

姜黄素后处理通过血红素氧合酶 1 发挥对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用

姚博华, 蒋卫红

(中南大学湘雅三医院, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 姜黄素; 血红素氧合酶 1; 缺血/再灌注损伤

[摘要] **目的** 探讨姜黄素后处理对心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的作用及其可能的机制。**方法** 选用 48 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组、I/R 组、姜黄素后处理组和姜黄素 + ZnPPIX 后处理组。结扎雄性 SD 大鼠冠状动脉左前降支,使心肌缺血 30 min,再灌注 6 h 造成心肌缺血再灌注损伤模型,并于缺血 30 min 后再灌注前 1 分钟内由舌下静脉推注姜黄素或 ZnPPIX。检测各组大鼠的心肌病理改变以及心功能改变、血浆中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量以及心肌组织中血红素氧合酶 1(HO-1)活性和表达改变。**结果** 与 I/R 组比较,姜黄素后处理可明显上调 HO-1 活性和表达,并能显著抑制 I/R 后的心肌氧化应激损伤反应。这一保护作用可被 HO-1 抑制剂 ZnPPIX 部分消除。**结论** 姜黄素后处理可通过抗氧化作用减轻心肌 I/R 损伤,其保护作用与上调 HO-1 蛋白的活性和表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effects of Curcumin Post-treatment on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Heme Oxygenase-1

YAO Bo-Hua, and JIANG Wei-Hong

(The Third Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

[KEY WORDS] Curcumin; Heme Oxygenase-1; Ischemia Reperfusion Injury

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of curcumin post-treatment on oxidative stress injury induced by myocardial ischemia/reperfusion (I/R) and its mechanism. **Methods** Forty-eight male SD rats were randomized into four groups: sham group, I/R group, curcumin post-treatment group and curcumin + Zinc protoporphyrin IX (ZnPPIX) post-treatment group. Myocardial I/R was carried out by ligation of left anterior descending coronary artery for 30 min followed by reperfusion for 6 h, and injection of curcumin or ZnPPIX before reperfusion via sublingual vein. Blood was collected at the end of reperfusion for detecting changes of myocardial pathologic changes, cardiac function, serum lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). Heme oxygenase-1 (HO-1) activity and expression in myocardial tissue was detected by HO-1 activity detection kit and Western blot. **Results** Compared with I/R group, post-treatment with curcumin resulted in an enhanced activity and expression of HO-1 protein, and reduced oxidative stress injury induced by I/R ($P < 0.05$). This protective effect was considerably attenuated by ZnPPIX (an inhibitor of HO-1). **Conclusions** Curcumin post-treatment could protect against myocardial I/R injury via anti-oxidative injury and up-regulation activity and expression of HO-1 protein, which was a main component in curcumin-mediated protective effect.

缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是指器官或组织经历一段时间缺血而恢复血流供应后,不但不能恢复器官或组织功能反而加重功能障碍及结构损伤的现象。心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)的发病机制复杂且

严重影响患者的治疗效果与预后,因此,预防和减轻 MIRI 已成为当今心血管研究领域的热点和重点。1986 年 Murry 等^[1]首次提出了缺血预适应(ischemia preconditioning, IPC)具有心肌保护作用。近年来,研究者发现从中药姜科姜黄属植物姜黄中提取的一种

[收稿日期] 2014-05-28

[作者简介] 姚博华,硕士研究生,主要从事心血管内科临床与基础研究。通讯作者蒋卫红,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事心血管内科临床与基础研究。

天然的活性成分姜黄素 (curcumin, Cur) 预适应能减轻 MIRI、抑制心衰以及减少心肌梗死面积,改善心功能^[2-4]。由于心肌梗死的发生具有随机性和不可预测性,IPC 的临床应用价值受到了极大的限制。药物后适应是指器官或组织经历一段时间缺血后,而在恢复血流再灌注之前或再灌注期间给予一些保护性药物,从而发挥组织或器官保护作用。目前对于给予姜黄素后适应是否对在体心脏具有保护作用及机制如何,尚少见报道。本文拟对姜黄素后适应在 MIRI 中的作用及其机制作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠 (购自中南大学实验动物部), 体重为 200 ~ 250 g。

