

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.28.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 28-0008-05

姜黄素改善小鼠功能性胃排空障碍的研究*

刘艳婷, 于晶, 王红伟, 于小玲

(青岛大学基础医学院 生理与病理生理学系, 山东 青岛 266021)

摘要: **目的** 探讨姜黄素灌胃是否通过影响乙酰胆碱途径改善小鼠胃排空障碍。**方法** 利用一氧化氮 NO 前体盐酸左旋精氨酸 (L-精氨酸) 和乙酰胆碱受体阻断剂阿托品分别复制小鼠功能性胃排空障碍模型。选取健康昆明种雄性小鼠 54 只, 分为对照组、姜黄素组、L-精氨酸组、阿托品组、姜黄素 + (L-精氨酸) 联合组、姜黄素 + 阿托品联合组, 共 6 组, 每组 9 只。实验方法: 姜黄素混悬液灌胃, 共 15 d; L-精氨酸混悬液于第 11 天起额外灌胃, 共 5 d; 阿托品混合液于小鼠测量胃排空前 40 min 腹腔注射 1 次。其余组用溶媒溶液按照同样方式灌胃以及生理盐水腹腔注射作为对照。**结果** 与对照组比较, L-精氨酸组和阿托品组小鼠胃排空率均降低, 乙酰胆碱酯酶 mRNA 相对定量及蛋白表达均下降, 乙酰胆碱酯酶活力降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 L-精氨酸组比较, 姜黄素 + (L-精氨酸) 联合组小鼠胃排空率升高, 乙酰胆碱酯酶 mRNA 相对定量、蛋白表达及乙酰胆碱酯酶活力均改善, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与阿托品组比较, 姜黄素 + 阿托品联合组小鼠胃排空率升高, 乙酰胆碱酯酶 mRNA 相对定量、蛋白表达及乙酰胆碱酯酶活力也改善, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 单用姜黄素组与对照组比较, 上述指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 姜黄素通过影响乙酰胆碱释放改善外源性 NO 和阿托品造成功能性胃排空障碍。

关键词: 姜黄素; 乙酰胆碱; 一氧化氮; 胃排空; 功能障碍

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Curcumin alleviates functional gastric emptying disorder in mice through acetylcholine pathway*

Yan-ting Liu, Jing Yu, Hong-wei Wang, Xiao-ling Yu

(Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China)

Abstract: Objective To explore whether curcumin can alleviate gastric emptying disorder through acetylcholine pathway. **Methods** The mouse model of functional gastric emptying disorder was made by L-arginine (precursor of NO) and Atropine (blocker of acetylcholine receptor). A total of 54 healthy male Kunming mice were randomly divided into six groups including a control group, a curcumin group, a L-arginine group, an Atropine group, a curcumin+L-arginine group, and a curcumin+Atropine group. There were 9 mice in each group. Curcumin mixed suspension was intragastrically administrated for a total period of 15 d. L-arginine mixed suspension was given additionally through intragastric administration from the 11th day for a total period of 5 d. Atropine mixture was intraperitoneally injected once 40 min before measurement of gastric emptying rate. The other groups were administrated with the same way as the controls. **Results** Compared with the control group, the gastric emptying rate of mice decreased both in the L-arginine group and the Atropine group ($P < 0.05$), while the relative mRNA quantity

收稿日期: 2018-01-29

* 基金项目: 山东省自然科学基金项目 (No: ZR2014HM033)

[通信作者] 于小玲, E-mail: xiaoling_yu2004@163.com; Tel: 0532-82991713

and protein expression of acetylcholinesterase (AChE) and the activity of AChE also decreased ($P < 0.05$). Compared with the L-arginine group, the gastric emptying rate in the curcumin+L-arginine group increased ($P < 0.05$), and the relative mRNA quantity, protein expression and the activity of AChE also increased ($P < 0.05$). Compared with the Atropine group, the gastric emptying rate increased in the curcumin+Atropine group ($P < 0.05$), and the relative mRNA quantity, protein expression and the activity of AChE also increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in above indexes between the curcumin group and the control group ($P > 0.05$). **Conclusions** Curcumin can alleviate the functional gastric emptying disorder through affecting the release of acetylcholine in mouse model made by exogenous NO and Atropine.

