

姜黄素对小鼠颅脑创伤后大脑皮质凋亡自噬和组织细胞修复的影响

王尧淇 付海洋 常盼

【摘要】目的 探讨姜黄素(curcumin)对颅脑创伤小鼠大脑皮质神经元凋亡、自噬及神经修复的治疗作用。**方法** 90只健康雄性小鼠随机分为空白对照组(12只)、假模型组(26只)、颅脑创伤+生理盐水组(TBI+NaCl组,26只,模型制备后30min腹腔注射生理盐水)和颅脑创伤+姜黄素组(TBI+curcumin组,26只,模型制备后30min腹腔注射姜黄素),通过碘化丙啶染色检测神经元凋亡数目、Western blotting法检测凋亡和自噬相关蛋白[B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、激活型Caspase-3和P62、微管相关蛋白1轻链3(MAP1LC3)]表达变化,Cavalieri法测量大脑皮质损伤体积。**结果** 颅脑创伤后48h,小鼠神经元凋亡数目显著增加($t=26.000, P=0.000; t=18.520, P=0.000$),姜黄素治疗后神经元凋亡数目减少($t=3.686, P=0.014$);大脑皮质损伤区凋亡相关蛋白Bcl-2表达降低($t=5.656, P=0.000; t=3.254, P=0.008; t=4.485, P=0.001; t=3.150, P=0.009$)、激活型Caspase-3表达升高($t=8.534, P=0.000; t=3.468, P=0.005; t=8.565, P=0.000; t=2.846, P=0.016$),自噬相关蛋白P62表达降低($t=3.574, P=0.004; t=7.612, P=0.000; t=3.465, P=0.005; t=8.637, P=0.000$)、MAP1LC3-II表达升高($t=7.101, P=0.000; t=7.656, P=0.000; t=6.816, P=0.000; t=9.043, P=0.000$),姜黄素治疗后Bcl-2表达升高($t=3.290, P=0.007$)、激活型Caspase-3表达降低($t=3.520, P=0.005$)、P62表达持续降低($t=3.595, P=0.004$)、MAP1LC3-II表达持续升高($t=4.954, P=0.000$)。颅脑创伤后28d,小鼠大脑皮质损伤体积增加($t=34.813, P=0.000; t=11.172, P=0.000$),姜黄素治疗后大脑皮质损伤体积减少($t=4.525, P=0.003$)。**结论** 姜黄素可通过抑制神经元凋亡活性、增强自噬活性而对颅脑创伤后的神经元发挥保护作用并促进神经修复。

【关键词】 颅脑创伤; 姜黄素; 细胞凋亡; 疾病模型, 动物

Effect of curcumin on autophagy apoptosis and histocytic renovation in mice after traumatic brain injury

WANG Yao-qi¹, FU Hai-yang¹, CHANG Pan²

¹He'nan Wei Shi Forensic Expertise Center, Zhengzhou 450004, He'nan, China

²Central Laboratory, Second Affiliated Hospital, Xi'an Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China

Corresponding author: CHANG Pan (Email: 83646858@qq.com)

【Abstract】 Objective To explore the therapeutic effect of curcumin on neuronal apoptosis, autophagy and neural renovation in cerebral cortex of mice after traumatic brain injury (TBI). **Methods** A total of 90 mice were randomly divided into 4 groups: blank control group (N = 12), sham group (N = 26), TBI + NaCl group (N = 26, NaCl was pretreated by intraperitoneal injection 30 min after TBI) and TBI + curcumin group (N = 26, curcumin was pretreated by intraperitoneal injection 30 min after TBI). Propidium iodide (PI)-labeled cell-counting was used to study the cell protective effect of curcumin. Expression of apoptosis and autophagy related proteins B cell lymphoma (Bcl-2), activated Caspase-3, P62, microtubule-

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2019.08.008

基金项目:陕西省缺血性心血管疾病重点实验室开放基金资助项目(项目编号:2016ZDKF09);陕西省科技厅基金资助项目(项目编号:2018SF-129)

作者单位:450004 郑州,河南唯实司法鉴定中心(王尧淇,付海洋);710038 西安医学院第二附属医院中心实验室(常盼)

