

## 姜黄素对大鼠肠缺血再灌注后肠黏膜细胞凋亡及 GRP78 表达的影响

徐 浩, 张居易\*, 杨海林

重庆市开州区人民医院 普外科, 重庆 405400

**摘 要:** 目的 观察姜黄素对大鼠肠缺血再灌注后肠黏膜细胞凋亡及 GRP78 表达的影响。方法 30 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、姜黄素组。采用无创性动脉夹夹闭肠系膜上动脉 1 h 后实施再灌注来建立肠缺血再灌注模型, 姜黄素组在手术前 5 d 开始每天按 200 mg/kg ig 给药 1 次, 假手术组仅分离肠系膜上动脉, 不夹闭。采用 HE 染色观察肠黏膜损伤情况并进行病理评分; TUNEL 法观察肠黏膜细胞凋亡情况并计算凋亡指数; Western blotting 检测再灌注损伤 3 h 时肠黏膜 GRP78 及 Caspase-12 蛋白表达。结果 模型组肠黏膜损伤严重, 绒毛上皮成块脱落, 固有层破坏、溃疡, 腺体破坏严重; 姜黄素组肠黏膜绒毛上皮仅部分脱落, 腺体排列紊乱, 与模型组比较, 病理评分显著降低 ( $P < 0.05$ ); 模型组肠黏膜隐窝可见大量凋亡阳性细胞; 与模型组比较, 姜黄素组肠黏膜隐窝上皮细胞凋亡情况明显减轻, 凋亡指数显著下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 姜黄素组 GRP78 蛋白表达量显著增加 ( $P < 0.05$ ), Caspase-12 蛋白表达量显著下降 ( $P < 0.05$ )。结论 姜黄素有可能通过上调 GRP78 表达, 减少内质网应激所致肠黏膜细胞凋亡, 来减轻肠黏膜的再灌注损伤, 达到保护肠黏膜作用。

**关键词:** 姜黄素; 内质网应激; GRP78; Caspase-12; 肠缺血再灌注损伤; 细胞凋亡

中图分类号: R322.45, R656.7 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 03-0457-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.03.015

## Effect of curcumin on intestinal mucosal cell apoptosis and GRP78 expression after intestinal ischemia-reperfusion in rats

XU Hao, ZHANG Juyi, YANG Hailin

Department of General Surgery, the People's Hospital of Kaizhou District, Chongqing, 405400, China

**Abstract: Objective** To observe the possible effect of curcumin on GRP78 expression and epithelial cells apoptosis in rats after intestinal ischemia reperfusion. **Method** Thirty male SD rats were randomly divided into three groups: sham group, model group and curcumin group, 10 rats in each group. An experimental model of intestinal ischemia reperfusion in rats was established by the occlusion of superior mesenteric artery for one hours by small atraumatic clip, followed by reperfusion, and sham group were prepared in the same way without the occlusion. Curcumin group were feeded curcumin at a dose of 200 mg/kg per day 5 days before operating. Intestinal tissue injury severity of rat was tested by HE assay. The apoptosis of epithelial cells was measured by TUNEL method. The expression of GRP78 in rats tissue after 3 h reperfusion was detected by Western blotting. **Results** In the model group, intestinal mucosa was damaged seriously, villous epithelium was exfoliated, lamina propria was damaged, ulcerated and glands were damaged seriously. Compared with the model group, the pathological score of curcumin group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the apoptosis of intestinal mucosal crypt epithelial cells in curcumin group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the expression of GRP78 and caspase-12 in curcumin group increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Curcumin could reduce intestinal ischemia reperfusion injury in rats by up-regulation GRP78 expression.