Keywords: curcumin; acetylcholinesterase; nitric oxide; gastric emptying; dysfunction

姜黄素 (Curcumin, Cur) 是从姜科植物姜黄的根茎中分离出来的一种多酚类物质, 作为一种天然的着色剂和调味剂添加在食品中, 后期研究发现姜黄素还具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗菌等多种生物学作用^[1-2]。本实验室前期研究发现, 姜黄素灌胃对顺铂^[3]、外源性一氧化碳 NO, 以及阿托品^[4]造成的小鼠胃肠功能障碍均有显著的改善作用。进一步研究显示姜黄素可通过促进乙酰胆碱 (Acetylcholine, Ach) 释放而改善顺铂所致的胃排空障碍^[5]。姜黄素对单纯功能性胃排空障碍是否也通过 Ach 途径发挥改善作用需要进一步确认。因 Ach 释放后迅速被乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 水解成胆碱和乙酸, 所以本研究通过检测小鼠胃组织中胆碱的数量变化得到 AChE 活力, 从而反映 Ach 的释放量。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

健康昆明种雄性小鼠 54 只, 体重 20 ~ 22 g, 购自山东省鲁抗医药股份有限公司质检中心实验动物室。姜黄素 (纯度 99.9%)、盐酸左旋精氨酸 (L-精氨酸) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 阿托品注射液购自天津药业集团新郑股份有限公司, AChE 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, RNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司, 逆转录和实时荧光定量聚合酶链反应试剂盒购自瑞士罗氏生物科技有限公司, AChE、GADPH 引物由上海生工生物有限公司设计合成, 免疫印记技术测定的试剂购自美国 Sigma 公司, AChE (Cat.NO.bs-2511R)、 β -actin 抗体 (Cat.NO.bs-0061R) 购自中国 Bioass 公司。姜黄素与 5% 质量分数的阿拉伯胶溶液配成浓度为 25 g/L 的混悬液, L-精氨酸使用时与 5% 质量分数的阿拉伯胶溶液配成浓度为 250 g/L 的混悬液。阿托品与生理盐水配成 0.075 g/L 的混合液。

1.2 动物分组与处理

小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、姜黄素组、L-精氨酸组、阿托品组、姜黄素+L-精氨酸联合组、姜黄素+阿托品联合组, 共 6 组, 每组 9 只。对照组、L-精氨酸组、阿托品组给予溶媒溶液灌胃, 1 次/d, 0.2 ml/次, 共 15 d。姜黄素组、姜黄素+(L-精氨酸)联合组、姜黄素+阿托品联合组给予姜黄素 (200 mg/kg) 混悬液灌胃, 1 次/d, 0.2 ml/次, 共 15 d。从灌胃的第 11 天开始, L-精氨酸组、姜黄素+(L-精氨酸)联合组分别给予 0.2 ml L-精氨酸 (2 g/kg) 混悬液灌胃, 1 次/d, 0.2 ml/次, 共 5 d。阿托品组、姜黄素+阿托品联合组于小鼠测量胃排空前 40 min 腹腔注射阿托品 (0.5 mg/kg) 混合液 1 次。其余组给予等量溶媒溶液灌胃及生理盐水腹腔注射作为对照。

1.3 胃排空率的检测

在末次灌胃结束后, 各组小鼠禁食 24 h 并自由饮水, 处死小鼠前 20 min 时, 分别给予 0.8 ml 80% 质量分数的亚甲蓝混悬液灌胃。脱臼处死小鼠并腹腔解剖, 结扎胃贲门部和幽门部, 切取胃并称其全质量, 然后洗去胃内容物, 再次称取胃净质量, 计算胃排空率。胃排空率 (%) = $1 - (\text{胃全质量} - \text{胃净质量}) / 0.8 \text{ ml 亚甲蓝混悬液质量} \times 100\%$ 。

1.4 胃组织 AChE 活力的检测

分别取各组小鼠的新鲜胃组织, 用高通量组织匀浆机研磨成 10% 体积分数的组织匀浆, 低温离心后取上清液。严格按照 AChE 试剂盒说明书进行操作, 反应结束后将最终显色的反应液转移到 96 孔板, 使用全自动酶标仪检测在波长 412 nm 时的吸光度值, 然后根据每毫克组织蛋白计算组织匀浆中 AChE 活力。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应对胃组织 AChE mRNA 的检测

