

• 论著 •

姜黄素对肺血栓栓塞症大鼠肺组织不规则趋化因子的影响

王灵聪 黄立权 孙晨 蒋慧芳 种法政 杨如会 智屹惠
吴艳春 雷澍 江荣林

【摘要】 **目的** 探索肺血栓栓塞症(PET)大鼠肺组织不规则趋化因子(FKN)的变化及姜黄素(Cur)的干预作用。**方法** 采用自体血栓法复制大鼠PTE模型。96只大鼠按完全随机分组方法分为6组:正常组(control组)、假手术组(sham组)、模型组(model组)、Cur低剂量组(Cur-low组)、Cur中剂量组(Cur-medium组)、Cur高剂量组(Cur-high组)。栓塞后4、72 h,行HE染色观察肺病理学改变,检测肺系数、血清FKN和肺组织的FKN、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)的mRNA水平。**结果** 栓塞后4、72 h,各组肺系数比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。栓塞后4 h血清FKN比较,control组明显低于model组,72 h后control、sham、Cur-high组均明显低于model组(P 均 <0.01)。Control、sham、Cur-low、Cur-medium、Cur-high组4、72 h肺组织FKN、TNF- α 、IL- 1β 的mRNA水平均明显低于model组(P 均 <0.01)。栓塞后72 h,大鼠肺组织HE染色显示肺泡壁血管高度扩张、充血,光镜下个别大鼠查见出血性梗死灶,应用Cur后肺组织充血程度明显减轻,出现梗死的大鼠数量也有降低的趋势。**结论** Cur能降低PTE大鼠肺组织的FKN水平。

【关键词】 姜黄素;肺栓塞;趋化因子CX3CL1

Effect of curcumine on fractalkine of lung tissue in pulmonary thromboembolism rats

WANG Ling-cong*, HUANG Li-quan, SUN Chen, JIANG Hui-fang, ZHONG Fa-zheng, YANG Ru-hui, ZHI Yi-hui, WU Yan-chun, LEI Shu, JIANG Rong-lin. *Department of Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicine University, Hangzhou 310006, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the changes of fractalkine (FKN) of lung tissues in pulmonary thromboembolism (PTE) and intervention function of curcumin (Cur). **Methods** PTE model was established by autologous blood clot. A total of 96 rats were randomly divided into six groups: control group, sham group, model group, Cur-low group, Cur-medium group, and Cur-high group, 16 in each. Pathological changes of the lungs were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The lung coefficient and mRNA levels of FKN, tumor

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2011.06.002

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y207052, Y2080036)

作者单位:310006 杭州,浙江中医药大学附属第一医院ICU(王灵聪、黄立权、孙晨、智屹惠、吴艳春、雷澍、江荣林);
310012 杭州,浙江省立同德医院血液科(蒋慧芳);311121 杭州赫贝科技有限公司(种法政、杨如会)

necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) in blood and lung tissue were detected at 4 and 72 h after embolism. **Results** There was no significant difference between each group on the lung coefficient after embolism at 4 and 72 h (all $P > 0.05$). The blood serum FKN level in the control group was obviously lower than the model group at 4 h after embolism, while at 72 h, the control, sham, Cur-high groups were all lower than the model group (all $P < 0.01$). The mRNA levels of FKN, TNF- α , IL-1 β in the lung tissue were significantly lower in the control, sham, Cur-low, Cur-medium, Cur-high groups as compared with the model group at 4 and 72 h after embolism (all $P < 0.01$). HE staining assumed that the pulmonary alveolar capillaries remarkably expanded and revealed hyperemia at 72 h after embolism. Hemorrhagic infarction could be seen in several rats under the light microscope. After the rats applied with Cur, the lung congestion released. **Conclusion** Cur could decrease the FKN levels in the rats with PTE.