通讯作者:常盼,Email:83646858@qq.com

associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3- II) were detected by Western Blotting. The lesion volume of cortex was tested by Cavalieri method. **Results** PI positive cells significantly increased 48 h after TBI ($t = 26.000, P = 0.000; t = 18.520, P = 0.000$), and reduced after curcumin injection ($t = 3.686, P = 0.014$); in cortex lesion area, expression level of apoptosis associated protein Bcl-2 decreased ($t = 5.656, P = 0.000; t = 3.254, P = 0.008; t = 4.485, P = 0.001; t = 3.150, P = 0.009$), expression level of activated Caspase-3 increased ($t = 8.534, P = 0.000; t = 3.468, P = 0.005; t = 8.565, P = 0.000; t = 2.846, P = 0.016$), expression level of autophagy associated protein P62 decreased ($t = 3.574, P = 0.004; t = 7.612, P = 0.000; t = 3.465, P = 0.005; t = 8.637, P = 0.000$), expression level of MAP1LC3- II increased ($t = 7.101, P = 0.000; t = 7.656, P = 0.000; t = 6.816, P = 0.000; t = 9.043, P = 0.000$), curcumin suppressed apoptotic activity by showing higher expression level of Bcl-2 ($t = 3.290, P = 0.007$), lower expression level of activated Caspase-3 ($t = 3.520, P = 0.005$), lower expression level of P62 ($t = 3.595, P = 0.004$), and higher expression level of MAP1LC3- II ($t = 4.954, P = 0.000$). More tissue damage was seen 28 d after TBI ($t = 34.813, P = 0.000; t = 11.172, P = 0.000$) but less tissue damage was seen in TBI + curcumin group ($t = 4.525, P = 0.003$). **Conclusions** Curcumin could inhibit neuronal apoptosis and enhance autophagic activity. Therefore, it may induce neuroprotection and promote neural renovation after traumatic brain injury.

【Key words】 Craniocerebral trauma; Curcumin; Apoptosis; Disease models, animal

This study was supported by Opening Foundation of Shaanxi Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Disease (No. 2016ZDKF09) and Foundation of Science and Technology of Shaanxi Province, China (No. 2018SF-129).

Conflicts of interest: none declared

颅脑创伤(TBI)后,由于各种信号转导通路被激活,神经细胞发生可调控性损伤而引起中枢神经系统功能障碍^[1-2]。凋亡和自噬是颅脑创伤后神经细胞程序性死亡的主要方式,抑制神经细胞凋亡、活化自噬可以促进创伤后脑组织的修复和功能改善。近年来,对神经细胞凋亡和自噬的调控研究成为颅脑创伤治疗的重要课题,对减轻神经细胞损害、促进修复具有重要意义^[3]。姜黄素(curcumin)是由姜黄属植物根茎中分离提取的酚类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化反应、抗炎反应、消除氧自由基等的作用^[4],可以用于治疗多种神经系统疾病,动物实验业已证实其对幼年小鼠颅脑创伤具有促进神经再生的作用^[5]。然而,姜黄素对颅脑创伤后神经细胞凋亡和自噬,以及脑组织修复的影响尚未见诸文献报道,本研究拟通过颅脑创伤小鼠模型观察姜黄素对创伤后神经细胞凋亡和自噬,以及脑组织修复的影响,探讨此类药物对创伤后神经功能的保护机制。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验动物 健康雄性、8 周龄美国癌症研究所(ICR)小鼠共 90 只,体重 25~30 g,由空军军医大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(陕)2019-001],于室温(23±2)℃、相对湿度 50%~

60%、12 h 昼-12 h 夜循环照明环境中饲养,自由摄食、饮水。

2. 试剂与仪器 (1)药品与试剂:姜黄素(规格:10 g)和碘化丙啶(PI,规格:10 mg)均由美国 Sigma 公司提供,细胞裂解液为生工生物工程(上海)股份有限公司产品,电化学发光(ECL)显色剂和聚偏二氟乙烯(PVDF)膜分别为美国 Amersham Biosciences 公司和 Millipore 公司产品,二辛可宁酸(BCA)蛋白分析试剂盒由美国 Pierce 公司提供,微管相关蛋白 1 轻链 3(MAP1LC3)抗体(1:3000)、P62 抗体(1:500)分别购自美国 Abcam 公司和 Santa Cruz 公司,Caspase-3 抗体(1:500)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)抗体(1:1000)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(1:5000)均购自美国 Bioword Technology 公司,由辣根过氧化物酶(HRP)标记的 IgG II 抗为生工生物工程(上海)股份有限公司产品。(2)设备与仪器:自由落体打击器由苏州大学法医病理学教研室自行制备,包括支座、引导杆、落体、等张弹簧、液体传导撞筒、压力传感器和打击柱,打击落体 40 g、引导杆确定打击高度 20 cm、打击柱直径 2 mm、打击柱下降深度 2 mm。51615U 型立体定位仪购自美国 Kopp 公司,STRONG90 型自动颅骨钻为韩国 SNU Precision 公司产品,CM1950 型冰冻切片仪由德国 Leica 公司提供,JY96-II 型超声细胞破碎仪为宁波科生仪器厂产品,Vi-470 CCD 光电

