

姜黄素对大鼠心肌梗死后炎症反应的抑制作用及其机制

陈磊磊,王泽穆,陈波,王连生,杨志健

(南京医科大学第一附属医院心内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨姜黄素对大鼠心肌梗死(myocardial infarction,MI)后炎症反应的抑制作用及相应机制。方法:采用 Wistar 大鼠,通过结扎冠状动脉建立 MI 模型,观察姜黄素对于梗死后不同时间心肌组织中炎症反应和炎症因子表达的影响,探讨其相关的分子生物学机制。结果:与对照组比较,姜黄素的使用明显改善 MI 后 28 d 的心脏功能,并降低 MI 后梗死区 1、7、14 及 28 d 的炎症细胞浸润;进一步研究显示姜黄素降低了大鼠 MI 后不同时段肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 6 的表达,并抑制 NF- κ B 和 JAK-1/SATA3 信号通路的激活。结论:姜黄素可通过抑制 MI 后炎症相关信号通路的激活来减少梗死区炎症细胞的浸润和炎症因子的分泌,减缓炎症反应,从而起到改善血流动力学、减轻心室重构和维护心功能的保护作用。

[关键词] 心肌梗死;姜黄素;炎症

[中图分类号] R541.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1552-05

doi:10.7655/NYDXBNS20151111

Role of curcumin in suppressing the inflammation after the myocardial infarction in rats and its underlying mechanisms

Chen Leilei, Wang Zemu, Chen Bo, Wang Liansheng, Yang Zhijian

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of curcumin on the inflammation after myocardial infarction(MI) in rats and its underlying mechanisms. **Methods:** The Wistar rat MI models were established through the ligation of the left anterior descending coronary artery. Infiltration of inflammatory cells and the expression of related cytokines at different time points after MI were detected, and then we tried to uncover the underlying molecular mechanisms suppressing the inflammation by curcumin with Western blot. **Results:** Compared with the control group, the use of curcumin significantly improved cardiac function in 28 d after MI, and reduced the inflammatory cells infiltration of infarction area after MI 1 d, 7 d, 14 d and 28 d; further studies suggested that curcumin decreased inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 in rats after MI at different times, and suppressed the activation of NF- κ B and JAK-1/SATA3 signaling pathways. **Conclusion:** Curcumin can inhibit inflammation after MI by signaling pathways to reduce infiltration of inflammatory cells in infarct area and reduce the secretion of inflammatory cytokines, thus improve hemodynamics, reduce ventricular remodeling and maintain cardiac function.

[Key words] myocardial infarction; curcumin; inflammation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1552-1556, 1619]

姜黄素是从姜科植物的根茎姜黄中提取出的一种植物多酚,广泛用于食品上色和佐味。研究表明,姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗凝、降血脂、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗突变等药理学作用^[1-3]。此外,姜黄素的毒性很低,小鼠的 LD₅₀>2 g/kg,人口服最大耐受量可达 8 000 mg/d。因此,姜黄素是一种安全有效具有多种药理活性的药物,是一种很有开发前景的天然化合物。近年来,姜黄素在心血管疾病中

的作用也得到了越来越多的关注。研究发现姜黄素在治疗动脉粥样硬化、预防经皮腔内冠状动脉成形术后的再狭窄、治疗心力衰竭和心肌梗死(myocardial infarction,MI)等心血管疾病方面具有很好的应用前景。姜黄素能够抑制 MI 后心肌细胞凋亡,改善心室重构和 MI 后的心功能障碍,且其作用强度与剂量大小呈一定的量效关系。Wang 等^[4]也发现姜黄素能减少胶原沉积、降低基质金属蛋白酶-2的

表达,从而改善血流动力学和心室重塑,且具有剂量依赖性。但是,姜黄素在调节 MI 后炎症反应以改善心室重塑中的功能及相关信号通路,目前还缺乏深入的研究。

因此,本研究通过结扎冠状动脉建立大鼠 MI 模型及姜黄素干预,研究姜黄素对 MI 后炎症反应的调节作用及对心室重塑的改善,并探讨相应的分子生物学机制,为其临床应用提供理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