【Key words】 Curcumin; Pulmonary embolism; Chemokine CX3CL1

肺血栓栓塞症(pulmonary thromboembolism, PTE)是静脉系统或右心血栓阻塞肺动脉或其分支引起的疾病。PTE已成为一种常见心血管疾病,全球每年确诊的PTE有数百万人,我国尚缺乏其准确的流行病学资料。PTE可导致肺内产生一个更广泛的炎性过程,而且凝血后的产物及炎性细胞之间的相互作用进一步加重了病理程度^[1]。不规则趋化因子(fractalkine, CX3CL1, FKN)对于炎症细胞在血管壁上的募集和内皮细胞的损伤有重要作用^[2-3]。我们发现Cur可抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)刺激人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)的FKN表达^[4],并能改善PTE大鼠的动脉血气分析及生存率^[5],而关于FKN与PTE的相关性研究至今仍较为少见。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD大鼠,购自无锡市惠山江南实验动物场,许可证号:SCXK(苏)2009-0005。

1.2 药品及试剂 Cur购自上海丽臣生物科技有限公司(批号:110823);大鼠FKN酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自上海上海逸峰生物科技有限公司(批号皆为201109);RNA提取所用试剂TRIzol Reagent购自美国Invitrogen生命技术公司;逆转录试剂盒RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit购自加拿大Fermentas公司;DNA消化用Recombinant DNase I(RNase-free)购自宝生物工程(大连)有限公司;荧光定量PCR所用试剂Platinum SYBR Green 荧光定量PCR SuperMix UDG购自美国Invitrogen生命技术公司。

1.3 仪器及设备 测量光密度值的读板机为Molecular Devices Spectra Max PLUS 384;定量PCR仪为Bio-Rad MJ MiniOpticon Real-Time PCR System,配套使用的分析软件为Bio-Rad CFX Manager。

1.4 分组、造模及给药 96只SD大鼠,雄性,适应性饲养3d后,按完全随机分组方法,分为正常组(control组)、假手术组(sham组)、模型组(model组)、Cur低剂量组(Cur-low组)、CUR中剂量组(Cur-medium组)、Cur高剂量组(Cur-high组),每组各16只。采用自体血栓法复制PTE模型:实验前4h眼眶静脉取血,放置4h凝固,手术剪修剪至体积约为2 mm³,加入生理

盐水(normal saline, NS)制备混悬液。取大鼠,称体质量,按体质量腹腔注射水合氯醛麻醉。固定,剃毛后,颈部皮肤消毒。手术剪开颈部皮肤,暴露并分离右侧颈总静脉,1 ml 注射器抽取 0.5 ml 混悬液(约为 15~20 个血栓),颈总静脉插管,迅速推入血栓混悬液,观察大鼠呼吸状况,出现呼吸加快加深,表明造模成功。control 组不接受任何干预,sham 组颈总静脉注射 NS 0.5 ml。手术前一天和 40 min 前分别按设计灌胃一次(量均为 1 ml / 100 g),并按照实验设计,Cur-low、Cur-medium、Cur-high 组在模型建立后 6 h 分别灌胃 Cur 50 mg / kg、100 mg / kg、200 mg / kg,sham 和 model 组灌胃 NS,1 次 / d。实验期间,各组大鼠均自由饮水和进食。各组在栓塞后 4、72 h,各随机取 8 只大鼠水合氯醛麻醉后,分别取血、肺组织等进行检测。

1.5 检测指标 ①计算肺系数(肺质量 / 体质量 × 100%);②双抗体夹心 ABC-ELISA 法,测定血清 Fkn 水平;③荧光定量 PCR 检测肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、FKN 的 mRNA 水平,实验共设三组生物学重复,每组 12 个样品(随机从 6 组的两个时段即 4、72 h 各取 1 个标本),每个样品实行三次技术性重复;④肺病理苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。

1.6 统计学方法 所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 for windows 统计软件,各组比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺系数及血清 FKN 水平

栓塞后 4、72 h 的各组肺系数比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。各组 ELISA 法血清 FKN 比较,栓塞后 4 h 时 control 组显著小于 model 组($P > 0.01$),Cur-high 组小于 model 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。72 h 时,control、sham、Cur-high 组均显著小于 model 组(P 均 < 0.01),见表 1。

表 1 各组大鼠造模后 4、72 h 的肺系数、血清 FKN 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	4 h		72 h	
		肺系数(100%)	血清 FKN (ng / L)	肺系数(100%)	血清 FKN (ng / L)
control 组	8	5.7 \pm 0.7	2401.8 \pm 17.6 ^a	5.2 \pm 0.4	2493.8 \pm 125.2 ^a
sham 组	8	5.7 \pm 0.7	2427.7 \pm 245.1	5.6 \pm 0.7	2438.4 \pm 266.5 ^a
model 组	8	5.3 \pm 0.5	2674.3 \pm 78.1	6.0 \pm 0.8	3090.8 \pm 117.4
cur-low 组	8	5.7 \pm 0.7	4012.0 \pm 57.8 ^a	7.1 \pm 2.2	3758.1 \pm 59.9 ^a
cur-medium 组	8	5.7 \pm 0.4	3277.8 \pm 591.9	6.2 \pm 1.0	4194.7 \pm 57.6 ^a
cur-high 组	8	5.7 \pm 1.0	2548.8 \pm 136.4	7.4 \pm 1.3	2707.5 \pm 143.5 ^a

