

姜黄素对糖尿病脑病大鼠氧化应激及海马 iNOS 表达的影响

陈艳瑜, 魏倩萍*, 胡义平

重庆医科大学附属第一医院老年科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨糖尿病脑病与氧化应激和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的关系, 及姜黄素治疗的效果和机制。
方法 大鼠随机分为正常对照组(CN)、正常姜黄素组(Cur)、糖尿病组(DM)、糖尿病+姜黄素治疗组(DM+Cur), 以注射链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型, Cur组和DM+Cur组采用Cur(60 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃给药。12周后测定海马组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)含量, RT-PCR和免疫组化方法检测海马iNOS mRNA表达水平及iNOS免疫阳性细胞平均光密度值(MOD)值。**结果** 与CN组相比, DM组海马组织SOD和CAT活性明显降低($P<0.01$), NO和MDA含量明显增加($P<0.01$), 海马组织iNOS mRNA及蛋白表达较CN组明显增加($P<0.01$); 与DM组相比, DM+Cur组SOD和CAT活性明显增加($P<0.01$), NO和MDA含量明显降低($P<0.01$), 海马组织iNOS mRNA及MOD值明显降低($P<0.01$)。**结论** 糖尿病脑病与氧化应激水平及海马组织iNOS表达升高相关; 姜黄素可能通过抗氧化活性及下调iNOS表达, 而对糖尿病脑病起保护作用。

[关键词] 姜黄素; 糖尿病脑病; 氧化应激; 海马; 诱导型一氧化氮合酶

[中图分类号] R 587.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1300-05

Effect of curcumin on oxidative stress and hippocampus iNOS expression in diabetic encephalopathy rats

CHEN Yan-yu, WEI Qian-ping*, HU Yi-ping

Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relation of diabetic encephalopathy with oxidative stress and hippocampus expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS) in rats and to study the therapeutic effects of curcumin. **Methods** Diabetes mellitus was induced by injection of Streptozotocin in rats. The experiment animals were randomly divided into control group, diabetic group, diabetes plus curcumin group and control plus curcumin group; animals in the latter two groups received 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹ curcumin treatment. Superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), malondialdehyde(MDA) and nitric oxide(NO) in the hippocampal tissues were measured 12 weeks after treatment. The expression of iNOS mRNA and the mean optical density (MOD) of immunoreactive neurons were evaluated by RT-PCR and immunohistochemistry method, respectively. **Results** Compared with the control group, diabetic group had significantly lower activities of SOD and CAT, higher contents of NO and MDA, and increased expression of iNOS mRNA and protein in the hippocampal tissues ($P<0.01$). Compared with the diabetic group, diabetic plus curcumin group had significantly higher activities of SOD and CAT, lower contents of NO and MDA and decreased expression of iNOS mRNA and the MOD of immunoreactive neurons in hippocampus ($P<0.01$). **Conclusion** Diabetic encephalopathy is associated with oxidative stress and increased expression of iNOS; curcumin may protect diabetic encephalopathy by inhibiting oxidative stress and down-regulating the iNOS expression.

[Key words] curcumin; diabetic encephalopathy; oxidative stress; hippocampus; inducible nitric oxide synthase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(12):1300-1304]

糖尿病时期糖代谢紊乱可损害中枢神经系统, 这一损害被称之为“糖尿病脑病”。其以认知功能受损为特征, 同时伴有大脑结构、神经生理及神经精神等方面的病理性改变^[1], 发病机制尚不明确。一氧化氮(NO)是一种重要的多功能内源性气体自由基, 作为一种神经递质参与脑内多种生理功能, 研究提

示 NO 通路可能通过氧化应激途径参与了糖尿病认知功能障碍发病机制^[2-5]。本实验欲通过观察糖尿病大鼠海马区诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达, 及 NO 和氧化应激水平的变化, 探讨其在糖尿病脑病中的作用; 并研究姜黄素对糖尿病性脑病的保护作用及机制, 为将其应用于临床提供实验依据。

