

姜黄素减轻小鼠深部组织压力性损伤

刘盼盼¹, 张子锐¹, 杨旭¹, 韩晶¹, 陆连芳², 王爱敏¹, 张菊^{1*}

(1. 青岛大学护理学院 山东 青岛 266000; 2. 青岛大学附属医院肝胆外科, 山东 青岛 266000)

摘要:目的 评价姜黄素(Cur)对缺血-再灌注所致小鼠深部组织压力性损伤(DTPI)创面愈合的影响。方法 将小鼠随机分为对照组(Con)、模型组(Mod)、姜黄素4和8 mg/kg干预组(Cur 4, Cur 8),每组10只。磁铁压迫法构建深部组织损伤模型,每隔48 h于创面注射姜黄素,拍照观察伤口愈合情况。HE染色观察伤口愈合病理改变,real-time PCR检测肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、血管内皮生长因子(VEGF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)的mRNA表达;Western blot检测VEGF- α 、TGF- β 、Stat3、p-Stat3蛋白的表达。结果 与对照组相比,模型组伤口逐渐恶化,病理学改变明显。与模型组相比,Cur 8组伤口愈合明显加快($P < 0.05$);Cur 8组炎性细胞浸润减少,新生血管密度增多。Cur 8组TNF- α 、IL-6的mRNA表达量均低于模型组,IL-10、VEGF- α 和TGF- β 表达量均高于模型组($P < 0.05$);Cur 8组VEGF- α 、TGF- β 、p-Stat3蛋白表达水平均高于模型组($P < 0.05$)。结论 姜黄素可减轻小鼠缺血-再灌注所致的DTPI,其机制可能与抑制炎症反应及促进血管再生有关。

关键词: 姜黄素;深部组织压力性损伤;创面愈合;动物实验

中图分类号:R471 文献标志码:A

Curcumin alleviates deep tissue pressure injury in mice

LIU Pan-pan¹, ZHANG Zi-rui¹, YANG Xu¹, HAN Jing¹, LU Lian-fang², WANG Ai-min¹, ZHANG Ju^{1*}

(1. School of Nursing, Qingdao University, Qingdao 266000;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of curcumin on wound healing in deep tissue pressure injury (DTPI) induced by ischemia-reperfusion in mice. **Methods** Mice were randomly divided into control group (Con), model group (Mod), 4 and 8 mg/kg curcumin treatment group (Cur 4, Cur 8), 10 mice in each group. A deep tissue pressure injury model was established by magnet compression. The wounds tissue was injected with curcumin every 48 hours and photographed to observe the wound healing. HE staining was used to observe the pathological changes of wound healing. Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of TNF- α , IL-6, IL-10, VEGF- α and TGF- β . Western blot was used to detect the expression of VEGF- α , TGF- β , Stat3 and p-Stat3. **Results** Compared with the control group, the wound in the model group gradually deteriorated, and the pathological changes were obvious. Compared with the model group, the wound healing of the Cur 8 group was significantly accelerated ($P < 0.05$). Compared with the model group, the inflammatory cell infiltration was reduced and the neovascular density was increased in the Cur 8 group. The mRNA expression of TNF- α and IL-6 in the wound tissues of the Cur 8 group

收稿日期:2019-04-03 修回日期:2019-09-23

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81701838);中国博士后科学基金(2018M632628)

*通信作者(corresponding author):yongzhoutju@163.com

was less than those in the model group, while the expression of IL-10, VEGF- α and TGF- β was higher than those in the model group ($P < 0.05$). The expression of VEGF- α , TGF- β and p-Stat3 in Cur 8 group was higher than those in model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Curcumin administration can alleviate DTPI of mice induced by ischemia-reperfusion, and its mechanism may be related to the inhibition of inflammatory response and promotion of angiogenesis.

