

姜黄素对脓毒症小鼠急性肺损伤肾素-血管紧张素影响的研究

吴礼襄¹, 孙立^{2*}

(¹暨南大学附属第一医院 ICU, 广东 广州 510630; ²暨南大学医学院中医系, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的:研究姜黄素对脓毒症小鼠急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的保护作用,探讨其作用机制。方法:动物随机分为手术组、假手术组、姜黄素组、卡托普利组和正常对照组,盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)建立动物模型,利用光镜观察肺部组织形态学变化,称重法计算湿/干比(W/D),ELISA法检测血清中细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平,RIA法测定肺组织和血中Ang II的量。结果:与手术组比较,卡托普利(ACE拮抗剂)和姜黄素均可以使ALI/ARDS小鼠的氧合指数(259.5 ± 24.2 、 268.8 ± 21.5 vs 194.3 ± 23.9)和W/D(5.35 ± 0.25 、 5.13 ± 0.59 vs 6.08 ± 0.64)得到改善,都能不同程度地抑制体内Ang II的生成(肺: 1.58 ± 0.16 、 1.65 ± 0.21 vs 2.38 ± 0.41 ;血: 178.04 ± 17.87 、 153.74 ± 10.24 vs 213.38 ± 25.44),降低炎症因子水平,减轻肺组织病理学损伤。结论:姜黄素对脓毒症ALI具有保护作用,至少通过抑制炎症和抑制RAS两个重要机制发挥肺保护作用。

[关键词] 姜黄素;急性肺损伤;肾素-血管紧张素系统;脓毒症

[中图分类号] R631.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-188-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150210

Effects of curcumin on renin-angiotensin system (RAS) in mice with acute lung injury induced by sepsis

Wu Lixiang¹, Sun Li^{2*}

(¹ICU, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630; ²Medical School of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the impacts of curcumin on mice with acute lung injury induced by sepsis and its mechanisms. **Methods:** Mice were divided randomly into CLP, sham, curcumin, captopril, and control groups. ALI/ARDS animal models were induced by the CLP operation. The acute lung injury of these animal was assessed by measuring oxygenation index, wet/dry lung weight rate (W/D), and lung tissue histology 18 h after operation. ELISA was applied to measured the level of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in blood whereas radioimmunity was used to investigate the change of Ang II in lung tissue and blood. **Results:** Compared with the CLP group, W/D rate of lung tissue decreased whereas PaO₂/FiO₂ increased significantly in captopril and curcumin groups (W/D: 5.35 ± 0.25 , 5.13 ± 0.59 vs 6.08 ± 0.64 , $P < 0.05$); (PaO₂/FiO₂: 259.5 ± 24.2 , 268.8 ± 21.5 vs 194.3 ± 23.9). Both captopril and curcumin markedly decreased Ang II level in lungs and plasma of mice (lung, 1.58 ± 0.16 , 1.65 ± 0.21 vs 2.38 ± 0.41 ; blood, 178.04 ± 17.87 , 153.74 ± 10.24 vs 213.38 ± 25.44). Several inflammatory factors such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 decreased in serum and histopathologic appearance of ALI/ARDS attenuated after captopril or curcumin treatment. **Conclusion:** Curcumin could protect mice from acute lung injury induced by sepsis through inhabiting inflammatory factors release and Ang II generation.

[Key words] curcumin; ALI; RAS; sepsis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 188-191]

姜黄素(curcumin)因具有抗氧化、抗炎作用在急性肺损伤(acute lung injury, ALI)表现出良好应用前景,但其肺损伤保护机制并不清楚。近年肾素-血

管紧张素系统(RAS)与ALI的关系引起高度关注,通过药物干预RAS可能是治疗ALI/ARDS的新途径^[1]。报道显示姜黄素具有抑制RAS关键酶的作用^[2-2],本研究拟建立脓毒症小鼠急性肺损伤模型,观察姜黄素对ALI/ARDS动物模型中RAS系统几种关键酶(ACE、ACE2和Ang II)的影响,进一步分

[基金项目] 广东省中医药局立项资助(20131155)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sunny@126.com

