

姜黄素对动脉粥样硬化兔基质金属蛋白酶 9 的影响

林梅瑟¹, 陈碧新², 赵志光³, 张怀勤², 杨德业²

(1. 温州市中医院 ICU; 温州医学院 2. 附属第一医院心内科 心血管生物和基因研究所,

3. 附属第二医院病理科, 浙江省温州市 325000)

[关键词] 内科学; 姜黄素; 动脉粥样硬化; 基质金属蛋白酶 9; 血清脂质; 阳性细胞率; 兔

[摘要] 目的 研究姜黄素对动脉粥样硬化兔主动脉基质金属蛋白酶 9 表达的影响。方法 将 30 只雄性日本大耳白兔给予高脂饲料喂养 2 个月。成功复制动脉粥样硬化模型兔 20 只, 随机分成两组, 治疗组给予姜黄素 200 mg/(kg·d) 灌胃, 对照组每日给予生理盐水灌胃, 均以基础饲料喂养, 共治疗 1 月。采血检测血浆总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇水平变化; 兔处死后取主动脉观察粥样斑块面积比; 取主动脉弓做病理切片, 进行光镜检查, 用免疫组织化学检测主动脉壁基质金属蛋白酶 9 的表达。结果 姜黄素治疗组血浆甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平与对照组相比显著降低, 高密度脂蛋白胆固醇水平显著升高 ($P < 0.05$)。姜黄素治疗组斑块面积/主动脉面积比显著低于对照组 ($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶 9 免疫组织化学染色强度、阳性细胞率、总分均低于对照组。结论 姜黄素可以显著降低动脉粥样硬化兔主动脉壁基质金属蛋白酶 9 的表达, 抑制动脉粥样硬化的形成。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Curcumin on the Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in the Aorta Atherosclerotic Rabbits

LIN Mei-Se¹, CHEN Bi-Xin², ZHAO Zhi-Guang³, ZHANG Hua-Qin², and YANG De-Ye²

(1. Department of ICU, Wenzhou Traditional Chinese Medicine Hospital; 2. Department of Cardiology of the First Affiliated Hospital Institute for Cardiovascular Biology & Gene, Wenzhou Medical College; 3. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

[KEY WORDS] Curcumin; Atherosclerosis; Matrix Metalloproteinase-9; Serum Lipids; Ratio of Positive Cell; Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of curcumin on the expression of matrix metalloproteinase-9 in the aorta atherosclerotic rabbits. **Methods** Thirty male Japanese White rabbits were fed with high cholesterol diet for two consecutive months. After atherosclerotic model was established, the remaining animals were randomly divided into two groups: the control group and treatment group. Both groups were fed with standard diet for next one month. Additionally, the treatment group received an oral curcumin at dose 200 mg/kg, and the control group received an oral curcumin-free sodium chloride solution daily during experiment. Before and after the curcumin therapy period, the blood sample were collected in both groups. Serum was separated and used for the assessment of total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol (LDLC), high density lipoprotein cholesterol (HDLC) and triglyceride. After three months, all animals were killed. Entire aortas were rapidly dissected out, and the ratio of atherosclerotic plaque was examined. The aortic arch was selected for histological examinations and stained with hematoxylin and eosin (H & E). The expression of MMP-9 was examined with semiquantitative analysis immunohistochemistry in the aorta. **Results** Both treatment and control group had eight rabbits for analysis. After curcumin treatment for one month, compared with the control group, the treatment group decreased serum triglyceride by 23.5% (0.75 ± 0.15 mmol/L vs 0.98 ± 0.20 mmol/L, $P = 0.024$), total cholesterol by 21.6% (3.52 ± 0.66 mmol/L vs 4.49 ± 0.80 mmol/L, $P = 0.020$) and LDLC by 30.3% (2.05 ± 0.43 mmol/L vs 2.94 ± 0.72 mmol/L, $P = 0.009$), but increased HDLC by 16.3% (1.14 ± 0.15 mmol/L vs 0.98 ± 0.14 mmol/L, $P = 0.040$). Curcumin inhibited the atherosclerotic development in experimental rabbits, the ratio of plaque with area reduced obviously in treatment group as compared to those of control group ($22.61\% \pm 7.95\%$ vs $42.28\% \pm 19.34\%$, $P = 0.025$). The stained intensity, ratio of positive cell and total score of MMP-9 immunohistochemistry expression were significantly lower in treatment group than those in control group. **Conclusion** Curcumin could decrease the expression of matrix metalloproteinase-9 in the aorta and attenuate atherosclerotic development in rabbits.

