论著

文章编号:1000-5404(2014)14-1492-04

姜黄素对内毒素诱导的急性肺损伤的保护作用及机制研究

陈永锋,周向东,杨和平 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 探究姜黄素在内毒素(LPS)诱导大鼠急性肺损伤(acute lung injury,ALI) 中的保护作用,并明确其作用机制。**方法** 80只健康雄性12周龄SD大鼠,体质量(200±25)g,由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为:①正常对照组:3 mL/kg生理盐水腹腔注射;②溶媒组:1 mL/kg DMSO和2 mL/kg生理盐水腹腔注射;③模型组:5 mg/kg LPS腹腔注射;④姜黄素组:先注射5 mg/kg LPS,30 min后注射200 mg/kg姜黄素腹腔注射。每组20只。分别于0、6、12、24 h选取5只大鼠行血气分析,Western blot检测肺组织MMP2、MMP9、ELISA检测IL-6和TNF-α的表达水平以及MPO活性。**结果** 正常对照、溶媒组大鼠组内和组间PaO_2、PaO_2/FiO_2、MMP2、MMP9、IL-6和TNF-α的表达水平以及MPO活性比较均无显著性差异($P>0.05$)。与0 h比较,模型组、姜黄素组在6、12、24等3个时点PaO_2、PaO_2/FiO_2显著降低($P<0.05$),MMP2、MMP9、IL-6和TNF-α的表达水平以及MPO活性显著升高($P<0.05$)。与正常对照组相比,模型组、姜黄素组PaO_2、PaO_2/FiO_2均显著降低($P<0.05$),MMP2、MMP9、IL-6和TNF-α的表达水平以及MPO活性显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,姜黄素组PaO_2、PaO_2/FiO_2在6、12、24 h均显著升高($P<0.05$),MMP2、MMP9、IL-6和TNF-α的表达水平以及MPO活性显著降低($P<0.05$)。**结论** 姜黄素能有效减轻由LPS诱导的ALI,其机制可能与下调MMP2和MMP9蛋白的表达、进而减少肺组织中性粒细胞的聚集和活化、最终显著减轻肺组织炎症反应有关。

[关键词] 姜黄素;ALI;MMP2;MMP9

[中图法分类号] R285.5;R363.21;R563.05 [文献标志码] A

Protective effects of curcumin on acute lung injury induced by LPS in rats

Chen yongfeng, Zhou Xiangdong , Yang Heping (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the protective effect of curcumin on acute lung injury induced by LPS in rats and further to explore the molecular mechanism. **Methods** Eighty 12-week-old SD rats weighing 200±25 g, aged 12 weeks, purchased from the Experimental Animal Center of the Third Military Medical University were randomized into 4 groups and treated as follows: control group were intraperitoneal injected with saline (3 mL/kg), the solvent group was injected with DMSO (1 mL/kg) in half an hour after intraperitoneal injection of saline (2 mL/kg), model group was injected with 5 mg/kg LPS, and curcumin treatment group was injected with curcumin 200 mg/kg in half an hour after intraperitoneal injection of LPS. Arterial blood samples were collected in 0, 6, 12, and 24 h after drug administration for blood gas analysis, then the lung pathology was assessed, meanwhile the expression levels of MMP2 and MMP9 were measured by Western blotting and the expression levels of IL-6 and TNF-α and the activity of MPO were determined by ELISA. **Results** There was no significant difference between and within control group and solvent group. Compared with 0 h, PaO_2 and PaO_2/FiO_2 were significantly decreased, the expression levels of MMP2, MMP9, IL-6 and TNF-α and the activity of MPO were significantly decreased in model group and curcumin treatment group at 6, 12 and 24 h ($P<0.05$). Compared with control group and solvent group, PaO_2 and PaO_2/FiO_2 were significantly decreased, the expression levels of MMP2, MMP9, IL-6 and TNF-α and the activity of MPO were significantly decreased in model group and curcumin treatment group ($P<0.05$). compared with model group, PaO_2 and PaO_2/FiO_2 were significantly increased, the expression levels of MMP2, MMP9, IL-6 and TNF-α and the activity of MPO were significantly decreased in curcumin treatment group ($P<0.05$). **Conclusion** Curcumin have a protective effect on acute lung injury induced by LPS in rats, and the protective mechanisms may be related to decreased MMP2 and MMP9 protein expression.

