

姜黄素对急性肺损伤小鼠肺组织 GSH-PX 和 iNOS 活性的影响

雷素英¹, 李银生², 张彬², 王琼梓¹ (1.新乡医学院第三附属医院呼吸科, 河南 新乡 453003; 2.新乡医学院组胚教研室, 河南 新乡 453003)

摘要: 目的 探讨姜黄素对博莱霉素(BLM)诱导的急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)小鼠肺组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性的影响。方法 博莱霉素诱导小鼠急性肺损伤模型, 光镜观察肺组织学改变, 测定 GSH-PX、iNOS 活性变化。结果 姜黄素能降低肺组织中 iNOS 活性, 提高小鼠体内 GSH-PX 活性, 与假手术组相比, 第 3、7 天时模型组 iNOS 活性明显增高($P<0.01$), 姜黄素中、高剂量组和模型组相比, iNOS 活性下降显著($P<0.01$); 与假手术组相比, 第 3、7 天时模型组 GSH-PX 活性明显减少($P<0.01$), 姜黄素中、高剂量组和模型组相比, GSH-PX 活性显著增加($P<0.01$)。病理组织学检查亦表明, 一定剂量的姜黄素可明显减轻肺组织损伤的程度。结论 一定剂量姜黄素在 BLM 诱导的急性肺损伤中有一定的防治作用。其机制可能是通过升高肺组织的 GSH-PX 活性, 降低 iNOS 的活性, 重建机体氧化、抗氧化平衡有关。

关键词: 急性肺损伤; 姜黄素; 谷胱甘肽过氧化物酶; 诱导型一氧化氮合酶

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)07-0583-04

Effect of Curcumin on Acute Lung Injury of Mice with GSH-PX and iNOS Activity in Lung Tissues

LEI Suying¹, LI Yinsheng², ZHANG Bin², Wang Qiongzhi¹ (1.The third Teaching Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 2.The Department of histology and Embryology of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of curcumin on GSH-PX, iNOS activity in lung tissues in acute lung injury (ALI) mice induced by bleomycin (BLM). **METHODS** BLM was injected intravenously into mice to establish the ALI model. The histological changes were observed with microscope. The changes of GSH-PX and iNOS were measured to reveal the acute lung injury. **RESULTS** Curcumin was able to increase the activity of GSH-PX, reduce the activity of iNOS. Compared with the sham group, iNOS in model group were significantly higher ($P<0.01$) at the 3rd and 7th day. In high-dose and medium-dose group of curcumin, iNOS decreased significantly ($P<0.01$) compared with model group. GSH-PX decreased significantly ($P<0.01$) in model group at 3rd and 7th day. In high-dose and medium-dose group, GSH-PX activity increased significantly ($P<0.01$) compared with model group. The lung pathological manifestations also displayed obvious pathological improvement. **CONCLUSION** Curcumin has protective effect at the early phase of ALI. The mechanism may be the increase of lung tissue GSH-PX activity, inhibited activity of iNOS as well as the balance between reconstruction oxidative and anti-oxidant.

KEY WORDS: acute lung injury; curcumin; glutathione peroxidase; inducible nitric oxide synthase

急性肺损伤是以进行性加重的呼吸困难、发绀和顽固性低氧血症为主要临床表现的临床综合征, 其病理特征为肺部微血管通透性增高导致肺水肿及透明膜形成, 可伴发肺间质纤维化^[1-2]。目前认为, 当肺脏受到致病因素作用时, 释放大量的

氧自由基, 机体清除自由基能力下降, 导致肺脏局部强烈的氧化应激反应, 从而造成急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)。因此, 在 ALI 早期如何抑制过量自由基释放导致的炎症反应是研究者十分关心的问题。研究发现, 姜黄素(curcumin)具

作者简介: 雷素英, 女, 主任医师

Tel: (0373)3029830

E-mail: sylei2006@163.com

有抗炎、抗氧化、抗缺血和抗纤维化作用^[3-4]。本研究拟采用博莱霉素诱导小鼠急性肺损伤模型,探讨姜黄素在抗急性肺损伤方面的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 昆明小鼠 60 只, ♂, 体重(20±2)g, 由郑州大学医学院实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(豫)2005-0001。