子相机购自美国 Ludl Electronic Products 公司, 体视显微镜由德国 Leica 公司提供。

二、研究方法

1. 颅脑创伤模型制备与分组 (1) 模型制备: 小鼠经腹腔注射 4% 水合氯醛 (1 ml/100 g) 全身麻醉, 固定于立体定位仪, 剔毛、显露头皮, 经质量分数为 75% 医用乙醇溶液消毒, 于头皮正中直切口、长度为 2 cm, 钝性剥离右侧颅骨膜, 于冠状缝后、中线旁各 1 mm 处以圆形钻头的自动颅骨钻钻开直径 5 mm 的骨窗, 显露硬脑膜并确保其完整。参照文献 [6] 方法, 通过自由落体打击器将 40 g 砝码从 20 cm 高度自由落下击中显露的硬脑膜, 即刻缝合头皮。(2) 模型评价: 于创伤后 24 h 进行爬杆实验, 以评价小鼠颅脑创伤模型制备成功与否。将间距为 30 cm 的标杆垂直立于水平地面, 顶端以钢丝绳连接, 小鼠线上停留时间 > 30 s, 同时可甩尾和自由活动, 可从两杆之间爬线的一端移动到另一端, 并顺着标杆爬下, 评 5 分 (满分); 停留 > 30 s, 同时可进行甩尾和肢体活动, 线上可移动, 但无法沿着标杆爬下, 为 4 分; 停留 > 30 s, 可进行甩尾和肢体活动, 但不能在线上移动, 为 3 分; 停留 > 30 s, 可以进行肢体活动但是不能甩尾, 为 2 分; 停留 > 30 s, 无法进行甩尾和肢体活动, 为 1 分; 停留 < 30 s, 评 0 分。评分 < 2 分者, 则视为颅脑创伤模型制备成功。(3) 实验分组: 90 只小鼠采用随机数字表法随机分为空白对照组 (对照组, 12 只)、假颅脑创伤模型组 (假模型组, 26 只)、颅脑创伤 + 生理盐水组 (TBI + NaCl 组, 26 只) 和颅脑创伤 + 姜黄素组 (TBI + curcumin 组, 26 只)。对照组动物麻醉后仅切开头皮, 不作其他处理; 假模型组动物于麻醉后切开头皮、右侧顶部制备骨窗, 但不行自由落体打击器打击; TBI + NaCl 组小鼠于模型制备后 30 min 经腹腔注射生理盐水 10 ml; TBI + curcumin 组小鼠于模型制备后 30 min 经腹腔注射溶于 10 ml 生理盐水中的姜黄素 (0.10 mg/g)。创伤后经胃管进水, 48 h 后断头取脑进行各项检测。

2. 碘化丙啶染色计数神经元凋亡数目 假模型组、TBI + NaCl 组和 TBI + curcumin 组各选 6 只小鼠, 于模型制备后 48 h 断头切取全脑组织, 液氮快速冰冻 15 s, 以冰冻切片机连续切片, 层厚 12 μm , 每只小鼠共制备 8 张脑切片, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 24 h 后以无水乙醇固定 15 min、碘化丙啶染色 3 min, 以胞核呈红色者为阳性细胞, 每张切片选取 5 个损伤区域, 于中倍镜 ($\times 200$) 下计数阳性细胞, 取平均值即为神

经元凋亡数目。

3. Western blotting 法检测大脑皮质凋亡和自噬相关蛋白表达变化 每组各选择 12 只小鼠, 于模型制备后 48 h 断头取脑, 切取患侧大脑皮质损伤中心及其周围脑组织, 于空白离心管 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 < 24 h, 加入 1 ml 细胞裂解液, 超声细胞破碎仪以离心半径 8.50 cm、转速 10 000 r/min 低温 (4 $^{\circ}\text{C}$) 离心 4 min, 取上清液, 经分光光度法测定小鼠大脑皮质损伤区总蛋白含量并配平, Western blotting 法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、激活型 Caspase-3, 以及自噬相关蛋白 P62、MAP1LC-3 表达变化, 行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 经 PVDF 膜转膜、ECL 法显色, 检测条带灰度, 以 GAPDH 作为内参, 计算目的蛋白相对表达量。

4. Cavalieri 法测量大脑皮质损伤体积 假模型组、TBI + NaCl 组和 TBI + curcumin 组各选择 8 只小鼠, 于模型制备后 28 d 断头切取双侧脑组织, 液氮快速冰冻 15 s, 采用冰冻切片机连续切片, 层厚为 12 μm , 每只小鼠共制备 8 张脑组织切片, 进行 HE 染色。Vi-470 CCD 光电子相机采集图像并导入 Sigma Scan Pro 5 影像测量软件 (美国 Imaging Research 公司), 测量健侧大脑皮质总体积, Cavalieri 法计算患侧大脑皮质损伤体积占健侧大脑皮质总体积比例 [大脑皮质损伤体积 (%) = (健侧大脑皮质总体积 - 患侧大脑皮质体积) / 健侧大脑皮质总体积 $\times 100\%$], 取平均值。