Key words: curcumin; deep tissue pressure injury; wound healing; animal experiment

压力性损伤 (pressure injury, PI), 又名压力性溃疡或褥疮, 据统计, 在中国综合性医院压力性损伤发生率为 3% ~ 14%^[1]。其中深部组织压力性损伤 (deep tissue pressure injury, DTPI) 由于其病情隐匿、发展迅速以及治疗成本高等特点引起临床伤口专家们的高度重视。其常见于移动能力受限患者的骨突强烈或长期受力部位, 主要因局部组织缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion) 引起血管内皮损伤并启动炎症反应, 进而导致微循环障碍、毛细血管网密度减少^[2]。因此, 选择有效的药物治疗深部组织压力性损伤, 已成为近年来医学研究的热点。

姜黄素 (curcumin, Cur) 是一种从中药材姜黄中提取的植物多酚, 也是姜黄最主要的活性成分^[3]。研究表明, 姜黄素能够减轻小鼠糖尿病足溃疡损伤, 提示姜黄素可能对慢性伤口损伤有一定的保护作用, 但其能否减轻缺血-再灌注导致的深部组织压力性损伤尚有待研究^[4-5]。基于此, 本实验拟评价姜黄素对缺血-再灌注导致的小鼠深部组织压力性损伤的影响, 初步探讨其分子作用机制, 为临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品与试剂: 姜黄素 (Sigma-Aldrich 公司); IL-6、IL-10、VEGF- α 、TGF- β 和 TNF- α 引物 (青岛德罗海达生物技术有限公司合成); Stat3、p-Stat3、VEGF- α 和 TGF- β 单克隆抗体 (万类生物科技有限公司); 其他有机分析纯试剂 (青岛德瑞康生物科技有限公司)。

1.1.2 实验动物: SPF 级 8 ~ 10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 30 只, 体质量 20 ~ 22 g (北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产合格证: SCXK 京 2016-0006)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的分组及处理: 按照以往文献报道的方

法建立小鼠深部组织压力性损伤模型^[6]。腹腔注射 4% 水合氯醛 7.5 mL/kg 麻醉小鼠后, 用剃毛器除去背部被毛, 选择小鼠坐骨棘突附近皮肤组织施压, 在施压处上下两侧各放置一块相同磁铁 (直径 12 mm, 厚 5 mm, 重 2.4 g, 表面磁通量为 1 000 高斯)。施压 12 h 后释放 12 h 为 1 个循环, 共 1 个循环。施压期间小鼠正常进食、活动。采用随机数字表法将小鼠随机分为模型组 (Mod)、姜黄素 4 mg/kg 组 (Cur 4)、姜黄素 8 mg/kg 组 (Cur 8), 每组 10 只。另取 10 只正常小鼠作为对照组 (Con)。以模型构建成功为第 0 天, 于 1、3、5、7、9、11 和 13 天, 平均每只小鼠体质量按 20 g 计算, Cur 4 组的每只小鼠创面皮下注射 0.8 g/L 姜黄素 0.1 mL, Cur 8 组的每只小鼠创面皮下注射 1.6 g/L 姜黄素 0.1 mL。对照组和模型组小鼠不做任何处理。

1.2.2 伤口愈合状况测定: 建模后第 1、3、5、7、10、12 和 14 天在相同条件下于小鼠局部创面拍照, 使用 Image J 软件统计伤口面积。以第 3 天伤口面积为基准, 伤口愈合百分比 = 未愈合伤口面积/第 3 天伤口面积。

1.2.3 HE 染色: 于第 14 天颈椎脱臼法处死小鼠, 取创面及周围 1 cm 皮肤组织, 固定于 4% 多聚甲醛, 制作石蜡切片, 进行 HE 染色, 光镜下观察。

1.2.4 Real-time PCR 检测 mRNA 表达: Trizol 法提取伤口组织总 mRNA, 反转录试剂盒构建 cDNA。Q-PCR 检测借助荧光定量 PCR 试剂盒, 设置程序: 95 °C 15 min; 95 °C 10 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 40 次循环; 扩增反应完成后进行熔解曲线制作。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。引物序列见表 1。