**Key word:** curcumin; endoplasmic reticulum stress; GRP78; Caspase-12; intestinal ischemia reperfusion; apoptosis

姜黄素作为一种从中草药姜黄中分离出来的低分子量多酚类化合物,在组织器官中发挥抑制细胞炎症介质的释放、对抗氧化应激、减轻细胞凋亡

等作用<sup>[1-2]</sup>,但是其对肠缺血再灌注损伤的保护机制尚不完全清楚。越来越多的研究<sup>[3-6]</sup>发现,内质网应激所诱导的细胞凋亡在肝、肾及脑等器官缺血再灌

收稿日期: 2019-07-08

第一作者: 徐 浩(1985—),男,硕士研究生,研究方向胃肠疾病基础与临床。E-mail:691095612@qq.com

\*通信作者: 张居易,男,硕士研究生。Tel: (023)52663926 E-mail:1073926256@qq.com

注损伤中发挥关键作用。因此,推测姜黄素也有可能通过调节再灌注所诱导的内质网应激发挥保护肠道的作用。GRP78属热休克蛋白70家族的一员,其被视为内质网应激的标志物<sup>[7-8]</sup>。因此,本实验通过观察姜黄素对缺血再灌注损伤中肠黏膜细胞凋亡及GRP78表达的变化来评价其对内质网应激的影响,以期为姜黄素在肠缺血再灌注临床治疗中的应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要试剂

姜黄素(美国sigma,批号C1386);苏木精及伊红染液(上海碧云天生物技术有限公司);TUNEL试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司);GRP78、Caspase-12抗体(美国Bioworld);Tubulin抗体(内参,武汉三鹰生物技术有限公司)。

### 1.2 主要仪器

显微手术器械及耗材(中国上海手术器械厂);-80℃超低温冰箱(美国Thermo);石蜡切片机(德国Leica);光学显微镜(日本Olympus);电子天平(上海天平仪器厂);超纯净水产生系统(美国Sartorius Airum);小型台式高速离心机(德国Eppendorf);微量移液枪(德国Eppendorf);全自动酶标仪(美国Thermo Fisher);Gel Doc2000型凝胶成像系统(美国Bio-rad);凝胶图像分析软件(美国Bio-Rad公司Quantity one);电泳仪和电转仪(美国Bio-rad)。

### 1.3 实验动物

SPF清洁级雄性SD大鼠30只,体质量250~300g,购于重庆医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证为SCXK(渝)2018-0003。

## 2 方法

### 2.1 分组及模型制备

SD大鼠随机分成3组:假手术组、模型组和姜黄素组,每组10只。姜黄素组大鼠于手术前5d开始每天按200mg/kg ig姜黄素,剂量设置参考文献<sup>[9]</sup>,每天1次。所有动物手术前均禁食12h,自由饮水,用4%水合氯醛10mL/kg ip麻醉后开腹,暴露出肠系膜上动脉,假手术组仅单纯游离而不夹毕,模型组和姜黄素组则用无创性动脉夹夹毕60min造成肠缺血,缺血后松开动脉夹进行再灌注,若10min内肠灌注后颜色由暗黑转为红润,表明灌注成功,则逐层缝合腹膜、腹直肌前鞘及皮肤。于再灌注3h活杀,取距回盲部10cm处肠段约6cm,生理盐水充分冲洗净肠内容物,断肠分2份,1份用4%

多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,行TUNEL染色,另1份置于-80℃低温冰箱保存备检。

### 2.2 观察指标

**2.2.1 普通光镜组织学观察** 标本在4%多聚甲醛固定24h后,经梯度酒精系列脱水,常规石蜡包埋,4μm厚连续切片并进行HE染色,在光镜下进行组织病理学观察。肠黏膜损伤程度评分采用Chiu氏<sup>[10]</sup>8级评分标准评分,即0分为正常黏膜绒毛;1分为绒毛顶端上皮间质间隙增大;2分为上皮层与固有层中度分离;3分为绒毛两侧亦有大量分离伴部分绒毛顶端破损;4分为绒毛破损伴固有层毛细血管暴露;5分为固有层破坏、出血、溃疡;6分为隐窝基底层损伤;7分为肠黏膜全程坏死;8分为肠壁全层坏死。