析肺损伤炎症过程的变化规律,探讨姜黄素肺保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 BALB/C 小鼠,广东省医学实验动物中心中心提供,4~8 周龄,体重 20~30 g;姜黄素(批号:051105,上海试剂三厂),自制为固体分散体制剂;卡托普利注射液(常州制药厂有限公司); ^{125}I Ang II 放射免疫试剂分析盒(北京科美东雅生物科技公司);小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒(北京晶美生物工程公司);SV-695B 型智能放免 γ 测量仪(上海原子核研究所日环仪器一厂);酶标仪(Labsystem 公司,芬兰);i-STAT 临床血液分析仪(ABBOTT 公司,美国)。

1.2 方法

雄性 BALB/C 小鼠 75 只,随机分为以下几组:手术组、假手术组、姜黄素组、卡托普利组和正常对照组,每组 20 只,常规笼养 1 周后进行试验。

建立盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 诱导的 ALI/ARDS 动物模型^[4]。术先用 1% 戊巴比妥以腹腔注射麻醉小鼠后,常规固定消毒铺巾,无菌条件下沿腹正中线作一长约 2 cm 切口,取出盲肠,在盲肠根部结扎,用消毒的 20 号穿刺针贯通穿刺盲肠 2 次,并在穿孔处挤出少量肠内容物,之后将盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹壁切口,术后禁食 12 h,自由饮水。假手术组 (sham) 动物仅做开腹,取出盲肠,不结扎和穿孔,术后还纳盲肠并关腹。姜黄素组和卡托普利组在 CLP 手术后分别腹腔注射姜黄素和卡托普利,注射剂量参考相关文献,姜黄素为 20 mg/kg^[3],卡托普利剂量为 2.5 mg/kg^[2],正常对照组动物未行任何手术。

每组 10 只术后 18 h 留取标本检测肺损伤指标,包括:动脉血气分析、肺湿干重比(W/D)和肺组织病理。小鼠麻醉后行体外左心穿刺取得动脉血,用 i-STAT 临床血液分析仪立刻检测动脉血气分析;取左肺称湿重(W),把肺放入 80℃ 烤箱烘烤 48 h 后,取出称得肺干重(D),最后取两者的比值得 W/D;小鼠的右肺用 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡切片,HE 染色,普通光镜下观察并照相。

检测 5 组小鼠手术后 6 h 的炎症因子改变:首先小鼠摘眼球取血后室温放置 2 h,5 000 r/min 离心 10 min,吸取上清于 -20℃ 保存待测。采用 ELISA 法检测血清中细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,操作步骤参照试剂盒说明书进行。

所剩 5 只小鼠在手术后 6 h 提取血清待检 Ang II,并留取肺组织匀浆检测 Ang II,采用 ^{125}I 血管紧张素 II 放射免疫试剂分析盒测定肺组织和血中 Ang II 的量,测定方法按产品说明书进行。

1.3 统计学方法

全部数据资料分析均采用 SPSS12.0 统计分析软件进行,数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对各组数据先进行正态检验和方差齐性检验,若符合正态分布、方差齐,则进行单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用 LSD 法;若不符合方差齐性的要求,则进行秩和检验,组间比较采用 Mann-Whitney 法; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺损伤的变化

术后 18 h 手术组小鼠出现行动迟缓、进食减少、毛发竖起、口唇和尾部发绀等表现。且小鼠 W/D 和血气出现明显改变,手术组较假手术组小鼠肺水含量明显增多 ($W/D: 6.08 \pm 0.64$ vs 4.38 ± 0.93 , $P < 0.01$),明显缺氧 ($\text{PaO}_2: 40.8 \pm 5.03$ vs 72.8 ± 4.32 , $P < 0.01$),氧合指数明显下降 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2: 194.3 \pm 23.9$ vs 346.7 ± 20.5 , $P < 0.01$);与手术组比较,卡托普利 (ACE 拮抗剂) 和姜黄素均可以使 ALI/ARDS 小鼠的氧合指数 ($259.5 \pm 24.2, 268.8 \pm 21.5$ vs 194.3 ± 23.9 , $P < 0.01$) 和 W/D ($5.35 \pm 0.25, 5.13 \pm 0.59$ vs 6.08 ± 0.64 , $P < 0.01$) 得到改善(表 1)。

