

姜黄素对急性肺损伤小鼠炎症反应的改善作用

邵 奇¹, 王倩梅², 马善波³, 张 伟³, 郭 超^{3*}

(1. 铜川矿务局中心医院药剂科, 陕西 铜川 727000; 2. 空军军医大学西京医院急诊科, 陕西 西安 710032; 3. 空军军医大学西京医院药剂科, 陕西 西安 710032)

摘要: **目的** 考察姜黄素对急性肺损伤小鼠炎症反应的改善作用。**方法** 50 只小鼠随机分为对照组、急性肺损伤组、姜黄素干预组 (200 mg/kg)、TLR4 激动剂组和 TLR4 抑制剂组, 采用腹腔注射脂多糖 (5 mg/kg) 建立脓毒性休克致急性肺损伤小鼠模型。24 h 后, ELISA 检测血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 以及肺组织 TLR4、MyD88、NF- κ B 水平, HE 染色观察肺组织病理学形态, 并计算肺损伤评分。**结果** 与对照组比较, 急性肺损伤组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 肺组织 TLR4、MyD88、NF- κ B 表达, 肺组织病理学评分显著升高 ($P<0.01$); 与急性肺损伤组比较, 姜黄素干预组小鼠上述指标均显著降低 ($P<0.01$); 与姜黄素干预组比较, TLR4 激动剂组小鼠上述指标均显著升高 ($P<0.01$), 而 TLR4 抑制剂组则显著降低 ($P<0.01$)。**结论** 姜黄素可通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路来改善急性肺损伤小鼠炎症反应。

关键词: 姜黄素; 急性肺损伤; TLR4; MyD88; NF- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)10-2349-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.10.013

Effects of curcumin on inflammatory response of acute mouse lung injury

SHAO Qi¹, WANG Qian-mei², MA Shan-bo³, ZHANG Wei³, GUO Chao^{3*}

(1. Department of Pharmacy, Tongchuan Central Hospital of Mining Bureau, Tongchuang 727000, China; 2. Department of Emergency, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of curcumin on inflammatory response of acute mouse lung injury. **METHODS** Fifty mice were randomly divided into control group, acute lung injury group, curcumin intervention group (200 mg/kg), TLR4 agonist group and TLR4 inhibitor group. And septic shock mouse models of acute lung injury were induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (5 mg/kg). 24 h after the corresponding treatment, the serum levels of inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, as well as lung tissue TLR4, MyD88, NF- κ B detection of the mice were tested by ELISA, the histopathological morphology of the lung was observed and the lung injury score was calculated as well by HE staining. **RESULTS** Compared with the control group, the acute lung injury group displayed obviously higher levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum, and TLR4, MyD88, NF- κ B, and significantly increased pathological damage score in the lung ($P<0.01$). Compared with the acute lung injury group, the curcumin intervention group were observed with significantly lower levels of the aforementioned indices ($P<0.01$). Yet in contrast to the curcumin intervention group, the TLR4 agonist group shared significant increase in these levels ($P<0.01$), while the TLR4 inhibitor group behaved differently ($P<0.01$). **CONCLUSION** Curcumin can attenuate inflammatory response of acute mouse lung injury via TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway.

KEY WORDS: curcumin; acute lung injury; TLR4; MyD88; NF- κ B

收稿日期: 2019-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403134)

作者简介: 邵 奇 (1987—), 男, 硕士, 主管药师, 从事中药药理研究。Tel: (0919) 2102340, E-mail: 258648933@qq.com

* 通信作者: 郭 超 (1985—), 男, 博士, 主管药师, 从事中药药效物质筛选研究。Tel: 13468828775, E-mail: xysn@163.com

