

姜黄素对兔颈动脉斑块稳定性及 EPCs 活力的影响

付冰 焦晓民

(辽宁中医药大学附属第二医院心血管科, 沈阳, 110032)

摘要 目的:观察姜黄素对颈动脉斑块稳定性及内祖皮细胞(EPCs)的影响。方法:将 30 只新西兰兔随机分为空白对照组、模型组及姜黄素组,各 10 只,其中空白对照组予普通饲料喂养,模型组予喂养高脂饲料,姜黄素组予喂养高脂饲料 + 100 mg/d 姜黄素。连续喂养 12 周后 HE 染色法观察 3 组兔主动脉内膜斑块厚度、外周血总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)水平以及利用 MTT 法测定人纤维 EPCs 细胞迁徙及增殖活性。结果:1)血脂水平:与空白组比较,模型组及姜黄素组 TC、TG 及 LDL-C 均升高($P < 0.05$),HDL-C 降低($P < 0.05$),其中姜黄素干预后上述指标有明显改善($P < 0.05$)。2)形态学变化:空白对照组颈动脉壁厚薄均匀,结构均匀,模型组及姜黄素均出现动脉管腔狭窄,动脉内膜增厚,其中姜黄素组较模型组改善。3)EPCs 增殖情况:与空白组比较,模型组及姜黄素 OD 值均降低($P < 0.05$),与模型组比较,姜黄素 OD 有所上调($P < 0.05$)。4)EPCs 迁徙能力:空白对照组各时间点划痕愈合率均显著高于其余 2 组($P < 0.05$),其中姜黄素组各时间点划痕愈合率均高于模型组($P < 0.05$)。结论:姜黄素由明显抗动脉粥样硬化作用,其作用机制可能与促进 EPCs 增殖及迁徙有关。

关键词 颈动脉斑块;稳定性;EPCs;姜黄素;PI3K/AKT;信号通路

Curcumin on Stability of Rabbits' Carotid Plaques and Viability of EPCs

Fu Bing, Jiao Xiaomin

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

Abstract Objective: To observe the influence of curcumin on stability of rabbit carotid plaques and endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods:** Thirty New Zealand rabbits were randomly divided into a blank control group, a model group and a curcumin group, 10 cases in each. The blank control group had ordinary diet, the model group high fat diet, the curcumin group high fat diet plus 100 mg/d of curcumin. After continuous feeding for 12 weeks, thickness of aortic intima plaque, peripheral blood total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL-C), high density lipoprotein (HDL-C) levels of all rabbits were observed by HE staining and measured migration and proliferation activity of EPCs cell by MTT method. **Results:** 1) Lipid levels: compared with the blank group, TC, TG, and LDL-C were higher in the model group and the curcumin group ($P < 0.05$), HDL-C lower ($P < 0.05$), and after the intervention of curcumin, the above indicators improved significantly ($P < 0.05$). 2) Morphological changes: the thickness of carotid artery wall in the blank control group were uniform, and with uniform structure, and the model group and the curcumin group were with artery luminal stenosis, thickening of the arterial intima, and the curcumin group improved compared with the model group. 3) The EPCs proliferation: compared with the blank group, OD values of the model group and the curcumin group were lower ($P < 0.05$); compared with the model group, OD of the curcumin group increased ($P < 0.05$). 4) Capacity of EPCs migration: scratches healing rate of the blank control group at each time point were significantly higher than that of the other two groups ($P < 0.05$); the scratch healing rate of the curcumin group was higher than that of the model group at each time point ($P < 0.05$). **Conclusion:** Curcumin had obvious resistance effect on atherosclerosis, and the mechanism may be associated with the promoting of proliferation and migration on the EPCs.