注:与 model 组比较,^a $P < 0.01$

2.2 肺组织 FKN、TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 水平

Control、sham、Cur-low、Cur-medium、Cur-high 组栓塞后 4、72 h 的肺组织 FKN、TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 水平均显著小于 model 组(P 均 < 0.01),但组间比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表 2。第一组 12 个样品的 FKN、TNF- α 、IL-1 β 溶解曲线均呈单峰(图 1~3)。

2.3 肺病理 HE 染色

行肺病理检查的 6 组大鼠共 87 只,分为 4 h(45 只)和 72 h(42 只)二个时间点,每组大鼠 6~9 只不等。

2.3.1 4 h 取材组 Control 组(8 只),sham 组(9 只),model 组(7 只),Cur-low 组(7 只),Cur-

表2 各组大鼠造模后4、72 h肺组织FKN、TNF- α 、IL-1 β 的mRNA水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	4 h			72 h		
		FKN	TNF- α	IL-1 β	FKN	TNF- α	IL-1 β
control 组	3	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.37 \pm 0.98	0.57 \pm 0.34	1.21 \pm 0.52
sham 组	3	0.96 \pm 0.13	1.45 \pm 0.22	1.23 \pm 0.53	1.71 \pm 0.96	0.69 \pm 0.35	0.73 \pm 0.27
model 组	3	4.05 \pm 0.36	4.22 \pm 0.58	3.09 \pm 0.13	13.77 \pm 3.83	18.32 \pm 3.52	14.68 \pm 12.48
Cur-low 组	3	1.39 \pm 0.14	2.02 \pm 0.56	1.22 \pm 0.49	1.44 \pm 0.46	1.55 \pm 0.39	1.37 \pm 0.55
Cur-medium 组	3	1.20 \pm 0.34	1.19 \pm 0.42	1.05 \pm 0.36	1.66 \pm 0.83	1.47 \pm 0.85	1.43 \pm 0.45
Cur-high 组	3	1.19 \pm 0.72	1.54 \pm 0.50	1.09 \pm 0.06	1.02 \pm 0.16	1.62 \pm 0.43	1.04 \pm 0.04

medium 组(8只),Cur-high 组(6只)。6组大鼠肺组织结构无显著差别,所有大鼠均有轻微充血,轻度水肿和炎细胞浸润,肺泡壁增厚,未见明显坏死,炎细胞类型为中性粒细胞或单个核细胞,肺内支气管未见明显病变(图4)。

2.3.2 72 h 取材组 Control 组(6只):肺组织结构与4 h组相同,由肺泡、肺内支气管分支及间质组成。肺组织有轻度间质性肺炎4只,肺组织中度充血2只,此为大鼠常见的自发性病变。肺内各级支气管上皮细胞未见明显变性,管腔内无渗出物,管周未见明显炎细胞浸润。sham 组(7只):病变多为轻度肺泡壁充血、水肿,中度1只,其中2只伴有肺气肿。model 组(9只):主要病变为肺泡壁明显充血,伴有肺气肿。重度充血5只,中度充血3只,轻度1只。肺泡壁无明显水肿,或炎细胞浸润。局部肺组织坏死2只,坏死区有出血,周围肺泡腔充有水肿液,坏死区内支气管上皮折叠,与管壁分离。间质有轻度水肿4只。肺内支气管上皮有不同程度的折叠7只,与管壁分离(图5)。Cur-low 组(7只):主要病变为肺泡壁轻度充血、水肿,有少量炎细胞浸润2只。局部肺组织坏死3只,坏死区有出血,其中1只局部有多量中性粒细胞,形成化脓性病变。肺内支气管上皮有不同程度的折叠4只,与管壁分离(图6)。Cur-medium 组(6只):主要病变为肺泡壁轻度充血,部分伴有肺泡壁轻度或中度水肿,及少量炎细胞浸润。局部肺组织坏死1只,坏死区有出血(图7)。Cur-high 组(7只):主要病变为肺泡壁轻度充血、水肿、炎细胞浸润。局部肺组织坏死2只,坏死区有出血(图8)。