**2.2.2 肠黏膜细胞凋亡检测** 按TUNEL试剂盒说明书进行,以胞核呈棕黄色者为阳性。400倍高倍视野下随机取5个绒毛隐窝视野,计数每100个细胞中凋亡细胞数为凋亡指数,取所有视野均值为每只动物的凋亡指数。

**2.2.3 Western blotting检测** 将备好的标本用细胞裂解液后提取蛋白;Bradford方法测蛋白浓度,调节蛋白浓度一致,取等量蛋白样品(30μg),SDS-PAGE电泳分离蛋白,湿法将蛋白条带转移至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液封闭1h,1:1000稀释一抗,4℃孵育过夜;洗涤后,1:3000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG室温孵育2h。洗涤后,显色剂ECL曝光,显影,定影,以Tubulin为内参。对结果进行吸光度扫描分析,并计算出相对值表达量。

### 2.3 统计学分析

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以SPSS 20.0统计软件进行单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 普通光镜组织学观察

如图1所示,假手术组肠黏膜正常,显示规则的绒毛;模型组肠黏膜损伤严重,绒毛上皮成块脱落,固有层破坏、溃疡,腺体破坏严重,姜黄素组肠黏膜绒毛上皮仅部分脱落,腺体排列紊乱,总体较模型组轻。Chiu氏评分见表1,与假手术组比较,模型组病理评分显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,姜黄素组病理评分显著降低( $P < 0.05$ )。