Key Words Carotid plaques, Stability, EPCs, Curcumin

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.06.046

逐年增长的心脑血管事件发病率给人类生命健康带来沉重打击,其中动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是冠心病及缺血性脑梗死的主要独立危险因素,因此抗 AS 被视为治疗心脑血管事件的核心任

务^[1-2]。近年来,中草药以疗效显著、毒性低等生物效应被诸多生物、医学界工作者纳入研究,姜黄素属于姜黄中提取的酸性酚类物质,据目前已知资料证实姜黄素有明显抗 AS 效应,但其作用机制尚无统一

定论。内皮祖细胞(EPCs)是血管形成前体细胞,具有较强增殖能力并最终分化成血管内皮细胞,广泛参与血管新生及血管内膜修复等环节^[3],因此我们设想:姜黄素抗AS效应是否通过ERCs细胞增殖进行介导?为了证实这一观点我们进行一系列研究。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 取30只新西兰兔,平均体重(2.1 ± 0.19)kg,所有动物均由辽宁长生生物有限公司动物实验中心提供,饲养环境设置:室温(23 ± 2)℃,相对湿度(56 ± 6)%。

1.1.2 试剂与仪器 胆固醇粉购自上海国光生物有限公司,DMEM培养基购自美国Gibco公司,MTT即四甲基偶氮唑蓝购自Sigma公司,胰酶购自Bio-sharp公司,DMSO购自Sigma公司,96孔板,超净工作台购自苏州安泰公司,细胞恒温培养箱购自日本SANYO公司,酶标定量测定仪购自Thermo Multiskan AsCant公司,可调控温度离心机购自Eppendorf公司,流式细胞仪购自BD公司,姜黄素购自神威药业有限公司,猪油自行市场购买,蛋黄粉购自河南上宇公司。PI3K、AKT、 β -actin抗体均购自CST公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 30只新西兰兔随机分为空白对照组、模型组及姜黄素组,各10只。高脂饲料配方:10%蛋黄粉+5%猪油+1%胆固醇粉+84%常规兔饲料。即每100g饲料中含有10g蛋黄粉,5g猪油,1g胆固醇粉及84g常规饲料。除空白对照组予喂养纯常规饲料,模型组及姜黄素均予连续12周喂养高脂饲料,所有动物自由饮水,并设置12/12昼夜交替灯光周期。

1.2.2 干预方法 空白对照组及模型组予0.9%NaCl溶液(广西裕源药业有限公司,国药准字H45020977)以10mL/kg灌胃,姜黄素组亦以10mL/kg灌胃,3组均1次/d,连续给药4周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 血脂检测 给药4周后动物均禁食12h,次日清晨以0.3mL/kg水合氯醛麻醉动物后抽取空腹兔耳动脉血5mL,在4℃条件以5000r/min离心5min,抽取上清液待查,并用酶法检测动物TG、TC、HDL-C、LDL-C。

1.2.3.2 EPCs细胞的分离及培养 完成1.2.1步骤后于3组新西兰兔双侧胫骨平台抽取骨髓血,利用密度梯度离心法提取单核细胞,加4mL DMEM高

糖培养基,离心1000r/min×3min,弃去上清,加入5mL完全培养基(10%胎牛血清),用巴士吸管轻轻吹大,使细胞悬浮,接种于培养瓶中,置于37℃、5%CO₂孵箱中孵育,24h换液,弃去贴壁细胞,继续培养,待细胞铺满瓶底80%以上时,以0.25%的胰酶消化传代。

1.2.3.3 颈动脉取材 完成1.2.3.2抽取骨髓后于耳缘静脉注入空气处死3组新西兰兔,随后逐层剪开颈部皮肤暴露左颈总动脉,利用手术剪剪取长约2cm的动脉,置于提前配制好的0.1MPBS中反复清洗,随后将标本置于多聚甲醛后固定24h,在进行常规石蜡包埋、切片、染色,并在显微镜下观察形态学改变。

1.2.3.4 MTT法测细胞增殖情况 将处于对数生长期的EPCs细胞密度调整为 2×10^4 个/mL,接种于24孔板,37℃5%CO₂培养箱培养,将实验分为空白组、模型组、姜黄素组、各组6个复孔。每孔加入CCK2810μL,培育4h后每孔加入20μL 5g/L MTT,继续孵育4h后,吸弃上清,每孔加入DM-SO150μL,振荡10min,酶标仪在490nm波长处读取OD值。

