

论著·基础研究

姜黄素对血栓模型大鼠细胞内外热休克蛋白70的影响*

任碧琼^{1,2},田雪飞^{1,2},罗书笛^{1,2},徐 飞^{1,2},刘俊龙^{1,2},陈 维^{1,2}

(1. 湖南省第二人民医院检验科,湖南长沙 410007;2. 湖南中医药大学临床医学院,湖南长沙 410007)

摘要:目的 以姜黄提取物为参照研究姜黄素对大鼠血栓模型的影响及其与损伤相关模式分子(DAMP)热休克蛋白70(HSP70)的关系。**方法** 分别对大鼠进行姜黄素及姜黄提取物灌胃14 d后用物理方法建立大鼠血栓模型,以假手术组、蒸馏水灌胃血栓模型组(血栓模型组)大鼠为对照,获取各组大鼠血液标本和血管组织,采用ELISA法检测各组大鼠血浆HSP70水平,采用免疫组化法检测各组大鼠血管组织中HSP70的表达。**结果** 血栓模型组大鼠血浆HSP70水平显著高于假手术组大鼠($P=0.003$),姜黄素低、高剂量灌胃血栓模型组大鼠血浆HSP70均显著降低($P=0.005, 0.002$),而姜黄提取物灌胃血栓模型组大鼠血浆HSP70水平无明显变化;与假手术组大鼠相比,血栓模型组大鼠血管组织中HSP70表达增强,姜黄素灌胃使血栓模型大鼠血管组织中HSP70表达增强,而姜黄提取物没有此作用。**结论** 姜黄素抗炎作用与增加细胞内HSP70表达,降低细胞外HSP70有关,姜黄提取物的抗炎作用可能是通过其他机制。

关键词:血栓模型; 姜黄素; 姜黄提取物; 热休克蛋白70; 抗炎**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.24.005**中图法分类号:**R285.5**文章编号:**1673-4130(2018)24-3006-03**文献标识码:**A**Effects of curcumin on intracellular and extracellular heat shock protein 70 in rat model of thrombosis***REN Biqiong^{1,2}, TIAN Xuefei^{1,2}, LUO Shudu^{1,2}, XU Fei^{1,2}, LIU Junlong^{1,2}, CHEN Wei^{1,2}

(1. Department of Clinical Laboratory, The Second People's Hospital of Hunan, Changsha, Hunan 410007, China;

2. School of Clinical Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: Objective Effects of curcumin on thrombosis model in rats and its relationship with damage-associated model molecule (DAMP) heat shock protein 70 (HSP70) were studied with turmeric extract as reference. **Methods** After 14 days' intragastric administration of curcumin and turmeric extract, thrombosis models were established in rats by physical method. Blood samples and vascular tissues of rats were obtained, and sham operation group and distilled water group as control group. Plasma HSP70 levels were detected by ELISA and the expression of HSP70 in vascular tissues of rats was measured by immunohistochemical staining. **Results** The plasma HSP70 level in thrombotic model group was significantly higher than that in sham-operated group ($P=0.003$). The plasma HSP70 level in curcumin low and high dose group was significantly lower than that in sham-operated group ($P=0.005, 0.002$). Compared with sham-operated rats, the expression of HSP70 in vascular tissues of thrombotic model rats was increased. Curcumin could increase the expression of HSP70 in vascular tissues of thrombotic model rats, but curcuma extract had no such effect. **Conclusion**

The anti-inflammatory effect of curcumin is related to the increase of intracellular HSP70 expression and the decrease of extracellular HSP70. The anti-inflammatory effect of turmeric extract may be through other mechanisms.

Key words: thrombus model; curcumin; turmeric extracts; extracellular heat shock protein 70; anti-inflammatory

姜黄素及姜黄提取物均来源于姜科植物,且均有抗炎、抗氧化作用,相关机制研究并没有明确两者之间的区别。姜黄素属于单一成分,而姜黄提取物则含有几种不同空间结构的姜黄素异构体及其他物质。目前的研究认为姜黄素通过清除自由基和增强抗氧

化酶活性实现抗氧化作用^[1],而姜黄提取物的作用更侧重于破血行气,通经止痛。研究认为姜黄素的抗炎作用是通过抑制炎性介质并抑制重要的炎性反应信号通路核因子κB(NF-κB)来实现的,但具体是通过什么途径并没有被阐明。细胞外热休克蛋白70

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81473617);湖南省中医药管理局重点项目(201720)。