急性肺损伤是由多种病因引起的，以急性进行性呼吸窘迫、顽固性低氧血症等为主要表现的临床常见急危重症，病死率可高达 30%~40%^[1-2]，寻找可靠有效的新型治疗靶点仍然是目前亟待解决的关键问题之一。近年来众多学者^[3-5]研究发现，从姜黄中提取的多酚类活性成分姜黄素除可用于百草枯中毒、糖尿病、癌症、帕金森等治疗外，还可发挥良好的抗急性肺损伤作用，其作用机制与关键分子靶点可能与 THF-β1/SMAD、Akt/Erk、MAPK/NF-κB 等多条信号通路相关^[6]。本研究通过构建小鼠急性肺损伤动物模型，观察 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路在姜黄素改善炎症反应中的作用。

1 材料

1.1 动物 健康成年 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 50 只，体质量 14~26 g，购于空军军医大学西京医院动物实验中心，动物生产许可证号 SCXK（陕）2014-0013。实验前，在温度（22±1）℃、相对湿度 45%~75%、光照周期 12/12 h 环境中适应性饲养 1 周。

1.2 试药 姜黄素购自四川成都德锐可生物科技有限公司（CAS#458-37-7，含有量>99.8%）。LPS 购自美国 Sigma 公司（L2880）；TLR4 激动剂（牙齦卟啉单胞菌内毒素，LPS-PG）购自上海康朗生物科技有限公司（货号 tlr1-ppglps）；TLR4 抑制剂（瑞沙托维，TAK-242）购自杭州联科生物技术股份有限公司（货号 2A-13871-5）；TNF-α、IL-1β 和 IL-6 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所；Toll 样受体 4（TLR4）、髓样分化因子 88（MyD88）和核因子-κB（NF-κB）ELISA 试剂盒均购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器 包埋机购自上海名元实业有限公司（型号 JB-P5）；病理切片机购自上海涵飞医疗器械有限公司（型号 RM-2016）；电子显微镜购自日本奥林巴斯公司（型号 BX50）。

2 方法

2.1 分组与造模 小鼠称重麻醉后固定于实验台，

备皮分离气管和右侧颈总动脉，行气管插管保持呼吸，颈总动脉插管监测血压，并备用采血通道。急性肺损伤组以 5 mg/kg 剂量腹腔注射脂多糖（LPS）建立模型^[7]。50 只小鼠随机分为对照组、急性肺损伤组、姜黄素干预组、TLR4 激动剂组、TLR4 抑制剂组，对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水，姜黄素干预组在给予 5 mg/kg LPS 前 30 min 腹腔注射姜黄素 200 mg/kg，TLR4 激动剂组和 TLR4 抑制剂组分别以 3 mg/kg LPS-PG 和 TAK-242 在 200 mg/kg 姜黄素给予前 10 min 腹腔注射^[8]。

2.2 肺组织病理形态观察 快速打开小鼠胸腔，取出肺组织，冰上取左肺，用冰生理盐水冲洗，取其下方 1/3 肺组织用于 HE 染色及肺组织病理学评分，每组选 6 张，每张选 4 个视野（×400），计数受损肺泡（肺泡腔 RBC 或 WBC>2 个）占肺泡总数的百分比，即肺损伤组织学定量评价指标（IQA）^[1,9]，其余肺组织-80℃下保存备用。

2.3 ELISA 检测 腹腔注射 LPS 或生理盐水 24 h 后，经颈总动脉插管取血，4℃、3 000 r/min 离心 15 min 后，吸取上清，依据 ELISA 试剂盒说明书，分别测定血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平，以及肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB 水平。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理，计量资料均以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。多组间比较采用单因素方差分析，2 组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平 如表 1 所示，与对照组比较，急性肺损伤组小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著升高（*P*<0.01）；与急性肺损伤组比较，姜黄素干预组小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著降低（*P*<0.01）；与姜黄素干预组比较，TLR4 激动剂组小鼠血清三者水平显著升高（*P*<0.01），TLR4 抑制剂组小鼠血清三者水平显著降低（*P*<0.01）。

表 1 各组血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平比较（ $\bar{x}\pm s$ ，*n*=10）

