

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.022

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.022>

姜黄素对慢性低灌注大鼠的行为学功能保护作用

周婷¹, 李青叶², 黄菲菲¹, 侯明¹

(1. 武汉市东西湖区人民医院神经内科, 武汉 430040; 2. 湖北省中医院神经内科, 武汉 430040)

[摘要] 目的: 探讨姜黄素在慢性低灌注大鼠的神经功能保护作用。方法: 制备慢性脑缺血模型(2-VO)模型, 术后分别给予姜黄素(实验组)和磷酸盐缓冲液(PBS, 对照组)干预。术后8周后行Morris水迷宫评价大鼠的空间学习记忆功能变化。同时从Nissl染色观察大鼠神经细胞的变化; Western blot检测炎症因子IL-1 β 、TNF- α 的表达。结果: 实验组大鼠的空间学习记忆能力均较对照组明显改善, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Nissl染色发现实验组大鼠的缺血区神经元细胞与形态相对较为完整, 而对照组大鼠神经元形态不完整, 仅有散在的尼氏小体; 在姜黄素治疗后缺血区脑细胞中IL-1 β 、TNF- α 的含量明显降低($P < 0.05$)。结论: 姜黄素可以显著改善慢性脑缺血大鼠的空间学习记忆能力, 可能与其抗炎症反应相关。

[关键词] 姜黄素; 脑缺血; 水迷宫; 炎症因子; 神经保护

Experimental study of the curcumin in chronic cerebral ischemic rats

ZHOU Ting¹, LI Qingye², HUANG Feifei¹, HOU Ming¹

(1. Department of Neurology, People's Hospital of Wuhan East Lake, Wuhan 430040; 2. Department of Neurology, Chinese Medicine Hospital of Hubei Province, Wuhan 430040, China)

Abstract **Objective:** Explore the effect of curcumin on chronic cerebral ischemia in rats, and its possible mechanism. **Methods:** Chronic cerebral ischemia (2-VO) model were prepared and given curcumin or PBS after the surge. Eight weeks after the operation, Morris water maze were carried out to evaluate the learning and memory ability of the rats. The change of nerve cells were observed by Nissl staining; the expression of IL-1 β , TNF- α were detected by western blot. **Results:** The learning and memory ability of the curcumin group were significantly improved compared with the control group. The neurons pattern of curcumin treatment group was similar to the control group, while only scattered Nissl bodies were found the curcumin group; the expression of IL-1 β , TNF- α in curcumin treatment group were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion:** Curcumin can significantly improve the learning and memory ability of the chronic cerebral ischemic rat and its possible mechanism maybe involve in the anti-inflammation in neurons.

Keywords curcumin; cerebral ischemia; Morris water maze; inflammatory cytokine; neuro-protection

收稿日期 (Date of reception): 2015-04-16

通信作者 (Corresponding author): 李青叶, Email: zhouting1230@yeah.net

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是一种慢性脑血管疾病,以进行性认知功能障碍和记忆损害为临床特征,是一种严重的脑神经系统退行性疾病。大量的资料^[1]提示慢性脑供血不足在VD的病理发生发展中起着重要的作用。随着人口老龄化的发展,VD已经成为影响老年人健康以及生活质量的一个重要疾病,随着医学科学的进步,有关其研究取得了重大进展,但可惜的是仍缺乏有效的治疗药物^[2-3]。

姜黄素(curcumin)是提取自姜科姜黄素属植物的根茎,可作为食用色素使用,具有安全性高、毒副作用小的优点^[4-5]。前期研究^[6-7]表明其不仅可以作为食品添加剂以及香料,还对疾病有一定的治疗和预防作用,逐渐成为人们研究的热点。姜黄素具有抗氧化应激、抗炎、抗癌等作用。且近年来有研究^[8-9]表明姜黄素可用于帕金森疾病、阿尔茨海默病等神经退行性疾病,但是有关其对于血管性痴呆(VD)的研究却相对罕见。

2-VO是经典的慢性脑缺血模型,其可以有效的模拟机体脑血流不足后发生发展为VD的一系列病理生理变化,比较适合于VD的基础研究^[10]。本试验首先诱导慢性脑缺血模型大鼠,并经胃肠道给予姜黄素干预,首先观察大鼠的空间学习记忆能力的变化,并从颅内缺血区细胞的形态和常见炎症因子IL-1 β 、TNF- α 的表达来探讨其可能的机制,为临床应用姜黄素治疗慢性缺血性脑血管病作一些有益的探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物以及分组

雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠,12~16周龄,60只,体重260~280 g,购自湖北省疾病预防控制中心。饲养于武汉大学动物实验中心,所有的实验过程均遵循湖北省实验动物管理和伦理委员会相关准则。适应性饲养后7 d,准备制作2-VO模型。术前12 h禁食不禁水,用10%水合氯醛(0.35 mL/kg)腹腔注射麻醉,颈部常规消毒铺巾后,取颈部正中切口,逐层钝性分离双侧颈总动脉,并游离之。双重丝线结扎,术后缝合皮肤。随机分为假手术组和手术组,假手术组只分离出双侧颈总动脉(没有后续结扎双侧颈总动脉)。手术后随机分为实验组和对照组,实验组灌胃姜黄素,3次/d,60 μ mol/L,10 mL/kg/d,对照组给予等容量的PBS溶液,每天干预一次,至术后8周。术后死亡大鼠

共计11只,其中手术组6只,对照组5只。

1.2 水迷宫测试

水迷宫为直径120 cm圆形不锈钢水池,水深30 cm。检测方法参照前述^[10]。按照水迷宫的圆周注明4个入水点(E、S、W、N),将水迷宫分为4个等分,在任一等分中放入一个平台,直径6 cm,高28 cm,在水迷宫中加入温度约为23~25 $^{\circ}$ C的热水和牛奶的混合物,高度高过平台2 cm。术后8周进行Morris水迷宫检测^[7]。实验分为二个阶段,第一阶段,定位航行实验:共进行5 d,每次将大鼠面向池壁随机选取东北(NE)、西北(NW)、西南(SW)、东南(SE)等4个象限点中一个为入水点,测其60 s内成功进驻平台的轨迹图及所需时间。如在60 s内大鼠不能成功进驻平台,则实验者将其引上平台并令其停留15 s。记录逃避潜伏期为60 s,每次训练间隔时间为60 s。第二阶段,空间探索试验:实验最后1 d,撤除平台,从SW象限点作为入水点,将大鼠放入水中,记录30 s内大鼠在NE象限的游泳时间和游泳轨迹。

1.3 取材脑组织及Nissl染色

大鼠在进行完水迷宫测试后行灌注取脑,在水合氯醛麻醉下进行内灌注,取脑组织,包埋后冰冻切片,每个大鼠切10个切片,隔5张留取一片,将切好的脑片置于明胶中,然后将脑片贴到预先用明胶处理过的玻片上,自然风干,Nissl试剂染色、脱色、二甲苯透明,封片后在显微镜下观察计数。

1.4 Western blot检测IL-1 β 、TNF- α 的含量

按照western blot试剂盒的说明书进行,首先抽提蛋白,取蛋白裂解液和细胞裂解液按照1:9体积混合,吹打混匀,静止后取上清分装,检测蛋白浓度。内参照为 β -actin,利用胶片条带扫描分析,目标蛋白表达量=目标蛋白积分光密度值/ β -actin的积分光密度值。

1.5 统计学处理

大鼠Morris水迷宫结果用均数 \pm 标准误表示,余各组数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多样本间比较采用多因素的方差分析。采用SPSS11.0统计学软件对数据进行分析,两两比较采用均值 t 检验,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水迷宫测试测潜伏期

2.1.1 定位航行实验结果(图1)

定位航行试验潜伏期主要用于检测大鼠空间学习和记忆能力: 将各组大鼠每天四个象限的潜伏期取平均值即可得到各组大鼠每天的Morris水迷宫平均潜伏期。双因素方差分析(4×5)结果提示大鼠组间平均潜伏期的差异有统计学意义($P<0.05$), 表明干预因素和训练天数对大鼠Morris水迷宫潜伏期有影响。在训练的第2、3、4、5天假手术组潜伏期与手术组相比时间较短, 姜黄素组大鼠的潜伏期比PBS组明显缩短, 差异均有统计学意义($P<0.01$), 这说明姜黄素干预组大鼠学习记忆能力与PBS对照组大鼠相比较有显著的改善。