作者简介:任碧琼,女,教授,主要从事免疫分子调控与疾病的研究。

本文引用格式:任碧琼,田雪飞,罗书笛,等.姜黄素对血栓模型大鼠细胞内外热休克蛋白70的影响[J].国际检验医学杂志,2018,39(24):

(HSP70)是一种损伤相关模式分子(DAMP)^[2],能与TLR4受体结合激活NF- κ B信号通路发挥促炎作用^[3]。抑制NF- κ B通路能阻断炎性信号传导通路^[4-5],抑制NF- κ B核转位和随后的促炎细胞因子释放^[6],姜黄素抑制NF- κ B是否与HSP70有关?本课题组通过以下实验进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 姜黄素及姜黄提取物 姜黄素购自美国Sigma公司,批号:SLBN7214V;姜黄提取物由湖南中医药大学天然药物化学教研室提供,其中姜黄素含量为4.95%。按比例换算使姜黄素含量保持一致:姜黄素低剂量组100 mg/(kg·d),姜黄素高剂量组500 mg/(kg·d);姜黄提取物的低剂量2020 mg/(kg·d),高剂量为10 100 mg/(kg·d)。

1.2 大鼠血栓模型建立

1.2.1 大鼠选择及喂养 选用SD大鼠60只,雄性,体质量在300~450 g的范围内,由湖南中医药大学动物中心代购并饲养,饲养环境:SPF级,温度(23±2)℃,湿度、噪音、换气、照明等条件控制在规定范围内,每天给予标准颗粒饲料及水,自由摄食,每天定时清洁。将60只大鼠随机分为假手术对照组、血栓模型组、姜黄素低剂量组、姜黄素高剂量组、姜黄提取物低剂量组、姜黄提取物高剂量组,假手术对照组及血栓模型组采用蒸馏水灌胃,其他4组分别用姜黄素及姜黄提取物高、低剂量连续灌胃14 d,然后进行造模手术。

1.2.2 模型建立 SD大鼠术前禁食12 h,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,取下腹部正中纵行切口,显露腹腔,小心分离腹主动脉与下腔静脉(IVC),将4号丝线与IVC并行,实验组用Prolene线将IVC与丝线一起结扎,假手术组不结扎,并在结扎线下方上血管阻断夹,抽除丝线并移开血管阻断夹。处理后将肠管回纳入腹腔,逐层关腹,术后用暖灯保暖直至大鼠清醒。术后24 h开腹取栓,手术显微镜下观察IVC形态及侧枝静脉开放代偿程度,切取结扎线下方IVC段,以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗IVC及髂静脉,收集血栓,并测量重量。取IVC段,行苏木素-伊红(HE)染色,镜下观察血栓形成。

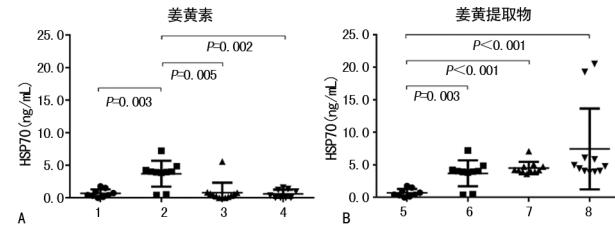
1.3 HSP70检测 采用CUSBIO-ELISA试剂盒检测6组大鼠血浆中HSP70水平,试剂盒由武汉华美生物有限公司提供,按照说明书对6组大鼠血浆HSP70水平检测。采用免疫组化方法对血栓组织进行染色。

1.4 统计学处理 实验数据采用SPSS19.0统计软件进行统计学处理。所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐时,两两比较用q检验,方差不齐时用秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 姜黄素及姜黄提取物灌胃组血浆HSP70水平的变化 血栓模型鼠血浆HSP70显著高于假手术组