2.2 肺组织和血浆 Ang II 的变化

为检验 RAS 系统下游产物 Ang II 的变化,采用放射免疫法测定术后 6 h 小鼠肺组织和血清中 Ang II 的含量(表 2),手术组小鼠肺组织和血浆中 Ang II 表达量较正常对照组和假手术组均明显升高,与手术组比较,卡托普利和姜黄素都能不同程度的抑制体内 Ang II 的生成(肺: $1.58 \pm 0.16, 1.65 \pm 0.21$ vs 2.38 ± 0.41 ; 血: $178.04 \pm 17.87, 153.74 \pm 10.24$ vs 213.38 ± 25.44),差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.3 炎症因子改变

CLP 手术后 6 h,手术组小鼠血清细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 均较假手术组小鼠有显著升高 ($P < 0.01$),反映 CLP 手术导致机体出现明显的全身炎症反应;而在腹腔注射卡托普利和姜黄素后,ALI/ARDS 小鼠血清中几个细胞因子得到一定程度的抑制(表 3)。

2.4 肺组织病理改变

肺组织病理改变更具直观性,CLP 手术的小鼠肺呈现明显的肺损伤,肺组织炎症细胞渗出、肺水

表 1 术后 18 h 小鼠的肺损伤变化

Table 1 Blood gas analysis and W/D change at 18th hour after operation (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	W/D	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	PaO ₂ /FiO ₂
正常对照组	4.09 ± 0.32	75.8 ± 5.67	38.3 ± 4.76	360.9 ± 27.1
假手术组	4.38 ± 0.93	72.8 ± 4.32	37.5 ± 2.84	346.7 ± 20.5
手术组	6.08 ± 0.64*	40.8 ± 5.03*	39.1 ± 6.64	194.3 ± 23.9*
姜黄素组	5.13 ± 0.59 [#]	68.8 ± 4.12 [#]	37.3 ± 3.53	268.8 ± 21.5 [#]
卡托普利组	5.35 ± 0.25 [#]	62.2 ± 4.25 [#]	37.63 ± 3.86	259.5 ± 24.2 [#]

与假手术组比较,*P < 0.01;与手术组比较,[#]P < 0.01。

表 2 卡托普利和姜黄素对 CLP 小鼠肺组织和血 Ang II 的影响

Table 2 The effect of captopril and curcumin on Ang II level in serum and lung tissue of mice induced by CLP (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺 Ang II (fmol/mg)	血 Ang II (fmol/ml)
正常对照组	1.01 ± 0.13	10.98 ± 0.96
假手术组	1.09 ± 0.09	11.55 ± 2.3
手术组	2.38 ± 0.41*	213.38 ± 25.44*
姜黄素组	1.65 ± 0.21 [#]	153.74 ± 10.24 [#]
卡托普利组	1.58 ± 0.16 [#]	178.04 ± 17.87 [#]

与假手术组比较,*P < 0.01;与手术组比较,[#]P < 0.01。

肿和间隔增厚均很明显,部分肺泡腔充满粉染均质水肿液,部分有透明膜形成,弥漫性肺出血,肺泡腔塌陷,肺泡腔内有游离的中性粒细胞和巨噬细胞呈现典型的肺损伤改变(图 1C,D),而正常对照组和假手术组没有类似变化(图 1A、B)。手术后加入卡托普利或姜黄素后,肺水肿的程度有所减轻,炎症渗出和间隔增厚程度也得到部分改善(图 1E、F)。