1.2.5 Western blot 检测目的蛋白: 取冻存的皮肤肌肉组织样本, 匀浆化后向裂解液内加入等体积含十二烷基硫酸钠的蛋白缓冲液, 水浴锅内煮沸 10 min, 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液。采用 BCA 蛋白分析试剂盒测定样本内蛋白浓

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of the primers

name	primer sequence
<i>TGF-β</i>	F:5'-CAACAATTCCTGGCGTTACCTT-3' R:5'-CAAGAGCAGTGAGCGCTGAA-3'
<i>TNF-α</i>	F:5'-ACAAGGCTGCCCGACTAC3' R:5'-TGGGCTCATACCAGGTTTG-3'
<i>IL-6</i>	F:5'-ACCACTCCCAACAGACCTGTCT-3' R:5'-CAGATTGTTTTCTGCAAGTGCAT-3'
<i>IL-10</i>	F:5'-CAGAGAAGCATGGCCAGAA-3' R:5'-CACCTTGGTCTTGGAGCTTATTA-3'
<i>VEGF-α</i>	F:5'-CAGATCATGCGGATCAAACCT-3' R:5'-CTTCTTTGGTCTGCATTACATC-3'

度,用 SDS-PAGE 分离蛋白质,并将蛋白转移至硝酸纤维素膜。常温下用含 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,经 TBST 溶液清洗 2 次后加入适度稀释的第一抗体 (VEGF-α、TGF-β、Stat3、p-Stat3、β-actin),4 °C 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶偶联的第二抗体孵育 1 h,最后加入底物并曝光、显影。

1.3 统计学分析

应用 SPSS20.0 软件进行分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 创面愈合过程大体观察

3 组小鼠建模后第 1 天,创面呈苍白色圆形,创周清晰整齐。深部组织压力性损伤第 3 天,3 组创面边缘逐渐模糊,颜色加深。第 5 天,3 组创面均扩大、不同程度凹陷,颜色进一步加深呈黄褐色。第 7 天,模型组创面进一步恶化发展,而干预组创面出现缩小态势。第 10 天,模型组创面缩小但是颜色加深呈深褐色,Cur 8 组伤口面积明显缩小,创缘处可见结痂。第 12~14 天,模型组创面缓慢缩小,部分结痂覆盖;Cur 8 组创面完全结痂覆盖,且见结痂与创缘分离,周围粉色新生上皮覆盖明显。3 组小鼠的创面愈合宏观情况见图 1。

2.2 创面愈合比

以完全上皮覆盖作为创面愈合的依据,不同时间点的创面愈合比(表 2)。深部组织压力性损伤后第 7、10、12 和 14 天,Cur 8 组小鼠创面愈合比均分别显著低于模型组($P < 0.05$);Cur 4 组只在第 7、10 天创面愈合比低于模型组($P < 0.05$),其第 14 天创面愈合比与模型组无显著差别。

