

· 论 著 ·

姜黄素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

伍陈海

(海南医学院附属医院,海口 570102)

摘要:目的 探讨姜黄素对大鼠心肌缺血再灌注引起的氧化应激损伤的保护作用。方法 将 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。(1)假手术组;(2)缺血再灌注损伤(MIR)组;(3)溶剂组;(4)姜黄素低、中、高剂量组。建立心肌缺血再灌注模型。用不同剂量姜黄素在结扎前 30 min 分别做预处理。再灌注结束后采血,测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶同工酶(LDH1),并测量心肌梗死面积。结果 姜黄素预处理能明显降低血浆中 AST、LDH、LDH1 和 MDA 的含量,提高 SOD 活性,减少心肌梗死面积。结论 姜黄素对大鼠心肌缺血再灌注引起的氧化应激损伤有保护作用。

关键词:姜黄素;心肌缺血;心肌再灌注损伤;氧化应激

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)01-0025-02

Protective effects of curcumin on myocardial ischemia reperfusion injury in rats

Wu Chenhai

(The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of curcumin on oxidative stress injury induced by myocardial ischemia reperfusion in rats. **Methods** Sixty healthy SD rats were randomized into six groups: sham group, MIR group, PEG group, MIR + high dose curcumin treatment group, MIR + middle dose curcumin treatment group, MIR + low dose curcumin treatment group. Myocardial IR was carried out by ligation of left anterior descending coronary artery for 30 min followed by reperfusion for 60 min. Different dosages of curcumin were administered 30 min before the ligation. Blood was collected at the end of reperfusion for detecting changes of aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), lactate dehydrogenase 1 (LDH1), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA). The myocardial infarct size was also estimated. **Results** Curcumin pretreating dose-dependently decreased the contents of AST, LDH, LDH1 and MDA, and the myocardial infarct size, and increased the activity of SOD. **Conclusion** Curcumin exerts protective effects on myocardial ischemia reperfusion injury.

Key words: curcumin; myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; oxidative stress

心肌缺血再灌注(myocardial ischemia and reperfusion, MIR)损伤临床谱广泛,常见于心肌梗死、冠状动脉搭桥术、冠状动脉溶栓术、冠状动脉再通术等过程中,大量自由基特别是活性氧产生介导的氧化应激是导致缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤的主要致病机制,而及早、有效地进行抗氧化治疗则能明显减轻心肌损伤并改善心功能状态^[1]。有研究发现,植物药姜黄素是一种天然抗氧化剂,对心、脑等重要器官的 IR 有较好的保护作用,但其作用机制并未完全阐明^[2]。本实验拟从整体水平研究姜黄素对 MIR 的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 60 只,由海南医学院实验动物中心提供,体质量 200~250 g。

1.2 药物与试剂 姜黄素(上海国药集团化学试剂有限公司,纯度 99%,批号:82329401)临用前用含 6% (体积分数)乙醇和 6% (体积分数)聚乙二醇 400 的水溶液溶解。伊文斯蓝、氯化三苯基四氮唑购自 Sigma 公司。丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶同工酶 1(LDH1)购自英国朗道公司。

1.3 仪器 ALC-V8 动物呼吸机(上海奥尔科特生物技术有限公司)、HITACHI7150 生化分析仪(日本日立公司)、高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,5804/5804R)、722N 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)MS4000U 生物信号定量

记录分析系统(广州市龙飞达科技有限公司)等。

1.4 方 法

1.4.1 分组与给药 将 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。(1)假手术(Sham)组;(2)MIR 组;(3)溶剂组:缺血前 30 min (麻醉状态,以下相同)经十二指肠注射含 6% (体积分数)乙醇和 6% (体积分数)聚乙二醇 400 的水溶液 2 mL/kg;(4)姜黄素低、中、高剂量组:缺血前 30 min 经十二指肠分别注射姜黄素 10、20、40 mg/kg。

