

姜黄素对缺血性脑室周围白质软化新生大鼠的脑保护作用

何柳芳 陈惠金 钱龙华 陈冠仪

上海交通大学医学院附属新华医院 上海市儿科医学研究所(上海 200092)

摘要: 目的 体内评估姜黄素对缺血性脑室周围白质软化(PVL)新生大鼠的脑保护作用。方法 通过双侧颈总动脉结扎制备2日龄缺血型PVL新生大鼠动物模型。将新生大鼠分为假手术组(sham组)、缺氧缺血组(HI组)、缺氧缺血前用药组(HI前用药组)和缺氧缺血后用药组(HI后用药组)。在双侧颈总动脉结扎前和后应用姜黄素50 mg/(kg·d),制模后48 h取材,分别观察脑病理组织学变化,检测氧化/抗氧化物质,检测Bcl-2、Bax以及剪切型Caspases-3、9蛋白表达。**结果** 脑病理显示两个用药组的脑白质病变较HI组明显改善,其中重度白质病变的发生率分别较HI组降低了62.5%和43.8%,另有12.5%的脑白质完全正常;免疫组化显示用药组脑内的O4阳性少突胶质细胞(OL)前体和髓鞘碱性蛋白(MBP)阳性成熟OL的积分光密度(IOD)值均较缺氧缺血组显著增高;姜黄素明显抑制由缺氧缺血引起的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和过氧化物酶(CAT)活性的下降、谷胱甘肽(GSH)含量减少,以及丙二醛(MDA)含量升高;用药组的Bcl-2合成量亦较HI组明显增加,Bax以及Caspases-3、9活化片段的合成量均较HI组明显减少。**结论** 姜黄素对缺氧缺血引起的脑白质损伤具有良好的保护作用,与其调节脑内的抗氧化系统、以及调节脑内的凋亡相关蛋白的表达有关。

[临床儿科杂志,2011,29(9):863-867]

关键词: 姜黄素; 缺血; 脑室周围白质软化; 大鼠

中图分类号: Q95-3

文献标志码: A

文章编号: 1000-3606(2011)09-0863-05

Cerebralprotective effect of curcumin on neonatal rats with ischemic periventricular leukomalacia HE Liu-fang, CHEN Hui-jin, QIAN Long-hua, CHEN Guan-yi (Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the cerebralprotective effect of curcumin on neonatal rats with ischemic periventricular leukomalacia (PVL) *in vitro*. **Methods** The models of ischemic two-day-old neonatal rats were established by ligating bilateral common carotid arteries. The neonatal rats were divided into the sham group, hypoxic-ischemic (HI) group, pre-treat with curcumin before HI group and post-treat with curcumin after HI group. The neonatal rats were given curcumin at a dose of 50 mg/kg·d before or after ligating bilateral common carotid arteries. The assessment of cerebral pathology, the detection of the oxidation/anti-oxidation materials, and the analysis of the expression of Bcl-2/Bax and cleaved-Caspases-3, 9 were undertaken in 48 hours after the surgery. **Results** The pathological changes in cerebral white matter were improved significantly in both of the curcumin groups compared to those in the HI group with 62.5% and 43.8% of severe pathological changes and 12.5% of normal white matters, respectively. The IOD (integrated optical density) values of O4 (oligodendrocyte marker O4) and MBP (myelin basic protein) staining were increased, the activities of SOD (superoxide dismutases), GPx (glutathione peroxidase) and CAT (catalase) and level of GSH (glutathione) were increased, the level of MDA (malondialdehyde) was decreased, the expression of Bcl-2 was increased, the expression of Bax and the activation of caspase-3, 9 were decreased significantly in both of curcumin-groups compared to those in the HI group, respectively. **Conclusions** Curcumin exerts well protection on ischemia-induced white matter injury, and the effect may be related with its regulation on anti-oxidative defense system and the expression of apoptosis-associated proteins. (*J Clin Pediatr*, 2011, 29(9): 863-867)

Key words: curcumin; ischemia; periventricular leukomalacia; rat

脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)是早产儿脑损伤的主要类型之一,为早

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30672246)

