

## 姜黄素预处理对体外循环大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护与抗氧化作用

郑芳<sup>1</sup>, 巩红岩<sup>1\*</sup>, 秦元旭<sup>1</sup>, 王更富<sup>2</sup>, 王庆志<sup>2</sup>, 邱庆成<sup>2</sup>, 付庆林<sup>2</sup>

(1. 新乡医学院第一附属医院临床麻醉教研室, 河南 新乡 453100; 2. 新乡医学院, 河南 新乡 453100)

**[摘要]** 目的:探讨姜黄素预处理对体外循环期间大鼠心肌缺血再灌注引起的氧化应激损伤的保护作用。方法:将 90 只 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 15 只,分别为假手术组,缺血再灌注损伤(MIR)组,溶剂组,姜黄素低、中、高(10,20,40 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量组。建立心肌缺血再灌注模型。用不同剂量姜黄素在人为制造大鼠心肌缺血模型前 30 min 分别做预处理。再灌注结束后采血,测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶同工酶(LDH1),并测量心肌梗死面积。结果:姜黄素预处理能明显降低血浆中 AST,LDH,LDH1,MDA 的含量,MIR 组血浆中各种心肌酶均明显高于假手术组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),MIR 组与溶剂组比较差异无统计学意义,姜黄素组血浆各心肌酶均明显低于 MIR 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提高 SOD 活性,减少心肌梗死面积。结论:姜黄素对体外循环期大鼠心肌缺血再灌注引起的氧化应激损伤有保护作用。

**[关键词]** 姜黄素; 心肌缺血; 心肌再灌注损伤; 氧化应激

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0148-04

## Protective Effects of Curcumin on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats in Cardz Pulmonary Bypass

ZHENG Fang<sup>1</sup>, GONG Hong-yan<sup>1\*</sup>, QIN Yuan-xu<sup>1</sup>, WANG Geng-fu<sup>2</sup>,  
WANG Qing-zhi<sup>2</sup>, QIU Qing-cheng<sup>2</sup>, FU Qing-lin<sup>2</sup>

(1. Department of Anesthesia First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China;  
2. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China)

**[收稿日期]** 20111011(001)

**[基金项目]** 国家博士后基金项目(57068)

**[第一作者]** 郑芳,硕士,住院医师,从事医学影像研究,E-mail:ghyzf@sohu.com

**[通讯作者]** \* 巩红岩,硕士,主治医师,E-mail:ghy20100228@yahoo.com

清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用显著增强,74% 醇沉且相对分子质量大于 5 000 的猪牙皂多糖对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 有清除作用,质量浓度为 0.07 g·L<sup>-1</sup> 时清除率为 20.18%,但其清除作用没有 Vit C 强。其余猪牙皂多糖对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 基本没有清除作用。

### [参考文献]

- [1] 刘来正,赵桂珍.皂角子、皂荚与猪牙皂粉末显微鉴定的比较研究[J].山西中医学院学报,2009,10(2):24.
- [2] 中国药典.一部[S].2010:298.
- [3] 谢宗万,范崔生,朱兆仪.全国中草药汇编[M].北京:人民卫生出版社,1996:821.
- [4] 高峥贞,夏玉凤,王强,等.猪牙皂的化学成分和药理活性研究进展[J].中国野生植物资源,2008,27

(1):1.

- [5] 赵声兰,陈进伟,刘芳,等.猪牙皂多糖提取工艺及体外抗氧化活性的研究[J].云南中医学院学报,2010,33(4):15.
- [6] 聂波,何国荣,刘勇,等.地笋抗氧化活性的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):176.
- [7] 周向军,高义霞,袁毅君,等.乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):36.
- [8] 折改梅,孙芳芳,吕海宁,等.多叶棘豆清除自由基活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):91.
- [9] 何玲玲,王新,刘彬,等.板栗多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J].营养与功能,2010,26(2):72.

