

【基础研究】

曾松柏¹, 张 梅¹, 董化江², 李东霞¹, 单云官²

摘要: **目的** 探讨姜黄素对急性心肌梗死大鼠冠状动脉血管内皮生长因子(VEGF)和心肌组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。**方法** 将36只Sprague Dawley大鼠随机分为对照组、模型组和姜黄素治疗组,每组12只。模型组和姜黄素治疗组大鼠使用缝扎线结扎冠状动脉前降支制备心肌梗死模型,对照组大鼠冠状动脉前降支下穿线不结扎。各组大鼠均于术前6d进行灌胃,其中对照组、模型组大鼠于术前6d给予生理盐水灌胃,每次4 mL,每日1次;姜黄素治疗组大鼠将姜黄素按 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 溶于4 mL体积分数6%的乙醇聚乙二醇400中进行灌胃,每日1次,连续5 d;于术后第6天处死大鼠并取结扎线以下的冠状动脉和心肌组织,反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测各组大鼠心肌组织中TNF- α mRNA表达水平,Western blot检测各组大鼠心肌组织中TNF- α 蛋白表达水平,免疫组织化学法检测冠状动脉VEGF表达水平。**结果** 模型组大鼠心肌组织中TNF- α mRNA和TNF- α 蛋白表达水平均显著高于对照组($P<0.05$);姜黄素治疗组大鼠心肌组织中TNF- α mRNA和TNF- α 蛋白表达水平与模型组比较均显著降低($P<0.05$),而与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组和姜黄素治疗组大鼠结扎线以下冠状动脉组织中VEGF表达水平较对照组显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);姜黄素治疗组大鼠结扎线以下冠状动脉组织中VEGF表达水平较模型组明显升高($P<0.01$)。**结论** 姜黄素可有效降低急性心肌梗死大鼠缺血损伤区域心肌组织中TNF- α 的表达,并有效提高结扎线以下冠状动脉VEGF的表达,对受损心肌功能的恢复及维持冠状动脉血管内皮功能稳定和血管再生具有积极意义。

中图分类号: R541.4 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2016)10-0852-04

ZENG Song-bai¹, ZHANG Mei¹, DONG Hua-jiang², LI Dong-xia¹, SHAN Yun-guan²

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Logistics University of CAPF, Tianjin 300162, China; 2. Department of Anatomy and Histology and Embryology, Logistics University of CAPF, the Key Laboratory of the Corrosion Protection and Mortal Remains of Tianjin, Tianjin 300162, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of curcumin on vascular endothelial growth factor(VEGF) of coronary artery and tumor necrosis factor- α (TNF- α) of myocardium tissue in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Thirty-six Sprague Dawley rats were randomly divided into control group,model group and curcumin treatment group,12 rats in each group. All the rats were given intragastric administration at six days before operation. The rats in control group and model group were given intragastric administration with 4 mL normal saline at six days before operation for five days,once a day. Curcumin was dissolved in 4 mL 6% ethanol polyethylene glycol 400,then the rats in curcumin treatment group were given intragastric administration with the curcumin once a day for five days. All the rats were sacrificed at six days after operation to obtain the coronary artery and myocardium tissue under the ligature. TNF- α mRNA in myocardium tissue was detected by reverse transcription polymerase chain reaction and TNF- α protein in myocardium tissue was detected by Western blot. The change of VEGF in coronary artery was detected by immunohistochemistry method. **Results** The expression levels of TNF- α mRNA and TNF- α protein in model group were higher than those in control group($P < 0.05$);while they were lower in curcumin treatment group than those in model group($P < 0.05$);but there was no significance difference between curcumin treatment group and

收稿日期:2015-10-27

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(编号:16JCZDJC31900)。

作者简介:曾松柏(1983-),男,湖南岳阳人,硕士研究生在读,住院医师,主要从事冠状动脉粥样硬化性心脏病及介入治疗的临床研究。

通信作者:张 梅(1967-),女,天津人,博士,主任医师,主要从事冠状动脉粥样硬化性心脏病基础及临床介入治疗研究;E-mail:chyoyouyou@126.com。

control group($P>0.05$). The VEGF level in coronary artery in curcumin group and model group was higher than that in control group($P<0.05$, $P<0.01$); while the VEGF level in coronary artery in curcumin group was higher than that in model group($P<0.01$). **Conclusion** Curcumin can effectively decrease the expression of TNF- α in ischemic myocardium, and promote the expression of VEGF in coronary artery of rats with acute myocardial infarction, which could promote vessel revascularization and keep the function of endothelia of coronary artery.

