

姜黄素对小鼠皮肤移植排斥反应的影响

张红果¹, 曹军平², 树俊莲¹, 刘文霞³, 马毅^{4*}

1. 武警总医院药剂科, 北京 100039
2. 武警总医院消毒供应科, 北京 100039
3. 武警北京总队第三医院特诊科, 北京 100141
4. 武警总医院磁共振科, 北京 100039

摘要: 目的 探讨姜黄素对小鼠皮肤移植排斥反应的免疫抑制作用。方法 BALB/c 小鼠作为供体, C57BL/6 小鼠作为受体, 建立背-背皮肤移植模型。术后分为假手术组、模型组、姜黄素 (50 mg/kg) 组、环孢素 A (10 mg/kg) 组、姜黄素+环孢素 A (50 mg/kg+5 mg/kg) 组, 每组 10 只, 每天 1 次, ip 给药 10 d。记录各只小鼠移植皮片的存活天数, 术后第 4、8 天采用 ELISA 法检测血浆白细胞介素-2 (IL-2) 浓度。结果 姜黄素组、环孢素 A 组、姜黄素+环孢素 A 组的小鼠移植皮片存活时间分别为 14.77、16.81、19.96 d, 与模型组 (12.10 d) 比较差异显著 ($P < 0.01$); 姜黄素+环孢素 A 组的小鼠移植皮片存活时间与姜黄素或环孢素 A 组比较显著延长 ($P < 0.05$ 、0.01); 姜黄素组、环孢素 A 组、姜黄素+环孢素 A 组术后第 4 天血浆 IL-2 水平分别为 3.68、2.05、2.70 ng/mL, 与模型组 (4.76 ng/mL) 比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01); 姜黄素组、环孢素 A 组、姜黄素+环孢素 A 组术后第 8 天血浆 IL-2 水平分别为 4.06、2.11、2.95 ng/mL, 与模型组 (5.85 ng/mL) 比较差异显著 ($P < 0.01$)。结论 姜黄素具有抑制皮肤移植小鼠免疫排斥反应的作用。

关键词: 姜黄素; 免疫抑制; 皮肤移植; 小鼠; 白细胞介素-2

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)08-1082-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.08.008

Immunosuppressive effect of curcumin on skin transplantation in mice

ZHANG Hong-guo¹, CAO Jun-ping², SHU Jun-lian¹, LIU Wen-xia³, MA Yi⁴

1. Department of Pharmacy, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039
2. Department of Sterilization and Supply, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039
3. Department of Special Diagnosis, The Third Hospital of Beijing Armed Police Forces, Beijing 100141, China
4. Department of MRI, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039

Abstract: Objective To investigate the immunosuppressive effect of curcumin on xenogenic skin transplantation in mice. **Methods** The skin transplantation model was established by an operation, tergal skin flaps from BALB/c donor mice transplanted to the back of C57BL/6 recipient mice. Then recipient mice were divided into five groups at random, namely sham, model, curcumin (50 mg/kg), Cyclosporin A (10 mg/kg) and curcumin + Cyclosporin A (50 mg/kg + 5 mg/kg). All mice were ip administered once daily for 10 d. The survival days of skin graft were recorded in all groups. The interleukin-2 (IL-2) levels in plasma of all mice were determined by ELISA 4 and 8 d after the operation, respectively. **Results** The mean survival time of skin graft in curcumin, Cyclosporin A and curcumin + Cyclosporin A groups were 14.77, 16.81 and 19.96 d, respectively, which showed significant differences comparing with 12.10 d of model group ($P < 0.01$). Combination of curcumin and Cyclosporin A administration showed a longer mean survival days than curcumin or Cyclosporin A group ($P < 0.05$ or 0.01). The IL-2 levels in plasma of mice in curcumin, Cyclosporin A and curcumin + Cyclosporin A groups on postoperative day 4 were 3.68, 2.05 and 2.70 ng/mL, respectively, which were significantly reduced than 4.76 ng/mL of model group ($P < 0.05$ or 0.01). The IL-2 levels in plasma of mice in curcumin, Cyclosporin A and combination of curcumin and Cyclosporin A groups on postoperative day 8 were 4.06, 2.11 and 2.95 ng/mL, respectively, which were significantly reduced than 5.85 ng/mL of model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Curcumin may have a good

收稿日期: 2017-01-16

作者简介: 张红果, E-mail: zhanghongguoYi@foxmail.com

*通信作者 马毅, E-mail: mayiwj@sina.com

immunosuppressive effect on mice with xenogenic skin transplantation.