Tab. 1 Comparison of serum TNF-α, IL-1β and IL-6 levels among various groups ($\bar{x}\pm s$, <i>n</i> =10)			
组别	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照组	174.20±6.60	35.50±5.94	126.30±5.57
急性肺损伤组	512.60±6.40**	166.50±6.51**	264.70±6.71**
姜黄素干预组	204.30±7.08##	81.07±5.00##	186.50±6.10##
TLR4 激动剂组	532.20±7.20&&	208.20±5.46&&	304.20±6.48&&
TLR4 抑制剂组	184.20±6.77&&	48.04±5.37&&	140.70±4.98&&

注:与对照组比较,***P*<0.01;与急性肺损伤组比较,##*P*<0.01;与姜黄素干预组比较,&&*P*<0.01

3.2 肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB 水平 如表 2 所示,与对照组比较,急性肺损伤组小鼠肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB 水平显著升高 ($P<0.01$);与急性肺损伤组比较,姜黄素干预组小鼠肺组织三

者水平显著降低 ($P<0.01$);与姜黄素干预组相比,TLR4 激动剂组小鼠肺组织三者水平显著升高 ($P<0.01$),TLR4 抑制剂组小鼠肺组织三者水平显著降低 ($P<0.01$)。

表 2 各组肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	TLR4/(ng·mg ⁻¹)	MyD88/(ng·mg ⁻¹)	NF-κB/(ng·mg ⁻¹)
对照组	6.92±1.12	31.20±3.16	156.00±5.54
急性肺损伤组	37.45±3.45**	124.70±5.40**	236.00±6.80**
姜黄素干预组	18.01±2.16##	66.70±4.12##	192.80±6.73##
TLR4 激动剂组	25.24±2.17&&	98.18±4.48&&	337.40±5.37&&
TLR4 抑制剂组	10.24±1.21&&	41.48±3.44&&	167.10±4.79&&

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与急性肺损伤组比较,## $P<0.01$;与姜黄素干预组比较,&& $P<0.01$ 。

3.3 肺组织病理学变化及评分 光镜下可见对照组小鼠肺泡结构比较完整,肺泡壁薄,肺泡腔轮廓清晰;急性肺损伤组小鼠肺泡结构破坏、塌陷甚至消失,肺泡隔明显增宽且肺泡隔内有大量炎性细胞浸润;姜黄素干预组小鼠部分肺泡腔融合消失,部

分肺泡腔可见出血、渗出及少量炎性细胞浸润;TLR4 激动剂组小鼠肺泡扩张融合、炎性细胞渗出较严重;TLR4 抑制剂组小鼠肺泡结构相对比较完整,肺泡壁较薄,肺泡腔轮廓较清晰,炎性细胞渗出和炎症浸润则较轻。见图 1。