[收稿日期] 2010-09-06 **[接受日期]** 2010-10-28

[作者简介] 陈艳瑜, 硕士生. E-mail: cyy3694@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-68485555, E-mail: wqp68894940@163.com

1 材料和方法

1.1 动物与试剂 清洁级健康雄性 SD 大鼠(8 周龄, 体质量 220~250 g), 购自重庆医科大学实验动物中心。链脲佐菌素(STZ)、姜黄素(Sigma, 美国)。NO、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所)。iNOS 抗体、SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德)。iNOS 引物及 β -actin 由上海生工生物工程技术有限公司设计合成。

1.2 造模与分组 实验大鼠适应性喂养 1 周, 禁食 12 h, 按 60 mg/kg 单次腹腔注射 STZ。72 h 后尾静脉采血测血糖, 血糖浓度 >16.7 mmol/L 视为糖尿病模型建立成功; 将成模大鼠随机分成糖尿病组(DM)和糖尿病+姜黄素治疗组(DM+Cur), 每组 10 只。另随机选取正常大鼠作为正常对照组(CN)和正常姜黄素组(Cur), 每组 10 只, 60 mg/kg 单次腹腔注射缓冲液。姜黄素用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成混悬液, DM+Cur 组和 Cur 组采用 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃给药, 另两组给以等量 0.5% 羧甲基纤维素钠灌胃, 为期 12 周。实验期间大鼠单笼饲养, 自由进食饮水, 不使用胰岛素及其他降糖药物。

1.3 取材 采用 10% 水合氯醛(3 ml/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 经心脏灌注生理盐水约 200 ml 后, 冰盘上迅速断头取脑, 用冰生理盐水清洗。取一侧脑组织 4% 多聚甲醛固定过夜, 行 SABC 法作 iNOS 免疫组化染色, 分离另一侧海马组织, -80°C 保存, 检测海马内 iNOS mRNA 的表达及相关生化指标。各组大鼠于处死前尾静脉取血测血糖值。

1.4 生化指标检测 取海马组织制备 10% 组织匀浆, 离心, 取上清, 按试剂盒说明书测定 NO、MDA 含量和 SOD、CAT 活性。蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定。

1.5 免疫组化检测 iNOS 表达 切片脱蜡, 3% H_2O_2 灭酶后热修复抗原, 5% BSA 封闭, 滴加一抗 iNOS (1:100) 4°C 过夜, 滴加生物素化二抗羊抗兔 IgG 37°C 孵育 20 min, SABC 孵育 20 min, DAB 显色, 脱水, 透明, 封片。阴性对照用 PBS 代替一抗。利用 Image pro plus 6.0 图像分析软件观察大鼠海马 CA3 区 iNOS 免疫阳性神经元的平均光密度值(MOD)。

1.6 RT-PCR 检测 iNOS mRNA 表达 取 100 mg

海马组织置于组织匀浆器内, 加 TRIzol 1 ml, 参照说明书提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 常规 PCR 扩增。 β -actin 上游引物: 5'-TGA CCC AGA TCA TGT TTG AG-3', 下游引物: 5'-TCA TGA GGT AGT CAG TCA GG-3', 产物为 210 bp; iNOS 上游引物: 5'-ACG AGG TGT TCA GCG TGC TCC AC-3', 下游引物: 5'-CCA CAA TAG TAC AAT ACT ACT TGG-3', 产物为 394 bp。 β -actin 扩增条件为 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 30 个循环, 72°C 再延伸 10 min。iNOS 退火温度为 58°C , 余同 β -actin。取 5 μl 产物作 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统拍照观察, 用 Quantity One 软件对条带的灰度进行分析。将实验组和对照组条带的平均灰度值与相应的 β -actin 条带的平均灰度值的比值进行比较。

