

姜黄素改善糖尿病小鼠心脏抗氧化及葡萄糖摄取能力

宋利娜 柳 茵 李 琳 刘维军 于志文

摘 要 **目的** 探讨姜黄素对糖尿病心肌病的保护作用机制。**方法** C57BL/6J 小鼠分别给予低脂、高脂、注射链脲佐菌素 (STZ) + 高脂、STZ + 含 (10mg/kg) 姜黄素的高脂饲料干预 15 天。用 TAB 结合法测定 MDA, 用 Western blot 法检测组织蛋白含量。**结果** 姜黄素短期干预可降低 STZ + 高脂诱导的糖尿病小鼠血糖 ($22.1 \pm 1.0 \text{ mmol/L}$ vs $17.9 \pm 1.0 \text{ mmol/L}$, $P < 0.05$), 并明显减少糖尿病小鼠心脏 MDA 含量 ($2.3 \pm 0.2 \text{ nmol/mg prot}$ vs $1.5 \pm 0.3 \text{ nmol/mg prot}$, $P < 0.05$), 同时上调 Nrf2 系统抗氧化酶 NQO-1、GLUT1、GLUT4 及 AMPK 磷酸化水平, 降低 TXNIP 含量。**结论** 姜黄素在整体可起到降低血糖作用, 在心脏局部可明显对抗糖尿病造成的氧化应激和葡萄糖转运蛋白功能缺陷。

关键词 姜黄素 糖尿病心肌病 氧化应激 葡萄糖转运蛋白

[中图分类号] R587.1 [文献标识码] A

Curcumin Attenuated Oxidative Stress and Improved the Capacity of Glucose Uptake in Myocardial Tissue of the Diabetic Mice. Song Lina, Liu Yin, Li Lin, et al. Department of Medical School, Qinghai University, Qinghai 810001, China

Abstract Objective To explore the protective mechanism of curcumin in diabetic cardiomyopathy. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into four groups, i. e. low fat diet, high fat diet, streptozocin (STZ) injected plus high fat diet and STZ plus high fat feeding containing curcumin, respectively. The mice were sacrificed at the intervention of 15th day. We used malonyldialdehyde (MDA) kits to measured MDA in myocardial tissue. Western blot was applied to determine the protein content of GLUT1, GLUT4 in the heart. **Results** Short-term curcumin intervention attenuated the metabolic disturbance of blood glucose in diabetic mice which was induced by STZ and fed with high fat diet ($22.1 \pm 1.0 \text{ mmol/L}$ vs $17.9 \pm 1.0 \text{ mmol/L}$, $P < 0.05$), accompanied by a remarkable reduction in myocardial MDA level ($2.3 \pm 0.2 \text{ nmol/mg prot}$ vs $1.5 \pm 0.3 \text{ nmol/mg prot}$, $P < 0.05$). Correspondingly, curcumin upregulated the levels of NQO-1, GLUT4, GLUT1 and phosphorylation of AMPK, reduced the level of TXNIP protein. **Conclusion** Curcumin can reduce the blood glucose in the whole body and exerts a profound effect in anti-oxidative stress in myocardial tissue of the diabetic mice with an improved capacity in cardio glucose uptake.

Key words Curcumin; Diabetic cardiomyopathy; Oxidative stress; Glucose transporter

糖尿病心肌病变是导致糖尿病患者死亡的主要合并症之一^[1]。糖尿病时长期的糖脂代谢异常影响心脏能量供给, 包括葡萄糖摄取能力的降低, 导致细胞内能量缺乏, 进而影响其正常的生理活动, 包括对能量代谢需求甚高的收缩射血功能以及心脏抗损伤能力, 病情严重时可发生心肌缺血或梗死^[2,3]。关于糖尿病心肌病的发病机制涉及自由基产生过多, 造成氧化应激, 激活细胞凋亡信号, 出现心肌细胞损伤和坏死^[4]。此外, 胰岛素抵抗、心肌细胞钙稳态失调及凋亡、心肌组织纤维化以及心脏自主神经病变等因素共同削弱了糖尿病患者心脏的代偿能力, 以致心力衰竭^[5]。虽然对于糖尿病心肌病发病机制有着上述认

