

姜黄素对肺缺血/再灌注损伤小鼠 Caspase-12 及细胞凋亡的影响

周俊辉^{1△} 赵珊¹ 陈海娥¹ 陈丹¹ 郝卯林¹ 应磊¹ 林丽娜² 王万铁¹

摘要 **目的** 研究姜黄素(curcumin, CUR)对肺缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤小鼠天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-12(cysteinyI aspartate specific proteinase-12, Caspase-12)及细胞凋亡的干预作用。**方法** 采用 C57BL/6J 小鼠制作在体单侧肺原位 I/R 损伤模型。采用随机数字表法将 60 只小鼠分为 6 组,每组 10 只。假手术组(简称 Sham 组)、I/R 组、I/R 加二甲亚砜(简称 I/R 加 DMSO)组、I/R 分别加 100、150、200 mg/kg CUR(简称 I/R 加 CUR-100、I/R 加 CUR-150、I/R 加 CUR-200)组。实验结束留取左肺,测定肺湿/干重比(W/D)和总肺水含量(TLW),光镜观察肺组织形态学改变,进行肺组织损伤定量评估(IQA),电镜观察肺组织超微结构改变,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 Caspase-12 和葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) mRNA 及蛋白表达水平,原位末端标记(TUNEL)法检测肺组织细胞凋亡指数(AI)。**结果** 与 Sham 组比较,I/R 组 Caspase-12 和 GRP78 mRNA 及蛋白表达水平均升高($P < 0.05$),W/D、TLW、IQA 和 AI 均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),肺组织形态结构均发生明显损伤;与 I/R 加 DMSO 组比较,I/R 加 CUR-100 组、I/R 加 CUR-150 组、I/R 加 CUR-200 组 GRP78 mRNA 及蛋白表达水平均升高($P < 0.05$),而 Caspase-12 mRNA 及蛋白表达水平均降低($P < 0.05$),W/D、TLW、IQA 和 AI 亦均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),肺组织形态学异常改变趋近于正常。**结论** 姜黄素对 I/R 损伤发生的小鼠肺脏具有较好的保护作用,其机制可能与其对抗过度的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)中 Caspase-12 引起的细胞凋亡有关。

关键词 Caspase-12;肺;姜黄素;缺血/再灌注;细胞凋亡

Effect of Curcumin on Caspase-12 and Apoptosis in Pulmonary Ischemia/Reperfusion Injury Mice
ZHOU Jun-hui¹, ZHAO Shan¹, CHEN Hai-e¹, CHEN Dan¹, HAO Mao-lin¹, YING Lei¹, LIN Li-na²,
and WANG Wan-tie¹ 1 Institute of Ischemia/Reperfusion Injury, Wenzhou Medical University, Zhejiang
(325035), China; 2 Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University,
Zhejiang (325035), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of curcumin (CUR) on cycteinyI aspirate specific protease-12 (Caspase-12) and pneumocyte apoptosis in pulmonary ischemia/reperfusion (I/R) injury mice. **Methods** The *in vivo* unilateral *in situ* pulmonary I/R injury mouse model was established in C57BL/6J mice. Sixty experimental mice were randomly divided into six groups by random digit table, i. e., the sham-operation group (Sham), the I/R group, the I/R + dimethyl sulfoxide group (I/R + DMSO), the I/R + low dose CUR pre-treated group (I/R + CUR-100), the I/R + middle dose CUR pre-treated group (I/R + CUR-150), the I/R + high dose CUR pre-treated group (I/R + CUR-200), 10 in each group. Mice were euthanized and their left lungs were excised. Wet lung weight to dry lung weight (W/D) and the total lung water content (TLW) were tested. The morphological changes of the lung tissue were observed and index of quantitative evaluation for alveolar damage (IQA) detected under light microscope. The ultra-mi-

基金项目:浙江省公益技术应用研究项目(No. 2011C37092);浙江省医药卫生科技计划项目(No.2010KYA132);浙江省中医药科技计划项目(No. 2010ZB088);浙江省中医药重点学科建设计划(No. 2012-XK-A28)

作者单位:1. 温州医科大学缺血/再灌注损伤研究所(浙江 325035);2. 温州医科大学附属第一医院麻醉科(浙江 325035)

