

• 实验研究 •

姜黄素对急性肺栓塞大鼠炎症因子的影响

王灵聪* 张 微 夏国莲 江荣林

浙江中医药大学附属第一医院, 浙江省杭州市邮电路 54 号, 310006

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y207052, LY12H29005)

通讯作者: wlc501@139.com, (0571)86620356

[摘要] 目的 探讨姜黄素(CUR)对急性肺栓塞(APE)大鼠肺组织损伤的作用机制。方法 96 只 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、CUR 低、中、高剂量组, 每组 16 只, 采用自体血栓法建立 APE 大鼠模型。CUR 低、中、高剂量组分别给予 CUR 50、100、200 mg/kg 灌胃, 正常组、假手术组和模型组给予等体积生理盐水。造模前 24 h 和造模前 40 min 各灌胃 1 次, 造模后每日灌胃 1 次。各组在造模后 4 h、72 h 分别处死动物, 检测血清白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)水平, 肺组织 HE 染色观察病理改变, 测定肺组织不规则趋化因子(CX3CL1)及受体(CX3CR1)阳性细胞数。结果 造模后 4 h、72 h, 正常组、假手术组、CUR 低剂量组、CUR 中剂量组 IL-8 显著低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。造模后 72 h, 正常组、假手术组、CUR 高剂量组 TNF- α 显著低于模型组($P < 0.05$), 正常组、假手术组、CUR 低、中、高剂量组 IL-1 β 均显著低于模型组($P < 0.05$)。造模后 72 h CUR 可明显减轻肺组织充血程度。造模后 4 h, 正常组、假手术组、CUR 高剂量组的 CX3CL1 阳性细胞计数均显著小于模型组($P < 0.01$), 正常组、假手术组、CUR 中、高剂量组的 CX3CR1 阳性细胞计数显著小于模型组($P < 0.01$)。造模后 72 h, 正常组、假手术组、CUR 低、中、高剂量组的 CX3CL1 阳性细胞计数均显著小于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 正常组、假手术组的 CX3CR1 阳性细胞计数显著小于模型组($P < 0.01$)。结论 CUR 可抑制 APE 大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、CX3CL1 及 CX3CR1 的表达水平, 这可能是其减轻 APE 肺组织损伤的机制之一。

[关键词] 姜黄素; 急性肺栓塞; 炎症因子

Effect of Curcumin on Inflammatory Factor in Acute Pulmonary Embolism Rats

WANG Lingcong, ZHANG Wei, XIA Guolian, JIANG Ronglin

(The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Province 310006)

ABSTRACT **Objective** To observe the mechanism of curcumin (CUR) for lung tissue injury in acute pulmonary embolism (APE) rats. **Methods** Totally 96 SD rats were randomized into the normal group, sham group, model group, low-dose CUR group, middle-dose CUR group and high-dose CUR group, with 16 in each. The APE models were established by injecting self-thrombus. The low-dose CUR group, middle-dose CUR group and high-dose CUR group was given 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg of CUR respectively. The normal group, sham group and model group was given the same volume of saline. The rats were given intragastric administration 40 minutes and 24 hours before modeling and once daily after modeling. The rats were sacrificed on the 4h and 72 h after modeling. The serum levels of interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes of lung tissue were observed with HE staining. The Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1) and CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) levels in lung tissue were measured with immunohistochemical method. **Results** The IL-8 levels in the normal group, sham group, low-dose CUR group and middle-dose CUR group were significantly lower than those in the model group on the 4h and 72 h after modeling ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The TNF- α levels in the normal group, sham group and high-dose CUR group were significantly lower than that in the model group on the 72 h after modeling ($P < 0.05$). The IL-1 β levels in the normal group, sham group, low-dose CUR group, middle-dose CUR group and high-dose CUR group were significantly lower than that in the model group on the 72 h after modeling ($P < 0.05$). On the 72 h after modeling, the hyperemia of the lung tissues was apparently reversal after applying CUR. The CX3CL1-positive cell counts in the normal group, sham group and high-dose CUR group were significantly lower than those in the model group on the 4h after modeling ($P < 0.01$). The CX3CR1-positive cell counts in the normal group, sham group, middle-dose CUR group and high-dose CUR group were significantly lower than those in the model group on the 4h after modeling ($P < 0.01$). The CX3CL1-positive cell counts in the normal group, sham group, low-dose CUR group, middle-dose CUR group and high-dose CUR group were significantly lower than those in