识, 但直到目前血糖控制仍是该病治疗的基础, 调节血脂药物、血管紧张素转换酶抑制剂及血管紧张素 II 拮抗剂、 β 受体阻滞剂等也被证明可在多方面发挥心肌保护作用, 间接延缓糖尿病心脏病的发生发展, 但目前尚无有效的药物进行治疗^[6]。

姜黄素 (curcumin, Cur) 是近年来被发现的对于心脏具有保护作用的一种天然植物多酚。由于其低毒、价廉以及对多种慢性疾病的广泛药理作用而备受关注, 具有潜在临床应用前景。据文献报道姜黄素可有效降低糖尿病动物血糖水平, 增加胰岛素敏感度, 并且具有抗炎、抗氧化应激等作用^[7-10]。对姜黄素保护心脏的作用机制研究的一个重要发现是它可以抑制核辅因子 p300 介导的心肌细胞增生, 从而对抗心肌增生肥大作用^[11]。但其对糖尿病心肌病的作用机制鲜有报道。本研究将探讨姜黄素干预对糖尿病小鼠心肌损伤因素及能量摄取的调控作用, 以期进一步阐释姜黄素保护糖尿病心肌损伤作用的分子信号

作者单位: 810001 西宁, 青海大学医学院 (宋利娜、刘维军); 青海大学附属医院心血管内科 (柳茵、李琳、于志文)

通讯作者: 刘维军, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: LIUWEIJ2011@163.com; 于志文, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: yu552013@163.com

机制。

材料与方法

1. 主要试剂:姜黄素购自 Organnika 公司;链脲佐菌素 (Streptozocin, STZ) 购自 Sigma 公司;诺和灵 R 胰岛素购自诺和诺德中国制药有限公司;丙二醛 (MDA) 试剂盒购自南京建成生物工程有限公司;核因子 NF-E2 相关因子 (Nrf2)、醌氧化还原酶 (NQO-1) 抗体购自 MBL 公司;硫氧还蛋白结合蛋白 (TXNIP)、磷酸化腺苷活化蛋白激酶 (p-AMPK)、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 购自 Proteintech 公司;葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4)、葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1) 抗体分别购自 Abcam 及 Calbiochem 公司;血糖仪及血糖试纸购自鱼跃医疗设备公司;小鼠胰岛素测定 Elisa 试剂盒购自 CUSABIO 生物公司;BCA 蛋白测定盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

2. 实验动物处理:6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 (广东省实验动物中心提供),适应性喂养 1 周后给予腹腔注射链脲佐菌素 (streptozocin, STZ, 100mg/kg, 溶于柠檬酸钠缓冲液, pH4.2 ~ 4.5) 造模,72h 后采尾静脉血测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 的小鼠纳入模型组,对照组小鼠腹腔注射等量的柠檬酸钠缓冲液。造模成功后,模型组再随机分为两组,分别给予含 45% 脂肪的高脂 (high fat diet, HFD) 饲料及添加了姜黄素 (10mg/kg) 的高脂饲料喂养。另一批小鼠分别给予含 10% 脂肪的低脂 (low fat diet, LFD)、高脂饲料喂养,共 4 组。小鼠自由进食和饮水。定时检测血糖及体重等,干预 15 天后,断头处死,快速取心脏冷冻于液氮中, -80℃ 环境保存。

3. 血糖及胰岛素测定:各组鼠用相应饲料干预 5 天、10 天后采尾静脉血用糖尿病患者血糖试纸测血糖。血清胰岛素采用 ELISA 方法测定;各组小鼠禁食 8h 后处死,断头采血约 100 μ l,室温静置 2h 后,1000 $\times$ g, 离心 10min, 取上清 5 μ l, 按照 CUSABIO 生物公司小鼠胰岛素 Elisa 试剂盒说明书步骤进行操作。