3 讨论

2008年欧洲肺栓塞诊断治疗指南认为,美国1979至1999年的住院病患资料,PTE的发病率为0.4%。法国一项34 200人的社区研究发现,静脉栓塞和PTE的发生率分别为18.3/10 000和6.0/10 000,但因尸检资料难以获得,PTE的确切发生率不得而知。最新的前瞻性研究显示急性肺栓塞的致死率约为7%~11%^[6]。进一步的研究PTE发病机制,有助于降低其死亡率。目前认为PTE存在血管内皮损伤、血流淤滞、血液高凝等,而内皮、血小板和白细胞之间的黏附作用参与了血栓形成^[7],并加重了肺损伤。而FKN是否参与了PTE的发病过程呢?FKN是1997年发现的兼有黏附和趋化活性的含有373个氨基酸残基的蛋白质分子趋化因子^[8],对于炎症细胞在血管壁上的募集和内皮细胞的损伤有重要作用,能够诱导淋巴细胞的活化与定向迁移,还能使T细胞、单核细胞和自然杀伤细胞与血管内皮细胞紧密黏附^[9]。目前国内外认为FKN在某些疾病如急性肺损伤^[10]、肺动脉高压^[11]、冠心病^[12]、类风湿性关节炎^[13]、造血干细胞移植术后急性移植物抗宿主病^[14]等的发病中起一定作用。我们实验发现,model组大鼠栓塞4 h后的血清FKN,肺组织的FKN、TNF- α 、IL-1 β 均显著升高,72 h后更明显,提示栓塞4 h后即可

