

姜黄素对急性肺栓塞大鼠细胞外调节蛋白激酶、三磷酸肌醇激酶、蛋白激酶 B 的影响

王灵聪^{1*} 张 微¹ 吴建浓¹ 黄立权¹ 杨如会² 江荣林¹

(1. 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; 2. 杭州赫贝科技有限公司)

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(LY12H29005); 浙江省中医药防治重大疾病攻关计划项目(2012ZGG001)

* 通讯作者: wlc501@139.com, (0571)86620356

[摘要] 目的 探索姜黄素改善急性肺栓塞(APE)的作用机制。方法 采用自体血栓法复制 APE 动物模型, 72 只 SD 大鼠按体重随机分为正常组、假手术组、模型组、姜黄素组各 18 只, 姜黄素组于手术前 1 天和 40 min, 造模后 6、24、72 h 给予姜黄素 100 mg/kg 灌胃 1 次, 其余 3 组在同一时间灌胃等量生理盐水。分别在造模后 6、24、72 h, 随机取 6 只大鼠肺组织和血清, Western Blot 法检测肺组织大鼠细胞外调节蛋白激酶(ERK)、三磷酸肌醇激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt), ELISA 法测定血清脑钠肽(BNP)、肌钙蛋白 T(TnT)和 D-二聚体(D-Dimer)。结果 与正常组同时时间点比较, 模型组、姜黄素组在 3 个时间点 ERK、PI3K、Akt 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组同时时间点比较, 仅姜黄素组的肺组织 ERK 在造模后 24 h 时差异无统计学意义($P > 0.05$), 其余各时间点姜黄素组大鼠肺组织 ERK、PI3K、Akt 均显著下降($P < 0.01$)。与正常组同时时间点比较, 模型组 BNP、TnT 和 D-Dimer 在 3 个时间点均显著升高($P < 0.01$); 与模型组同时时间点比较, 姜黄素组的血清 BNP、TnT 和 D-Dimer 均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 姜黄素能降低 APE 大鼠的肺组织 ERK、PI3K、Akt 及血清 BNP、TnT 和 D-Dimer 水平, 可能是姜黄素改善 APE 大鼠预后的机制之一。

[关键词] 姜黄素; 肺栓塞; 细胞外调节蛋白激酶; 三磷酸肌醇激酶/蛋白激酶 B; 脑钠肽; 肌钙蛋白 T; D-二聚体

Effect of Curcumin on ERK, PI3K and Akt in Rats with Acute Pulmonary Embolism

WANG Lingcong¹, ZHANG Wei¹, WU Jiannong¹, HUANG Liquan¹, YANG Ruhui², JIANG Ronglin¹

(1. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Province 310006; 2. Hangzhou Hibio Bio-tech Co., Ltd)

ABSTRACT Objective To study the mechanism of Curcumin for acute pulmonary embolism (APE). **Methods** The APE models were established by self-embolism. Totally 72 SD rats were randomized into the normal group, sham operation group, model group and Curcumin group, with 18 in each. The Curcumin group was gavaged with 100mg/kg Curcumin one day and 40min before operation, and at the 6th, 24th and 72th hour after modeling respectively. Another three groups were gavaged with normal saline at the same time points. The lung tissue and serum was taken from 6 rats at the 6th, 24th and 72th hour after modeling. The extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt) was detected by Western Blot. The serum levels of brain natriuretic peptide (BNP), troponin T (TnT) and D-dimer were detected by ELISA. **Results** There were significant differences between the normal group, model group and Curcumin group in ERK, PI3K and Akt at the same time point ($P < 0.01$). There was no significant difference between the model group and Curcumin group in ERK at the 24th hour after modeling ($P > 0.05$). Comparing with the model group, ERK, PI3K and Akt in the lung tissue was significantly decreased in other groups at the same time point ($P < 0.01$). Comparing with the normal group, the levels of BNP, TnT and D-Dimer were significantly increased in the model group at the same time point ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the levels of BNP, TnT and D-Dimer were significantly decreased in the Curcumin group at the same time point ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Curcumin can decrease ERK, PI3K and Akt in the lung tissue and serum levels of BNP, TnT and D-Dimer. It might be one of the mechanisms to explain why curcumin can improve the prognosis of APE.