通讯作者:王万铁, Tel:0577-86689817, E-mail:wwt@wzmc.edu.cn

△现在河南省胸科医院麻醉二科(郑州 450008)

DOI: 10. 7661/CJIM. 2014. 09. 1118

crostructure of the lung tissue was observed under electron microscope. The mRNA and protein expression levels of Caspase-12 and glucose regulated protein (GRP78) were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. Apoptosis index (AI) of the lung tissue was determined by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) method. Results Compared with the Sham group, expression levels of Caspase-12, GRP78 mRNA and protein all significantly increased in the I/R group ($P < 0.05$); W/D, TLW, IQA, and AI were all notably higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the morphological and ultrastructural injury of the lung tissue were notably observed in I/R group. Compared with the I/R + DMSO group, expression levels of GRP78 mRNA and protein were increasingly higher in the I/R + CUR-100 group, the I/R + CUR-150 group, and the I/R + CUR-200 group ($P < 0.05$), expression levels of Caspase-12 mRNA and protein were lower ($P < 0.05$); W/D, TLW, IQA, and AI also decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the morphological and ultrastructural injury of the lung tissue were gradually alleviated in the I/R + CUR groups. Conclusion CUR had better effect on the lung protection against I/R injury, which might be related to inhibition for pneumocyte apoptosis associated with Caspase-12 in excessive unfolded protein response (UPR).

KEYWORDS Caspase-12; lung; curcumin; ischemia/reperfusion; apoptosis

肺缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是影响肺移植手术的重要环节,目前尚无有效的预防及治疗措施。近来学者发现,肺 I/R 损伤的发生与肺组织细胞凋亡密切相关^[1],且抑制细胞凋亡对 I/R 诱导的肺损伤有一定的防治作用^[2],但其具体的作用机制至今未能完全阐明。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-12 (cysteinyl aspartate specific proteinase-12, Caspase-12)存在于内质网上,在全身多种器官内均有表达,是内质网应激诱导细胞凋亡的重要因子之一。姜黄素(curcumin, CUR)是从姜黄属植物姜黄、郁金等活血化瘀药物中提取出的一种酚性色素,具有行气活血、通经止痛、抗炎、抗氧化、抗肿瘤和抗肺动脉高压等作用^[3-5]。目前姜黄素对非肿瘤细胞抗凋亡作用的研究越来越受到关注,且多集中于脑、视网膜等的 I/R 损伤,其机制主要与影响 MAPK 信号通路以及调控凋亡基因 p53 有关^[6,7]。由此推断姜黄素的抗凋亡机制是多方面的。本实验建立小鼠原位肺 I/R 损伤模型,以 CUR 对模型进行干预,明确其对 Caspase-12 的作用和抗细胞凋亡的机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 60 只,雄性,6~8 周,体重(20.0 ± 2.0) g。饲养于 SPF 级环境中,由温州医科大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2010-0150],动物实验方案经温州医科大学实验动物伦理委员会审核并同意实施。

2 药物 CUR(姜黄纯度 $\geq 94\%$),美国 Sigma 公司。不同剂量 CUR 试剂配制如下:先取 1 份纯 DMSO,稀释于 9 份的生理盐水中,配制成 10%DM-

SO 溶剂;称取 CUR 粉剂,溶于 10% DMSO 溶剂中,用力混匀,使其充分溶解,配制成如下浓度的 CUR 溶液,4℃下保存,用时摇匀。(1) CUR-100 组(100 mg/kg): CUR 溶液浓度:5.0 mg/mL;给药体积 V(mL) = [小鼠体重(W) kg \times 100 mg/kg]/5.0 mg/mL = 20W mL。(2) CUR-150 组(150 mg/kg): CUR 溶液浓度:7.5 mg/mL;给药体积 V(mL) = [小鼠体重(W) kg \times 150 mg/kg]/7.5 mg/mL = 20W mL。(3) CUR-200 组(200 mg/kg): CUR 溶液浓度:10.0 mg/mL;给药体积 V(mL) = [小鼠体重(W) kg \times 200 mg/kg]/10.0 mg/mL = 20W mL。(4) DMSO 组:给予 10% DMSO 20 mL/kg;给药体积 V(mL) = 小鼠体重(W) kg \times 20 mL/kg = 20W mL。