the model group on the 72 h after modeling ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The CX3CR1-positive cell counts in the normal group and sham group were significantly lower than those in the model group on the 72 h after modeling ($P < 0.01$). **Conclusion** The inflammatory response appears in APE rats. CUR can inhibit the levels of IL-8, TNF- α , IL-1 β , CX3CL1 and CX3CR1 in APE rats, which may be relevant to relieving lung tissue injury.

Keywords curcumin; pulmonary embolism; inflammatory factor

姜黄素(CUR)是从姜黄中提取的一种酚类物质,具有抗炎、抗凝作用。急性肺栓塞(APE)是临床上的常见病,研究显示,APE 存在肺动脉及其分支的阻塞,可激活广泛的凝血-纤溶系统并产生炎症反应^[1]。有研究发现兔急性肺血栓栓塞症部分炎症因子可增高^[2],本实验主要观察 CUR 对 APE 大鼠炎症因子及不规则趋化因子(CX3CL1)及受体(CX3CR1)的影响。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 96 只,体重(260 $\pm$ 50)g,由无锡惠山江南实验动物场提供,合格证号:SCXK(苏)2009-0005。

1.2 药物

CUR 由上海丽臣生物科技有限公司提供,批号 110823。

1.3 主要试剂和仪器

白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β)大鼠酶联免疫检测(ELISA)试剂盒均由上海逸峰生物科技有限公司提供,批号均为 201109;Fkn 抗体及 CX3CR1 抗体(Abcam)。石蜡切片机(Leica,型号:RM2235),烤片机(孝感亚光医用电子技术有限公司,型号:JLT-A),电热恒温培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司,型号:HZQ-F160)。

1.4 模型建立

采用自体血栓法建立 APE 大鼠模型。具体方法:实验前 4 h 大鼠自体眼眶静脉取血,凝固 4 h 后修剪为 2 mm³ 大小血栓,与生理盐水混合备用。大鼠水合氯醛腹腔注射麻醉成功后,将其右颈总静脉分离,迅速从大鼠颈总静脉注射 0.5 ml 血栓混悬液,病理证实造模成功。假手术组从颈总静脉注射生理盐水 0.5 ml,正常组不接受任何干预。

1.5 动物分组与给药方法

利用 SPSS 19.0 统计软件产生的随机分配表分为 6 组,每组 16 只。CUR 低、中、高剂量组分别给予 CUR 溶液 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg 灌胃,正常组、假手术组和模型组给予同体积生理盐水。造模前 24 h 和造模前 40 min,各组灌胃 1 次,

造模后每天灌胃 1 次,共 3 天。

1.6 观察指标及方法

各组在造模后 4 h、72 h,各随机处死 8 只大鼠。ELISA 法测定血清白细胞介素 8(IL-8)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)水平;肺组织 HE 染色观察病理变化;免疫组织化学法检测肺组织 CX3CL1 及 CX3CR1,在 400 倍光镜下,视野中随机选取 50 个细胞,进行 CX3CL1、CX3CR1 阳性细胞计数,每组选取 10 个视野。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析,组间均数的两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间血清 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 水平比较

表 1 示,造模后 4 h、72 h,模型组血清 IL-8 水平与正常组、假手术组比较显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);CUR 低、中剂量组血清 IL-8 水平较模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。造模后 72 h,模型组血清 TNF- α 、IL-1 β 水平与正常组、假手术组比较显著升高($P < 0.01$);CUR 高剂量组血清 TNF- α 水平,CUR 低、中、高剂量组血清 IL-1 β 水平较模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠不同时间肺组织病理结果

