

姜黄素干预急性肺栓塞不规则趋化因子后对 B 型钠尿肽、心肌肌钙蛋白 I、D-二聚体水平的影响

朱春海 邝晶 王灵聪

323900 浙江丽水,青田县中医医院(朱春海);310006 浙江杭州,浙江中医药大学附属第一医院(邝晶、王灵聪)

通讯作者:王灵聪, Email:wlc501@139.com

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.021

【摘要】目的 观察姜黄素对急性肺栓塞(APE)大鼠 B 型钠尿肽(BNP)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、D-二聚体的影响。**方法** 设计合成不规则趋化因子(CX3CL1)-短发夹 RNA(shRNA)和过表达载体,分别进行腺病毒包装。将 60 只 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、模型组、姜黄素组、姜黄素+shRNA 组、姜黄素+CX3CL1 过表达载体组,每组 10 只。用自体血栓复制方法制备 APE 动物模型,药物干预组于制模前 1 d 和 40 min 分别灌胃姜黄素 100 mg/kg 1 次;病毒干预组于制模前 3 d 尾静脉注射 10^9 pfu 1 次;假手术组和模型组灌胃等量生理盐水 2 mL,每天 1 次;正常对照组不接受任何干预。制模后 6 h,取肺组织,激光共聚焦显微镜下观察肺组织变化,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理学改变;用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 BNP、cTnI、D-二聚体水平。**结果** 病毒感染肺组织呈绿色,细胞核呈蓝色。肺组织病理学观察显示:模型组较正常对照组及假手术组肺组织病理学改变明显,经姜黄素干预后,各治疗组肺动脉内部分栓塞溶解,炎症减轻。ELISA 检测结果显示:与假手术组比较,模型组大鼠血清 cTnI、BNP、D-二聚体含量显著升高 [cTnI (ng/L): 224.97 ± 37.96 比 149.13 ± 36.65 , BNP (ng/L): 53.66 ± 21.72 比 24.62 ± 10.44 , D-二聚体 (ng/L): 78.68 ± 13.10 比 42.00 ± 9.30 , 均 $P < 0.05$];与模型组比较,姜黄素组、姜黄素+shRNA 组和姜黄素+CX3CL1 过表达载体组血清 cTnI、BNP、D-二聚体含量显著降低 (cTnI 为 162.98 ± 28.65 、 143.32 ± 34.55 、 159.50 ± 37.80 比 224.97 ± 37.96 , 均 $P < 0.05$, BNP 为 27.45 ± 11.00 、 26.95 ± 6.66 、 33.05 ± 7.05 比 53.66 ± 21.72 , 均 $P < 0.05$, D-二聚体为 54.34 ± 4.57 、 53.38 ± 11.01 、 56.33 ± 6.80 比 78.68 ± 13.10 , 均 $P < 0.05$);各干预组间比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。**结论** 姜黄素能降低 APE 大鼠血清 BNP、cTnI、D-二聚体含量,但与 CX3CL1 关系不大。

【关键词】 肺栓塞; 姜黄素; B 型钠尿肽; 心肌肌钙蛋白 I; D-二聚体; 不规则趋化因子

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY17H290006, LY12H29005); 浙江省医药卫生平台计划重点资助项目 (2015ZDA022); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程资助项目 (2014-108)

The influence on B-type natriuretic peptide, cardiac troponin I and D-dimer after intervention in CX3CL1 of acute pulmonary embolism by curcumin Zhu Chunhai, Kuang Jing, Wang Lingcong

Qingtian Traditional Chinese Medicine Hospital, Lishui 323900, Zhejiang, China (Zhu CH); the First Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang, China (Kuang J, Wang LC)

