

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.22.004

姜黄素对机械通气相关性肺损伤的保护作用及其机制研究^{*}

张先明¹,杨 睿²,刘 庆¹,杨文婷¹,伍伟良³,杜 娟^{1△}

(1. 贵州医科大学附属医院呼吸内科,贵阳 550004;2. 贵州省贵阳市第一人民医院内科 550004;
3. 广州医科大学广州呼吸疾病研究所,广州 510000)

[摘要] **目的** 研究姜黄素对机械通气相关性肺损伤的保护作用及其分子机制。**方法** 将 30 只健康的日本大耳白兔分为对照组、损伤组和姜黄素组。其中对照组采用正常潮气量 8 mL/kg 通气;损伤组采用 20 mL/kg 大潮气量机械通气诱导肺损伤;姜黄素组在损伤组基础上给予姜黄素鼻饲,并分别予以血红素氧合酶 1(HO-1)激动剂钴原卟啉(CoPP)和抑制剂锌原卟啉(ZnPP)干预。实验过程中检测氧合指数,48 h 后处死动物获取肺组织标本检测肺组织湿干比(W/D)、丙二醛(MDA)水平及髓过氧化物酶(MPO)活性;用实时荧光定量-聚合酶链反应(RTQ-PCR)法检测 HO-1 mRNA 表达水平,比色法检测其活性,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素 6(IL-6)水平。**结果** 与对照组比较,损伤组氧合指数明显降低,W/D、MDA 水平及 MPO 活性、肺损伤总积分增加($P<0.05$)。姜黄素干预后,姜黄素组氧合指数较损伤组明显增加,W/D、MDA 水平、MPO 活性及肺损伤总积分明显降低;BALF 中 TNF- α 及 IL-6 水平明显降低,HO-1 活性及 mRNA 表达水平明显增加($P<0.05$)。姜黄素经 HO-1 激动剂 CoPP 处理后 TNF- α 、IL-6、肺损伤积分明显降低;经 HO-1 抑制剂 ZnPP 处理后 TNF- α 、IL-6、肺损伤积分明显增加。**结论** 姜黄素可能通过上调 HO-1 表达,从而改善机械通气相关性肺损伤免肺部气体交换功能,减轻炎症反应。

[关键词] 姜黄素;机械通气相关性肺损伤;血红素氧合酶-1

[中图分类号] R459.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)22-3034-04

Protective effect and mechanism of Curcumin on ventilator-induced lung injury in rabbits^{*}

Zhang Xianming¹,Yang Rui²,Liu Qing¹,Yang Wenting¹,Wu Weiliang³,Du Juan^{1△}

(1. Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of Internal Medicine, the First People's Hospital of Guiyang, Guiyang, Guizhou 550004, China; 3. Guangzhou Institute of Respiratory Disease Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect and molecular mechanism of Curcumin on ventilator-induced lung injury in rabbits. **Methods** Totally 30 healthy rabbits were assigned into control group, injury group and Curcumin group. The control group was treated with normal tidal volume 8 mL/kg ventilation; injury group was treated with 20 mL/kg tidal volume mechanical ventilation induced lung injury; on the basic of injury group, Curcumin group was treated with Curcumin, and the heme (HO-1) agonists and inhibitors of heme (CoPP) and zinc porphyrin (ZnPP) inhibitors were administered separately. The oxygenation index was detected, after 48 hours, the animals were sacrificed to obtain lung tissue specimens for detection of lung wet to dry weight ratio (W/D), malondialdehyde (MDA) levels and myeloperoxidase (MPO) activity. The expression level of HO-1 mRNA was detected by RTQ-PCR method, and its activity was detected by colorimetric method, the levels of TNF- α and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, the oxygenation index of injury group was significantly decreased, the W/D ratio, MDA and MPO activity were significantly increased, and the total score of lung injury was also increased ($P<0.05$). After Curcumin treatment, the oxygenation index increased, the W/D, MDA, MPO and the total score of lung injury decreased significantly ($P<0.05$). In the Curcumin group, Curcumin decreased the level of TNF- α and IL-6 in BALF, and upregulate HO-1 activity and mRNA expression in lung tissue ($P<0.05$). In addition, in Curcumin group, after treatment with HO-1 agonist CoPP, level of TNF- α and IL-6 in BALF and the total score of lung injury decreased; after treatment with HO-1 inhibitor ZnPP, level of TNF- α and IL-6 in BALF and the total score of lung injury increased. **Conclusion** Curcumin can induce HO-1 expression, and thus improve gas exchange and decrease inflammatory response and lung injury scores in ventilator-induced lung injury.