[收稿日期] 2006-11-16 [修回日期] 2007-02-26

[基金项目] 温州市科技计划基金(Y20060156)资助

[作者简介] 林梅瑟, 硕士, 主治医师, 研究方向为急救医学和心内科, E-mail 为 linmeise@medmail.com.cn. 通讯作者杨德业, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病和高血压的基础和临床。赵志光, 硕士, 主治医师, 研究方向为肿瘤病理。

姜黄具有行气、散风活血、通经止痛等作用,常用于治疗食欲不振、肝胆疾病、风湿病等疾病。姜黄素是从姜黄中提取的一种黄色酸性酚类物质,是姜黄发挥药理作用的活性成分。国内外研究发现姜黄素具有降脂、抗氧化、抗炎、抗感染和抗肿瘤作用,Quiles 等^[1]发现姜黄素能减轻家兔动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变程度。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)在体内参与细胞外基质的降解与重构,参与了 As 时的血管壁重构、斑块破裂、血栓形成等过程,与 As 斑块的形成和稳定等密切相关^[2]。因此,本研究旨在通过复制家兔 As 模型,观察姜黄素对 As 的作用和主动脉壁 MMP-9 表达的影响,探讨姜黄素可能的抗 As 机制。

1 材料与方法

1.1 材料

日本大耳白兔由温州医学院动物实验中心提供;高脂饲料成分为 84% 基础饲料、10% 猪油、5% 红糖及 1% 胆固醇;姜黄素由神威药业有限公司提供;免疫组织化学试剂盒和兔抗 MMP-9 抗体由福州迈新生物技术开发公司提供。

1.2 动脉粥样硬化模型的建立

2~3 月龄健康雄性日本大耳白兔 30 只,体重 1.7~2.1 kg,基础颗粒饲料适应性喂养 1 周后,给予高脂饲料单笼喂养,每兔每日进食量为 150 g,饮水不限,喂养期间死亡 7 只。2 个月后随机抽取 3 只家兔处死,肉眼下主动脉壁均有斑块形成,确认 As 模型建立。

1.3 分组

剩余 20 只兔随机分成对照组($n=10$)和姜黄素治疗组($n=10$)。两组均给予基础颗粒饲料喂养,每日 150 g。治疗组每日给予姜黄素 200 mg/kg 灌胃;对照组每日给予生理盐水灌胃,持续治疗 1 月。

1.4 血脂检测

治疗前禁食 12 h,取兔耳缘静脉采血 2 mL;治疗后禁食 12 h 采心脏血 2 mL。4 000 r/min,离心 5 min,取血清用全自动生化分析仪测定血脂。总胆固醇(total cholesterol, TC)测定用 CHOD-PAP 法,甘油三酯(triglyceride, TG)测定用 GPO-PAP 法,高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)测定用化学修饰酶法,低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)测定用直接法。

1.5 主动脉标本检测

治疗结束后,处死全部动物。剪开胸腹腔,小心

剥离主动脉和心脏,将主动脉从心脏与主动脉连接的位置及髂动脉分支处剪断,剥离动脉外膜后,纵向剪开主动脉,用生理盐水冲洗 2 遍后用 10% 中性福尔马林溶液固定 12 h,截取主动脉弓石蜡包埋,取 5 μm 切片,HE 染色后进行光镜检查。当主动脉标本离体后打开动脉腔,迅速描记斑块及主动脉面积,然后用剪纸称重法计算斑块面积与主动脉面积比。