1.2 主要试剂

姜黄素 (C1386, 总姜黄素含量 > 95%)、血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抑制剂锌原卟啉 IX (zineprotoporphyrin IX, ZnPP IX) 和 HO-1 抗体均购于 Sigma 公司。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 及 HO-1 活性检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 建立缺血/再灌注模型

SD 大鼠用戊巴比妥钠 (质量分数为 3% , 30 mg/kg) 进行腹腔注射麻醉,采用仰卧位进行固定。将电极插入大鼠四肢皮下,采用 MS4000U 生物学软件监测肢体导联的心电图信号。行气管插管后接呼吸机予正压给予人工呼吸,打开胸腔,暴露心脏,左冠状动脉左前降支穿线不结扎做缺血备用。结扎雄性 SD 大鼠冠状动脉左前降支,当心电图上出现 ST 段抬高、T 波高耸表示心肌缺血成功。当抬高的 ST 段和 T 波逐渐恢复正常表示再灌注成功。

1.4 实验分组

SD 大鼠随机分为 4 组,每组 12 只。假手术组: 打开胸腔,暴露心脏,左冠状动脉前降支只穿线但不结扎,且由舌下静脉推注生理盐水,其它手术操作同其它组; I/R 组: 心肌缺血 30 min,再灌注 6 h 造成 MIRI 模型; 姜黄素后处理组: 缺血 30 min 后,再灌注 6 h 前 1 分钟内由舌下静脉推注姜黄素 (20 mg/kg); 姜黄素 + ZnPP IX 后处理组: 缺血 30 min 后,再灌注 6 h 前 1 分钟内由舌下静脉推注姜黄素和 ZnPP IX (7.5 mg/kg)。

1.5 心肌组织的病理改变和心功能的检测

各组大鼠的心肌组织用 HE 染色法检测其病理改变。分离右颈总动脉,将充满肝素生理盐水的导管 (聚乙烯) 经颈总动脉导入左心室,经 BL-420 信号采集系统采集信号,采集心率、左心室舒张压 (left ventricular diastolic pressure, LVDP)、左心室内压最大上升速率 (+ dp/dt_{max}) 和左心室内压最大下降速率 (- dp/dt_{max})。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

取各组的心肌组织,用 RIPA 细胞裂解液冰浴中裂解组织,在 4℃ 下离心 10 min (12 000 r/min), 取 5 μL 蛋白上清,并采用 BCA 法检测各组蛋白浓度。取 20 ~ 25 μg 蛋白,经 SDS-PAGE 胶电泳分离总蛋白,将蛋白转移至 PVDF 膜上,用含 5% 无脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜,依次用 HO-1 和 GAPDH 一抗以及二抗孵育,并用化学发光剂 ECL 对 PVDF 膜进行显色,摄片分析。

1.7 生化指标检测

各组 SD 大鼠于 I/R 结束后,分别采取静脉血,离心分离血浆,血浆 CK 和 LDH 活性采用半自动生化分析仪进行检测。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,硫代巴比妥法检测 MDA 含量,方法步骤按试剂盒说明书进行。取左心室壁缺血区心肌组织加入缓冲液 (蔗糖-Tris) 制成心肌组织匀浆液 (10%)。依据 HO-1 可以降解底物血红素从而生成胆红素的原理,通过胆红素生成量间接代表体系中的 HO-1 活性 [nmol / (mg · h)]。

1.8 统计学处理

所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用方差分析,采用 SPSS 14.0 软件进行分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素后处理对心肌 I/R 损伤的保护作用

心肌组织 HE 染色结果显示: 假手术组心肌横纹清晰,心肌纤维排列整齐,细胞核正常,间质未见充血、出血及炎性反应; I/R 组可见心肌横纹消失,心肌细胞排列紊乱并伴有变性坏死; 姜黄素后处理组心肌的组织形态结构明显优于 I/R 组,但不及正常组,心肌细胞变性坏死程度减轻; 姜黄素 + ZnPP IX 后处理组心肌损伤程度较姜黄素后处理组加重 (图 1)。心功能检测结果显示,缺血再灌注后,姜黄素后处理组大鼠的 LVDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 高于 IR 组,姜黄素 + ZnPP IX 后处理组对心功能的改善作用弱于姜黄素后处理组 ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 各组大鼠缺血再灌注后心功能的变化($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1. The changes of cardiac function after myocardial I/R in all groups