Corresponding author: Wang Lingcong, Email:wlc501@139.com

【Abstract】Objective To observe the effects of curcumin on B-type natriuretic peptide (BNP), cardiac troponin I (cTnI) and D-dimer in rats with acute pulmonary embolism (APE). **Methods** The irregular chemotactic factor (CX3CL1)-shRNA and overexpression vector were designed and synthesized, and adenovirus packages were respectively carried out. Sixty Spargue-Dawley (SD) rats were divided into normal control group, sham-operation group, model group, curcumin group, curcumin+CX3CL1-shRNA group and curcumin+CX3CL1 overexpression vector group by random number table (each group 10 rats). The APE rat models were duplicated by autologous blood embolus method. in the pharmacological intervention groups, 1 day and again 40 minutes before operation, a dose of curcumin 100 mg/kg was administered by gavage respectively; in virus intervention groups, 3 days before modeling, intravenous injection of 10^9 pfu into a tail vein was performed once; in sham-operation group and model group, an equivalent dose of normal saline 2 mL daily was administered by gavage; the normal group did not accept any intervention. Six hours after modeling, the change of lung tissue were observed under confocal laser scanning microscope, the lung tissue was taken for hematoxylin-eosin (HE) staining, histopathological changes of lung tissue were observed, and the levels of serum BNP, cTnI, D-dimer were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Virus infected lung tissue was green, nuclear was blue. The HE staining in lung tissue showed: histopathological changes in the model group were more obvious than those in normal group and sham-operation group, after curcumin intervention, some emboli in pulmonary arteries in all treatment groups were partially dissolved, and the inflammation was alleviated. The results of ELISA shows: the contents of cTnI, BNP, D-dimer were significantly higher in model group than those in sham-operation group [cTnI (ng/L): 224.97 ± 37.96 vs. 149.13 ± 36.65 , BNP (ng/L): 53.66 ± 21.72 vs. 24.62 ± 10.44 , D-dimer (ng/L): 78.68 ± 13.10 vs. 42.00 ± 9.30 , all $P < 0.05$]; the contents of cTnI, BNP, D-dimer were significantly lower in curcumin group, curcumin+shRNA group and curcumin+CX3CL1 overexpression vector group than those in model group (cTnI was 162.98 ± 28.65 , 143.32 ± 34.55 , 159.50 ± 37.80 vs. 204.97 ± 37.96 , all $P < 0.05$, BNP was 27.45 ± 11.00 ,

26.95 ± 6.66, 33.05 ± 7.05 vs. 53.66 ± 21.72, all $P < 0.05$, D-dimer was 54.34 ± 4.57, 53.38 ± 11.01, 56.33 ± 6.80 vs. 78.68 ± 13.10, all $P < 0.05$); there were no statistical significant differences in comparisons among all intervention groups (all $P > 0.05$). **Conclusion** Curcumin is able to improve serum BNP, cTnI, D-dimer in APE rats, but its relation with CX3CL1 is not obvious.

【Key words】 Pulmonary embolism; Curcumin; B natriuretic peptide; Cardiac troponin I; D-dimer; Irregular chemotactic factor

急性肺栓塞(APE)是肺动脉因各种栓子堵塞而致呼吸循环障碍的疾病,其发病急,病情凶险,病死率高。我国肺栓塞的流行病学调查发现,1997年至2008年,1 697万余例住院患者中有1.8万余例肺栓塞患者,年发生率0.1%,病死率从1997年的25.1%下降到2008年的8.7%^[1]。目前肺栓塞已成为我国的一种常见心血管疾病,对生命威胁极大,需早期发现并积极干预^[2]。欧洲心脏病学会2008年发布的急性肺栓塞诊断和治疗指南^[3]表明,APE患者血B型钠尿肽(BNP)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)、D-二聚体水平较低者预后良好。本课题组前期的研究发现,姜黄素能抑制APE大鼠不规则趋化因子(CX3CL1)及受体(CX3CR1)的表达水平,减轻肺组织病理学改变^[4]。本研究拟阻断或过度表达CX3CL1,以探讨姜黄素是否能通过干预APE患者的CX3CL1从而改善BNP、cTnI、D-二聚体。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料:病理组织漂烘仪(TEC 2500型,常州市郝思琳仪器设备有限公司);BX43型显微镜(日本奥林巴斯公司)。姜黄素由大连美仑生物技术有限公司提供,规格5克/瓶,批号:NO223A。cTnI、BNP、D-二聚体检测试剂盒均购自武汉优尔生科技股份有限公司。