### 3.2 TUNEL检测肠黏膜细胞凋亡

如图2所示,假手术组小肠黏膜绒毛顶端可见少数凋亡细胞;模型组肠黏膜隐窝可见大量凋亡阳

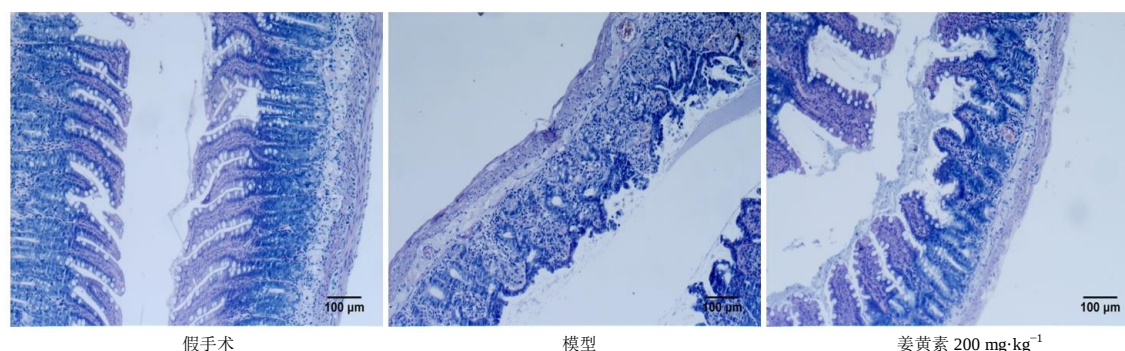


图1 各组肠黏膜HE染色

Fig. 1 HE staining of intestinal mucosa in each group

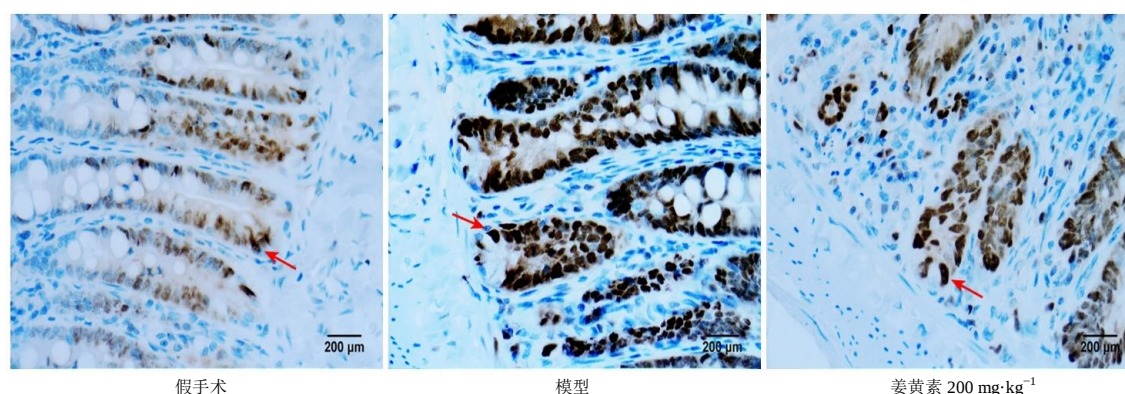
表1 姜黄素对肠黏膜病理损伤和细胞凋亡指数的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of curcumin on pathological damage and apoptosis index of intestinal mucosa( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 病理损伤评分               | 细胞凋亡指数                  |
|-----|---------------------------|----------------------|-------------------------|
| 假手术 | —                         | 0±0                  | 7.50±0.58               |
| 模型  | —                         | 5.8±0.8*             | 53.90±2.09*             |
| 姜黄素 | 200                       | 3.9±0.8 <sup>#</sup> | 40.40±2.20 <sup>#</sup> |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs sham group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group



红色箭头所示为凋亡阳性细胞

red arrow shows apoptotic positive cells

图2 各组肠黏膜TUNEL染色

Fig. 2 TUNEL staining of intestinal mucosa in each group

性细胞;姜黄素组肠黏膜隐窝上皮细胞凋亡情况明显减轻。凋亡指数见表1,与假手术组比较,模型组凋亡指数显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,姜黄素组凋亡指数显著下降( $P < 0.05$ )。

### 3.3 Western blotting检测结果

如图3所示,假手术组GRP78与Caspase-12蛋白仅微量表达;与假手术组比较,模型组GRP78与Caspase-12蛋白表达量均显著上升( $P < 0.05$ );与模型组比较,姜黄素组GRP78蛋白表达量显著增加( $P < 0.05$ ),Caspase-12蛋白表达量显著下降( $P < 0.05$ )。结果见表2。

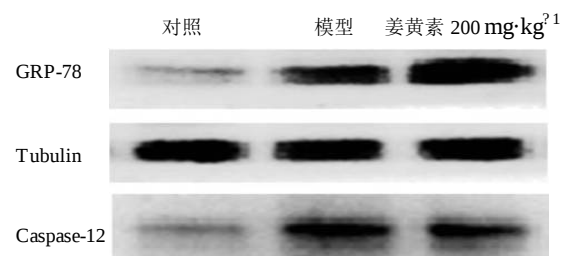


图3 各组Western blotting检测结果

Fig. 3 Western blotting test results of each group

## 4 讨论

肠道作为缺血反应最敏感的器官之一,严重的

表2 姜黄素对 GRP78 与 Caspase-12 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 2 Effect of curcumin on the expression of GRP78 and caspase-12( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别  | 剂量/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | GRP78/Tubulin | Caspase-12/<br>Tubulin |
|-----|-------------------------------|---------------|------------------------|
| 假手术 | —                             | 8.78±0.23     | 8.61±0.36              |
| 模型  | —                             | 18.04±0.96*   | 25.18±1.37*            |
| 姜黄素 | 200                           | 24.85±1.43#   | 19.59±1.00#            |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ \* $P < 0.05$  vs sham group; # $P < 0.05$  vs model group

创伤、失血及肝脏或者小肠移植术等原因均可能引起肠缺血再灌注损伤。而肠的缺血再灌注可造成内质网功能失调,诱发内质网应激。反过来,持续的内质网应激会导致肠黏膜细胞凋亡,加重肠的再灌注损伤。我们前期实验通过夹闭肠系膜上动脉,成功建立肠缺血再灌注模型,且成功观察到了再灌注对肠黏膜所致的损伤及细胞凋亡情况,以及通过观察 GRP78 表达的情况,证实了内质网应激参与了肠缺血再灌注损伤<sup>[8]</sup>。