Keywords Curcumin; pulmonary embolism; extracellular signal-regulated protein kinase; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B; brain natriuretic peptide; troponin T; D-dimer

急性肺栓塞(acute pulmonary embolism, APE)病死率为 7%~11%^[1]。我们前期研究发现 APE 大鼠存在广泛的炎症反应, 姜黄素能改善 APE 的病理及炎症因子^[2-3]。另有研究显示, 细胞外调节

蛋白激酶(ERK)、三磷酸肌醇激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)在肺损伤、肺动脉高压等疾病中起了较重要的作用^[4-10]。本研究主要观察姜黄素对 APE 大鼠肺组织 ERK、PI3K、Akt 的影响, 并以血清脑钠

肽(BNP)、肌钙蛋白 T(TnT)和 D-二聚体(D-Dimer)评估姜黄素治疗 APE 的预后。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 72 只,体重(248 ± 18)g,购自无锡市惠山江南实验动物场,动物合格证号:SCXK(苏)2009-0005。

1.2 药物、试剂和仪器

姜黄素,由上海丽臣生物科技有限公司提供,批号 110823。PI3K 抗体(批号 BS3678, Bioworld 公司),Akt 抗体(批号 ab8805, Abcam 公司),ERK 抗体(批号 9102, Cell Signaling Technology 公司), β -Actin(肌动蛋白)抗体(批号 sc-47778, Santa Cruz 公司),山羊抗兔 IgG-HRP(Bioworld 公司),山羊抗小鼠 IgG-HRP(批号 BS12478, Bioworld 公司)。BNP(批号 20120725)、TnT(批号 20120316)和 D-Dimer(批号 20120725)的 ELISA 试剂均为上海逸峰生物科技有限公司生产,规格:96T。主要仪器:细胞培养塑料平板(96 孔, Fisher Scientific 公司),酶标仪(SPECTRA max Plus 384, Molecular Devices 公司),电泳系统(Mini-Proten Tetra System, Bio-Rad 公司),凝胶成像仪(ChemiDoc XRS System, Bio-Rad 公司)。

1.3 动物模型建立

使用自体血栓复制 APE 动物模型^[2-3]:大鼠实验前 4 h 眼眶静脉取血,放置 4 h 凝固,修剪至体积为 2 mm^3 ,加生理盐水制备混悬液。据大鼠体重通过腹腔注射水合氯醛麻醉。分离出右颈总静脉,通过 1 ml 注射器抽取 0.5 ml 混悬液(约 15~20 个血栓),迅速从颈总静脉注射血栓混悬液,当大鼠出现呼吸加快加深,表明 APE 造模成功。假手术组自右颈总静脉注入 0.5 ml 生理盐水,正常组不接受任何干预。

1.4 动物分组与给药

72 只 SD 大鼠按体重采用 SPSS 19.0 统计软件产生随机分配表分为正常组、假手术组、模型组、姜黄素组,每组 18 只。姜黄素组给予姜黄素 100 mg/kg,手术前 1 天和 40 min 分别灌胃 1 次,造模后 6、24、72 h 各灌胃 1 次,其余 3 组在同一时间灌胃等量生理盐水,实验期间各组大鼠均自由饮水和进食。

1.5 观察指标及方法

各组大鼠分别在造模后 6、24、72 h 给药后,按体重利用 SPSS 19.0 统计软件产生随机分配表随机

取 6 只大鼠麻醉,取肺组织和血清。Western blot 法检测肺组织 ERK、PI3K、Akt;取左肺上叶,制备蛋白样品,BCA 法测定蛋白浓度(测定 562 nm 处的吸光度值,根据标准曲线计算样品的蛋白浓度),聚丙烯酰胺凝胶电泳,聚偏二氟乙烯膜(PVDF)转膜后封闭,孵育一抗,洗膜,孵育二抗后洗膜,ECL 化学发光显影,根据 Image J1.44 软件得出样品蛋白质 ERK、PI3K、Akt 与 β -Actin 的光密度值(IntDen),分别计算其与 β -Actin 光密度的比值。ELISA 法测定血清 BNP、TnT 和 D-Dimer。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件分析结果,计量资料均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组 ERK、PI3K、Akt 比较采用单因素方差分析,BNP、TnT 和 D-Dimer 的比较采用随机区组的多因素方差分析,组间均数的两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点肺组织 ERK、PI3K、Akt 比较