3 仪器及试剂 小动物呼吸机(型号:HX-100E,中国成都泰盟科技有限公司),PCR 仪(日本 Bioer 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),电转仪和电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),电热恒温鼓风干燥箱(中国上海贺德实验设备有限公司),AL204 电子称(美国 METTLER TOLEDO 公司),BA-200 光学显微镜(日本 Motic 公司),H-7500 型透射电镜(日本 Hitachi 公司)。Trizol 提取液(美国 Life technologies 公司),逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒(美国 Fermentas Life Science 公司),兔抗 GAPDH 多克隆 IgG 抗体(中国杭州贤至生物科技有限公司),葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein, GPR78) 一抗、Caspase-12 一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司),二抗工作液(辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔 IgG,北京中杉金桥生物科技有限公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天生物技术研究),DAB

显色试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司),脱氧核糖核酸酶 I(美国 Sigma 公司),其余均为市售分析纯。

4 方法

4.1 实验分组 采用随机数字表法将 C57BL/6J 小鼠分为 6 组,每组 10 只,假手术组(简称 Sham 组)、I/R 组、I/R 加二甲亚砜组(简称 I/R 加 DMSO 组),I/R 分别加 100、150、200 mg/kg CUR 组(简称 I/R 加 CUR-100、I/R 加 CUR-150、I/R 加 CUR-200 组)。于缺血前 2 h 经腹腔注射不同剂量 CUR 溶液及 10% DMSO 溶液。

4.2 模型制作 按照文献[8]报道的方法制作小鼠原位肺 I/R 损伤动物模型。具体操作步骤可参考本课题组已发表文章^[9]。小鼠开胸并夹闭左肺门 30 min,即为缺血期;松开动脉夹,再灌注 3 h 后结束实验,留取左肺。Sham 组只开胸不夹闭肺门,余步骤同 I/R 组,观察 3.5 h 后处死小鼠并取左肺。I/R 损伤造模成功小鼠共 50 只。

5 观察项目及检测方法

5.1 肺湿/干重比(W/D)和总肺含水量(total lung water, TLW)检测 具体操作步骤按本课题组前期方法^[9]。

5.2 肺组织光镜检测及肺泡损伤数定量评价指标(IQA)检测 具体操作步骤同文献[9]。

5.3 肺组织超微结构电镜检测 具体操作步骤同文献[9]。

5.4 RT-PCR 检测 GRP78 及 Caspase-12 mRNA 水平 Trizol 法抽提总 RNA。测定总 RNA 浓度。按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。再按照 PCR 试剂盒说明书进行 cDNA 扩增。内参及目的基因引物序列见表 1。PCR 反应条件为:起始变性,95 °C,1 min;变性,95 °C,30 s;退火,55 °C (GAPDH)/49 °C (GRP78)/57 °C (Caspase-12),30 s;延伸,72 °C,30 s;终止延伸,72 °C,10 min。循环数 33 次。用各目的基因扩增产物的密度与 GAPDH 基因扩增产物的密度比值表示各目的基因的表达水平。

表 1 内参及各目的基因的引物序列

基因名称	引物序列	产物(bp)
Caspase-12	上游 5'-CTGACAGCTCCTCATGGACTC-3'	309
	下游 5'-GCCAGCAAAGTGCATTAAGTTC-3'	
GRP78	上游 5'-GATAATCAACCAACTGTATAC-3'	575
	下游 5'-GTATCCTCTTACCAGTTGG-3'	
GAPDH	上游 5'-ACTTGAAGGGTGGAGCCAAA-3'	530
	下游 5'-CCAGGAAATGAGCTTGACA-3'	

5.5 Western blot 检测 GRP78 及 Caspase-12 蛋白水平 取约 100 mg 肺组织块置研钵中并碾碎。加 400 μL 单去污剂裂解液裂(含 PMSF)于研钵中,于冰上反复碾压使组织变为匀浆。将匀浆物低温高速离心后取上清液,96 孔板-BCA 法测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性。40 μg 蛋白样品为上样量,用 10% SDS-PAGE 将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上,再将膜用 TBS 浸湿后移至含 5% 脱脂奶粉的封闭液中,37 °C 反应 1 h。分别加入兔抗 Caspase-12 多克隆抗体(1:1 000)、兔抗 GRP78 多克隆抗体(1:1 000)和兔抗 GAPDH 多克隆 IgG 抗体(1:1 000),4 °C 反应过夜。再加入二抗工作液(辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔 IgG,1:500),室温反应 1 ~ 1.5 h。化学发光,显影,定影。扫描后用 GEL-PRO 凝胶成像分析软件进行吸光度积分值分析。

