

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.004

姜黄素后处理通过 SIRT1/FOXO1 信号通路拮抗小鼠脑缺血再灌注损伤 *

魏毅君¹ 翟蒙恩² 王晓武² 路志红³ 金振晓² 赵振伟^{1Δ}

(1 第四军医大学 唐都医院神经外科 陕西 西安 710000; 2 第四军医大学 西京医院心血管外科 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学 西京医院麻醉科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探究姜黄素后处理是否通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路抵抗小鼠脑缺血再灌注损伤。**方法:**小鼠脑缺血 30 min, 再灌注 24 h 建立脑缺血再灌注模型。手术前脑室内注射 SIRT1 特异性抑制剂 EX527。再灌注后腹腔注射姜黄素。小鼠随机分为以下 6 组:假手术组;单纯姜黄素后处理组;缺血再灌注组;缺血再灌注+姜黄素后处理组;EX527 预处理+缺血再灌注+姜黄素后处理组;EX527 预处理+脑缺血再灌注组。再灌注 24 h 检测脑梗死体积、Complex I 活性、ROS 含量以及 SIRT1、Ac-FOXO1、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达情况。**结果:**与手术组相比,姜黄素后处理组梗死区脑组织 SIRT1 的表达量及活性明显增加,脑梗死体积降低,ROS 含量降低而 Complex I 活性增高,Bcl-2 的表达增高而 Bax 和 Caspase-3 的表达量降低(均 $P<0.05$)。阻断 SIRT1 信号通路后上述姜黄素脑保护作用均减弱($P<0.05$)。**结论:**我们的研究首次证实姜黄素后处理通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路,进而降低氧化应激与凋亡,最终减轻脑缺血再灌注损伤。

关键词:姜黄素;脑缺血再灌注损伤;凋亡;氧化应激;SIRT1;FOXO1

中图分类号:R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)17-3216-04

Curcumin Posttreatment Ameliorates Cerebral Ischemia Reperfusion Injury of Mice through Activating SIRT1/FOXO1 Signaling Pathway*

WEI Yi-jun¹, ZHAI Meng-en², WANG Xiao-wu², LU Zhi-hong³, JIN Zhen-xiao², ZHAO Zhen-wei^{1Δ}

(1 Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710000, China;

2 Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To elucidate the definite role of silent information regulator 1 (SIRT1)/Forkhead box protein O1 (FOXO1) signaling pathway in the protective effect of curcumin posttreatment against cerebral ischemia reperfusion (IR) injury (IRI) in adult mice. **Methods:** In this study, adult mice were subjected to 30 min of ischemia and 24 h of reperfusion to mimic the cerebral IRI. Prior to this procedure, the mice were given intracerebroventricularly with or without a SIRT1 selective inhibitor, EX527. Curcumin was intraperitoneally administrated following reperfusion with a single dose of 100 mg/kg. The mice were randomly divided into six groups: Sham group, Cur group, IR group, IR+Cur group, IR+Cur+EX527 group and IR+EX527 group. Twenty-four hours after the reperfusion, the infarct volume, Complex I activity, reactive oxygen species (ROS) production and the expression levels of SIRT1, Ac-FOXO1, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in each group were measured. **Results:** Compared with the IR group, curcumin posttreatment significantly increased the expression level of SIRT1, as well as its deacetylase activity. Curcumin conferred a cerebral-protective effect, as shown by reduced infarct volume compared with the IR group. In addition, curcumin posttreatment caused a significant upregulation of Complex I activity and downregulation of ROS production. Moreover, curcumin posttreatment increased the expression level of an anti-apoptotic factor, Bcl2, and decreased the expression level of the pro-apoptotic factor Bax and Caspase-3. However, these cerebral-protective effects of curcumin were largely abolished by EX527 treatment. **Conclusions:** Our results demonstrate that curcumin pretreatment attenuates cerebral IRI by reducing IR-induced oxidative stress and apoptosis through the activation of SIRT1/FOXO1 signaling pathway.