通信作者: 陈惠金 电子邮箱: hjchenk@online.sh.cn

产儿死亡和其后发育障碍的主要原因。少突胶质细胞(OL)前体是早产儿发生PVL的主要靶细胞,在早产儿PVL的发病机制中起着关键作用。缺氧缺血是引起早产儿PVL的主要因素之一,早产儿脑白质对缺氧缺血损伤高度敏感,氧化应激诱导的损伤参与PVL的形成^[1]。迄今对PVL防治尚无有效方法。姜黄素是从姜黄中提取的酚类物质,研究表明姜黄素具有抗氧化、抗缺血、抗炎等广泛的药理作用^[2-4]。在本系列研究前期的体外实验中,已发现姜黄素对H₂O₂诱导的OL前体氧化应激损伤具有良好的保护作用。本研究进一步从体内研究探讨姜黄素对缺血性PVL新生大鼠的脑保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

新生2日龄Sprague-Dawley(SD)大鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪2003-0002),无性别选择,随机分为4组:假手术组(sham组)、缺氧缺血组(HI组)、缺氧缺血前预用姜黄素组(HI前用药组)和缺氧缺血后即刻用姜黄素组(HI后用药组),每组8只。所有新生大鼠置于室温环境,相对湿度60%~70%,由母鼠自由哺乳。

1.2 主要试剂和仪器

O4单克隆抗体(R&D),髓鞘碱性蛋白(MBP)单克隆抗体(R&D),生物素标记羊抗小鼠IgM(北京博奥森公司),SABC免疫组化试剂盒(北京中杉公司),超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化物酶(CAT)和丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(南京建成生物研究所),倒置相差显微镜(Nikon TE-2000-S),全波长酶标仪和垂直电泳仪(Bio-Rad公司),石蜡切片机(上海医疗仪器设备厂),恒温冰冻切片机(Lecia)等。

1.3 缺血性PVL模型制备^[5]和用药方法

2日龄SD新生大鼠术前称重,乙醚麻醉后,仰卧位固定,75%酒精消毒颈部皮肤,沿正中线皮肤切口,用6.0号丝线结扎双侧颈总动脉,缝合皮肤,涂抹火棉胶。待麻醉苏醒后,放置母鼠身边恢复2h,随后置37℃、湿度约70%的常压恒温缺氧箱中,输入8%O₂和92%N₂混合气体缺氧30min,流量为1~2.5L/min。缺氧完成后,将动物放回母鼠身边。HI前用药组于术前1h经腹腔注射姜黄素50mg/(kg·d),HI后用药组于模型制备后即

刻经腹腔注射姜黄素50mg/(kg·d)。

1.4 检查方法

1.4.1 病理检查 脑组织标本经4%多聚甲醛固定至少24h,以视交叉和乳头体中部为切面行脑冠状切片,厚度约3~4mm,经石蜡包埋后切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下对脑室周围白质进行病理评估。参照Hisakazu等^[6]评分方法,拟定白质损伤评分标准,0度:正常;I度:白质轻度疏松,神经纤维排列不整齐(轻度异常);II度:白质严重疏松,神经纤维排列不整齐,有凝固性坏死和囊腔形成(重度异常)。

1.4.2 免疫组化分析 经常规制作免疫组化分析标本,O4和MBP单抗工作液加入比例均为1:100。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。应用Olympus倒置显微镜采图,Image-Pro Plus 5.0图像分析软件对图像进行分析。每张切片在200倍镜下,在脑室周围同一部位随机取3个视野采图,计算每个视野阳性染色的积分光密度(IOD),棕黄色提示为相应标记物呈阳性表达。

1.4.3 脑组织氧化/抗氧化物质检测 处死大鼠后快速取出脑组织,将脑组织以视交叉和乳头体中部为切面行冠状切片,称重后加入约10份体积的匀浆液,制成匀浆液,按照标准测试盒说明书采用分光光度法测定SOD、GSH-Px、CAT活力和GSH、MDA含量。