5.6 原位肺细胞凋亡检测 按照 TUNEL 法,依据试剂盒说明书所述方法操作。凋亡细胞胞核染色呈棕褐色,未凋亡细胞胞核染色呈蓝紫色。计数 5 个高倍镜(×400)下的凋亡细胞数。每张片子至少观察 500 个细胞,计算每 100 个细胞内的阳性细胞数,即为凋亡指数(apoptosis index, AI)。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析;组间两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

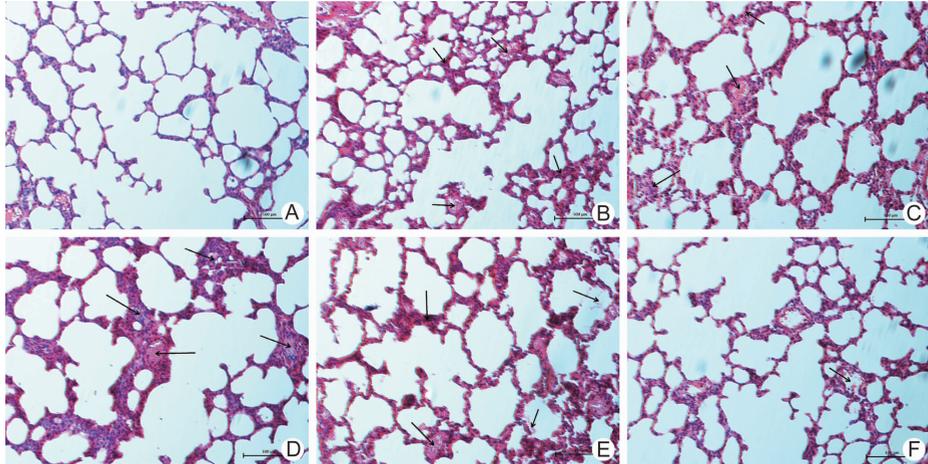
1 各组 W/D 及 TLW 测定结果比较(表 2) 与 Sham 组比较,I/R 组 W/D 和 TLW 均明显升高($P < 0.01$)。与 I/R 加 DMSO 组比较,I/R 加 CUR-100、I/R 加 CUR-150、I/R 加 CUR-200 组 W/D 和 TLW 均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),尤以 I/R 加 CUR-200 组降低明显($P < 0.01$)。

2 各组肺组织形态学及 IQA 变化比较(表 2, 图 1) 与 Sham 组比较,I/R 组 IQA 显著升高($P < 0.01$)。与 I/R 加 DMSO 组比较,I/R 加 CUR-100 组、I/R 加 CUR-150 组和 I/R 加 CUR-200 组 IQA 均下降($P < 0.01$),尤以 I/R 加 CUR-200 组降低明显($P < 0.01$)。光镜下,损伤的肺组织在形态学上主要表现为:肺泡结构紊乱,肺泡壁水肿增厚或破裂,肺泡内水肿渗出或红细胞漏出或炎症细胞漏出。而 I/R 加 CUR 组中上述肺组织损伤均有不同程度的减轻。

表 2 各组肺组织 W/D、TLW、IQA 及 AI 变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	W/D	TLW	IQA (%)	AI (%)
Sham	10	2.32 ± 0.49	1.32 ± 0.49	4.71 ± 1.68	2.89 ± 0.99
I/R	10	4.99 ± 0.72*	3.99 ± 0.72*	40.22 ± 5.39*	35.19 ± 5.94*
I/R 加 DMSO	10	5.10 ± 0.63	4.10 ± 0.63	39.55 ± 4.67	34.66 ± 4.52
I/R 加 CUR-100	10	4.13 ± 0.89 [△]	3.13 ± 0.89 [△]	31.47 ± 3.48 ^{△△}	31.49 ± 2.91 [△]
I/R 加 CUR-150	10	3.43 ± 0.97 ^{△△▲}	2.43 ± 0.97 ^{△△▲}	20.52 ± 2.69 ^{△△▲▲}	24.78 ± 3.41 ^{△△▲▲}
I/R 加 CUR-200	10	2.65 ± 0.85 ^{△△▲▲○}	1.65 ± 0.85 ^{△△▲▲○}	14.99 ± 3.56 ^{△△▲▲○○}	14.47 ± 2.69 ^{△△▲▲○○}