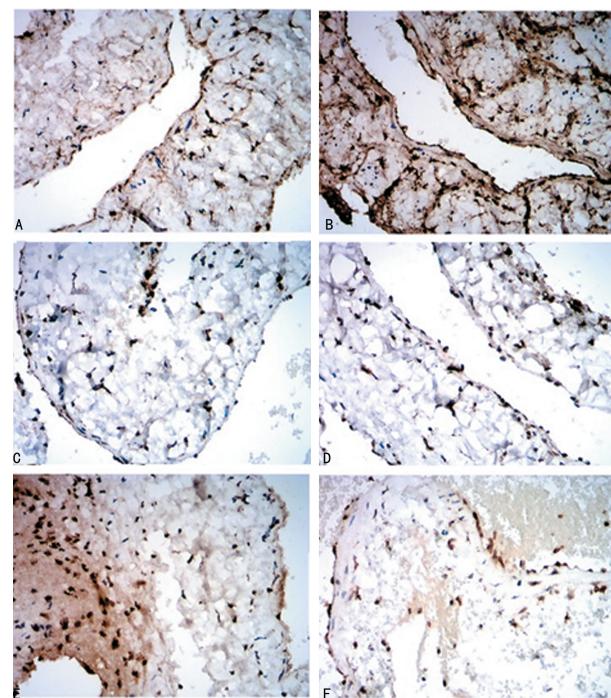
大鼠($P=0.003$),低剂量、高剂量姜黄素灌胃组大鼠血浆HSP70水平均显著降低($P=0.005$ 、 0.002),而姜黄提取物灌胃组血浆HSP70水平的变化与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$),但高剂量姜黄提取物灌胃组血浆HSP70有上升趋势,见图1。



注:1为假手术对照组;2为血栓模型组;3为低剂量姜黄素灌胃组;4为高剂量姜黄素灌胃组;5为假手术对照组;6为血栓模型组;7为低剂量姜黄提取物灌胃组;8为高剂量姜黄提取物灌胃组

图1 不同剂量姜黄素及姜黄提取物对血栓模型鼠血浆HSP70水平的影响

2.2 姜黄素及姜黄提取物灌胃组大鼠血管壁组织中HSP70表达 免疫组化检测血管组织中HSP70的表达,与假手术对照组相比,血栓模型大鼠血管组织中HSP70表达增强,低剂量姜黄素灌胃组大鼠血管组织中HSP70表达增强,高剂量姜黄素灌胃组大鼠血管组织中HSP70表达增强更明显;而低剂量和高剂量姜黄提取物灌胃组大鼠血管组织中HSP70表达无明显变化,见图2。



注:A为低剂量姜黄素灌胃组;B为高剂量姜黄素灌胃组;C为低剂量姜黄提取物灌胃组;D为高剂量姜黄提取物灌胃组;E为血栓模型组;F为假手术对照组

图2 姜黄素及姜黄提取物对血管组织中HSP70的影响($\times 400$)

3 讨 论

血栓的形成使得小静脉甚至毛细静脉处于明显的郁血状态,毛细血管的渗透压因静脉压力改变而升高,血管内皮细胞因缺氧而渗透性改变导致血管内的

液体成分向外渗出移向组织间隙造成肢体肿胀，并且在静脉血栓形成过程中引起静脉本身及其周围组织炎性反应。关于血栓与炎症的报道很多，并且血栓形成与 HSP70 的关系也有报道^[7]，有研究认为诱导 HSP70 表达是既能防止血栓形成又很少引起出血的新方法^[8]，组织中 HSP70 升高有防止血栓形成的作用^[9]。本研究发现血栓模型鼠血管组织细胞中的 HSP70 表达比假手术大鼠血管组织中高，说明血栓形成本身能促进机体应激性表达 HSP70 增加，而姜黄素有进一步增加血管组织中 HSP70 表达的作用，并且与浓度有关，但姜黄提取物没有此作用，可能是由于姜黄提取物中含有一定比例甲氧基姜黄素和双脱甲氧基姜黄素，而这两种成分的结构与姜黄素的结果不同，见图 3，虽然按姜黄素比例换算给予了相当剂量，但这种复合成分的作用机制与单纯姜黄素有所区别，这可能与其空间结构有关。

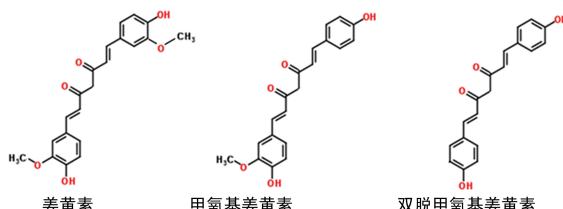


图 3 姜黄素($C_{21}H_{20}O_6$)、甲氧基姜黄素($C_{20}H_{18}O_5$)及双脱甲氧基姜黄素($C_{19}H_{16}O_4$)的分子结构