1.1.2 药物与制剂 姜黄素(四川金郁金科技有限公司生产, 批号: 080302, 含量: 95.6%), 注射用盐酸博莱霉素(日本化药株式会社生产, 批号: 740140)。iNOS 试剂盒、GSH-PX 试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及给药方法 昆明小鼠 60 只, ♂, 用 10%乌拉坦(7.5 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉, 逐层分离并暴露气管, 其中 48 只小鼠, 气管内缓慢注入 0.1 mL 博莱霉素(5 mg·kg⁻¹)生理盐水溶液, 继续注入 0.1 mL 的空气, 12 只假手术组小鼠气管内注入等体积的生理盐水。注射后立即将动物直立并左右旋转, 使药液在肺内均匀分布。造模第 2 天后, 模型小鼠随即分为 4 组, 每组 12 只分别为模型组、姜黄素高、中、低剂量组。姜黄素高、中、低剂量组小鼠分别灌胃 200, 100, 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹姜黄素混悬液(姜黄素溶于二甲基亚砜配成的混悬液), 假手术组和模型组小鼠分别给予生理盐水与二甲基亚砜配成的溶液灌胃, 给药体积均为 0.014 L·kg⁻¹·d⁻¹。

1.2.2 取材方法 小鼠在造模第 3 天及第 7 天后分 2 次取材, 每次各组随机处死 6 只, 共 30 只。具体步骤: 小鼠腹腔注射 10%乌拉坦(7.5 mL·kg⁻¹)麻醉后固定, 快速开胸取肺组织, 冷生理盐水清洗后置于-20℃冰箱保存。

1.2.3 肺组织匀浆制备 取出所需肺组织, 放入冷生理盐水中漂洗除去浮血, 滤纸吸干后, 在冰浴上剪成碎块, 称取适量组织, 加入 9 倍量预冷

的生理盐水, 在冰浴中快速研磨制成 10%组织匀浆, 4℃离心 10 min, 离心半径为 10 cm, 转速为 3 000 r·min⁻¹, 取上清液进行测定。

1.2.4 肺组织病理学检查 将所取左肺组织用甲醛固定, 一周后石蜡包埋、切片, HE 染色, 染色后切片参照 Szapiel^[5]方法确定肺泡炎(0~+++级)的程度。具体如下: 肺泡炎分为 4 级: ①无肺泡炎: 0 分; ②轻度肺泡炎 1 分: 单核细胞浸润使肺泡隔增宽, 仅限于局部和近胸膜部, 面积小于全肺的 20%, 肺泡结构正常; ③中度肺泡炎 2 分: 受累面积占全肺的 20%~50%, 近胸膜部较重; ④重度肺泡炎 3 分: 面积大于 50%, 偶见肺泡腔内有单核细胞及出血造成的实变。光学显微镜下观察肺组织形态结构变化。

1.2.5 生化指标测定 按试剂盒说明书步骤进行。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 一般情况

假手术组小鼠, 活泼好动, 反应敏捷, 皮毛致密、整齐而有光泽, 生长、进食及活动情况良好, 体重逐渐增加, 呼吸节律平稳。造模组小鼠精神萎靡, 行动迟缓, 食欲不振, 皮毛蓬松, 营养不良, 枯槁无光泽, 第 3 天后呼吸明显急促, 肺哮鸣音明显。其中以模型组最为明显, 姜黄素中剂量组和高剂量组均不同程度好于模型组。

2.2 肺组织病理观察

假手术组在第 3 天和第 7 天时肺组织结构未见异常。模型组在第 3 天和第 7 天时肺组织广泛充血水肿, 肺泡间隔增宽, 其中第 7 天时肺组织仍呈损伤状态, 证明造模成功。姜黄素高、中、低剂量组也可见不同程度的肺组织损伤, 但均比模型组轻。第 7 天所取标本结果见图 1。各组小鼠肺组织病理变化的评分见表 1。