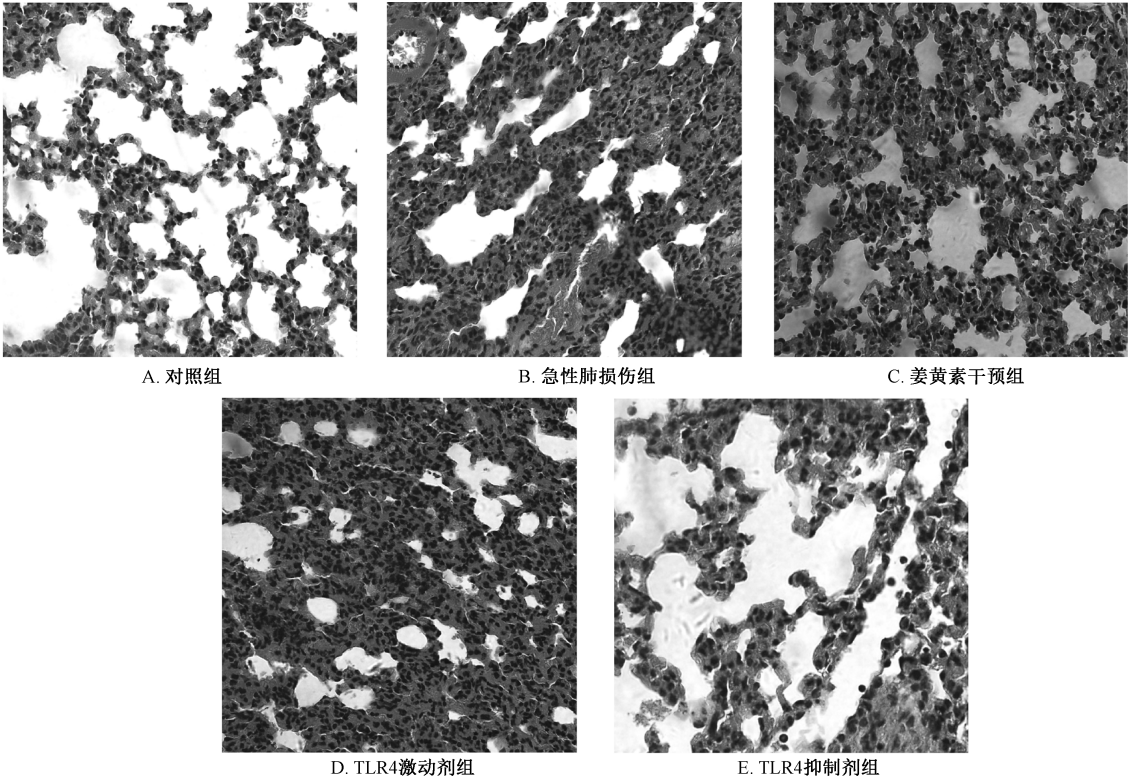


图 1 各组小鼠肺组织病理形态 (HE, ×400)

Fig. 1 Pathological morphologies of mouse lung tissues in various groups (HE, ×400)

与对照组比较,急性肺损伤组小鼠肺组织病理学评分显著升高 ($P<0.01$);与急性肺损伤组比较,姜黄素干预组评分显著降低 ($P<0.01$);与姜黄素干预组比较,TLR4 激动剂组评分显著升高 ($P<0.01$),TLR4 抑制剂组评分明显降低 ($P<0.01$)。见表 3。

4 讨论

急性肺损伤是现代危重病医学的重大难题,主要表现为急性呼吸困难和顽固性低氧血症^[10],其最突出的特点是因过度炎症反应引起弥漫性肺泡毛细血管膜损伤,导致肺水肿、肺不张、毛细血管通透性增加以及肺部气体交换障碍。脓毒症是临床急

表 3 各组肺组织病理学评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab.3 Comparison of pathological scores in lung tissues among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	IQA/%
对照组	0
急性肺损伤组	34.0±3.1**
姜黄素干预组	19.7±2.5##
TLR4 激动剂组	58.7±2.2&&
TLR4 抑制剂组	10.2±1.8&&

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与急性肺损伤组比较,## $P<0.01$;与姜黄素干预组比较,&& $P<0.01$.

性肺损伤最常见的病因之一,因此本研究采用常用的腹腔注射 LPS 方法建立内毒素血症导致急性肺损伤的小鼠模型,模拟临床急性肺损伤的发生,并同时观察 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路在姜黄素改善急性肺损伤小鼠炎症反应中的作用机制。

TNF- α 是机体介导炎症反应的关键细胞因子,也是急性肺损伤炎症反应的一个较为客观的指标^[11],释放后可迅速激活肺组织中性粒细胞、肺泡巨噬细胞、内皮细胞和血小板等,进而诱导其他炎症因子的产生和释放,发挥“级联放大”的作用,不断加重肺组织损伤^[12-13]。在整个炎症反应中,TNF- α 是始动因素,IL-1 β 起协同作用^[14-15],后者虽不能直接活化炎性白细胞,但可刺激其他炎性因子(如 IL-6、IL-8 等)的分泌,促进炎症反应发展^[16]。