血浆 HSP70 属于细胞外 HSP70(eHSP70)，是细胞内 HSP70 在细胞遭受应激时死亡破坏释放至细胞外形成的能警示免疫系统的“危险信号”，与组织中 HSP70 的作用完全相反^[10]，属于炎症因子，eHSP70 是典型的 DAMP，能作为危险信号刺激机体的免疫系统产生固有免疫及适应性免疫反应。尽管关于 eHSP70 的研究近年越来越多，但很少有研究从降低细胞外 HSP70 的角度探讨缓解炎症，本研究的结果显示，血栓模型大鼠血浆 HSP70 水平显著高于未处理的对照组，说明血栓形成过程中细胞缺氧甚至破坏使得 HSP70 由细胞内释放至细胞外。采用姜黄素及姜黄提取物对血栓模型大鼠进行灌胃处理，发现姜黄素能明显降低血浆 HSP70 的水平，但姜黄提取物没有这种作用。

研究表明，姜黄素可减轻脂多糖诱导的小鼠乳腺炎的髓过氧化物酶的活性和炎症细胞渗出(如 TNF、IL-6、IL-1 β)，其机制是姜黄素下调 TLR4 表达，抑制 NF- κ B 信号通路，减少炎性介质的释放^[11]。作为炎性介质，外源性 HSP70 能够激活免疫细胞上的细胞表面受体，如 TLR2 和 TLR4^[12]，从而导致 NF- κ B 活化，TNF- α 、IL1- β 和 IL-6 的产生^[13]，而姜黄素能够抑制这种作用。

4 结 论

姜黄素对大鼠血栓模型的影响主要有两种：一是促进细胞内 HSP70 的表达，二是降低细胞外 HSP70 水平，其机制可能是通过抑制 HSP70 从组织释放入

血，从而抑制炎症信号通路的激活，达到抗炎的作用。而姜黄素提取物的抗炎作用与此机制无明显相关。

参 考 文 献

- [1] TRUJILLO J, CHIRINO Y I, MOLINA-JIJÓN E, et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings[J]. Redox Biol, 2013, 1(5): 448-556.
- [2] LAND W G. Role of heat shock protein 70 in innate alloimmunity[J]. Front Immunol, 2012, 2(1): 89.
- [3] MAI A S, DOS SANTOS A B, BEBER L C C, et al. Exercise training under exposure to low levels of fine particulate matter: effects on heart oxidative stress and extra-to-intracellular HSP70 ratio [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 9067875.
- [4] SUN S C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(9): 545-558.
- [5] WANG C, CHOU P, CHUNG F, et al. Heat shock protein70 is implicated in modulating NF- κ B activation in alveolar macrophages of patients with active pulmonary tuberculosis[J]. Sci Rep, 2017, 7(13): 1214.
- [6] MURALIDHARAN S, AMBADE A, FULHAM M A, et al. Moderate alcohol induces stress proteins HSF1 and hsp70 and inhibits proinflammatory cytokines resulting in endotoxin tolerance[J]. J Immunol, 2014, 195(10): 1975-1987.
- [7] DUERSCHMIED D, BODE C. Hsp70 preventing thrombosis: benefit without burden? [J]. Cardiovasc Res, 2016, 110(3): 291-292.
- [8] ALLENDE M, MOLINA E, GURUCEAGA E, et al. Hsp70 protects from stroke in atrial fibrillation patients by preventing thrombosis without increased bleeding risk [J]. Cardiovasc Res, 2016, 110(3): 309-318.
- [9] ALLENDE M, MOLINA E, LECUMBERRI R, et al. Inducing heat shock protein 70 expression provides a robust antithrombotic effect with minimal bleeding risk [J]. Thromb Haemost, 2017, 117(9): 1722-1729.
- [10] LUCIANA M, NEIL G, WALTER M. Mediators and mechanisms of heat shock protein 70 based cytoprotection in obstructive nephropathy[J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20(6): 893-906.
- [11] SHI X, ZHENG Z, LI J, et al. Curcumin inhibits A β -induced microglial inflammatory responses in vitro: involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathway[J]. Neurosci Lett, 2015, 596(6): 105.
- [12] TORIGOE T, TAMURA Y, SATO N. Heat shock proteins and immunity: application of hyperthermia for immunomodulation[J]. Int J Hyperther, 2009, 25(8): 610-616.
- [13] QU J, TAO X, TENG P, et al. Blocking ATP-sensitive potassium channel alleviates morphine tolerance by inhibiting HSP70-TLR4-NLRP3-mediated neuroinflammation [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(2): 228.