1.6 免疫组织化学法测定基质金属蛋白酶 9

每例蜡块切片进行 MMP-9 标记及对照,组织切片经枸橼酸缓冲液高压锅煮沸 10 min 进行抗原修复。免疫组织化学采用 En vision 法, PBS 冲洗, DAB 显色,以 PBS 代替一抗作阴性对照,严格按说明书步骤操作。MMP-9 阳性结果判断标准采用半定量积分法,选择具有代表性的 10 个高倍视野进行观察,分别计数 100 个细胞,共计 1 000 个细胞,计算阳性细胞数的平均百分率。MMP-9 阳性染色者以细胞质和/或细胞膜呈棕黄色者为准。根据染色程度和染色细胞百分率进行评分:基本不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分;着色细胞占计数细胞的百分率 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分, $\geq 51\%$ 为 3 分;将每张切片着色程度得分与平均着色细胞百分率得分各自相加为最后得分。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同组治疗前后用配对 t 检验,组间用两独立样本的 t 检验并进行方差齐性 F 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。采用 SPSS 11.5 统计软件处理。

2 结果

2.1 动物存活情况

30 只兔在建立 As 模型过程中自然死亡 7 只,处死 3 只,剩余 20 只兔进入治疗阶段。治疗期间,治疗组因灌胃导致兔死亡 2 只,对照组 1 只;对照组另 1 只兔因肢体偏瘫死亡;最后治疗组和对照组各有 8 只兔进入统计学分析。治疗前两组兔体重相近,姜黄素治疗后体重低于对照组,但无统计学差异(表 1)。

表 1. 两组兔治疗前后体重的变化 ($\bar{x} \pm s$, kg)

分 组	实验前	治疗前	治疗后
治疗组	1.88 ± 0.11	2.31 ± 0.26	2.61 ± 0.40
对照组	1.84 ± 0.11	2.41 ± 0.30	3.00 ± 0.37

2.2 血脂的变化

经高脂饲料喂养 2 个月后两组兔血浆 TG、TC、LDLC 和 HDLC 明显升高, 但两组间无显著性差异。姜黄素治疗 1 月后各项血脂指标均有不同程度改

善, 对照组改喂基础颗粒饲料血脂指标亦有不同程度改善, 但姜黄素治疗组与对照组相比 TC 降低 21.6%, LDLC 降低 30.3%, TG 降低 23.5%, HDLC 升高 16.3%, 差异均具有显著性 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 治疗前后血脂的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, mmol/L)

分 组	TG	TC	LDLC	HDLC
治疗前 对照组	1.99 ± 1.21	31.01 ± 14.73	15.55 ± 8.33	2.64 ± 0.79
治疗组	3.13 ± 2.17	37.79 ± 13.32	17.19 ± 5.58	2.32 ± 0.69
治疗后 对照组	0.98 ± 0.20	4.49 ± 0.80 ^d	2.94 ± 0.72 ^d	0.98 ± 0.14 ^d
治疗组	0.75 ± 0.15 ^{bc}	3.52 ± 0.66 ^{bd}	2.05 ± 0.43 ^{bd}	1.14 ± 0.15 ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 组内比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 组间比较。

2.3 主动脉壁斑块面积的改变

姜黄素治疗组主动脉斑块面积比与对照组相比明显减少 (22.61 ± 7.95 比 42.28 ± 19.34 , $P < 0.05$)。

2.4 主动脉病理形态学改变

肉眼下, 对照组主动脉弹性明显下降, 几乎整条主动脉内膜可见梭形乳白色斑块或脂纹, 动脉内膜有明显隆起; 治疗组粥样病变明显较轻, 主要位于主动脉弓, 胸、腹主动脉斑块少见, 动脉内膜隆起程度较对照组轻, 且动脉较对照组柔软有弹性。光镜下, 对照组内膜增厚, 斑块形成, 增厚的内膜中含大量泡沫细胞, 内膜表面不光滑, 内皮细胞缺失或不连续, 中膜明显不规则增厚, 平滑肌纤维显著紊乱; 姜黄素治疗组可见内膜局限性隆起, 内膜增厚但未达管壁全周, 内膜下可见少量散在泡沫细胞, 中膜平滑肌纤维排列稍紊乱(图 1)。