Wistar 大鼠 120 只,雄性,质量(250 ± 20) g,由扬州大学提供,自由饮水和摄食。姜黄素、蛋白酶抑制剂(Sigma 公司,美国), α -Tubulin 抗体、JAK1 和磷酸化 JAK1 (p-JAK1) 抗体、STAT3 和磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 抗体、辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗兔 IgG(南京诺唯赞生物科技有限公司);大鼠白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 检测试剂盒、大鼠 IL-6 检测试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 酶联免疫吸附检测试剂盒(南京建成生物工程公司)、BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒、组织裂解蛋白提取液(上海碧云天生物技术研究所);预染标准蛋白质 Marker (Fermentas 公司,美国)。MP100 压力换能器 (BiopacSystems 公司,美国),电泳及湿转转移槽 (Bio-Rad 公司,美国),Western 发光照相系统(UVP 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及大鼠 MI 模型制备

大鼠 120 只,随机分为给药(MI+Cur)组、心肌梗死(MI)组和假手术(Sham)组,每组再分为 0、1、7、14、28 d 组,每组 7~8 只。于吸入麻醉状态下,在大鼠左侧第 3、4 肋间隙切开,暴露心脏,永久性结扎冠状动脉左前降支;Sham 组只挂线不结扎冠状动脉。MI+Cur 组在造模后 1 h 经尾静脉注射姜黄素(150 mg/kg,用生理盐水稀释)^[4];MI 组及 Sham 组均给予同等剂量的生理盐水。MI 术后每日给药 1 次,持续药物干预 4 周。在 MI 术后 0、1、7、14、28 d,尾静脉采血 0.5 mL,及时离心收集血清于-70℃保存。处死大鼠后取心肌梗死交界组织,Sham 组取相同部位,分别以 4%多聚甲醛固定用于形态学检测及匀浆裂解供制备 Western blot 样品。

1.2.2 心功能检测

将手术后 28 d 的大鼠称重,以 10%水合氯醛麻

醉后仰面固定,剪开大鼠颈部皮肤,找到右侧颈总动脉,结扎远心端,近心端近结扎处剪开一小口,插入充满 125 U/mL 肝素液的腰麻管,缓慢推进导管,同时观察示波器,当导管进入左室后停止推进,稳定 5~10 min 后记录心室内压力曲线,包括左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、等容收缩期左心室内压力上升的最大速率(+dp/dtmax)和等容舒张期左心室压力下降的最大速率(-dp/dt-max)。然后注入 10%氯化钾 3 mL,使心脏停搏于舒张期,开胸切取心脏,分离心房和大血管,沿室间隔分离左心室(包括室间隔)和右心室,用冰生理盐水冲洗干净并吸干水分后分别称取左、右心室重量。将左、右心室重量与体重相除,计算左心室重量/体重比值(LVW/BW, mg/g)和右心室重量/体重比值(RVW/BW, mg/g),即为左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)及右心室质量指数(right ventricular mass index, RVMI)。

1.2.3 HE 染色观察心肌病理学变化和炎症细胞浸润

组织常规脱水,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,常规 HE 染色后,于光镜下选取各组切片,观察梗死区、交界区和非梗死区细胞及形态,总结各组光镜下的形态学改变。

1.2.4 酶联免疫吸附法检测炎症细胞因子

取各组血清样本,充分混匀各检测试剂;标准孔分别加入相应稀释浓度的标准品,各组各时段血清标本使用标本稀释液 1:1 稀释后加入反应孔,分别向各孔加入生物素标记的抗体,震荡后 37℃ 孵育 1 h;洗板后每孔加入亲和链酶素-HRP,混匀后 37℃ 孵育 30 min;洗板后每孔加入等量底物 A、B 液,振荡混匀,37℃ 温育 10 min;加入终止液后于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的吸光度值。根据吸光度值及标准品浓度得到标准曲线,计算得到检测血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的样品浓度。

1.2.5 Western blot 检测

心肌组织剪碎并匀浆裂解,部分样本进行核蛋白抽提, Bio-Rad 蛋白定量试剂盒测定蛋白质含量。各组标本取等量蛋白量上样,蛋白经电泳、转膜、封闭后分别加入 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、NF- κ B p65、LaminB 及 α -Tubulin 抗体,再经洗涤,加入二抗,显色。

1.3 统计学方法

采用 SPSS15.0 统计软件进行统计学分析,所有计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较

采用方差分析(ANOVA),两两比较用 LSD 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 MI 后 28 d 心脏功能的影响

