

· 实验研究 ·

姜黄素对内毒素休克兔急性肾损伤的影响

陈壮林 李跃祥 余剑波 王飞 孙莹 宋禹

【摘要】 目的 探讨姜黄素对内毒素休克兔急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的影响及其可能机制。**方法** 健康雄性新西兰大白兔 40 只, 2 月龄, 随机分为四组: 对照组(C 组)、姜黄素对照组(Cur 组, 姜黄素 50 mg/kg)、内毒素休克组(L 组, 脂多糖 5 mg/kg)和姜黄素预处理组(CurL 组, 姜黄素 50 mg/kg, 30 min 后予脂多糖 5 mg/kg), 每组 10 只。给予脂多糖后 6 h 测定血尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)浓度并处死兔。观察肾组织病理变化并进行肾损伤评分。采用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性, 硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)浓度, RT-PCR 法检测肾组织 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达量, Western blot 法检测肾组织中 Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白及 HO-1 蛋白含量。**结果** C 组和 Cur 组肾单位结构未见明显异常。L 组肾小球皱缩, 肾小管上皮细胞肿胀、空泡形成或脱落, 肾间质水肿, 大量炎性细胞浸润。CurL 组病理改变较 L 组明显减轻。与 C 组比较, L 组及 CurL 组肾损伤评分、BUN、Cr 及 MDA 浓度明显升高, SOD 活性明显降低, 肾组织 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达量、Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白及 HO-1 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。与 L 组比较, CurL 组肾损伤评分、BUN、Cr 及 MDA 浓度明显降低, SOD 活性明显升高, 肾组织 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达量、Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白及 HO-1 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。**结论** 姜黄素可以减轻内毒素休克兔的 AKI, 其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

【关键词】 姜黄素; 转录因子 NF-E2 相关因子 2; 内毒素休克; 急性肾损伤

Effects of curcumin on acute kidney injury in endotoxic shock rabbits CHEN Mulin, LI Yuexiang, YU Jianbo, WANG Fei, SUN Ying, SONG Yu. Department of Anesthesiology, Tianjin Xiqing Hospital, Tianjin 300380, China

Corresponding author: LI Yuexiang, Email: xqlyx640221@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of curcumin on acute kidney injury in endotoxic shock rabbits and discuss the possible mechanism. **Methods** Forty healthy male New Zealand white rabbits aged 2 months were randomly divided into 4 groups: control group (group C), curcumin control group (group Cur, curcumin 50 mg/kg), endotoxic shock group (group L, LPS 5 mg/kg) and curcumin pretreatment group (group CurL, curcumin 50 mg/kg, LPS 5 mg/kg 30 minutes later), 10 in each group. The concentrations of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) were detected, and the rabbits were sacrificed 6 h after LPS treatment. The pathological changes of renal tissue were examined and the pathological scores were recorded. SOD activities were measured by xanthine oxidase method. MDA contents were assayed according to thiobarbituric acid method. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to investigate the mRNA levels of Nrf2 and HO-1. The expressions of Nrf2 total protein, Nrf2 nuclear protein and HO-1 protein in the renal tissue were determined by Western blot. **Results** No abnormal structures were visible in groups C and Cur. The histopathological changes of the kidneys included glomerular shrinkage, cellular swelling, vacuolization and desquamation in tubules, interstitial edema and massive inflammatory cells infiltration in group L. Compared with group C, the pathological manifestations was relieved obviously in group CurL. Compared with group C, the pathological score, the concentrations of BUN, Cr, and MDA were obviously increased, while SOD activity was significantly decreased, the mRNA expression of Nrf2 and HO-1, the protein levels of Nrf2 total, Nrf2 nuclear and HO-1 in the renal tissues were distinctly increased in groups L and CurL ($P < 0.05$). Compared with group L, the pathological score, the concentrations of BUN, Cr and MDA were obviously decreased, while SOD

DOI:10.12089/jca.2018.02.016

作者单位: 300380 天津市西青医院麻醉科(陈壮林、李跃祥、王飞、孙莹、宋禹); 天津市南开医院麻醉科(余剑波)

通信作者: 李跃祥, Email: xqlyx640221@sina.com

activity was significantly increased, the mRNA expression of Nrf2 and HO-1, the protein levels of Nrf2 total, Nrf2 nuclear and HO-1 in the renal tissues were significantly increased in group CurL ($P < 0.05$). **Conclusion** Curcumin can ameliorate acute kidney injury induced by endotoxemic shock in rabbits, and its mechanism may be related to activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway.