[责任编辑 邹晓翠]

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the protective effect of curcumin on oxidative stress injury induced by myocardial ischemia reperfusion (MIR) in rats in cardiopulmonary bypass (CPB). **Method:** Sixty healthy SD rats were randomized into six groups: sham group, MIR group, PEG group, MIR + high dose curcumin treatment group, MIR + middle dose curcumin treatment group, MIR + low dose curcumin treatment group. Myocardial IR was carried out by ligation of left anterior descending coronary artery for 30 min followed by reperfusion for 60 min. Different dosages of curcumin were administered 30 min before the ligation. Blood was collected at the end of reperfusion for detecting changes of aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), lactate dehydrogenase 1 (LDH1), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA). The myocardial infarct size was also estimated. **Result:** Curcumin pretreatment dose-dependently decreased the contents of AST, LDH, LDH1 and MDA, and the myocardial infarct size, and increased the activity of SOD with dose-dependent manner. **Conclusion:** Curcumin exerts protective effects on myocardial ischemia reperfusion injury.

**[ Key words ]** curcumin; myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; oxidative stress

心肌缺血再灌注(MIR)损伤临床谱广泛,尤其在心脏外科手术时如冠状动脉搭桥术、人工瓣膜置换术、大血管置换术等过程中,大量自由基特别是活性氧产生介导的氧化应激是导致缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤的主要致病机制,因此,及早、有效地进行抗氧化治疗,清除氧自由基,能明显减轻心肌损伤并改善心功能状态<sup>[1]</sup>。姜黄素(curcumine)是从姜黄属中药姜黄、郁金等的块茎中提取出来的一种酚性色素,味辛、苦,性温、无毒,有破血行气、通经止痛等作用,且毒性低。现代药理学研究表明姜黄素具有抗炎、抗氧化、清除自由基、降脂、抗微生物的功效。其对心血管系统的作用已引起临床的广泛重视。植物药姜黄素是一种天然抗氧化剂,对心、脑等重要器官的IR有较好的保护作用,但其作用机制并未完全阐明<sup>[2]</sup>。传统实验采取大鼠冠状动脉结扎法进行MRI造模,不符合临床手术规律。本实验采用人工建立体外循环并行升主动脉阻断制造MRI模型,从整体水平研究姜黄素对MIR的保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 健康雄性SD大鼠90只,由新乡医学院实验动物中心统一采购提供[购于第四军医大学实验动物研究中心,合格证号SCXK-(军)2002-001],动物饲养自然明暗周期,自由进食、饮水。个体质量200~250 g。

**1.2 药物与试剂** 姜黄素(CUR,购自美国Sigma公司,纯度99%,批号293963),临用前用含6%(体积分数)乙醇和6%(体积分数)聚乙二醇400的水溶液溶解。伊文斯蓝、氯化三苯基四氮唑均购自Sigma公司(批号分别为265350,239597)。丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建

成生物工程研究所(批号80530202)。天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶同工酶1(LDH1)试剂盒购自英国朗道公司(批号C10Y1206)。

**1.3 仪器** ALC-V8型动物呼吸机(上海奥尔科特生物技术有限公司)、HITACHI7150型生化分析仪(日本日立公司)、高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司,5804/5804R)、722N型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、MS4000U生物信号定量记录分析系统(广州市龙飞达科技有限公司)等。体外循环采用兰格蠕虫泵(吉林宏威制药设备有限公司)可提供流量0.001~36 000 mL·min<sup>-1</sup>。标本切片使用YD-335型电脑切片机(上海之信仪器有限公司)切片厚度0~100 μm,修片厚度0~500 μm。

## 1.4 方法

**1.4.1 分组与给药** 将SD大鼠随机分为6组,每组15只。①假手术(Sham)组,②MIR组,③溶剂组:缺血前30 min(麻醉状态,以下相同)经十二指肠注射含6%(体积分数)乙醇和6%(体积分数)聚乙二醇400的水溶液2 mL·kg<sup>-1</sup>;④姜黄素低、中、高剂量组:姜黄素的预处理剂量设为10,20,40 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[2]</sup>。缺血模型制造前30 min经十二指肠分别注射姜黄素10,20,40 mg·kg<sup>-1</sup>。