[Key words] curcumin; ventilator-induced lung injury; heme oxygenase-1

姜黄素是从姜黄属植物中分离出来的一种低分子质量多酚类化合物,其结构为双阿魏醌甲烷,具有广泛的作用。随着对姜黄素研究的日益深入,已证实其具有广泛的药理学活性,它不仅可作为一种非甾体类抗炎药物使用,而且还具有较好的化学预防特性。姜黄素能通过调节多条细胞信号通路^[1],抑制或促进肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)等细胞

^{*} 基金项目:贵州省卫生和计划生育委员会科学技术基金资助项目(gzwjkj2015-1-034)。 作者简介:张先明(1974—),博士,主要从事呼吸力学及机械通气的研究。 △ 通讯作者,E-mail:dujuan08888@tom.com。

因子的表达^[2],能安全无毒地发挥其抗炎、抗氧化、抗感染、抗肿瘤、抗肺纤维化等广泛的药理活性^[3]。研究表明姜黄素能通过 TGF-1/SMAD3 途径抑制脓毒症导致的肺损伤^[4];同时,姜黄素还能通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)及抗氧化作用抑制机械通气膈肌废用性萎缩^[5]。

最近,有研究还发现姜黄素是血红素氧合酶 1(HO-1)强有力的诱导剂,其抗氧化作用可能主要依赖于诱导 HO-1 蛋白表达^[6-7]。已知 HO-1 广泛表达于细胞微粒体内,是可由多种理化因素诱导的抗氧化酶,它可使细胞内游离血红素催化降解从而生成胆红素和 CO 等^[8],HO-1/胆红素/CO 系统具有强烈的抗氧化、抗凋亡和抗炎等作用,是细胞内十分重要的内源性保护体系,与心、肺、脑、肾等多种器官疾病密切相关。诱导 HO-1 高表达对于延缓疾病的进展有重要生物学作用,尤其对组织器官具有重要的保护作用,因而成为目前研究的热点^[9]。机械通气相关性肺损伤的本质是气压伤、剪切伤导致大量炎性介质释放而形成的生物伤^[10]。因此,作者假设姜黄素能够通过各种分子途径提高 HO-1 水平,抑制 TNF- α 、IL-6 等炎性细胞因子释放,从而达到减轻机械通气相关性肺损伤的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级日本大耳白兔 30 只,月龄 3~6 月,体质量 2.3~3.2 kg,由广东省高要市实验动物中心提供。

1.1.2 实验仪器与试剂 Evita 4 呼吸机(德国德格尔公司);i-STAT 全自动血气分析仪(美国 Abbott 公司);SYBR Premix Ex Taq™ PCR Kit(日本 TaKaRa 公司);9600DNA 扩增仪(美国 PE 生物系统公司);7500 型实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。姜黄素及 TNF- α 、IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(广州蓝吉生物科技有限公司);丙二醛(MDA)和髓过氧化物酶(MPO)检测及反转录试剂盒(广州吉坤生物医学有限公司);戊巴比妥钠、钴原卟啉(CoPP)和锌原卟啉(ZnPP,美国 Sigma 公司)。

1.2 方法 肌内注射 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 诱导麻醉后,行气管切开,插入气管套管及胃管,分离左侧颈总动脉采集动脉血。从耳静脉滴注乳酸林格液 6 mL·kg⁻¹·h⁻¹维持生理需要用以补充丧失的液体并维持血压稳定。动物准备阶段采用容量控制通气模式(IPPV 模式),潮气量(VT)8 mL/kg,吸氧分数为 50%,吸呼比为 1:2,呼气末正压 3 cm H₂O,根据动脉血气分析频率调整呼吸频率保持动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)在 35~40 mm Hg。