【Key words】 Curcumin; NF-E2-related factor 2; Endotoxemic shock; Acute kidney injury

肾脏是内毒素休克最易受累的器官之一,而肾损伤的严重程度直接影响到内毒素休克的预后^[1]。姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、促进免疫调节等作用,且毒性低、不良反应小^[2],在急性炎症的防治、恶性肿瘤治疗等方面的研究较多,但其在内毒素性肾损伤中的作用及其机制少见报道。本研究通过制备兔内毒素休克急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)模型,探讨姜黄素对内毒素休克肾损伤的影响,并进一步探讨其可能机制,为内毒素休克肾损伤防治提供参考。

材料与方法

实验动物与分组 健康清洁雄性新西兰大白兔 40 只,2 月龄,体重 2.0~2.5 kg,由天津市中国医学科学院生物工程研究所提供[许可证号:SCXK(京)2011-0008]。室温(18~22℃)饲养 1 周,实验前禁食 24 h,自由饮水。采用随机数字法分为四组:对照组(C 组)、姜黄素对照组(Cur 组)、内毒素休克组(L 组)、姜黄素预处理组(CurL 组),每组 10 只。

主要试剂与仪器 姜黄素,脂多糖(LPS);丙二醛(MDA)浓度测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性测定试剂盒;RT-PCR 试剂盒、总 RNA 提取试剂盒;蛋白提取试剂盒; β -actin;抗兔血红蛋白加氧酶 1(HO-1)多克隆抗体;兔 Nrf2 多克隆抗体。BX51 光学显微镜、荧光显微镜;多功能酶标仪;Quantity One 凝胶成像分析系统;LineGene 9620 实时定量 PCR 仪。

实验方法 实验兔经耳缘静脉缓慢注射 20% 乌拉坦 5 ml/kg 麻醉后固定,颈部备皮消毒,常规铺巾。取颈部正中切口,1%利多卡因局麻,切皮,分离气管和左侧颈内动脉。行气管插管及左侧颈内动脉置管,保留自主呼吸,连续监测动脉血压。血压稳定 30 min 后对各组兔进行实验处理。Cur 组经耳缘静脉注射姜黄素 50 mg/kg(溶剂为 DMSO 0.08 ml/kg),30 min 后注射生理盐水 2 ml;L 组注射生理盐水 0.08 ml/kg,30 min 后注射 LPS 5 mg/kg(溶于 2 ml 生理盐水);CurL 组注射姜黄素 50 mg/kg,30 min 后注射 LPS 5 mg/kg;C

组分别注射等容量生理盐水。静脉注射 LPS 或生理盐水后 6 h 经心脏采血 5 ml,离心 15 min(4℃, 3 000 r/min)。采用全自动生化分析仪测定血尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)浓度。放血处死兔,取双肾组织,用 4℃磷酸盐缓冲盐水冲洗肾组织表面血渍,左肾组织用液氮罐速冻后保存于-80℃低温冰箱,右肾组织用 10%福尔马林溶液固定备用。

肾组织病理的观察 取 10%福尔马林溶液固定的右肾组织,脱水、石蜡包埋、切片(厚 5 μ m)、HE 染色。光学显微镜下观察肾组织病理学变化。参照文献[3]介绍的方法,每张切片随机选取 10 个视野于光学显微镜下观察,进行肾组织损伤评分。肾组织损伤评分标准:(1)近曲小管改变:1 分,小管上皮扇贝样改变,伴有细胞刷状缘着色斑片状脱失;2 分,上皮细胞肿胀或增厚,伴有刷状缘着色部分脱失;3 分,上皮细胞显著肿胀或有空泡形成,刷状缘着色脱失>50%。(2)小管扩张和上皮增厚:1 分,<25%;2 分,25%~50%;3 分,>50%。(3)小管坏死/细胞碎裂:1 分,<25%;2 分,25%~50%;3 分,>50%。(4)小管上皮/基底膜剥离:1 分,偶发;2 分,片状(尤其在肾髓质);3 分,肾髓质和皮质多发。(5)小管上皮细胞凋亡:1 分,<10%;2 分,10%~50%;3 分,>50%。

肾组织丙二醛(MDA)浓度和超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 取-80℃保存的左肾组织制备匀浆,采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 浓度,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。

Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达量的测定 按照总 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取肾组织总 RNA,进行 RT-PCR。采用荧光定量 PCR 仪测定 β -actin、HO-1 及 Nrf2 的 C_T 值,采用 SDS 软件以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法相对定量分析 HO-1 和 Nrf2 mRNA 表达量。

肾组织 Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白和 HO-1 蛋白含量的测定 取-80℃左肾组织制备匀浆,按说明提取肾组织中 Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白及 HO-1 蛋白,离心,取上清液进行蛋白定量。在暗室中用增强化学发光液进行显色与曝光,采用 Quantity One 凝胶成像分析系统进行扫描,以目的蛋白与 β -actin 条带积分光密度值的比值反映目的蛋白的相