**1.4.2 建立体外循环下缺血再灌注模型** 大鼠戊巴比妥钠(质量分数3%,1.5 mL·kg<sup>-1</sup>)麻醉,仰卧位固定。将银针电极插入大鼠四肢皮下,连接MS4000U生物信号定量记录分析系统,监测II肢体导联心电图。分离气管并插管后立即予呼气末正压通气IPPV模式(呼吸频率50~70次/min,流量15~20 mL·kg<sup>-1</sup>),胸骨正中打开心包腔,暴露心

脏,剪破心包膜,分离肺、主动脉,以备行升主动脉阻断,行心房插管,并引流至储血槽,并向储血槽内吹入 100% 纯氧,同时暴露股动脉,行股动脉插管,通过蠕动泵引流储血槽内氧和血通过股动脉泵如体循环。体外循环建立后,即用动脉夹行升主动脉阻断。然后观察心电图变化,以心电图 ST 段抬高、T 波高耸标志心肌缺血的存在;以抬高的 ST 段下降、T 波逐渐恢复以确定再灌注的成功。由于大鼠心肌耐受缺血时间为 10~20 min<sup>[3]</sup>,因此本实验选择阻断大鼠升主动脉 30 min,该时间足以造成大鼠心肌缺血,并成功制造心肌缺血模型。阻断 30 min 后,开放升主动脉。再灌注 3 h 后,断头取血 2 mL,0~4 °C,600 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min 并采集心脏标本,用于测定心肌梗死面积,假手术组的所有大鼠不阻断升主动脉。

**1.4.3 心肌梗死面积测量** 再灌注结束后,由主动脉逆行注入 0.5 g·L<sup>-1</sup> 的伊文思蓝 1.5 mL,待心脏非缺血区充分染成蓝色后,摘取心脏后用 4 °C 生理盐水将心脏清洗干净,剪去心底组织、心耳及右心室,置 -80 °C 冰箱速冻 5 min,然后自心尖向心底平行于房室沟方向将左室切成 5 μm 厚的薄片。将心脏切片置于 pH 7.4、质量浓度为 10 g·L<sup>-1</sup> TTC 液中,37 °C 孵育 10 min,冷生理盐水冲洗去游离染料,4% 甲醛溶液固定。染成蓝色的区域代表非缺血区,红色区域(含白色区)代表缺血区,白色区域代表梗死区。沿着不同颜色的边缘切下不同区域并称质量,分别以心肌梗死区质量(infart weight, IW)、缺血区质量(weight of risk, WR)占左心室质量(weight of left ventricular, WLV)的百分比(IW/WLV)%, (WR/WLV)% 反映心肌梗死面积、心肌缺血面积。

**1.4.4 血浆心肌酶测定** 采用 HITACHI7150 生化分析仪检测血浆 AST, LDH, LDH1 水平。

**1.4.5 血浆 SOD, MDA 测定** 按试剂盒说明书中的方法测定 SOD 活力和 MDA 含量。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 血浆心肌酶的变化** MIR 组血浆各心肌酶均明显高于假手术组,差异有统计学意义,姜黄素组血浆各心肌酶均明显低于 MIR 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

**2.2 血浆 SOD, MDA 的变化** MIR 组血浆 MDA 含量明显高于假手术组( $P < 0.05$ ),也明显高于姜黄

表 1 姜黄素对 MIR 大鼠血浆心肌酶的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量/<br>mg·kg <sup>-1</sup> | AST                        | LDH                         | LDH1                       |
|-----|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 假手术 | -                          | 263.0 ± 31.0 <sup>1)</sup> | 689.0 ± 31.0 <sup>1)</sup>  | 255.0 ± 21.0 <sup>1)</sup> |
| MIR | -                          | 394.0 ± 17                 | 2 296.0 ± 208.0             | 401.0 ± 62.0               |
| 溶剂  | -                          | 323.0 ± 49                 | 2 314.0 ± 216.0             | 398.0 ± 43.0               |
| 姜黄素 | 40                         | 191.0 ± 30.0 <sup>1)</sup> | 755.0 ± 116.0 <sup>1)</sup> | 201.0 ± 13.0 <sup>1)</sup> |
|     | 20                         | 246.0 ± 26.0 <sup>1)</sup> | 862.0 ± 147.0 <sup>1)</sup> | 210.0 ± 21.0 <sup>1)</sup> |
|     | 10                         | 192.0 ± 33.0 <sup>1)</sup> | 1814.0 ± 375.0              | 392.0 ± 31.0               |

