

姜黄素预处理后大鼠急性腹膜炎腹膜肿瘤坏死因子 α 的检测

张秀丽^{1,2}, 马健飞¹, 吴咏今², 樊怡¹, 董齐¹, 王力宁¹

(1. 中国医科大学 附属第一医院肾内科, 沈阳 110001; 2. 本溪市铁路医院 内科, 辽宁 本溪 117000)

摘要:目的 揭示姜黄素在由表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*)所致的腹膜炎中对实验动物腹膜肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达的影响。方法 大鼠腹腔注射表皮葡萄球菌诱发急性腹膜炎,采用 Western blot 和逆转录聚合酶链反应,分别在造模后 3、6、12、24 和 48 h 各时点检测姜黄素处理组与无姜黄素处理组大鼠腹膜 TNF- α 蛋白和 mRNA 的表达情况。结果 大鼠腹膜 TNF- α 蛋白和 mRNA 的表达自感染后 6~24 h 出现时间依赖性升高。与无姜黄素处理组相比,姜黄素处理组实验动物腹膜 TNF- α 蛋白和 mRNA 表达降低。此外,姜黄素处理组腹膜细胞损伤较无姜黄素处理组轻。结论 姜黄素在由表皮葡萄球菌引起的急性腹膜炎中具有保护作用。

关键词: 腹膜透析;姜黄素;急性腹膜炎;表皮葡萄球菌;肿瘤坏死因子 α ;大鼠

中图分类号: R256.6 文献标志码: A 文章编号: 0258-4646(2009)10-0749-02

TNF- α Expression in the Peritoneum of Curcumin Pretreated Acute Peritonitis Rat

ZHANG Xiu-li^{1,2}, MA Jian-fei¹, WU Yong-jin², FAN Yi¹, DONG Qi¹, WANG Li-ning¹

(1. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Internal Medicine, Rail-Way Hospital of Benxi, Benxi 117000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of curcumin treatment on the expression of TNF- α in the peritoneum of acute peritonitis rats. **Methods** The rats were intraperitoneally injected *Staphylococcus epidermidis* (*S.epidermidis*) for the modelization of acute peritonitis. After a survival time of 3, 6, 12, 24 and 48 hours, TNF- α expression in the peritoneum was detected by Western blot and RT-PCR in the rats of curcumin treatment group and non-curcumin treatment group. **Results** TNF- α expression showed time-dependent increase at 6, 12, 24 hours after the infection in the non-curcumin treatment group. In curcumin treatment group, TNF- α expression decreased at 6, 12, 24 hours after infection compared to non-curcumin treatment group. **Conclusion** Curcumin may be a protective agent in acute peritonitis induced by *S.epidermidis*.

Key words: peritoneal dialysis; curcumin; acute peritonitis; *Staphylococcus epidermidis*; tumor necrosis factor- α ; rat

腹膜透析是治疗终末期肾脏疾病的重要手段。在长期的腹膜透析过程中,不可避免地发生腹膜透析相关性腹膜炎。透析相关性腹膜炎会引起炎症细胞浸润及细胞外基质的沉积,最终导致透析失败。表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, *S.epidermidis*)腹膜炎是最常见的透析相关性腹膜炎,其病因主要为导管附近感染^[1]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是机体在受到病毒、内毒素脂多糖、细菌胞壁二肽、某些细胞因子和在体内能刺激单核巨噬系统增生的非特异性佐剂等因素作用后,产生最快、到达高峰时间最短的炎性介质^[2]。有报道表明,TNF- α 在腹膜间皮细胞存在表达,并在腹膜炎的炎症过程中起着重要的作用^[3]。姜黄素(curcumin)是姜黄(姜科植物)的根茎,作为一种药用植物最早记载于公元659年苏敬等撰写的《新修

草本》。具有行气破瘀、散风活血止痛之功效,临床多用于胸肋刺痛、闭经、风湿肩臂疼痛、跌打肿痛等。姜黄素被认为可以抑制体外肿瘤细胞的生长,因此近年来关于姜黄素抗肿瘤方面的研究一直是领域内的热点。随着研究的深入,人们发现姜黄素还具有免疫调节和抗炎作用^[4]。有研究表明,姜黄素在一些炎症中被证明可以影响TNF- α 的表达,进而发挥其免疫调节的作用^[5]。但是,其在由表皮葡萄球菌所致的急性腹膜炎中会有何种作用,目前尚不清楚。本研究旨在揭示姜黄素在急性表皮葡萄球菌腹膜炎中对TNF- α 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物、模型制备及取材

36只雄性SD大鼠(体质量250~300g)随机分为姜黄素处理组及无姜黄素处理组,每组18只。无姜黄素处理组大鼠腹腔注射生理盐水,姜黄素处理组大鼠腹腔注射表皮葡萄球菌溶液(10^7 /ml菌落形