1.2.1 分组及干预 稳定 30 min 后记录各项基础参数,分为 3 组。(1)对照组($n=6$):继续予以初始常规潮气量 8 mL/kg 通气。(2)损伤组($n=6$):大潮气量 20 mL/kg 通气^[11],鼻饲生理盐水。(3)姜黄素组($n=6$):大潮气量 20 mL/kg 通气,鼻饲姜黄素 200 mg/kg,每日 3 次。为验证姜黄素是否通过 HO-1 影响炎性因子及肺损伤,另设两亚组:姜黄素+CoPP 组($n=6$),大潮气量 20 mL/kg,鼻饲姜黄素 200 mg/kg,每日 3 次,并腹腔注射 CoPP 15 mg/kg;姜黄素+ZnPP 组($n=6$),大潮气量 20 mL/kg,鼻饲姜黄素 200 mg/kg,每日 3 次,并腹腔注射 ZnPP 45 mg/kg。

1.2.2 血气分析、肺组织湿干比(W/D)、MDA 水平及 MPO

活性的测定 采用 i-SATA 便携式血气分析仪检测实验开始及实验结束时动脉血氧分压(PaO₂),并根据 PaO₂/吸入氧浓度(FiO₂)计算氧合指数。通过静脉注射 10%氯化钾(KCl)处死兔,取右肺组织 5 块,获得湿重,80 °C 烤箱内放置 24 h,获取干重,计算 W/D。MDA 水平按试剂盒说明书的步骤进行:加入样品及试剂混匀后 95 °C 水浴 30 min,4 500 r/min 离心 15 min,测定上清中吸光度(A)值。50 mL 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)加入肺组织后超声破碎,经过 3 个冻融循环,4 °C 15 000×g 离心 10 min。20 μ L 组织上清液与 40 μ L 分析缓冲液混合后,于 3 min 内在 460 nm 处检测 MPO 的活性。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液的采集及细胞因子测定 在大耳白兔右主支气管部位对右肺进行结扎,左肺插管注入 30 mL 生理盐水并收集肺泡灌洗液。ELISA 法测定 TNF- α 、IL-6 水平。

1.2.4 肺组织 HO-1 活性及 HO-1 mRNA 的表达 HO-1 的活性按参考文献[12]提供的方法进行测定,用考马斯亮蓝法检测蛋白水平。用 Trizol 试剂提取肺组织总 RNA,反转录合成 cDNA。HO-1:上游引物 5'-CAG GTG ACT GCC GAG GGT TTT -3',下游引物 5'-GGA AGT AGA GCG GGG CGT AG-3'。 β -肌动蛋白(β -actin):上游引物 5'-CCC ATC TAC GAG GGC TAC GC-3',下游引物 5'-CAG GAA GGC CTG GAA CA-3'。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳及拍照。每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数 Ct 值表示,样本的相对表达量为 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}。

1.2.5 病理学分析 通气 48 h 后以 10%KCl 处死动物,取肺组织以 10%甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色,选取其中 4 项具有代表性的病变并积分。包括:肺泡水肿、肺泡出血、肺泡中性粒细胞浸润、微血栓形成。使用显微镜选取病理标本切片四周及中心位置 5 个互不重叠的视野进行评估。放大 100 倍,必要时切换至 250 倍进一步确认。在评分系统中,1~4 分代表某一病理特点的严重程度:基本正常 1 分,轻度 2 分,中度 3 分,重度 4 分;每张病理切片每个病理特点 5 个视野的评分均数代表该病理切片这一病理特点的评分情况。最后用每只实验兔的 5 张病理切片均值及所观察病理特点指标之和来反映整个肺组织的损伤情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两多重比较采用 LSD-*t* 检验。方差不齐的定量资料采用 Kruskal-Wallis H 检验,两两多重比较采用 Nemenyi 法检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血气分析 与对照组相比,损伤组氧合指数明显降低($P<0.01$)。姜黄素干预后,姜黄素组氧合指数较损伤组明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 1。