GRP78 作为内质网应激的标志物,在生理情况下呈基础水平表达,起到了维持内质网内环境稳定作用,主要通过 ATP6、IRE1 和 PERK 3 种酶的内质网膜内端结合来抑制上述 3 种酶活性<sup>[11]</sup>。同时,GRP78 可以通过与 Caspase-7 和 caspase-12 形成复合物,阻止 Caspase-12 激活和从内质网释放,来抑制 Caspase-12 所致细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。但如果内质网应激持续的存在,ATP6、IRE1 和 PERK 会与 GRP78 解离,通过激活其下路凋亡路径致凋亡<sup>[7]</sup>。Urban 等<sup>[12]</sup>在大脑缺血再灌注研究中发现伴侣蛋白 GRP78 的上升能够阻碍细胞发生凋亡,但 Gadd153 及 Caspase-12 表达上调同时使细胞作好凋亡的准备。因此,抑制持续的内质网应激,阻止其诱导的凋亡途径将有望减轻或消除缺血再灌注对肠黏膜上皮细胞的损伤,为我们防治缺血性肠病提供了新的治疗思路。

姜黄素是从姜黄中提取的黄色多酚化合物,越来越多的研究证明姜黄素可用于治疗癌症、心血管疾病和炎症状态<sup>[13-14]</sup>。近年来关于姜黄素对肠缺血再灌注损伤保护有不少机制提出如:①Tian 等研究发现<sup>[15]</sup>,姜黄素能够显著逆转缺血再灌注诱导的 ZO-1 蛋白下调,起到维持保护肠黏膜通透性的作用,同时姜黄素能通过抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的释放来修复肠道缺血再灌注损伤;②Okudan<sup>[16]</sup>的研究结果表明,姜黄素预处理作为一种营养补充

剂,对大鼠肠缺血再灌注损伤有明显的减轻作用,其作用机制包括抗炎和抗氧化作用,抗氧化酶活性升高、氧化应激和促炎细胞因子水平降低。同时大量研究表明<sup>[17-20]</sup>,姜黄素预先给药可通过抑制内质网应激途径介导的细胞凋亡减轻大鼠全脑缺血再灌注损伤,其机制与上调 GRP78 表达和减少 Gadd153 和 Caspase-12 表达有关。但关于姜黄素对肠缺血再灌注损伤中细胞凋亡及内质网应激的研究甚少。

本实验通过 HE 和 TUNEL 染色分析,发现姜黄素可以明显改善肠缺血再灌注所致的病理损伤,减弱了肠黏膜上皮细胞凋亡。再次证明了姜黄素对肠缺血再灌注损伤肠黏膜的保护作用,而其保护作用可能是通过减少肠黏膜细胞凋亡来实现。最重要的是,我们通过 Western blotting 检测发现,姜黄素可以上调 GRP78 表达和抑制 Caspase-12 促凋亡蛋白表达,因此,推测姜黄素可能通过上述途径来抑制缺血再灌注时内质网应激实现其保护作用。故本研究最大的临床实际价值在于再一次证明姜黄素是一种新的肠黏膜保护剂,且其保护机制与减轻内质网应激所诱导的细胞凋亡有关。所以在小肠移植、创伤及肠梗阻等临床肠缺血性疾病的治疗过程中,应用姜黄素可以起到保护肠黏膜的作用,让患者受益。

姜黄素减轻肠缺血再灌注大鼠肠黏膜的损伤,减少肠黏膜细胞凋亡,机制可能与其上调 GRP78 表达,抑制 Caspase-12 表达,减轻内质网应激诱导的细胞凋亡有关。