[通信作者] 周向东,E-mail: xiangdongzhou@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140710.0834.001.html(2014-07-10)

[**Key words**] curcumin; acute lung injury; MMP2; MMP9

Corresponding author: Zhou Xiangdong, E-mail: xiangdongzhou@126.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是指机体在受到严重创伤、感染、休克等打击后出现的一种以肺毛细血管内皮细胞、肺泡上皮细胞坏死、弥漫性肺间质及肺泡水肿而导致的急性低氧性呼吸功能不全。ALI发展到更严重阶段即为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),临床上表现为呼吸窘迫、常规治疗手段难以纠正的顽固性低氧血症和非心源性肺水肿[1]。目前尚未在针对ALI/ARDS的相关治疗上取得突破性进展,其致死率仍可高达30%~40%[2]。姜黄素是提取于中药姜黄根茎中的一种酚类色素,具有较为广泛的药理作用,如抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等[3-4]。有研究表明,姜黄素显著抑制中性粒细胞(polymorphonu clear neutrophils, PMNs)的聚集、黏附、迁移和活化,从而发挥其对于组织器官的保护效应[5]。然而,姜黄素在内毒素诱导的ALI过程中的作用及其作用机制尚不明确。本研究拟通过给予腹腔注射姜黄素后观察内毒素(LPS)致急性肺损伤大鼠的肺组织的病理改变、MMP2和MMP9表达、MPO水平、炎症因子含量的差异,初步探讨姜黄素在ALI过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

姜黄素和LPS(Sigma公司,美国);BCA蛋白含量测定试剂盒(HyClone公司,美国);Western blot发光检测试剂盒(北京普利莱基因公司,中国);兔抗大鼠MMP2多克隆抗体、兔抗大鼠MMP9多克隆抗体、兔抗大鼠β-actin多克隆抗体(Santa Cruz公司,美国);辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(中杉金桥生物技术有限公司,中国);电化学发光底物(康为世纪公司,中国);髓过氧化物酶(MPO)活性检测试剂盒;IL-6、TNF-α ELISA检测试剂盒(R&D公司,美国)。

1.2 动物分组及处理

健康雄性12周龄SD大鼠80只,体质量(200±25)g,由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为:①正常对照组:3 mL/kg生理盐水腹腔注射;②溶媒组:1 mL/kg DMSO和2 mL/kg生理盐水腹腔注射;③模型组:5 mg/kg LPS腹腔注射;④姜黄素组:先注射5 mg/kg LPS,30 min后注射200 mg/kg姜黄素腹腔注射。每组20只。

1.3 动脉血气分析

分别于0、6、12、24 h 4个时间点将大鼠麻醉后,腹部正中切口暴露腹腔,将腹腔脏器拨开,显露搏动的腹主动脉,用镊子将其游离出来,用预先已经肝素化的5 mL的采血注射器穿刺入腹主动脉,抽取约2 mL动脉血,橡皮塞密封隔绝空气,行血气分析。

1.4 肺组织病理改变观察

抽取动脉血气后,取右肺下叶,10%福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋,切片,HE染色,光学显微镜下观察肺组织的病理改变。

