

·论 著·

姜黄素对大鼠小肠炎组织 MPO、SOD 作用的影响

宋卫兵 张振书 肖冰 黄茂梁 赵士义 王新颖

【摘要】 目的 研究姜黄素对受损肠黏膜大鼠小肠组织髓过氧化物酶 (MPO), 超氧化物歧化酶 (SOD)活性的影响,探讨姜黄素的抗炎机制。方法 应用氨甲蝶呤制备大鼠小肠炎模型,实验设正常对照组,模型对照组,柳氮磺胺吡啶(SASP, 100 mg/kg)组,姜黄素(100 mg/kg)组。后2组每天灌胃给药1次,给药时间从造模后第2天开始至实验结束,共6 d,第4天、第7天分别观察大鼠疾病活动指数(DAI)和结肠黏膜损伤指数(CMDI),光镜下组织学评分(HS),生化法检测大鼠小肠组织髓过氧化物酶(MPO)及超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果 与正常组相比,模型组大鼠DAI、CMDI和HS明显增加($P < 0.01$),小肠组织MPO活性显著升高($P < 0.01$),SOD活性则显著下降($P < 0.01$),姜黄素可改善DAI、CMDI和HS($P < 0.01$),降低MPO活性($P < 0.01$),增加SOD活性($P < 0.01$)。结论 姜黄素对大鼠小肠炎具有保护作用,其机制可能与减少脂质氧化及增加清除氧自由基的能力有关。

【关键词】 姜黄素;肠黏膜损伤;MPO;SOD

Effects of curcumin on MPO and SOD of methotrexate-Induced small intestinal damage in rats SONG Wei-bing, ZHANG Zhen-shu, XIAO Bing, et al. Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of curcumin on experimental rat enteritis and the possible mechanism. **Methods** Rat model of enteritis was induced by methotrexate (MTX) and sodium chloride. The experimental animals were randomly divided into four groups: normal group, model group, sulfasalazine (SASP) group and curcumin group. SASP (100 mg/kg), curcumin (100 mg/kg), and saline were administered to rats in corresponding groups by gastric irrigation daily for 6 days. The disease activity index (DAI), colonic mucosal damage index (CMDI) and histological score (HS) of the rats were observed and evaluated. The level of myeloperoxidase(MPO) and superoxide dismutase(SOD) was measured by biochemical method. **Results** Compared with normal group, the DAI, CMDI and HS in model group was significantly increased, and the level of MPO was augmented. However, SOD activity was significantly reduced. **Conclusion** Curcumin has beneficial effect on rat enteritis by reducing lipid peroxidation and resisting oxygen free radicals.

【Key words】 Curcumin; Enteritis; Myeloperoxidase; Superoxide dismutase

大量研究证实,肠黏膜结构受损主要由致病因素引起肠黏膜释放致炎化学因子和细胞因子,引起上皮细胞凋亡或者死亡^[1]。在这一过程中,活性氧族(reactive oxygen species, ROS)起到了“扳机”的作用。

姜黄素是一种天然低毒的药用植物,主要来源于姜科姜黄属植物姜黄的根茎,是姜黄中的主要活性成分。近年来,国内外许多文献相继报道姜黄素具有抗感染、抗炎、抗凝、抗癌、抗氧化、清除自由基

等作用^[2]。我们在建立大鼠小肠炎基础上,通过测定大鼠小肠组织中髓过氧化物酶(MPO),超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化,以探讨姜黄素的抗炎机制。

材料和方法

一、实验动物

Sprague-Dawley (SD)大鼠 80 只,雌性,体质量 200 ± 20 g,购于南方医科大学实验动物中心,每日光照 12 h,室温条件下饲养。

二、主要试剂与仪器

注射用氨甲蝶呤(MTX),购于浙江万马药业有限公司,柳氮磺胺吡啶片为上海三维制药有限公司

作者单位:510515 南方医科大学南方医院消化病研究所
通讯作者:张振书, E-mail: zzs6689@163.com

产品,SOD及MPO试剂盒购自南京建成生物研究所,其它试剂为国产分析纯。722分光光度仪为上海第三分析仪器厂产品,水浴箱为江苏红旗医疗器械厂产品。

三、方法

1. 模型建立

大鼠适应一周后,腹腔内注射氨甲蝶呤(20 mg/kg体重),造成小肠炎^[3],第4天及第7天时处死大鼠,进行指标分析。

2. 分组及评分

实验设正常对照组、模型对照组、SASP组(100 mg/kg)、姜黄素组(100 mg/kg),后两组从造模后第2天开始,每日按剂量灌胃一次,共6次。第4天和第7天分别观察大鼠一般状况及粪便性状,记录评分。