3 讨论

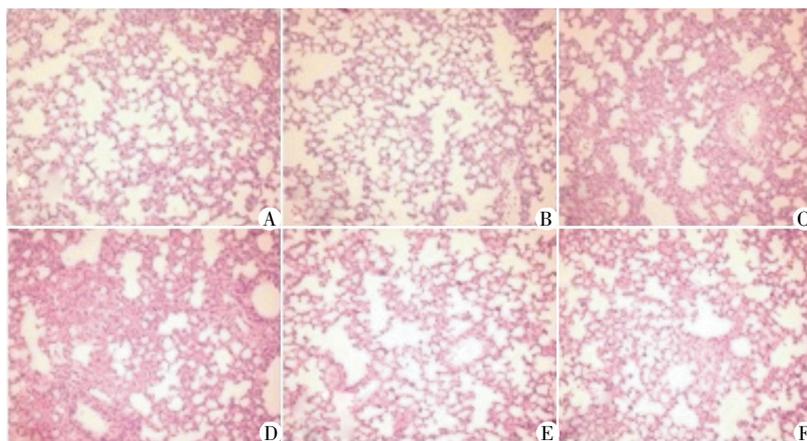
近年在体研究证实了姜黄素对多种原因造成

表 3 卡托普利和姜黄素对 CLP 小鼠血清炎症因子的影响

Table 3 The effect of captopril and curcumin on inflammatory factors level in serum of mice induced by CLP(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF α	IL-1 β	IL-6
正常对照组(n=10)	44.9 ± 16.3	75.8 ± 15.7	408.3 ± 67.6
假手术组(n=10)	65.8 ± 19.3	66.5 ± 11.7	404.5 ± 64.6
手术组(n=10)	759.2 ± 21.5*	486.6 ± 61.7*	2 670.45 ± 174.1*
姜黄素组(v=10)	343.3 ± 35.9 [#]	224.8 ± 35.2 [#]	1 127.3 ± 140.5 [#]
卡托普利组(n=10)	368.5 ± 45.5 [#]	202.2 ± 30.5 [#]	985.6 ± 120.6 [#]

与假手术组比较,*P < 0.01;与手术组比较,[#]P < 0.01。



A: 对照组;B:假手术组;C、D:手术组;E:卡托普利组;F:姜黄素组。

图 1 肺组织病理改变(HE,×100)

Figure1 Pathogenesis change of lung tissue(HE ×100)

的 ALI/ARDS 动物模型具有保护作用。Sun 等^[5]对大鼠行肺移植手术,观察姜黄素和地塞米松对缺血再灌注损伤所致 ALI/ARDS 的保护作用,发现姜黄素组与地塞米松组再灌注 2 h 和 24 h 的肺水肿病

理评分和总分、肺组织中髓过氧化物酶 (MPO)活性、MDA、TAOC、TNF-α、IL-6 的含量低于载体组,肺组织 NF-kB 的转录与表达增加,这种保护效应在肝脏热缺血合并肺损伤动物模型中进一步得以证

实^[6]。朱瑞芳等^[7]制备油酸型 ALI 模型,检测肺泡灌洗液(BALF) TNF- α 、IL-6、IL-10 的含量,同样发现姜黄素对油酸型 ALI 具有保护作用,其可能机制为调节致炎因子与抗炎因子。Bansal 等^[8]应用肺炎克雷伯菌经鼻吸入制备肺炎小鼠模型,联用姜黄素较单独使用阿莫西林/克拉维酸能减少 BALF 中 TNF- α 、IL-6、一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)水平。Guzel 等^[9]给大鼠吸入盐酸造成吸入性肺损伤,实验前 7 d 给大鼠腹腔注射姜黄素,观察到姜黄素组大鼠肺组织一氧化氮合酶(iNOS)、表面蛋白 D (SP-D)、MDA、羟脯氨酸(HP)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)等抗氧化物表达增加。Avasarala 等^[10]给小鼠吸入呼肠病毒制备 ALI 模型,实验前 5d 给小鼠腹腔注射姜黄素(50 mg/kg),实验显示姜黄素可以显著减轻小鼠肺脏炎症病理及纤维化。