注:与 MIR 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (表 2, 3 同)。

素各组,差异有统计学意义, MRI 组 SOD 活性明显低于假手术组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),也明显低于姜黄素各组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 姜黄素对 MIR 大鼠血浆 SOD, MDA 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量/<br>mg·kg <sup>-1</sup> | MDA/mmol·L <sup>-1</sup> | SOD/U·mL <sup>-1</sup>     |
|-----|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 假手术 | -                          | 1.8 ± 0.3 <sup>1)</sup>  | 121.0 ± 15.0 <sup>1)</sup> |
| MIR | -                          | 6.65 ± 0.8               | 79.0 ± 6.0                 |
| 溶剂  | -                          | 6.9 ± 0.8                | 91.0 ± 2.0                 |
| 姜黄素 | 40                         | 3.0 ± 0.2 <sup>1)</sup>  | 121.0 ± 8.0 <sup>1)</sup>  |
|     | 20                         | 4.8 ± 0.3 <sup>1)</sup>  | 104.0 ± 9.5 <sup>1)</sup>  |
|     | 10                         | 4.5 ± 0.1 <sup>1)</sup>  | 99.0 ± 4.0 <sup>1)</sup>   |

**2.3 心肌梗死面积的变化** 各组间(WR/WLV)% 比较差异无统计学意义;姜黄素高、中剂量组明显低于 MIR 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) (表 3)。

表 3 姜黄素对缺血再灌注心肌梗死面积的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) %

| 组别  | 剂量/<br>mg·kg <sup>-1</sup> | WR/WLV                   | IW/WLV                    |
|-----|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 假手术 | -                          | 42.0 ± 8.0 <sup>1)</sup> | 0                         |
| MIR | -                          | 46.4 ± 4.0               | 17.7 ± 3.2                |
| 溶剂  | -                          | 41.0 ± 2.0 <sup>1)</sup> | 16.6 ± 11.0 <sup>1)</sup> |
| 姜黄素 | 40                         | 42.0 ± 7.0 <sup>1)</sup> | 7.8 ± 2.0                 |
|     | 20                         | 41.0 ± 6.0 <sup>1)</sup> | 9.8 ± 1.6                 |
|     | 10                         | 40.0 ± 9.0 <sup>1)</sup> | 14.0 ± 3.1 <sup>1)</sup>  |

## 3 讨论

临床上心肌梗死的实验室检查变化主要为 ECG 及血清酶学指标的异常。传统实验研究均是采取冠状动脉结扎或应用哈巴狗动脉钳夹闭冠状动脉的方法,不符合心脏生理规律,易造成急性心肌缺血。本实验重点采用体外循环的方法制造心肌缺血