1.4.4 细胞凋亡相关蛋白检测 应用Western Blot法检测Bcl-2、Bax蛋白和Caspase-3、9活性片段表达。提取组织蛋白质,应用二喹啉甲酸(BCA)法测定总蛋白量,根据标准曲线计算出蛋白浓度。经蛋白质聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后,取出凝胶,并以湿法电转将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,分别用兔抗大鼠Bcl-2、Bax、Caspase-3、9多克隆抗体(1:1000)孵育过夜,再与HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5000)反应后,增强化学发光法显色,X线底片曝光显影。结果用图像处理仪进行灰度扫描分析,并以稳定表达的基因β-Tublin作为内参照。

1.5 统计学分析

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS11.0统计软件分析。根据方差齐性检验结果,两组间比较采用两样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK;等级资料使用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对脑白质损伤的病理影响

2日龄新生大鼠于造模和施药后48h进行脑病理检查(表1,图1),结果显示,sham组大鼠脑皮质下神经纤维致密,走向整齐,未发现病理改变。HI组大鼠脑皮质下和脑室周围白质则病变明显,组织结构模糊,坏死疏松,神经纤维走向紊乱,呈网状、条索状,部分可见囊性空洞形成。两个用药组大鼠的脑损伤情况较HI组均明显改善,白质疏松和神经纤维排列紊乱明显好转,部分白质结构接近正常。

表1 光镜下脑白质损伤病理评估 [n(%)]

组别	0度	I度	II度
sham组	32 (100.00)	0 (0)	0 (0)
HI组	0 (0)	6 (18.75)	26 (81.25)
HI前用药组	4 (12.50)	22 (68.75)	6 (18.75)
HI后用药组	4 (12.50)	16 (50.00)	12 (37.50)

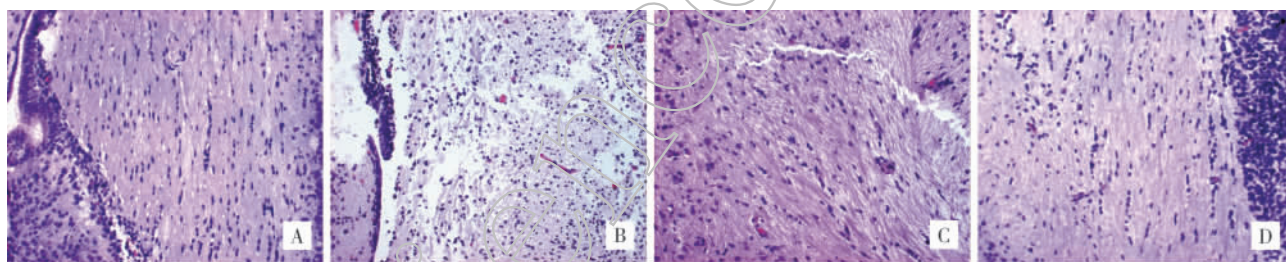
注: $\chi^2 = 87.55, P = 0.000$

2.2 姜黄素对脑白质 OL 前体的影响

OL前体是脑白质损伤的主要靶细胞。分别用O4和MBP标记OL前体和成熟OL细胞,并采用脑白质中O4和MBP染色的积分光学密度(IOD)对各组OL数量进行比较,结果显示(图2),sham组新生大鼠的脑组织中存在大量O4⁺和MBP⁺细胞,HI组大鼠脑组织中仅见少量O4⁺细胞和MBP⁺细胞,较sham组明显降低。HI前或后应用姜黄素则均能显著减轻因缺氧缺血所引起的O4⁺细胞和MBP⁺细胞数的减少,2个用药组各自的两种标记细胞IOD值均较HI组显著增高。两用药组之间两种标记细胞IOD值的差异无统计学意义(O4染色IOD值比较: $F = 3.23, P = 0.128$; MBP染色IOD值比较: $F = 3.48, P = 0.117$)。