Toll 样受体家族是一类天然免疫受体,广泛分布于机体淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞,可通过识别病原微生物表面的配体-病原体相关分子模式(如 G⁻菌的 LPS),通过一系列信号通路介导炎症介质释放,在天然免疫防御中发挥重要作用^[17-18]。TLR4 是目前 Toll 样受体研究中最多种的一种,也是靶细胞上 LPS 引发炎症反应的主要配体,在内毒素性急性肺损伤的发生发展中发挥重要作用。LPS 可激活 TLR4 通路,然后通过髓样分化蛋白 88(MyD88)依赖性途径介导多种炎性信号转导,参与炎症反应,以诱导下游的 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶的早期相活化为特征,主要介导炎性细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)产生^[19-20]。

本研究发现,LPS 致急性肺损伤小鼠血清炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高,肺组织病理损伤明显增加、肺组织病理学评分升高;姜黄素干预可显著降低急性肺损伤小鼠炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等)水平,减轻肺组织病理损伤,降低肺组织病理学评分。本研究还证实,急

性肺损伤小鼠肺组织 TLR4、MyD88、NF- κ B 水平均明显升高,而姜黄素可显著降低三者水平,这与炎性细胞和炎症因子的表达变化趋势基本一致,提示姜黄素可能通过抑制 TLR4 受体的表达,序贯影响 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路,抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 释放,从而显著改善 LPS 导致的小鼠急性肺损伤。

综上所述,本实验为急性肺损伤的预防提供了理论和实验依据,姜黄素有望成为相关新型药物。然而,本研究观察指标有限,姜黄素在生物体内的稳定性、利用率、毒副作用如何,以及能否在临床展开试验尚不明确,有待将来进一步研究。

参考文献:

[1] 秦文瀚. 硫化氢对 LPS 致小鼠急性肺损伤的保护及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2017.

[2] 秦 丽, 李 敏, 王毓国, 等. 益气活血中药对急性肺损伤大鼠炎症因子及 Toll 样受体 4 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 114-119.

[3] 李 波, 唐思嘉, 刘可可, 等. 姜黄素治疗急性肺损伤效果和机制的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(6): 1312-1316.

[4] Gouda M M, Prabhu Ashwini, Bhandary Y P. Curcumin alleviates IL-17A-mediated p53-PAI-1 expression in bleomycin-induced alveolar basal epithelial cells[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(2): 2222-2230.

[5] Cheng K, Yang A, Hu X, et al. Curcumin attenuates pulmonary inflammation in lipopolysaccharide induced acute lung injury in neonatal rat model by activating peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) pathway[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 1178-1184.

[6] Kim J, Jeong S W, Quan H, et al. Effect of curcumin (Curcuma longa extract) on LPS-induced acute lung injury is mediated by the activation of AMPK[J]. J Anesth, 2016, 30(1): 100-108.

[7] 刘 畅, 荆 科. Toll 样受体阻断剂对内毒素血症小鼠肠黏膜损伤的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2018, 20(2): 158-163.

[8] Kajiwar K, Takata S, To T T, et al. The promotion of nephropathy by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide via toll-like receptors[J]. Diabetol Metab Syndr, 2017, 9: 73.

[9] Kolluru G K, Shen X, Bir S C, et al. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection[J]. Nitric Oxide, 2013, 35: 5-20.

[10] 宋丽娟, 朱 煜, 金 鸣. 羟基红花黄色素 A 抑制脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠炎症因子表达的研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2016, 15(6): 577-582.

[11] 朱 丹, 何亚荣, 姚 蓉, 等. 他克莫司(FK506)减轻百草枯中毒大鼠急性肺损伤炎症反应的疗效分析[J]. 临床急诊杂志, 2017, 18(3): 170-174.

[12] 杨文萍, 孔冰冰, 赵欣, 等. 辛伐他汀对脓毒症小鼠肺损伤的保护作用[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(7): 733-736.

[13] Silvestre M C, Reis V M S D. Evaluation of the profile of inflammatory cytokines, through immunohistochemistry, in the skin of patients with allergic contact dermatitis to nickel in the acute and chronic phases[J]. *An Bras Dermatol*, 2018, 93(6): 829-835.

[14] Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation[J]. *Hamostaseologie*, 2010, 30(1): 10-12; 14-16.