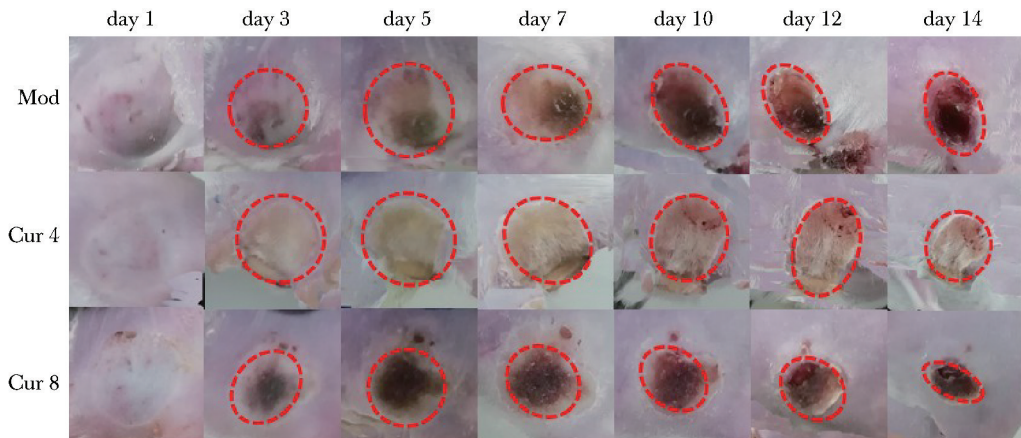


图 1 小鼠 DTPI 的创面愈合情况
Fig 1 Wound healing of DTPI in mice

表 2 姜黄素对小鼠创面愈合比的影响

Table 2 Effect of curcumin on wound healing ratio in mice($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

group	3 days	5 days	7 days	10 days	12 days	14 days
model	1	1.43±0.04	1.53±0.08	1.03±0.10	0.81±0.06	0.55±0.07
Cur 4	1	1.33±0.09	1.27±0.07*	0.86±0.04*	0.73±0.07	0.42±0.07
Cur 8	1	1.31±0.08	1.15±0.07*	0.81±0.06*	0.63±0.08*	0.31±0.08*

* $P < 0.05$ compared with model group.

2.3 伤口组织形态学观察

实验第 14 天,组织切片染色结果(图 2)。相比对照组,模型组创面肉芽组织较少,可见少量成纤维细胞、中性粒细胞及毛细血管。相比模型组,Cur 8 组肉芽组织更为丰富,可见较多的成纤维细胞、胶原纤维及新生毛细血管。Cur 4 组病理改变介于模型组与 Cur 8 组之间。

2.4 创面组织中相关因子 mRNA 的表达

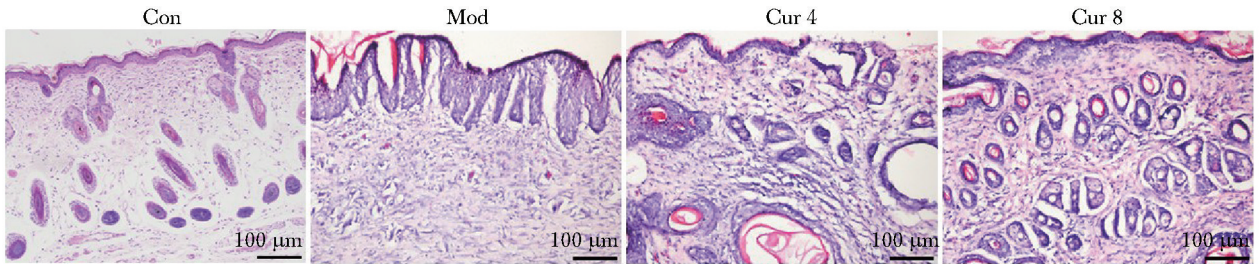
深部组织压力性损伤第 14 天,与对照组相比,模型组 TGF- β 、IL-10 和 VEGF- α 的 mRNA 表达显著减少($P < 0.05$),IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达显著增多($P < 0.05$)。Cur 4 和 Cur 8 组创面组织中 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平均低于模型组($P < 0.05$);而 Cur 8 组创面组织中 VEGF- α 、IL-10 和 TGF- β 含量明显高于模型组($P < 0.05$)(图 3)。

2.5 创面组织中相关因子蛋白的表达

与对照组相比,模型组 VEGF- α 、TGF- β 和 p-Stat3 蛋白表达减少($P < 0.05$)。Cur 8 组 VEGF- α 、TGF- β 和 p-Stat3 蛋白较模型组明显升高($P < 0.05$),Cur 4 组 TGF- β 和 p-Stat3 蛋白较模型组表达增加($P < 0.05$),而 3 组实验中 Stat3 蛋白含量无明显区别(图 4)。

