

· 论 著 ·

姜黄素诱导 HSP70 及对大鼠感染性脑水肿 保护作用的研究

黄榕, 罗芳, 余小河, 杨于嘉

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘 要] 目的 研究姜黄素预处理诱导 HSP 70 表达的量效和时效关系及对感染性脑水肿的保护作用。方法 ①量效及时效关系的研究: SD 大鼠随机分为空白对照组、二甲亚砷(DMSO)组、热休克(HS)组和姜黄素(CUR)组;再根据姜黄素的剂量(mg/kg)分为 80 mg, 40 mg, 20 mg 及 10 mg 组。根据观察时间分为 0, 2, 4, 6, 12, 16, 24 h 及 48 h 组。Western 印迹分析检测脑组织 HSP70。②脑水肿保护作用研究: SD 大鼠随机分为生理盐水对照组(NS)、感染性脑水肿组(PB)、二甲亚砷组、热休克预处理组和姜黄素预处理组。制备感染性脑水肿模型, 用干湿法测定脑含水量;原子光谱吸收法测定脑组织钠、钾含量。结果 正常情况下, 脑组织有一定量 HSP70 的表达, DMSO, CUR 20 mg 和 CUR 10 mg 组 HSP70 表达无明显增多;HS, CUR 40 mg 及 CUR 80 mg 组 HSP70 明显增加, 以 CUR 40 mg 组明显, 差异有显著性($P < 0.01$)。HSP70 在注射姜黄素后 2 h 开始表达, 16 h 达高峰, 24~48 h 处于稳定状态。HS 组、CUR 组的脑含水量和脑组织钠离子含量与 PB 组比较有明显降低, 差异有显著性($P < 0.01$)。结论 姜黄素可诱导大鼠脑组织 HSP70 的产生, 有剂量及时间依赖关系。姜黄素预处理对大鼠感染性脑水肿有保护作用。

[中国当代儿科杂志, 2003, 5(2): 109-112]

[关 键 词] 姜黄素; HSP70; 感染性脑水肿; 大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)02-0109-04

Heat Shock Protein-70 Expression Induced by Curcumin and the Protective Effect of Curcumin on Infectious Brain Edema in Rats

Rong HUANG, Fang LUO, Xiao-He YU, Yu-Jia YANG. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Email: hdoctor@163.net)

Abstract: **Objective** To study the dose-effect and time-effect of heat shock protein-70 (HSP70) expression induced by curcumin, an antioxidant compound extracted from the spice tumeric, and the protective effect of curcumin on infectious brain edema in rats. **Methods** Dose-effect and time-effect: 24 SD rats were randomly assigned into four groups: control group, dimethyl sulfoxide (DMSO) group, heat shock group and curcumin group. The rats in the curcumin group were subdivided into groups receiving 80, 40, 20 and 10 mg of curcumin, respectively. Another 24 SD rats injected with 40 mg curcumin were divided into groups sacrificed at 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 16 h, 24 h, and 48 h. HSP70 expression was detected by the Western blotting analysis. Protective effect of curcumin on infectious brain edema: 52 SD rats were assigned into five groups: normal control group, infectious brain edema group, DMSO pretreatment group (DMSO group), heat shock pretreatment group (HS group), and curcumin pretreatment group (CUR group). Water content and Na^+ and K^+ contents in brain tissues were measured. **Results** Compared with the control group, HSP70 expressions of the heat shock group, 40 mg curcumin group and 80 mg curcumin group significantly increased, especially in the 40 mg group ($P < 0.01$). HSP70 expression gradually increased with the time after the injection of curcumin, peaking at 16 h and reaching a plateau at 24 h and 48 h. The contents of water and Na^+ in brain tissues significantly decreased in the HS and CUR groups compared with the un-treated infectious brain edema group. **Conclusions** HSP70 expression can be induced by pretreatment with curcumin, and there are dose-effects and

[收稿日期] 2002-09-26; [修回日期] 2003-01-02

[基金项目] 湖南省科委资助项目(02ssy3034)

[作者简介] 黄榕(1961-), 女, 博士, 副教授。主攻方向: 小儿神经及呼吸系统疾病。

[通讯作者] 黄榕, 湖南省长沙市湘雅路 141 号中南大学湘雅医院儿科, 邮编: 410008。

time-effects. The protective effect of curcumin against infectious brain edema may be a consequence of increased HSP70 expression in rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(2): 109-112]

Key words: Curcumin; HSP70; Infectious brain edema; Rat

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是细胞受不同因素刺激时合成的一组蛋白质,是由基因所调控的。在众多的 HSP 家族中,以 HSP70 的作用最为引人注目。目前诱导 HSP 的方法绝大多数为有损性,这些方法仅能在动物实验中进行,怎样使热休克反应的理论体现其临床应用价值,有赖于寻找安全有效的诱导方法。姜黄素(curcumin)是从植物姜黄根茎中提取的一种酚性色素,具有广泛的药理作用且毒性低。本研究采用姜黄素预处理,观察其诱导大鼠脑组织 HSP70 表达的量效及时效关系及对感染性脑水肿模型的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