1.2.3.5 细胞迁移划痕实验 将处于对数生长期的EPCs细胞密度调整为 2×10^4 个/mL,接种于24孔板,37℃5%CO₂培养箱培养,利用移液枪对细胞进行划“一”操作,每孔划分痕1次,随后用0.1MPBS冲洗3次,将悬浮非贴壁细胞尽量冲洗脱离,再加入培养液,再次置于37℃5%CO₂培养箱培养12h、24h及48h,随后显微镜下观察划痕愈合情况,划痕愈合率=(拍摄时划痕面积-初始面积)/初始面积×100%^[8]

1.2.3.6 Western-blot检测PI3K、AKT的表达 将收集的EPCs细胞收集加入100μL裂解液进行细胞分裂,放入4℃振荡器中持续震荡30min,并将液体用移液枪转移至事先预冷离心管,再次置于4℃离心机中以5000r/min转速进行离心15min,用移液枪将上清液抽取至新的离心管中备用。利用BCA试剂盒测定蛋白浓度,并在100℃水浴中进行蛋白变性7min,并计算上样量。事先配制好SDS-PAGE胶体,用移液枪将蛋白加之胶体中进行电泳,随后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,随后用脱脂奶粉进行封闭2h,用PBS清洗2次,10min/次,加1:500稀释的一抗(PI3K、AKT)及内参抗体(β -actin,1:3000)室温孵育2h,用PBS清洗2次,10min/次,随后加入辣根过氧化酶HRP-二抗,室温下轻摇2h取出继

表 1 各组血脂变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
空白组	10	1.19 ± 0.34	0.72 ± 0.13	1.57 ± 0.40	0.43 ± 0.15
模型组	10	3.26 ± 1.26 *	6.89 ± 1.37 *	0.49 ± 0.06 *	18.16 ± 4.25 *
阿伐他汀钙组	10	1.43 ± 0.77 * [△]	3.75 ± 1.08 * [△]	1.22 ± 0.38 * [△]	11.05 ± 3.27 * [△]

注:与空白组比较: * $P < 0.05$,与模型组比较: [△] $P < 0.05$ 。

续 PBS 清洗 2 次,10 min/次,最后利用 ECL 显影,拍照,统计分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 单因素方差分析(One-Way ANOVA),各组数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,各组所得数据与空白组比较,计量资料符合正态分布,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组血脂情况 与空白组比较,模型组及姜黄素组 TC、TG 及 LDL-C 均升高($P < 0.05$),HDL-C 降低($P < 0.05$),其中姜黄素干预后上述指标有明显改善($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 3 组左颈动脉形态学的变化 空白对照组颈动脉壁厚薄均匀,结构均匀,模型组及姜黄素均出现动脉内膜增厚及不均,其中姜黄素组较模型组改善。见图 1。

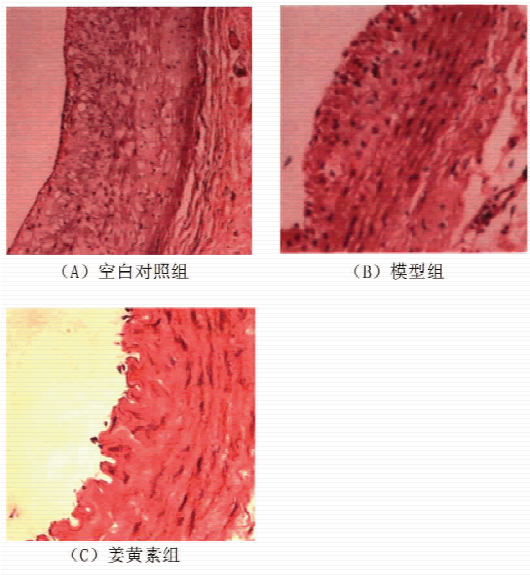


图 1 3 组左颈动脉内膜情况

2.3 EPCs 细胞增殖情况 与空白组比较,模型组及姜黄素 OD 值均降低($P < 0.05$),与模型组比较,姜黄素 OD 有所上调($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 EPCs 细胞增殖的影响