Key words: Curcumin; Cerebral ischemia reperfusion injury; Apoptosis; Oxidative stress; SIRT1; FOXO1

Chinese Library Classification (CLC): R743.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3216-04

前言

缺血性脑卒中是常见的脑血管病之一,其致死率和致残率

较高^[1]。脑缺血发生后,及时恢复缺血区域血流是减少脑组织损伤最有效的方案之一,但缺血脑组织恢复血流后,活性氧随之大量产生,继而加重神经细胞凋亡和坏死,这种现象称为脑缺

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81671136;81570231)

作者简介:魏毅君(1979-),硕士,主治医师,主要研究方向:脑缺血再灌注损伤基础和临床研究, E-mail: weiyijunfmmu@126.com

Δ 通讯作者:赵振伟,教授,主任医师,主要研究方向:脑血管疾病基础和临床研究, E-mail: zhaozhenweifmmu@126.com

(收稿日期:2016-12-10 接受日期:2016-12-30)

血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)^[2]。姜黄素(Curcumin, Cur),是中药姜黄中的有效成分之一。姜黄素抵抗脑缺血再灌注损伤已有报道,但是多数研究注重探讨姜黄素预处理对脑 IRI 的保护作用^[3,4],而姜黄素后处理的作用及其机制研究甚少。沉默信息调节因子 1 (Silent information regulator 1, SIRT1)是一种组蛋白脱乙酰酶,其活性取决于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)^[5]。大量研究证实 SIRT1 具有明确的脑保护作用^[6,9]。然而,姜黄素后处理是否通过激活 SIRT1 来抵抗大脑 IRI 尚无报道。本研究旨在评价姜黄素后处理对脑 IRI 的保护作用以及对 IR 后氧化应激和凋亡的影响,并探究 SIRT1 信号转导是否介导姜黄素的脑保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 姜黄素、EX527、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(Sigma 公司); β -actin 抗体、抗 Bax、Bcl-2、Caspase-3 抗体(Cell signaling 公司);抗 Ac-FOXO1 抗体(Santa Cruz 公司);抗 SIRT1 抗体(Abcam 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce 公司);活性氧(Reactive oxygen species, ROS)含量检测试剂盒(Invitrogen 公司)。

1.1.2 实验动物 C57BL/6 小鼠,雄性,体重 20-25 g,8~10 周龄,由第四军医大学实验动物中心提供。C57BL/6 小鼠饲养于清洁级环境,自由进食进水。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立 如前所述^[10,11],我们采用线栓法闭塞小鼠大脑中动脉以诱导局灶性脑缺血。操作步骤如下:用氧气和异氟烷(2.5%诱导,1.5%维持)混合气麻醉小鼠;将小鼠固定于加热垫上,使其直肠温度维持在 37.0 °C 附近;沿小鼠颈前正中线剪开皮肤,分离右侧颈部肌肉与脂肪组织,找到颈内动脉和颈外动脉(切勿损伤迷走神经);结扎右侧颈总动脉近心端及颈外动脉;用小动物血管夹阻闭颈内动脉,于颈总动脉近分叉处剪一小口,插入涂覆有圆形尖端的 6-0 尼龙缝合线;松开小动物血管夹,继续送入线栓,在颈动脉分叉远端 10 mm 处进行大脑中动脉闭塞;诱导缺血 30 min,撤去线栓开始再灌注;停止麻醉,将动物放回笼中,自由进食进水。假手术动物行颈正中切口,分离右颈总动脉,直接缝合,放回笼中,自由进食进水。

1.2.2 实验分组及给药方式 将 96 只 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组,每组 16 只,即假手术组(Sham 组)、单纯姜黄素后处理组(Cur 组)、缺血再灌注组(IR 组)、缺血再灌注+姜黄素后处理组(IR+Cur 组)、EX527 预处理+缺血再灌注+姜黄素后处理组(IR+Cur+EX527 组)、EX527 预处理+缺血再灌注组(IR+EX527 组)。再灌注后腹腔注射姜黄素(100 mg/kg)。EX527 每次给药剂量为 10 μ g,脑室内注射,术前每两天给一次,总共 3 次。

1.2.3 脑梗体积测定 如前所述^[11,12],再灌注 24 小时后,一次性腹腔注射大剂量戊巴比妥钠后快速处死小鼠;迅速取全脑;冻于 -80 °C 冰箱 10 min;将脑组织切成 2 mm 厚的冠状切片;在 37 °C 下在暗室内用 2% TTC 染色 30 min,室温固定(10%甲醛) 24 h;用数码相机对切片进行拍照,并用 Image J 图像分析软件分析每张切片脑梗面积;每张切片脑梗面积乘以厚度,计算出