1.7 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行单因素方差分析, 数据用 SPSS 13.0 统计软件处理, 检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般情况 实验过程中, DM 组大鼠出现明显的多饮、多食、多尿及体质量下降, 毛色暗黄, 后期精神较差, 行动迟缓。DM+Cur 组大鼠“三多一少”症状改善, 毛色偏黄, 精神较好, 无明显的行动迟缓。第 12 周时, 同 CN 组比较, DM 组和 DM+Cur 组体质量降低($P < 0.05$), 血糖值均升高($P < 0.05$); DM 组和 DM+Cur 组体质量、血糖无明显差异。姜黄素对正常大鼠体质量、血糖无影响。详见表 1。

2.2 各组大鼠海马组织 NO、MDA 含量及 SOD、CAT 活性 与 CN 组相比, DM 组大鼠 NO 和 MDA 含量明显增加, SOD 和 CAT 活性明显降低($P < 0.01$); 而 DM+Cur 组 NO 和 MDA 含量明显低于 DM 组, SOD 和 CAT 活性明显高于 DM 组($P < 0.01$)。姜黄素对正常大鼠 NO、MDA 含量及 SOD、CAT 活性无影响。见表 2。

2.3 各组大鼠海马 CA3 区 iNOS 的表达 CN 组大鼠海马见少量 iNOS 免疫阳性细胞, MOD 值低; DM 组 CA3 区 iNOS 免疫阳性细胞明显增多, 胞质呈棕黄色, MOD 值与 CN 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); DM+Cur 组 CA3 区 iNOS 免疫阳性细胞减少, 胞质呈黄色, MOD 值与 DM 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。姜黄素对正常大鼠海马 iNOS 的表达无影响。见图 1、表 3。

表 1 各组大鼠体质量、血糖水平

Tab 1 Body mass and blood glucose levels in each group

(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Group	Body mass m/g		Blood glucose $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	
	0 week	12 weeks	0 week	12 weeks
CN	259.79±23.03	448.94±41.08	5.70±0.61	5.79±0.70
Cur	260.23±21.23	439.76±22.65	5.62±1.25	5.68±0.96
DM	265.45±17.77	220.62±18.94*	24.45±2.67*	29.23±1.57*
DM+Cur	255.78±22.39	243.63±21.38*	23.94±4.03*	27.59±2.67*

CN: Control group; Cur: Control treated with curcumin group; DM: Diabetic group; DM+Cur: Diabetic treated with curcumin group. * $P < 0.05$ vs CN group

表 2 各组大鼠海马组织 NO、MDA 含量及 SOD、CAT 活性

Tab 2 Nitric oxide, malondialdehyde and antioxidant enzyme levels in hippocampus tissues of each group

(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Group	NO	MDA	SOD	CAT
	$m_B/(\mu mol \cdot g^{-1})$	$m_B/(nmol \cdot mg^{-1})$	$z_B/(U \cdot mg^{-1})$	$z_B/(U \cdot mg^{-1})$
CN	1.52±0.05	4.66±0.12	111.08±2.00	5.23±0.14
Cur	1.49±0.08	4.57±0.32	107.32±1.98	5.16±0.21
DM	3.06±0.14**	10.36±0.26**	75.70±2.38**	2.37±0.14**
DM+Cur	1.69±0.09** $\Delta\Delta$	8.37±0.17** $\Delta\Delta$	88.25±2.59** $\Delta\Delta$	3.66±0.16** $\Delta\Delta$

CN: Control group; Cur: Control treated with curcumin group; DM: Diabetic group; DM+Cur: Diabetic treated with curcumin group. NO: Nitric oxide; MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase. ** $P < 0.01$ vs CN group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs DM group