各组大鼠造模后 6、24、72 h ERK、PI3K、Akt 的 Western Blot 显影提示模型组更显著,姜黄素组有一定程度的色泽变淡。表 1 示,与正常组同时间点比较,模型组、姜黄素组在造模后 6、24、72 h ERK、PI3K、Akt 差异均有统计学意义($P < 0.01$),假手术组各指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组同时间点比较,仅姜黄素组肺组织 ERK 在造模后 24 h 时差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各时间点姜黄素组大鼠肺组织 ERK、PI3K、Akt 均显著下降($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠不同时间点血清 BNP、TnT 和 D-Dimer 比较

表 2 示,与正常组同时间点比较,模型组 BNP、TnT 和 D-Dimer 造模后 6、24、72 h 均显著升高($P < 0.01$),姜黄素组 TnT 仅 6 h 显著高于正常组($P < 0.01$),假手术组各指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组同时间点比较,姜黄素组的血清 BNP、TnT 和 D-Dimer 均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与本组内 24 h 比较,模型组造模后 24 h 的血清 BNP、TnT 和 D-Dimer 升高达高峰,均显著高于 6 h($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),造模后 72 h 开始下降,其中 BNP 和 D-Dimer 差异有统计学意义($P < 0.01$)。姜黄素组造模后 24 h 及 72 h 的血清 TnT 均显著低于 6 h($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠不同时间点肺 ERK、PI3K、Akt 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	ERK	PI3K	Akt
正常组	6 h	6	9.93±0.22	1.54±0.06	4.98±0.16
	24 h	6	1.01±0.03	0.29±0.01	0.45±0.01
	72 h	6	8.45±0.28	1.43±0.09	4.20±0.13
假手术组	6 h	6	10.70±0.41	1.65±0.02	4.51±0.07
	24 h	6	1.16±0.01	0.31±0.02	0.43±0.01
	72 h	6	9.37±0.27	1.10±0.03	4.45±0.09
模型组	6 h	6	12.63±0.91*	3.39±0.03*	10.11±0.15*
	24 h	6	1.34±0.01*	0.44±0.01*	0.56±0.01*
	72 h	6	10.73±0.23*	2.37±0.03*	5.55±0.02*
姜黄素组	6 h	6	8.48±0.13*△	1.92±0.02*△	7.40±0.23*△
	24 h	6	1.35±0.07*	0.33±0.01*△	0.50±0.01*△
	72 h	6	7.38±0.11*△	1.01±0.02*△	3.33±0.12*△

注:与正常组同时时间点比较,* $P<0.01$;与模型组同时时间点比较,△ $P<0.01$

表 2 各组大鼠不同时间点血清 BNP、TnT 和 D-Dimer 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	BNP(pg/ml)	TnT(pg/ml)	D-Dimer(ng/ml)
正常组	6 h	6	306.59±50.65	52.79±26.27	409.55±24.54
	24 h	6	314.32±11.60	88.27±41.75	386.25±19.84
	72 h	6	236.93±35.30	73.27±19.17	356.07±2.80
假手术组	6 h	6	306.36±63.45	60.19±20.75	415.71±47.81
	24 h	6	288.64±53.82	79.23±29.21	401.34±43.61
	72 h	6	261.93±38.91	88.63±35.33	345.89±33.35
模型组	6 h	6	423.98±31.92*△△	145.67±31.38*△	494.38±32.69*△
	24 h	6	573.41±38.95*	232.50±35.12*	563.30±10.36*
	72 h	6	376.02±66.67*△△	212.21±64.92*	438.13±42.70*△△
姜黄素组	6 h	6	303.41±42.50*#	214.62±15.26*#△△	387.41±27.20*#
	24 h	6	351.02±113.15*#	88.08±59.98*#▲	359.64±45.82*#
	72 h	6	292.50±32.91#	41.35±4.09*#▲	387.77±32.24#