MI 后第 28 天血流动力学检测结果显示,与 Sham 组相比,MI 组的 LVEDP 显著增加 ($P < 0.05$),LVSP 则显著下降 ($P < 0.05$);而与 MI 组相

比,MI+Cur 组的 LVSP 显著升高,LVEDP 显著下降 ($P < 0.05$,表 1)。与 Sham 组比较,MI 组的 $\pm dp/dt_{max}$ 均显著下降 ($P < 0.05$),与 MI 组比较,MI+Cur 组 $\pm dp/dt_{max}$ 显著增高 ($P < 0.05$,表 1)。

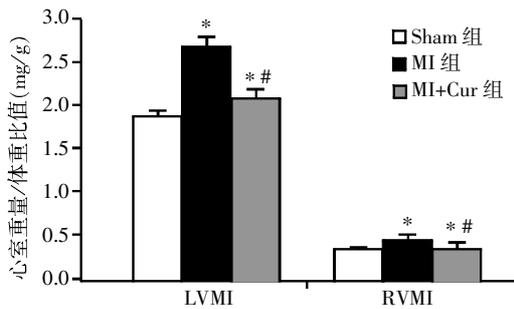
对心室质量指数的计算结果显示,与 Sham 组比较,MI 后 28 d,MI 组的 LVMI、RVMI 均显著增加 ($P < 0.05$)。与 MI 组相比,姜黄素治疗 28 d 后 MI+Cur 组的 LVMI、RVMI 均显著减少 ($P < 0.05$,图 1)。

表 1 MI 后第 28 d 大鼠血流动力学参数

Table 1 Hemodynamic parameters in mice on 28th day after MI

参数	Sham 组 (n=8)	MI 组 (n=8)	MI+Cur 组 (n=8)	F 值	P 值
LVSP(mmHg)	107.05 ± 5.69	68.61 ± 5.72 *	90.62 ± 5.47 **	93.964	< 0.001
LVEDP(mmHg)	8.69 ± 2.19	21.10 ± 4.49 *	12.72 ± 2.20*	32.282	< 0.001
+dp/dt _{max} (mmHg)	5 762.12 ± 431.61	2 406.11 ± 243.46 *	4 063.47 ± 497.67 **	137.014	< 0.001
-dp/dt _{max} (mmHg)	4 944.25 ± 297.36	2 095.07 ± 216.47 *	3 421.53 ± 542.43 **	113.580	< 0.001

与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 MI 组比较, # $P < 0.05$ 。



与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 MI 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 左、右心室质量指数比较

Figure 1 Mass index comparison between the left and right ventricular

2.2 姜黄素对 MI 后心肌组织病理改变和炎症细胞浸润的影响

如图 2 所示,HE 染色显示 Sham 组左心室心肌细胞排列规则整齐,细胞结构完整,椭圆形细胞核位于心肌细胞中央,未出现明显的坏死或凋亡。MI 组在 MI 后 1 d 即出现大量细胞死亡,表现为心肌细胞的形态尚存,但部分细胞出现萎缩,细胞质染色加深,心肌纤维出现溶解和断裂,可见核固缩、核碎裂,同时伴随有大量炎症细胞浸润;MI 后 7 d 梗死区由肉芽组织组成,其中含有炎症细胞、纤维细胞及大量新生毛细血管。MI 后 14 d 的成分与 MI 后 7 d 相似;MI 后 28 d 时梗死区域细胞减少,由大量胶原组成了游离的左心室壁。MI+Cur 组中,仍可见心肌细胞坏死,但姜黄素的使用导致 MI 后 1、7、14、28 d 的存活细胞增多,纤维组织增生减少,1、7、14 d 心肌组织中炎性细胞浸润减少。