3 讨论

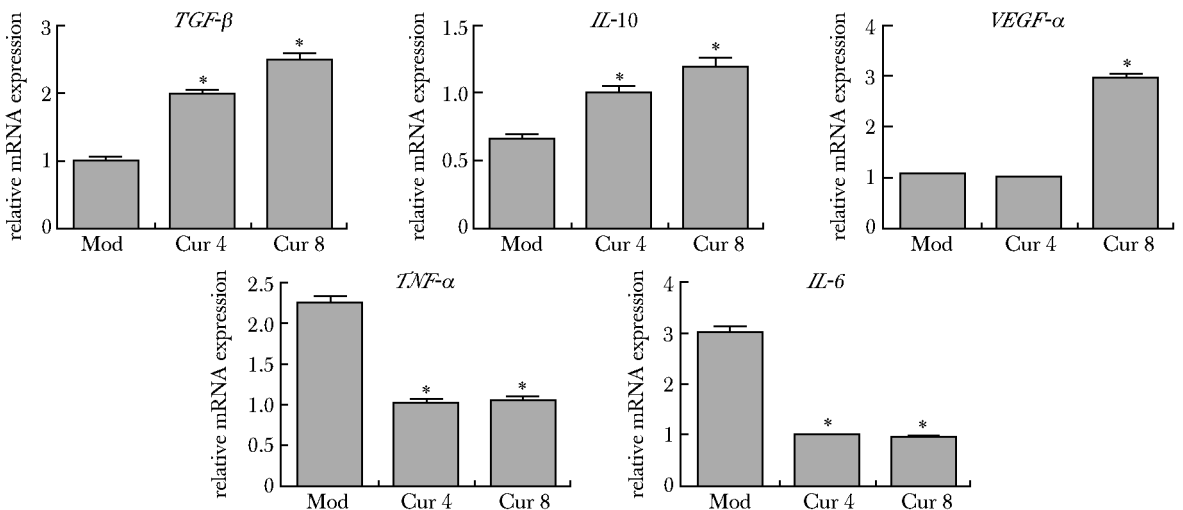
姜黄素具有抗感染、抗氧化、抗癌等多种药理作用,临床上常用于治疗鼻炎、呼吸道疾病和肠道疾病等^[7],其对改善缺血-再灌注引起的肾损伤、脑损伤及炎症反应等有很好的疗效^[8],但姜黄素在缺血-再灌注引起的深部组织压力性损伤中的保护作用及分子机制仍不明确。



* $P < 0.05$ compared with model group

图 2 DTPI 后第 14 天的组织形态学观察

Fig 2 Histological examination at day 14 after DTPI(HE staining $\times 100$)



* $P < 0.05$ compared with model group

图 3 小鼠创面组织中 TNF- α 、IL-6、IL-10、VEGF- α 、TGF- β mRNA 表达

Fig 3 mRNA expression of TNF- α , IL-6, IL-10, VEGF- α , TGF- β and HIF-1 α in the wound tissues($\bar{x} \pm s, n = 3$)

