120.33±23.47 ^②

与缺血组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$

表 2 各组脑缺血再灌注后神经凋亡细胞及 Bcl-2、Bax 蛋白的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	神经凋亡细胞	Bcl-2	Bax
假手术组	1.57±0.68	1.86±0.29	1.96±0.76
缺血组	46.86±8.69	16.79±3.01	21.58±3.24
姜黄素 100mg/kg 组	33.83±3.54 ^②	27.29±3.26 ^②	17.96±4.86 ^①
姜黄素 300mg/kg 组	25.91±5.04 ^②	40.67±9.07 ^②	18.25±3.78 ^①

与缺血组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$

素治疗组 Bax 蛋白较假手术组表达显著增高 ($P < 0.01$), 且 100mg/kg 和 300mg/kg 姜黄素治疗组 Bax 表达高于缺血组 ($P < 0.05$) (表 2)。

3 讨论

姜黄素类物质是中药姜黄提取物, 主要包括有姜黄素、去甲姜黄素和双去甲姜黄素以及二氢姜黄素等, 其中姜黄素为主要有效成分。姜黄素具有抗肿瘤、抗炎、抗 HIV、抗菌、抗氧化等多种药理作用, 并且毒副作用低, 具有良好的临床应用潜力, 受到国内外的广泛关注。近年来发现姜黄素依靠其良好的抗氧化和抗炎等作用, 在脑保护及治疗脑血管病方面具有良好的运用前景。郝宪恩等^[2]的研究表明在动物试验中灌胃给予姜黄素能降低脑梗死面积。他们用姜黄素灌胃给药治疗脑缺血再灌注模型的大鼠, 结果显示姜黄素可升高模型大鼠血中 SOD、6-酮前列腺-F1 α (6-keto-PGF1 α)、NO 含量; 降血中 MDA、血栓素(TXB2)、内皮素(ET)含量, 脑组织钙含量^[3]。石晶等^[4]提出姜黄素可能通过其抗氧化作用保护线粒体的功能, 维持细胞能量代谢, 从而增强对再灌注损伤的抵抗力。

尽管姜黄素有多种药理学活性, 但是其生物利用率和药代动力学特性却很缓和。Pan 等^[5]发现通过腹腔注射给药的吸收比口服给药更高。这表明了通过灌胃给药, 非常低的姜黄素被吸收入血。国外有报导^[6]大鼠中动脉缺血后半小时内给予姜黄素 100mg/kg 和 300mg/kg 腹腔注射, 可使梗死面积减小。并且姜黄素对脑缺血再灌注损伤的保护是通过减少脂质过氧化反应, 调节谷胱甘肽过氧化酶活性来实现的。姜黄素对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 此作用与增加脑血流量, 抗脂质过氧化, 防止钙超载有关。本实验通过腹腔注射姜黄素治疗脑缺血再灌注的大鼠, 证实姜黄素能明显减少梗死面积, 减轻局部脑缺血所致脑组织损伤。

细胞凋亡是 Kerr 等在 1972 年提出的, 它是一种由基因控制的细胞自主性死亡过程, 在生理情况下也称“程序性细胞死亡”, 是维持内环境稳定的机制之一^[7]。脑缺血再灌注损伤是一系列复杂的病理生理变化, 目前研究主要集中在氧自由基、兴奋性氨基酸、细胞内钙离子超载、炎症反应、细胞凋亡等方面。而且各损伤机制之间又存在着联系, 自由基的形成、NO 的作用、兴奋性氨基酸的释放及钙离子稳态失调等方面均与脑缺血再灌注损伤中细胞凋亡的发生有关^[8]。局灶性脑缺血由严重缺血的中心区和缺血半暗带组成, 缺血中心区的脑组织在短时间内即发生

不可逆性损伤, 成为梗死区。缺血半暗带区的神经细胞却发生以凋亡为主的迟发性神经元死亡^[9]。

与细胞凋亡相关的 Caspase 基因、Bcl-2 家族基因、P53 基因、早反应基因对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡起调控作用, Bcl-2 基因是主要的抑制基因之一。Bcl-2 抗细胞凋亡的作用机理为抑制 Ca^{2+} 的释放, 阻止促细胞凋亡基因信号传递, 阻断这些诱导基因生成产物以及细胞内的抗氧化作用。Bax 是强有力的促凋亡基因, 能与 Bcl-2 形成异源二聚体, Bcl-2 与 Bax 的比值增高促进细胞存活, 否则细胞死亡。Choi 等^[10]研究 MACO 大鼠模型时发现, 应用磷酸二酯酶 III 抑制剂 Cilostazol 清除羟氧基和氧自由基, 可以减少缺血半暗带的 Bax 蛋白表达水平, 相应的提高 Bcl-2 蛋白表达和抑制细胞色素 C 的释放, 减少缺血脑组织梗死体积, 抑制细胞凋亡和氧化。

本实验结果显示, 大鼠脑缺血再灌注后, 在梗死灶周围的脑组织中可检测到较多的凋亡细胞, 表明细胞凋亡是缺血性脑损伤中细胞死亡的途径之一。本实验结果还显示姜黄素可上调 Bcl-2 蛋白的表达, 可下调 Bax 蛋白表达。且各治疗组中 Bcl-2/Bax 比值均增大, 减少了 Bax 同源二聚体的形成, 从而降低脑缺血再灌注后神经细胞凋亡数目。提示姜黄素可通过增强抑凋亡基因的表达, 从而减少脑缺血再灌注后的神经细胞凋亡, 这可能是其对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用的机制之一。猜测姜黄素抗凋亡主要与抑制 Ca^{2+} 的释放, 抗氧化作用及改变 Bcl-2/Bax 比值来减少神经细胞凋亡等有关。姜黄素的神经细胞保护作用对急性脑缺血的防治具有重要的临床应用价值, 值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [2] 郝宪恩, 王鑫国, 宋翠森, 等. 姜黄素对大鼠实验性脑梗死面积的影响 [J]. 中华实用中西医杂志, 2002, 15(2):255.
- [3] 郝宪恩, 王鑫国, 李楠, 等. 姜黄素对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2004, 20(1):7—9.
- [4] 石晶, 陶昕, 胡晋红, 等. 缺血再灌注损伤时脑线粒体功能的改变及姜黄素的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2000, 16(5):537—539.
- [5] Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice [J]. Drug Metabolism and Disposition, 1999, 27(4):486—494.
- [6] Thiagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats [J]. Life Sciences, 2004, 74(8):969—985.
- [7] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis [J]. Br J Cancer, 1972, 2(26):239—242.
- [8] 李琳, 张志强. 脑缺血再灌注损伤中细胞凋亡的研究进展 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(1):60—62.
- [9] Crivrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling nuclear DNA fragmentation [J]. J Cell Biol, 1992, 119(3):493—501.
- [10] Choi JM, Shin HK, Kim KY, et al. Neuroprotective effect of cilostazol against focal cerebral ischemia via antiapoptotic action in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300:787—793.