#### 参考文献

- [1] Bavarsad K, Riahi M M, Saadat S, et al. Protective effects of curcumin against ischemia-reperfusion injury in the liver [J]. Pharmacol Res, 2019, 141: 53-62.
- [2] Hou Y, Wang J, Feng J. The neuroprotective effects of curcumin are associated with the regulation of the reciprocal function between autophagy and HIF-1 $\alpha$  in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Drug Des Dev Ther, 2019, 13: 1135-1144.
- [3] Xu F, Ma R, Zhang G, et al. Estrogen and propofol combination therapy inhibits endoplasmic reticulum stress and remarkably attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury and OGD injury in hippocampus [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108: 1596-1606.
- [4] Guo C, Zhang J, Zhang P, et al. Ginkgolide B ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury in rats via inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. Drug Des Dev Ther, 2019, 13: 767-774.

- [5] IKazaz I O, Demir S, Yulug E, et al. N-acetylcysteine protects testicular tissue against ischemia/reperfusion injury via inhibiting endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. *J Pediatr Urol*, 2019,15(3): 253.
- [6] Liu H, Wang L, Weng X D, et al. Inhibition of Brd4 alleviates renal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress by blocking FoxO4-mediated oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2019, Doi: 10.1016/j.redox.2019.101195.
- [7] Zhu Y, Zhang L, Fu R, et al. The change tendency of endoplasmic reticulum stress associated proteins in rats with spinal cord injury [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 1938-1947.
- [8] 徐浩, 李洋, 王继见, 等. 葡萄糖调节蛋白78在大鼠肠缺血再灌注损伤中的表达及其意义 [J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(5): 679-682.
- [9] 廖美娟, 赵伟成, 梁幸甜, 等. 姜黄素对肠缺血再灌注继发性肺损伤大鼠 TNF- $\alpha$  与 IL-6 表达的影响 [J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(1): 1-4.
- [10] Petrat F, Groot de H. Protection against severe intestinal ischemia/reperfusion injury in rats by intravenous resveratrol [J]. *J Surg Res*, 2011, 167(2): 145-155.
- [11] Wiseman R L, Haynes C M, Ron D. SnapShot: The unfolded protein response [J]. *Cell*, 2010, 140(4): 590-590.
- [12] Urban P, Pavlikova M, Sivonova M, et al. Molecular analysis of endoplasmic reticulum stress response after global forebrain ischemia/reperfusion in rats: effect of neuroprotectant simvastatin [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(2): 181-92.
- [13] Mokhtari-Zaer A, Marefati N, Atkin S L, et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 214-222.
- [14] Fan Z, Yao J h, Li Y, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion by inhibiting the pathway of NF- $\kappa$ B [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4): 3451-3459.
- [15] Tian S, Guo R, Wei S, et al. Curcumin protects against the intestinal ischemia-reperfusion injury: involvement of the tight junction protein ZO-1 and TNF- $\alpha$  related mechanism [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2016, 20(2): 147-152.
- [16] Okudan N, Belviranli M, Gokbel H, et al. Protective effects of curcumin supplementation on intestinal ischemia reperfusion injury [J]. *Phytomedicine*, 2013, 15, 20(10): 844-848.
- [17] 叶莉莎, 孟波, 革炜, 等. 姜黄素预先给药对大鼠全脑缺血再灌注诱导内质网应激的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2011, 31(2): 234-236.
- [18] Zhu H, Fan Y, Sun H, et al. Curcumin inhibits endoplasmic reticulum stress induced by cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 4047-4052.
- [19] Chhunchha B, Fatma N, Kubo E, et al. Curcumin abates hypoxia-induced oxidative stress based-ER stress-mediated cell death in mouse hippocampal cells(HT22) by controlling Prdx6 and NF-KB regulation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304: C636-C655.
- [20] Shakeri A, Zirak M R, Wallace Hayes A. Curcumin and its analogues protect from endoplasmic reticulum stress: Mechanisms and pathways [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 146: 104335.