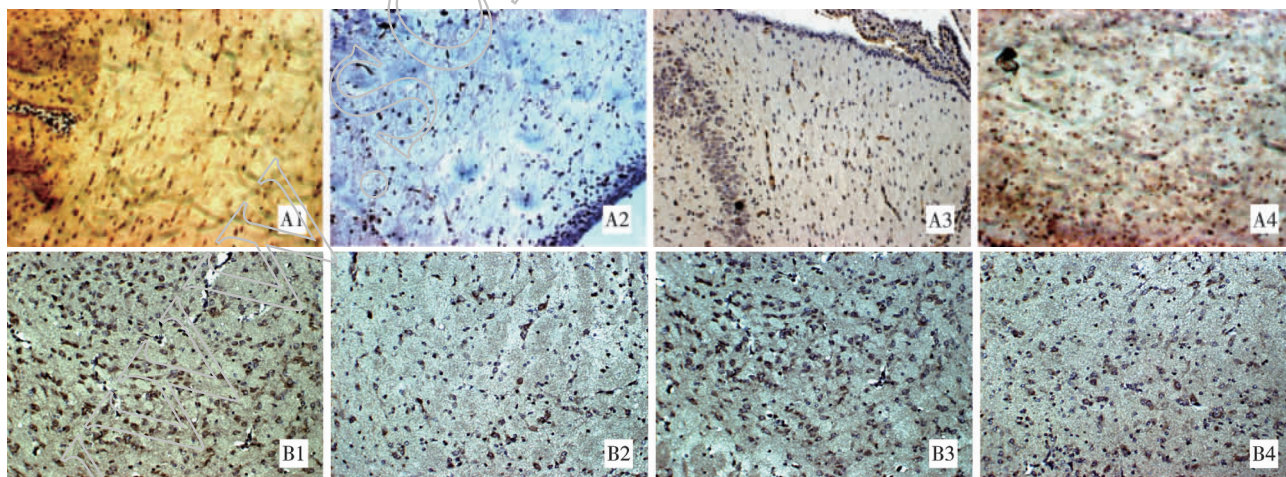
2.3 姜黄素对脑组织氧化/抗氧化物质的影响

2日龄新生大鼠于造模和施药后48h脑组织氧化/抗氧化物质与sham组相比,HI组大鼠脑内SOD、GPx和CAT活性及GSH含量均显著降低,而MDA含量明显升高(P 均 < 0.01)。见表2。HI前或后应用姜黄素均可明显阻止SOD、GPx活性下降和GSH含量减少,并明显抑制MDA含量升高



A. sham组; B. HI组; C. HI前用药组; D. HI后用药组

图1 新生大鼠光镜下脑白质病理($\times 200$)



A为O4阳性标记物免疫组化照片,深棕色表示O4阳性的OL前体,A1.sham组,A2.HI组,A3.HI前用药组,A4.HI后用药组。B为MBP阳性标记物免疫组化照片,深棕色表示MBP阳性的成熟OL,B1.sham组,B2.HI组,B3.HI前用药组,B4.HI后用药组

图2 新生大鼠脑白质免疫组化照片($\times 200$)

表 2 各组大鼠 SOD、GPx 和 CAT 的活力及 GSH、MDA 的含量

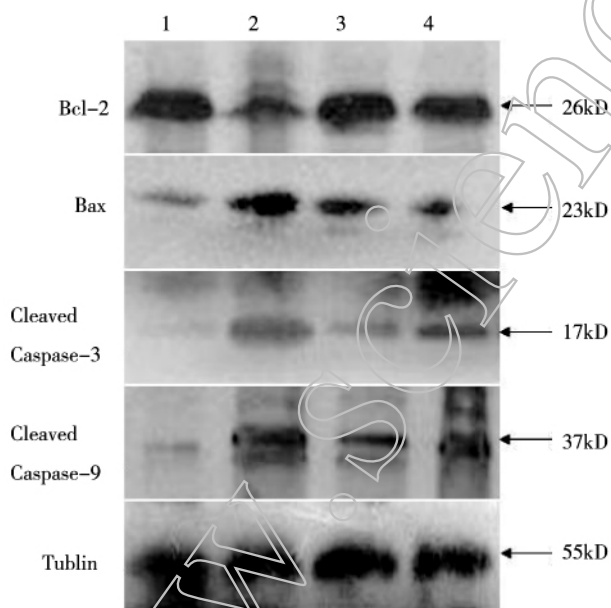
组别	只数	SOD (U/mg)	GPx (U/mg)	CAT (U/mg)	GSH (μmol/mg)	MDA (nmol/mg)
sham组	8	7.511 ± 1.829	8.653 ± 0.767	3.272 ± 0.732	1.283 ± 0.181	2.420 ± 0.413
HI组	8	2.285 ± 0.790	5.059 ± 0.749	1.929 ± 0.530	0.781 ± 0.173	3.945 ± 0.540
HI前用药组	8	6.522 ± 0.983	7.210 ± 0.640	2.534 ± 0.661	1.268 ± 0.217	2.838 ± 0.616
HI后用药组	8	6.055 ± 1.625	6.702 ± 0.341	2.609 ± 1.087	1.267 ± 0.196	3.055 ± 0.491
F值		17.212	52.034	3.967	13.087	12.237
P		0.000	0.000	0.018	0.000	0.000