取冷藏于 -80°C 冰箱的各组胃组织 50 mg, 用

硅胶柱纯化方式提取胃组织的总 RNA，逆转录成 cDNA，用 LightMix® 试剂盒进行实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)，以 GAPDH 作为内参。反应条件为：95℃ 3 min，95℃ 10 s，60℃ 20 s，72℃ 30 s，共 40 个循环。每样本采用 3 管，计算其平均 Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。AchE 正向引物：5'-ACCTGCTTCTCCCACACCT-3'，反向引物：5'-GGTCCCCTCGGTAGTTCA-3'；内参照 GAPDH 基因正向引物：5'-CGGACTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'，反向引物：5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。

1.6 Western blot 法检测 AchE

提取各组小鼠胃组织蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，电转至 PVDF 膜上。将转移好的 PVDF 膜浸入脱脂奶粉中以阻止后续非特异性结合；PBST 洗涤 3 次后用 AchE 抗体孵育 1 h (37℃)；再用同样方法洗涤、孵育二抗；洗涤之后在 PVDF 膜上滴加 DAB 发光染色液，在数码冷光成像分析系统中成像，然后分析条带灰度值，并与相应 β -actin 的灰度值比较得到相对值。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件，计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，各组数据符合正态分布且方差齐的条件，组间两两比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 L-精氨酸所致的小鼠胃排空障碍及 AchE 的影响

与对照组比较，L-精氨酸组小鼠胃排空率降低 ($t=4.684, P=0.000$)，AchE mRNA、AchE 蛋白表达及 AchE 活力均下降 ($t=7.250、6.626$ 和 4.933 ，均 $P=0.000$)；与 L-精氨酸组比较，姜黄素 + (L-精氨酸) 联合组小鼠胃排空率改善 ($t=3.153, P=0.003$)，AchE mRNA、AchE 蛋白表达及 AchE 活力均升高 ($t=4.165、3.718$ 和 $2.936, P=0.000、0.001$ 和 0.007)；姜黄素 + (L-精氨酸) 联合组与对照组比较上述指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。单用姜黄素组与对照组比较上述指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1 和附图。

2.2 姜黄素对阿托品所致的小鼠胃排空障碍及 AchE 的影响

由表 2 和附图可见，与对照组比较，阿托品组胃排空率降低 ($t=6.855, P=0.000$)，其 AchE mRNA、

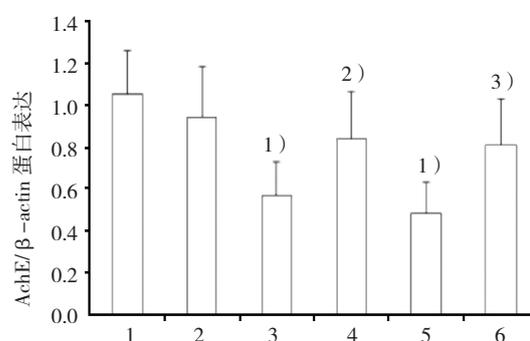
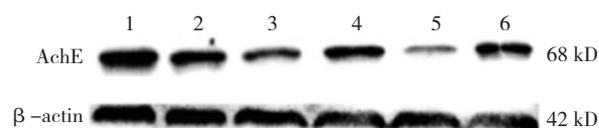
AchE 蛋白表达及 AchE 活力均降低 ($t=6.559、5.454$ 和 4.094 ，均 $P=0.000$)；与阿托品组比较，姜黄素 + 阿托品联合组胃排空率改善 ($t=6.398, P=0.000$)，其

表 1 姜黄素对 L-精氨酸所致的小鼠胃排空及 AchE 的影响 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	胃排空率 /%	AchE mRNA 表达	AchE 活力 / (u/mg)
对照组	68.94 \pm 10.96	1.00 \pm 0.20	0.78 \pm 0.13
姜黄素组	62.00 \pm 13.84	0.89 \pm 0.20	0.70 \pm 0.16
L-精氨酸组	41.43 \pm 13.78	0.47 \pm 0.09	0.50 \pm 0.11
姜黄素 + (L-精氨酸) 联合组	60.32 \pm 11.54	0.80 \pm 0.22	0.69 \pm 0.19
F 值	8.440	18.348	6.395
P 值	0.000	0.000	0.002