[15] 章小山. 常山酮通过 CD14 /NF- κ B 通路调控 LPS 诱导的大鼠急性肺损伤免疫系统紊乱[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(6): 861-865.

[16] Monmai C, Go S H, Shin I S, *et al*. Immune-enhancement effect of *Asterias amurensis* fatty acids through NF- κ B and MAPK pathways on RAW 264. 7 Cells[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 28(3): 349-356.

[17] 刘辉, 刘宇飞, 李向东, 等. Toll 样受体 4 抑制剂 C34 灌服对大鼠脓毒症急性肺损伤的治疗作用及其机制探讨[J]. 山东医药, 2016, 56(23): 44-46.

[18] Kong D L, Wang Z F, Tian J. Glycyrrhizin inactivates toll-like receptor (TLR) signaling pathway to reduce lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting TLR2 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4597-4607.

[19] 刘伟, 董雪松, 刘晓伟, 等. Toll 样受体 4 在百草枯中毒急性肺损伤中的作用[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(1): 7-10; 16.

[20] 丁岗强, 康谊, 刘俊平, 等. 甘草甜素对脓毒症小鼠急性肺损伤保护作用的实验研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(19): 4742-4744.

强心颗粒对心气虚兼血瘀水肿证心衰大鼠心肌细胞线粒体凋亡的影响

肖军¹, 部帅², 李珩³, 周杰², 吕林懋⁴, 林家茂^{1*}
(1. 山东省肿瘤防治研究院内科五病区, 山东 济南 250117; 2. 山东中医药大学第二附属医院心血管科, 山东 济南 250001; 3. 淄博市中心医院中医科, 山东 淄博 255020; 4. 山东大学齐鲁医院急诊科, 山东 济南 250012)

摘要: **目的** 探索强心颗粒对慢性心力衰竭心气虚兼血瘀水肿证大鼠心肌细胞线粒体凋亡的影响。**方法** 50 只大鼠随机分为正常组、模型组、缬沙坦组 (13.35 mg/kg)、强心颗粒组 (9.26 g/kg), 采用阿霉素联合丙基硫氧嘧啶双重因子攻击技术建立大鼠模型。灌胃给药 4 周后, 检测大鼠的心肌细胞线粒体超微结构、线粒体跨膜电位、心肌组织 ATP 水平, Western blot 法检测 Cyto-C、Cleaved-caspase-3、Cleaved-caspase-9、Bcl-2、Bax 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 强心颗粒组大鼠心肌细胞线粒体超微结构改善, 线粒体跨膜电位下降心肌细胞比例显著减少 ($P<0.01$), 心肌组织 ATP 水平显著增加 ($P<0.01$), Cyto-C、Cleaved-caspase-3、Cleaved-caspase-9 蛋白表达显著减低 ($P<0.01$), Bcl-2/Bax 比率显著升高 ($P<0.01$), 且显著优于缬沙坦组 ($P<0.01$)。**结论** 强心颗粒可通过调控线粒体凋亡通路来改善慢性心力衰竭心气虚兼血瘀水肿证大鼠的心功能及预后。

关键词: 强心颗粒; 慢性心力衰竭; 心气虚兼血瘀水肿证心衰大鼠模型; 线粒体凋亡通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)10-2353-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.10.014

Effects of Qiangxin Granules on mitochondrial apoptosis of myocardial cells in rats with heart failure of patterns of Heart-Qi Deficiency Blood Stasis and Edema

收稿日期: 2018-08-10
基金项目: 山东省自然科学基金重点项目 (ZR2009CZ007); 山东省自然科学基金中青年科学家奖励基金 (ZR2016HB01, ZR2016HB60); 山东省中医药科技发展计划项目任务书 (2017-176)
作者简介: 肖军(1970—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事中医药治疗心脏、肿瘤疾病研究。Tel: 13964039996, E-mail: xiaojun166my@163.com
***通信作者:** 林家茂(1986—), 男, 博士, 主治医师, 从事中医药治疗心脏、肿瘤疾病研究。Tel: 18615538892, E-mail: linjiamao_@126.com