2.5 基质金属蛋白酶 9 免疫组织化学改变

姜黄素治疗组 MMP-9 免疫组织化学染色强度、阳性细胞率、总积分明显低于对照组 ($P < 0.01$; 图 2 和表 3)。

表 3. 基质金属蛋白酶 9 免疫组织化学表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分 组	染色强度 (分)	阳性细胞率	总积分 (分)
对照组	2.3 ± 0.7	38.5% ± 13.6%	4.3 ± 1.4
治疗组	1.3 ± 0.5 ^a	16.5% ± 8.0% ^a	2.4 ± 0.7 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

家兔对外源性胆固醇吸收率高达 75% ~ 90%, 对高血脂症清除能力较低, 家兔形成的高血脂症、主动脉粥样硬化斑块、冠状动脉粥样硬化等病变与人

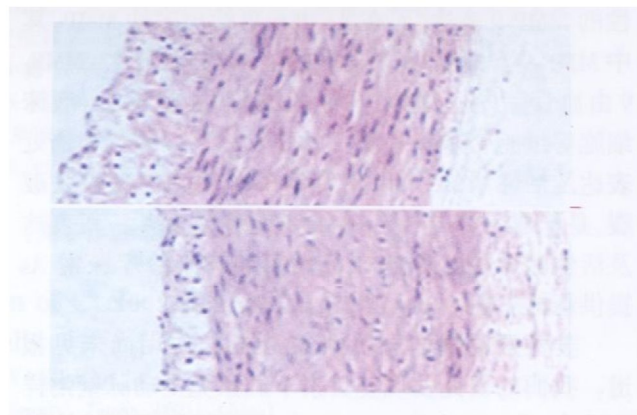


图 1. 主动脉粥样硬化斑块组织切片 ($\times 100$) 上为对照组, 下为治疗组。

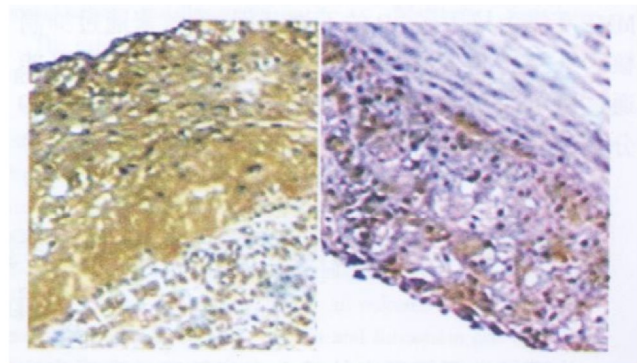


图 2. 基质金属蛋白酶 9 在主动脉粥样硬化斑块组织中的阳性表达 ($\times 100$) 左为对照组, 右为治疗组。

类的病变极其相似。每天给家兔喂服胆固醇 0.3 g, 4 个月后肉眼可见主动脉粥样硬化斑块; 若每天剂量增至 0.5 g, 3 个月后可出现斑块; 若增至每天 1 g, 可缩为 2 个月。本模型每日给予胆固醇 1.5 g, 2 月后家兔已出现显著高血脂症, 并且主动脉壁上出现脂质条纹, 家兔已造成高血脂症, As 模型成功建立。

低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 升高是冠心病的

主要原因,降低LDLC能明显减少冠心病的危险性,而HDLc与冠心病发病呈负相关,低HDLc血症是冠心病强有力的预测指标。故一个药物可降低LDLC同时升高HDLc将可能对动脉粥样硬化疾病起到良好的治疗作用。本组研究显示姜黄素治疗组与生理盐水对照组相比明显降低血浆TC和LDLC,并且能升高血浆HDLc水平,与国内外研究结果相似^[3,4]。

基质金属蛋白酶9(MMP-9)又称明胶酶B,是MMP家族中的一个重要成员,主要降解弹性蛋白及基底膜的主要成分Ⅲ型胶原。MMP-9其在体内是以前体或酶原形式分泌的,只有被激活后才能发挥其降解细胞外基质的作用。正常动脉壁只有少量无活性的MMP-9表达,而在As斑块可检出多种MMP,其中MMP-9含量较多、活性增强。在As血管壁,MMP-9由血管壁内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞、泡沫细胞等细胞合成和分泌。MMP-9在粥样硬化损伤处表达及活性增加,可降解细胞外基质和促进斑块破裂,是形成不稳定斑块的重要促进因素^[5]。其表达及活性的调控机制研究可为我们临床治疗探索As提供新的思路。