2.2 各组肺组织中 W/D、MDA 水平及 MPO 和 HO-1 活性的变化 损伤组 W/D、MDA 水平和 MPO 活性高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。姜黄素干预后,肺组织 W/D、MDA 水平和 MPO 活性均下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。姜黄素干预后,姜黄素组 HO-1 活性明显高于对照组及损伤组。见表 1、图 2。

2.3 各组肺组织中 HO-1 mRNA 表达 结果显示,对照组中 HO-1 mRNA 表达水平低,损伤组表达增加,而给予姜黄素处

理后,HO-1 mRNA 表达水平明显增加,见图 3。

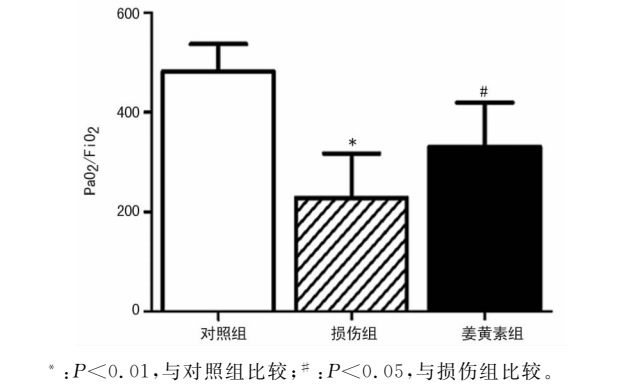


图 1 各组血气分析结果

表 1 各组肺组织中 MDA 水平及 MPO 和 HO-1 活性的变化(̄x±s)				
组别	n	MDA (nmol/mg)	MPO (ΔA/min·g·protein)	HO-1 [nmol/(mg protein·h)]
对照组	6	8.29±1.39	1.98±0.79	156.67±55.26
损伤组	6	19.22±1.74*	12.22±2.75*	367.25±79.66*
姜黄素组	6	12.33±2.19#	5.67±1.88#	639.22±105.36#

*: $P < 0.01$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与损伤组比较。

2.4 各组细胞因子水平测定 与对照组相比,损伤组 TNF-α 和 IL-6 水平明显增加($P < 0.05$)。姜黄素干预后,姜黄素组 TNF-α 和 IL-6 水平明显降低($P < 0.05$)。此外,给予 HO-1 激动剂 CoPP 后, TNF-α 及 IL-6 的水平进一步降低,而 HO-1 抑

制剂 ZnPP 处理后, TNF-α 及 IL-6 的水平明显增加($P < 0.05$),见表 2。

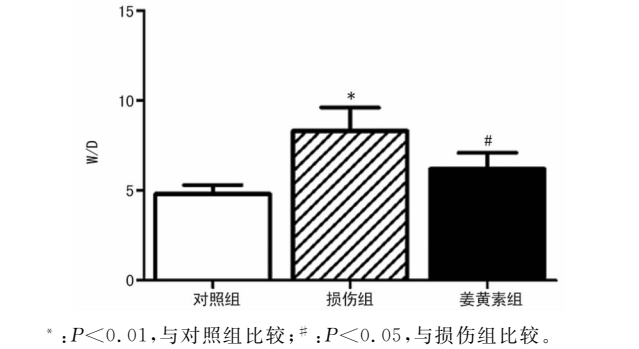
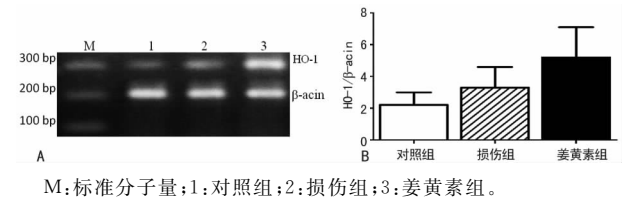