Key words: curcumin; immunosuppressive effect; skin transplantation; mouse; interleukin-2

免疫抑制剂的出现使器官移植作为一种治疗终末期器官衰竭的方法得以广泛应用,但目前临床常用的免疫抑制剂仍不够理想,存在毒性较大、长期使用患者难以耐受等弊端。因此,寻找新型高效、低毒的免疫抑制药物依然是临床关注的热点。姜黄素(curcumin)是从姜黄、莪术、郁金、石菖蒲等植物中分离的一种酚类衍生物,具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、神经保护等药理作用^[1-4]。目前姜黄素作为免疫抑制剂用于治疗自身免疫性疾病已引起国内外研究的关注^[5-6],据报道,姜黄素对器官移植具有抗排斥反应的作用^[7-8],是一种极具潜力的免疫抑制药物。本研究通过异体皮肤移植小鼠模型,探讨姜黄素对器官移植排斥反应的影响,以期为姜黄素的深入开发及其在器官移植免疫抑制上的应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠 40 只、C57BL/6 小鼠 50 只,均为雄性,12 周龄,体质量为 18~23 g,由河北医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(冀)2013-1-0003。饲养于普通环境条件下,自由摄食和饮水。

1.2 药品与试剂

姜黄素(纯度≥98%),由 Sigma 公司提供,批号 048K0704,使用前以亚麻油配成所需浓度。环孢素 A(Ciclosporin A),由瑞士诺华制药有限公司提供,使用前以生理盐水配成所需浓度。小鼠白介素-2(IL-2)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒,购自美国 R&D systems 公司。

1.3 主要仪器

台式高速离心机,型号 TG16-WS,湖南省湘仪离心机仪器有限公司产品;酶标仪,型号 AC100-110,瑞士 Tecan 公司产品。

2 方法

2.1 动物模型的建立

参照文献方法^[9],行背-背皮肤移植。供体: BALB/c 小鼠;受体: C57BL/6 小鼠。取 C57BL/6 小鼠,1%戊巴比妥钠按 50 mg/kg ip 麻醉后,于背部移植区脱毛、消毒,剪去移植区皮肤,形成植皮创基备用。将 BALB/c 小鼠同样条件麻醉、脱毛、

消毒后,于其背部切取全层皮肤一块,刮除其皮下脂肪和肉膜层,修剪成与 C57BL/6 小鼠创面大小相等的皮片,移植于 C57BL/6 小鼠植皮创基上,四周间断缝合固定,轻压皮片,使其与创面贴紧,用创可贴包扎,分笼饲养。

2.2 分组与给药

术后受体小鼠随机分为模型组(等体积溶媒)、姜黄素(50 mg/kg)组^[8]、环孢素 A(10 mg/kg)组^[10]、姜黄素+环孢素 A(50 mg/kg+5 mg/kg)组^[11],每组 10 只;另取 10 只 C57BL/6 小鼠,移去移植区皮肤后再植入原位,作为假手术组(等体积溶媒)。各组均为手术当天开始 ip 给药,每天 1 次,连续 10 d。

2.3 移植皮片的存活情况观察

术后每天定时观察小鼠一般状况和移植皮片的存活情况。若移植皮片质地柔软、颜色红润、边缘融合,有部分毛发生长则判为存活或耐受;若移植皮片毛发脱落和表皮坏死为排斥开始;若皮片发黑变硬,形成干痂脱落或溃烂大于 1/2,则认为完全被排斥;记录各只小鼠移植皮片出现完全排斥反应的天数,为移植皮片存活时间。

2.4 血浆 IL-2 测定

于皮肤移植术后第 4、8 天(预试验证实小鼠的移植皮片在 5~7 d 开始发生排斥,因此选取此时间点取样),采用剪尾采血法取血,离心取血浆,用 ELISA 法检测小鼠血浆中白细胞介素-2(IL-2)浓度,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件分析数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对移植皮片存活时间的影响

实验期间各组小鼠均未出现感染死亡现象;假手术组移植皮片未出现排斥反应,因此不参与数据统计;姜黄素组、环孢素 A 组、姜黄素+环孢素 A 组的小鼠移植皮片存活时间分别为 14.77、16.81、19.96 d,与模型组(12.10 d)比较,差异显著($P < 0.01$);姜黄素+环孢素 A 组小鼠移植皮片存活时间与姜黄素或环孢素 A 单用组比较,均显著延长($P < 0.05$ 、 0.01),见图 1。