Key words: curcumin; vascular endothelial growth factor; rat; tumor necrosis factor- α ; acute myocardial infarction

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 较为公认的治疗方法是药物溶栓、介入等, 以实现堵塞的血管再通^[1], 使心肌的血流恢复灌注, 缩小梗死心肌面积, 挽救濒死心肌, 改善患者心功能及预后, 提高生存率^[2-3]。姜黄素是从姜黄中提取的酚类物质, 具有抗氧化、抗缺血、抗炎、清除自由基等作用^[4-7], 由于其不良反应小而被广泛应用于心血管疾病的治疗和预防。本研究利用大鼠 AMI 模型探讨姜黄素对急性梗死心肌的保护作用, 旨在为心肌梗死的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物分组 无特定病原级雄性 Sprague Dawley 大鼠 36 只, 体质量(250 ± 10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK(京) 2012-0001。实验大鼠于动物室内分笼喂养, 室内温度为 (20 ± 3) $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 (50 ± 20) %, 每日光照 12 h, 并提供 50 g 全营养鼠粮及足量清洁饮水。实验大鼠按随机数字表法分为对照组、AMI 模型组和姜黄素治疗组, 每组 12 只。

1.2 主要试剂与仪器 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抗体 (上海恪敏生物科技有限公司), 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体 (上海瑞齐生物科技有限公司), TRIzol 试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (武汉博士德生物工程有限公司), 超净工作台 (中国苏净集团安泰公司), eclip-se E400 型荧光显微镜 (日本 Nikon 公司), Olympus CX6 光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 组织切片机、RM2015 石蜡切片机 (德国 Leica 公司), Sigma3K18 型台式离心机 (德国 Sigma 公司), 多功能真彩色细胞图像分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司), 二氨基联苯胺显色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 AMI 大鼠模型的制备与取材 3 组大鼠均于术前 6 d 进行灌胃, 其中对照组、模型组大鼠每次给予生理盐水 4 mL, 姜黄素治疗组将姜黄素按 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 溶于 4 mL 体积分数 6% 的乙醇聚乙二醇 400 中进行灌胃, 均连续灌胃 5 d。大鼠采用

$60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于手术台上。模型组、姜黄素治疗组大鼠采用正中切口开胸, 剪断第 5~6 根肋骨, 扩张切口, 顺势将心脏挤出胸腔, 用缝合线将冠状动脉前降支结扎阻断血流造成梗死模型, 然后扩张切口顺势回纳心脏入胸腔, 缝合胸部切口, 动作轻柔、迅速, 勿损伤肺脏, 以免造成人为性气胸。对照组大鼠开胸, 心脏冠状动脉前降支下穿线不结扎, 其余操作同模型组和姜黄素治疗组。模型组和姜黄素治疗组大鼠心电图 ST 段抬高, 证实模型制备成功。术后第 6 天脱臼处死大鼠, 留取结扎线以下冠状动脉和心尖部心肌组织, 迅速置于液氮, 结扎线以下心肌组织进行反转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 及 Western blot 实验, 观察 TNF- α 表达变化; 结扎线以下冠状动脉前降支用于免疫组织化学检测 VEGF 表达。本实验大鼠的处理符合伦理学要求。