注: 除 CAT 外, HI 组与各组比较, $P < 0.01$; HI 前或后用药两组间比较 $P > 0.05$; 除 GPx 外, sham 组与前或后用药组比较, $P > 0.05$

($P < 0.01$)。虽然姜黄素能抑制 CAT 活性的下降, 但与 HI 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。两个用药组在氧化/抗氧化物质之间的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 姜黄素对脑内 Bcl-2、Bax 蛋白及 Caspase-3、9 活化片段表达的影响

与 sham 组相比, HI 组大鼠脑内 Bcl-2 表达明显降低, Bax 表达明显增加, Caspase-3、9 激活亦明显增加。HI 前或后应用姜黄素则均能增加 Bcl-2 的表达和降低 Bax 的表达及 Caspases-3、9 的活化。见图 3。



1. sham 组; 2. HI 组; 3. HI 前用药组; 4. HI 后用药组; Tubulin 为对照

图 3 Western blot 检测姜黄素对 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3、9 表达的影响

3 讨论

PVL 是早产儿发生脑瘫和认知障碍的主要原因。目前对 PVL 的防治尚无有效方法。姜黄素是

一种具有强抗氧化作用的天然物质。目前已有学者观察了姜黄素应用于实验性心、脑、肾、肝、肺缺血再灌注的效果, 初步发现对发生缺血的脏器具有良好保护作用, 治疗机制主要为抗氧化应激。此外, 有研究发现姜黄素能阻止或延缓氧化应激诱导的老年性神经退化疾病如阿兹海默病、帕金森病的进展^[7,8]。但是有关姜黄素对新生儿未成熟脑缺血损伤的潜在保护作用尚不清楚。

本研究应用石蜡病理切片和 O4、MBP 标记染色来评估脑白质损伤情况, 结果显示双侧颈总动脉结扎后缺氧 30 min 能够引起 2 日龄大鼠在造模和施药后 48 h 脑组织白质的广泛损伤, 包括白质疏松、神经纤维排列紊乱, 大量 O4 和 MBP 阳性 OLs 丢失。证实缺氧缺血可引起严重的 OLs 损伤, 本模型的创建是成功的。一些研究证实姜黄素对大鼠脑缺血损伤具有保护作用, 但这些研究主要集中于神经元损伤而非白质损伤^[9,10]。本研究发现, 应用姜黄素能显著改善缺氧缺血引起的白质疏松和神经纤维排列紊乱的病理变化, 减少缺氧缺血引起的 O4、MBP 阳性 OLs 的丢失, 保护缺氧缺血诱导的脑白质损伤。本研究对缺氧缺血动物模型仅进行了短期观察, 姜黄素是否具有长期的保护效果以及可否改善缺氧缺血引起的行为缺陷, 尚有待进一步进行长时间的追踪观察实验。

本研究证实, 广泛的白质损伤与氧化应激直接相关。缺氧缺血后大鼠脑组织中 MDA 含量明显升高而 GSH 含量明显减少, 提示缺血缺氧使 ROS 产生过多, 引起氧化应激反应, 这与其他报道相一致^[3,11]。实验同时也发现, 缺氧缺血损伤后脑组织的抗氧化酶活性明显下降。应用姜黄素治疗后, 无论是缺氧缺血前用药还是缺氧缺血后用药, 都不仅显著降低 MDA 含量, 还明显抑制 SOD、CAT 和 GPx 活性下降以及抑制 GSH 含量减少。提示姜黄素能减少脑缺血缺氧后的氧化应激损伤。本研