1.4.2 建立缺血再灌注模型 大鼠经戊巴比妥钠(质量分数为 3%,30 mg/kg,ip)麻醉,仰卧位固定。将银针电极插入大鼠四肢皮下,连接 MS4000U 生物信号定量记录分析系统,监测 II 肢体导联心电图。分离气管并插管后立即予正压人工呼吸(呼吸频率 50 次/分,流量 20 mL/kg),从左侧第 3、4 肋间打开胸腔,暴露心脏,剪破心包膜,在肺动脉圆锥左缘平左心耳根下缘 2 mm 冠状动脉处进针,用 5-0 无损伤缝合线穿过心肌层,以备结扎左冠状动脉左前降支引起缺血用。60 min 后解除结扎再灌注 30 min。以心电图 ST 段抬高、T 波高耸标志心肌缺血的存在;以抬高的 ST 段下降、T 波逐渐恢复以确定再灌注的成功。再灌注成功后腹主动脉取血 2 mL,0~4 °C,600×g 离心 15 min。

1.4.3 心肌梗死面积测量 再灌注结束后,将冠状动脉左前降支原位重新结扎,由主动脉逆行注入 0.5 g/L 的伊文斯蓝 1.5 mL,待心脏非缺血区充分染成蓝色后,摘取心脏后用 4 °C

生理盐水将心脏清洗干净,剪去心底组织、心耳及右心室,置-80℃冰箱速冻 5 min,然后自心尖向心底平行于房室沟方向将左室切成 1~1.5 mm 厚的薄片。将心脏切片置于 pH 7.4、浓度为 10 g/L TTC 液中,37℃ 孵育 10 min,冷生理盐水冲洗去游离燃料,4% 甲醛溶液固定。染成蓝色的区域代表非缺血区,红色区域(含白色区)代表缺血区,白色区域代表梗死区。沿着不同颜色的边缘切下不同区域并称重,分别以心肌梗死区质量(infart weight, IW)、缺血区质量(weight of risk, WR)占左心室质量(weight of left ventricular, WLW)的百分比(IW/WLV)%、(WR/WLV)%反映心肌梗死面积、心肌缺血面积。

1.4.4 血浆心肌酶测定 采用 HITACHI7150 生化分析仪检测血浆 AST、LDH、LDH1 水平。

1.4.5 血浆 SOD、MDA 测定 按试剂盒说明书中的方法测定 SOD 活力性和 MDA 含量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 血浆心肌酶的变化 MIR 组血浆各心肌酶均明显高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$),MIR 组与溶剂组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),姜黄素组血浆各心肌酶均明显低于 MIR 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 姜黄素对 MIR 大鼠血浆心肌酶的影响
($\bar{x} \pm s, U/L, n=10$)

| 组别 | AST | LDH | LDH1 |
|---------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | 203.0±46.0 ^c | 799.0±35 ^c | 211.0±33.0 ^c |
| MIR 组 | 354.0±23 | 2 235.0±267.0 | 371.0±67.0 |
| 溶剂组 | 343.0±59 ^a | 2 123.0±243.0 ^a | 364.0±53.0 ^a |
| 姜黄素高剂量组 | 198.0±33.0 ^c | 765.0±126.0 ^c | 218.0±43.0 ^c |
| 姜黄素中剂量组 | 246.0±26.0 ^c | 862.0±147.0 ^c | 253.0±48.0 ^c |
| 姜黄素低剂量组 | 198.0±33.0 ^c | 1 789.0±405.0 ^a | 375.0±57.0 ^a |

^a: $P > 0.05$; ^c: $P < 0.05$,与 MIR 组比较。

2.2 血浆 SOD、MDA 的变化 MIR 组血浆 MDA 含量明显高于假手术组($P < 0.05$),与溶剂组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),也明显高于姜黄素各组,差异有统计学意义($P < 0.05$);MIR 组 SOD 活性明显低于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$),与溶剂组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),也明显低于姜黄素各组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 姜黄素对 MIR 大鼠血浆 SOD、MDA 的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | MDA(mmol/L) | SOD(U/mL) |
|---------|----------------------|-------------------------|
| 假手术组 | 2.2±0.3 ^c | 121.0±15.0 ^c |
| MIR 组 | 7.1±1.2 | 75.0±7.0 |
| 溶剂组 | 7.3±1.2 ^a | 83.0±5.0 ^a |
| 姜黄素高剂量组 | 3.4±0.9 ^c | 115.0±7.0 ^c |
| 姜黄素中剂量组 | 4.1±0.2 ^c | 99.0±8.0 ^c |
| 姜黄素低剂量组 | 4.3±0.4 ^c | 91.0±3.0 ^a |