疾病活动指数(DAI)评分标准参照文献^[4]。DAI = (体重下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数)/3。

组织学评分^[5]生理盐水冲洗干净大体标本,肉眼观察大体形态并进行结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分,评分标准:无损伤为0分;轻度充血,水肿,表面光滑,无糜烂或溃疡为1分;充血水肿,黏膜粗糙呈颗粒状,有糜烂或肠黏连为2分;高度充血水肿,黏膜表面有坏死及溃疡形成,溃疡最大纵径 < 1.0 cm,肠壁增厚或表面有坏死及炎症为3分;在3分基础上溃疡最大纵径 > 1.0 cm,或全肠壁坏死为4分。

3. 标本收集

第4天及第7天分别腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠后。将其仰卧固定于手术台,行沿腹部正中切口,分离小肠组织,沿肠系膜纵轴剪开,用冰生理盐水冲洗净,肉眼观察大体形态并进行评分,同时取病变最明显处组织置于10%中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,切片,染色,光镜下观察组织学改变并评分,距回盲瓣5 cm处取5 cm小肠称重,加入3倍体积磷

酸缓冲液(0.1 M,pH 7.2),匀浆后10 000 rpm离心30 min,取上清液测MPO、SOD活性。

4. SOD、MPO的检测

按试剂盒说明书要求严格操作。

四、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件进行分析,两组间比较用单因素方差分析,组间差异采用 q 检验, $P < 0.05$ 差异有显著性。

结 果

一、大鼠一般状况

造模后第2天开始,大鼠出现腹泻、解黄色半稀便、稀便或粪便潜血试验(+)、血便,精神倦怠,活动进食减少等现象。SASP组和姜黄素组的一般情况及消化道症状好于模型组,DAI评分明显降低($P < 0.01$),但SASP组和姜黄素组之间差异无显著性($P > 0.05$),见表1。

二、大体形态及组织学改变

模型组第4天可见不同程度充血、水肿、糜烂,第7天见充血水肿明显,可见出血点及浅小溃疡形成,显微镜下分别见黏膜及黏膜下层血管高度扩张充血,大量炎细胞浸润,以中性粒细胞为主,CMDI评分分别显著高于正常组($P < 0.01$)。姜黄素组与SASP组大鼠肠黏膜充血、水肿、糜烂等现象较模型组显著减轻。同时取病变最明显处组织置于10%中性甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,切片,染色,光镜下观察组织学改变并评分(HS)。切片15个高倍视野的平均评分:指标为溃疡、炎症、肉芽肿、上皮细胞异型增生、病变深度,按有无及轻中重程度分别计为0,1,2和3,病变深度达黏膜下层、肌层、浆膜层分别计为1,2和3,以上各项相加得总分,详见表1。实验过程中死亡的动物疾病活动指数(DAI)计为4分,但由于死亡原因与结肠炎并不一定相关,因此死后的各项评分如组织学评级等不计入统计分析。

表1 各组大鼠DAI,CMDI及HS评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	实验(天)	剂量(mg/kg)	DAI	CMDI	HS
正常组	4	-	0.12 ± 0.07	0.30 ± 0.10	0.16 ± 0.18
	7	-	0.12 ± 0.09	0.30 ± 0.19	0.16 ± 0.20
模型组	4	-	2.02 ± 1.17	2.53 ± 0.09	2.09 ± 0.15
	7	-	3.19 ± 1.02	3.12 ± 0.14	3.04 ± 0.20
姜黄素组	4	100	1.02 ± 0.09	1.69 ± 0.16	1.69 ± 0.24
	7	100	0.50 ± 0.17	0.61 ± 0.20	0.89 ± 0.31
SASP组	4	100	1.09 ± 0.06	1.68 ± 0.42	1.69 ± 0.21
	7	100	0.51 ± 0.30	0.59 ± 0.10	0.90 ± 0.39

注:各组与同期正常组比 $P < 0.01$,姜黄素组、SASP组与同期模型组比 $P < 0.01$;姜黄素组与同期SASP组比 $P > 0.05$ 。

三、姜黄素对 MPO 含量及 SOD 活性的影响

模型组肠黏膜 MPO 的活性分别明显高于同期正常组 ($P < 0.01$), 模型组第 7 天肠黏膜 MPO 的含量明显低于第 4 天的模型。模型组肠黏膜 SOD 活性明显低于同期正常组 ($P < 0.01$), 且模型组第 7 天肠黏膜 SOD 的含量明显高于第 4 天的模型。姜黄素组和 SASP 组均可下调 MPO 活性, 增强 SOD 活性。姜黄素组在降低 MPO, 增加 SOD 水平与 SASP 组相当 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 各组大鼠 MPO, SOD 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	实验(天)	只数	SOD(U/g)	MPO(U/g)
正常组	4	10	24.32 ± 7.11	0.26 ± 0.76
	7	10	23.39 ± 6.18	0.25 ± 0.81
模型组	4	10	12.62 ± 2.17	0.82 ± 0.29
	7	10	9.19 ± 3.18	1.22 ± 0.36
姜黄素组	4	10	16.73 ± 8.14	0.92 ± 0.38
	7	10	19.32 ± 0.19	0.53 ± 0.12
SASP组	4	10	17.67 ± 0.56	0.72 ± 0.24
	7	10	19.69 ± 0.16	0.59 ± 0.21