1.4 RT-PCR 检测各组大鼠心肌组织中 TNF- α mRNA 表达水平 应用 TRIzol 试剂提取结扎线以下心肌组织总 RNA, 根据试剂盒说明反转录合成 cDNA。TNF- α 上游引物序列: 5'-CCCAATCTGTGTCCT-TCTAACT-3', 下游引物序列: 5'-CAGCGTCTCGTGT-GTTTCT-3', 目的基因长度为 105 bp。反应条件: 94°C 预变性 3 min, 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 29 个循环, 72°C 再延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 采用快速凝胶成像系统拍摄电泳图谱条带, 利用图像分析软件分析条带灰度值。以各实验组目的基因相对于 β -actin 的灰度值与生理盐水再做相对比值, 表示各组目的基因的相对表达变化程度。实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测各组大鼠心肌组织中 TNF- α 蛋白表达水平 取结扎线以下心肌组织 100 mg, 加入 1 mL 细胞裂解液与蛋白磷酸酶的混合物 (99:1) 液氮研磨, 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 上清液即为总蛋白。取部分上清液加入聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液混匀, 沸水浴 5 min, 冰上冷却, 蛋白变性, -20°C 保存。以聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 采用湿转法转移至聚偏二氟乙烯膜上, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂牛奶封闭 1 h, 加一抗 (TNF- α 多克隆抗体), 4°C 过夜。三羟甲基氨基甲烷缓冲液冲洗后, 分别与辣根过氧化物酶标记的山

羊抗兔/小鼠 IgG 抗血清(1:12 000)室温震荡孵育 2 h,暗室内 X 线片曝光显影,扫描仪扫描底片,分析目的条带的灰度值。以目的条带与 GAPDH 灰度值之比作为目的基因蛋白的表达。各实验组目的蛋白条带相对于 GAPDH 条带的灰度值与生理盐水对照组再做相对比值,表示各组 TNF- α 蛋白的相对表达变化程度,实验重复 3 次。

1.5 免疫组织化学检测冠状动脉 VEGF 表达水平

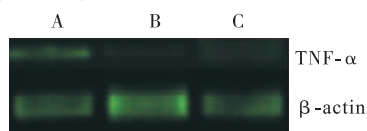
取各组大鼠结扎线以下冠状动脉,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solation,PBS)冲洗,40 g · L⁻¹多聚甲醛进行固定,包埋组织块,切片厚度 5 μ m,脱蜡,入水,将切片浸于二甲苯中 5 min × 2 次、体积分数 100% 乙醇 5 min × 2 次、体积分数 95% 乙醇 5 min × 2 次、体积分数 90% 乙醇 5 min × 2 次、体积分数 85% 乙醇 5 min × 2 次、体积分数 75% 乙醇 5 min × 2 次,自来水冲洗,PBS 洗 2 次;体积分数 1% 甲醇过氧化氢溶液室温浸泡 10 min,蒸馏水洗 1 次,以消除内源性过氧化物酶的活性,PBS 洗 3 次,每次 5 min;将切片放入 0.01 mol · L⁻¹柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中,在微波炉内微波辐射 10 min;待修复液降至室温后,PBS 洗 3 次,每次 5 min;切片上滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min。滴加一抗(多克隆 VEGF)4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加生物素化二抗(IgG),37 $^{\circ}$ C 20 min,PBS 洗 5 min × 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C 20 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;用二氨基联苯胺显色试剂盒显色,显色 6 min 后,充分水洗;苏木精复染细胞核 1 min,充分水洗,体积分数 1% 盐酸乙醇分化,体积分数 1% 氨水反蓝,充分水洗,经体积分数 70% 乙醇 5 min、体积分数 80% 乙醇 5 min、体积分数 90% 乙醇 5 min × 2 次、体积分数 95% 乙醇 5 min × 2 次、体积分数 100% 乙醇 5 min × 2 次脱水,二甲苯透明 5 min × 2 次,中性树脂封片,选择 3 组阳性和阴性组织相,进行 100 倍和 400 倍的显微照相,选择有意义的组织相,经登录、编号、采集、分析、读取数据、最后存盘,显微照相。根据阳性细胞在全部组织细胞中所占比例及阳性细胞染色强度判定实验结果:(1)按显色细胞数记分(A):阳性细胞数 < 1/3 为 1 分,阳性细胞数 1/3 ~ 2/3 为 2 分,阳性细胞数 \geq 2/3 为 3 分;(2)按细胞显色深浅记分(B):无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。积分数 = A × B。A × B = 0 为(-),A × B = 1 ~ 2 为(+),A × B = 3 ~ 4 为(++),A × B = 6 ~ 9 为(+++)。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠心肌组织中 TNF- α mRNA 表达水平比较