图 2 各组 W/D 的变化



M:标准分子量;1:对照组;2:损伤组;3:姜黄素组。

图 3 各组肺组织中 HO-1 mRNA 相对表达水平

2.5 各组肺损伤总积分的对比 各组肺泡水肿、肺泡中性粒细胞浸润、肺泡出血、微血栓形成之间存在明显差异,损伤组总积分明显增加($P < 0.05$)。姜黄素干预后,姜黄素组总积分明显降低($P < 0.05$)。此外,给予 HO-1 激动剂 CoPP 后,总积分降低,而 HO-1 抑制剂 ZnPP 处理后,总积分明显增加($P < 0.05$),见表 3。

表 2 各组 TNF-α 和 IL-6 水平比较(pg/mL,n=6,̄x±s)

项目	对照组	损伤组	姜黄素组	姜黄素+CoPP 组	姜黄素+ZnPP 组
TNF-α	13.63±6.98	426.66±55.87*	228.98±79.35#	98.79±30.56△	338.73±69.76△
IL-6	5.68±2.93	86.25±10.49*	41.62±17.26#	15.99±6.78△	63.22±15.71△

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与损伤组比较; △: $P < 0.05$, 与姜黄素组比较。

表 3 各组肺损伤总积分的对比(̄x±s,n=6)

项目	对照组	损伤组	姜黄素组	姜黄素+CoPP 组	姜黄素+ZnPP 组	F	P
肺泡水肿	0.8±0.5	3.3±0.5	2.1±0.7	2.1±0.5	3.7±0.5	8.955	<0.01
肺泡中性粒细胞浸润	0.9±0.3	2.8±0.6	2.5±0.6	1.8±0.5	3.3±0.2	4.152	<0.05
肺泡出血	0.7±0.4	2.9±0.5	2.2±0.6	2.0±0.4	3.4±0.5	4.526	<0.05
微血栓形成	0.8±0.3	3.7±0.4	2.1±0.3	2.1±0.3	3.5±0.3	3.935	<0.05
总积分	3.2±1.5	12.7±1.1	9.6±0.8	8.1±0.7	14.9±1.5	18.600	<0.01

3 讨 论

机械通气可以通过一系列机制导致机械通气相关性肺损伤。机械通气相关性肺损伤形成的机制主要包括:气压伤、容积伤及肺泡反复开闭导致的剪切伤。除直接的结构性损伤外,这些机械力还会促进炎性细胞因子的释放和中性粒细胞的聚集,导致局部和全身性炎症增加,形成生物伤,并随着血液循环将炎症播散到肺外器官,造成多器官功能衰竭,最终使机械通气患者病死率增加。

本研究采用大潮气通气建立机械通气相关性肺损伤的动物模型^[11],研究结果显示,大耳白兔使用大潮气通气后,其氧合指数小于 300 mm Hg,肺组织 W/D、MDA 水平和 MPO 活性的变化,以及炎性介质浓度和肺损伤总积分与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$),这表明大潮气量机械通气可造成机械通气相关性肺损伤。

近年来,针对机械通气相关性肺损伤的防治是研究的热点。姜黄素是从姜黄属植物中分离出来的一种低相对分子质

量多酚类化合物,其结构为双阿魏酰甲烷。姜黄素不仅作为一种非甾体类抗炎药物被使用,而且还具有化学预防特性,被证实具有广泛的药理学活性。

本研究显示,姜黄素组能提高氧合指数,表明姜黄素能有效改善肺组织的氧合和肺换气功能。同时,姜黄素组 W/D 下降,表明姜黄素能改善肺微血管的通透性,降低肺水肿的形成。众所周知,中性粒细胞的聚集在缺血-再灌注损伤中发挥重要的作用,是机械通气相关性肺损伤中重要的因素之一。因此,抑制中性粒细胞渗出可减轻肺损伤,改善患者的预后^[12]。MPO 活性是间接评价中性粒细胞渗出的重要指标之一。本研究发现,姜黄素能降低 MPO 活性,TNF- α 、IL-6 的水平也下降,提示姜黄素能抑制中性粒细胞的释放,降低炎症因子水平,从而减轻机械通气相关性肺损伤。