4. 蛋白免疫印迹杂交 (Western blot) 法检测心肌 GLUT1、GLUT4、TXNIP、AMPK、p-AMPK、Nrf2、NQO-1 等蛋白的表达:取小鼠心室肌 (约 20mg), 加入 200 μ l 新鲜配制组织裂解液, 含 137mmol/L NaCl、20mmol/L Tris (pH7.5)、2mmol/L 磷酸酯酶抑制剂、10mmol/L 焦磷酸钠、10mmol/L 氟化钠、2mmol/L EDTA、1% TritonX-100、2 μ g/ml 抑蛋白酶肽、5 μ g/ml 亮抑酶肽和 2mmol/L 苯甲基磺酰氨, 玻璃匀浆器中研磨 50 次后, 于 4℃、16900r/min 离心 5min, 留上清。用 BCA 法, 将各样品置于酶标仪中, 于 452nm 波长处测定 OD 值, 绘制标准曲线, 计算蛋白浓度。取等量蛋白与蛋白上样缓冲液混匀, 并于

95℃ 变性 5min 后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 后转至 NC 膜上, 8% 脱脂奶粉封闭 2h, 相应一抗结合 4℃ 过夜, 再加入二抗室温孵育 2h, ECL 显影并用凝胶成像系统记录影像。GLUT1、GLUT4 蛋白的检测采用特殊的膜蛋白组织裂解液, 即上述蛋白裂解液加入 2% SDS。组织蛋白变性采用高浓度尿素上样缓冲液, 含 6.86mol/L 尿素、4.29% SDS、43mmol/L Tris (pH 6.8)、300mmol/L DTT, 室温变性 60min, 然后同上进行 Western blot 法检测。

5. 心肌 MDA 含量测定:取小鼠心脏约 50mg, 加入适量的裂解液 (10% Tx-100, 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 去离子水定容), 制成 10% 的组织匀浆液。按照南京建成生物科技的 MDA 测试盒说明书操作, TAB 结合法测定各组心肌组织中 MDA 的含量并用蛋白含量进行校正。

6. 统计学方法:所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用统计软件 SPSS 17.0 处理; 每两组均数间差异显著性检验采用 *t* 检验; 多组均数之间的差异显著性检验用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 姜黄素干预降低糖尿病小鼠血糖作用:小鼠给予 STZ 腹腔注射诱导糖尿病成功后, 继续进行 15 天的高脂和高脂加姜黄素干预。高脂饲喂增加小鼠体重, 而姜黄素干预对高脂饲喂小鼠体重并无明显影响 (STZ + HFD + Cur 组 22.7 ± 0.6 g vs HFD 组 17.75 ± 0.8 g, *P* < 0.05, 图 1)。对小鼠血糖和血清胰岛素含量的测定表明, 姜黄素干预降低小鼠血糖水平 (5 天时 STZ + HFD 组 22.1 ± 1.0 mmol/L vs STZ + HFD + Cur 组 17.9 ± 1.0 mmol/L, *P* < 0.05; 10 天时 STZ +

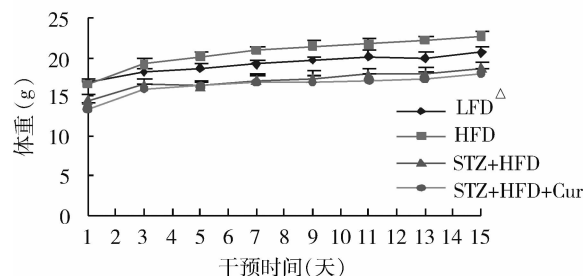


图 1 小鼠体重记录结果

LFD. 低脂干预组; HFD. 高脂干预组; STZ + HFD. 糖尿病模型组; STZ + HFD + Cur. 姜黄素干预组。与 HFD 组相比, $\Delta P < 0.05$