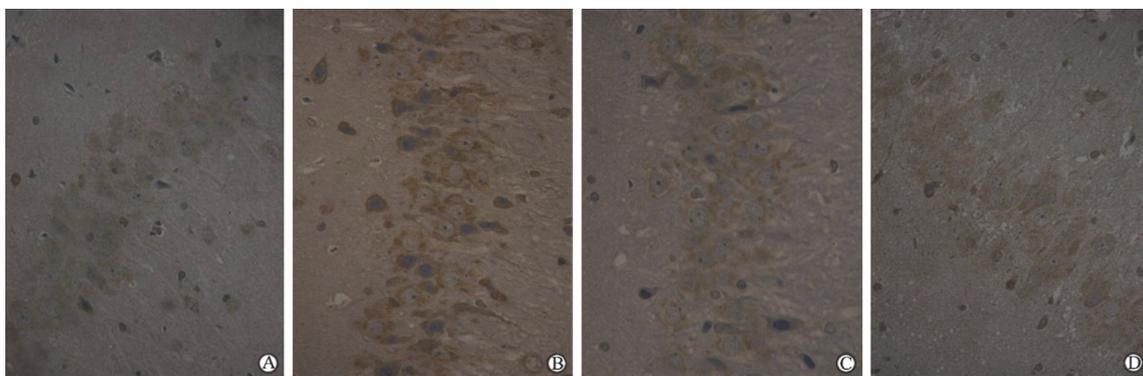


图 1 免疫组化检测海马 CA3 区 iNOS 的表达

Fig 1 Expression of iNOS in hippocampus CA3 region as detected by immunohistochemistry

A: Control group(CN); B: Diabetic group(DM); C: Diabetic treated with curcumin group (DM+Cur); D: Control treated with curcumin group (Cur). Original magnification: $\times 400$

表 3 各组大鼠海马 iNOS mRNA 的表达及免疫阳性细胞的 MOD 值

Tab 3 Expression of iNOS mRNA and MOD in immunoreactive neurons of rat hippocampus tissues in each group

(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Group	iNOS (mRNA/ β -actin)	Immunoreactive neurons (MOD)
CN	0.30±0.02	0.09±0.01
Cur	0.28±0.03	0.08±0.02
DM	0.65±0.01**	0.18±0.03**
DM+Cur	0.41±0.02** $\Delta\Delta$	0.12±0.01** $\Delta\Delta$

CN: Control group; Cur: Control treated with curcumin group; DM: Diabetic group; DM+Cur: Diabetic treated with curcumin group. MOD: Mean optical density. ** $P < 0.01$ vs CN group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs DM group

2.4 各组大鼠海马 iNOS mRNA 的表达 CN 组大鼠海马 iNOS mRNA 表达量低。与 CN 组相比, DM 组大鼠海马组织 iNOS mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.01$); 和 DM 组比较, DM+Cur 组大鼠海马组织 iNOS mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.01$)。姜黄素对正常大鼠海马 iNOS mRNA 的表达无影响。见图 2、表 3。

3 讨论

氧化应激在糖尿病中枢神经系统并发症中发挥重要作用。氧化应激指细胞或组织内的活性氧化物(ROS)的产生超出了抗氧化能力,从而导致组织

损害的一种状态。糖尿病糖代谢紊乱引起葡萄糖的有氧化、蛋白的非酶糖基化作用加强及脂代谢异常为 ROS 产生增加的主要原因。ROS 的产生过多可导致神经元线粒体内膜上的脂类、蛋白质和线粒体 DNA 损害,使得细胞内能量衰竭和细胞死亡,引起认知功能障碍^[4,6]。

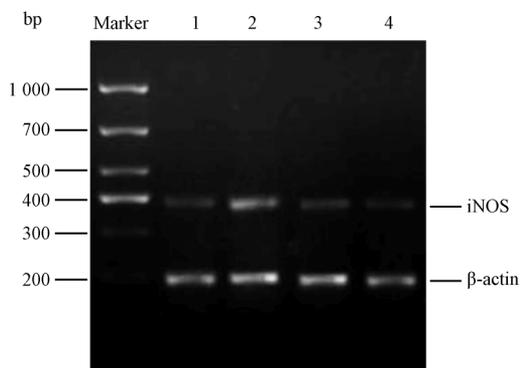


图 2 各组大鼠海马组织 iNOS mRNA 的表达

Fig 2 Expression of iNOS mRNA

in rat hippocampus tissues of each group

1: Control group(CN); 2: Diabetic group(DM); 3: Diabetic treated with curcumin group (DM+Cur); 4: Control treated with curcumin group (Cur)