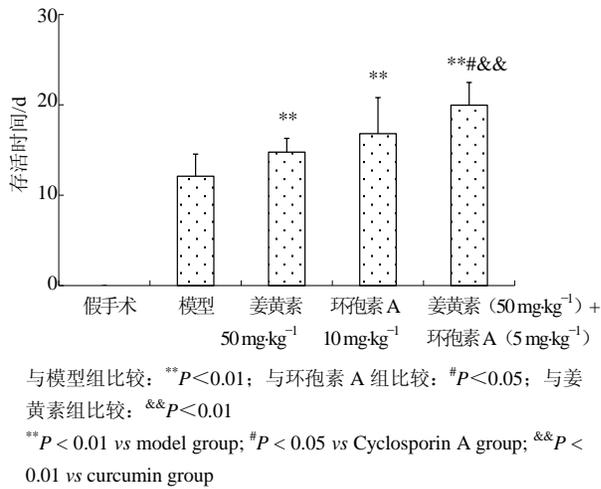
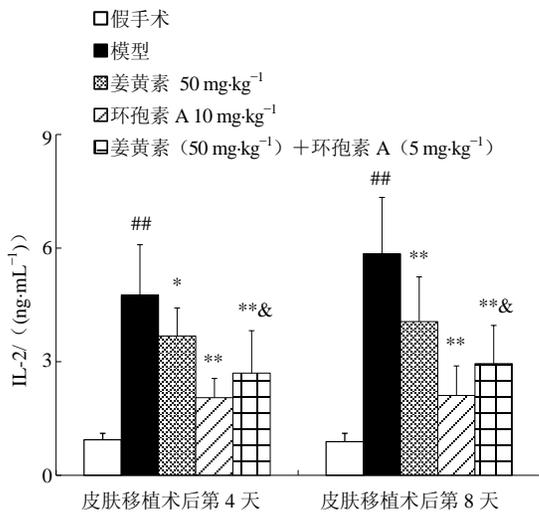


图 1 各组移植皮片存活时间 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Survival days of skin graft in all groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 对血浆 IL-2 浓度的影响

如图 2 所示, 皮肤移植术后第 4、8 天, 模型组小鼠血浆 IL-2 浓度分别为 4.76、5.85 ng/mL, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.01$); 姜黄素组、环孢素 A 组、姜黄素+环孢素 A 组移植术后第 4 天血浆 IL-2 浓度分别为 3.68、2.05、2.70 ng/mL, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05、0.01$); 姜黄素组、环孢素 A 组、姜黄素+环孢素 A 组移植术后第 8 天血浆 IL-2 水平分别为 4.06、2.11、2.95 ng/mL, 与模型组



与假手术组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与姜黄素组比较: & $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ vs curcumin group

图 2 各组血浆 IL-2 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 IL-2 levels of plasma in all groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

比较差异显著 ($P < 0.01$); 姜黄素+环孢素 A 组小鼠术后第 4、8 天的血浆 IL-2 水平与环孢素 A 组比较均差异不显著。

4 讨论

临床上异体移植的皮肤因其所涉及抗原的典型性, 在所有移植组织器官中最难以存活; 采用动物皮肤移植模型来研究免疫排斥反应, 是一种简单而准确的免疫学方法^[7]。环孢素 A 作为临床器官移植常用的免疫抑制剂, 抗排斥反应作用强大, 但其毒副作用尤其是肝肾毒性令临床医生和患者深感困扰。作为天然药物中的活性成分, 姜黄素的安全性和免疫抑制活性已得到临床研究证实, 其免疫抑制活性能否应用于器官移植领域, 业已引起国内外学者的关注, 目前关于姜黄素对皮肤移植抗排斥反应的研究尚未见报道。本研究探讨了姜黄素对异体皮肤移植小鼠模型的影响, 结果发现姜黄素可使移植皮片的存活率明显提高, 平均存活时间延长, 急性排斥反应显著减轻; 表明姜黄素一方面可增强环孢素 A 的抗排斥反应效果, 另一方面可减少传统免疫抑制剂的剂量以提高用药安全性并降低医疗成本。据报道, 姜黄素在心、肾等动物器官移植模型的研究中具有较好的抗排斥反应效果^[6, 10]。刘慎微等^[11]研究发现, 姜黄素对长期口服环孢素 A 造成的大鼠肾脏毒性有防治作用, 与其抗氧化、减少炎细胞浸润、改善间质纤维化等作用有关, 提示姜黄素与环孢素 A 联合应用可能有减毒效果。