1.5 MMP2和MMP9表达水平检测

取各组大鼠肺组织100 mg,置于冰上剪碎,液氮冷冻,用研钵研磨成匀浆,加入裂解液裂解30 min后,12 000×*g* 4 ℃离心15 min,取上清,测浓度,配制上样液。取50 μg总蛋白行10%凝胶电泳,随后转膜,5%脱脂奶粉封闭,分别与相应的大鼠特异性抗体孵育,4 ℃,15 h,充分漂洗后孵育辣根过氧化物酶标记的二抗,37 ℃,1 h。最后将PVDF膜置于暗室显影,凝胶成像系统收集图像并对条带进行吸光度(波长:428 nm)值扫描,结果用目的条带灰度值/β-actin灰度值表示。

1.6 小鼠肺组织MPO、炎症因子检测

各组大鼠分别取100 mg肺组织进行匀浆,离心后取上清。按照试剂盒相关说明书测定480 nm处的吸光度值,测定MPO活性;采用相对应的检测ELISA检测试剂盒检测肺组织IL-6和TNF-α水平。

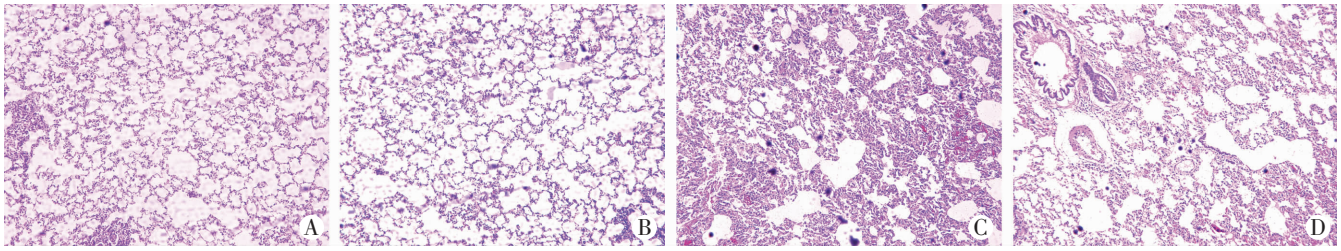
1.7 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 小鼠肺组织病理学改变

HE染色结果显示,正常对照组、溶媒组大鼠肺泡结构清晰,未见异常。见图1A、B;模型组肺泡结构破坏严重,呈现弥漫充血性水肿,肺间质水肿,肺泡间隔增宽,可见大量中性粒细胞浸润。见图1C;姜黄素组肺泡结构尚明显,肺间质水肿,肺泡间隔增宽,中性粒细胞浸润程度较模型组显著减轻。见图1D。



A:正常对照组;B:溶媒组;C:模型组;D:姜黄素组

图1 各处理组大鼠肺组织病理学改变 (HE ×100)

表1　各组大鼠不同时间点 PaO_2、PaO_2/FiO_2 的比较（$n=5, \bar{x}\pm s$）

组别	PaO_2(mmHg)				PaO_2/FiO_2(mmHg)			
	0 h	6 h	12 h	24 h	0 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	92.28±2.39	91.36±1.54	92.76±2.51	92.05±2.28	435.96±12.04	429.37±14.75	425.73±12.57	435.19±13.16
溶媒组	92.66±1.87	92.91±2.42	91.67±2.65	92.33±1.96	432.16±10.28	439.92±12.36	434.58±16.05	436.25±14.32
模型组	91.46±1.42	78.07±3.01^{abd}	67.19±3.94^{abd}	58.86±3.85^{abd}	431.95±11.81	305.95±13.27^{abd}	290.98±11.32^{abd}	279.82±10.05^{abd}
姜黄素组	91.73±2.31	85.36±3.52^{abcd}	76.58±2.98^{abcd}	70.87±4.04^{abcd}	426.34±13.66	378.75±15.52^{abcd}	359.36±16.97^{abcd}	317.81±13.56^{abcd}

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与溶媒组比较;c:$P<0.05$,与模型组比较;d:$P<0.05$,与0 h比较