1.2 CX3CL1过表达载体和短发夹RNA(shRNA)的制备

1.2.1 CX3CL1过表达腺病毒(AD)的构建流程:重组AD载体质粒pHBAd-MCMV-GFP,用EcoRI和BamHI双酶切,酶切完成后胶回收,获得CX3CL1片段,转化后的CX3CL1平板挑菌,37℃250 r/min摇菌14 h,菌液进行聚合酶链反应(PCR)鉴定,将阳性克隆菌液送上海桑尼生物技术有限公司测序,获得pHBAd-MCMV-GFP-CX3CL1重组载体,标记为AD-CX3CL1,同时用质粒pHBAd-MCMV-GFP作为空白对照,标记为AD-GFP,再制备重组质粒,再经过重组AD载体的包装、收毒及扩增,最后行病毒纯化,从而完成CX3CL1过表达AD构建流程。

1.2.2 CX3CL1 shRNA AD构建流程:采用pHBAd-U6-GFP干扰载体,设计干扰序列,构建CX3CL1

shRNA,并进行筛选和鉴定。

1.3 实验分组及干预方法:健康雄性清洁级SD大鼠60只,体质量(200±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司和北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002,动物合格证号:0195969。将大鼠按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、模型组、姜黄素组、姜黄素+shRNA组、姜黄素+CX3CL1过表达载体组,每组10只。采用本课题组成熟的自体血栓复制法^[3]复制肺栓塞动物模型。药物干预组于制模前1 d和40 min前分别灌胃姜黄素100 mg/kg 1次;病毒干预组于制模前3 d尾静脉注射10⁹ pfu 1次;假手术组和模型组每天灌胃等量生理盐水2 mL 1次;正常对照组不接受任何干预。

1.4 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.5 检测指标及方法:于栓塞后6 h再次麻醉大鼠取肺组织及血进行检测。

1.5.1 病毒感染大鼠肺组织的变化观察:病毒感染大鼠肺组织后处死,取肺组织于-20℃制备厚度为8 μm的冰冻切片,行激光共聚焦,荧光显微镜下(转盘式共聚焦显微镜,日本奥林巴斯公司)观察CX3CL1过表达和shRNA病毒感染肺组织的变化。

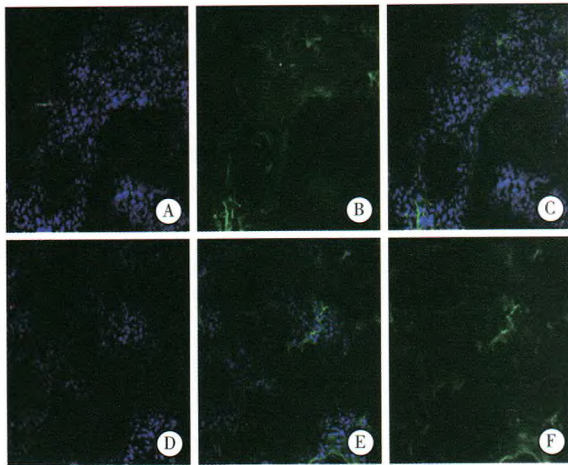
1.5.2 肺组织病理学观察:栓塞后6 h,取肺组织,制作切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理学变化。

1.5.3 血清cTnI、BNP、D-二聚体含量测定:栓塞后6 h,右颈总静脉取血液,用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测cTnI水平,用竞争抑制ELISA检测BNP和D-二聚体水平。

1.6 统计学分析:使用SPSS 17.0统计软件进行数据处理和分析,正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