对含量。

统计分析 采用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

肾组织病理观察 C 组和 Cur 组肾单位完整,肾小球和肾小管结构及细胞形态无明显异常。L 组和 CurL 组肾单位结构清晰度明显下降,肾小球皱缩,肾小球内大量炎性细胞浸润;肾小管管腔扩张、管型形成,部分肾小管上皮细胞肿胀、空泡形成或脱落;肾间质出血、水肿,大量炎性细胞浸润。与 L 组比较,CurL 组上述病理改变明显减轻(图 1)。

血清学及肾组织损伤评分、MDA 浓度和 SOD 活性 与 C 组比较,L 组和 CurL 组血 BUN 和 Cr 浓度、肾损伤评分明显升高,肾组织 MDA 浓度明显升高,SOD 活性明显降低($P < 0.05$);与 L 组比较,CurL 组 BUN 和 Cr 浓度、肾损伤评分明显降低,肾组织 MDA 浓度明显降低,SOD 活性明显升高($P < 0.05$);C 组和 Cur 组以上指标差异均无统计学意义(表 1)。

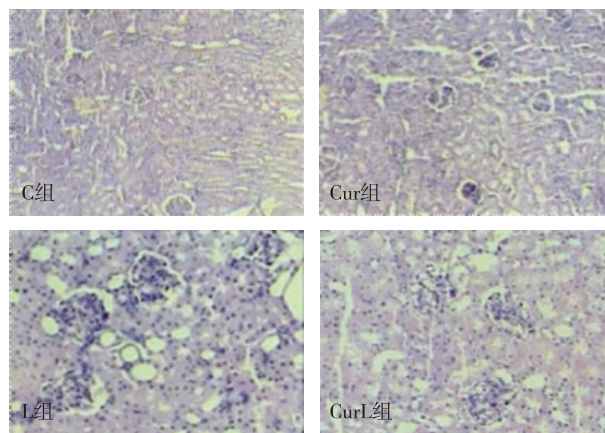


图 1 四组兔肾组织病理学改变(HE, ×200)

RT-PCR 及 Western blot 结果 与 C 组比较,L 组和 CurL 组 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达量、Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白和 HO-1 蛋白含量明显增加($P < 0.05$);与 L 组比较,CurL 组 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达量、Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白和 HO-1 蛋白含量明显增加($P < 0.05$);C 组和 Cur 组以上指标差异均无统计学意义(表 2)。

讨 论

脓毒症是临床常见的危急重症,常可导致肾

表 1 四组兔血 BUN、Cr 浓度、肾损伤评分、肾组织 MDA 浓度和 SOD 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	BUN (mmol/L)	Cr (μ mol/L)	肾损伤评分 (分)	MDA (nmol/mg)	SOD (nU/mg)
C 组	10	8.13±0.60	75.73±6.95	1.96±0.80	5.87±0.82	169.67±7.49
Cur 组	10	8.55±0.46	76.17±5.88	2.02±0.96	5.93±0.76	172.11±7.49
L 组	10	16.63±0.92 ^{ab}	160.88±9.75 ^{ab}	9.46±0.70 ^{ab}	12.54±1.02 ^{ab}	99.66±7.10 ^{ab}
CurL 组	10	13.78±0.78 ^{abc}	130.83±8.35 ^{abc}	6.24±0.65 ^{abc}	9.23±1.17 ^{abc}	130.63±5.39 ^{abc}

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 Cur 组比较,^b $P < 0.05$;与 L 组比较,^c $P < 0.05$

表 2 四组兔肾组织 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达量及 Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白和 HO-1 蛋白含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin	Nrf2 总蛋白	Nrf2 核蛋白	HO-1 蛋白
C 组	10	0.97±0.04	0.96±0.03	0.86±0.06	0.58±0.07	0.39±0.05
Cur 组	10	0.99±0.02	0.98±0.04	0.84±0.06	0.60±0.06	0.39±0.07
L 组	10	2.17±0.42 ^{ab}	2.01±0.25 ^{ab}	1.30±0.12 ^{ab}	1.03±0.06 ^{ab}	0.63±0.07 ^{ab}
CurL 组	10	2.87±0.36 ^{abc}	2.83±0.33 ^{abc}	1.65±0.10 ^{abc}	1.37±0.09 ^{abc}	0.95±0.21 ^{abc}

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 Cur 组比较,^b $P < 0.05$;与 L 组比较,^c $P < 0.05$