模型。重点观察体外循环期生命体征不可避免的病理变化,为心脏手术中的 MIR 积累应用姜黄素的经验。

在 MIR 中,大量自由基特别是活性氧产生介导的氧化应激是导致 MIR 损伤的主要机制之一。正常时,细胞内自由基清除剂 SOD 使氧自由基转变成  $H_2O_2$ ,通过过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及半胱氨酸蛋白酶(组织蛋白酶 B, D, L 等)<sup>[3]</sup>的作用还原为水和分子氧,氧自由基产生与清除保持动态平衡。急性心肌缺血再灌注发生过程中,由于组织缺氧导致呼吸链抑制,还原型辅酶 I (NADH)堆积,游离脂肪酸堆积,膜脂质的分子氧不能全部还原,经加氧酶系作用产生大量自由基,自由基氧化膜上的不饱和脂肪酸使脂肪变性形成过氧化脂质。在形成过氧化脂质过程中,因过氧化引起大量氧自由基产生<sup>[4-5]</sup>。氧自由基过量生成和(或)细胞内抗氧化系统受损导致氧自由基及相关代谢产物过量聚集,从而对机体造成损伤,即氧化应激损伤<sup>[6-7]</sup>。氧化应激损伤心肌细胞膜、肌质网膜及线粒体膜,导致膜通透性增加,心肌酶漏出到血液中,因此检测血浆心肌酶,尤其是心肌同工酶如 LDH1 可反映心肌受损程度。MDA 是脂质过氧化终末代谢产物,其含量反映脂质过氧化程度以及自由基的含量。SOD 是自由基清除酶,其活性反映组织抗氧化防御系统的状况及组织氧化损伤的程度。现代医学研究揭示,姜黄素具有直接捕捉和清除自由基的能力,其分子结构中的酚羟基在抗氧化活性中起决定作用。有报道,姜黄素体外可抑制脂氧酶和环氧酶活性<sup>[8-9]</sup>,减少从花生四烯酸途径生成的自由基;抑制黄嘌呤氧化酶活性<sup>[10]</sup>,减少腺苷代谢途径形成的自由基;抑制一氧化氮合酶活性,减少由精氨酸代谢途径产生的 NO 所诱导的自由基的生成,抑制中性粒细胞炎症反应,减少白细胞呼吸暴发产生的自由基<sup>[11-12]</sup>。本研究结果显示,各组间(WR/WLV)% 无显著差异, MIR 组血浆各心肌酶、MDA 含量、(IW/WLV)% 明显高于假手术组,与 MIR 组比较,姜黄素高、中、低剂量组 MDA 含量明显降低、SOD 活性升高,表明姜黄素能减少心肌酶漏出,减少梗死面积。

上述实验结果提示姜黄素对实验性心肌缺血再灌注,特别是在体外循环应用的心脏手术中引起的氧化应激损伤有保护作用,其机制可能与清除氧自由基、保护氧自由基清除酶活性,大鼠心肌抗氧化能

力、抑制脂质过氧化物产生、减轻脂质过氧化所致心肌细胞膜的损伤等有关。

## [参考文献]

- [ 1 ] Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, et al. Oxi-dativestress-inducedischemicheartdisease: protection-byantioxidants[J]. Curr Med Chem, 2004, 11 (3):369.
- [ 2 ] 程虹,刘惟莞.姜黄素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(10):1238.
- [ 3 ] 杨家荣,杨慧,潘铁军.姜黄素对膀胱肿瘤细胞组织蛋白酶 D 表达的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37 (14):1540.
- [ 4 ] 邵耕.现代冠心病学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995:8.
- [ 5 ] Aggarwal B B, Harikumar K B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, a-gainst neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic-diseases[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(1):40.
- [ 6 ] Madamanchi N R, Vendrov A, Runge M S. Oxidativestress and vascular diseases [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1):29.
- [ 7 ] 孟爱国,刘春艳. N-马来酰-L-缬氨酸酯姜黄素对胃癌 MGC-803 细胞周期的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):81.
- [ 8 ] 赵珍东,段启,张雷红.姜黄素对氧应激致大鼠肝星状细胞增殖及 TGF- $\beta_1$  表达的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):285.
- [ 9 ] Yahagi A, Umemura M, Tamura T, et al. PP-061-09 Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4<sup>+</sup> T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection [J]. Inter Immunol, 2010, 22 (3):111.
- [ 10 ] Zhao J, Yu S, Zheng W, et al. Curcumin improves outcomes andattenuates focal cerebral ischemic injury via antiapoptotic mecha-nisms in rats[J]. Neurochem Res, 2010, 35(3):374.
- [ 11 ] 宋金春,黄薇.姜黄素泊洛沙姆 P123 共聚物胶囊的制备及其释药特性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1) 283.
- [ 12 ] 曾晓会,陈玉兴,赵自明.姜黄素微囊在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 17 (2):186.

[责任编辑 邹晓翠]