

· 基础研究 ·

姜黄素诱导 HO-1 表达对大鼠动脉粥样硬化的影响*

刘全未¹, 黄维义^{2△}

(1. 四川省内江市第二人民医院心内科 641100; 2. 泸州医学院附属医院心内科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨姜黄素能否诱导大鼠主动脉血红素加氧酶-1(HO-1)高表达,以及诱导 HO-1 高表达能否有效发挥内源性抗动脉粥样硬化(AS)作用。方法 以健康雄性 Wistar 大鼠 38 只,随机分为正常对照组($n=8$ 只)、模型组($n=14$ 只)、姜黄素组($n=8$ 只)及抑制组($n=8$ 只),模型组、姜黄素组、抑制组同法复制 AS 模型,姜黄素组加用姜黄素,抑制组加用姜黄素及锌原卟啉 IX。于 6、10 及 14 周末分别随机处死模型组大鼠 2 只以了解 AS 形成程度。第 14 周末处死所有大鼠取降主动脉观察病理学变化,同时行主动脉内 HO-1 表达、分布情况及活力测定。结果 (1)姜黄素组 HO-1 表达及活力均显著高于模型组($P<0.05$),AS 程度明显轻于模型组。(2)抑制组 HO-1 表达及活力均明显低于姜黄素组($P<0.05$),AS 程度较姜黄素组加重。结论 姜黄素可显著诱导 HO-1 表达并增加其活力进而发挥抗 AS 作用。

关键词:姜黄素;动脉粥样硬化;大鼠;血红素加氧酶-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.26.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)26-2649-03

Effect of curcumin by inducing heme oxygenase-1 expression on atherosclerosis in rats

Liu Quanwei¹, Huang Weiyi^{2△}

(1. Department of Cardiology, The Second People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan 641100, China;

2. Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 64600, China)

Abstract: Objective To explore whether curcumin(CMN)could induce the expression of heme oxygenase-1(HO-1) in rat's aortic artery and the induced high expression plays an anti-atherosclerosis(AS) role. **Methods** 38 male Wistar rats were randomly divided into 4 groups as control group (group A, $n=8$), model group (group B, $n=14$), treatment group (group C, $n=8$) and suppression group (group D, $n=8$). Rate model with AS was established by same method in group B, C and D, group C were treated with CMN and group D treated both CMN and ZnPP IX at the same time. 2 rats from group B were executed at the end of 6, 10 and 14 weeks respectively to detect the pathological changes and the AS degree. All of the rates were executed at the end of 14 weeks' treatment and the descending aorta tissue was observed by light microscopy, furthermore, detected the expression and distribution and its activity about HO-1 protein in the aortic artery. **Results** (1) The expression and activity about HO-1 in group C were increased significantly than group B ($P<0.05$), the degree of AS in group C were lighter than group B; (2) The expression and activity about HO-1 in group D were decreased significantly than group C ($P<0.05$), the degree of AS in group D were lighter than group C. **Conclusion** CMN could induce HO-1 protein over expression and increase its activity and play an anti-AS role in rat's aortic artery, however, this induction were blocked significantly by ZnPP IX.

Key words: curcumin; atherosclerosis; rat; heme oxygenase-1

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生机制十分复杂,多种危险因素如高血压、吸烟、高血脂、糖尿病等均可通过促发氧化应激反应,导致血管内皮细胞损伤、低密度脂蛋白侵入内皮下间隙并在此被氧化修饰、单核细胞趋化聚集于内皮下并激活致血管壁慢性炎症反应等,最终促发 AS^[1-2]。然而,同样具有上述致 AS 高危因素的部分人群却并不患病,表明人体内必然存在着有效拮抗氧化应激、防止 AS 的内源性保护机制。已知血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1)是 HO 的诱导型,HO-1/胆红素/CO 广泛参与抗炎、抗多种急、慢性氧化应激损伤,在防治高血压、AS 等多种疾病中起重要作用,是机体内不可缺少的内源性保护系统^[3]。近年发现,姜黄素是一种天然的 HO-1 强诱导剂,能诱导多种组织细胞高表达 HO-1 蛋白。本研究拟以姜黄素诱导 HO-1 的表达,探讨其抗 AS 疗效。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器 姜黄素(美国 SIGMA 公司,纯度 99%),锌原卟啉 IX(美国 SIGMA 公司),维生素 D 注射液(上海通用药