表 2 姜黄素对阿托品所致的小鼠胃排空率及 AchE 的影响 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	胃排空率 /%	AchE mRNA 表达	AchE 活力 / (u/mg)
对照组	68.94 \pm 10.96	1.00 \pm 0.15	0.77 \pm 0.14
姜黄素组	62.00 \pm 13.84	0.93 \pm 0.20	0.74 \pm 0.18
阿托品	37.77 \pm 8.12	0.58 \pm 0.12	0.49 \pm 0.15
姜黄素 + 阿托品联合组	63.75 \pm 9.08	0.82 \pm 0.19	0.72 \pm 0.10
F 值	14.539	18.348	7.241
P 值	0.000	0.000	0.001



1: 对照组; 2: 姜黄素组; 3: 阿托品组; 4: 姜黄素 + 阿托品联合组; 5: L-精氨酸组; 6: 姜黄素 + (L-精氨酸) 联合组; 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与阿托品组比较, $P < 0.05$; 3) 与 L-精氨酸组比较, $P < 0.05$

附图 各组小鼠胃组织中 AchE 蛋白表达

AchE mRNA、AchE 蛋白表达及 AchE 活力均升高 ($t = 3.204$ 、 2.978 和 3.827 , $P = 0.005$ 、 0.010 和 0.003), 上述指标虽未完全恢复至正常, 但与对照组比较差异已无统计学意义 ($P > 0.05$)。单用姜黄素组与对照组比较上述指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

L-精氨酸和阿托品均可造成功能性胃肠蠕动障碍。其中 L-精氨酸是 NO 前体, 在体内被一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化生成 NO, NO 由鸟苷酸环化酶激活经环磷酸鸟苷^[5], 作用于化学门控的钙释放通道, 引起细胞内 Ca^{2+} 库释放的 Ca^{2+} 减少, 从而松弛胃肠道平滑肌, 抑制胃肠道蠕动。也有研究认为 NO 可直接抑制 Ach 的释放而起松弛平滑肌的作用^[6]。阿托品作为 M 胆碱受体阻断剂能够阻断 Ach 与相应受体结合, 从而使胃肠平滑肌松弛, 降低胃肠蠕动的频率和幅度, 从而使胃肠蠕动障碍。两者造成胃肠蠕动障碍均与 Ach 有关, Ach 作为胃肠的兴奋性神经递质, 由神经末梢释放后, 与 M 胆碱能受体结合, 激活 G 蛋白^[7] 与磷脂酶 C 结合分解生成第二信使, 从而参加一系列级联反应, 引起细胞内 Ca^{2+} 增加, 引起平滑肌收缩^[8]。与胆碱受体结合后和未与胆碱受体结合的 Ach 迅速被 AchE 水解成胆碱和乙酸被回收到神经末梢作为生成 Ach 的原料。本研究中采用的试剂盒就是通过检测胆碱的数量得到 AchE 的活力, 从而反映 Ach 的释放量。结果显示, 在 L-精氨酸和阿托品造成功能性胃排空障碍时, 胃组织中 AchE 活力降低并且 mRNA 和蛋白的表达量下降, 说明外源性 NO 和阿托品引起的胃排空障碍均与 Ach 释放减少有关。给予姜黄素灌胃后可以显著改善 NO 和阿托品所致的胃排空障碍, 并且 AchE 的活力和 mRNA 以及蛋白表达均得到改善, 说明姜黄素可能通过促使 Ach 释放改善胃排空。

姜黄素在体内如何增加胃组织 Ach 释放目前尚不清楚。本实验室以往研究显示在顺铂造成的胃肠损伤中, 姜黄素可抑制小鼠胃组织 NOS 的活性从而减少 NO 的产生^[9], 姜黄素抑制 NO 产生的作用在其他研究中同样得到验证^[10-11]。如前所述, NO 可以抑制 Ach 而松弛平滑肌^[6, 12], 因而推测在 L-精氨酸模型中, 姜黄素可能是通过抑制胃组织 NO 产生进而增加 Ach 释放, 从而改善胃排空, 这可能是姜黄素发挥作用的机制之一。在阿托品模型中, 姜黄素预先灌胃使 Ach 释