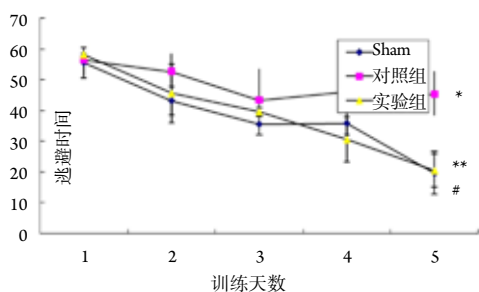


图1 各组定位航行实验潜伏期比较

Figure 1 Comparison of the navigation test latency in each group

There were statistically significant differences of the latency period among the sham group, the control group and the experimental group on the 2nd, 3rd, 4th, 5th day(*, **, $P<0.05$). Among them the average latency period were significantly shorter in the curcumin group than those in the PBS group ($P<0.01$).

2.1.2 空间探索实验结果(图2)

空间探索试验主要考察大鼠对平台的记忆能力: 记录各组大鼠在30 s内在原有平台的第一象限游泳时间, 取平均值, 代表大鼠对平台的记忆能力。单因素方差分析结果显示: 姜黄素组和PBS组相比较明显延长, 差异有统计学意义($P<0.001$), 这说明姜黄素组大鼠对平台的记忆能力较PBS组明显改善。

2.2 Nissl染色观察神经元损伤(图3)

通过病理切片Nissl染色观察大鼠的皮层神经细胞, 正常大鼠的神经元胞体呈圆形或者圆锥

形, 并且轮廓清楚, 胞浆染色清晰, 在神经细胞内可见多个尼氏小体, 姜黄素治疗组大鼠的神经细胞排列整齐, 未发现明显的神经元异常, 但是对照组大鼠经过Nissl染色发现神经元形态不完整, 层次不清, 仅有散在的尼氏小体存在。

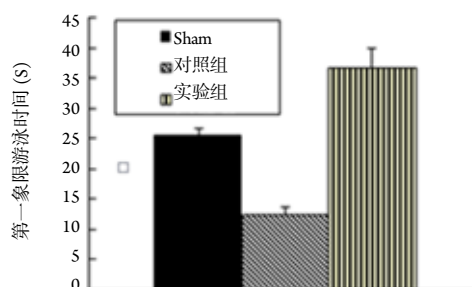


图2 各组空间探索实验第一象限游泳时间比较

Figure 2 Comparison of the first quadrant time in space exploration experiments in each group

There were statistically significant differences between the curcumin group and the control group. The time of the curcumin group were significantly shorter than that of the PBS group ($P<0.01$).

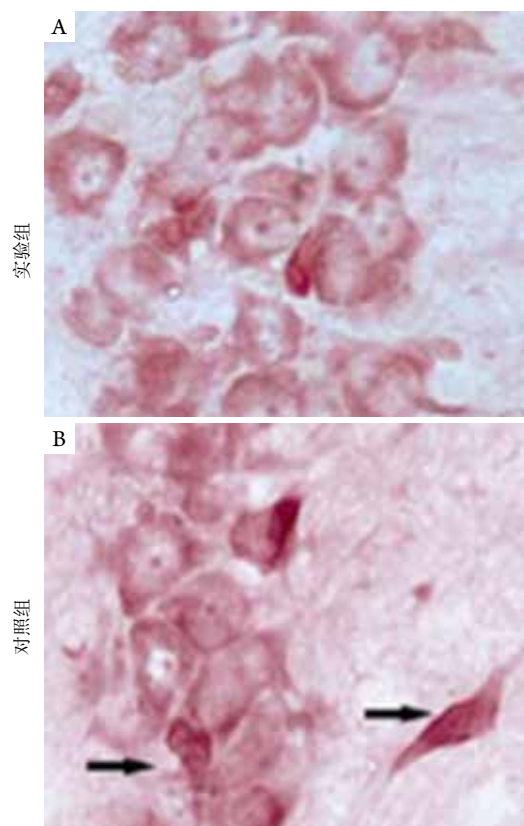


图3 各组大鼠神经细胞的Nissl染色(×400)

Figure 3 Results of the Nissl staining neurons of the two groups rats (×400)