分 组	HR(次/分)	LVDP(mmHg)	+ dp/dt _{max} (mmHg/s)	- dp/dt _{max} (mmHg/s)
假手术组	292 ± 20	115 ± 12	8076 ± 308	5419 ± 272
I/R 组	311 ± 32	66 ± 5 ^a	5637 ± 254	4117 ± 215
姜黄素后处理组	303 ± 24	99 ± 8 ^b	7219 ± 290	4939 ± 243
姜黄素 + ZnPPⅨ后处理组	305 ± 23	82 ± 7 ^c	6501 ± 265	4407 ± 228

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 I/R 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与姜黄素后处理组比较。

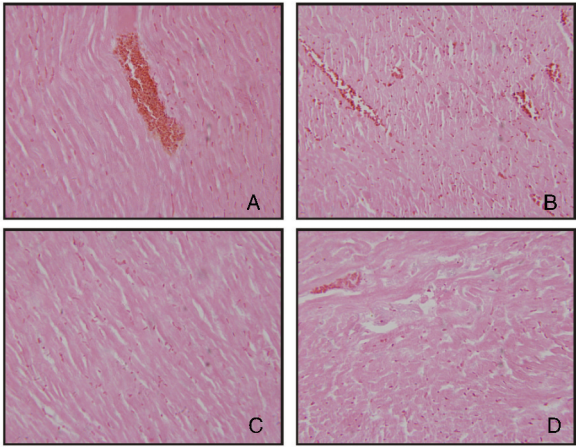


图 1. 姜黄素后处理对 I/R 大鼠心肌组织损伤的影响 A 为假手术组, B 为 I/R 组, C 为姜黄素后处理组, D 为姜黄素 + ZnPPⅨ后处理组。

Figure 1. The effects of curcumin post-treatment on myocardial injury

2.2 血浆心肌酶的变化

与假手术组相比, I/R 组血浆 CK 和 LDH 含量均明显高于假手术组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 姜黄素后处理组 CK 和 LDH 含量较 I/R 组明显降低($P < 0.05$); 与姜黄素后处理组相比, 姜黄素 + ZnPPⅨ后处理组 CK 和 LDH 含量明显升高($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 姜黄素后处理对 I/R 大鼠血浆心肌酶 CK 和 LDH 的影响

Table 2. The effects of curcumin post-treatment on serum CK and LDH after rat myocardial I/R injury($\bar{x} \pm s, n = 12, U/L$)

分 组	CK(U/L)	LDH(U/L)
假手术组	1087.4 ± 109.6	422.8 ± 45.9
I/R 组	5039.3 ± 588.7 ^a	2101.7 ± 213.0 ^a
姜黄素后处理组	2805.7 ± 231.0 ^b	1093.5 ± 90.1 ^b
姜黄素 + ZnPPⅨ后处理组	3767 ± 260.2 ^c	1200.4 ± 112.3 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 I/R 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与姜黄素后处理组比较。

2.3 心肌组织 HO-1 酶活性及蛋白表达的变化

姜黄素后处理组显示心肌 HO-1 活性和蛋白表达显著上调(与 I/R 组相比, $P < 0.05$)。HO-1 抑制组显示 ZnPPⅨ能显著抑制 HO-1 的活性和表达($P < 0.05$; 表 3 和图 2)。

表 3. 姜黄素后处理对 I/R 大鼠心肌组织 HO-1 活性的影响
Table 3. The effects of curcumin post-treatment on myocardial HO-1 activity after rat myocardial I/R injury($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分 组	HO-1[nmol/(mg · h)]
假手术组	2.2 ± 0.3
I/R 组	3.7 ± 0.6
姜黄素后处理组	8.0 ± 0.8 ^a
姜黄素 + ZnPPⅨ后处理组	4.4 ± 0.3 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与 I/R 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与姜黄素后处理组比较。

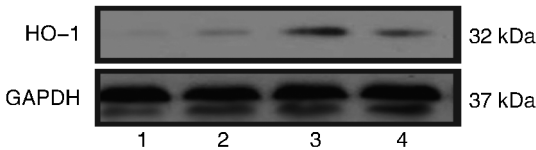


图 2. 姜黄素后处理对 I/R 大鼠心肌组织 HO-1 蛋白表达的影响 1 为假手术组, 2 为 I/R 组, 3 为姜黄素后处理组, 4 为姜黄素 + ZnPPⅨ后处理组。