每片脑片的梗死体积;所有切片梗死体积相加得到每只小鼠脑梗体积(infarct volume)。

1.2.4 脑组织氧化应激水平检测 再灌注 24 h 后,取梗死区脑组织,并按照 1:9 的比例用生理盐水制备成脑组织匀浆。按照文献所述方法检测氧化呼吸链复合物 I(Complex I)活性和 ROS 含量^[13,14]。

1.2.5 脑组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3、SIRT1、Ac-FOXO1 蛋白表达测定 再灌注 24 小时后迅速取脑,切除梗死区脑组织,提取蛋白样品,提取方法如前所述^[15]。用 BCA 蛋白定量试剂盒检测各组样品蛋白浓度。在电泳加样孔内加入等量蛋白质(40 μ g),10% Bis/Tris 凝胶分离蛋白,并用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 TBST (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.1% Tween-20, pH 7.5)稀释的 5%脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 2 h,孵育抗 SIRT1(1:500 稀释)、Ac-FOXO1(1:1000 稀释)、Bcl2(1:1000 稀释)、Bax(1:1000 稀释)、Caspase-3(1:1000 稀释)和 β -actin(1:1000 稀释)抗体,4 °C 过夜;用 TBST 洗涤 3 次;室温孵育对应的二抗(1:5000 稀释)1.5 h;用 TBST 洗涤 3 次。使用 BioRad 成像系统检测蛋白质条带并使用 Image Lab 软件定量。

1.3 统计分析

用 SPSS13.0 统计学软件进行统计分析,实验数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示;差异显著性检验采用单因素方差分析,比较两组间差异用 LSD-t 检验。P<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素后处理能上调脑缺血再灌注后 SIRT1 分子的表达,并增加其活性

与 Sham 组小鼠相比,IR 组小鼠梗死区脑组织的 SIRT1 表达水平明显降低而 Ac-FOXO1 表达水平明显增加(P<0.05)。与 IR 组相比,姜黄素后处理可以上调梗死区脑组织 SIRT1 的表达并降低 Ac-FOXO1 水平(P<0.05,见图 1F,G)。与 IR+Cur 组相比,EX527 后处理组 SIRT1 的表达量下调(P<0.05),而 Ac-FOXO1 的表达量明显上调(P<0.05),提示 EX527 可以明显抑制 SIRT1 的表达及脱乙酰化酶活性(见图 2F,G)。

2.2 姜黄素后处理通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路减少脑梗体积

小鼠脑缺血再灌注 24 h 后 TTC 染色检测脑梗体积,红染区域表示正常区域,未染色区域表示梗死区。如图 1A,B 所示,Sham 组和 Cur 组小鼠未发生脑梗。IR 组小鼠发生明显脑组织梗死。与 IR 组小鼠相比,姜黄素后处理可以明显减少小鼠脑梗体积(P<0.05)。而阻断 SIRT1 信号通路后小鼠的脑梗体积与 IR+Cur 组相比明显增加(P<0.05,见图 2A,B)。以上结果提示,姜黄素可通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路减少缺血再灌注后脑梗体积。

2.3 姜黄素后处理通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路减少脑缺血再灌注后氧化应激水平

再灌注 24 h 后检测脑组织中 Complex I 活性及 ROS 产量。我们发现,与 Sham 组小鼠相比,IR 组小鼠脑组织中 Complex I 的活性明显下降,而 ROS 产量明显增高(P<0.05)。与 IR 组相比,姜黄素后处理可以明显提高脑组织内 Complex I 的活性并降低 ROS 产量(P<0.05,见图 1C,D)。阻断 SIRT1 信号通