注:与 Sham 组比较,* $P < 0.01$;与 I/R 加 DMSO 组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与 I/R 加 CUR-100 组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与 I/R 加 CUR-150 组比较,[○] $P < 0.05$,^{○○} $P < 0.01$;表 3,4 同



注:A 为 Sham 组;B 为 I/R 组;C 为 I/R 加 DMSO 组;D 为 I/R 加 CUR-100 组;E 为 I/R 加 CUR-150 组;F 为 I/R 加 CUR-200 组;箭头标识为形态、结构或病理变化;图 2,3 同

图 1 各组肺组织光镜形态学变化 (HE 染色, ×200)

3 各组肺组织超微结构比较(图 2) Sham 组:肺组织超微结构无明显损伤改变。I/R 组:肺泡 II 型上皮细胞轮廓模糊,细胞肿胀明显,表面微绒毛明显减少甚至消失,线粒体等细胞器明显肿胀,板层小体逐渐出现空泡或数目减少甚或消失,胞核碎裂较多,染色质分布明显不均。I/R 加 CUR 组:随着 CUR 剂量的逐渐增加,I/R 加 CUR 组肺组织超微结构损伤逐渐减轻,

尤以 I/R 加 CUR-200 组减轻明显,具体表现为:肺泡 II 型上皮细胞轮廓逐渐趋于清晰,细胞肿胀程度逐渐减轻,表面微绒毛逐步增多,线粒体等细胞器趋向常态,板层小体逐渐增多,胞核边界较完整,染色质越分布均匀。

4 各组细胞凋亡和 AI 值比较(表 2,图 3) 与 Sham 组比较,I/R 组 AI 明显升高($P < 0.01$)。与 I/R

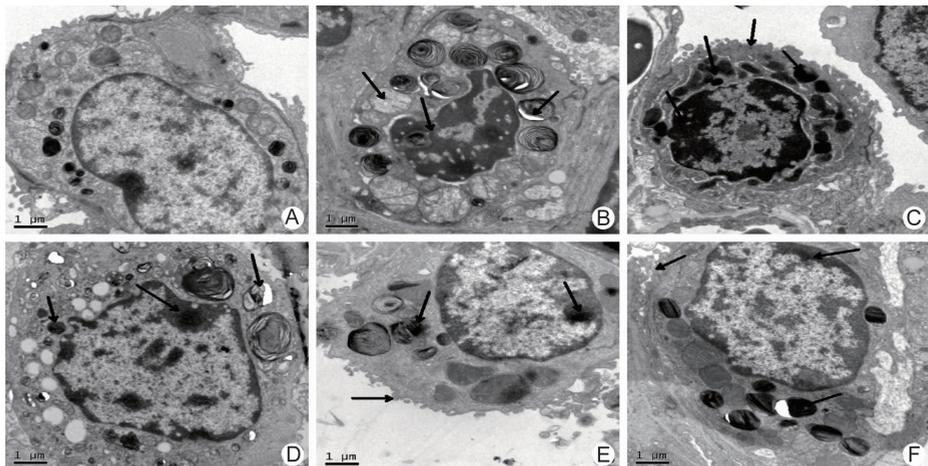


图 2 各组肺组织肺泡 II 型细胞超微结构变化 (电子透射电镜, ×10 000)