作者简介:张秀丽(1972-),女,硕士研究生。

通讯作者:马健飞, E-mail: mjiangfei@medmail.com.cn

收稿日期:2009-03-26

成单位,采用3.86%透析液稀释)^[6]。姜黄素处理组在注射表皮葡萄球菌前24h,预先腹腔注射姜黄素(1mg/kg)。实验动物分别于感染后3、6、12、24和48h后,断头处死并迅速取出腹膜,存入-80℃深冻冰箱用于Western blot和逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测。

1.2 Western blot 检测

样品剪碎后加入裂解液4℃过夜。考马斯亮蓝法进行蛋白定量,各组取等量蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并转至PVDF膜上,脱脂奶粉溶液封闭3~7h;一抗孵育过夜(4℃);二抗常温下孵育2h;后进行显色、曝光、胶片扫描、定量分析。

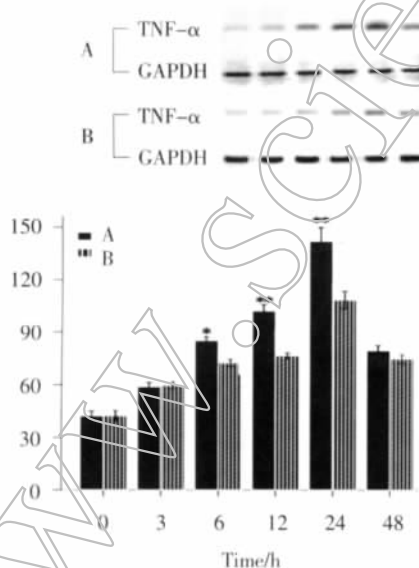
1.3 RT-PCR 检测

采用Trizol一步法提取大鼠腹膜总RNA,然后进行逆转录。采用引物为5'-GCAGCCTTGCC-CTTGA-3', 5'-GCCACCACGCTCTTCTG-3'。PCR扩增后,PCR扩增产物用3%琼脂糖凝胶进行电泳分离观察,成像,Image-pro Plus 6.0软件包分析。

2 结果

2.1 TNF-α 蛋白的表达

TNF-α蛋白的表达水平在感染后6~24h呈时间依赖性上升(图1)。与非姜黄素处理组相比,姜黄素处理组TNF-α蛋白的表达含量在感染后6、12和24h 3个时点均明显下降($P < 0.05$)。



A, non-curcumin treatment group; B, curcumin treatment group.

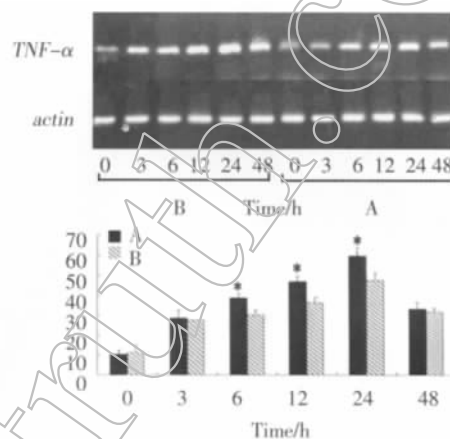
Compared with non-curcumin treatment group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$.

图1 大鼠腹膜 TNF-α 蛋白的表达

Fig.1 A representative Western blot image of the TNF-α proteins in non-curcumin treatment and curcumin treatment rats' peritoneum

2.2 TNF-α mRNA 表达

TNF-α mRNA 的表达趋势与 TNF-α 蛋白的表达是一致的,在感染后6~24h呈时间依赖性上升(图2)。与非姜黄素处理组相比,在感染后6、12和24h 3个时点,姜黄素处理组 TNF-α mRNA 表达明显减少($P < 0.05$)。



A, non-curcumin treatment group; B, curcumin treatment group.

Compared with non-curcumin treatment group, * $P < 0.05$.

图2 大鼠腹膜 TNF-α mRNA 的表达

Fig.2 A representative RT-PCR image of the TNF-α mRNA in non-curcumin treatment and curcumin treatment rats' peritoneum

3 讨论

急性腹膜炎是腹膜透析过程中的常见并发症,也是导致腹膜透析失败的常见原因。姜黄素可以减轻革兰阳性球菌败血症模型大鼠的组织损伤,降低其死亡率^[7]。我们曾应用免疫组织化学技术从形态学的层面发现了急性腹膜炎中 TNF-α 的改变。本研究从蛋白以及 mRNA 水平证实姜黄素在表皮葡萄球菌腹膜炎的过程中可以下调 TNF-α 的表达,对炎症起着保护作用。