业股份有限公司),胆固醇及胆酸钠(上海蓝季科技发展有限公司),丙硫氧嘧啶(上海朝晖药业有限公司),HO-1 检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 AS 模型建立及动物分组 健康雄性 Wistar 大鼠(3 月龄,体质量 180~200 g,四川大学华西医学动物中心提供)38 只,适应性喂养 1 周后随机分为 4 组,即正常对照组($n=8$ 只)、模型组($n=14$ 只)、姜黄素组($n=8$ 只)及抑制组($n=8$ 只)。正常对照组全程普通饲料喂养,模型组、姜黄素组、抑制组在实验开始时均一次性腹腔注射维生素 D 注射液 70 万 U/kg,同时姜黄素组加用姜黄素 3 mg/kg,隔日腹腔注射 1 次,抑制组加用姜黄素同时予锌原卟啉 IX 7.5 mg/kg,隔日腹腔注射 1 次,均予高脂饲料(胆固醇 3%,胆酸钠 0.5%,丙硫氧嘧啶 0.2%,白糖 5%,猪油 10%,普通饲料 81.3%)喂养。于 6、10 及 14 周末分别处死模型组大鼠 2 只以了解 AS 形成程度。实验时间 14 周。

1.3 病理形态观察 14 周末,苯巴比妥钠腹腔麻醉后,分离

主动脉并剥除外膜结缔组织取降主动脉起始段 1~2 cm 置于 10% 中性甲醛溶液固定,常规石蜡切片及 HE 染色,光镜下观察血管内皮连续性及向管腔突出情况,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC),泡沫细胞及血管内膜、中膜变化,并于多媒体彩色病理图文分析系统测量内膜、中膜厚度及其比值。

1.4 斑块面积测定 主动脉经 10% 中性甲醛溶液固定。常规脱色后用油红 O 染色(斑块部位着色),然后在多媒体彩色病理图文分析系统分别测量斑块面积和主动脉内膜面积。计算斑块占主动脉内膜面积的百分比。

1.5 HO-1 表达检测 取大鼠降主动脉近段 1~2 cm,行免疫组织化学染色(SABC)法检查细胞内 HO-1 表达及分布情况。将大鼠主动脉用 10% 中性甲醛溶液固定后行石蜡包埋、切片,将切片常规脱蜡、至水,3% 过氧化氢(H₂O₂)灭活内源性过氧化酶,经抗原修复、正常血清封闭后,滴加一抗(抗 HO-1 抗体,滴度 1:200)及二抗(滴度 1:100);DAB 室温下避光显色,脱水、透明、封片,显微镜下观察,见细胞胞质内有棕褐色颗粒者即为 HO-1 蛋白表达阳性细胞。用 CD-8 病理彩色图像分析系统在 200 倍光镜下,对每张切片随机测定 5 个不重复视野的 HO-1 蛋白吸光度(optical density, OD)值,取平均值代表 HO-1 蛋白表达量。

1.6 HO-1 活力测定 HO-1 的活力测定参考姚海木等^[4]的方法进行,取大鼠降主动脉近段约 1~2 cm 处组织制成 10% 组织匀浆,高速离心分离微粒体,考马亮兰法定量蛋白浓度;再根据 HO-1 降解血红蛋白生成胆红素的原理,以单位时间内每毫克蛋白催化反应体系中胆红素的生成量代表 HO-1 活力,单位为 nmol/(mg·h)。

1.7 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件行统计学分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

光镜下观察,见正常对照组血管内皮完整、光滑;弹力纤维层结构清晰完整。模型组见动脉壁明显增厚,管壁向管腔突出,内皮下可见大量泡沫细胞聚集,见表 1。HO-1 表达量、分布及活力检测见表 2。

表 1 4 组内膜、中膜厚度比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	内膜厚度(μm)	内膜/中膜(%)
正常对照组	8	8.81 \pm 1.57	8.70 \pm 1.6.00
模型组	8	36.92 \pm 8.72	44.70 \pm 9.00
姜黄素组	8	26.06 \pm 3.91 [#]	35.50 \pm 5.80 [#]
抑制组	8	34.80 \pm 5.56 [*]	45.00 \pm 10.20 [*]

[#]: $P < 0.05$,与模型组比较;^{*}: $P < 0.05$,与 CMN 组比较。

表 2 HO-1 蛋白 OD 值及活力检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值	HO-1 活力[nmol/(mg·h)]
正常对照组	8	0.113 \pm 0.026	25.05 \pm 6.17
模型组	8	0.271 \pm 0.05	35.46 \pm 3.17
姜黄素组	8	0.448 \pm 0.078 [#]	58.90 \pm 6.05 [#]
抑制组	8	0.213 \pm 0.038 [*]	8.45 \pm 2.01 [*]