注: 各组与同期正常组比 $P < 0.01$, 姜黄素组、SASP 组与同期模型组比 P 均 < 0.01 ; 姜黄素组与同期 SASP 组比 P 均 > 0.05 。

四、SOD 和 MPO 变化的关系

SOD 和 MPO 的变化呈负相关 ($r = -0.41, P < 0.05$)。

讨 论

氨甲蝶呤 (methotrexate, MTX) 为经典的抗叶酸代谢药, 可直接抑制肠上皮细胞 DNA 的合成。Xian 等^[6]通过 MTX 诱导的鼠小肠炎模型的研究, 发现 MTX 不利于肠上皮的更新, 直接抑制肠上皮细胞 DNA 的合成。导致肠隐窝细胞有丝分裂减弱和肠绒毛缩短, 直至肠隐窝形态丧失、绒毛皱缩脱落。对大鼠腹膜注射氨甲蝶呤 20 mg/kg, 可导致严重的小肠炎, 并且大鼠在 7 天内可全部死亡^[7]。本文实验结果表明, SD 大鼠注射氨甲蝶呤后, 大鼠粪便变稀, 体重下降, 模型组动物在 4 天的死亡率高达 60.0%, 7 天全部死亡, 与文献报道相符^[8]。

近年来, 对肠黏膜屏障功能的研究已成为热点。临床和实验研究发现, 多种因素都可能削弱或破坏肠道屏障功能, 这些因素包括严重的失血、失液; 严重的创伤、烧伤、感染; 长期应用广谱抗生素或免疫抑制剂; 不合理全胃肠外营养及蛋白质营养不良以及放疗、化疗、电离辐射等。这些因素可从一个或多个

方面损伤肠道屏障的结构和功能, 不但加重原发疾病的病情, 甚至诱发全身炎症反应综合征 (SIRS) 和多器官功能不良综合征 (MODS) 而危及生命。

姜黄素主要来源于姜科姜黄属植物姜黄的根茎, 是姜黄中的主要活性成分。Ukil 等^[9]在三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导的实验性大肠炎大鼠中, 用姜黄素预先处理的大鼠, 腹泻症状和肠黏膜的损伤明显改善, 中性粒细胞浸润和脂质过氧化程度明显减轻, 并抑制核因子- κ B (NF- κ B) 活性。Shukla 等^[10]实验表明姜黄素可以使大鼠 SOD 升高。

正常情况下, 体内存在清除氧自由基的防御系统, 包括抗氧化酶和抗氧化剂。当抗氧化系统削弱或氧自由基生成过度时, 氧自由基溢出细胞外, 对周围组织造成损伤。如与生物膜不饱和脂肪酸共价结合, 激发连锁反应, 生成脂质过氧化物及降解产物如丙二醛 (MDA), 使膜流动性降低, 通透性增加, 大量 Ca^{2+} 内流, 胞内 Ca^{2+} 负荷增加, 致细胞死亡。作用于蛋白质分子, 使之变性, 酶失活, 促进炎性渗出和水肿。SOD 是内源性超氧阴离子自由基清除剂, 其活性高低可部分反映机体清除自由基的能力^[11], 可能对脑组织起到保护作用。SOD 的存在可阻止缺血损伤部位的氧自由基损伤, 抑制体内补体激活, 从而保护组织细胞免遭补体活化介导的炎性损伤^[12]。本实验模型组中, 大鼠肠黏膜组织 SOD 活性明显减低而姜黄素组大鼠一般状况及腹泻、血便症状明显减轻, 结肠大体和组织学评分也有所改善, 其 SOD 活性增加。

许多研究表明, 自由基、活性氧与 IBD 非常密切。IBD 病变以溃疡和炎性细胞浸润为主。中性粒细胞在 IBD 和免疫反应中起着重要作用。中性粒细胞和单核细胞的吞噬作用是炎症反应的中心环节, 由吞噬细胞通过“呼吸爆发”产生的多种活性氧物质是引起组织损伤的主要原因。MPO 是中性粒细胞嗜天青颗粒产生的一种重要的过氧化物酶, 主要存在于嗜中性粒细胞和单核细胞中, 活性高低反映了中性粒细胞浸润程度。因此, 我们同时检测了 MPO, 结果显示, 模型组肠黏膜组织 MPO 活性显著高于正常组, 且第 7 天高于第 4 天。姜黄素组 MPO 活力低于同期模型组。且 SOD 与 MPO 呈负相关, 说明随着炎症的加重, 氧自由基生成过多, 因而导致 SOD 水平下降。