5. 统计分析方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

创伤后 48 h, 假模型组、TBI + NaCl 组和 TBI + curcumin 组小鼠神经元凋亡数目差异有统计学意义 ($P = 0.000$, 表 1); 创伤后小鼠神经元凋亡数目明显增加 ($P = 0.000, 0.000$), 经姜黄素治疗后神经元凋亡数目减少 ($P = 0.014$; 表 2, 图 1)。表明姜黄素具有阻止颅脑创伤小鼠大脑神经元凋亡的作用。

创伤后 48 h, 不同处理组小鼠凋亡相关蛋白 (Bcl-2、激活型 Caspase-3) 和自噬相关蛋白 (P62、MAP1LC3-II) 表达差异具有统计学意义 (均 $P = 0.000$, 表 3); 创伤后小鼠大脑皮质损伤区 Bcl-2 ($P =$

表 1 不同处理组小鼠神经元凋亡数目(PI 阳性细胞数目)的比较($\bar{x} \pm s$, 个)

Table 1. Comparison of PI - positive cells in the injured cortex of mice among 3 groups ($\bar{x} \pm s$, number)

组别	例数	阳性细胞数目
假模型组(1)	6	2.50 ± 0.38
TBI + NaCl 组(2)	6	188.60 ± 15.79
TBI + curcumin 组(3)	6	148.40 ± 17.74
<i>F</i> 值		254.946
<i>P</i> 值		0.000

表 2 不同处理组小鼠神经元凋亡数目(PI 阳性细胞数目)的两两比较

Table 2. Paired comparison of PI - positive cells in different groups after TBI

组间两两比	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1) 与 (2)	26.000	0.000
(1) 与 (3)	18.520	0.000
(2) 与 (3)	3.686	0.014

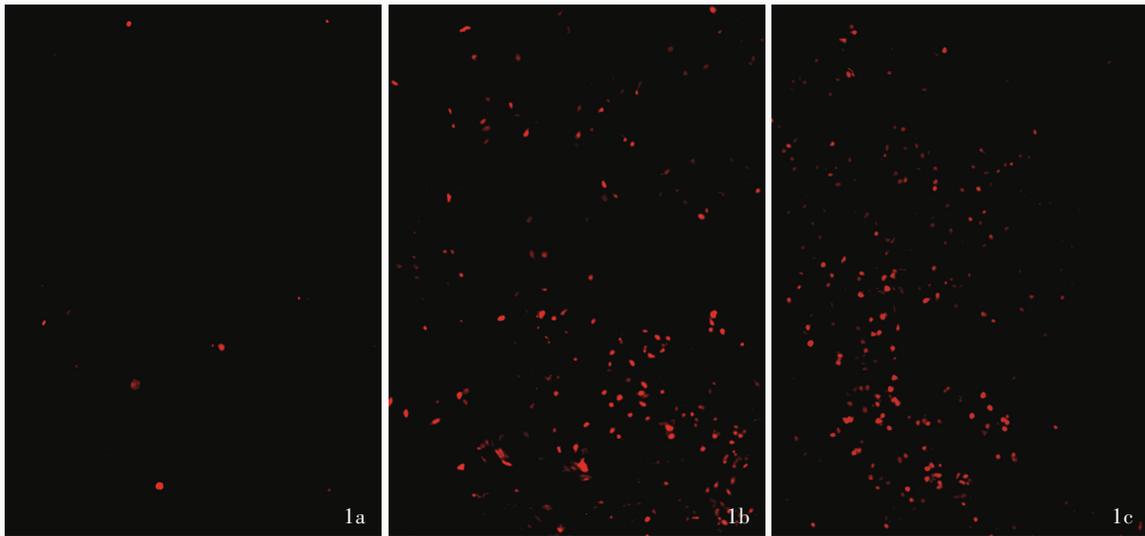


图 1 光学显微镜观察 PI 染色 ×200 1a 假模型组小鼠大脑皮质未发现明显的 PI 阳性细胞 1b TBI + NaCl 组小鼠大脑皮质损伤区 PI 阳性细胞数目明显增加 1c TBI + curcumin 组小鼠大脑皮质损伤区 PI 阳性细胞数目有所减少

Figure 1 Optical microscopy findings PI staining ×200 PI-positive cells were not found in the cortex of the mice in sham group (Panel 1a). PI-positive cells were increased obviously in the cortex of the mice in TBI + NaCl group (Panel 1b). PI-positive cells were reduced in the cortex of the mice in TBI + curcumin group (Panel 1c).