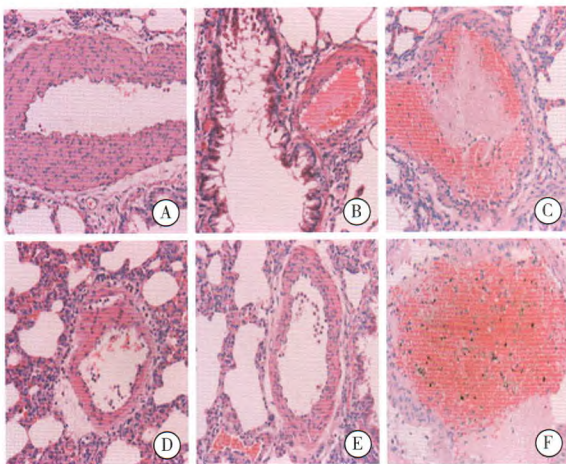
2.1 激光共聚焦显微镜观察病毒感染大鼠肺组织变化(图1):病毒感染肺组织呈绿色,细胞核呈蓝色,说明病毒可成功感染肺组织。



注：A 为正常对照组；B 为假手术组；C 为模型组；
D 为姜黄素组；E 为姜黄素 + shRNA 组；
F 为姜黄素 + CX3CL1 过表达载体组

图 1 激光共聚焦显微镜观察病毒感染大鼠肺组织变化(中倍放大)

2.2 肺组织病理学观察(图 2)：正常对照组肺组织结构清晰,肺泡结构正常,肺间质未见明显炎性细胞浸润,气道和血管周边偶有炎症;血管无血栓栓塞形成。假手术组与正常对照组基本相似。模型组肺动脉内可见混合血栓,血管内皮脱落明显;肺泡间隔增厚肿胀,肺泡内出血;支气管和血管周围及肺间质大量炎性细胞浸润,甚至出现肺脓肿。姜黄素组和姜黄素 + shRNA 组肺动脉部分栓塞溶解,血管再通,血管内皮增生,炎症反应较轻,血栓形成数量减少,部分切片无明显血栓栓塞形成,溶栓效果好。姜黄素 + CX3CL1 过表达载体组可见炎症反应较轻,伴随轻度肺出血现象;血栓形成较少,溶栓效果好。



注：A 为正常对照组；B 为假手术组；C 为模型组；
D 为姜黄素组；E 为姜黄素 + shRNA 组；
F 为姜黄素 + CX3CL1 过表达载体组

图 2 栓塞后各组肺组织病理学变化观察(HE 染色 中倍放大)

2.3 姜黄素对各组大鼠血清 cTnI 含量的影响(表 1)：与假手术组比较,模型组大鼠血清 cTnI 含量显著升高;与模型组比较,姜黄素组、姜黄素 + shRNA 组和姜黄素 + CX3CL1 过表达载体组血清 cTnI 含量显著降低(均 $P < 0.05$);各干预组间比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 姜黄素对各组大鼠血清 cTnI、BNP、D-二聚体含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	cTnI (ng/L)	BNP (ng/L)	D-二聚体 (ng/L)
正常对照组	10	147.57 ± 34.47	24.49 ± 6.52	42.38 ± 8.43
假手术组	10	149.13 ± 36.65	24.62 ± 10.44	42.00 ± 9.30
模型组	10	224.97 ± 37.96 ^a	53.66 ± 21.72 ^a	78.68 ± 13.10 ^a
姜黄素组	10	162.98 ± 28.65 ^b	27.45 ± 11.00 ^c	54.34 ± 4.57 ^c
姜黄素 + shRNA 组	10	143.32 ± 34.55 ^c	26.95 ± 6.66 ^c	53.38 ± 11.01 ^c
姜黄素 + CX3CL1 过表达载体组	10	159.50 ± 37.80 ^c	33.05 ± 7.05 ^b	56.33 ± 6.80 ^c

注：与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

2.4 姜黄素对各组大鼠血清 BNP 含量的影响(表 1)：与假手术组比较,模型组大鼠血清 BNP 含量显著升高;与模型组比较,各干预组大鼠血清 BNP 含量均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各干预组间比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.5 姜黄素对各组大鼠血清 D-二聚体含量的影响(表 1)：与假手术组比较,模型组大鼠血清 D-二聚体含量显著升高;与模型组比较,各干预组大鼠血清 D-二聚体含量显著降低(均 $P < 0.01$);各干预组间比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