2.3 IL-1 β 、TNF- α 的western blot检测(图4)

通过对各组大鼠的脑组织中IL-1 β 、TNF- α 的含量检测,发现对照组大鼠皮层中IL-1 β 的表达显著高($P<0.05$),而在姜黄素治疗后,大鼠皮层中IL-1 β 的表达较转基因对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),提示当大鼠发生VD时,脑内的炎症因子IL-1 β 表达会大量增加,而姜黄素的治疗可以有效的减少这一炎症因子的表达。TNF- α 的表达和变化趋势与IL-1 β 相同,即TNF- α 在对照组大鼠中表达最高,正常大鼠中最低,而在姜黄素治疗后TNF- α 的含量较对照组明显降低,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图4。

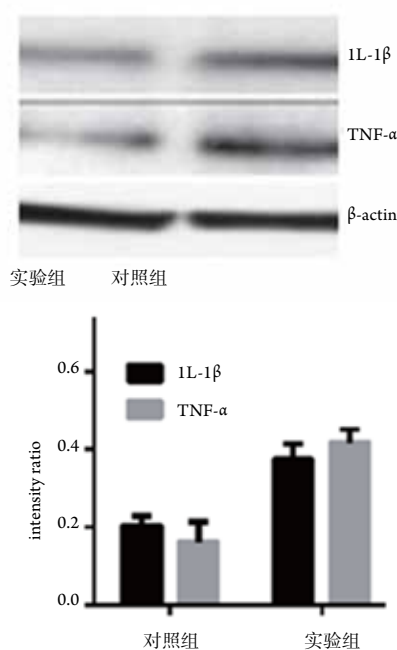


图4 IL-1 β 、TNF- α 的Western blot检测及其相对灰度值统计比较

Figure 4 Statistical comparison of the IL-1 β , Western blot detection of TNF- α and their relative gray value

The IL-1 β expression was significantly higher in the rat cortical of the control group ($P<0.05$), but the IL-1 β expression was significantly lower after curcumin treatment. The difference between the two groups were statistically significant.

2.4 大鼠的体重和毒副作用比较

为了明确姜黄素是否会使大鼠产生不良反应,我们在用药期间对大鼠的体重和毒副作用进行了检测,经过8周的喂养,我们发现各组大鼠的体重变化无显著差异,各组大鼠未发现明显的毒副作用。

3 讨论

痴呆是导致老年人认知功能衰退、生活质量降低的主要疾病之一,其主要的病理变化为血管淀粉样变以及神经元缺失^[11],其发病机制还未明确,但是大量的研究^[12-13]提示VD的发生可能与炎症反应以及神经元的凋亡有关。近年来,祖国中医药的发展为从多靶点、多层次、多方位治疗缺血性脑血管病提供了新的治疗方向,逐渐成为研究的热点。

姜黄素作为经典的祖国中医药之一,研究其对于动脉粥样硬化及血管功能已成为当今研究的热点之一。本实验中,我们首先制作了慢性脑缺血模型大鼠,再经胃肠道给予姜黄素进行连续干预。术后8周,我们进行Morris水迷宫检测了各组大鼠的空间学习和记忆行为能力,结果显示,姜黄素组大鼠的空间学习和记忆功能较PBS组有显著的改善。为了更直观的观察姜黄素对VD大鼠神经元的作用,我们进行了Nissl染色观察神经元损伤,发现姜黄素治疗可以明显减少神经损伤。随后为了进一步探索其可能的机制,我们检测了常见的炎症因子IL-1 β 、TNF- α 在缺血区脑组织炎症因子的表达。

接受姜黄素干预的大鼠空间学习和记忆功能改善的具体机制尚不清楚,推测可能有以下原因: 1)姜黄素可以有效的减轻神经细胞的形态学损伤,进而有利于减轻神经细胞的功能损伤。本实验中通过Nissl染色观察,发现姜黄素可以有效的减轻神经细胞的损伤,姜黄素治疗组大鼠的神经细胞排列整齐,未发现明显的神经元异常,但是对照组大鼠经过Nissl染色发现神经元形态不完整,层次不清,仅有散在的尼氏小体存在。2)姜黄素可以有效的发挥抗炎、抗免疫作用,从而进一步减轻神经细胞和血管内皮细胞的损伤,有利于发挥神经保护作用。本研究中,我们检测了IL-1 β 、TNF- α 这两种经典的炎症因子。结果发现,当大鼠发生VD时,脑内的炎症因子IL-1 β 、TNF- α 等表达会大量增加,而姜黄素的治疗可以有效的减少这些炎症因子的表达,各组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。3)姜黄素进入大鼠体内后通过某种特异未知受体,对缺血的神经元起到神经保护作用^[6,8]。神经元上可能有这种受体的表达,具体的机制不清。4)姜黄素还通过其他特别的机制,如抗吞噬作用、抗免疫、抗菌、改善脂代谢等机制,起到神经保护作用^[8-9]。5)其他各种未知因素。

