



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2022.11.013

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.11.013

· 临床基础研究 ·

姜黄素对系统性红斑狼疮小鼠氧化应激的影响及其保护作用

刘志勇 褚爱春

[摘要] **目的** 探讨姜黄素对系统性红斑狼疮(SLE)小鼠氧化应激的影响及其保护作用。**方法** 将 20 只 BALB/c 小鼠随机分为正常组(10 只)和正常干预组(10 只);20 只 MRL/lpr 小鼠随机分为模型组(10 只)和模型干预组(10 只)。正常组和模型组小鼠不做任何处理,正常干预组和模型干预组小鼠采用姜黄素 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,连续 4 周。然后将 4 组小鼠用 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉,用 1 ml 空针于心尖部穿刺采血处死小鼠。处死之前收集 4 组小鼠 24 h 尿液。检测 4 组小鼠血清氧化应激相关指标[一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)]、抗双链 DNA(ds-DNA)抗体、24 h 尿蛋白水平并进行比较。**结果** 与正常组比较,模型组小鼠血清 NO、MDA、抗 ds-DNA 抗体及 24 h 尿蛋白水平明显升高,而血清 SOD 和 GSH-PX 水平则明显下降($P < 0.01$)。与模型组比较,模型干预组小鼠血清 NO、MDA、抗 ds-DNA 抗体及 24 h 尿蛋白水平明显下降,而血清 SOD 和 GSH-PX 水平则明显升高($P < 0.05$)。正常组和正常干预组小鼠上述指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 姜黄素能明显减轻 SLE 小鼠的氧化应激反应,发挥抗氧化保护作用。

[关键词] 姜黄素; 系统性红斑狼疮; 氧化应激; MRL/lpr 小鼠

[中图分类号] R593.24

[文献标识码] A

Influence of curcumin on oxidative stress in systemic lupus erythematosus mice and its protective effect Liu Zhiyong, Chu Aichun. Department of Rheumatism Immunity, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

[Abstract] **Objective** To explore the influence of curcumin on oxidative stress in systemic lupus erythematosus (SLE) mice and its protective effect. **Methods** Twenty BALB/c mice were randomly divided into normal group ($n = 10$) and normal intervention group ($n = 10$). Twenty MRL/lpr mice were randomly divided into model group ($n = 10$) and model intervention group ($n = 10$). Mice in normal group and model group did not do any treatment. Mice in normal intervention group and model intervention group were given curcumin $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ by gavage for 4 weeks. Then, mice in 4 groups were anesthetized with intraperitoneal injection of 4% chloric hydrate and were sacrificed by puncture at the apex of heart with a 1 ml empty needle. 24 h urine was collected from mice in 4 groups before they were killed. Serum oxidative stress related indexes [nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), antioxidant indexes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX)], anti-double stranded DNA (ds-DNA) antibody, 24 h urinary protein levels were detected and compared among mice of 4 groups. **Results** Compared with normal group, serum NO, MDA, anti-ds-DNA antibody and 24 h urinary protein levels in model group were significantly increased, while serum SOD and GSH-PX levels were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, serum NO, MDA, anti-ds-DNA antibody and 24 h urinary protein levels in model intervention group were significantly decreased, while serum SOD and GSH-PX levels were significantly increased ($P < 0.05$). There were no significant difference of above indexes between normal group and normal intervention group ($P > 0.05$). **Conclusion** Curcumin can significantly alleviate the oxidative stress response of SLE mice and play an antioxidant protective role.

[Key words] Curcumin; Systemic lupus erythematosus; Oxidative stress; MRL/lpr mice

系统性红斑狼疮(SLE)是一种自身免疫性疾病,其特点是患者体内存在大量自身抗体,特别是抗核抗

体,会导致肾脏、肺和心脏等多器官损伤^[1-2]。目前认为 SLE 的病因是多因素的,包括遗传、激素和环境等,但其分子机制尚不明确^[3]。SLE 患者和动物模型的研究表明氧化应激在 SLE 发病中起重要作用^[1]。活性氧自由基(ROS)的大量产生和氧化还原状态改变可能