近年来,活性氮作为构成氧化应激的新途径备受关注。它来源于 NO,其中以过氧亚硝酸盐阴离子(OONO⁻)的活性和毒性最强。NO 是由左旋精氨酸和分子氧在一氧化氮合酶(NOS)催化下生成的一种小分子气体自由基。Hink 等^[7]发现糖尿病时 NOS 活性增强,产生过量的 NO 与超氧阴离子(O₂⁻)反应生成 OONO⁻,促进了氧化损害。OO-NO⁻是一种强氧化剂,在酸性条件下能转变为性质活泼的反式结构,而发挥氧化应激的作用,可有效地氧化蛋白质巯基和铁硫(Fe/S)中心酪氨酸残基,使许多蛋白或酶失活,影响代谢,抑制呼吸酶,破坏线粒体结构,使 DNA 链断裂,并可启动脂质过氧化,导致神经元的死亡。Mastrocola 等^[2]发现 ROS 增加的同时,糖尿病大鼠大脑线粒体内 NO 及 NOS 表达增加。Celik 等^[8]发现糖尿病大鼠大脑 iNOS mRNA 表达增加,NO 含量增加,抗氧化酶 SOD、CAT 等活性降低。糖尿病时抗氧化酶发生糖化或氧化,导致体内 SOD、CAT 等抗氧化酶活性下降,清除自由基的能力下降,MDA 等反映氧化应激水平的脂质过氧化物含量升高^[9]。本实验糖尿病组大鼠海马 NO 和 MDA 含量明显增加,抗氧化酶 SOD、CAT 活性下降,提示 NO 加强了氧化应激反应。本

实验还发现正常对照组大鼠海马 iNOS 含量少,iNOS mRNA 表达微弱,糖尿病组 iNOS 表达明显增高。iNOS 在正常情况下很少表达,糖尿病时 iNOS 表达增多,导致 NO 生成增加。内源性或外源性 NO 的过量产生和释放具有细胞毒性和细胞抑制作用,过量产生的 NO 可通过活性氮、氧化应激效应对脑组织造成损害。而糖尿病时氧化应激引起 OO-NO⁻生成过多,激活了对氧化剂敏感的 NF-κB 转录因子,使 iNOS 表达增多^[10-11]。两者相互作用导致的脑组织损害可能是导致糖尿病脑病的发病机制之一。

姜黄素为姜黄的主要活性成分,属植物多酚,是一种天然抗氧化剂,能清除各种自由基,对超氧阴离子、NO 等都有很强的清除能力,同时也是一种 iNOS 抑制剂。Ataie 等^[12]研究发现姜黄素能保护神经,在糖尿病脑病中发挥保护作用。本实验发现给予姜黄素治疗后,糖尿病大鼠海马 NO 和 MDA 含量降低,SOD 和 CAT 活性增加,海马 iNOS 含量及 iNOS mRNA 表达增加。提示姜黄素能够提高抗氧化酶活性,减少脂质过氧化产物的堆积,降低 iNOS 的表达,对糖尿病大鼠海马组织可能具有保护作用。Kuhad 等^[1]发现姜黄素能显著改善糖尿病大鼠血糖、体质量,张卫国等^[13]发现姜黄素对糖尿病大鼠血糖、体质量无显著影响,本实验发现姜黄素治疗后糖尿病大鼠的血糖、体质量无明显改善,其效果的差异可能与姜黄素的浓度和时间依赖性有关,其作用机制有待进一步研究。

综上所述,糖尿病脑病大鼠活性氮产物显著增高,表明活性氮产物通过氧化应激途径参与了糖尿病脑病发病过程。经过姜黄素治疗后,抗氧化酶活性增强,脂质过氧化产物降低,iNOS 表达被抑制。表明姜黄素可能通过清除 NO,下调 iNOS 表达,抑制氧化应激反应,增强自由基清除这一途径对糖尿病脑病起保护作用。

[参考文献]