^a: $P > 0.05$; ^c: $P < 0.05$,与 MIR 组比较。

2.3 心肌梗死面积的变化 各组间(WR/WLV)%比较差异无统计学意义($P > 0.05$);MIR 组与溶剂组(IW/WLV)%比较

差异无统计学意义($P > 0.05$),姜黄素高、中剂量组明显低于 MIR 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 3)。

表 3 姜黄素对缺血再灌注心肌梗死面积的影响
($\bar{x} \pm s, \%, n=10$)

| 组别 | WR/WLV | IW/WLV |
|---------|-----------------------|-----------------------|
| 假手术组 | 40.0±9.0 ^a | 0 ^c |
| MIR 组 | 46.0±5.0 | 17.1±3.5 |
| 溶剂组 | 42.0±5.0 ^a | 16.8±1.2 ^a |
| 姜黄素高剂量组 | 43.0±7.0 ^a | 7.9±2.3 ^c |
| 姜黄素中剂量组 | 41.0±6.0 ^a | 9.9±1.7 ^c |
| 姜黄素低剂量组 | 40.0±9.0 ^a | 14.6±3.1 ^a |

^a: $P > 0.05$; ^c: $P < 0.05$,与 MIR 组比较。

3 讨 论

MIR 损伤广泛存在于急性冠状动脉综合征、体外循环手术、心脏移植、心脏骤停与心肺复苏等过程中。在临床上心肌梗死的实验室检查变化主要表现为 ECG 的异常及血清酶学指标的异常。大量自由基特别是活性氧产生介导的氧化应激是导致 MIR 损伤的主要机制之一。

正常时,细胞内自由基清除剂 SOD 使氧自由基转变成过氧化氢(H_2O_2),通过过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及半胱氨酸蛋白酶(组织蛋白酶 B、D、L 等)^[3]的作用还原为水和分子氧,氧自由基产生与清除保持动态平衡。急性心肌缺血再灌注发生过程中,由于组织缺氧导致呼吸链抑制,还原型辅酶 I(NADH)堆积,游离脂肪酸堆积,膜脂质的分子氧不能全部还原,经加氧酶系作用产生大量自由基;自由基氧化膜上的不饱和脂肪酸使脂肪变性形成过氧化脂质。在形成过氧化脂质过程中,因过氧化引起大量氧自由基产生^[4-5]。氧自由基过量生成和(或)细胞内抗氧化系统受损导致氧自由基及相关代谢产物过量聚集,从而对机体造成损伤,即氧化应激损伤^[6-7]。氧化应激损伤心肌细胞膜、肌质网膜及线粒体膜,导致膜通透性增加,心肌酶如 LDH、AST 等漏出到血液中,因此检测血浆心肌酶,尤其是心肌同工酶如 LDH1 可反应心肌受损程度。MDA 是脂质过氧化终末代谢产物,其含量反映脂质过氧化程度以及自由基的含量。SOD 是自由基清除酶,其活性反映组织抗氧化防御系统的状况及组织氧化损伤的程度。

姜黄素是从植物姜黄、郁金、莪术等植物根茎中提取的一种生物多酚化合物。现代医学研究揭示,姜黄素具有直接捕捉和清除自由基的能力,其分子结构中的酚羟基在抗氧化活性中起决定作用^[8]。有报道,姜黄素体外可抑制脂氧酶和环氧酶活性^[9],减少从花生四烯酸途径生成的自由基;抑制黄嘌呤氧化酶活性^[10],减少腺苷代谢途径形成的自由基;抑制一氧化氮合酶活性^[11],减少由精氨酸代谢途径产生的 NO 所诱导的自由基的生成;抑制中性粒细胞炎症反应^[12],减少白细胞呼吸暴发产生的自由基。

本研究结果显示,各组间(WR/WLV)%无显著差异,MIR 组血浆各心肌酶、MDA 含量、(IW/WLV)%明显高于假手术组,与 MIR 组比较,姜黄素高、中、低剂量组 MDA 含量明显降低、SOD 活性升高,表明姜黄素能减少心肌酶漏出,减少梗死面积。上述实验结果提示姜黄素对实验性心肌缺血再灌注引起的氧化应激损伤有保护作用,其机制可能与清除氧自由基、保护氧自由基清除酶活性、增强缺血再灌注大(下转第 29 页)

解使其失活。但是本实验显示该蛋白高表达的趋势与复发癌侵袭转移的理论并不吻合,其原因可能与实验误差有关,但具体机制还需进一步探讨。

参考文献:

[1] 薛凤霞,赵敬. 复发性卵巢癌的诊断[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2005,21(7):385-386.