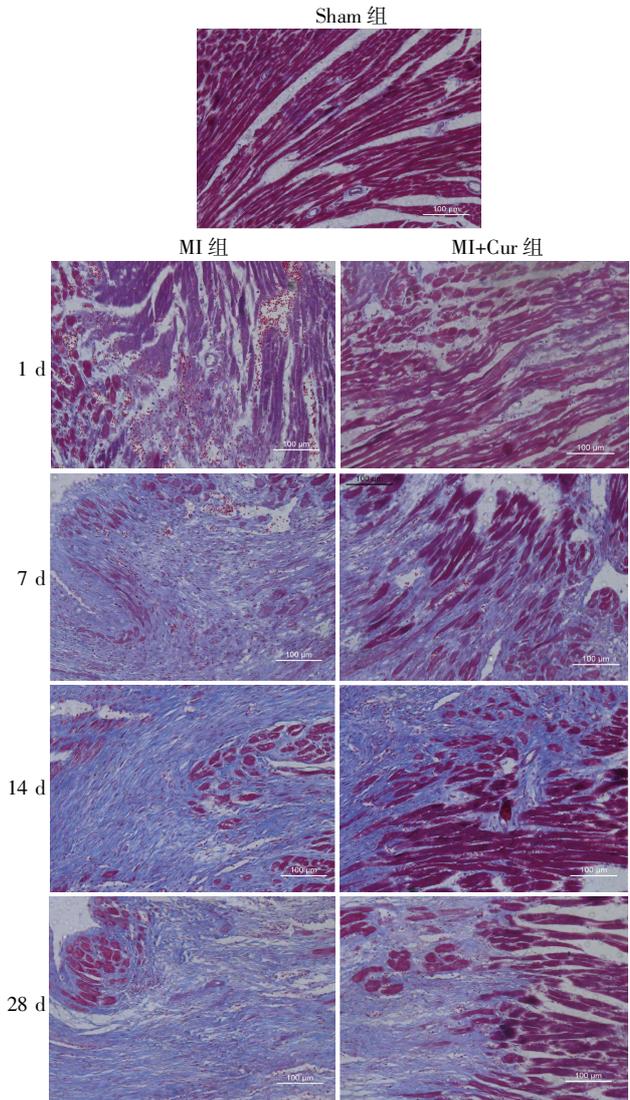


图 2 MI 后各时段梗死部位病理学变化及炎症细胞浸润

Figure 2 Pathological changes of infarction site and inflammatory cells infiltration after MI

2.3 姜黄素对 MI 后各时段血清中炎症因子水平的影 响

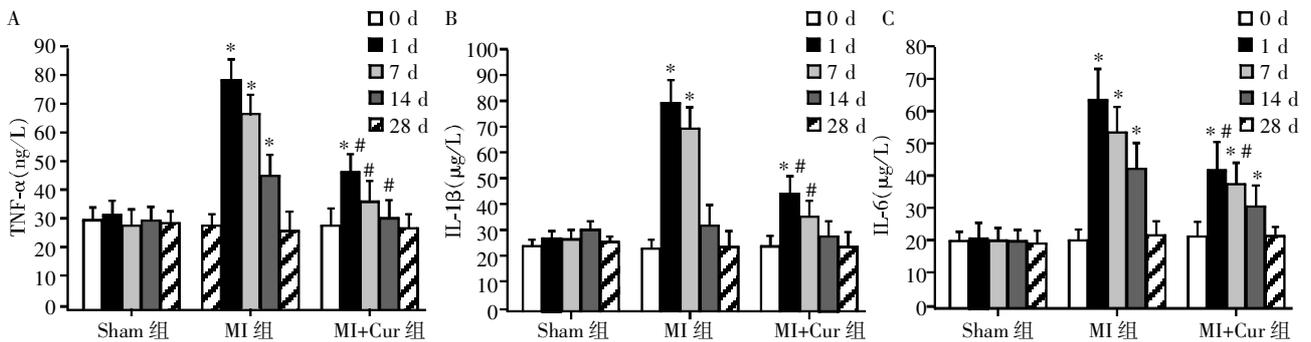
TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 是 MI 后主要的炎症因子。检测结果如图 3 所示,在 MI 发生后 1 d,MI 组血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达明显增加,与 Sham 组间存在显著差异($P < 0.05$),此后其表达逐渐下降。在 MI 后 14 d,MI 组血清中 IL-1 β 的含量与 Sham 组间已无显著差异($P > 0.05$)。而 MI 组 TNF- α 及 IL-6 的表达则在 MI 后 28 d 时与 Sham 组间无显著差异($P > 0.05$)。

与 MI 组相比,MI+Cur 组经姜黄素给药后,其血

清中的 TNF- α 表达在 MI 后 1、7、14 d 均显著下调 ($P < 0.05$),7 d 后其 TNF- α 水平与 Sham 组间无显著差异($P > 0.05$,图 3A)。