当异体器官移植发生免疫排斥时, 受者体内的免疫活性细胞被移植物抗原激活而分泌大量的细胞因子。IL-2 即由活化的 CD4⁺ T 细胞产生, 是参与器官排斥反应的主要细胞因子。IL-2 可促进 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖活化, 激活 CTL 毒性作用, 诱导其他细胞因子的分泌, 还可刺激已耐受的移植物重新发生排斥反应^[12]。因此, IL-2 的表达水平是反映免疫排斥发生程度、预测排斥风险的指标之一。有临床报道称将 IL-2 抗体用于治疗器官移植患者, 取得较好疗效^[13]。本研究探讨了姜黄素对皮肤移植小鼠 IL-2 水平的影响, 结果发现异体皮肤移植小鼠血浆 IL-2 表达水平比自体皮肤移植小鼠有显著提高, 提示异体移植有急性免疫排斥反应的发生; 移植术后第 4、8 天, 姜黄素单用、姜黄素与亚剂量环孢素 A 合用均可使小鼠血浆的 IL-2 水平明显降低, 说明姜黄素可抑制皮肤移植动物体内 IL-2 分泌, 进而抑制 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖、活化,

减少 B 细胞产生抗体的量;这在一定程度上抑制了其他细胞因子的释放,降低了 MHC-II 类抗原的表达;同时抑制或减少了黏附分子介导白细胞黏附于血管内皮,减轻了趋化因子诱导淋巴细胞对移植物的浸润,从而减轻免疫排斥反应^[6]。这与姜黄素抑制其他器官移植动物体内 IL-2 表达的报道结论一致^[6, 10]。传统免疫抑制剂环孢素 A 对 IL-2 表达的过度抑制,反过来可影响细胞因子撤退诱导的细胞凋亡,使得淋巴细胞对凋亡的敏感性减弱,同时亦影响了调节性 T 细胞的产生和功能^[12];因此,本研究中采用姜黄素与亚剂量环孢素 A 合用,合用组第 4、8 天的血浆 IL-2 水平与环孢素 A 单用组比较均无统计学意义,二者合用可望缓解环孢素 A 对 IL-2 表达水平的过度抑制。

总之,姜黄素对异体皮肤移植动物具有抗排斥反应的作用,其作用机制尚需深入研究。

参考文献

- [1] 李 军,熊 琨,龚 元,等. 基于信号转导通路的姜黄素抗氧化机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2373-2380.
- [2] Mirzaei H, Shakeri A, Rashidi B, et al. Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 102-112.
- [3] 常明向,吴梅梅,李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 42-47.
- [4] 赵 爽,程学敏,黎海娟,等. 姜黄素干预中枢神经系统疾病生物学机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 512-518.
- [5] 郭 颖,高 毅,刘永光. 免疫抑制剂姜黄素逆转胰岛素抵抗的研究 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(5): 481-484.
- [6] Deters M, Hütten H, Kaever V. Synergistic immunosuppressive effects of the mTOR inhibitor sirolimus and the phytochemical curcumin [J]. Phytomedicine, 2013, 20(2): 120-123.
- [7] Chueh S C, Lai M K, Liu I S, et al. Curcumin enhances the immunosuppressive activity of cyclosporine in rat cardiac allografts and in mixed lymphocyte reactions [J]. Transplant Proc, 2003, 35(4): 1603-1605.
- [8] 高瑞辉,祝恒成,刘修恒,等. 腹腔注射姜黄素延长小鼠移植心脏存活时间的作用及其机制 [J]. 中华器官移植杂志, 2009, 30(9): 531-535.
- [9] 成 功,陈 明,孙则禹,等. 建立小鼠皮肤移植排斥模型稳定获得记忆 T 细胞 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(4): 32-35.
- [10] 于艳秋,田 伟,张海鹏,等. 高压氧与环孢素 A 对皮肤移植小鼠脾活性氧及一氧化氮含量的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(12): 1286-1288.
- [11] 蔡振刚,于志军,温 爽,等. 青藤碱对大鼠肝移植急性排斥反应的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(4): 112-114.
- [12] 张黎黎,吕 军,宛 霞,等. 姜黄素对骨髓间充质干细胞诱导肾移植免疫耐受的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(28): 4450-4454.
- [13] 刘慎微,付艳红. 姜黄素对大鼠环孢素肾毒性的防治作用 [J]. 中国药师, 2007, 10(5): 419-422.
- [14] Witkowska A, Zywiec J, Stozik A, et al. Interleukin 2 as a potential cancer marker in patients after kidney transplantation [J]. Ann Agric Environ Med, 2015, 22(2): 320-324.
- [15] Campara M, Tzvetanov I G, Oberholzer J. Interleukin-2 receptor blockade with humanized monoclonal antibody for solid organ transplantation [J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(6): 959-969.