3 讨论

CX3CL1 是体内广泛分布的不规则趋化因子,具有黏附和趋化活性,是 CX3C 家族的唯一成员^[5]。本课题组前期的研究发现,肺栓塞大鼠出现广泛炎症反应,其血清和肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-8)、CX3CL1 及 CX3CR1 的表达均显著增高^[4]。本研究发现,通过设计合成 CX3CL1-shRNA 和过表达载体,用 AD 包装,并注入大鼠体内,进一步观察姜黄素干预肺栓塞大鼠 CX3CL1、CX3CR1 信号通路后,对其血清 BNP、cTnI、D-二聚体水平的影响。激光共聚焦显微镜观察病毒感染大鼠肺组织发现,病毒感染肺组织呈绿色,细胞核呈蓝色,说明病毒可成功感染肺组织。

心肌肌钙蛋白(cTn)是调节心肌肌肉组织收缩的蛋白,cTn 是由 cTnT、cTnI 和 cTnC 3 种不同基因的亚基组成。大约 30%~40% 的 APE 患者血清

肌钙蛋白水平升高^[6],且是预后较差的一个危险因素^[7]。在血压正常型的肺栓塞患者中诊断发现,右心室功能不全或 cTn 水平升高对改变患者预后具有重要作用^[8]。BNP 又称脑钠肽,是心肌细胞合成的具有生物学活性的天然激素,主要在心室中表达。当左室功能不全时,心肌细胞快速合成并释放入血,有助于调节心脏功能^[9]。伴随右室功能不全的肺栓塞患者常存在较高的 BNP 水平,且高水平的 BNP 预示着不良的临床事件。研究表明,在 APE 患者中,结合肌钙蛋白和 N 末端 BNP 前体(NT-proBNP)水平能更好地进行危险分层^[10]。D-二聚体是被纤溶酶降解交联纤维蛋白后的产物,其在血清中含量增高提示有微血栓的形成,微血管内血栓形成又进一步激活炎症反应。临床上 D-二聚体诊断肺栓塞敏感性较高,特异性相对较低,并对排除临床表现不明显的肺栓塞患者有良好的实用性^[11-12]。联合检测 APE 患者血浆 BNP 及 D-二聚体能在入院早期较准确地预测患者预后,以指导进一步治疗^[13]。

本实验显示,与正常对照组比较,模型组大鼠血清 cTnI、BNP 及 D-二聚体含量显著升高;与模型组比较,各处理组 BNP、cTnI、D-二聚体水平均有显著下降。姜黄素能降低肺栓塞大鼠血清 BNP、cTnI 及 D-二聚体水平,对肺栓塞的病理生理发展有阻断作用。但各处理组间 cTnI、BNP、D-二聚体比较差异无统计学意义,提示过表达或抑制 CX3CL1 对 APE BNP、cTnI 及 D-二聚体水平影响不大。

APE 的治疗有抗凝及溶栓等^[14-15],但存在出血等不良反应,故有必要对高危人群运用祖国传统医学进行预防。姜黄是姜黄属的多年生草本植物,根茎可行气活血,通经止痛,其提取物姜黄素具有抗炎、抗凝、抗氧化、抗癌等作用。研究发现,姜黄素能通过抗炎机制而对细菌诱导产生急性肺损伤的大鼠发挥疗效^[16],能抑制大鼠分叶状中性粒细胞和白三烯的形成^[17],减少胰腺炎组织中中性粒细胞浸润^[18],能抑制脓毒症大鼠炎症因子及核转录因子- κ B(NF- κ B)^[19-20]。Olszanecki 等^[21]发现,姜黄素能抑制急性肺损伤小鼠中性粒细胞髓过氧化物酶活性,降低炎症反应,保护肺组织,这些均与本课题组前期的研究^[4, 22]发现肺栓塞存在炎症反应,姜黄素能抑制脂多糖(LPS)诱导人支气管上皮细胞的炎症反应的结果^[23-24]一致。