表2　各组大鼠不同时间点 MMP2、MMP9 的表达定量比较（$n=5, \bar{x}\pm s$）

组别	MMP2				MMP9			
	0 h	6 h	12 h	24 h	0 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	0.74±0.18	0.83±0.16	0.75±0.14	0.81±0.19	0.66±0.13	0.71±0.17	0.79±0.15	0.71±0.13
溶媒组	0.76±0.13	0.84±0.12	0.83±0.15	0.79±0.16	0.75±0.11	0.72±0.09	0.63±0.16	0.69±0.12
模型组	0.84±0.16	1.45±0.26^{abd}	1.96±0.24^{abd}	2.31±0.19^{abd}	0.64±0.15	1.59±0.26^{abd}	2.26±0.23^{abd}	2.83±0.24^{abd}
姜黄素组	0.77±0.14	1.25±0.19^{abcd}	1.42±0.25^{abcd}	1.54±0.21^{abcd}	0.67±0.19	1.37±0.15^{abcd}	1.61±0.22^{abcd}	1.89±0.17^{abcd}

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与溶媒组比较;c:$P<0.05$,与模型组比较;d:$P<0.05$,与0 h比较

2.2　各组血气分析值比较

正常对照组、溶媒组大鼠组内和组间 PaO_2、PaO_2/FiO_2 比较均无显著统计学差异($P>0.05$)。与0 h比较,C、D在6、12、24 h 3个时点 PaO_2、PaO_2/FiO_2 均持续、显著地降低($P<0.05$)。与正常对照组相比,模型组、姜黄素组 PaO_2、PaO_2/FiO_2 均显著降低($P<0.05$);与模型组相比,姜黄素组 PaO_2、PaO_2/FiO_2 在6、12、24 h均显著升高($P<0.05$)。见表1。

2.3　各组 MMP2 和 MMP9 表达水平比较

正常对照组、溶媒组大鼠组内和组间 MMP2 和 MMP9 表达水平较低,变化均无显著统计学差异($P>0.05$)。与0 h相比,模型组、姜黄素组 MMP2 和 MMP9 表达在6、12、24 h 3个时点均明显增加,且伴随时间的延长而逐步增加($P<0.05$)。与正常对照组相比,模型组、姜黄素组 MMP2 和 MMP9 表达均显著增加($P<0.05$);与模型组相比,姜黄素组 MMP2 和 MMP9 表达在6、12、24 h均显著降低($P<0.05$)。见图2,表2。

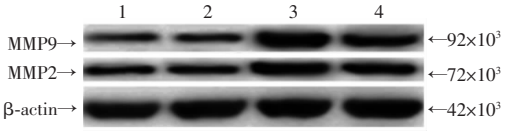


图2　Western blot 检测各组 ALI 大鼠腹腔注射12 h肺组织 MMP2 和 MMP9 的表达

2.4　各组 MPO、炎症因子水平比较

正常对照组、溶媒组大鼠组内和组间 MPO、IL-6 和 TNF-α 变化均无显著统计学差异($P>0.05$)。与0 h相比,模型组、姜黄素组在6、12、24 h 3个时间点 MPO、IL-6 和 TNF-α 水平均明显增加,且伴随时间的延长而逐步上升($P<0.05$)。与正常对照组相比,模型组、姜黄素组 MPO 活性、IL-6 和 TNF-α 水平均显著增加($P<0.05$);与模型组相比,姜黄素组 MPO 活性、IL-6 和 TNF-α 水平在6、12、24 h均显著降低($P<0.05$),见表3、4。

表3　各组大鼠不同时间点肺组织 MPO 活性水平的比较（$n=5, \bar{x}\pm s$）

组别	MPO 活性			
	0 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	0.895±0.18	0.812±0.16	0.826±0.24	0.877±0.19
溶媒组	0.866±0.23	0.846±0.22	0.831±0.15	0.912±0.26
模型组	0.845±0.21	1.696±0.29^{abd}	2.125±0.46^{abd}	2.718±0.49^{abd}
姜黄素组	0.874±0.14	1.457±0.16^{abcd}	1.623±0.35^{abcd}	1.745±0.41^{abcd}