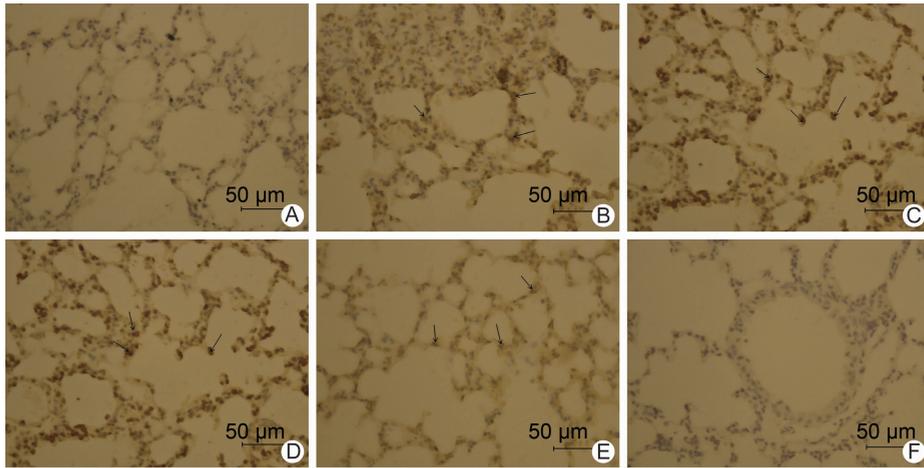


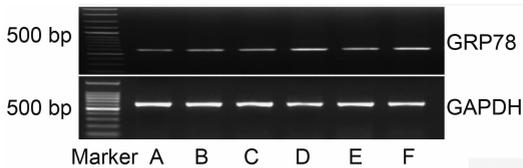
图3 各组小鼠肺组织细胞凋亡结果 (POD 显色, ×400)

加 DMSO 组比较, I/R 加 CUR-100 组、I/R 加 CUR-150 组和 I/R 加 CUR-200 组 AI 均下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 尤以 I/R 加 CUR-200 组降低明显 ($P < 0.01$)。TUNEL 法染色显示, I/R 组中大量肺血管内皮细胞发生凋亡, 而经 CUR 干预后则明显减少; 大量肺泡上皮细胞在经 I/R 后引起凋亡, 而经 CUR 干预后亦明显减轻。

5 各组 GRP78 和 Caspase-12 mRNA 表达水平比较(图 4, 5, 表 3) 与 Sham 组比较, I/R 组 GRP78

和 Caspase-12 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 I/R 加 DMSO 组比较, 随着 CUR 剂量的增加, GRP78 mRNA 表达水平逐渐升高 ($P < 0.05$); Caspase-12 mRNA 表达水平逐渐降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

6 各组 GRP78 和 Caspase-12 蛋白表达水平比较(图 6, 7, 表 4) 与 Sham 组比较, I/R 组 GRP78 和 Caspase-12 蛋白的表达水平均升高 ($P < 0.01$)。与 I/R 加 DMSO 组比较, 随着 CUR 剂量的增加, GRP78 蛋白表达水平逐渐升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),



注: A 为 Sham 组; B 为 I/R 组; C 为 I/R 加 DMSO 组; D 为 I/R 加 CUR-100 组; E 为 I/R 加 CUR-150 组; F 为 I/R 加 CUR-200 组; 图 5-7 同

图 4 GRP78 mRNA 电泳图

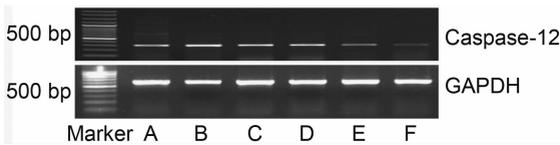


图 5 Caspase-12 mRNA 电泳图

表 3 各组小鼠肺组织中 GRP78、Caspase-12 mRNA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GRP78 mRNA	Caspase-12 mRNA
Sham	10	0.42 ± 0.03	0.25 ± 0.02
I/R	10	0.80 ± 0.04 *	0.80 ± 0.04 *
I/R 加 DMSO	10	0.78 ± 0.03	0.81 ± 0.05
I/R 加 CUR-100	10	0.83 ± 0.04 Δ	0.74 ± 0.04 Δ
I/R 加 CUR-150	10	0.84 ± 0.05 Δ▲	0.64 ± 0.05 Δ▲▲
I/R 加 CUR-200	10	0.90 ± 0.04 Δ▲○	0.36 ± 0.04 Δ▲▲○