路后小鼠脑组织中 Complex I 活性与 IR+Cur 组相比明显降低,而 ROS 产量增高($P<0.05$,见图 2C,D)。以上结果提示,姜

黄素可通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路改善脑组织缺血再灌注后的氧化应激水平。

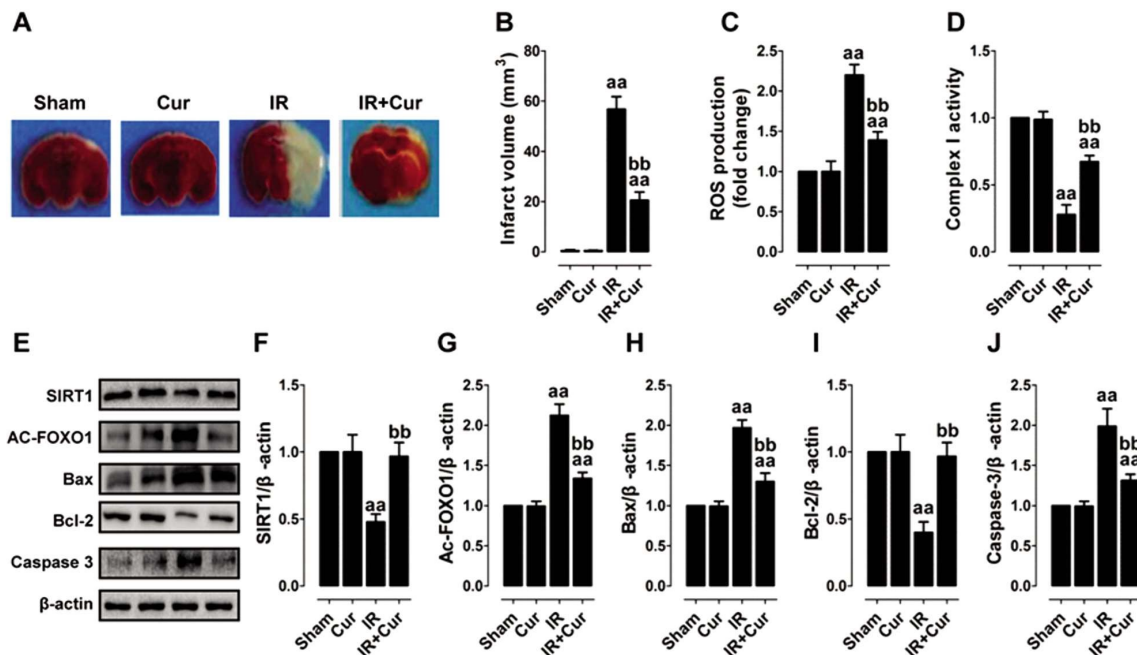


图 1 姜黄素后处理对缺血再灌注后脑组织梗死面积、氧化应激及凋亡的影响

Fig. 1 The effects of curcumin posttreatment on infarct volume, oxidative stress and apoptosis following cerebral ischemia reperfusion

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=8$, aa $P<0.01$, compared with the Sham group, bb $P<0.01$, compared with the IR group.