模型组造模后 4 h 肺泡壁高度充血增厚、细胞无明显坏死,局部有出血,肺泡腔尚可见,局部肺泡腔内有出血;CUR 高、中、低剂量组造模后 4 h 的肺组织结构均无明显破坏。正常组、假手术组造模后 72 h 肺泡结构完整、无水肿出血坏死;模型组造模后 72 h 大部分区域结构不清,支气管上皮结构紊乱,梗死区见局部肺泡壁坏死、肺泡腔消失,肺泡出血,而大体肺标本见大片的肺梗死灶;CUR 低剂量组造模后 72 h 肺泡壁明显充血增厚,部分肺泡腔内有红细胞,支气管可见,梗死区见肺泡壁坏死,肺泡腔轮廓尚可见,内充有红细胞;CUR 高剂量组造模后 72 h 大部分区域实变(梗死区),肺泡腔消失,梗死区见肺泡壁坏死,肺泡腔轮廓尚可见,内充有浆液、红细胞。

表 1 各组大鼠不同时间血清 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-8		TNF- α		IL-1 β	
		4h	72h	4h	72h	4h	72h
正常组	8	473.26 $\pm$ 28.98*	461.39 $\pm$ 36.92**	176.01 $\pm$ 10.70	198.18 $\pm$ 31.95**	29.49 $\pm$ 6.11	30.26 $\pm$ 3.12**
假手术组	8	463.79 $\pm$ 28.40*	438.32 $\pm$ 35.08**	180.46 $\pm$ 11.72	173.38 $\pm$ 42.46**	29.42 $\pm$ 7.01	30.10 $\pm$ 2.72**
模型组	8	534.68 $\pm$ 44.61	652.88 $\pm$ 87.66	184.89 $\pm$ 7.39	279.69 $\pm$ 13.92	30.69 $\pm$ 4.91	36.21 $\pm$ 3.00
CUR 低剂量组	8	460.78 $\pm$ 67.59*	476.18 $\pm$ 77.44**	237.28 $\pm$ 14.33**	271.81 $\pm$ 7.70	29.73 $\pm$ 3.81	30.90 $\pm$ 4.00*
CUR 中剂量组	8	461.76 $\pm$ 64.29*	478.29 $\pm$ 81.34**	237.40 $\pm$ 10.29**	277.35 $\pm$ 7.24	32.14 $\pm$ 5.15	31.01 $\pm$ 3.29*
CUR 高剂量组	8	458.53 $\pm$ 117.65	489.88 $\pm$ 200.01	197.33 $\pm$ 18.26	261.58 $\pm$ 8.00*	31.22 $\pm$ 5.33	30.81 $\pm$ 2.35**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 2 各组大鼠不同时间 CX3CL1、CX3CR1 阳性细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CX3CL1		CX3CR1	
		4h	72h	4h	72h
正常组	10	8.20 $\pm$ 3.55**	7.50 $\pm$ 3.47**	11.80 $\pm$ 4.66**	10.50 $\pm$ 3.47**
假手术组	10	9.70 $\pm$ 4.11**	8.70 $\pm$ 3.23**	10.90 $\pm$ 4.63**	11.70 $\pm$ 4.97**
模型组	10	17.30 $\pm$ 2.87	16.60 $\pm$ 5.87	20.90 $\pm$ 4.82	20.30 $\pm$ 5.44
CUR 低剂量组	10	16.20 $\pm$ 5.81	12.60 $\pm$ 3.84*	17.50 $\pm$ 5.62	18.30 $\pm$ 5.60
CUR 中剂量组	10	13.60 $\pm$ 6.47	11.30 $\pm$ 3.53**	12.70 $\pm$ 6.20**	17.80 $\pm$ 8.44
CUR 高剂量组	10	11.10 $\pm$ 4.20**	10.10 $\pm$ 3.38**	12.50 $\pm$ 5.91**	16.50 $\pm$ 5.52

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 各组大鼠不同时间肺组织 CX3CL1、CX3CR1 阳性细胞数比较

表 2 示,造模后 4h,正常组、假手术组、CUR 高剂量组的 CX3CL1 阳性细胞计数均显著小于模型组($P<0.01$),正常组、假手术组、CUR 中剂量组、CUR 高剂量组的 CX3CR1 阳性细胞计数均显著小于模型组($P<0.01$)。造模后 72h,正常组、假手术组、CUR 低剂量组、CUR 中剂量组、CUR 高剂量组的 CX3CL1 阳性细胞计数均显著小于模型组($P<0.05$),正常组、假手术组的 CX3CR1 阳性细胞计数均显著小于模型组($P<0.01$)。