对照组、模型组和姜黄素治疗组大鼠心肌组织中 TNF- α mRNA 相对表达量分别为 0.18 ± 0.05、0.41 ± 0.09、0.27 ± 0.05;模型组大鼠心肌组织中 TNF- α mRNA 表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);姜黄素治疗组大鼠心肌组织中 TNF- α mRNA 表达水平与模型组比较显著降低(*P* < 0.05),而与对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)(图 1)。



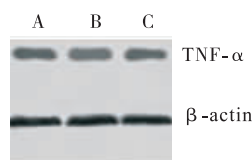
A:模型组;B:对照组;C:姜黄素治疗组。

图 1 各组大鼠心肌组织 TNF- α mRNA 表达

Fig.1 Expression of TNF- α mRNA in myocardium tissue in all the groups

2.2 3 组大鼠心肌组织中 TNF- α 蛋白表达水平比较

对照组、模型组和姜黄素治疗组大鼠心肌组织中 TNF- α 蛋白相对表达量分别为 0.16 ± 0.03、0.37 ± 0.019、0.22 ± 0.06。模型组大鼠心肌组织中 TNF- α 蛋白表达水平较对照组显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);姜黄素治疗组大鼠心肌组织中 TNF- α 蛋白表达水平较模型组明显降低(*P* < 0.05),而与对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)(图 2)。



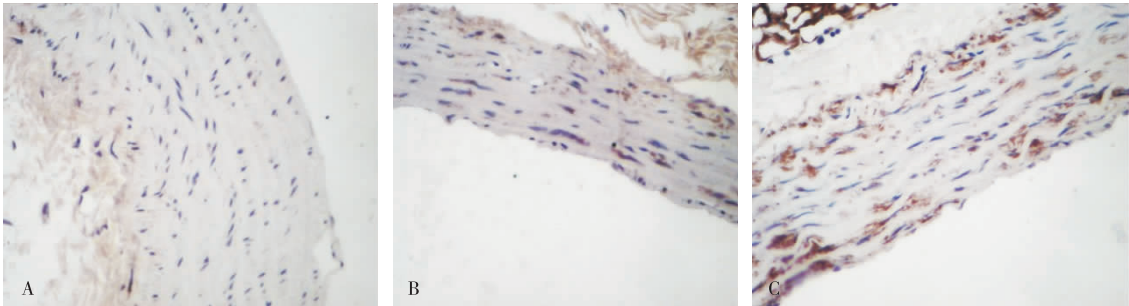
A:模型组;B:对照组;C:姜黄素治疗组。

图 2 各组大鼠心肌组织 TNF- α 蛋白表达情况

Fig.2 Expression of TNF- α protein in myocardium tissue in all groups

2.3 3 组大鼠冠状动脉 VEGF 免疫组织化学检测结果比较

结果见图 3。对照组、模型组和姜黄素治疗组大鼠每个视野阳性细胞百分比分别为 (13.90 ± 3.01)%、(21.56 ± 3.72)%、(47.00 ± 6.12)%。模型组和姜黄素治疗组大鼠结扎线以下冠状动脉组织中 VEGF 表达水平与对照组相比显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05,*P* < 0.01);姜黄素治疗组结扎线以下冠状动脉组织中 VEGF 表达水平较模型组明显升高,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。



A:对照组;B:模型组;C:姜黄素治疗组。

图 3 各组大鼠冠状动脉 VEGF 表达(免疫组织化学, ×400)

Fig.3 Expression of VEGF in coronary artery in all groups(immunohistochemistry, ×400)

3 讨论

心血管疾病严重威胁着人类健康,近年来发病率有升高趋势。临床上多采用恢复血流再灌注的方法治疗 AMI,然而,缺血再灌注损伤、再梗死、恶性心律失常等使治疗效果大打折扣。因此,寻找一种新的行之有效的治疗方法是当前医疗界亟须解决的问题^[1-3]。

姜黄素是从姜科植物姜黄中提取的一种色素,其可有效抑制炎症反应,具有抗氧化、清除体内自由基、对抗缺血缺氧等功效^[6-9],其抗氧化、抗炎、抗凝、降脂、抗动脉粥样硬化、抗衰老、清除自由基及抑制肿瘤生长等作用已得到证实^[4-7]。