是 SLE 产生自身抗体和各种临床特征的重要因素^[4]。姜黄素是从植物姜黄中提取的一种多酚化合物,据报道其可减轻炎症,抑制自身免疫反应,是一种安全高效的抗炎和抗氧化药物^[5-7]。既往研究结果表明姜黄素可通过上调或下调相关基因的表达来诱导其产生抗氧化酶,从而改善氧化应激,发挥抗氧化作用^[8-9]。目前发现姜黄素对系统性硬化症^[10]、类风湿关节炎^[11]等多种疾病具有良好的治疗效果。本研究采用姜黄素对 SLE 小鼠模型进行干预,观察小鼠血清氧化与抗氧化应激指标的变化,探讨姜黄素对 SLE 的抗氧化效果及其保护作用。

材料与方法

1. 材料:6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠和 MRL/lpr 小鼠各 20 只,均购自于中国科学院上海实验动物中心,在有正常食物和水的环境中适应性饲养 1 周,室温 22~25℃,白天/黑夜 12 h 循环。姜黄素购自美国 Sigma-Aldrich 公司,丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)检测试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司,一氧化氮(NO)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司,小鼠抗双链 DNA(ds-DNA)抗体检测试剂盒购自上海瑞番生物科技有限公司,水合氯醛晶体由武汉大学人民医院药剂科提供。

2. 方法

(1)动物分组和干预措施:将 20 只 BALB/c 小鼠随机分为正常组 10 只和正常干预组 10 只;将 20 只 MRL/lpr 小鼠随机分为模型组 10 只和模型干预组 10 只。正常组和模型组小鼠不做任何处理。正常干预组和模型干预组小鼠用混合有姜黄素($500\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)的玉米油 0.5 ml 灌胃,连续 4 周。姜黄素用量根据参考文献^[12]按体重换算确定。

(2)标本采集:按照上述措施处置 4 周后,用腹腔注射 4% 水合氯醛的方法麻醉小鼠,打开胸腔,直视下用 1 ml 空针注射器于心尖部采血 0.5~1.0 ml,常规离心 5 min,吸取上层血清置于试剂管中,于 -80℃ 冰箱冻存备用。在动物处死前 1 天留取尿液标本,每只小鼠分别放在 1 个代谢笼中,收集 24 h 尿液,标本置于 -20℃ 冰箱保存用于总尿蛋白排泄分析。

(3)血清氧化应激相关指标水平测定:取室温复融的上清液 0.1 ml,采用硝酸还原酶法测定 NO 水平,按试剂盒操作步骤混匀标本,于 550 nm 波长处读取各标本 OD 值,然后计算各样本 NO 水平。MDA 水平测定是基于分光光度法测定硫代巴比妥酸(TBA)和 MDA 形成的粉红色产物,取 1 ml 上清液,加入 75 μl 0.10 M

乙二胺四乙酸(EDTA)和 250 μl 的 1% TBA 溶液,沸水浴 15 min,于 532 nm 处测定 OD 值,根据试剂盒说明书计算 MDA 水平。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 水平,根据试剂盒操作要求处置样品,于 550 nm 波长处测定各标本 OD 值,计算 SOD 水平。采用化学比色法测定 GSH-PX 水平,于 412 nm 处测定各标本 OD 值,计算 GSH-PX 水平。

(4)小鼠抗 ds-DNA 抗体水平测定:采用双抗夹心 ELISA 法测定血清抗 ds-DNA 抗体水平,将生物素标记抗体加入待测血清标本中,37℃ 温箱孵育 1 h,洗净后加入 80 μl 亲和链酶素-辣根过氧化物酶(HRP),振荡混匀,在 37℃ 温箱孵育 30 min;洗净后加入 50 μl A、B 底物,摇匀,继续在 37℃ 温箱孵育后立刻加入终止液,于 450 nm 波长处计算结果代表抗 ds-DNA 抗体水平。

(5)小鼠 24 h 尿蛋白水平测定:根据试剂盒说明书按步骤进行测定,采用酶标仪(Bio-rad, Japan)于 450 nm 波长处测定各管 OD 值,计算各标本 24 h 尿蛋白水平。

3. 统计学处理:应用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

4 组小鼠血清氧化应激相关指标、抗 ds-DNA 抗体及 24 h 尿蛋白水平比较:4 组小鼠血清 NO、MDA、SOD、GSH-PX、抗 ds-DNA 抗体及 24 h 尿蛋白水平比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组小鼠血清 NO、MDA、抗 ds-DNA 抗体及 24 h 尿蛋白水平均明显升高,而血清 SOD 和 GSH-PX 水平均明显下降($P < 0.01$)。与模型组比较,模型干预组小鼠血清 NO、MDA、抗 ds-DNA 抗体及 24 h 尿蛋白水平均明显下降,而血清 SOD 和 GSH-PX 水平均明显升高($P < 0.05$)。正常组和正常干预组小鼠上述指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