- [1] Kuhad A, Chopra K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences[J]. *Euro J Pharmacol*, 2007, 576: 34-42.
- [2] Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, et al. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats[J]. *J Endocrinol*, 2005, 187: 37-44.
- [3] Ponnuswamy P, Ostermeier E, Schrottler A, Chen J, Huang P L, Ertl G, et al. Oxidative stress and compartment of gene ex-

- pression determine proatherosclerotic effects of inducible nitric oxide synthase[J]. *Am J Pathol*,2009,174:2400-2410.
- [4] Maiese K,Chong Z Z,Shang Y C. Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress[J]. *Curr Med Chem*,2007,14:1729-1738.
- [5] Stadler K,Jenei V,von Bolcschazy G,Somogyi A,Jakus J. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes[J]. *Free Radic Biol Med*,2003,35:1240-1251.
- [6] Shrilatha B,Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat[J]. *Int J Androl*,2007,30:508-518.
- [7] Hink U,Li H,Mollnau H,Oelze M,Matheis E,Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus[J]. *Circ Res*,2001,88:E14-E22.
- [8] Celik S,Erdogan S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats[J]. *Mol Cell Biochem*,2008,312:39-46.
- [9] Xue H Y,Jin L,Jin L J,Li X Y,Zhang P,Ma Y S,et al. Aucubin prevents loss of hippocampal neurons and regulates antioxidative activity in diabetic encephalopathy rats[J]. *Phytother Res*,2009,23:980-986.
- [10] 曾龙驿,舒同,林可意,穆攀伟,张国超,陈燕铭,等. 伊贝沙坦对糖尿病大鼠肾氧化应激、NF- κ B活性和ICAM-1 mRNA表达的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*,2008,29:402-406.
- [11] 匡荣,孙意国,郑筱祥,倪维芳,朱社敏. 硫辛酸通过抑制NF- κ B-iNOS-NO信号保护氧化应激诱导的PC12细胞损伤[J]. *中国现代应用药学*,2009,26:538-541.
- [12] Ataie A,Sabetkasaei M,Haghparast A,Moghaddam A H,Kazeminejad B. Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, Curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat[J]. *Pharmacol Biochem Behav*,2010,96:378-385.
- [13] 张卫国,韩刚,王彬,阎林奇,翟冠钰,范颖. 姜黄素固体分散体对2型糖尿病大鼠氧化应激的影响[J]. *中国现代应用药学*,2010,27:13-15.

[本文编辑] 孙岩

· 消 息 ·

《军医大学学报(英文版)》征稿征订启事

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)是由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)共同主办、国内外公开发行人(CN 31-1002/R, ISSN 1000-1948)的高级医药学综合性英文学术刊物,1986年6月创刊。本刊主要报道基础、临床、预防、军事医学、药学和中国医学等领域的最新科研成果、新理论、新技术和新方法。辟有专家论坛、基础研究、临床研究、经验交流、短篇报道、个案报告等栏目。

本刊为中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中国期刊网、万方数据库和中文科技期刊数据库等国内所有重要检索系统,已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstract Journal)和波兰《哥白尼索引》(IC)等国际知名检索系统收录,期刊全文已进入爱思唯尔(Elsevier)科技出版集团所属的 ScienceDirect 全文数据库(<http://www.elsevier.com/locate/jmcpla>)。

为了弘扬科研创新精神,推动医学事业发展,促进海内外学术交流,本刊面向全国和海外作者征稿。

来稿要求:来稿请附中文的文题、作者姓名、单位名称及较详细的中文摘要和3~8个关键词,参考文献放在文末。来稿务必写清个人通讯地址及联系电话,编辑部在接到稿件30日内通知作者稿件是否被采用。

刊发周期:由全国相关学科领域的知名专家和权威人士进行审稿,对审稿通过的论文2~6个月内安排刊出。国家、省部级基金资助和重点攻关项目稿件优先发表。

本刊为双月刊,A4开本,80g铜版纸彩色印刷,每期定价15元,全年90元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-725),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地 址:上海市翔殷路800号《军医大学学报(英文版)》编辑部,邮编:200433

联系人:徐佳

电 话:021-81870788 转 818 分机

E-mail: jydxxb@yahoo.com.cn