放量增加的具体机制尚不清楚, 但是姜黄素对多种疾病模型中 Ach 以及 AchE 的研究有类似报道。服用姜黄素的大鼠可提高机体中谷胱甘肽水平及 AchE 活性, 可以减轻秋水仙素引起的大鼠因脂质过氧化而产生的认知功能障碍^[13]。姜黄素可使镉中毒小鼠脑内 AchE 的活力显著提高并且呈现剂量依赖性^[14]。姜黄素还促进大鼠脑组织 Ach 释放, 这是改善因 β -淀粉样蛋白诱导的炎症反应所致的阿尔茨海默病的机制之一^[15]。

综上所述, 在外源性 NO 和阿托品造成的两种功能性胃排空障碍的模型中, 姜黄素均可通过影响 Ach 的释放而改善小鼠的胃排空, 这也为将来姜黄素对胃肠功能的研究提供思路。姜黄素的药理作用广而毒副作用小, 近期又制备出了提高姜黄素溶解性的复合材料^[16], 相信未来一定有广阔的前景。

参 考 文 献:

- [1] FENG T, WEI Y, LEE R J, et al. Liposomal curcumin and its application in cancer[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12(1): 6027-6044.
- [2] HUSSAIN Z, THU H E, AMJAD M W, et al. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives[J]. *Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications*, 2017, 77(1): 1316-1326.
- [3] 孙瑛璘. 姜黄素通过减轻乙酰胆碱含量变化改善顺铂引起的小鼠胃排空障碍 [D]. 青岛: 青岛大学, 2016.
- [4] YU J, XU W H, SUN W, et al. Curcumin alleviates the functional gastrointestinal disorders of mice in vivo[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2017, 20(12): 1176-1183.
- [5] VIEIRA A B, COELHO L P, INSUELA D B, et al. Mangiferin prevents guinea pig tracheal contraction via activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71759-71770.
- [6] ISLAM M Z, VAN D C, SHIRAIISHI M, et al. Methylmercury affects cerebrovascular reactivity to angiotensin II and acetylcholine via rho-kinase and nitric oxide pathways in mice[J]. *Life Sciences*, 2016, 147(2): 30-38.
- [7] WOLTERS V, KRASEL C, BROCKMANN J, et al. Influence of gap on the dynamics of m3-acetylcholine receptor-g-protein-coupled receptor kinase 2 interaction[J]. *Molecular Pharmacology*, 2015, 87(1): 9-17.
- [8] SONG X, ZHAO C, DAI C, et al. Suppression of the increasing level of acetylcholine-stimulated intracellular Ca^{2+} in guinea pig airway smooth muscle cells by mabuterol[J]. *Biomedical Reports*, 2015, 3(6): 778-786.
- [9] 徐韶宁, 刘艳婷, 孙一, 等. 姜黄素灌胃改善顺铂小鼠胃排空与一氧化氮的相关性 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(5): 24-27.
- [10] PURWAR B, SHRIVASTAVA A, ARORA N, et al. Effects of

- curcumin on the gastric emptying of albino rats[J]. *Indian Journal of Physiology & Pharmacology*, 2012, 56(56): 168-173.
- [11] ZHU W, SU J, LIU J, et al. The involvement of neuronal nitric oxide synthase in the anti-epileptic action of curcumin on pentylenetetrazol-kindled rats[J]. *Biomed Mater Eng*, 2015, 26(s1): S841-S850.
- [12] HRYHORENKO L M, WOSKOWSKA Z, FOX-THRELKELD J A. Nitric oxide (NO) inhibits release of acetylcholine from nerves of isolated circular muscle of the canine ileum: relationship to motility and release of nitric oxide[J]. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 1994, 271(2): 918-926.
- [13] KHURANA S, JAIN S, MEDIRATTA P K, et al. Protective role of curcumin on colchicine-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2012, 31(7): 686-697.
- [14] ABU-TAWHEEL G M. Effects of curcumin on the social behavior, blood composition, reproductive hormones in plasma and brain acetylcholinesterase in cadmium intoxicated mice[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016, 23(2): 219-228.
- [15] LIU Z J, LI Z H, LIU L, et al. Curcumin attenuates beta-amyloid-induced neuroinflammation via activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma function in a rat model of alzheimer's disease[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7(1): 261-273.
- [16] KURNIAWANSYAH F, QUACHIE L, MAMMUCARI R, et al. Improving the dissolution properties of curcumin using dense gas antisolvent technology[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 521(1): 239-248.

(张西倩 编辑)