讨 论

目前研究认为氧化应激可能是 SLE 病理特征中细胞死亡信号异常暴露和反应的基础。SLE 患者免疫系统异常激活,氧化应激触发凋亡和坏死细胞释放核碎片,刺激抗核抗体产生,进而引发炎症和器官损伤^[13]。SLE 的发生发展与 ROS 的过度产生及无效清除有关。研究表明,SLE 患者血液中存在不同成分的 ROS 生成增加或细胞内还原性谷胱甘肽水平降低,而使用抗氧化剂恢复氧化还原平衡或通过摄入抗氧化营养素(如

表 1 4 组小鼠血清氧化应激相关指标、抗 ds-DNA 抗体及 24 h 尿蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	NO(μ mol/L)	MDA(nmol/ml)	SOD(U/ml)	GSH-PX(U/ml)	24 h 尿蛋白(mg)	抗 ds-DNA 抗体(ng/ml)
正常组	35.56 \pm 4.69	5.78 \pm 1.07	71.63 \pm 8.51	185.57 \pm 21.72	2.53 \pm 0.32	2.83 \pm 0.51
正常干预组	34.98 \pm 3.83	5.39 \pm 0.96	73.07 \pm 9.07	187.38 \pm 22.65	2.37 \pm 0.21	2.25 \pm 0.39
模型组	61.73 \pm 8.45 ^a	14.82 \pm 2.36 ^a	42.52 \pm 4.17 ^a	109.16 \pm 10.22 ^a	14.55 \pm 1.33 ^a	19.82 \pm 2.55 ^a
模型干预组	43.51 \pm 5.33 ^b	9.35 \pm 1.72 ^b	65.81 \pm 7.32 ^b	160.39 \pm 13.65 ^b	10.26 \pm 0.97 ^b	12.75 \pm 1.97 ^b
F 值	13.691	21.633	10.691	12.504	151.702	79.322
P 值	0.002	<0.001	0.004	0.002	<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

维生素 A、C、胡萝卜素等)减少氧化应激的影响,可减轻 SLE 患者各种氧化应激诱导的并发症^[1]。

研究发现姜黄素是一种强效的抗氧化剂,其正甲基提供的氢可与 ROS 发生氧化反应,有助于清除循环系统中的 ROS^[14]。姜黄素还能增加抗氧化酶的表达,如 SOD、GSH-PX 和过氧化氢酶等,且姜黄素能通过激活细胞内的抗氧化基因来清除 ROS,保护细胞免受氧化应激诱导的损伤,从而降低细胞毒性,减弱继发效应^[15]。既往动物实验已证实姜黄素对肝脏和心脏等器官具有明显的抗氧化保护作用。在 Macías-Pérez 等^[16]的一项关于肝损伤的动物实验中发现,姜黄素能够逆转仓鼠肝实质损伤。Naghdi 等^[17]研究也发现姜黄素具有较强的抗氧化性能,有助于改善 1 型糖尿病诱导的氧化应激和调节糖尿病诱导的心脏组织损伤。

在氧化应激损伤生物膜后,MDA 能够反映不饱和脂肪酸过氧化的情况,而过量表达的 NO 能使微小血管渗透性增高,破坏局部组织器官微循环。发挥抗氧化作用的 SOD 可氧化还原 ROS,维持机体氧化应激平衡;GSH-PX 则可清除氧化应激产生的过氧化物,保护机体免受损伤^[18]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清 NO 和 MDA 水平明显升高,而血清 SOD 和 GSH-PX 水平明显降低,表明 SLE 小鼠体内存在氧化应激。同时,我们还发现模型组小鼠血清抗 ds-DNA 抗体及 24 h 尿蛋白水平与正常组相比也明显升高,提示氧化应激与 SLE 的病情进展及肾脏损伤紧密相关。然而用姜黄素干预 4 周后,模型干预组小鼠血清 SOD 和 GSH-PX 水平均高于模型组,而 NO 和 MDA 水平均低于模型组,表明姜黄素能够抑制 SLE 小鼠的氧化应激反应。此外,本研究还发现,与模型组比较,模型干预组小鼠血清抗 ds-DNA 抗体和 24 h 尿蛋白水平明显降低,表明姜黄素对 SLE 模型小鼠有明显的治疗效果。这与既往研究结果一致,Elena 等^[12]发现姜黄素能调节 SLE 小鼠的自身免疫活动,并能减轻肾损伤;Abdul Kadhim 等^[19]在环孢素 A 所致肾损伤的动物实验中发现,姜黄素可明显降低大鼠血清 MDA 水平,显著提高抗氧化酶活性,减轻环孢素 A 的肾毒性,并使改变的肾脏形态恢复正常。正常干预组和正常组小鼠