组别	OD 值(OD490)
空白组	0.947 ± 0.132
模型组	0.436 ± 0.058 * *
姜黄素组	0.793 ± 0.067 * [△]

注:与空白组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: [△] $P < 0.05$ 。

2.4 EPCs 细胞迁徙能力变化 空白对照组各时间点划痕愈合率均显著高于其余 2 组($P < 0.05$),其中姜黄素组各时间点划痕愈合率均高于模型组($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组的在不同时间点划痕愈合率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h
空白组	41.51 ± 9.15	78.32 ± 6.67	97.63 ± 1.38
模型组	14.24 ± 6.76 *	24.72 ± 4.72 *	54.36 ± 2.32 *
姜黄素组	28.73 ± 3.16 * [△]	44.15 ± 1.83 * [△]	84.62 ± 3.69 * [△]

注:与空白组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: [△] $P < 0.05$ 。

2.5 PI3K、AKT 蛋白表达的变化 造模后模型组及姜黄素组新西兰兔外周单核细胞中 PI3K 蛋白及 AKT 蛋白均较空白对照组下降,其中模型组下降的趋势更明显($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组 PI3K 蛋白及 AKT 蛋白的表达

组别	例数	PI3K/内参 IOD 比值	AKT/内参 IOD 比值
空白对照组	10	3.91	4.12
模型组	10	1.93	0.24
姜黄素组	10	2.36	2.14

3 讨论

动脉管壁在长期不同病理因素激下逐渐发生病变,主要导致脂质聚集及其表面纤维帽的形成,最终导致动脉粥样硬化,并有病理学资料证实粥样硬化性斑块的稳定性取决于纤维帽的厚度及血管内皮细胞的活性,传统观点认为血流剪应力导致血管内皮细胞受损所致,最终形成动脉粥样硬化斑块。但近年来某些新发现提出了异议^[4-6],部分学者通过病理学实验证实动脉粥样硬化是血管内皮细胞动态平衡受损导致。EPCs 细胞是一类具有高度增殖的前体细胞,其通过不断的增殖反应最终分化为成熟血管内皮细胞,并广泛参与血管新生及内皮细胞修复的过程,当机体中 EPCs 数量不足,无法及时修复受损的内皮细胞,因此动脉粥样硬化随之而来,有学者利用多因素 Logic 多因素回归分析显示,内皮细胞数量减少是脑动脉粥样硬化的独立危险因素。故越来越多学者认为 EPCs 有望成为调节内皮细胞功能最终实现抗动脉粥样硬化的靶方向之一。在本研究中我们利用对新西兰兔进行动脉粥样硬化模型制作,

并进行血脂、颈动脉形态学研究,同时检测了动物的 EPCs 细胞增殖情况及其迁徙能力,结果显示高脂饲料喂养下新西兰兔血脂明显高于正常组,并且在其左颈总动脉发现明显的动脉粥样硬化斑块,同时出现血管内皮明显不均,与此同时我们还发现模型组 EPCs 细胞增殖能力及迁徙能力明显减弱,这一结果与国内外诸多文献研究一致^[7-12],这说明动脉粥样硬化者确存在 EPCs 细胞数量及功能减弱,影响了其修复血管内皮的效应,EPCs 细胞确在抗 AS 中扮演重要角色。