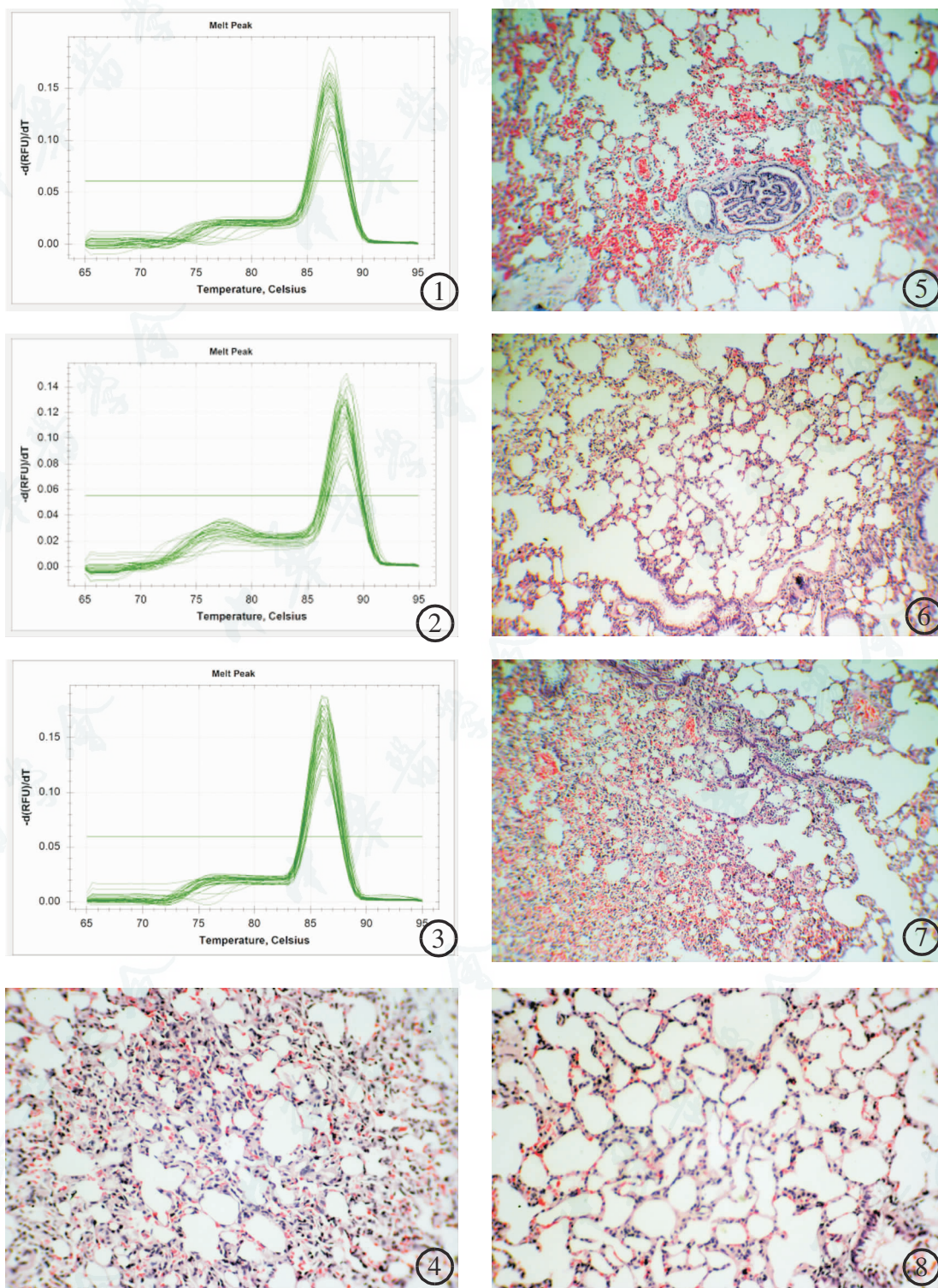


图1 FKN 溶解曲线;图2 TNF- α 溶解曲线;图3 IL-1 β 溶解曲线;图4 model 组 栓塞后 4 h 肺组织病理。肺泡壁高度充血增厚、细胞无明显坏死,局部有出血,肺泡腔尚可见(HE $\times 100$);图5 model 组栓塞后 72 h 肺组织病理。大部分区域(梗死区)结构不清,支气管上皮结构紊乱(HE $\times 100$);图6 Cur-low 组 栓塞后 72 h 肺组织病理。肺泡壁明显充血增厚,部分肺泡腔内有红细胞,支气管可见(HE $\times 100$);图7 Cur-medium 组栓塞后 72 h 肺组织病理。肺泡壁轻度充血,部分伴有肺泡壁轻度或中度水肿,及少量炎细胞浸润(HE $\times 100$);图8 Cur-high 组栓塞后 72 h 肺组织病理。肺泡壁轻度充血、水肿、炎细胞浸润(HE $\times 100$)

见炎症因子显著分泌,其后 3 d 内仍呈上升趋势,故对 PTE,除常规治疗外,尚需积极进行抗炎治疗。

PTE 的治疗主要为溶栓和抗凝^[7]。我们的前期研究发现, Cur 可明显改善 PTE 大鼠的动脉血气、乳酸及病死率, 这与 Cur 具有抗炎、抗凝等作用有关^[5]。研究发现栓塞 4 h 时血清 FKN 的药物干预尚不起作用, 而 72 h 后 Cur-high 组的 FKN 显著小于 model 组, 说明栓塞 72 h 后大剂量 Cur 能降低 PTE 血清 FKN 水平。

肺系数的大小与肺及大鼠体质量有关, 理论上栓塞后 4 h 和 72 h model 组应大于 control 及 sham 组, 但实验发现差异不大, 考虑两时间段肺水肿引起的肺重增加及大鼠体质量变化不大有关, 这从肺病理可以证实。肺组织 HE 染色证实, 栓塞后 4 h 大鼠肺部病变, 主要表现肺泡壁血管轻微或轻度扩张、充血, 轻度或中度水肿, 伴有炎细胞浸润, Cur 应用后有减轻肺部病变的作用, 但效果不甚明显。而栓塞后 72 h 大鼠肺部病变, 主要表现肺泡壁血管高度扩张、充血, 水肿和炎细胞浸润不明显, 光镜下个别大鼠查见出血性梗死灶, Cur 应用后肺组织充血程度明显减轻, 出现梗死的大鼠数量也有降低的趋势。说明使用 Cur 可减轻 PTE 72 h 后肺的病理损害。

第一组 12 个样品的 FKN、TNF- α 、IL-1 β 溶解曲线均呈单峰, 说明 PCR 产物唯一, 实验精确度较高。我们发现 model 组大鼠栓塞 4、72 h 的肺组织 FKN、TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 水平比 control 及 sham 组均显著升高, 而 Cur 干预后可显著降低上述 3 个炎症指标, 这与 Cur 可抑制肺 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 分泌^[15]相符。