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与溶媒组比较;c:$P<0.05$,与模型组比较;d:$P<0.05$,与0 h比较

3　讨论

ALI 的发病机制极其复杂,虽然目前已有大量相关研究,但迄今仍尚未完全阐明。但 ALI 的本质是过度的炎性级联反应而导致的肺泡-毛细血管结构的完整性遭到破坏,在整个其发病过程中,中性粒细胞肺内聚集是 ALI 早期最显著的病理学改变,同时也是导致 ALI 的主要因素[6-7]。LPS 作为目前公认的导致机体众多炎性损伤病理生理改变的重要介质,被广泛应用于 ALI 等疾病模型的构建。本研究表明,在腹腔注射 LPS 后,模型组大鼠 PaO_2、PaO_2/FiO_2 显著降低,诱发了典型的 ALI,肺组织 MPO、炎症因子水平升高明显,

表4　各组大鼠不同时间点肺组织 IL-6 和 TNF-α 水平的比较（$n=5, \bar{x}\pm s$）

组别	IL-6				TNF-α			
	0 h	6 h	12 h	24 h	0 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	10.36±2.59	9.67±2.15	11.25±3.12	9.48±3.53	1.16±0.19	1.15±0.27	1.08±0.19	0.98±0.21
溶媒组	9.16±3.65	11.18±3.92	10.75±2.98	10.56±4.85	1.13±0.16	1.01±0.20	0.96±0.26	1.17±0.14
模型组	9.79±3.28	39.52±9.65^{abd}	47.82±12.34^{abd}	54.16±14.42^{abd}	1.05±0.16	1.99±0.13^{abd}	2.84±0.36^{abd}	3.46±0.48^{abd}
姜黄素组	10.52±3.73	27.68±8.44^{abcd}	32.67±10.18^{abcd}	39.69±9.23^{abcd}	1.08±0.24	1.81±0.29^{abcd}	2.18±0.32^{abcd}	2.81±0.39^{abcd}

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与溶媒组比较;c:$P<0.05$,与模型组比较;d:$P<0.05$,与0 h比较

表明中性粒细胞浸润明显,炎症级联反应失控。既然中性粒细胞浸润在ALI的发生发展过程中发挥了极为重要的作用,那么阻止这一过程就成为了极为理想的干预靶点。

姜黄素是从植物姜黄中提取的中药单体,属于二苯基庚烃类化合物。近年来,姜黄素被证实在抗氧化、抗病毒、抗肿瘤和抗炎等方面发挥着广泛的作用,逐渐成为研究的热点[8]。在抗氧化方面,姜黄素能提高SOD、GPx1、CAT等多种抗氧化酶的活性而发挥其清除细胞内自由基的作用,进而抑制MAPK、NF-κB等信号通路的活化[9]。在抗病毒方面,姜黄素能通过活化P53、PGC-1α途径阻止病毒DNA的复制[10]。在抗肿瘤方面,姜黄素可以通过下调低氧诱导因子、Notch1的表达、抑制PKC的激活来抑制肿瘤细胞的增殖,促进其凋亡[11]。在抗炎症性损伤方面,已有的研究表明,姜黄素对于心、肺、脑、肝、肾等组织的炎性损伤有着极佳的保护作用,其具体的分子机制可能是通过抑制中性粒细胞向炎性反应靶器官的聚集及随后的活化作用有关[12]。那么,在LPS导致的ALI过程中,姜黄素是否也可以通过抑制中性粒细胞的聚集和活化发挥起保护作用呢?我们的研究表明,姜黄素减轻了LPS导致的PaO_2、PaO_2/FiO_2降低,MPO和炎症因子水平升高,表明姜黄素可有效抑制中性粒细胞在肺组织的聚集和活化,进而减轻LPS导致ALI。