MI+Cur 组血清中的 IL-1 β 水平在 MI 后 1、7 d 均显著低于 MI 组 ($P < 0.05$),7 d 后其 IL-1 β 水平与 Sham 组间无显著差异($P > 0.05$,图 3B)。

MI+Cur 组血清中 IL-6 水平在 MI 后 1、7 d 均显著低于 MI 组 ($P < 0.05$),14 d 后其 IL-6 水平与 MI 组间无显著差异($P > 0.05$),但此时 MI 组及 MI+Cur 组的 IL-6 水平仍显著高于 Sham 组($P < 0.05$,图 3C)。



A: 血清 TNF- α 水平;B: 血清 IL-1 β 水平;C: 血清 IL-6 水平。与 Sham 组比较,* $P < 0.05$;与 MI 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 3 MI 各时段血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平

Figure 3 Serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 in each period after MI

2.4 姜黄素对 MI 后 1、7 d NF- κ B 激活的影响

与 Sham 组相比,MI 后 1、7 d,MI 组梗死区心脏组织中核内 NF- κ B p65 表达水平均显著升高;MI+Cur 组核内 NF- κ B p65 含量明显低于 MI 组,与 Sham 组类似(图 4)。

2.5 姜黄素对 MI 后早期 JAK/STAT 信号通路激活的影响

相比 Sham 组,MI 后 1、7 d MI 组梗死区心脏组织中 JAK/STAT 信号通路被激活。而 MI+Cur 组中 p-JAK-1 和 p-STAT3 水平明显低于 Sham 组和 MI 组(图 5)。

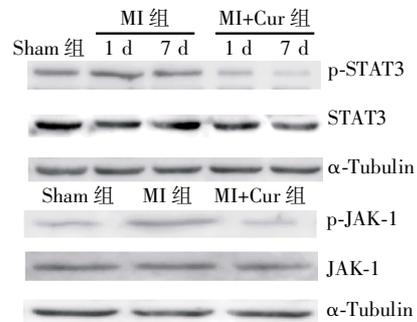


图 5 MI 后 1 d、7 d 心脏组织中 JAK/STAT 信号通路的激活
Figure 5 JAK/STAT signal pathway activation in heart tissue at 1st day and 7th day after MI

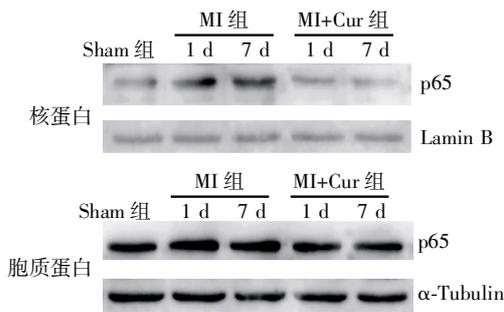


图 4 MI 后 1 d、7 d 心脏组织中 NF- κ B 的激活

Figure 4 NF- κ B activation in heart tissue at day 1 and day 7 after MI

3 讨论

现代社会中,多种心脏疾病的发病率呈上升趋势。其中,MI 严重威胁着人类健康。随着溶栓及经皮冠状动脉腔内成形术的应用,急性 MI 的病死率明显降低。但 MI 后许多患者心功能下降、心室重塑发展为心力衰竭,导致 MI 后缺血性心肌病仍然广泛流行,从而增加了患者的经济负担^[5]。最近研究显示,在 MI 引起的心室重塑和心功能失调中,炎症的参与起了重要作用^[6]。MI 造成大量细胞死亡,其释放的相关因子诱导炎症反应发生并清除死亡

细胞及基质碎片,同时激活疤痕形成所需的信号通路^[7]。但在这一过程中,炎症抑制信号也要被及时激活以促进保护性疤痕的形成,并遏制恶性重塑过程^[8]。否则,梗死后免疫反应的持续与扩张会引起严重后果。例如,过度早期炎症会促进基质退化并导致心脏破裂;炎症反应的延长抑制胶原沉降、降低疤痕拉伸强度并引起心室扩张;炎症因子的过度激活促进凋亡,导致心肌细胞数量进一步下降。此外,缺乏抑制的炎症反应会蔓延至正常心肌组织,导致纤维化,最终削弱舒张功能。因此,调节 MI 后炎症反应已成为抑制心室重塑与心力衰竭的重要靶点。