0.000, 0.008, 0.001, 0.009)、P62 ($P = 0.004, 0.000, 0.005, 0.000$) 表达水平降低, 激活型 Caspase-3 ($P = 0.000, 0.005, 0.000, 0.016$) 和 MAP1LC3 - II ($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000$) 表达水平升高; 经姜黄素治疗后 Bcl-2 表达水平升高 ($P = 0.007$)、激活型 Caspase-3 表达水平降低 ($P = 0.005$), P62 表达水平持续降低 ($P = 0.004$)、MAP1LC3 - II 表达水平持续升高 ($P = 0.000$; 表 4, 图 2)。提示姜黄素具有抑制创伤后大脑皮质损伤区域神经元凋亡活性、增强自噬活性之功效。

创伤后 28 d, 假模型组、TBI + NaCl 组和 TBI + curcumin 组小鼠大脑皮质损伤体积差异有统计学意义 ($P = 0.015$, 表 5); 创伤后小鼠大脑皮质损伤体积增加 ($P = 0.000, 0.000$), 但经姜黄素治疗后其损伤体积减少 ($P = 0.003$, 表 6)。提示姜黄素可减少创伤

后大脑皮质损伤体积。

讨 论

颅脑创伤除可直接导致脑组织损害、神经细胞非程序性坏死外, 还可激发程序性细胞死亡, 如细胞凋亡、自噬和程序性坏死等, 因此, 细胞信号转导调控成为颅脑创伤后损伤与修复的研究热点^[7-8]。凋亡是程序性细胞死亡的经典模式, 是一种受基因调控、依赖能量、有序地细胞死亡方式, 根据 Caspase 是否参与而分为 Caspases 依赖性和非 Caspases 依赖性两类途径, Caspases 依赖性途径是凋亡的主要方式, 表现有 Bcl-2 抑制凋亡蛋白的抑制及 Caspase-3 蛋白的大量激活^[9]。自噬是真核细胞中广泛存在的降解和(或)再循环机制, 自噬的激活可导致 P62 蛋白大量降解及 MAP1LC3 - II 蛋白大量激活; 一方面

表 3 不同处理组小鼠创伤后大脑皮质 Bcl-2、激活型 Caspase-3、P62 和 MAP1LC3- II 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Comparison of expression level of Bcl-2, activated Caspase-3, P62 and MAP1LC3- II in the cortex of the mice in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Bcl-2	激活型 Caspase-3	P62	MAP1LC3- II
对照组(1)	12	1.55 ± 0.09	0.36 ± 0.05	0.94 ± 0.04	0.93 ± 0.03
假模型组(2)	12	1.41 ± 0.09	0.40 ± 0.04	0.95 ± 0.06	0.94 ± 0.05
TBI + NaCl 组(3)	12	0.68 ± 0.17	0.89 ± 0.07	0.61 ± 0.08	1.58 ± 0.11
TBI + curcumin 组(4)	12	1.07 ± 0.16	0.58 ± 0.09	0.35 ± 0.05	2.00 ± 0.13
F 值		41.292	64.833	79.292	166.346
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

Bcl-2, B cell lymphoma/leukemia-2, B 细胞淋巴瘤/白血病-2; MAP1LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3, 微管相关蛋白 1 轻链 3。The same for Table 4

表 4 不同处理组小鼠创伤后大脑皮质 Bcl-2、激活型 Caspase-3、P62 和 MAP1LC3- II 的两两比较

Table 4. Paired comparison of the expression level of Bcl-2, activated Caspase-3, P62 and MAP1LC3- II in the cortex of the mice in different groups