[2] Duelli DM, Lazebnik YA. Primary cells suppress oncogene-dependent apoptosis[J]. Nat Cell Biol,2000,2(11):859-862.

[3] Stambolic V, Mak TW, Woodgett JR. Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis[J]. Oncogene,1999,18(45):6094-6103.

[4] Pusch W, Kostrzewa M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in screening and diagnostic research [J]. Curr Pharm Des,2005,11(20):2577-2591.

[5] Semmes OJ, Feng Z, Adam BL, et al. Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer: I. Assessment of platform reproducibility[J]. Clin Chem,2005,51(1):102-112.

[6] De Noo ME, Tollenaar RA, Ozalp A, et al. Reliability of human serum protein profiles generated with C8 magnetic beads assisted MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Anal Chem,2005,77(22):7232-7241.

[7] Ketterlinus R, Hsieh SY, Teng SH, et al. Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software [J]. BioTechniques, 2005, Suppl: S37-40.

[8] 刘伟杰,秦环龙,马延磊. 大肠癌患者肠黏膜的蛋白质组学研究[J]. 山东医药,2008,48(40):1-3.

[9] Luftner D, Possinger K. Nuclear matrix proteins as biomarkers for breast cancer[J]. Exp Rev Mol, Diagn, 2002, 2(1):23.

[10] 李玉华,杨留才,孙炯,等. 卵巢癌组织的差异蛋白质研究[J]. 苏州大学学报:医学版,2009,29(3):483-486.

[11] Tammela J, Lele S. New modalities in detection of recurrent ovarian cancer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2004, 16(1):5-9.

[12] 张淑兰,王丹波,任凤岩. 肿瘤标志物检测在复发性卵巢癌诊治中的意义[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21(7):389-391.

[13] Bandera CA, Ye B, Mok SC. New technologies for the identification of markers for early detection of ovarian cancer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2003, 15(1):51.

[14] 仲召阳,王东,李增鹏,等. 多肿瘤标志物蛋白质芯片检测系统对结直肠癌诊断的临床意义[J]. 重庆医学,2007,36(23):2406-2408.

[15] 乔正蓉. 甲胎蛋白与癌胚抗原肿瘤标志物联合检测在原发性肝癌鉴别诊断中的应用[J]. 重庆医学,2008,37(12):1333-1335.

[16] Beneduce L, Castaldi F, Marino M, et al. Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2005,103(12):2558-2565.

(收稿日期:2010-05-10 修回日期:2010-09-10)

(上接第 26 页)

鼠心肌抗氧化能力、抑制脂质过氧化物产生、减轻脂质过氧化所致心肌细胞膜的损伤等有关。

参考文献:

[1] Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, et al. Oxidative stress-induced ischemic heart disease: protection by antioxidants[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(3):369-387.

[2] 程虹,刘惟堯. 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):1238-1241.

[3] 杨家荣,杨慧,潘铁军. 姜黄素对膀胱肿瘤细胞组织蛋白酶 D 表达的影响[J]. 重庆医学,2008,37(14):1540-1543.

[4] Flaherty JT, Zweier JL. Role of oxygen radicals in myocardial reperfusion injury: experimental and clinical evidence[J]. Klin Wochenschr, 1991, 69(21-23):1061-1065.

[5] 邵耕. 现代冠心病学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1995:8.

[6] Bassenge E, Schneider HT, Daiber A. Oxidative stress and cardiovascular disease[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2005, 130(50):2904-2909.

[7] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular diseases[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1):29-38.

[8] Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, et al. Role of phenolic HO-1 and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin[J]. Free Rad Biol Med, 2003, 35(5):475-784.

[9] Huang MT, Lysz T, Ferraro T, et al. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis[J]. Cancer Res, 1991, 51(3):813-819.

[10] Lin JK, Shih CA. Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/xidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH 3T3 cells [J]. Carcinogenesis, 1994, 15(8):1717-1721.

[11] Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an antitumor promoter and antiinflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 206(2):533-540.

[12] Srivastava R. Inhibition of neutrophil response by curcumin[J]. Agents Actions, 1998, 28(3/4):298-303.

(收稿日期:2010-01-08 修回日期:2010-05-10)