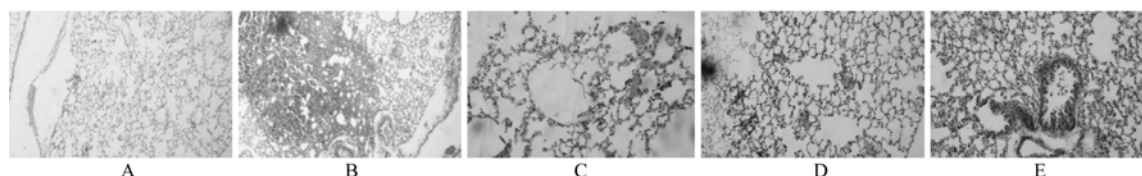


图 1 肺组织切片 HE 染色结果图(200×)

A-假手术组; B-模型组; C-姜黄素高剂量组; D-姜黄素中剂量组; E-姜黄素低剂量组

Fig 1 Results of the HE staining in lung tissue slides(200×)

A-sham group; B-model group; C-curcumin high dose group; D-curcumin middle dose group; E-curcumin low dose group

表 1 各组小鼠不同时间点肺泡炎症程度半定量结果

Tab 1 Semi-quantitative results of alveolitis degree in mice at different time points

分 组	3 天	7 天
假手术组	-	-
模型组	+++	++
姜黄素高剂量组	±	±
姜黄素中剂量组	±	-
姜黄素低剂量组	+	+

2.3 肺组织 GSH-PX 活性测定

与假手术组相比,第 3 天和第 7 天时模型组 GSH-PX 活性明显减少($P<0.01$),姜黄素中、高剂量组和模型组相比, GSH-PX 活性显著增加($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 姜黄素对博来霉素诱导的 ALL 小鼠肺组织中 GSH-Px 活性的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$, $U \cdot mg^{-1}$)

Tab 2 Effects of curcumin on GSH-Px activity of lung tissue in ALI mouse induced by bleomycin($n=6$, $\bar{x} \pm s$, $U \cdot mg^{-1}$)

组 别	第 3 天	第 7 天
假手术组	62.12 $\pm$ 1.24	68.49 $\pm$ 0.73
模型组	25.99 $\pm$ 1.58 ²⁾	30.44 $\pm$ 4.32 ²⁾
姜黄素高剂量组	40.60 $\pm$ 1.05 ^{1),4)}	41.52 $\pm$ 1.09 ^{1),4)}
姜黄素中剂量组	41.52 $\pm$ 0.51 ^{1),4)}	42.49 $\pm$ 1.39 ^{1),4)}
姜黄素低剂量组	29.42 $\pm$ 2.02 ^{2),3)}	31.15 $\pm$ 0.94 ²⁾

注:与假手术组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较,³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

2.4 肺组织 iNOS 活性测定

与假手术组相比,第 3 天和第 7 天时模型组 iNOS 活性明显增高($P<0.01$),姜黄素中、高剂量组和模型组相比, iNOS 活性下降显著($P<0.01$)。结果见表 3。

表 3 姜黄素对博来霉素诱导的 ALL 小鼠肺组织中 iNOS 活性的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$, $U \cdot mg^{-1}$)

Tab 3 Effect of curcumin on iNOS activity of lung tissue in ALI mouse induced by bleomycin($n=6$, $\bar{x} \pm s$, $U \cdot mg^{-1}$)

组别	第 3 天	第 7 天
假手术组	1.215 $\pm$ 0.05	1.23 $\pm$ 0.08
模型组	3.07 $\pm$ 0.17 ²⁾	3.21 $\pm$ 0.37 ²⁾
姜黄素高剂量组	1.83 $\pm$ 0.08 ^{1),4)}	1.79 $\pm$ 0.06 ^{1),4)}
姜黄素中剂量组	1.82 $\pm$ 0.08 ^{1),4)}	1.77 $\pm$ 0.07 ^{1),4)}
姜黄素低剂量组	2.09 $\pm$ 0.05 ^{1),3)}	2.23 $\pm$ 0.44 ^{1),3)}

注:与假手术组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较,³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

3 讨论

引起急性肺损伤的发病机制尚未完全阐明,目前治疗主要以对症支持治疗为主,对于损伤的肺组织,尚缺乏有效的治疗方法^[1]。多数学者认为肺损伤的发病机制是机体尤其是肺内部氧化、抗氧化平衡失调^[6-7]。氧自由基对人体有特殊意义,在正常情况下,机体内所产生的自由基可以参与有益于生命活动的某些环节,如杀灭微生物、清除衰老死亡的细胞和肿瘤细胞及调节炎症反应等。正常情况下肺可以维持氧化和抗氧化的平衡,但当肺脏受到致病因素攻击时,产生大量的氧自由基,机体清除自由基能力下降,导致肺脏局部强烈的氧化应激反应,从而造成 ALI。在寻求治疗 ALI 有效药物的研究中,增强机体的抗氧化能力,尤其是清除氧自由基的能力,已成为衡量疗效的标准之一。