我们发现 Cur 可抑制 TNF- α 刺激 HUVEC 的 FKN mRNA 及蛋白表达^[4], 而有研究也认为, IL-1 或 TNF- α 体外刺激内皮细胞后, FKN 表达显著上调^[6]。我们推测当血栓进入肺动脉后, 缺血缺氧使局部产生炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 等, 激活肺血管壁内皮细胞上的 FKN 表达, 促使白细胞在血管内皮上的黏附, 损伤内皮细胞, 参与血栓形成, 而 Cur 通过抑制血清 FKN 和肺的 FKN、TNF- α 、IL-1 β , 抑制炎症, 减缓栓塞的加重, 从而起到保护肺的作用。综上所述, Cur 能降低 PTE 大鼠肺组织的 FKN 水平, 改善肺病理损害, 对大鼠有保护作用。

参 考 文 献

- 1 Watts JA, Gellar MA, Obratsova M, et al. Role of inflammation in right ventricular damage and repair following experimental pulmonary embolism in rats. *Int J Exp Pathol*, 2008, 89 (5): 389-399.
- 2 Todorova D, Sabatier F, Doria E, et al. Fractalkine expression induces endothelial progenitor cell lysis by natural killer cells. *PLoS One*, 2011, 6 (10): e26663.
- 3 Matsumiya T, Ota K, Imaizumi, et al. Characterization of synergistic induction of CX3CL1 /fractalkine by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells: an essential role for TNF-alpha in post-transcriptional regulation of CX3CL1. *J Immunol*, 2010, 184 (8): 4205-4214.
- 4 王灵聪, 蒋慧芳, 朱佃香, 等. 姜黄素对 TNF- α 诱导人脐静脉内皮细胞 FKN 表达的干预作用. *中国中医药科技*, 2010, 17 (6): 517-518, 524.
- 5 蔡斌, 孙晨, 王灵聪, 等. 姜黄素对急性肺栓塞大鼠的影响. *浙江医学*, 2011, 33 (4): 457-459.
- 6 Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, et al. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 2008, 29 (18): 2276-2315.
- 7 Smith A, Quarmby JW, Collins M, et al. Changes in the levels of soluble adhesion molecules and coagulation factors in the patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*, 1999, 82 (6): 1593-1599.

- 8 Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 1997, 385 (6617): 640-644.
- 9 Frong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*, 1998, 188 (8): 1413-1419.
- 10 王蕾,李廷谦,向国霞,等. 糖皮质激素对内毒素致急性肺损伤大鼠肺组织 Fractalkine 表达的影响. *四川大学学报(医学版)*, 2006, 37 (2): 250-253.
- 11 陈小菊,程德云,杨莉,等. 缺氧大鼠血清和肺内 fractalkine 的变化. *中华结核和呼吸杂志*, 2006, 29 (1): 54-55.
- 12 张雅婷,陈魁,阎西艳,等. 贝那普利对冠心病患者血清可溶性不规则趋化因子和肿瘤坏死因子 α 的影响. *郑州大学学报(医学版)*, 2010, 45 (2): 244-246.
- 13 Volin MV, Huynh N, Klosowska K, et al. Fractalkine-induced endothelial cell migration requires MAP kinase signaling. *Pathobiology*, 2010, 77 (1): 7-16.
- 14 王希晶,吴秉毅,吴海燕,等. 造血干细胞移植术后可溶性不规则趋化因子与急性移植物抗宿主病关系的初步研究. *南昌大学学报(医学版)*, 2011, 51 (3): 24-27.
- 15 Santel T, Pflug G, Hemdan NY, et al. Curcumin inhibits glyoxalase1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PLoS One*, 2008, 3 (10): e3508.
- 16 Harrison JK, Jiang Y, Wees EA, et al. Inflammatory agents regulate in vivo expression of fractalkine in endothelial cells of the rat heart. *J Leukoc Biol*, 1999, 66 (6): 937-944.

(收稿日期:2011-11-03)

(本文编辑:王思师)

王灵聪,黄立权,孙晨,等. 姜黄素对肺血栓栓塞症大鼠肺组织不规则趋化因子的影响 [J/CD]. *中华危重症医学杂志:电子版*, 2011, 4 (6): 357-363.