[#]: $P < 0.05$,与模型组比较;^{*}: $P < 0.05$,与 CMN 组比较。

正常对照组大鼠主动脉内膜无粥样斑块形成;模型组斑块面积比值达(46.24 \pm 5.13)%,姜黄素组为(15.17 \pm 4.81)%,

抑制组为(44.96 \pm 6.59)%。模型组的斑块面积比值与抑制组比较无显著变化($P > 0.05$),但均明显高于姜黄素组($P < 0.05$)。

3 讨 论

存在于细胞内微粒体中的 HO 系统可能是体内抗 AS 重要防御体系之一,是影响 AS 发生、发展的许多病理过程。作为血红蛋白代谢的起始酶和限速酶,HO-1 能降解血红蛋白产生等摩尔的胆绿素、CO 和游离铁,其中胆绿素迅速被胆绿素还原酶还原成胆红素。胆红素具有强大的抗氧化、抗炎及抑制 VSMC 增殖等作用,而 CO 亦广泛参与抗炎、调控细胞凋亡、抑制 VSMC 增殖。有研究表明,HO-1 通过降解血红蛋白所生成的产物发挥作用^[5]。HO 系统有可能通过对 NO 和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的调节及代偿机制抑制 AS 的发展^[6]。Yet 等^[7]利用腺病毒作为载体转染 HO-1 基因至载脂蛋白 E 基因缺失的小鼠,使 VSMC HO-1 高表达,有效阻止了 AS 的发生,反之,用锡原卟啉(Sn-protoporphyrin IX, SnPP)抑制 HO-1 的活力则能促进 AS 的发展;此外,Wang 等^[8]应用免疫组化染色和原位杂交技术证明实验动物 AS 斑块内、内皮细胞和 VSMC 内有 HO-1 表达的适应性增高,进一步研究发现,HO-1 的过表达可减少斑块形成,而使用 HO-1 的抑制剂如 SnPP 抑制 HO-1 活力则可促进斑块的发生和进展^[9]。以上研究均有力地证明了 HO-1 具有抗 AS 的作用。

姜黄素是从姜黄属中药如姜黄、郁金、莪术中提取的一种生物多酚化合物,可通过抗炎、抗氧化及清除自由基、抗凝、调脂等复杂的药理作用有效拮抗 AS 的进程^[10-13]。其药理作用与 HO-1 广泛的内源性细胞保护作用极其相似,因而推测姜黄素与 HO-1 两者存在着某种内在的紧密联系。新近不断增多的证据表明,姜黄素的众多药理作用主要通过诱导 HO-1 蛋白表达实现,如姜黄素通过诱导大鼠 VSMC HO-1 蛋白高表达从而显著抑制 VSMC 增殖^[14-15]。有研究发现,姜黄素芳香环上的甲氧基是其诱导 HO-1 表达的活力部位^[16],并可能是通过活化核因子相关因子 2/抗氧化剂反应元件这一特殊的细胞内细胞信号转导途径而诱导 HO-1 的表达^[17]。本研究结果显示,姜黄素可显著提高 HO-1 表达并增强其活力,有效减轻 AS 程度;同时应用锡原卟啉 IX 可显著抑制姜黄素对 HO-1 的诱导表达,其 AS 程度亦明显加重。

姜黄素抗 AS 作用尚未完全阐明。本研究证实了姜黄素具有抗 AS 作用,亦证实了诱导 HO-1 高表达在姜黄素抗 AS 中的重要价值。为 AS 的防治提供了新思路,也为通过上调 HO-1 表达这一全新的方法防治 AS 奠定了有力的基础,其作用与机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Harrison D, Kathy K, Griendling, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis[J]. Am J cardiol, 2003, 91(suppl 1):S7-11.
- [2] 陈礼波, 李晓辉, 张海港, 等. 炎症反应对兔腹主动脉粥样硬化形成的影响及其超声检查的评价[J]. 重庆医学, 2009, 38(21):2674-2676.
- [3] Ishikawa K, Maruyama Y. Heme oxygenase as an intrinsic defense system in vascular wall: implication against atherogenesis[J]. J Atheroscler Thromb, 2001, 8(3): 63-70.