HO-1 在人及哺乳动物组织内广泛存在,能催化血红素分解成胆绿素、CO 和铁离子的关键限速酶。近年来发现它除了具有降解血红素功能外,还具有抗炎症、抗氧化损伤的作用^[13],较多的研究表明它具有重要组织器官的保护作用,从而降低重症患者的多器官功能障碍,因此成为目前研究的热点之一。在许多病理情况下,如缺血-再灌注时,大量游离血红蛋白和血红素产生。当血红素与体内的氧分子发生反应时,可催化产生大量具有细胞毒性的氧自由基,因而导致 DNA 损伤、脂质过氧化及蛋白质变性,加重组织器官的损伤。HO-1 作为催化血红素分解的关键限速酶,可降解血红素,从而产生细胞保护效应^[14]。因此,寻求 HO-1 的诱导剂,对防治各种炎性损伤具有重要意义。本研究表明损伤组 HO-1 的活性及 mRNA 表达水平增加,可能是机体正常反馈性保护发挥作用。而经姜黄素处理后,HO-1 活性及表达明显增加,同时分别采用 HO-1 激动剂 CoPP 及特异性抑制剂 ZnPP 处理后,TNF- α 、IL-6 的水平及肺损伤总积分分别明显降低及增加,表明诱导 HO-1 表达后能抑制细胞因子的产生,而特异性抑制 HO-1 表达能明显逆转姜黄素对细胞因子的抑制作用,加重肺损伤,这表明上调 HO-1 的表达可能是姜黄素抗炎的重要机制之一。

本实验研究表明,姜黄素能改善氧合,减轻机械通气相关性肺损伤的肺组织水肿,同时能通过上调 HO-1 的表达,抑制机械通气过程中促炎因子的释放,对机械通气肺损伤具有一定的肺保护作用。因此,在机械通气患者肠内营养加入姜黄素,对机械通气患者可能具有一定的肺保护作用,具有一定的临床应用价值。

参考文献

- [1] Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action; signal transduction[J]. *Biofactors*, 2013, 39(1): 27-36.
- [2] Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: An Orally Bioavailable Blocker of TNF and Other Pro-inflammatory Biomarkers[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169(8): 1672-

1692.

- [3] Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric; from farm to pharmacy[J]. *Biofactors*, 2013, 39(1): 2-13.
- [4] Xu F, Lin SH, Yang YZ, et al. The effect of curcumin on sepsis-induced acute lung injury in a rat model through the inhibition of the TGF- β 1/SMAD3 pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(1): 1-6.
- [5] Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB, et al. Nuclear factor-kappaB signaling contributes to mechanical ventilation-induced diaphragm weakness[J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(3): 927-934.
- [6] Yang C, Zhang X, Fan H, et al. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia[J]. *Brain Res*, 2009, 128(2): 133-141.
- [7] Sahin K, Orhan C, Tuzcu Z, et al. Curcumin ameliorates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(11): 4035-4041.
- [8] da SJL, Zand BA, Yang LM, et al. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney[J]. *Kidney Int*, 2001, 59(4): 1448-1457.
- [9] Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide; novel therapeutic strategies in critical care medicine[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(12): 1485-1494.
- [10] Zhang X, Wu W, Zhu Y, et al. Abdominal muscle activity during mechanical ventilation increases lung injury in severe acute respiratory distress syndrome[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0145694.
- [11] Li H, Wu Z, Feng D, et al. BML-111, a lipoxin receptor agonist, attenuates ventilator-induced lung injury in rats[J]. *Shock*, 2014, 41(4): 311-316.
- [12] Krupa A, Fudala R, Florence JM, et al. Bruton's tyrosine kinase mediates Fc γ RIIa/Toll-like receptor-4 receptor crosstalk in human neutrophils[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(2): 240-249.
- [13] Deshane J, Chen S, Caballero S, et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(3): 605-618.
- [14] An L, Liu CT, Yu MJ, et al. Heme oxygenase-1 system, inflammation and ventilator-induced lung injury[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 677(1/2/3): 1-4.

(收稿日期:2016-02-09 修回日期:2016-04-28)