本文结果表明, 与模型组相比, 姜黄素组大鼠一般状况、腹泻、血便症状明显减轻, 结肠大体和组织学评分也有所改善。而且姜黄素可明显增强大鼠肠

黏膜组织 SOD 表达,降低肠黏膜组织 MPO 活性。说明姜黄素具有增强机体清除氧自由基的能力,同时可减轻炎细胞的浸润,对实验性大鼠小肠炎具有保护作用。

参考文献

- Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A, et al. Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:49-57.
- Sandborn WJ. Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:105-117.
- Ciralik H, Bulbuloglu E, Cetinkaya A, et al. Effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. *Mt Sinai J Med* 2006;73:1086-1092.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352-1355.
- Myers KJ, Murthy S, Flanigan A, et al. Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor- α in two murine models of colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:411-424.
- Xian CJ, Couper R, Howarth GS, et al. Increased expression of HGF and c-met in rat small intestine during recovery from methotrexate-induced mucositis. *Br J Cancer* 2000;82:951-954.
- Fox AD, Kripke SA, Berman JR, et al. Reduction of the severity of enterocolitis by glutamine-supplemented enteral diets. *Surg Forum* 1987;38:43-45.
- 任国谱, 谷文英. 谷氨酰胺活性肽营养液对大鼠小肠营养作用的研究. *氨基酸和生物资源* 2003;25:40-42.
- Ukil A, Maity S, Karmakar S, et al. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Br J Pharmacol* 2003;139:209-218.
- Schölmerich J, Huber G. Biological therapy in IBD. Anti-tumor necrosis factor- α and others. *Dig Dis* 2003;21:180-191.
- Wada K, Miyazawa T, Nomura T, et al. MN-SOD and Bcl-2 expression after repeated hyperbaric oxygenation. *Acta Neurochir Suppl* 2000;76(suppl):285-290.
- de Grey ADNJ, Baynes JW, Berd D, et al. Is human aging still mysterious enough to be left only to scientist. *Bioessays* 2002;24:667-676.

(收稿日期:2008-01-28)

(本文编辑:白 杨)

第八届全国胃病学术大会第一次公告

为提高我国胃病的诊治水平,中国医促会胃病专业委员会决定主办《第八届全国胃病学术大会》,由中国人民解放军 150 中心医院和第三军医大学附属西南医院和新桥医院承办,拟定于 2008 年 6 月 19~22 日在河南省洛阳市召开,届时将邀请国内著名专家对国内外有关胃疾病的基础与临床做专题报告、操作演示,并安排大会论文交流和病例讨论。我们热诚欢迎全国消化、普外、肿瘤、介入、放疗、化疗、中医、中西医结合等相关科室广大医护人员和全国各地中国医促会胃病专业委员会会员积极投稿并踊跃参加会议。牡丹花的故乡欢迎八方宾朋!

一、会议时间

2008 年 6 月 18 日报到,19~21 日学术交流,22 日 12:00 前全部代表撤离。

二、征文内容

未在公开刊物上发表过的有关胃及食管疾病内科、外科、中医、西医、中西医结合诊断及治疗等方面的论著、讲座、述评、综述、经验总结、病例分析和病例报告。专题讲座论文需全文,研究论文需 800 字左右中文摘要(目的、材料与方法、结果、结论)各 1 份,有软盘可附寄,欢迎网上投稿。请详细注明作者姓名、工作单位、邮政编码、详细地址、联系电话和电子信箱。截稿日期:2008 年 3 月 30 日(以邮戳日期为准)。

稿件和回执寄:河南省洛阳市解放军 150 中心医院消化内科 张汝钢 收(邮编 471031)。

联系人:张汝钢(电话:13403791223,E-mail:zrg026@163.com)或吴英超(电话:0379-64169015,E-mail:mw924@163.com)。

三、会议安排

大会专题报告;大会交流论文;操作演示;病例讨论;生产厂家展示和宣传医药、器械产品;发论文资料汇编;发学分证书(参加会议者获得国家级 I 类继续教育学分 8 分)。

四、收费标准

会务费:680 元/人(含场租、演讲、资料、伙食等费用),其中中国医促会胃病专业委员会会员为 630 元/人,理事 600 元/人。住宿统一安排,费用自理。会务费、住宿费、往返交通费按照国家规定回单位报销。