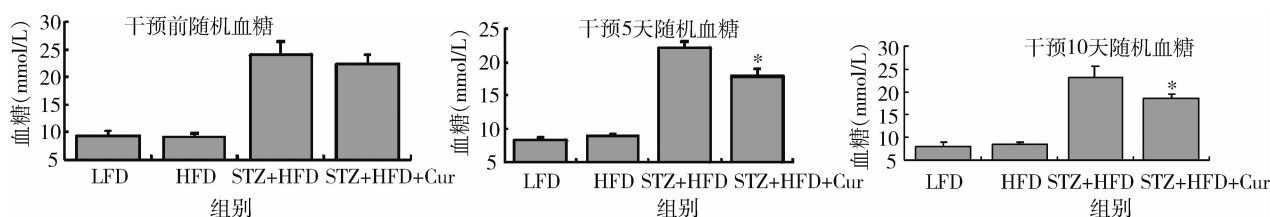


图 2 小鼠随机血糖测定结果

与 STZ + HFD 组比较, * *P* < 0.05

HFD 组 $23.4 \pm 2.3 \text{ mmol/L}$ vs STZ + HFD + Cur 组 $18.5 \pm 0.8 \text{ mmol/L}$, $P < 0.05$, 图 2), 同时明显增加血清胰岛素含量 (STZ + HFD 组 $6.4 \pm 2.3 \text{ U}$ vs STZ + HFD + Cur 组 $10.2 \pm 1.1 \text{ U}$, $P < 0.05$, 图 3)。

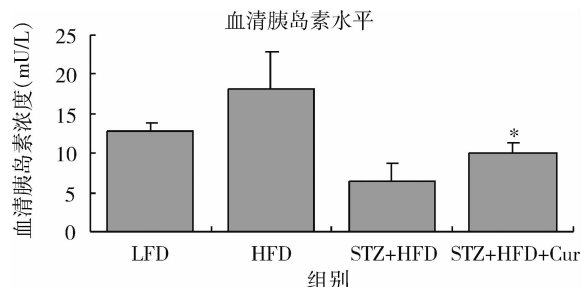


图 3 小鼠血清胰岛素水平测定结果

与 STZ + HFD 组比较, * $P < 0.05$

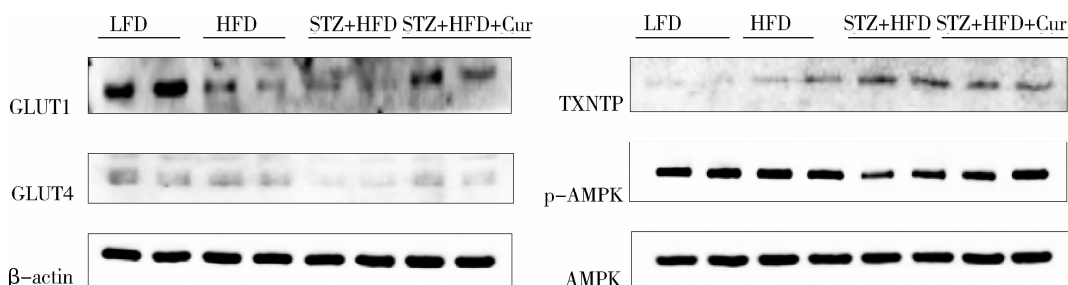


图 4 小鼠心脏 GLUT1、GLUT4、TXNIP、AMPK、p-AMPK 等蛋白的 Western bolt 法检测结果

3. 姜黄素通过上调 Nrf2 系统功能对抗心肌氧化应激损伤:为进一步探讨姜黄素保护心脏作用,笔者对心肌组织脂质氧化指标 MDA 进行了测定(图 5),结果表明 HFD 组心脏 MDA 含量较之 LFD 组有增加趋势,而 STZ + HFD 组则显著升高,STZ + HFD + Cur 组则明显纠正了小鼠心肌 MDA 含量,几乎达到正常水平 (STZ + HFD 组 $2.3 \pm 0.2 \text{ nmol/mg prot}$ vs STZ + HFD + Cur 组 $1.5 \pm 0.3 \text{ nmol/mg prot}$, $P < 0.05$)。为探讨姜黄素抗氧化应激作用,笔者对体内抗氧化系统 Nrf2 特异性调控的 NQO-1 蛋白进行了检测,结果表明姜黄素干预对 NQO-1 蛋白表达具有一定的上调作用(图 6)。