姜黄素对粥样斑块中MMP-9的作用尚未见报道。我们的研究发现姜黄素下调家兔主动脉粥样斑块中MMP-9表达,MMP-9免疫组织化学表达在姜黄素治疗组的染色强度、阳性细胞率、总积分均低于对照组。姜黄素抑制MMP-9表达的机制可能为: MMP-9作为核因子 κ B的下游基因,姜黄素通过抑制核因子 κ B^[6]进而减少MMP-9的表达;④姜黄素可能通过诱导血管平滑肌细胞凋亡^[7]进而减少MMP-9分泌;⑤姜黄素具有抗氧化和抗炎作用,能有效保护

内皮细胞^[8,9],减轻炎症反应,减轻血管壁损伤,进而减少MMP-9的表达。

Quiles等^[1]发现姜黄素能减轻家兔动脉粥样硬化程度,治疗组主动脉脂质斑纹病变较对照组明显减轻。我们的研究也证实姜黄素能减轻家兔主动脉粥样硬化程度,姜黄素治疗组斑块面积比明显低于对照组。姜黄素可能通过抗氧化、降低血浆LDLC、升高HDLc、减少MMP-9的表达从而起到治疗As作用。

[参考文献]

- [1] Quiles JL, Mesa MD, Ramirez-Tortosa CL, Aquilera CM, Battino M, Gil A, et al. Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22 (7): 1 225-231.
- [2] 于滢, 杨向红. 基质金属蛋白酶与动脉粥样硬化及斑块破裂的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (6): 592-595.
- [3] Arafat HM. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats [J]. *Med Sci Monit*, 2005, 11 (7): BR 228-234.
- [4] 沃兴德, 崔小强, 唐利华. 姜黄素对食饵性高脂血症大鼠血浆脂蛋白代谢相关酶活性的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (3): 223-226.
- [5] 周志斌, 郭毅, 王思鸿, 李小好, 尤玉兰, 顾惠娟, 等. 基质金属蛋白酶9及转化生长因子 β 1在人动脉粥样硬化斑块的表达及其与斑块稳定性的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (3): 217-220.
- [6] Surh YJ, Han SS, Keum YS, Seo HJ, Lee SS. Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF- κ B and AP-1 [J]. *Biofactors*, 2000, 12 (1-4): 107-112.
- [7] 陈磊磊, 尤明智, 杨季明, 王迪斌, 陶立翠. 姜黄素对血管损伤后内膜增生的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2003, 12 (18): 1 944-945.
- [8] 孙秀才, 冯建章, 裴晓阳, 盛小刚, 余细勇. 姜黄素对高脂饲料家兔血管内皮功能的保护作用[J]. *岭南心血管病杂志*, 2004, 10 (1): 60-63.
- [9] 肖健, 李校莹, 郭建红, 周仲楼. 姜黄素对过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤的双重保护[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10 (12): 1 376-380.

(此文编辑 文玉珊)

国际运动障碍学会继续医学教育暨帕金森病学术研讨会 会议通知

为更好地了解国内外帕金森病及运动障碍疾病临床治疗的循证医学、临床与基础研究的最新动态和发展趋势,兹定于2007年10月15日~19日在上海召开“国际运动障碍学会继续医学教育暨帕金森病学术研讨会”。会议的主要议题是帕金森病及运动障碍疾病的病因和发病机制、临床诊断、治疗进展及相关前沿基础研究成果。会议主要邀请国内外著名的帕金森病专家主讲帕金森病的临床诊断与治疗的循证医学及作精彩的学术报告。大会由国际运动障碍学会亚太地区执行委员会、中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组主办,上海医学会神经内科专科委员会、上海医学会老年医学专科委员会、上海交通大学医学院附属瑞金医院承办。本次会议将授予国家级继续医学教育iv类学分10分。

会议费用:900元/人(含会议资料及餐费)。住宿代为安排,费用自理。

报名回执请于2007年9月30日前寄至:上海瑞金二路197号,上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科主任办公室(邮编:200025);或传真:021-64454473和E-mail(rjsn197@yahoo.com.cn),联系人:杜敏老师。