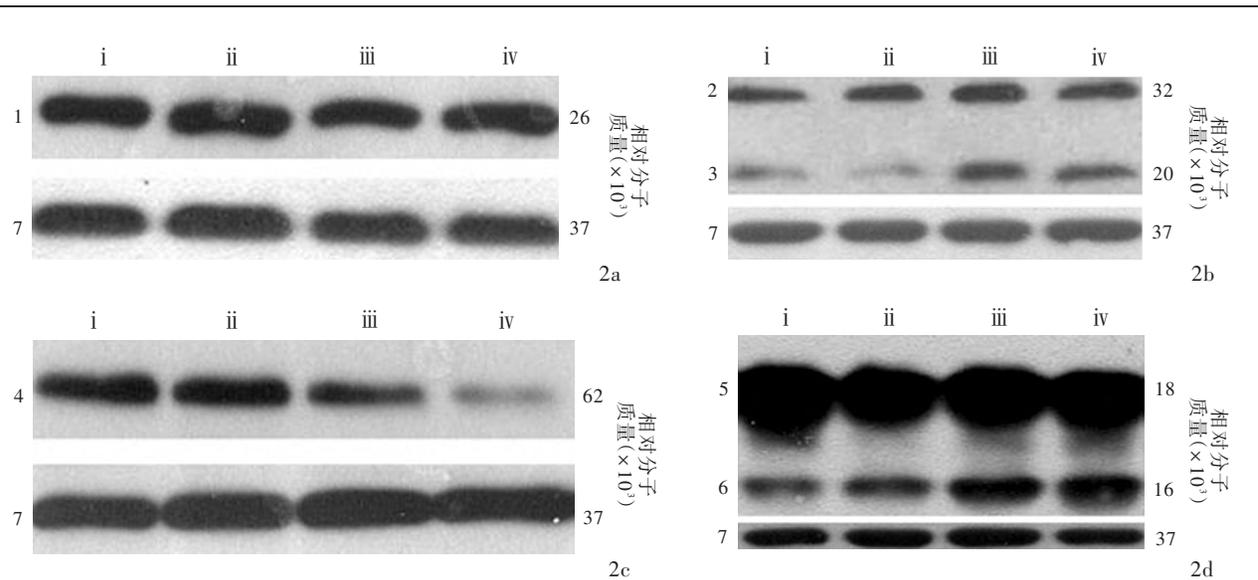
组间两两比	Bcl-2		激活型 Caspase-3		P62		MAP1LC3- II	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) (2)	2.028	0.098	1.865	0.121	0.037	0.972	0.426	0.687
(1) (3)	5.656	0.000	8.534	0.000	3.574	0.004	7.101	0.000
(1) (4)	3.254	0.008	3.468	0.005	7.612	0.000	7.656	0.000
(2) (3)	4.485	0.001	8.565	0.000	3.465	0.005	6.816	0.000
(2) (4)	3.150	0.009	2.846	0.016	8.637	0.000	9.043	0.000
(3) (4)	3.290	0.007	3.520	0.005	3.595	0.004	4.954	0.000

可促进细胞程序性死亡,另一方面细胞损伤时则具有清除受损细胞器、保护神经细胞的作用^[10]。本研究利用颅骨开骨窗定量打击建立小鼠颅脑创伤模型,对姜黄素预处理后是否能够影响大脑皮质凋亡或自噬活性,以及是否能够改善颅脑创伤后脑组织修复、减少神经细胞死亡进行研究。

姜黄素是从姜科、天南星科中植物根茎中经人工提炼的一种化学物质,具有二酮色素,为二酮类化合物,作为从植物中提取的人工合成物质,其神经保护作用已经多项动物实验和体外研究所证实,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤作用^[5,11-12]。因此我们认为,姜黄素具有通过抑制成年小鼠颅脑创伤后神经元凋亡、增强自噬活性从而对神经修复发挥潜在保护作用。碘化丙啶作为核酸荧光染料,不能透过完整的细胞膜,但能透过坏死细胞和凋亡中晚期细胞膜而使细胞核呈红色,我们团队的既往研究显示,颅脑创伤后 48 小时,碘化丙啶阳性细胞数目达到峰值^[13]。因此本研究对颅脑创伤后 48 小时假模型组、TBI + NaCl 组和 TBI + curcumin 组小鼠碘化丙啶阳性细胞数目进行观察,结果显示,创伤后小鼠碘化丙

啶阳性细胞数目增加,但经腹腔注射姜黄素后其阳性染色细胞数即减少,表明姜黄素可以有效阻止创伤后大脑皮质神经元凋亡;而且创伤后 28 天大脑皮质损伤体积亦增加,经姜黄素治疗后大脑皮质损伤体积有所减少,提示姜黄素可以有效减少创伤后的脑组织损害,从而对神经修复发挥保护作用。

Bcl-2 蛋白为抗凋亡蛋白,通过抑制下游 Caspases 系统而被激活,以抑制细胞凋亡活性^[14],细胞凋亡相关酶切的级联效应最终激活 Caspase-3,进而激活细胞凋亡机制,因此 Caspase-3 亦被称为凋亡的“执行者”^[15]。既往研究显示,通过抑制凋亡活性可改善创伤后神经细胞和组织修复^[7]。本研究结果显示,创伤后小鼠大脑皮质损伤区凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达水平降低、激活型 Caspase-3 表达水平升高,经姜黄素治疗后 Bcl-2 水平升高、激活型 Caspase-3 水平降低,表明姜黄素可以抑制大脑皮质损伤区神经元之凋亡活性。值得注意的是,由于创伤可以引起大量凋亡介导的神经细胞死亡,因此姜黄素抑制神经元凋亡的机制也在一定程度上解释了大脑皮质损伤区神经元凋亡数目的减少,而神经元凋亡数目