究还发现,在缺血缺氧大鼠脑组织中,Bcl-2表达下降和Bax、Caspase-3、9活化增加,姜黄素的应用能提高Bcl-2的表达和抑制Bax的表达及Caspase-3、9的活化,提示至少在一定程度上,姜黄素保护脑缺血与调节凋亡相关蛋白的表达有关。

本实验中,我们采用2个不同的时间进行施药:缺氧缺血前用药和缺氧缺血后用药。结果发现,这缺氧缺血前或后用姜黄素,对脑白质损伤的保护效果相似,在提高脑组织抗氧化物质的活性和降低脂质过氧化作用的能力、对凋亡蛋白表达的调节作用上均无明显差别。因此,与缺氧缺血后用药比较,在缺氧缺血后应用姜黄素同样具有良好的保护效果。这对今后临床用药时期的选择将具有一定的指导意义。

综上所述,本研究证实氧化应激参与了脑白质的病理生理过程,应用姜黄素能减轻OLs损伤,其保护作用与调节抗氧化系统和凋亡相关蛋白有关。

参考文献:

- [1] Welin AK, Sandberg M, Lindblom A, *et al.* White matter injury following prolonged free radical formation in the 0.65 gestation fetal sheep brain [J]. *Pediatr Res*, 2005, 58(1):100-105.
- [2] Kaur G, Tirkey N, Bharrhan S, *et al.* Inhibition of oxidative stress and cytokine activity by curcumin in amelioration of endotoxin-induced experimental hepatotoxicity in rodents [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 145(2):313-321.
- [3] Al-Omar FA, Nagi MN, Abdulgadir MM, *et al.* Immediate and delayed treatments with curcumin prevents forebrain ischemia-induced neuronal damage and oxidative insult in the rat hippocampus [J]. *Neurochem Res*, 2006, 31(5): 611-618.
- [4] Mandal MN, Patlolla JM, Zheng L, *et al.* curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(5):672-679.
- [5] Cai Z, Lin S, Fan LW, *et al.* Minocycline alleviates hypoxic-ischemic injury to developing oligodendrocytes in the neonatal rat brain [J]. *Neuroscience*, 2006, 137(2): 425-435.
- [6] Uehara H, Yoshioka H, Nagai H, *et al.* Doxapram accentuates white matter injury in neonatal rats following bilateral carotid artery occlusion [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 281(2-3):191-194.
- [7] Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, *et al.* Curcumin labels amyloid pathology *in vivo*, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model [J]. *J Neurochem*, 2007, 102(4):1095-1104.
- [8] Jagatha B, Mythri RB, Vali S, *et al.* Curcumin treatment alleviates the effects of glutathione depletion *in vitro* and *in vivo*:therapeutic implications for Parkinson's disease explained via *in silico* studies [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(5):907-917.
- [9] Thiagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats [J]. *Life Sci*, 2004, 74(8):969-985.
- [10] Zhao J, Zhao Y, Zheng W, *et al.* Neuroprotective effect of curcumin on transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2008, 1229:224-232.
- [11] Candelario-Jalil E, Alvarez D, Merino N, *et al.* Delayed treatment with nimesulide reduces of oxidalive stress following global ischemic brain injury in gerbils [J]. *Neurosci Res*, 2003, 47(2):245-253.

(收稿日期:2010-12-23)

上海新华儿科呼吸论坛学习班招生通知

国家级继续教育项目——《上海新华儿科呼吸论坛》(项目编号:J25-11-08)定于2011年11月12日—11月13日举办。本次论坛将围绕儿童呼吸系统疾病临床及基础研究新进展展开讨论,涉及儿童哮喘、呼吸道感染、支气管镜技术、肺功能等,并对儿童支原体感染的有关问题进行专题进行专题讨论。邀请国内著名专家授课,内容精彩丰富。本次论坛共30学时,授予一类学分10分,学费850元(含教材费100元),住宿、交通费用自理。招生对象:儿科及相关学科的临床医师及专业技术人员。联系地址:上海市控江路1665号上海交通大学医学院附属新华医院儿童呼吸科;联系人:楼冰倩;邮编:200092;联系电话:021-25076424。