姜黄素是具有脂溶性抗氧化作用的酚类化合物。一般的天然抗氧化剂只具有一个酚基团或者一个 β -二酮基团,而姜黄素的分子结构中同时具有酚和 β -二酮基团,因此,它具有更优越的抗氧化性,其作用主要表现在:消除活性自由基;消除过氧化物,如过氧化氢等;螯合金属离子^[8-9]。

GSH-PX 是氧自由基清除酶,是肺组织重要的抗氧化防御因子,它能够清除呼吸代谢过程中产生的大量过氧化物和羟自由基,从而减轻细胞膜多不饱和脂肪酸的脂质过氧化反应。而 iNOS 在某些病理条件下,生成大量氧自由基、硝基过氧化物,这些产物均可造成严重的细胞损伤,因而测试 iNOS 活性可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映体内自由基生成的情况。通过同时测定 GSH-PX 和 iNOS,可知 GSH-PX 的活性进而反映机体清除氧自由基的能力,而 iNOS 的活性又间接地反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。本研究结果显示博来霉素诱导的急性肺损伤小鼠体内的 GSH-PX 活性降低, iNOS 活性升高,产生过多的氧自由基,引发细胞和肺组织受到损伤,第 3 天和第 7 天时病理切片观察亦显示小鼠肺组织明显充血、水肿。应用姜黄素后 GSH-PX 活性显著升高, iNOS 活性下降明显,且病理切片观察小鼠第 3 天和第 7 天时肺组织病变减轻显著。第 7 天与第 3 天对比观察显示各项指标及病理观察肺组织损伤差异无统计学意义。

博来霉素诱导的肺纤维化模型早期表现为以

肺组织充血水肿和炎细胞浸润改变为主的急性肺损伤，后期炎症减轻并逐渐产生广泛的纤维化。本实验显示一定剂量姜黄素早期干预可明显减轻肺组织的充血水肿和炎症反应程度，维持机体氧化和抗氧化的平衡，改善肺损伤的预后。据此推断，对于急性肺损伤，一定剂量姜黄素早期干预对于延缓甚至阻止急性肺损伤后肺纤维化的发生和发展会起到一定的作用。其机制可能是通过升高肺组织的 GSH-PX 活性，降低 iNOS 的活性，降低脂质过氧化，清除体内过多的氧自由基从而重建机体氧化、抗氧化平衡有关。

REFERENCES

- [1] LU Z Y, ZHONG M S. Internal Medicine(内科学) [M]. 7th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 150-155.
- [2] MATUTE-BELLO G, MARTIN T R. Science review: apoptosis in acute lung injury [J]. Critical Care, 2003, 7(5): 355-358.
- [3] TANG C H . Plant functional foods (植物功能性食品) [M]. Beijing: chemical industry press, 2004: 382.
- [4] YU M M, WU W. A comparative study on the effect of curcumin and dexamethasone on paraquat-induced lung injury in rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care(中国中西医结合急救杂志), 2009, 16(5): 299-301.
- [5] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.
- [6] BECK-SCHIMMER B, SCHWENDENER R, PASCH T, et al. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury [J]. Respir Res, 2005, 6: 61.
- [7] RAGHAVENDRAN K, DAVIDSON B A, MULLAN B A, et al. Acid and particulate-induced aspiration lung injury in mice: importance of MCP-1 [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(1): 134-143.
- [8] ZHANG D W, WANG J F, NIU J Z, et al. Influence of compound Biejia Ruangan prescription on extracellular matrix in bleomycin induced pulmonary fibrosis rats [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, 29(1): 62-66.
- [9] ZHU R F, ZHOU M, HE J L. Protective effect of curcumin on oleic-induced acute lung injury in rats [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(17): 2141-2145.

收稿日期: 2011-08-19