i, 对照组; ii, 假模型组; iii, TBI + NaCl组; iv, TBI + curcumin 组
 1, Bcl-2; 2, 前体 Caspase-3; 3, 激活型 Caspase-3; 4, P62; 5, MAP1LC3- I ; 6, MAP1LC3- II ; 7, GAPDH
 Bcl-2, B 细胞淋巴瘤/白血病-2; MAP1LC3, 微管相关蛋白 1 轻链 3; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 2 Western blotting 法检测 2a TBI + NaCl 组 Bcl-2 表达水平低于对照组和假模型组, TBI + curcumin 组 Bcl-2 水平高于 TBI + NaCl 组但仍低于对照组和假模型组 2b TBI + NaCl 组激活型 Caspase-3 表达水平高于对照组和假模型组, TBI + curcumin 组激活型 Caspase-3 水平低于 TBI + NaCl 组但高于对照组和假模型组 2c TBI + NaCl 组 P62 表达水平低于对照组和假模型组, TBI + curcumin 组 P62 水平亦低于 TBI + NaCl 组 2d TBI + NaCl 组 MAP1LC3- II 表达水平高于对照组和假模型组, TBI + curcumin 组 MAP1LC3- II 水平亦高于 TBI + NaCl 组

Figure 2 Western blotting test Expression level of Bcl-2 in TBI + NaCl group was lower than control group and sham group, and expression level of Bcl-2 in TBI + curcumin group was higher than TBI + NaCl group but lower than control group and sham group (Panel 2a). Expression level of activated Caspase-3 in TBI + NaCl group was higher than control group and sham group, and expression level of activated Caspase-3 in TBI + curcumin group was lower than TBI + NaCl group but higher than control group and sham group (Panel 2b). Expression level of P62 in TBI + NaCl group was lower than control group and sham group, and expression level of P62 in TBI + curcumin group was also lower than TBI + NaCl group (Panel 2c). Expression level of MAP1LC3- II in TBI + NaCl group was higher than control group and sham group, and expression level of MAP1LC3- II in TBI + curcumin group was also higher than TBI + NaCl group (Panel 2d).

表 5 不同处理组小鼠创伤后大脑皮质损伤体积的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 5. Comparison of lesion volume of different groups after TBI ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	大脑皮质损伤体积
假模型组(1)	8	0.45 ± 0.07
TBI + NaCl 组(2)	8	18.22 ± 0.42
TBI + curcumin 组(3)	8	14.55 ± 1.76
F 值		44.472
P 值		0.015

表 6 不同处理组小鼠创伤后大脑皮质损伤体积的两两比较

Table 6. Paired comparison of the lesion volume in different groups after TBI

组间两两比	t 值	P 值
(1) vs (2)	34.813	0.000
(1) vs (3)	11.172	0.000
(2) vs (3)	4.525	0.003

的减少有利于神经修复。

自噬对细胞存亡具有两面性,一方面可以通过自噬阻止凋亡的激活,同时可清除受损的细胞器;另一方面,亦可以通过潜在途径成为细胞死亡的方式之一^[16-17]。自噬激活时磷脂酰乙醇胺与 MAP1LC3- I 结合形成 MAP1LC3- II, P62 是自噬降解底物,可被 MAP1LC3 捕捉进入自噬体,因此,自噬活性与 MAP1LC3- II 表达水平呈正相关、与 P62 表达水平呈负相关^[18]。本研究结果显示,创伤后小鼠大

脑皮质损伤区自噬相关蛋白 P62 表达水平降低、MAP1LC3- II 表达水平升高,予姜黄素治疗后 P62 表达持续降低、MAP1LC3- II 表达持续升高,表明姜黄素可以增强大脑皮质损伤区神经元自噬活性,从而对创伤后的神经修复发挥保护作用。

本研究证实,颅脑创伤后不同可调控的程序性细胞死亡方式之间存在某种串联机制^[19],初步阐述了姜黄素通过抑制凋亡活性、增强自噬活性而发挥神经保护作用的细胞信号转导潜在机制。但本实