姜黄素:购自美国 Caymanchem 公司,以 DMSO 溶解为 40 mg/ml 注射液;二甲亚砜(DMSO)、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺:购自上海生物工程有限公司;鼠抗 HSP70 单克隆抗体:美国 Sigma 公司;AKP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体:美国 Sigma 公司;百日咳菌液:批号:93-24-(1),含菌量 980 亿/ml,北京生物制品厂提供;灭菌生理盐水:湘雅医院药剂科;低温高速离心机(CS-15R 型):美国 Beckman 公司;图像处理仪(Eagle Eye II 型):美国出产。原子吸收光谱仪:AA-680G 型日本岛津。

1.2 实验动物及分组

1.2.1 量效及时效关系的研究 SD(Sprague-Dawley)大鼠 48 只,体重(210±27)g,雌雄不拘,随机分为 4 组。①空白对照组(blank, B):动物不做任何处理;②二甲亚砜组(DMSO):用 DMSO (0.1 ml/kg)给动物腹腔注射;③热休克处理组(HS):热休克处理参照文献进行^[1];④姜黄素处理组(CUR):给大鼠腹腔注射姜黄素。其中根据给予姜黄素剂量(mg/kg)的不同分为 4 个亚组:姜黄素 80 mg 组(CUR80)、40 mg 组(CUR40)、20 mg 组(CUR20)、10 mg 组(CUR10)。上述处理 24 h 后,断头处死。另外,根据量效结果以姜黄素 40 mg/kg 腹腔注射,按注射后处死的时间不同分为 8 组:0, 2, 4, 6, 12, 16, 24 及 48 h 组。

1.2.2 感染性脑水肿保护作用研究 SD 大鼠 52 只,体重(210±27)g 随机分为 5 组:①生理盐水对

照组(NS 组);大鼠不作预处理,置室温 24 h 后向左颈内动脉注射灭菌生理盐水制备动物模型;②感染性脑水肿组(PB 组);大鼠不作预处理,置室温 24 h 后按参考文献^[1]向左颈内动脉注入百日咳菌液制备 PB 模型;③二甲亚砜组(DMSO+PB 组);腹腔注射等量的 DMSO, 0.1 ml/kg, 置室温 24 h 后制备 PB 模型;④热休克预处理组(HS+PB 组);大鼠经热休克处理后,置室温 24 h 后制备 PB 模型;⑤姜黄素预处理组(CUR+PB 组)姜黄素 40 mg/kg 腹腔注射后,置室温 24 h 后制备 PB 模型。所有动物颈内动脉注菌或注生理盐水后 4 h 断头处死。

1.3 脑水肿指标的测定

1.3.1 脑含水量测定 脑含水量测定参照文献进行^[1]。按 Elliot 公式计算,含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.2 脑组织钠、钾离子测定 干脑组织钠、钾离子测定参照文献进行^[1]。用原子吸收光谱仪分析测定钠、钾含量(μg/ml),根据干脑组织重量换算成 mmol/kg 干重。

1.4 Western 印迹分析

大鼠断头处死后,立即取出脑组织约 150mg,按《分子克隆实验指南》方法稍做修改,制备蛋白质样本。蛋白质进行定量。取等量蛋白质经 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白质转移至硝酸纤维素(NC)膜上。小心取出 NC 膜,用封闭液 4℃ 封闭过夜,按 1:1 000 加入抗 HSP70 单克隆抗体 4℃ 过夜,按 1:2 000 加入 AKP 标记羊抗鼠 IgG 抗体,室温 2 h 后加入 AKP 生色底物缓冲液,至蛋白条带显色清晰时,终止反应,拍摄照片,记录实验结果。各组均重复 3 次。将结果用图像处理仪进行密度面积分析。

1.5 统计分析

数据用 Excel 7.0 及 SPSS 10.0 软件包分析,条带密度面积结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *F* 检验。

2 结果

2.1 姜黄素诱导 HSP70 表达量效关系结果

Western 印迹分析结果显示(图 1),正常情况下,脑组织有一定量的 HSP70 的表达;DMSO 组、CUR20 组、CUR10 组 HSP70 没有明显增加;HS 组、CUR40 组、CUR80 组 HSP70 均有明显增加。

NC膜经图像处理仪扫描显示 HS 组、CUR40 组、CUR80 组均较空白对照组明显增加,尤以 CUR40 组明显,差异有显著性($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 姜黄素诱导 HSP70 表达时效关系结果