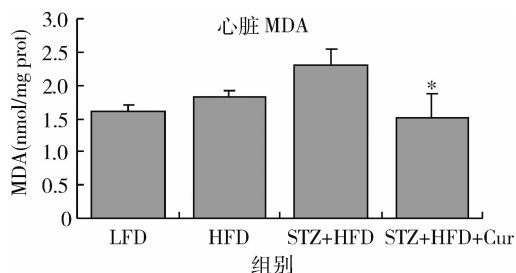


图 5 小鼠心肌组织中 MDA 检测结果

与 STZ + HFD 组比较, * $P < 0.05$

2. 姜黄素干预增加心肌 GLUT4 和 GLUT1 蛋白表达:姜黄素干预 15 天后, HFD 组小鼠心脏 GLUT1、GLUT4 蛋白表达水平与 LFD 组比有所下降,而 STZ + HFD 组小鼠心脏组织中这两种蛋白表达水平进一步降低,给予姜黄素干预后明显翻转心脏 GLUT4 和 GLUT1 的蛋白耗竭(图 4)。此外,笔者检测了 TXNIP 蛋白及 AMPK 磷酸化水平,结果发现, TXNIP 蛋白在 HFD 及 STZ + HFD 组小鼠心脏中的表达水平依次升高,而姜黄素干预具有一定的降低作用,而 AMPKThr172 磷酸化水平的变化则相反,姜黄素干预可改善 STZ + HFD 组小鼠心脏 AMPK 磷酸化的抑制现象,明显增高心脏 AMPK 磷酸化水平。

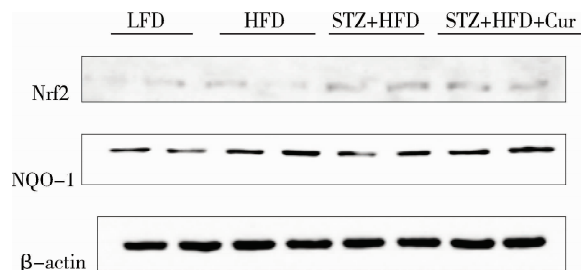


图 6 小鼠 Nrf2、NQO-1 蛋白的 Wester blot 法检测结果

讨 论

糖尿病性心脏病是糖尿病患者难治性及致死性的严重合并症之一。糖尿病的高血糖可造成糖尿病鼠心脏中抗氧化和抗凋亡能力障碍。多篇研究报告表明,姜黄素可改善糖尿病动物血糖代谢。本研究证实低剂量姜黄素在短期内也能起到降低糖尿病动物血糖和增加血清胰岛素含量的作用。从 MDA 检测结果可见,姜黄素可明显缓解糖尿病小鼠心肌的氧化应激状态,有研究指出,姜黄素本身就可以作为抗氧化剂,直接对抗心脏氧化应激,但是否还可通过其他途径发挥其抗氧化作用不得而知^[5]。Nrf2 是体内重要的抗氧化系统, NQO-1 又是 Nrf2 特异性调控的抗氧

化酶,因此,笔者检测了二者在心肌中的表达水平,以明确姜黄素是否可通过该途径介导小鼠心脏抗氧化作用。检测结果显示,低剂量的姜黄素可轻度上调 NQO-1 蛋白的表达,但对 Nrf2 蛋白的表达无明显影响。由此结果推测,姜黄素并没有明显激活 Nrf2 系统,其抗氧化作用可能是通过其他机制。有研究报道, TXNIP 也参与氧化还原状态的调控^[12]。本研究对小鼠心肌 TXNIP 蛋白的检测结果显示,姜黄素对高血糖反应性升高的 TXNIP 蛋白表达水平具有一定抑制作用,提示其也可能通过此途径改善心肌氧化应激状态。最后,姜黄素的降血糖作用也可间接减轻高血糖造成的 ROS 过度产生,进而起到缓解氧化应激的作用。