本研究以 CLP 人为造成腹腔感染,进而诱导出出现全身性炎症反应,最后导致肺损伤,这种脓毒症(SEPSIS) 诱导的 ALI/ARDS 是临床最常见和最严重的病因之一,采用该模型作为本研究的切入点具有较重要的理论意义和应用价值。首先关注氯沙坦对 ALI/ARDS 炎症反应的影响,实验纳入 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 这 3 个炎症因子,它们是 SEPSIS 诱导肺损伤主要的细胞因子,在炎症始动和炎症瀑布反应中发挥重要作用,以往有关 CLP 实验研究提示这些炎症因子常常在手术后 6 h 出现高峰^[11],因此在手术后 6 h 留取小鼠血液标本测定 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的变化,结果发现 CLP 手术组的炎症因子明显升高,而姜黄素组的小鼠炎症因子得到了抑制。同时,实验还检测血气分析和肺组织病理均显示姜黄素的确能够改善 ALI/ARDS 病情,本研究证明姜黄素可以通过抗炎机制对肺损伤起到保护作用。

然而姜黄素的作用是多方面的,Venkatesan 等^[2]首次报道姜黄素可以保护百草枯所致 ALI/ARDS 大鼠模型,同时姜黄素减少 BALF 中的 ACE 水平,提示姜黄素对 ALI/ARDS 的保护作用与 RAS 有关。Charles 等^[5]证实姜黄素除了抗氧化作用外,还具有抑制 ACE 的作用。ACE 的抑制必然导致其下游产物 Ang II 分泌减少。以往的研究已发现 Ang II 既可通过降解缓激肽减少 NO 的合成,又可促进氧化应激诱导氧自由基产生而增加 NO 的分解,加重肺血管内皮细胞的损伤,ACE 抑制剂卡托普利和 Ang II 的受体拮抗剂氯沙坦都可以提高 ALI 动物 7 d 生存率^[4]。这些研究提示姜黄素可能通过调节 RAS 不同组分,减少 Ang II 分泌,改善肺损伤。在本动物模型

中,不管在肺组织还是血液中,姜黄素作用的结果是 Ang II 生成减少,而且姜黄素能够最终减轻 ALI/ARDS 肺水肿的程度,显示了它治疗 ARDS 的作用与抑制 Ang II 生成有关。

[参考文献]

- [1] Salnikova LE, Smelaya TV, Vesnina IN, et al. Genetic susceptibility to nosocomial pneumonia, acute respiratory distress syndrome and poor outcome in patients at risk of critical illness[J]. *Inflammation*, 2014, 37(2):295-305
- [2] Venkatesan N. Pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity [J]. *Life Sci*, 2000, 66 (2): PL21-28
- [3] Charles RE, Ponrasu T, Sivakumar R, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of enzymatically synthesized phenolic and vitamin glycosides [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52(Pt 3):177-184
- [4] Shen L, Mo H, Cai L, et al. Losartan prevents sepsis-induced acute lung injury and decreases activation of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinases[J]. *Shock*, 2009, 31(5):500-506
- [5] Sun J, Guo W, Bai C. Preventive effects of curcumin and dexamethasone on lung transplantation-associated lung injury in rats [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(4):1205-1213
- [6] Wu NC, Wang JJ. Curcumin attenuates liver warm ischemia and reperfusion-induced combined restrictive and obstructive lung disease by reducing matrix metalloproteinase 9 activity[J]. *Transplant Proc*, 2014, 46(4):1135-1138
- [7] 朱瑞芳,周敏,余书勤. 姜黄素对大鼠油酸型急性肺损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(17):2141-2145
- [8] Bansal S, Chhibber S. Curcumin alone and in combination with augmentin protects against pulmonary inflammation and acute lung injury generated during Klebsiella pneumoniae B5055-induced lung infection in BALB/c mice[J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59(Pt 4):429-437
- [9] Guzel A, Kanter M, Aksu B. Preventive effects of curcumin on different aspiration material-induced lung injury in rats[J]. *Pediatr Surg Int*, 2009, 25(1):83-92
- [10] Avasarala S, Zhang F, Liu G, et al. Curcumin modulates the inflammatory response and inhibits subsequent fibrosis in a mouse model of viral-induced acute respiratory distress syndrome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e57285
- [11] Bedirli A, Kerem M, Pasaoglu H, et al. Betaglugan attenuates inflammatory cytokine release and prevents acute lung injury in an experimental model of sepsis [J]. *Shock*, 2007, 27(4):397-401

[收稿日期] 2014-05-13