3 讨论

肺栓塞结合其临床表现可属中医学“胸痹”、“喘证”、“厥脱”等范畴。姜黄为姜科姜黄属的多年生草本植物,具有破血行气、通经止痛等功能,临床可用于治疗气滞血瘀所致的心、胸、胁、腹诸痛。APE 的治疗主要为溶栓和抗凝,而预防本病采用的西药存在较大的出血可能性,故对于 APE 重点高危人群,如何选择安全有效的预防药物成为当务之急。研究发现^[3],CUR 可明显改善 APE 大鼠的动脉血气、乳酸及降低死亡率,故用 CUR 进一步研究对 APE 炎症反应的作用。

CX3CL1 对于炎症细胞在血管壁上的募集和内皮细胞的损伤有重要作用^[4]。有研究认为缺血缺氧可使肺 CX3CL1 分泌增高^[5~6],Maria B 等^[7]认为趋化因子在支气管哮喘及慢性阻塞性肺疾病

(COPD)中起重要的作用,CX3CL1 扮演细胞粘着分子和单核细胞或 T 细胞的趋化物,联合使用 IFN- γ 和 TNF- α 刺激,可呈时间和浓度依赖性地分泌 CX3CL1 的 mRNA 和蛋白质,地塞米松也可明显促进 CX3CL1 分泌。而 CX3CL1 是含有 373 个氨基酸残基蛋白质分子的不规则趋化因子,具有黏附和趋化活性,是 CX3C 家族的唯一成员^[8],能与其特异性受体 CX3CR1 结合介导炎症细胞与血管内皮细胞的紧密黏附,它们在体内分布广泛。

APE 的典型组织学特点为肺泡壁坏死和肺泡出血。本研究通过肺病理观察证实 APE 大鼠模型成功,造模后 4h 肺结构破坏不如 72h 严重,CUR 应用后,肺组织充血及炎症程度明显减轻,说明使用 CUR 可减轻 APE 大鼠肺组织病理损害。本实验结果提示,造模后 4h IL-8 显著升高,而 TNF- α 及 IL-1 β 在造模后 72h 出现升高,但 CX3CL1 及 CX3CR1 在造模后 4h 后即可见显著升高,CUR 的干预作用较佳,降低 APE 大鼠血清中 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 水平和肺组织中 CX3CL1、CX3CR1 的表达。这与 CUR 可抑制肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 分泌以及抑制 TNF- α 刺激人脐静脉血管内皮细胞的 CX3CL1 mRNA 及蛋白表达相符合^[9~10]。说明 CUR 能阻碍 APE 大鼠的炎症反应,可能是 CUR 减轻 APE 肺组织损伤的机制之一。

(下转第 515 页)

等药物,则极大地提高了治疗的安全性,在临床应用中取得了良好的治疗效果。本实验通过对 ACST 大鼠血 WBC、PLT,血清 ALT、DBiL、IBiL、LPS 及 TNF- α 的测定,对肝脏病理改变的观察,探讨了清胆汤联合胆道减压内引流对 ACST 大鼠的作用及可能机制,为临床应用中中西医结合方法治疗 ACST 提供了理论依据。

中医学认为 ACST 属“黄疸”、“胁痛”、“胆胀”等范畴,辨证多为肝胆湿热或胆腑郁热。其病机多因湿热侵袭、饮食不节、情志失调、虫积等致使肝郁气滞、胆失疏泄,郁久化热,煎熬胆汁,聚而为石,进一步使肝胆气机受阻。胆失通降,胆液不循常道外溢而发黄;胆腑不通,不通则痛。如邪热炽盛,与肠中糟粕相搏,则燥屎内结,腑气不通,发展为阳明腑实证。如邪热上扰心神,则神昏谵语,甚则狂乱不安。热盛日久,耗伤气阴,则出现亡阴或亡阳等危重证候。根据六腑以通为用的原则,选用清胆汤(大柴胡汤合茵陈蒿汤加减)以取其清热化湿、疏肝利胆、通里攻下之功效。方用茵陈、金钱草为主药,清热解毒、除湿退黄、利胆排石。配伍栀子、黄芩增强清泄三焦湿热、利胆退黄之功;木香、柴胡、延胡索疏肝、行气、止痛;枳实、芒硝、大黄通里攻下。