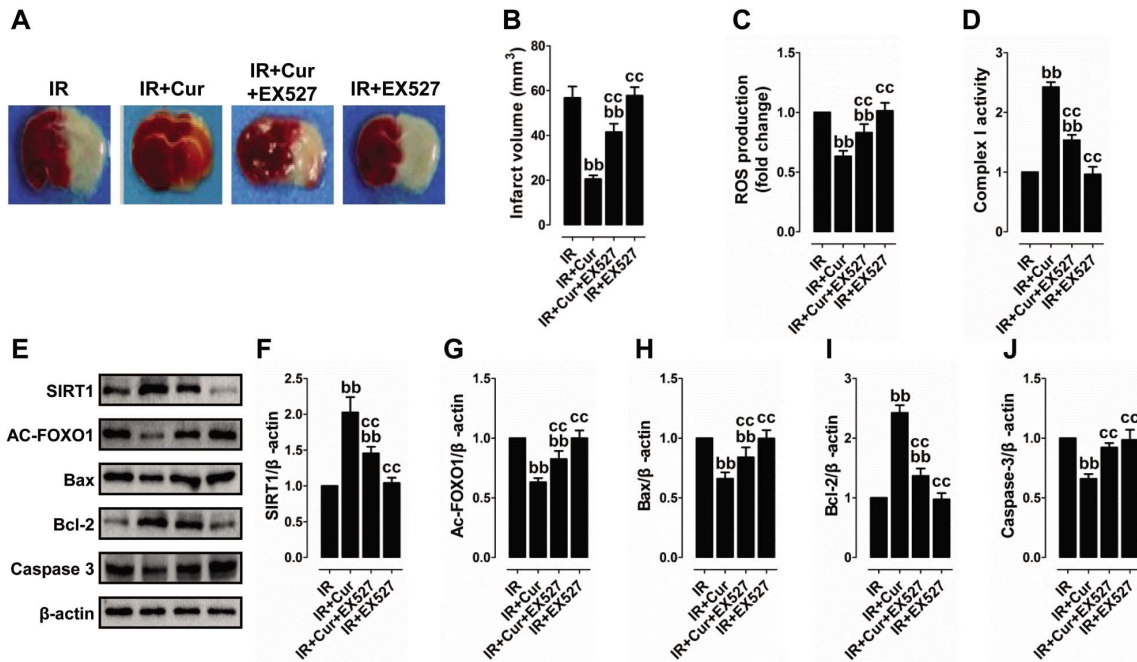


图 2 SIRT1 信号通路对姜黄素后处理脑保护作用的影响

Fig. 2 The influence of SIRT1 signaling pathway on cerebral-protective effects of curcumin following cerebral ischemia reperfusion

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=8$, bb $P<0.01$, compared with the IR group, cc $P<0.01$, compared with the IR+Cur group.

2.4 姜黄素后处理通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路减少脑缺血再灌注后凋亡水平

再灌注 24 h 后检测脑组织中 Bax、Bcl-2 以及 Caspase-3 的表达。我们发现,与 Sham 组小鼠相比,IR 组小鼠脑组织中 Bcl-2 的表达量明显下降,而 Bax 和 Caspase-3 的表达量明显上升($P<0.05$)。提示缺血再灌注后脑组织凋亡增加。而与 IR 组小

鼠相比,姜黄素后处理则上调 Bcl-2 的表达,并下调 Bax 和 Caspase-3 的表达($P<0.05$,见图 1H-J)。阻断 SIRT1 信号通路后小鼠 Bax 和 Caspase-3 的表达水平的与 IR+Cur 组相比明显增加,而 Bcl-2 的表达量明显下降($P<0.05$,见图 2H-J)。以上结果提示,姜黄素可通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路减轻缺血再灌注后脑组织凋亡水平。

3 讨论

缺血性脑卒中是常见的脑血管病之一,其致死率和致残率较高^[1]。脑缺血发生后,及时恢复缺血区域血流是减少脑组织损伤最有效的方案之一,但缺血脑组织恢复血流后,活性氧随着大量产生,继而加重神经细胞凋亡和坏死,这种现象称为脑缺血再灌注损伤^[2]。临床上多使用溶栓剂来治疗缺血性卒中,但由于其治疗时间窗很窄,溶栓剂的应用受到明显限制^[10]。因此,寻找新的有效治疗药物具有重要的临床意义。

姜黄素是中药姜黄中的有效成分之一。研究发现,姜黄素有多种生物学活性,如抗炎、抗氧化、抗凋亡和抗癌等^[17,18]。最近的报道还表明,姜黄素能够减轻心、肾、视网膜、肝脏和肠等器官的缺血再灌注损伤^[17-20]。此外,姜黄素也能有效减轻脑缺血再灌注损伤^[21]。但多数研究着重探讨了姜黄素预处理保护作用及其具体分子机制^[3,4]。在临床实践中,我们很难预测缺血性脑卒中的发生,故而无法提前用药来预防缺血再灌注损伤。基于此,我们课题组对于姜黄素后处理对脑缺血再灌注的保护作用加以探讨,并进一步明确其分子机制。

SIRT1 是一种组蛋白脱乙酰化酶,其活性主要取决于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)^[5]。大量研究证实 SIRT1 具有明确的脑保护作用。能量限制,缺血预处理和一些药物均可通过激活 SIRT1 减轻脑 IRI^[6-9]。此外,SIRT1 通过去乙酰化 p53 和 NF- κ B,进而抑制诱导缺血再灌注中 p53 和 NF- κ B 诱导的炎症和凋亡^[22]。然而,姜黄素后处理是否通过激活 SIRT1 来抵抗大脑 IRI 尚无报道。