姜黄素是一种多酚类植物单体,提取自中草药姜黄、莪术等块茎中,具有破血行气、通经止痛功效,中医学无动脉粥样硬化的病名,其属于“血瘀”范畴,活血化瘀是其主要治则。现代药理学证实姜黄素拥有酚和 β -二酮结构并存在化学结构,其中酚性羟基具有较强的捕捉清楚自由基的能力,有学者^[13]发现姜黄素可利用过氧化反应将自由基转化为诸多二聚体的产物,使其具有稳定的二氢呋喃结构,而二氢呋喃结构产物易溶解于酸性环境,具有一定的抗肿瘤效应。此外,有研究显示姜黄素对超氧阴离子等多种自由基有明显清除能力,减少了自由基对组织及细胞的损害,在本研究中我们发现经过造模的新西兰兔血脂明显异常,颈动脉内膜明显受损,EPCs 细胞增殖及迁徙能力明显减弱,在经过为期 4 周姜黄素干预后新西兰兔血脂水平有所恢复,颈动脉内膜得到一定修复,同时促进了 EPCs 细胞的增殖及迁徙能力,这说明姜黄素可刺激 EPCs 细胞增殖及迁移而达到抗 AS 的目的。然后姜黄素是通过何种途径促进 EPCs 细胞的增殖目前尚处于研究阶段,我们亦进行一系列研究,结果显示姜黄素促进 EPCs 细胞的增殖机制可能与 PI3K/Akt 信号通路关系密切。PI3K/Akt 信号通路与细胞的增殖、凋亡过程关系密切,当此信号通路在不同刺激因素作用下被激活,可不断磷酸化下游的增殖凋亡相关的蛋白,PI3K 属于激酶物质,具有明显的催化磷脂酰肌醇效应,可通过调节活化 AKT 抑制线粒体释放凋亡因

子,从而促进细胞增殖,在本研究中我们发现造模的新西兰兔 PI3K 及 AKT 表达水平均是下降的,但是经过姜黄素干预后 PI3K 蛋白及 AKT 蛋白的表达有所上调,这说明姜黄素促进 EPCs 细胞的增殖,抑制其凋亡可能与激活 PI3K/AKT 信号通路有关。

参考文献

- [1] 黎鹏程,卢丽丽,皮丕喆,等. 舒心稳斑颗粒对动脉粥样硬化血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. 中国医药科技,2014,21(5):494-496.
- [2] 韩喆,孟明,刘福林. 辛伐他汀对动脉粥样硬化斑块稳定性和 VEGF 表达的影响[J]. 医学研究与教育,2010,27(5):18-20.
- [3] 李蓉,蔡辉. 内皮细胞凋亡与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2012,6(32):1649-1652.
- [4] 郭春艳,李虹伟,郑平渝,等. 心元胶囊对冠心病患者血管内皮功能的影响[J]. 中国临床医生杂志,2008,36(11):32-34.
- [5] 王园园,龙民慧,周磊磊,等. 兔动脉粥样硬化动物模型的建立和评价[J]. 实验动物科学,2008,25(3):18.
- [6] 沈伟,范维琥,施海明,等. 红景天对兔主动脉粥样硬化斑块内血管内皮细胞生长因子表达及血管新生的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2008,5(11):1022-1025.
- [7] 孔朝红,刘煜敏,朱江,等. 高脂大鼠内皮祖细胞生物学特性的实验研究[J]. 中国神经免疫学和神经病杂志,2010,7(17):253-260.
- [8] 赵珊珊. 通脉地仙丸对动脉粥样硬化斑块内血管新生及其稳定性影响的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2010.
- [9] 薛峰,杜大勇,李运田,等. 瑞舒伐他汀对兔动脉粥样硬化斑块内 CD147 的表达及斑块稳定性的影响[J]. 山西医科大学学报,2013,44(4):258-262.
- [10] 王传锋,贾明兰. 他汀类药物防治动脉粥样硬化的应用[J]. 中国现代医生,2008,46(10):29-31.
- [11] zhang S, zhou Y, zhang Y, et, al. PreValence and risk factors of asymptomatic intracranial arterial stenosis in a community-based population of Chinese adults[J]. Eur J Neurol,2013,20(11):1479-1485.
- [12] white MJ. Genes count: Attenuated cerebral vasodilator capacity in young African Americans[J]. Exp Physiol,2015,100(1):1.
- [13] 行妍妍,汪军兵,谢赛,等. 姜黄素对放线菌素 D/TNF- α 诱导的 PC12 细胞和大鼠海马神经元损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(10):1746-1750.

(2017-03-06 收稿 责任编辑:徐颖)