脏、肺脏、肝脏及心血管等机体重要脏器损伤,在脓毒症休克患者中,AKI 发生率达 41%~78%,被认为是脓毒症休克死亡风险的独立危险因素^[1]。内毒素可通过炎症级联反应、氧化应激及直接肾损伤等作用参与脓毒症的 AKI 过程^[4]。本研究结果显示,给予内毒素后,肾损伤评分、血 BUN 和 Cr 浓度明显升高,表明出现了严重的 AKI,而肾组织中 MDA 浓度明显升高,SOD 活性显著下降,提示氧化应激参与了内毒素休克导致的兔 AKI 发病过程,与既往研究^[3]结果一致。

HO-1 是血红素加氧酶的 3 种同工酶之一,可限速降解血红素生成胆红素、铁及一氧化碳,并与上述酶解产物共同发挥抗炎及抗氧化作用^[5]。Nrf2 是一种内源性的抗氧化应激调节因子,生理状态下,Nrf2 与胞浆蛋白 Keap-1 以异二聚体非活性状态存在于细胞质中;当机体受到氧化应激或亲电子化学物质刺激时,Nrf2 磷酸化或 Keap-1 构象改变,Nrf2 与 Keap-1 解耦联,转位进入细胞核,与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合,调节血 HO-1 及 SOD 等抗氧化酶表达^[6]。Yu 等^[7]研究发现,内毒素引起的氧化应激可诱导 Nrf2 核转位,上调 HO-1 等抗氧化酶的表达,发挥自身抗氧化应激作用。本研究中,L 组和 CurL 组在给予内毒素后,肾组织 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达上调,Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白及 HO-1 蛋白含量增加,SOD 活性增强,提示内毒素作为外源性化学物质激活 Nrf2/ARE-HO-1 通路,调动机体自身抗氧化损伤系统抵抗外界氧化应激。

姜黄素是从植物姜黄中提取的一种多酚类物质,由 2 个酚羟基、2 个不饱和酮双键和 1 个 β -双酮/烯醇式结构,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤及抗病毒等多种作用^[8]。郑丹等^[9]对百草枯中毒大鼠进行姜黄素干预处理后,发现肾脏 Nrf2 水平上调,HO-1 和 SOD 活性增强,表明姜黄素可能通过 Nrf2 途径提高肾组织抗氧化水平,减轻百草枯中毒大鼠急性肾氧化损伤。本研究结果显示,姜黄素预处理组,肾组织 Nrf2 及 HO-1 mRNA 表达进一步上调,Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白及 HO-1 蛋白含量升高,SOD 活性升高,提示姜黄素预处理增加

Nrf2 及其下游蛋白表达,提高机体抗氧化损伤能力,从而减轻内毒素休克所致肾损伤。

在本研究中 BUN 和 Cr 作为肾损伤的标志,但在临床中并不能及时发现早期肾损伤,因此在脓毒症患者中,应该选用更具敏感性和特异性的指标进行评估。课题组后期将在本实验的基础上增加 Nrf2/HO-1 通路阻断剂,明确姜黄素在该通路中的作用位点,并探讨其上游通路。关于姜黄素减轻内毒素休克肾损伤是否存在其他机理,尚有待进一步研究。

综上所述,姜黄素可能通过诱导 Nrf2 核转位,增加 HO-1 蛋白含量,提高机体抗氧化损伤能力,从而减轻内毒素休克所致肾损伤。

参 考 文 献

- [1] Alobaidi R, Basu RK, Goldstein SL, et al. Sepsis-associated acute kidney injury. *Semin Nephrol*, 2015, 35(1): 2-11.
- [2] Priyadarsini KI. Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(11): 2093-2100.
- [3] 张晓,史佳,余剑波,等. 蛋白激酶 C 激活在兔内毒素休克诱发急性肾损伤中的作用. *中国中西医结合外科杂志*, 2016, 22(1): 34-37.
- [4] Zarbock A, Gomez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care*, 2014, 20(6): 588-595.
- [5] 申力军,辛绍杰,万志红. HO-1 在肝肾疾病中的作用研究进展. *现代生物医学进展*, 2017, 17(6): 1172-1175.
- [6] Pullarkat V, Meng Z, Tahara SM, et al. Proteasome inhibition induces both antioxidant and hbf responses in sickle cell disease via the nrf2 pathway. *Hemoglobin*, 2014, 38(3): 188-195.
- [7] Yu JB, Shi J, Zhang Y, et al. Electroacupuncture ameliorates acute renal injury in lipopolysaccharide-stimulated rabbits via induction of HO-1 through the PI3K/Akt/Nrf2 pathways. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0141622.
- [8] 李军,熊琨,龚元,等. 基于信号转导通路的姜黄素抗氧化机制研究进展. *中草药*, 2016, 47(13): 2373-2380.
- [9] 郑丹,韩文文,洪广亮,等. 姜黄素对百草枯中毒大鼠急性肾氧化损伤的干预作用. *温州医科大学学报*, 2016, 46(6): 391-396.

(收稿日期:2017-06-03)