此外,心脏由于其活跃的收缩舒张泵血功能,能量代谢极为活跃,因此心脏对葡萄糖的摄取能力对于心脏舒缩功能,包括损伤修复等耗能过程均具有重要意义。本研究发现,姜黄素干预可明显纠正小鼠心肌组织中重要的葡萄糖转运蛋白 GLUT4 及 GLUT1 的蛋白表达降低的现象。近年有研究报道, TXNIP 对于 GLUT1 有抑制作用,而 AMPK 又可抑制 TXNIP 的这一作用^[13]。本研究发现,心脏 AMPK 磷酸化水平在 STZ + HFD 小鼠心脏中明显下调,而 TXNIP 表达反而升高;姜黄素干预则可逆转这些异常,上调 AMPK 磷酸化水平,同时下调 TXNIP 的表达,继而改善 TXNIP 对 GLUT1、GLUT4 表达的抑制情况。因此可推测,姜黄素可通过激活 AMPK,进而抑制 TXNIP 对 GLUT1 等葡萄糖蛋白表达的抑制作用,这可能是其调控葡萄糖转运蛋白,改善糖尿病小鼠心脏葡萄糖摄取利用能力的机制之一。姜黄素一方面可以在整体起到降低血糖作用,另一方面在心脏明显对抗糖尿病造成的心肌氧化应激,同时增加心肌组织的葡萄糖转运蛋白表达及对葡萄糖的摄取能力。

参考文献

- 1 Resl M, Hulsmann M, Pacher R, *et al.* Heart failure in diabetes[J]. *Wien Med Wochenschr*, 2009, 159(5-6): 134-140
- 2 McGill JB, Peterson LR, Herrero P, *et al.* Potentiation of abnormalities in myocardial metabolism with the development of diabetes in women with obesity and insulin resistance [J]. *J Nucl Cardiol*, 2011, 18(3): 421-429
- 3 Li F, Dong NG. Progress of receptor of advanced glycation end products in cardiovascular disease[J]. *Journal of Clinical Cardiology: China*, 2012, 28(4): 272-275
- 4 高嵩,危春英. 糖尿病心脏病发病机制及对心功能影响的研究进展[J]. *医学综述*, 2011, 17(18): 2796-2799
- 5 赵凌云,田绍前,刘小红,等. 糖尿病心脏病的发病机制[J]. *中国糖尿病杂志*, 2013, 21(6): 571-573
- 6 赵娜娜,鲁翔. 糖尿病心脏病的治疗进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(3): 502-504
- 7 郭颖,高毅,刘永光,等. 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
- 8 Alappat L, Awad AB. Curcumin and obesity: evidence and mechanisms[J]. *Nutr Rev*, 2010, 68(12): 729-738
- 9 Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research [J]. *Altern Med Rev*. 2009, 14(2): 141-153
- 10 Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(3): 332-347
- 11 Aziz MT, El Ibrashy IN, Mikhailidis DP, *et al.* Signaling mechanisms of a water soluble curcumin derivative in experimental type 1 diabetes with cardiomyopathy[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2013, 5(1): 13
- 12 Spindel ON, World C, Berk BC. Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(6): 587-596
- 13 Wu N, Zheng B, Shaywitz A, *et al.* AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1 [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1167-1175

(收稿日期:2014-03-08)

(修回日期:2014-03-24)

中期因子 midkine 在妊娠滋养细胞疾病中表达的临床意义

姚红丽 彭友 全近毅 刘惠宁

摘要 **目的** 通过分析中期因子在正常绒毛组织、葡萄胎、侵蚀性葡萄胎及绒癌中表达的差异性,探讨中期因子与绒毛膜癌侵袭转移能力的关系。**方法** 采用免疫组化(SP)法检测正常早孕绒毛组织 20 例、葡萄胎组织 35 例、侵蚀性葡萄胎 18 例和绒

作者单位:310006 南京医科大学附属杭州医院(杭州市第一人民医院)(姚红丽、彭友、全近毅);410008 长沙,中南大学湘雅医院(刘惠宁)

通讯作者:刘惠宁,电子信箱:lh8127@yahoo.com.cn