Figure 2. The effects of curcumin post-treatment on myocardial HO-1 expression after rat myocardial I/R injury

2.4 血浆 MDA 和 SOD 的变化

I/R 组血浆 MDA 含量较假手术组明显增高($P < 0.01$); 与 I/R 组相比, 姜黄素后处理能明显降低血浆 MDA 含量($P < 0.05$), 但这种效应能被 ZnPPⅨ部分阻断。与假手术组相比, I/R 组血浆 SOD 含量明显降低($P < 0.01$); 姜黄素后处理能明显上调血浆 SOD 含量(与 I/R 组相比, $P < 0.05$), 与姜黄

素后处理组相比,姜黄素 + ZnPPIX后处理组 SOD 含量显著降低($P < 0.05$;表 4)。

表 4. 姜黄素后处理对 I/R 大鼠血浆 MDA 和 SOD 活性的影响

Table 4. The effects of curcumin post-treatment on serum MDA and SOD activity after rat myocardial I/R injury($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分 组	MDA($\mu\text{mol/L}$)	SOD(U/L)
假手术组	1.9 \pm 0.3	140.0 \pm 19.5
I/R 组	8.1 \pm 1.2 ^a	56.6 \pm 6.1 ^a
姜黄素后处理组	3.4 \pm 0.5 ^b	114.9 \pm 10.6 ^b
姜黄素 + ZnPPIX后处理组	5.0 \pm 0.7 ^c	92.8 \pm 7.9 ^c

a 为 $P < 0.01$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与 I/R 组比较;c 为 $P < 0.05$,与姜黄素后处理组比较。

3 讨 论

体外循环手术、心脏移植、心脏骤停以及急性冠状动脉综合等过程均伴有 MIRI。严重缺血缺氧可即刻引起心肌细胞坏死,同时再灌注过程中会产生大量的自由基、白细胞的黏附激活、钙超载、血管内皮细胞功能失调以及高能磷酸化合物缺乏等均可直接损伤心肌细胞,促进心肌细胞凋亡和坏死^[5-6]。由于 MIRI 发病机制十分复杂,其防治一直是学者们研究的重点^[7]。在 MIRI 研究领域中,经历了 IPC→药物预适应→缺血后适应→药物后适应的发展过程。采用药物进行干预治疗是目前对抗 MIRI 的重要研究方向和主要策略之一。IPC 与缺血后适应对 MIRI 具有类似的保护效果。但由于 IPC 无法预测缺血发生的具体时间,因此,其临床应用受到明显限制。与 IPC 相比,缺血后适应具备更大的临床可控性和预测性,是目前较为有效的治疗方法。缺血后适应可在恢复冠状动脉血流的同时又能减轻 MIRI 从而改善心肌缺血的治疗效果,已经成为目前研究的热点之一。现已证实部分药物后适应对 MIRI 具有明显的保护作用。缬沙坦后适应可通过 RISK 信号通路发挥心肌保护作用。在心脏 IR 注初期给予吗啡或胰岛素后适应,可减少心肌梗死面积以及改善心功能^[8-9]。胰岛素后适应的心肌保护作用可能与其活化 PI3K/Akt 信号通路有关。但由于多种细胞因子可通过多种信号通路参与 MIRI,至今仍未发现十分理想的药物。由于中药后适应所致不良反应较少,效果明显,因此,具有更大的临床应用空间。