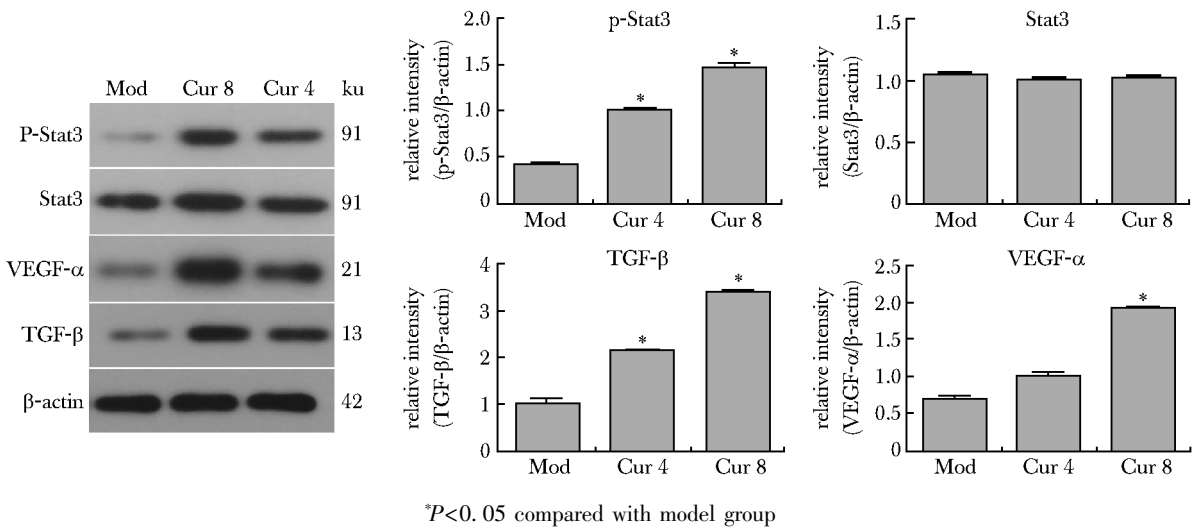


图4 DTPI中 p-Stat3、Stat3、TGF-β 和 VEGF-α 的蛋白表达

Fig 4 Expression of p-Stat3, Stat3, TGF-β and VEGF-α in the DTPI in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

深部组织压力性损伤是由于骨突部位持续的机械力导致的多层组织坏死,持续的炎症反应和血管密度骤减是其难以愈合的关键因素^[9-10]。本实验中局部注射姜黄素后,创面愈合率优于未处理模型组。HE 结果表明,相比模型组,Cur 8 组出现更多的毛细血管结构、新生血管和血管壁增厚现象。与模型组相比,Cur 8 组中 IL-6 和 TNF-α 的表达量显著降低,而 IL-10 的表达量显著增加。尤其,姜黄素可使深部组织压力性损伤后组织中 VEGF-α 和 TGF-β 的表达量增加,该研究结果与报道一致^[11]。IL-6 和 TNF-α 是参与机体炎症反应的重要炎症介质,且 TNF-α 可诱导成纤维细胞凋亡,抑制胶原沉积,阻碍伤口愈合;而 IL-10 是一种存在于缺血组织中的抗炎细胞因子,能刺激创面肉芽组织形成,是组织修复中的重要细胞因子之一。说明姜黄素可以减轻深部组织压力性损伤中的炎症反应。

同时,本研究初步探索了姜黄素在深部组织压力性损伤中的分子作用机制。JAK-STAT 信号通路

在机体的应激与炎症反应及创伤修复中发挥重要作用^[12]。STATs 对细胞因子信号的传递具有特异性,STAT3 活化后成为 p-STAT3,能诱导细胞分化、凋亡及血管生成等生物学行为相关的下游靶基因的表达,且 VEGF 启动子上存有 STAT3 的结合位点序列^[13]。Cur 8 组 p-STAT3、VEGF-α 表达较模型组明显增加,可见姜黄素激活 STAT3 进而诱导 VEGF-α 的表达,VEGF 作为一种高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂源,进一步诱导新生血管形成,促进肉芽组织生成,从而加快创面愈合,实现促进小鼠深部组织压力性损伤血管新生的作用。

综上所述,8 mg/kg 姜黄素对于保护小鼠深部组织压力性损伤效果显著,且组织炎症反应抑制及血管再生促进可能与姜黄素激活 JAK-STAT 信号通路直接相关。但姜黄素是否通过直接靶向作用于 STAT3,姜黄素的治疗剂量以及在临床中是否具有同样治疗效果还有待后期进一步深入研究验证。

参考文献:

- [1] 贾晓明. 压疮的流行病学特点及诊断与治疗进展[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2018, 1:4-7.
- [2] Peart J. The aetiology of deep tissue injury; a literature review[J]. Br J Community Nurs, 2016, 15:840-843.