姜黄素可有效抑制中性粒细胞的聚集和活化,进一步探明其发挥作用的具体分子机制就显得尤为必要。MMPs属于Ca^{2+}、Zn^{2+}依赖的蛋白水解酶家族,在胞外基质重塑中发挥着重要作用,活化后可降解绝大部分胞外基质成分,如层粘连蛋白、纤维蛋白连接素、Ⅳ型胶原蛋白、蛋白聚糖类等[13-14]。由于中性粒细胞在粘附、迁移的过程中常伴有胞外基质的重塑,且既往的研究表明,MMP2和MMP9的表达水平与中性粒细胞的聚集和活化程度、靶器官的损伤程度高度相关,抑制MMP2和MMP9的表达可显著减少中性粒细胞的聚集和活化,减轻其对靶器官的损伤[15]。那么,姜黄素是否是通过抑制MMP2和MMP9的表达发挥其保护作用呢?我们的研究表明,在正常大鼠肺组织,MMP2和MMP9表达较少;在受到LPS刺激后,MMP2和MMP9表达逐渐增加;而在给予姜黄素干预以后,MMP2和MMP9表达显著减少,提示姜黄素可能通过调控MMP2和MMP9表达来减少肺组织中性粒细胞的聚集和活化,进而发挥其肺保护作用。

综上所述,我们的结果表明姜黄素能有效减轻由LPS诱导的ALI,其机制可能与下调MMP2和MMP9蛋白的表达,进而减少肺组织中性粒细胞的聚集和活化,最终显著减轻肺组织炎症反应有关。

参考文献:

[1] Rice T W, Wheeler A P, Thompson B T, *et al*. Enteral omega-3 fatty acid, gamma-linolenic acid, and antioxidant supplementation in acute lung injury[J]. JAMA, 2011, 306(14): 1574-1581.

[2] National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network, Rice T W, Wheeler A P, *et al*. Initial trophic vs full enteral feeding in patients with acute lung injury: the EDEN randomized trial[J]. JAMA, 2012, 307(8): 795-803.

[3] Rao T S, Basu N, Siddiqui H H. Anti-inflammatory activity of curcumin analogues[J]. Indian J Med Res, 1982, 75: 574-578.

[4] Zhou H, Beevers C S, Huang S. Targets of curcumin[J]. Curr Drug Targets, 2011, 12(3): 332-347.

[5] Jantan I, Bukhari S N, Lajis N H, *et al*. Effects of diarylpentanoid analogues of curcumin on chemiluminescence and chemotactic activities of phagocytes[J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64(3): 404-412.

[6] Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury[J]. Mol Med, 2011, 17(3/4): 293-307.

[7] Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss B M, *et al*. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury[J]. J Clin Invest, 2012, 122(7): 2661-2671.

[8] Wilken R, Veena M S, Wang M B, *et al*. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 12.

[9] Palipoch S, Punsawad C, Koomhin P, *et al*. Hepatoprotective effect of curcumin and alpha-tocopherol against cisplatin-induced oxidative stress[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1): 111.

[10] Zandi K, Ramedani E, Mohammadi K, *et al*. Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line[J]. Nat Prod Commun, 2010, 5(12): 1935-1938.

[11] Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S. A review of therapeutic effects of curcumin[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(11): 2032-2046.

[12] Anand P, Sung B, Kunnumakkara A B, *et al*. Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: role of Michael acceptors and Michael donors[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(12): 1901-1909.

[13] Malemud C J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview[J]. Front Biosci, 2006, 11: 1696-1701.

[14] Martin M D, Matrisian L M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(3/4): 717-724.

[15] Tester A M, Cox J H, Connor A R, *et al*. LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis *in vivo* require PMN MMP-8 activity[J]. PLoS One, 2007, 2(3): e312.

(**收稿**:2014-05-18;**修回**:2014-06-25)

(编辑 栾 嘉)