本实验研究表明,单纯应用清胆汤的 ACST 大鼠血清 LPS、TNF- α 水平均明显下降,但死亡率、WBC、PLT 和 ALT 则无明显变化,肝脏病理变化无改善,且 DBiL 和 IBiL 升高,提示对于胆道完全梗阻的 ACST 大鼠单纯应用清胆汤,不但无益,反

而可能有害。究其原因可能是由于其利胆作用,增加了胆汁的分泌量,使本来已形成的胆道高压更加严重,进一步破坏胆血屏障,导致血清胆红素上升,加重了肝组织损伤。而清胆汤配合减压引流的 ACST 大鼠 PLT 显著回升,其他指标均显著低于 ACST 组,肝脏病理改变明显好转,与减压组相比 ALT 和 LPS 也明显降低。因此在临床上,应该根据患者的具体情况,合理选择应用利胆类中药。研究结果证明^[4-5],清胆中药能显著下调 LPS、TNF- α 等细胞因子和炎症介质水平,保护肝功能,防治 MODS,但要把握好适应症,应在保证胆道畅通,至少不是完全梗阻的情况下才能应用,对于胆道完全梗阻的患者应慎用。

参考文献

- [1]季成春.中西医结合方法治疗急性重症胆管炎大鼠肝损伤的实验研究[D].大连:大连医科大学,2005:12.
- [2]Gong JP, Liu CA, Wu CX, et al. Nuclear factor κ B activity in patients with acute severe cholangitis[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(2): 346-349.
- [3]Zhang WZ, Chen YS, Wang JW, et al. Early diagnosis and treatment of severe acute cholangitis[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 150-152.
- [4]章学林,朱培庭,张静哲.中药治疗急性胆道感染的机理研究概况[J].中国中西医结合外科杂志,1999,3:48-49.
- [5]张霞.清热解毒中药拮抗内毒素研究[J].天津中医,1999,16(1):43-45.

(收稿日期:2012-07-16;修回日期:2012-10-20)

[编辑:邓媛]

(上接第 508 页)

参考文献

- [1]韩力,时国朝.肺血栓栓塞症中炎症介质和细胞因子的作用[J].诊断学理论与实践,2006,5(6):537-540.
- [2]张斗霞,张丽梅,张凌,等.兔急性肺血栓栓塞症及尿激酶治疗中 TNF- α 、IL-8 和 IL-10 的变化[J].华中科技大学学报(医学版),2005,34(1):37-40.
- [3]蔡斌,孙晨,王灵聪,等.姜黄素对急性肺栓塞大鼠的影响[J].浙江医学,2011,33(4):457-459.
- [4]Yoneda O, Imai T, Goda S, et al. Fractalkine mediated endothelial cell injury by NK cell[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4055-4062.
- [5]王蕾,李廷谦,向国霞,等.糖皮质激素对内毒素致急性肺损伤大鼠肺组织 Fractalkine 表达的影响[J].四川大学学报(医学版),2006,37(2):250-253.
- [6]陈小菊,程德云,杨莉,等.缺氧大鼠血清和肺内 fractalkine 的变化[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(1):54-55.

- [7]Sukkar MB, Issa R, Xie S, et al. Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN- γ and TNF- α and regulation by TGF- β and corticosteroids[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(6): L1230-L1240.
- [8]Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. Nature, 1997, 385(6617): 640-644.
- [9]Lierat A, Su F, Norwicki M, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by curcumin in hyaline membrane disease(HMD) [J]. Life Sci, 2001, 70(3): 253-267.
- [10]王灵聪,蒋慧芳,朱佃香,等.姜黄素对 TNF- α 诱导人脐静脉内皮细胞 CX3CL1 表达的干预作用[J].中国中医药科技,2010,17(6):517-524.

(收稿日期:2012-07-23;修回日期:2012-12-10)

[编辑:洪涛]