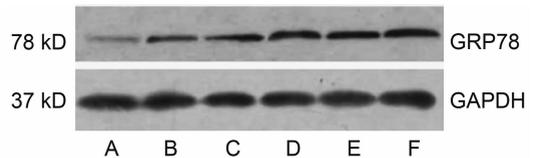


图 6 GRP78 蛋白电泳图

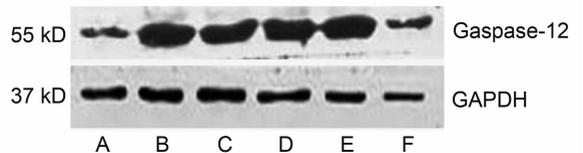


图 7 Caspase-12 蛋白电泳图

表 4 各组小鼠肺组织中 GRP78 及 Caspase-12 蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GRP78 蛋白	Caspase-12 蛋白
Sham	10	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.03
I/R	10	0.72 ± 0.04 *	0.81 ± 0.05 *
I/R 加 DMSO	10	0.73 ± 0.03	0.82 ± 0.06
I/R 加 CUR-100	10	0.79 ± 0.04 Δ	0.75 ± 0.05 Δ
I/R 加 CUR-150	10	0.84 ± 0.05 Δ▲	0.65 ± 0.04 Δ▲▲
I/R 加 CUR-200	10	0.90 ± 0.04 Δ▲▲○	0.37 ± 0.03 Δ▲▲○

Caspase-12 蛋白表达水平逐渐降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

在肺 I/R 损伤发生发展中,肺组织细胞凋亡起着关键性作用,且干预细胞凋亡对肺 I/R 损伤发挥着较好的防治作用。本研究结果亦显示,Sham 组肺组织中几乎均为正常细胞,而在 I/R 组中的凋亡细胞数目明显增多,且给予 CUR 干预后凋亡细胞数明显减少;同时光镜和 TUNEL 法显示,凋亡细胞中主要以肺毛细血管内皮细胞和肺泡 II 型上皮细胞为主,表明这两种肺细胞凋亡可能在肺 I/R 损伤的发生中起着重要作用。

内质网对机体内环境稳态改变十分敏感,缺血缺氧、氧化应激等都可以扰乱内质网稳态,导致错误折叠或未折叠蛋白蓄积,引发未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。一定程度的 UPR 对机体发挥保护作用,但持续过度的 UPR 将通过多种途径诱导内质网相关性细胞凋亡甚至死亡。GRP78 是 UPR 的经典标志物^[10]。GRP78 又称免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip),是内质网伴侣蛋白,UPR 可使 GRP78 大量表达,并与内质网中错误折叠和未折叠蛋白结合,恢复蛋白正确构象,维持内环境稳定,GRP78 的转录诱导在保护细胞避免各种内质网应激引起的死亡中具有重要作用^[10]。Caspase-12 存在于内质网膜上,其前体以酶原的形式与肿瘤坏死因子受体相关因子 α (TNF receptor-associated factor α , TRAF α) 相连接,肌醇必需酶-1 (Inositol-requiring enzyme-1, IRE-1) 与 TRAF α 的结合,导致 TNAF α 与 Caspase-12 前体复合物解离,在钙离子依赖性蛋白酶作用下,促进 Caspase-12。活化的 Caspase-12 进一步激活 Caspase-9 和 Caspase-3,引起细胞凋亡^[11]。本研究显示,GRP78 的表达水平在 Sham 组中很低,而在 I/R 组中明显上升,且经 CUR 干预,其水平一直处于高表达状态。这就说明,在过度的 UPR 中,上调的 GRP78 发挥着积极的保护作用。Caspase-12 的表达水平亦在 I/R 时明显上升,经 CUR 干预而下调,由此提示:过度的 UPR 中,Caspase-12 介导细胞凋亡途径,导致肺组织损伤。此种原因可能有多种,一种情况,持续上调的 GRP78 于 I/R 初期发挥了保护作用,但过度的 UPR 促使大量的未折叠蛋白蓄积于内质网中,导致 GRP78 无法全部将其清除,进而启动了内质网相关性细胞凋亡机制,促使细胞凋亡,损伤肺组织;另一种情况,持续的内质网应激促使 GRP78 与