综上所述,姜黄素能降低 APE 大鼠的血清 BNP、cTnI、D-二聚体水平,但与 CX3CL1 关系不大。

参考文献

- [1] Yang Y, Liang L, Zhai Z, et al. Pulmonary embolism incidence and fatality trends in chinese hospitals from 1997 to 2008: a multicenter registration study [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e26861.
- [2] 项松鹤. 易栓症相关遗传因素研究进展 [J]. *实用检验医师杂志*, 2011, 3(1): 47-50.
- [3] Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, et al. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(18): 2276-2315.
- [4] 王灵聪, 张微, 夏国莲, 等. 姜黄素对急性肺栓塞大鼠炎症因子的影响 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(6): 506-508, 515.
- [5] Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif [J]. *Nature*, 1997, 385(6617): 640-644.
- [6] Giannitsis E, Müller-Bardorf M, Kuroski V, et al. Independent prognostic value of cardiac troponin T in patients with confirmed pulmonary embolism [J]. *Circulation*, 2000, 102(2): 211-217.
- [7] Konstantinides S, Geibel A, Olschewski M, et al. Importance of cardiac troponins I and T in risk stratification of patients with acute pulmonary embolism [J]. *Circulation*, 2002, 106(10): 1263-1268.
- [8] Jiménez D, Uresandi F, Otero R, et al. Troponin-based risk stratification of patients with acute nonmassive pulmonary embolism: systematic review and metaanalysis [J]. *Chest*, 2009, 136(4): 974-982.
- [9] 王得顺, 王静, 杨凯. 脑钠肽检测在临床诊断中应用的影响因素 [J]. *实用检验医师杂志*, 2012, 4(3): 177-179, 188.
- [10] Kostrubiec M, Pruszczyk P, Bochowicz A, et al. Biomarker-based risk assessment model in acute pulmonary embolism [J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(20): 2166-2172.
- [11] Stein PD, Hull RD, Patel KC, et al. D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140(8): 589-602.
- [12] 王鸿利. D-二聚体的检测及其临床应用 [J]. *实用检验医师杂志*, 2013, 5(4): 199-201.
- [13] 赵玉文. 脑钠肽和 D-二聚体检测对急性肺栓塞早期诊断及预后评估的价值 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2009, 8(7): 27-28.
- [14] 李雪松, 刘雅丽, 刘慧林. 153 例急性肺栓塞溶栓与单纯抗凝疗效评价 [J]. *中华危重病急救医学*, 2012, 24(10): 632-633.
- [15] 王琼康, 黄晓莲, 张云强, 等. 50 例急性肺栓塞临床诊治分析 [J]. *中华危重病急救医学*, 2011, 23(1): 46-47.
- [16] Xu F, Diao R, Liu J, et al. Curcumin attenuates staphylococcus aureus-induced acute lung injury [J]. *Clin Respir J*, 2015, 9(1): 87-97.
- [17] Araújo CC, Leon LL. Biological activities of Curcuma longa L [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, 96(5): 723-728.
- [18] Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC, et al. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284(1): G85-95.
- [19] 宋菲, 张蓓, 马莉, 等. 槲皮素和姜黄素对脓毒症大鼠炎症因子的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19(4): 216-219.
- [20] 林梅瑟, 陈碧新, 赵志光, 等. 姜黄素对动脉粥样硬化家兔核转录因子- κ B 的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(2): 95-98, 封 2.
- [21] Olszanecki R, Gebska A, Korbut R. The role of haem oxygenase-1 in the decrease of endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression by curcumin [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 101(6): 411-415.
- [22] 王灵聪, 张微, 吴建浓, 等. 姜黄素对急性肺栓塞大鼠细胞外调节蛋白激酶、三磷酸肌醇激酶、蛋白激酶 B 的影响 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(18): 1592-1595.
- [23] 王灵聪, 韦丽玲, 江荣林, 等. 姜黄素对脂多糖诱导人支气管上皮细胞丝裂素活化蛋白激酶信号通路的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22(3): 239-242.
- [24] 张蓉蓉, 韦丽玲, 王灵聪. 姜黄素对脂多糖诱导人支气管上皮细胞基质金属蛋白酶的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(7): 616-618.

(收稿日期: 2016-07-21)