注:与正常组同时时间点比较,* $P<0.01$;与模型组同时时间点比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与本组内 24 h 比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与本组内 6 h 比较,▲ $P<0.01$

3 讨论

APE 按临床表现应属于中医学“厥证”、“胸痹”、“喘证”、“血证”、“痰饮”范畴。气虚则血瘀,瘀血阻络,气血津液运行不畅,闭阻心肺,心不主血脉,肺节失司,气血运行不畅而发本病。姜黄属于姜黄属植物,根茎为药用,姜黄能行气、散风活血、通经止痛。《本草纲目拾遗》:“姜黄真者是经种三年以上老姜。……姜黄味辛,温,无毒,色黄,主破血下气,温不寒。”姜黄素是从姜黄中提取的一种酚类物质,林全等^[11]认为姜黄素可降低慢性缺氧性肺动脉高压、改善肺血管重建。姜黄素也能减轻大鼠氧自由基对肺组织结构的氧化损伤,防治肺纤维化^[12]。姜黄素能抑制大鼠多形核中性粒细胞白三烯的形成^[13],并减轻实验性胰腺炎组织的中性粒细胞浸润^[14]。我们前期研究发现,100 mg/kg 的姜黄素组即可取得较好的效果^[2],为减少大鼠处死数量,故本实验仅使用姜黄素 100 mg/kg 进行干预。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联是细胞内重要的信号通

路,其中 ERK 与细胞的增殖反应最密切^[15]。PI3K/Akt 广泛存在于细胞中,是细胞生长、增殖及分化调节的信号转导通路之一,其靶蛋白为 Akt^[16],PI3K/Akt 信号途径可介导免疫炎症细胞激活及迁移。

本研究结果显示,假手术组和正常组各数据相比,差异均无统计学意义,说明手术刺激对实验无明显影响。Western Blot 检测 ERK、PI3K、Akt,其比较是 ECL 发光法,各个单独实验的发光值包括内参选取时间不一致,上样量有所差异,如果同一组别不同时间点的蛋白比较,必须放在同一张膜上进行重新跑胶才有意义,否则偏差太大,故实验中对同一组别的不同时间段不进行比较。与正常组同时时间点比较,模型组、姜黄素组 ERK、PI3K、Akt 在造模后 6、24、72 h 均有显著差异,说明造模后 ERK、PI3K、Akt 均可显著上升。与模型组同时时间点比较,姜黄素组的肺 ERK、PI3K、Akt 多呈显著下降,说明姜黄素可降低 APE 大鼠的 ERK、PI3K、Akt 水平。既往

研究发现 APE 大鼠可出现急性炎症反应,姜黄素能抑制其 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-8 ,减轻肺组织充血程度^[2],推测 APE 引起机体缺氧,刺激 ERK、PI3K、Akt 升高,从而介导炎症介质释放,而姜黄素可抑制其通道,减轻肺组织损伤。

欧洲心脏病学会 2008 年发布的《急性肺栓塞诊断和治疗指南》^[1]认为,APE 患者血 BNP、TnT、D-Dimer 较低者预后良好,故将这 3 项指标用于本实验。APE 造模后 6、24、72 h,血清 BNP、TnT 和 D-Dimer 均显著升高,造模后 24 h 升高最显著,造模后 72 h 开始下降,而姜黄素的干预可使其显著下降,提示姜黄素能改善 APE 大鼠的预后。总之,姜黄素能降低 APE 大鼠的肺 ERK、PI3K、Akt 及血清 BNP、TnT 和 D-Dimer 水平,提示可能为姜黄素改善 APE 预后的机制之一。