TNF 包括 TNF-α 和 TNF-β, TNF-α 来源于单核巨噬细胞, TNF-β 由活化 T 细胞产生,是具有重要生物活性的炎性细胞因子。TNF-α 对炎症的发生发展及炎症的放大效应起着重要作用^[3]。通常认为,血管新生有血管生成和血管形成 2 种方式,血管生成是指通过血管内皮细胞迁移、增殖,在原有的血管上以出芽的方式生长出新的血管;血管形成是指在原来无血管系统的情况下,通过 VEGF 的作用促进血管的新生和生成,是重建血供的重要途径之一^[8-9]。本研究显示,给予姜黄素干预后,可有效上调梗死冠状动脉中 VEGF 的表达,并能下调梗死区心肌中炎症因子 TNF-α 的表达,可认为在一定程度上实现了对梗死区附近心肌的有效保护,有效地抑制了炎症反应的进程,对受损心肌的功能恢复有积极意义;与此同时,VEGF 有效高表达对血供重建亦起到了积极作用,对受损心肌的营养供应提供了有效的支持。

本研究对 AMI 大鼠应用中药姜黄素进行干预,结果显示,姜黄素可有效上调冠状动脉 VEGF 表达,提示姜黄素对梗死心肌的血管生成有促进作用,对受损心肌的血管重建起到积极作用;另外,姜黄素可有效下调心肌组织炎症因子 TNF-α 表达,显示了其抗炎功能。梗死后心肌的无菌性炎症反应明显,姜黄素的抗炎作用对梗死后心肌的免疫调节意义不容

小觑,为受损心肌功能的恢复提供了窗口期;炎症反应的同时,缺血区心肌血供平衡被打乱,内皮功能失调,而姜黄素可有效改善血管新生,促进血供重建,有效保护受损心肌,对受损心肌功能的恢复具有双重意义。

综上所述,姜黄素干预治疗既可有效下调心肌组织中 TNF-α 表达,又可上调冠状动脉 VEGF 表达,提示姜黄素可有效抑制 AMI 大鼠心肌组织的炎症反应,同时上调冠状动脉组织 VEGF 水平,促进血供重建,对受损心肌功能恢复、维持冠状动脉血管内皮功能稳定及血管再生具有积极意义,其具体分子机制和信号转导途径值得深入研究。

参考文献:

[1] 胡大一,马长生. 心血管病学实践 2008:规范化治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:200-245.
[2] ZIMMERMANN N, HOHLFELD T. Clinical implications of aspirin resistance[J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3):379-390.
[3] 邹晓萍,董化江,单娜娜,等. 蕲麻正丁醇提取物对急性卵巢缺血再灌注损伤大鼠肿瘤坏死因子-α 的影响[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(5):321-323.
[4] 王春彬,高大中,殷跃辉,等. 姜黄素对高脂血症兔主动脉 NF-KB、VCAM-1、VEGF 表达的影响[J]. 中成药, 2007, 29(8):1127-1129.
[5] GAEDEKE J, NOBLE N A, BORDER W A. Curcumin blocks fibrosis in anti-Thy 1 glomerulonephritis through up-regulation of heme oxygenase 1[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(5):2042-2049.
[6] 陈志强,莫曾南. 姜黄素抑制人前列腺增生细胞 BPH1 增殖的研究[J]. 中国药房, 2008, 19(6):404-407.
[7] 高翠菊,高大中,王勇. 姜黄素对急性心肌梗死模型大鼠的心肌保护作用[J]. 中国药房, 2015, 26(13):1782-1785.
[8] TEPPER O M, GALIANO R D, KALKA C, et al. Endothelial progenitor cells: the promise of vascular stem cells for plastic surgery[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2003, 111(2):846-854.
[9] FREITAS A L, OLIVEIRAESILVA M, MATSUMOTO P M, et al. Experimental model of obtaining tissue adipose, mesenchymal stem cells isolation and distribution in surgery flaps in rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2014, 29(Suppl 2):29-33.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)