MI 发生后,坏死细胞和基质碎片激活 NF- κ B 等相关信号通路,促进炎症小体的激活和炎症因子的产生,从而启动炎症反应^[9-12]。释放的趋化因子则进一步招募中性粒细胞和单核细胞至梗死区,扩大炎症反应。随后,在多种细胞类型和胞外基质的参与下,促炎基因的表达和炎症细胞的浸润被迅速抑制。其中,中性粒细胞的凋亡、抑制性单核细胞亚群、调节性 T 细胞等都被证实参与了 MI 后炎症的抑制^[13-15]。对信号分子通路的研究则揭示了对 MI 后炎症的负向调控依赖于对 TLRs 通路、趋化因子信号和白细胞黏附级联的抑制。研究显示 MI 后第 1 天,大量心肌细胞凋亡,同时炎症细胞即开始浸润;MI 后第 7 天是炎症的高峰,此时,炎症细胞大量聚集,组织处于修复期;此后机体自身的炎症抑制作用开始产生效果,梗死区炎症细胞数量明显下降,表明炎症反应逐渐减弱;MI 后第 28 天,心肌细胞的凋亡明显减少,炎症反应基本结束,心脏重塑明显。因此,针对不同炎症相关靶点和时间点进行调控研究,可以为临床应用提供重要的理论依据。

本研究显示,姜黄素的使用可以改善 MI 后的血流动力学和心脏重塑,维护心功能,这一结果与以往研究结果相吻合^[4]。同时,在对心肌梗死后不同时间点的炎症细胞浸润和炎症因子表达的检测中,发现姜黄素主要作用于心肌梗死后的 0~7 d 内,即炎症开始至高峰的一个阶段,此时的反应主要包括炎症起始时 NF- κ B 等炎症相关信号通路和炎症小体的激活,以及炎症因子的释放和炎症的扩大。在这一阶段,NF- κ B 和 JAK/STAT 信号通路是激活炎症反应的主要分子机制。近期研究显示姜黄素对这些信号通路均有不同程度的抑制作用^[16-18],而本研究结果也证实姜黄素可在 MI 发生后的早期抑制这些重要信号通路的激活,提示姜黄素对于梗死后早

期炎症反应的抑制很可能是通过阻断其上游通路来实现的。在 MI 后 7 d,机体自身的调控机制导致促炎基因的表达和炎症细胞的浸润被迅速抑制,姜黄素的抑炎功能在这一阶段则不显著。同时,本研究也发现姜黄素对不同炎症因子的抑制作用在不同时段具有一定差异,而其中的具体机制还有待于更深入地研究。因此,本研究对进一步揭示姜黄素在 MI 后炎症抑制和心功能保护方面的功能和机制奠定了基础,为其在临床上的应用提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Alwi I, Santoso T, Suyono S, et al. The effect of curcumin on lipid level in patients with acute coronary syndrome [J]. *Acta Med Indones*, 2008, 40(4): 201-210
- [2] Murphy EA, Davis JM, McClellan JL, et al. Curcumin's effect on intestinal inflammation and tumorigenesis in the ApcMin/+ mouse [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(2): 219-226
- [3] Sintara K, Thong-Ngam D, Patumraj S, et al. Curcumin suppresses gastric NF-kappaB activation and macromolecular leakage in *Helicobacter pylori*-infected rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(32): 4039-4046
- [4] Wang NP, Wang ZF, Tootle S, et al. Curcumin promotes cardiac repair and ameliorates cardiac dysfunction following myocardial infarction [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(7): 1550-1562
- [5] Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications [J]. *Circulation*, 1990, 81(4): 1161-1172
- [6] Entman ML, Michael L, Rossen RD, et al. Inflammation in the course of early myocardial ischemia [J]. *FASEB J*, 1991, 5(11): 2529-2537
- [7] Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, et al. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes *in vitro* and in patients after acute myocardial infarction [J]. *J Clin Invest*, 1975, 56(3): 740-750
- [8] Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, et al. Soluble human complement receptor type 1: *in vivo* inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis [J]. *Science*, 1990, 249(4965): 146-151
- [9] Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody [J]. *Circulation*, 2010, 121(1): 80-90
- [10] Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, et al. Mitochondrial DNA

(下转第 1619 页)