参考文献

- [1] Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, et al. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. Eur Heart J, 2008, 29(18):2276-2315.
- [2] 王灵聪,张微,夏国莲,等.姜黄素对急性肺栓塞大鼠的炎症因子影响[J].中医杂志,2013,54(6):504-506.
- [3] 孙晨,王灵聪,蒋慧芳,等.阿司匹林对急性肺栓塞大鼠肺组织 CX3CL1 及 CX3CR1 影响[J].中华医学杂志,2013,93(1):69-72.
- [4] 沈伟峰,干建新,徐少文,等.盐酸戊乙奎醚抑制脂多糖性肺损伤大鼠肺泡 II 型上皮细胞损伤和 ERK 活化[J].中国病理生理,2009,25(9):1720-1725.
- [5] Jing JX, Zhang Y, Ji SH, et al. Kinetics of mitogen-activated protein kinase family in lipopolysaccharide-stimulated mouse kupffer cells and their role in cytokine production [J]. Shock, 2002, 18(4):336-341.
- [6] Liang S, Raj K, Megan R, et al. Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF-alpha production via Egr-1[J]. Am J Physiol Lung Cell Physiol, 2002, 282(6):1205-1211.
- [7] Jarrar D, Kuebler JF, Rue LW, et al. Alveolar macrophage activation after trauma-hemorrhage and sepsis is dependent on NF-kappa B and MAPK/ERK mechanisms[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(4):799-805.
- [8] 徐慧,戴元荣,夏晓东,等.哮喘大鼠肺组织 Akt 蛋白表达上调对 IL-4、IL-12 和 IL-13 的影响[J].温州医学院学报,2009,39(5):433-436.
- [9] 易斌,钱桂生,白莉,等.缺氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞 AktmRNA 表达的变化[J].第三军医大学学报,2006,28(3):192-194.
- [10] 王丽荣,李爽,袁辉,等.PI3K/Akt 信号通路在慢性缺氧性肺血管收缩中的机制[J].牡丹江医学院学报,2010,31(3):7-9.
- [11] 林全,狄枫,王良兴.姜黄素对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺动脉高压及肺动脉管壁胶原的影响[J].中国应用生理学杂志,2006,22(3):257-261.
- [12] 周刚,牛建昭,王继峰.姜黄素抗肺纤维化大鼠自由基损伤作用的实验研究[J].中国中药杂志,2006,31(8):669-672.
- [13] Araujo CC, Leon LL. Biological activities of Curcuma longa L[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2001, 96(5):723-728.
- [14] Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(1):85-95.
- [15] Yu PJ, Ferrari G, Pirelli L, et al. vascular injury and modulation of MARK: A targeted approach to therapy of restenosis[J]. Cellular signaling, 2007, 19(7):1359-1371.
- [16] Lin CH, Yeh SH, Lin CH, et al. A role for PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala[J]. Neuron, 2001, 31(5):841-851.

(收稿日期:2013-02-28;修回日期:2013-05-30)

[编辑:邓媛]

(上接第 1579 页)

附属医院多年来实行中医规范化治疗,遵循中医临床路径,中医分型及方证相对应治则,方药相对固定,故未再做相关统计分析。

参考文献

- [1] 胡亚美,江载芳.诸福棠实用儿科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2002:688-690.
- [2] 汪受传.中医儿科学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:136-140.
- [3] 朱文锋.中医诊断学[M].北京:中国中医药出版社,2001:9.
- [4] 肖洪俊.辨证分型治疗过敏性紫癜 64 例[J].现代中西医结合杂志,2009,18(14):1634.
- [5] 赵俊萍.辨证分型治疗小儿过敏性紫癜 128 例[J].光明中医,2008,23(4):463-464.
- [6] 任德旺,任仲玉,任仲仪,等.凉血化瘀扶正法治疗小儿过敏性紫癜性肾炎 30 例临床观察[J].中医杂志,2010,51(增刊 2):199-200.
- [7] 张志明.中医辨证治疗过敏性紫癜 105 例[J].河南中医,2007,27(11):52.
- [8] 刘玉清,丁樱.丁樱治疗过敏性紫癜性肾炎经验[J].中医杂志,2012,53(2):103-104.

(收稿日期:2013-07-01;修回日期:2013-07-30)

[编辑:崔京艳]