- [4] 姚海木, 吴学思, 张靖, 等. 血红蛋白氧合酶-1/一氧化碳通路参与辛伐他汀抗高血压诱发的大鼠心肌肥厚[J]. 生理学报, 2006, 58(2): 116-123.
- [5] Takahashi T, Morita K, Akagi R, et al. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11(12): 1545-1561.
- [6] 邓俊, 向贵平, 黄骥. HO-1/CO 与 NOS/NO 系统在动脉粥样硬化中的作用及其相关性研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(23): 2146-2150.
- [7] Yet SF, Layne MD, Liu X, et al. Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling [J]. *FASEB*, 2003, 17(12): 1759-1761.
- [8] Wang LJ, Lee TS, Lee FY, et al. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesion [J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(3): 711-720.
- [9] Ishikawa K, Sugawara D, Wang XP, et al. Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice [J]. *Circ Res*, 2001, 88(5): 306-512.
- [10] Okada K, Wangpoengtrakul C, Tanaka T, et al. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice [J]. *J Nutr*, 2001, 131(8): 2090-2095.
- [11] Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, et al. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats [J]. *Intern J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(10): 1967-1980.
- [12] Nan B, Yang H, Yan S, et al. C-reactive protein decreases expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells [J]. *Surgery*, 2005, 138(2): 212-222.
- [13] Arafa HM. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats [J]. *Med Sci Monit*, 2005, 11(7): 228-234.
- [14] Pae HO, Jeong GS, Jeong SO, et al. Roles of heme oxygenase-1 in curcumin-induced growth inhibition in rat smooth muscle cells [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(3): 267-277.
- [15] 张英, 黄维义, 万英. 姜黄素诱导血红蛋白氧合酶-1 表达抗大鼠主动脉平滑肌细胞增殖作用的研究 [J]. 临床心血管病杂志, 2008, 24(6): 444-446.
- [16] Jeong GS, Oh GS, Pae HO, et al. Comparative effects of curcuminoids on endothelial heme oxygenase-1 expression; ortho-methoxy groups are essential to enhance heme oxygenase activity and protection [J]. *Exp Mol Med*, 2006, 31, 38(4): 393-400.
- [17] Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element [J]. *Biochem J*, 2003, 371(Pt3): 887-895.

(收稿日期: 2011-04-10 修回日期: 2011-05-15)

(上接第 2648 页)

达亦减少, 分析原因可能与多机制参与 NAG-1 的表达有关。

总之, 对 NAG-1 表达的研究可成为治疗胃癌的一个新的化学预防靶标, 也提示对 NAG-1 蛋白的进一步研究可能有助于未来抗肿瘤药物的开发。

参考文献:

- [1] 吴在德. 外科学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 460.
- [2] 徐国宝, 李涛, 于霞, 等. 胃癌肝转移危险因素的相关性分析 [J]. 重庆医学, 2010, 39(6): 420-423.
- [3] Bimer P, Schindl M, Obennair A, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor is a marker for an unfavorable prognosis in early stage invasive cervical [J]. *Cancer*, 2000, 60(7): 4693-4696.
- [4] Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, et al. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF- β superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(4): 901-908.
- [5] Thomas R, True LD, Lange PH, et al. Placental bone morphogenetic protein (PLAB) gene expression in normal, premalignant and malignant human prostate cancer: relation to tumor development and progression [J]. *Cancer*, 2001(13), 93: 47-52.
- [6] Kathy V, Su Y, Henry G, et al. 1,1-Bis(3-indolyl)-1-(p-substituted phenyl) methanes inhibit proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells by activation of multiple pathways [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 109(6): 273-283.
- [7] Kadara H, Schroeder CP, Lotan D, et al. Induction of GDF-15/NAG-1/MIC-1 in human lung carcinoma cells by retinoid-related molecules and assessment of its role in apoptosis [J]. *Cancer Biol/Ther*, 2006, 5(5): 518-522.
- [8] Kim K, Baek SJ, Flake GP, et al. Expression and regulation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) in human and mouse tissue. [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 1388-1398.
- [9] Julie AK, Scott M, James RL, et al. p53 controls prostate-derived factor/macrophage inhibitory cytokine/NSAID-activated gene-1 expression in response to cell density, DNA damage and hypoxia through diverse mechanisms [J]. *Cancer Letters*, 2009, 277(1): 38-47.

(收稿日期: 2011-04-22 修回日期: 2011-05-24)