Western 印迹分析结果显示(图 2,图 3):大鼠脑组织 HSP70 的表达在 2 h 开始增加,至 16 h 达高峰、24~48 h 达稳定状态。NC 膜经图像处理仪灰度扫描结果见表 2。

2.3 姜黄素预处理对脑含水量、Na⁺、K⁺含量的影响

姜黄素预处理可使感染性脑水肿时脑含水量和 Na⁺ 含量明显下降,K⁺ 含量明显增高,CUR+PB 组与 PB 组比较差异有显著性, $P < 0.01$,结果见表 3。

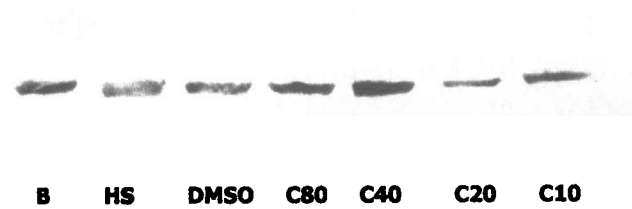


图 1 姜黄素诱导 HSP70 表达量效关系 Western 印迹杂交结果

B:空白对照组,HS:热休克预处理组,DMSO:DMSO 预处理组,C80:CUR80mg 组,C40:CUR 40 mg 组,C20:CUR 20 mg 组,C10:CUR 10 mg 组

Figure 1 Dose-effect in induced HSP70 expression with curcumin by Western blotting

B:blank group,HS:heat shock pretreatment group,DMSO:DMSO pretreatment group C80:CUR 80 mg group,C40:CUR 40 mg group,C20:CUR 20 mg group,C10:CUR 10 mg group

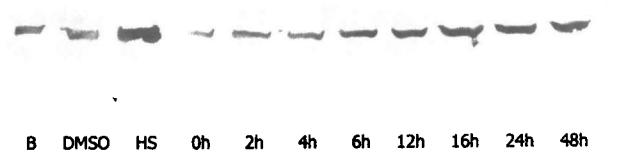


图 2 姜黄素诱导 HSP70 表达时效关系的 Western 印迹杂交结果

Figure 2 Time-effect in induced HSP70 expression with curcumin by Western blotting

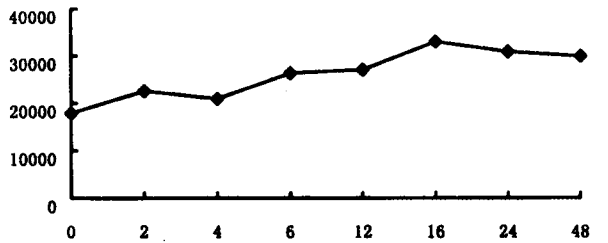


图 3 姜黄素诱导 HSP70 表达时效关系
Figure 3 Relationship between curcumin time-effect and expression of HSP70 by Western blotting

表 1 姜黄素诱导 HSP70 表达量效关系 Western 印迹杂交扫描结果

Table 1 Band density areas of Western blotting of the dose-effect in induced HSP70 expression by scan ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	灰度值
空白对照组	3	21627.25 $\pm$ 2025
DMSO 组	3	20630.25 $\pm$ 532
HS 组	3	26879.51 $\pm$ 960 ^a
CUR80 组	4	24208.50 $\pm$ 890 ^a
CUR40 组	5	35580.50 $\pm$ 6299 ^a
CUR20 组	3	21515.50 $\pm$ 4325
CUR10 组	3	21528.25 $\pm$ 2512

注: a 与空白对照组比较 $P < 0.01$

表 2 姜黄素诱导 HSP70 表达时效关系的 Western 印迹杂交灰度扫描结果

Table 2 Band density areas of Western blotting of the time-effect in induced HSP70 expression by scan ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	灰度值
0 h	3	19275 $\pm$ 1466
2 h	3	22100 $\pm$ 1156
4 h	3	20911 $\pm$ 242
6 h	3	25542 $\pm$ 1932
12 h	3	27362 $\pm$ 1193
16 h	3	32297 $\pm$ 1328
24 h	3	30786 $\pm$ 2372
48 h	3	31296 $\pm$ 959

表3 注菌或盐水侧脑组织含水量、钠、钾离子含量测定

Table 3 Contents of water, sodium and potassium on the side of PB or NS injected in brain tissues ($\bar{x} \pm s$)

分组	含水量 (%)	Na ⁺ (mmol/kg)	K ⁺ (mmol/kg)
NS (n=9)	79.86 ± 0.23	200.62 ± 6.48	445.62 ± 8.38
PB (n=12)	82.15 ± 0.40 ^a	278.07 ± 6.75 ^a	346.74 ± 7.62 ^a
DMSO+PB (n=9)	81.02 ± 0.28 ^{c,d}	236.95 ± 6.36 ^a	385.22 ± 13.27 ^a
HS+PB (n=9)	80.57 ± 0.42 ^b	210.49 ± 7.67 ^b	406.17 ± 5.28 ^b
CUR+PB (n=13)	80.60 ± 0.21 ^{b,e}	225.92 ± 5.74 ^{b,e}	396.46 ± 4.26 ^b