我们的研究发现,SIRT1 在缺血脑组织中的表达量与正常组织相比明显下降。此外,SIRT1 的去乙酰化酶活性也明显受到抑制,表现为 SIRT1 的下游分子 FOXO1 的乙酰化水平明显增高。SIRT1 分子的下调伴随着脑组织 Complex I 活性的下降以及 ROS 产量的增加。此外,缺血再灌注后小鼠脑组织中促凋亡分子 Bax 和 Caspase-3 的表达量明显上升,而抗凋亡分子 Bcl-2 的表达量明显降低。姜黄素后处理能够上调脑组织中 SIRT1 的表达,并改善缺血再灌注后氧化应激和凋亡水平。而干扰 SIRT1 的表达则明显抑制了姜黄素的保护作用。

综上所述,我们的研究证实姜黄素后处理能够明显改善脑缺血再灌注损伤,而 SIRT1/FOXO1 信号通路在其脑保护作用之中扮演着关键角色。我们的研究为临床上应用姜黄素治疗缺血性脑卒中患者提供了新的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2016, 133(4): e38-e360
- [2] Chen C J, Cheng F C, Liao S L, et al. Effects of naloxone on lactate, pyruvate metabolism and antioxidant enzyme activity in rat cerebral ischemia/reperfusion[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 287(2): 113-116
- [3] Liu L, Zhang W, Wang L, et al. Curcumin prevents cerebral ischemia reperfusion injury via increase of mitochondrial biogenesis [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(7): 1322-1331
- [4] Li L, Li H, Li M. Curcumin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by activating JAK2/STAT3 signaling pathway in rats[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 14985-14991
- [5] Hsu C P, Zhai P, Yamamoto T, et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion [J]. *Circulation*, 2010,

- 122(21): 2170-2182
- [6] Meng Z, Li J, Zhao H, et al. Resveratrol relieves ischemia-induced oxidative stress in the hippocampus by activating SIRT1 [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(2): 525-530
- [7] Ran M, Li Z, Yang L, et al. Calorie restriction attenuates cerebral ischemic injury via increasing SIRT1 synthesis in the rat[J]. *Brain Res*, 2015, 1610: 61-68
- [8] Chen H Z, Guo S, Li Z Z, et al. A critical role for interferon regulatory factor 9 in cerebral ischemic stroke [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(36): 11897-11912
- [9] Yan W, Fang Z, Yang Q, et al. SirT1 mediates hyperbaric oxygen preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(3): 396-406
- [10] Kilic U, Yilmaz B, Ugur M, et al. Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral ischemia [J]. *J Pineal Res*, 2012, 52(2): 228-235
- [11] Yang Y, Jiang S, Dong Y, et al. Melatonin prevents cell death and mitochondrial dysfunction via a SIRT1-dependent mechanism during ischemic-stroke in mice[J]. *J Pineal Res*, 2015, 58(1): 61-70
- [12] Swanson R A, Morton M T, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10(2): 290-293
- [13] Ye R, Kong X, Yang Q, et al. Ginsenoside Rd attenuates redox imbalance and improves stroke outcome after focal cerebral ischemia in aged mice[J]. *Neuropharmacology*, 2011, 61(4): 815-824
- [14] Gaur V, Aggarwal A, Kumar A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 616(1-3): 147-154
- [15] Yang Y, Zhang S, Fan C, et al. Protective role of silent information regulator 1 against hepatic ischemia: effects on oxidative stress injury, inflammatory response, and MAPKs [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(5): 519-531
- [16] Khandelwal P, Yavagal D R, Sacco R L. Acute Ischemic Stroke Intervention[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(22): 2631-2644
- [17] Kunwar A, Barik A, Sandur S K, et al. Differential antioxidant/pro-oxidant activity of dimethoxycurcumin, a synthetic analogue of curcumin[J]. *Free Radic Res*, 2011, 45(8): 959-965
- [18] Lopresti A L, Hood S D, Drummond P D. Multiple antidepressant potential modes of action of curcumin: a review of its anti-inflammatory, monoaminergic, antioxidant, immune-modulating and neuroprotective effects[J]. *J Psychopharmacol*, 2012, 26(12): 1512-1524
- [19] Srivastava G, Mehta J L. Currying the heart: curcumin and cardioprotection[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2009, 14(1): 22-27
- [20] Duan W, Yang Y, Yan J, et al. The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107(3): 263
- [21] Kakkar V, Muppu S K, Chopra K, et al. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: an efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85(3 Pt A): 339-345
- [22] Hernandez-Jimenez M, Hurtado O, Cuartero M I, et al. Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage[J]. *Stroke*, 2013, 44(8): 2333-2337