Caspase-12 分离,分离后的 Caspase-12 引发 Caspase 级联反应,直接诱导细胞发生凋亡,促使肺损伤的发生发展。

CUR 作为一种中药单体,因其抗氧化应激、抑制炎症性细胞因子释放以及抗细胞凋亡等诸多功效^[12,13],目前逐渐成为研究热点之一。本实验着眼于 CUR 对肺 I/R 损伤中细胞凋亡及 Caspase-12 的作用进行研究。实验中对 CUR 浓度的选取是依据他人研究报道的数值并加以换算而得出^[14]。本研究结果表明,给予 CUR 后,I/R 组中 W/D、TLW、IQA 和 AI 均逐渐下降,肺组织损伤形态亦减轻,肺凋亡细胞明显减少;而 Caspase-12 表达水平则逐步降低,GRP78 表达增加。证实 CUR 对抗肺细胞凋亡,减轻再灌注肺损伤,其机制可能与 I/R 诱发的过度 UPR 中 Caspase-12 表达下调有关,且与增加 GRP78 的活性、调控内质网相关性凋亡通路等有很大关系。但 I/R 损伤是多种因素综合作用的结果,单纯对其某一环节进行干预并不能获得最佳效果,因此可以推测,CUR 对抗肺 I/R 损伤的机制应是多方面的,故需做更多的工作去探究。

本研究表明,CUR 对 I/R 损伤发生的肺脏具有较好的保护作用,其机制可能与其对抗过度的 UPR 中 Caspase-12 途径引起的细胞凋亡有关。

参 考 文 献

- [1] Ng CS, Wan S, Yim AP. Pulmonary ischemia-reperfusion injury: role of apoptosis[J]. Eur Respir J, 2005, 25(2): 356-363.
- [2] Quadri SM, Segall L, de Perrot M, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation[J]. Am J Transplant, 2005, 5(2): 292-299.
- [3] 唐小卿, 聂亚雄, 冯鉴强, 等. 姜黄素对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(6): 672-676.
- [4] Egan ME, Pearson M, Weiner SA, et al. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects[J]. Science, 2004, 304(5670): 600-602.
- [5] 林全, 狄枫, 陈少贤, 等. 姜黄素对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺动脉高压及肺动脉管壁胶原的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2006, 22(3): 257-261.
- [6] 王晓静, 吴华璞, 李子广, 等. 姜黄素抗脑缺血再灌注损伤作用与 MAPK 信号通路的相关性分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(6): 711-713.
- [7] 王赛斌, 姬斌, 黄晓燕, 等. 姜黄素对自发性高血压大鼠缺

血再灌注后视网膜细胞凋亡及 p53 表达的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(7): 789-802.

- [8] Zanotti G, Casiraghi M, Abano JB, et al. Novel critical role of Toll-like receptor 4 in lung ischemia-reperfusion injury and edema[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(1): L52-L63.
- [9] 赵珊, 马迎春, 刘亚坤, 等. 姜黄素通过抑制内质网应激和 JNK 通路过度活化减轻小鼠肺缺血再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(2): 308-313.
- [10] Yoshida H, Haze K, Yanagi H, et al. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors[J]. J Biol Chem, 1998, 273(50): 33741-33749.
- [11] Zhan H, Yenari MA, Cheng D, et al. Bcl-2 over-expression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and Caspase-3 activity[J]. J Neurochem, 2003, 85(4): 1026-1036.
- [12] Yucel AF, Kanter M, Pergel A, et al. The role of curcumin on intestinal oxidative stress, cell proliferation and apoptosis after ischemia/reperfusion injury in rats[J]. J Mol Histol, 2011, 42(6): 579-587.
- [13] Fiorillo C, Becatti M, Pensalfini A, et al. Curcumin protects cardiac cells against ischemia-reperfusion injury: effects on oxidative stress, NF-kappaB, and JNK pathways[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 45(6): 839-846.
- [14] 孙加源, 郭卫刚, 贲勇, 等. 姜黄素和地塞米松对大鼠移植肺缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华器官移植杂志, 2007, 28(7): 395-399.

(收稿:2013-04-13 修回:2014-04-28)

2014 中国医师协会中西医结合医师大会征文通知

大会名誉主席: 张雁灵

大会主席: 陈可冀

大会副主席: 唐旭东 陈香美 黄光英 刘献祥 张敏州 郑锦 蔡定芳 穆大伟

大会执行主席: 唐旭东 陈香美 蔡定芳 刘勤社

主题: 医学伦理, 医疗质量

日期: 2014 年 10 月 24-26 日

地点: 陕西西安宾馆

征文内容: 医学人文、临床医学、循证医学、医学研究等(具体要求请浏览网站: <http://zxyjh.cmda.org.cn>)

征文截稿日期: 2014 年 10 月 20 日

要求: 报送电子版文件, E-mail: zxyjh2014@qq.com

联系人: 刘龙涛, 李浩, Tel: 010-62835091, 62835089