注: a 与 NS 比较 $P < 0.01$; b 与 PB 比较 $P < 0.01$; c 与 PB 比较 $P < 0.05$; d 与 NS 比较 $P < 0.05$; e 与 DMSO+PB 比较 $P > 0.05$

3 讨论

热休克反应(Heat Shock Response, HSR)是机体内源性保护机制之一,亚致死量刺激所诱导的HSR可使细胞对随后的致死性损伤产生耐受,减轻致死性损伤对机体细胞的破坏作用。我们以往的研究证实,HSR对感染性脑水肿的保护作用与HSP70表达增加有关^[2]。但HSR在诱导HSP70产生的同时对机体有一定的损害作用,仅能用于动物实验。

姜黄素是从中药姜黄根茎中提取的一种酚性色素^[3],具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化及调节血脂、抗动脉粥样硬化及抗HIV作用,且毒性低^[4]。Sood A等^[5,6]研究发现姜黄素可诱导体外培养细胞表达HSP70,但在整体动物脑组织是否能诱导HSP70表达的研究尚未见报道。本研究室过去的研究发现,黄芩甙、川芎嗪可诱导HSP70的表达^[7],且与剂量有关。我们的研究结果证实姜黄素可诱导大鼠脑组织HSP70的表达,且呈一定的量效及时效关系。量效关系研究显示:姜黄素40 mg组和80 mg组HSP70表达较空白对照组、姜黄素20 mg组、10 mg组及DMSO组明显增加($P < 0.01$);与热休克组比较差异无显著性。时效关系研究显示HSP70的表达在2 h开始增加,至16 h达高峰、24~48 h达稳定状态。与本研究室的既往的研究结果保持了一致性,与经典的HSR诱导HSP70表达的时间基本一致。在研究中我们观察到姜黄素预处理可减轻实验性脑水肿,CUR+PB组的脑含水量、钠离子含量较PB组明显下降,钾离子含量明显增高,差异有极显著性意义, $P < 0.01$;CUR+PB组与HS+PB组比较,脑含水量、钠、钾离子含量差异无显著性, $P > 0.05$ 。在我们以往的研究中显示,急性感染性脑水肿时iNOS mRNA的表达于24 h达高峰,使NO过

量产生,对神经细胞具有毒性作用^[8]。NF- κ B活性2 h开始增高,持续至24 h,提示NF- κ B与感染性脑水肿的迟发性神经元损伤有关^[9]。CUR诱导的HSP70表达在2 h开始增加,16 h达高峰,不仅对脑水肿早期损伤有一定保护作用,还可减轻脑水肿的迟发性神经元损伤。因此,可利用姜黄素诱导HSP70表达的特性,调动机体内源性保护机制,以减轻有害因素对细胞的损伤。

[参 考 文 献]

- [1] 黄榕,杨于嘉,虞佩兰,等.热应激反应对大鼠感染性脑水肿保护作用的研究[J].中华儿科杂志,1999,37(6):372-374.
- [2] 黄榕,杨于嘉,虞佩兰,等.热休克预处理对感染性脑水肿时神经细胞内钙的影响及机制探讨[J].中风与神经疾病杂志,2000,12(3):261-263.
- [3] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典一部[S].北京:化学工业出版社,2000,218.
- [4] 顾军,韩香,顾欣.姜黄素的基础药理作用[J].天津药学,2000,12(2):5-6.
- [5] Sood A, Mathew R, Trachtman H. Cytoprotective effect of curcumin in human proximal tubule epithelial cells exposed to shiga toxin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283(1): 36-41.
- [6] Kato K, Ito H, Kamei K, Iwamoto I. Stimulation of the stress-induced expression of stress proteins by curcumin in cultured cells and in rat tissues in vivo[J]. Cell Stress Chaperones, 1998, 3(3): 152-160.
- [7] 毛定安,杨于嘉,虞佩兰,等.黄芩甙、川芎嗪诱导大鼠脑组织热休克蛋白70合成[J].中国当代儿科杂志,2001,3(4):367-369.
- [8] 毛定安,杨于嘉,尹飞,等.热休克反应对大鼠感染性脑水肿脑组织诱生型一氧化氮合酶mRNA表达的影响[J].中国现代医学杂志,1998,8(10):1-3.
- [9] 毛定安,杨于嘉,俞燕,等.核因子- κ B活性在大鼠脑水肿的变化及热休克反应对其影响的研究[J].中国当代儿科杂志,1999,1(5):277-280.

(本文编辑:吉耕中)