- [3] Cui FF, Pan YY, Xie HH, *et al.* Pressure combined with ischemia/reperfusion injury induces deep tissue injury via endoplasmic reticulum stress in a rat pressure ulcer model [J]. Int J Mol Sci, 2016, 3:284-295.

- [4] Kant V, Gopal A, Pathak NN, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 2: 322-330.
- [5] Karri VV, Kuppusamy G, Talluri SV, *et al.* Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 1519-1529.
- [6] Sari Y, Minematsu T, Huang L, *et al.* Establishment of a novel rat model for deep tissue injury deterioration[J]. *Int Wound J*, 2015, 2:202-209.
- [7] 刘金金, 顾琦慷, 王雄彪. 姜黄素治疗呼吸系统疾病研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2018, 7:98-100.
- [8] Liu F, Ni W, Zhang J, *et al.* Administration of curcumin protects kidney tubules against renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) by modulating nitric oxide (NO) signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 1:401-411.
- [9] Preston A, Rao A, Strauss R, *et al.* Deep tissue pressure injury:a clinical review[J]. *Am J Nurs*, 2017, 5:50-57.
- [10] Zhao R, Liang H, Clarke E, *et al.* Inflammation in chronic wounds[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 12:2085-2098.
- [11] Yen YH, Pu CM, Liu CW, *et al.* Curcumin accelerates cutaneous wound healing via multiple biological actions: The involvement of TNF-alpha, MMP-9, alpha-SMA, and collagen[J]. *Int Wound J*, 2018, 4:605-617.
- [12] 王思亮, 朱喜科. JAK-STAT 信号传导通路调控胰腺癌的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2018, 5:582-585.
- [13] Muratori L, Gnani S, Fregnan F, *et al.* Evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its family member expression after peripheral nerve regeneration and denervation[J]. *Anat Rec*, 2018, 10:1646-1656.

新闻点击

健康生活可抵消阿尔茨海默病遗传风险

《美国医学会杂志》(*Journal of the American Medical Association*) (2019-07-14)发表的一项研究表明,即使你不幸携带易使你患上阿尔茨海默病的基因,健康的生活方式也可以降低这种风险。

该研究追踪了近 20 万英国 60 岁以上人群的遗传、生活方式和阿尔茨海默病发病率,平均为 8 年。研究人员发现,与遗传风险低、健康的生活方式相比,那些对阿尔茨海默病具有高遗传风险并且遵循不健康生活方式的人患病的可能性几乎增加了 3 倍。相反,生活得好,经常锻炼,均衡饮食,不吸烟,饮酒适度,则可以降低阿尔茨海默病概率,即使是那些具有高遗传风险的人也是如此。

英格兰埃克塞特大学医学院的 David Llewellyn 领导的这个研究小组认为,在被发现具有最高遗传风险的人群中,健康生活似乎可以将患病的概率降低 35%。在这项研究中,“高遗传风险”是基于已知与阿尔茨海默病相关的基因的存在,例如特定形式的 ApoE 基因和最近与脑部疾病相关的其他 DNA。“有利的生活方式”被定义为符合美国心脏协会锻炼指南的人,每周 150 min 的中等体力活动或 75 min 的剧烈运动;不吸烟,吃健康饮食,每天平均喝一杯葡萄酒或啤酒。

基因和生活方式似乎确实影响了一个人患阿尔茨海默病的概率。随着某人的遗传“风险评分”越来越高,他们患病的概率也越来越高,生活方式变得不那么健康也是如此。Llewellyn 和他的团队发现,基因虽然不能被修改,但生活方式可以。他们相信,更健康的生活可以促进脑血流量,这可以减少对脑细胞的“氧化损伤”,并有助于防止脑损伤凝块和炎症反应,从而降低阿尔茨海默病的风险。

刘晓荻 译

王欣 编