综上所述, 姜黄素可以有效的改善VD大鼠的空间学习记忆能力, 减少炎症介质的产生, 改善神经元的凋亡, 作为治疗VD的一种药物, 目前主要应用于基础实验, 多项实验结果表明其可以达到一定的效果, 但是如果作为长期用药, 其安全性和有效性还需进一步的实验研究。祖国医学博大精深, 源远流长, 相信对于姜黄素的进一步研究, 不仅能促进祖国医学的发展, 也为寻求一种有效的药物治疗慢性缺血性脑血管病提供了新的思路。随着医学研究的进展, 其在慢性缺血性脑血管病的基础和临床研究领域将会有着更为广阔的应用前景。

参考文献

1. Elias MF, Sullivan LM, D'Agostino RB, et al. Framingham stroke risk profile and lowered cognitive performance[J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 404-409.
2. Stranahan AM, Mattson MP. Selective vulnerability of neurons in layer II of the entorhinal cortex during aging and Alzheimer's disease[J]. *Neural Plast*, 2010, 2010: 108190.
3. Wang X, Michaelis ML, Michaelis EK. Functional genomics of brain aging and Alzheimer's disease: focus on selective neuronal vulnerability[J]. *Curr Genomics*, 2010, 11(8): 618-633.
4. Choi DK, Koppula S, Suk K. Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products[J]. *Molecules*, 2011, 16(2): 1021-1043.
5. Rasoanaivo P, Wright CW, Willcox ML, et al. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions[J]. *Malar J*, 2011, 10 Suppl 1: S4.
6. Wilken R, Veena MS, Wang MB, et al. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 12.
7. Cherniack EP. Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome[J]. *Nutrition*, 2011, 27(6): 617-623.
8. Kyritsis AP, Bondy ML, Levin VA. Modulation of glioma risk and progression by dietary nutrients and antiinflammatory agents[J]. *Nutr Cancer*, 2011, 63(2): 174-184.
9. Marchiani A, Rozzo C, Fadda A, et al. Curcumin and curcumin-like molecules: from spice to drugs[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(2): 204-222.
10. 孔朝红, 刘煜敏, 朱江, 等. 内皮祖细胞对慢性脑缺血大鼠空间学习记忆影响的机制研究[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2010, 19(12): 1086-1089.
KONG Zhaohong, LIU Yumin, ZHU Jiang, et al. Behavioral studies on the effect of endothelial progenitor cells on the spatial learning and memory of chronic cerebral ischemic rats[J]. *Chinese Journal of Behavioral Medicine & Brain Science*, 2010, 19(12): 1086-1089.
11. Bulic B, Ness J, Hahn S, et al. Chemical Biology, Molecular Mechanism and Clinical Perspective of γ -Secretase Modulators in Alzheimer's Disease[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2011, 9(4): 598-622.
12. Bali J, Halima SB, Felmy B, et al. Cellular basis of Alzheimer's disease[J]. *Ann Indian Acad Neurol*, 2010, 13(Suppl 2): S89-S93.
13. Hill NL, Kolanowski AM, Gill DJ. Plasticity in Early Alzheimer's Disease: An Opportunity for Intervention[J]. *Top Geriatr Rehabil*, 2011, 27(4): 257-267.

本文引用: 周婷, 李青叶, 黄菲菲, 侯明. 姜黄素对慢性低灌注大鼠的行为学功能保护作用 [J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(6): 985-989. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.022

Cite this article as: ZHOU Ting, LI Qingye, HUANG Feifei, HOU Ming. Experimental study of the curcumin in chronic cerebral ischemic rats[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2015, 35(6): 985-989. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.022