本实验结果显示,与假手术组相比,I/R 组可见心肌横纹消失,心肌细胞排列紊乱,间质有炎性细胞浸润,心肌功能受损,LDH 和 CK 活性明显增加,且脂质过氧化产物 MDA 增多而具有抗氧化能力的 SOD 明显降低,这表明 MIRI 时可出现明显的氧化应激损伤。姜黄素是利用化学方法从姜黄、莪术和郁金等植物中提取的一种天然的生物多酚类色素,它是多数姜科类植物中的一种重要的活性成分,其生物活作用广泛,具有多重的心血管保护效应,且其副作用较少,安全性高等优势,是当前抗 MIRI 研究领域十分具有研发价值和前景的中药。研究发现由于姜黄素含有酚羟基具有直接清除和捕捉自由基的能力,姜黄素也可提高谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽 S 转移酶和 SOD 的活性而发挥抗氧化作用,它同时也具有抗炎、抗肿瘤、抗纤维化、抗菌以及神经保护等多种作用^[2-4,10]。Nemmar 等^[11]发现姜黄素具有心血管保护作用。Olszanecki 等^[12]在老鼠模型中证实姜黄素具有抗动脉粥样硬化的作用。近年来,研究者发现姜黄素预适应能抑制心衰以及减少心肌梗死面积,改善心功能,并减轻心肌、肝脏和视网膜等多种组织的 I/R 损伤^[2-4,13-15]。但姜黄素后适应在 MIRI 中的作用尚少见报道。本实验结果显示,与 I/R 组相比,姜黄素后适应能明显降低 LDH 和 CK 活性,减轻心肌损伤且能抑制脂质过氧化产物 MDA 的增多而上调具有抗氧化能力的 SOD 活性。这些结果表明姜黄素后适应具有明显的心肌保护作用。有研究发现姜黄素是一个 HO-1 强有力的诱导剂,其抗氧化作用可能主要依赖于其诱导 HO-1 蛋白表达^[16-18]。已知 HO-1 是广泛表达于细胞微粒体内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一氧化碳(CO)等,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。本研究显示,姜黄素后适应能明显上调 HO-1 活性和蛋白表达,且抑制 HO-1 活性和表达后姜黄素对 MIRI 的心肌保护作用明显减弱。因此,姜黄素后适应的保护作用可能与其上调 HO-1 活性和表达有关。

本研究将为临床上应用姜黄素减轻和防治 MIRI 提供实验依据,但其具体机制尚不清楚,还有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocar-

- dium[J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1 124-136.
- [2] González-Salazar A, Molina-Jijón E, Correa F, et al. Curcumin protects from cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidant stress and mitochondrial dysfunction[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2011, 11: 357-364.
- [3] Hong D, Zeng X, Xu W, et al. Altered profiles of gene expression in curcumin-treated rats with experimentally induced myocardial infarction[J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(2): 142-148.
- [4] Katanasaka Y, Sunagawa Y, Hasegawa K, et al. Application of curcumin to heart failure therapy by targeting transcriptional pathway in cardiomyocytes[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(1): 13-17.
- [5] Avci G1, Kadioglu H, Sehirli AO, et al. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle[J]. *J Surg Res*, 2012, 172(1): e39-46.
- [6] Walters AM, Porter GA Jr, Brookes PS. Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2012, 111(9): 1 222-236.
- [7] Jiang B, Zhang B, Liang P, et al. Nucleolin protects the heart from ischaemia-reperfusion injury by up-regulating heat shock protein 32[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(1): 92-101.
- [8] 沈烨渠, 沈渠深, 张秋子. 心肌缺血后适应药物治疗进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(2): 159-161.
- [9] Sun Z, Tong G, Ma N, et al. NDRG2: a newly identified mediator of insulin cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(3): 341-345.
- [10] Sahin K, Orhan C, Tuzcu Z, et al. Curcumin ameloriates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(11): 4 035-041.
- [11] Nemmar A, Subramanian D, Ali BH. Protective effect of curcumin on pulmonary and cardiovascular effects induced by repeated exposure to diesel exhaust particles in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39 554.
- [12] Olszanecki R, Jawien J, Gajda M, et al. Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/LDL-double knockout mice[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(4): 627-635.
- [13] Kwon JS, Cho YK, Jeong MH, et al. Curcumin reduces the cardiac ischemia-reperfusion injury: involvement of the toll-like receptor 2 in cardiomyocytes[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(11): 1 514-523.
- [14] Lin CM, Lee JF, Chiang LL, et al. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion-induced liver injury[J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(4): 974-977.
- [15] Wang LL, Li CZ, H Guo, et al. Curcumin inhibits neuronal and vascular degeneration in retina after ischemia and reperfusion injury[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23 194.
- [16] Yang C, Zhang X, Fan H. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia[J]. *Brain Res*, 2009, 1 282: 133-141.
- [17] Alfieri A, Srivastava S, Siow RC, et al. Sulforaphane preconditioning of the Nrf2/HO-1 defense pathway protects the cerebral vasculature against blood-brain barrier disruption and neurological deficits in stroke[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 1 012-022.
- [18] Sahin K, Orhan C, Tuzcu Z, et al. Curcumin ameloriates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(11): 4 035-041.

(此文编辑 李小玲)