验是基于小鼠大体颅脑创伤模型,未行体外细胞培养研究,也未明确姜黄素其他给药途径对颅脑创伤的影响,因此姜黄素如何通过细胞信号转导机制影响神经元凋亡和自噬,以及更深入的神保护作用机制尚待进一步研究。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Zhang MY, Shan HY, Wang YQ, Wang T, Liu WL, Wang L, Zhang L, Chang P, Dong WW, Chen XP, Tao LY. The expression changes of cystathionine- β -synthase in brain cortex after traumatic brain injury[J]. J Mol Neurosci, 2013, 51:57-67.
- [2] Chu Y, Han GX, Wang YQ, Shan HY, Chen XP, Tao LY, Zhang MY. The role of CBS in injury time estimation after brain contusion[J]. Fa Yi Xue Za Zhi, 2017, 33:221-224. [褚洋, 韩国宪, 王尧淇, 单海燕, 陈溪萍, 陶陆阳, 张明阳. CBS在脑挫伤后损伤时间推断中的作用[J]. 法医学杂志, 2017, 33: 221-224.]
- [3] Zhang JY, Lee JH, Gu X, Wei ZZ, Harris MJ, Yu SP, Wei L. Intranasally delivered Wnt3a improves functional recovery after traumatic brain injury by modulating autophagic, apoptotic, and regenerative pathways in the mouse brain[J]. J Neurotrauma, 2018, 35:802-813.
- [4] Rahmani AH, Alsahli MA, Aly SM, Khan MA, Aldebasi YH. Role of curcumin in disease prevention and treatment[J]. Adv Biomed Res, 2018, 7:38.
- [5] Li J, Li Z, Cheng T. The role of CCM on traumatic brain injury in young mice[J]. Zhongguo Shi Yong Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2017, 20:1-4. [李杰, 李珍, 程田. 姜黄素治疗幼年小鼠颅脑创伤的实验研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2017, 20:1-4.]
- [6] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury. I: methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res, 1981, 211:67-77.
- [7] Wu Q, Xia SX, Li QQ, Gao Y, Gao Y, Shen X, Ma L, Zhang MY, Wang T, Li YS, Wang ZF, Luo CL, Tao LY. Mitochondrial division inhibitor 1 (Mdivi-1) offers neuroprotection through diminishing cell death and improving functional outcome in a mouse model of traumatic brain injury[J]. Brain Res, 2016, 1630:134-143.
- [8] Zhang MY, Shan HY, Chang P, Wang T, Dong WW, Chen XP, Tao LY. Hydrogen sulfide offers neuroprotection on traumatic brain injury in parallel with reduced apoptosis and autophagy in mice[J]. PLoS One, 2014, 9:E87241.
- [9] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281:1305-1308.
- [10] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy[J]. Methods Mol Biol, 2008, 445:77-88.
- [11] Hua WM, Liang ZQ, Fang Y, Gu ZL, Guo CY. Mechanisms of curcumin protecting endothelial cells against ischemia and reperfusion injury[J]. Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao, 2009, 25:1036-1041. [华文敏, 梁中琴, 方韵, 顾振纶, 郭次仪. 姜黄素抗内皮细胞缺血/再灌注损伤的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25:1036-1041.]
- [12] Mou J, Chen Y. Effects of curcumin on diabetic vascular complications in rats[J]. Jie Fang Jun Yao Xue Bao, 2017, 33:418-421. [牟健, 陈艳. 姜黄素对大鼠糖尿病血管并发症的保护作用[J]. 解放军药理学学报, 2017, 33:418-421.]
- [13] Luo CL, Chen XP, Yang R, Sun YX, Li QQ, Bao HJ, Cao QQ, Ni H, Qin ZH, Tao LY. Cathepsin B contributes to traumatic brain injury - induced cell death through a mitochondria-mediated apoptotic pathway[J]. J Neurosci Res, 2010, 88:2847-2858.
- [14] Popgeorgiev N, Jabbour L, Gillet G. Subcellular localization and dynamics of the Bcl-2 family of proteins[J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6:13.
- [15] Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates[J]. Cell Death Differ, 2017, 24:1380-1389.
- [16] Roy M, Tomar D, Singh K, Lakshmi S, Prajapati P, Bhatelia K, Gohel D, Singh R. TRIM8 regulated autophagy modulates the level of cleaved Caspase-3 subunit to inhibit genotoxic stress induced cell death[J]. Cell Signal, 2018, 48:1-12.
- [17] Song X, Lee DH, Dilly AK, Lee YS, Choudry HA, Kwon YT, Bartlett DL, Lee YJ. Crosstalk between apoptosis and autophagy is regulated by the arginylated BiP/Beclin-1/p62 complex[J]. Mol Cancer Res, 2018, 16:1077-1091.
- [18] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. Essays Biochem, 2017, 61:609-624.
- [19] Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18:E1865.

(收稿日期:2019-06-29)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(三)

酶联免疫吸附试验

enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

美国癌症研究所 Institute of Cancer Research(ICR)

美国国家老龄化研究所-阿尔茨海默病学会

National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA)

美国国立神经病学与卒中研究所

National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS)

美国国立神经病学与卒中研究所及国际进行性

核上性麻痹协会

National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Society for Progressive Supranuclear Palsy(NINDS-SPSP)

美国国立神经病学、语言障碍和卒中研究所-

阿尔茨海默病及相关疾病协会

National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association(NINCDS-ADRDA)

美国国立卫生研究院卒中量表

National Institutes of Health Stroke Scale(NIHSS)

蒙特利尔认知评价量表

Montreal Cognitive Assessment(MoCA)