TNF-α 可以抑制组织纤溶酶原激活物的释放及诱导纤溶酶原激活物抑制剂的分泌而抑制纤溶反应,同时促进次黄嘌呤大量生成,产生大量氧自由基及一氧化氮造成组织细胞破坏^[8]。说明 TNF-α 在炎症中的表达可能与腹膜纤维化的发生发展相关,而研究证实,姜黄素在由表皮葡萄球菌诱发的急性腹膜炎中可以下调 TNF-α 的表达。因此我们产生姜黄素可能抑制腹膜透析中腹膜纤维化的发生和发展的假设。

总之,本研究中姜黄素在由表皮葡萄球菌诱发

(下转第757页)

Wnt/Frizzled 信号分子参与了该时期牙胚细胞分化的调节。形态学上,成釉细胞和成牙本质细胞的分化成熟过程也是细胞的极化过程,Frizzled 蛋白在此过程中的阳性表达可能与细胞的极化有关。

Wnt 蛋白与受体 Frizzled 蛋白结合能够活化细胞内的支架蛋白 Dvl^[9],并通过下游的 3 种途径进行信号传递,调节细胞活动^[5,10]。其中,Wnt/ β -catenin 途径是通过调节 β -catenin 的稳定和核内转运,以调节目基因的活性^[10]。有研究证明,Wnt/ β -catenin 信号能够抑制牙髓干细胞向成牙本质细胞样细胞的分化^[11]。看来 Wnt/ β -catenin 途径不是成釉细胞和成牙本质细胞分化成熟的主要调节通路。Wnt/Frizzled 信号蛋白的 PCP 途径,能够影响下游的细胞骨架蛋白^[9]。因此推测由 Wnt/Frizzled 信号激活的 Wnt/PCP 途径可能参与了成釉细胞和成牙本质细胞的极化过程的调节。

参考文献:

- [1] Pispis J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis[J]. *Dev Biol* 2003, 262(2): 195-205.
- [2] Dassule HR, McMahon AP. Analysis of epithelial - mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth[J].

Dev Biol, 1998, 202(2): 215-227.

- [3] Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation [J]. *Adv Dent Res* 2001, 15(1): 14-18.
- [4] Hsieh JC, Rattner A, Smallwood PM, et al. Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(7): 3546-3551.
- [5] Brennan KR, Brown AM. Wnt proteins in mammary development and cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004, 9(2): 119-131.
- [6] Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development[J]. *Mech Dev*, 1999, 85(1-2): 197-200.
- [7] Liu F, Chu EY, Watt B, et al. Wnt/ β -catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis[J]. *Dev Biol* 2008, 313(1): 210-224.
- [8] Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haikel Y, et al. Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4 and WNT10b in the developing mouse first lower molar[J]. *J Histochem Cytochem* 2004, 52(1): 103-112.
- [9] Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity [J]. *Development* 2005, 132(20): 4421-4436.
- [10] Miller JR. The Wnts[J]. *Genome Biol* 2002, 3(1): 1-15.
- [11] Scheller EL, Chang J, Wang CY. Wnt/ β -catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation [J]. *J Dent Res* 2008, 87(2): 126-130.

(编辑 武玉欣 英文编辑 王又冬)

(上接第 750 页)

的急性腹膜炎中可以下调 TNF- α 的表达,并减轻腹膜炎过程中腹膜组织的细胞损伤。说明姜黄素在由表皮葡萄球菌诱发的急性腹膜炎中起着保护作用。

参考文献:

- [1] Baciulis V, Jankauskiene A, Cerkauskienė B. Incidence of peritonitis and catheter exit site infection in children undergoing automatic continuous cyclic peritoneal dialysis [J]. *Medicina (Kaunas)* 2003, 39 (Suppl 1): 70-74.
- [2] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis [J]. *N Engl J Med* 2003, 348(2): 138-150.
- [3] Nakamura S, Tachikawa T, Tobita K, et al. Role of advanced glycation end products and growth factors in peritoneal dysfunction in CAPD patients [J]. *Am J Kidney Dis* 2003, 41(15): S61-S67.
- [4] Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic prop-

erties in laboratory studies and clinical trials [J]. *Antioxid Redox Signal* 2008, 10(7): 511-545.

- [5] Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin [J]. *J Clin Immunol* 2007, 27(24): 19-35.
- [6] Ni J, Moulin P, Gianello P, et al. Mice that lack endothelial nitric oxide synthase are protected against functional and structural modifications induced by acute peritonitis [J]. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14 (2): 3205-3216.
- [7] Siddiqui AM, Cui X, Wu R, et al. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [J]. *Crit Care Med* 2006, 34(4): 1874-1882.
- [8] 李冠兰, 刘先哲, 余晏. TNF- α 、IL-10、MMPs 与 MODS 关系的研究进展[J]. *山东医药* 2007, 47(14): 77-78.

(编辑 陈 姜 英文编辑 王又冬)