上述各项指标比较差异均无统计学意义,表明姜黄素对正常小鼠无明显不良反应。

综上所述,SLE 模型小鼠存在氧化应激的失衡,而姜黄素干预减轻了 SLE 小鼠的氧化应激反应,改善了 SLE 相关的肾损伤,发挥了抗氧化保护作用。因此,抗氧化干预可能是 SLE 的有益辅助治疗方式。

参 考 文 献

[1] Shah D, Mahajan N, Sah S, et al. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus[J]. J Biomed Sci, 2014, 21(1): 23-36.

[2] 廖红丽, 刘媛. 系统性红斑狼疮继发间质性肺炎患者的临床及影像学特点分析[J]. 临床内科杂志, 2021, 38(10): 666-669.

[3] 田玉, 马丽艳, 韩玉祥, 等. 抗 C1q 联合 TIGIT 及 ZBTB20 在系统性红斑狼疮中临床诊断价值[J]. 临床军医杂志, 2021, 49(11): 1233-1235.

[4] Lee HT, Wu TH, Lin CS, et al. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-From the viewpoint of oxidative stress and mitochondrial dysfunction[J]. Mitochondrion, 2016, 30(9): 1-7.

[5] Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, et al. Serology of lupus erythematosus: Correlation between immunopathological features and clinical aspects[J]. Autoimmune Dis, 2014, 2014: 321359.

[6] Davidson A, Bethunaickan R, Berthier C, et al. Molecular studies of lupus nephritis kidneys[J]. Immunol Res, 2015, 63(1-3): 187-196.

[7] 张立泽, 王丹丹, 乔翠霞, 等. 姜黄素及白藜芦醇对溃疡性结肠炎小鼠巨噬细胞的影响和机制[J]. 中华炎性肠病杂志, 2020, 4(2): 131-138.

[8] 孙菁茹, 冯玉超. 姜黄素生物学功能的研究进展[J]. 农产品加工, 2020, 7(8): 67-71.

[9] 张琳, 谭劲, 刘一平, 等. 姜黄素提取物对 OSF 模型大鼠 TGF- β 1、IL-1 和 Bcl-2 的影响及相关机制探讨[J]. 疑难病杂志, 2021, 20(11): 1152-1156.

[10] Negar G, Naser-Aldin L, Amir HA, et al. Curcumin as a therapeutic candidate for multiple sclerosis: Molecular mechanisms and targets[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12237-12248.

[11] Fatemeh PZ, Sara SZ, Maryam R. Curcumin and rheumatoid arthritis: A systematic review of literature[J]. Int J Clin Pract, 2021, 75(10): e14280.

[12] Elena LD, Erin BT, Hannah RT, et al. Curcumin attenuates autoimmunity and renal injury in an experimental model of systemic lupus erythematosus[J]. Physiol Rep, 2020, 8(13): e14501.

[13] Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus[J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(11): 674-686.

[14] Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent[J]. Molecules, 2014, 19(12): 20091-20112.

[15] Mariana YM, Marina NM, Sandra LM, et al. Protective Effect of Curcumin against Doxazosin and Carvedilol Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 6085515.

[16] Macías-Pérez JR, Vázquez-López BJ, Muñoz-Ortega MH, et al. Curcumin and α/β -Adrenergic Antagonists Cotreatment Reverse Liver Cirrhosis in Hamsters: Participation of Nrf-2 and NF- κ B[J]. J Immunol Res, 2019, 30(4): 3019794.

[17] Naghdi A, Goodarzi MT, Karimi J, et al. Effects of curcumin and metformin on oxidative stress and apoptosis in heart tissue of type 1 diabetic rats[J]. J Cardiovasc Thorac Res, 2022, 14(2): 128-137.

[18] Yilmaz MI, Romano M, Basarali MK, et al. The Effect of Corrected Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction on Fmd Levels in Patients with Selected Chronic Diseases: A Quasi-Experimental Study[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9018.

[19] Abdul Kadhim SA, Ghafil FA, Majeed SA, et al. Nephroprotective effects of curcumin against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats model[J]. Wiad Lek, 2021, 74(12): 3135-3146.