



韩铁岭,石燕霞,安彩红,等.姜黄素抑制氧化应激减轻单侧输尿管梗阻大鼠肾脏间质纤维化[J].黑龙江农业科学,2019(4):90-93,94.

# 姜黄素抑制氧化应激减轻单侧输尿管梗阻大鼠肾脏间质纤维化

韩铁岭<sup>1</sup>,石燕霞<sup>1</sup>,安彩红<sup>1</sup>,杨 昊<sup>1</sup>,宋元明<sup>1</sup>,张学明<sup>2</sup>,闫巧梅<sup>2</sup>,丁海麦<sup>2</sup>

(1.包头医学院 巴彦淖尔临床医院,内蒙古 巴彦淖尔 015000;2.包头医学院 基础医学与法医学院,内蒙古 包头 014040)

**摘要:**为研究姜黄素对单侧输尿管阻塞大鼠肾间质纤维化可能的干预机制。将SD大鼠随机分为假手术组(Sham)、对照组(UUO)、UUO+50 mg·kg<sup>-1</sup>姜黄素组,UUO+75 mg·kg<sup>-1</sup>姜黄素组,每组6只,均于手术当天晚上灌胃给药,每24 h给药1次。第14天处死取肾组织,Masson染色光学显微镜下肾脏组织病理变化、试剂盒检测肾组织匀浆液丙二醛(MDA)含量,谷胱甘肽S转移酶(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活力;RT-PCR法检测核转录相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶(HO-1)mRNA表达。结果表明:与Sham组比较,UUO组和姜黄素干预组MDA含量均升高,GSH、SOD、CAT活力均显著降低,Nrf2和HO-1 mRNA表达显著升高;UUO组与姜黄素干预组比较,姜黄素干预组MDA含量显著降低,GSH、SOD、CAT显著升高,Nrf2和HO-1 mRNA表达显著升高;UUO组肾小球囊间隙增大,排列紊乱,胶原纤维增多,明显纤维化变性,姜黄素干预组病理表现较UUO组明显减轻。姜黄素能减轻单侧输尿管梗阻大鼠肾脏间质纤维化,其机制可能是通过诱导肾组织Nrf2表达,上调HO-1、SOD等抗氧化酶水平,提高肾组织抗氧化应激水平。

**关键词:**姜黄素;Nrf2;间质纤维化;氧化应激

肾间质纤维化是多种慢性肾病(CKD)的常见病理特征,也是导致终末期肾病(ESRD)的根本病理改变之一。肾小管间质纤维化能评价动物模型和人类肾功能指标<sup>[1]</sup>。因此阻断、逆转肾小管间质纤维化过程可能是阻止CKD进展的一种方法。已有研究证实肾脏内氧化应激增强或氧化还原失衡与肾功能障碍相关<sup>[2-3]</sup>。氧化应激损伤参与大多数肾脏疾病的病理过程,其产生的氧自由基也是TGF-β1诱导肾近曲小管上皮细胞(PTEC)上皮间质转化的重要媒介。核转录因子E2相关因子(Nrf2)在细胞防御中发挥重要作用,进入细胞核后与靶基因相结合调控其下游的多种抗氧化酶类和解毒酶的表达,研究表明当Nrf2发生激活障碍或缺失,就会使细胞处于氧化应激状态,可加重氧化应激源的细胞毒性,导致细胞功能障碍、凋亡等<sup>[4]</sup>。

姜黄素是从姜科植物姜黄等根茎中分离出的

一种低分子量多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗纤维化等作用,且不良反应小<sup>[5]</sup>。研究表明CCl<sub>4</sub>所致的大鼠肝脏纤维化模型中姜黄素可上调肝脏Nrf2表达减轻纤维化进程<sup>[6]</sup>。推断,Nrf2在预防肾氧化性损伤过程中发挥重要的作用,可能是预防或减轻氧化应激诱导肾损伤的一个重要靶点。姜黄素能否通过抑制肾氧化应激对抗肾间质纤维化有待研究,本试验通过姜黄素激活肾Nrf2信号通路,研究姜黄素抑制肾氧化应激减轻肾间质纤维化机制,旨在为阻断肾小管间质纤维化过程提供一种方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试大鼠 健康雄性SD大鼠24只,49日龄,体重(180.20±8.35)g,购自内蒙古大学动物饲养室。人工光照、阴暗各12 h,25℃恒温、相对湿度45%左右,给予标准的颗粒饲料、自然饮水适应性喂养7 d。

1.1.2 药物及仪器 戊巴比妥钠(包头医学院机能实验室提供);姜黄素(Sigma公司);总RNA提取试剂盒(动物组织总RNA提取试剂盒)、反转录试剂盒(FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂)、定量PCR(SuperReal荧光

收稿日期:2018-10-14

基金项目:内蒙古自然科学基金(2016MS(LH)0306);内蒙古自治区大学生创业实践项目(201710127008);包头医学院花蕾计划(2017BYJJ-HL-08)。

第一作者简介:韩铁岭(1996-),男,在读学士,专业为临床医学。E-mail: 441760784@qq.com。

通讯作者:丁海麦(1975-),男,硕士,副教授,从事慢性肾病研究。E-mail:dinghaimai@126.com。

定量预混试剂彩色版 SYBR Green)试剂盒均购自天根生化科技有限公司;引物博迈德生物技术有限公司;Masson 染液、氧化抗氧化试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;ABI 实时荧光定量 PCR 仪 SteponePlus 购自美国 Applied Biosystems 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 分组、动物造模及给药 分组:将 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham),对照组(UUO),50 mg·kg<sup>-1</sup>姜黄素干预组,75 mg·kg<sup>-1</sup>姜黄素干预组,每组 6 只。

造模:术前器械消毒,腹腔内注射 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,将大鼠俯卧位固定于鼠板,常规消毒,戴无菌手套,铺无菌孔巾,腹部切口,充分暴露右肾脏,用小弯镊轻轻剥离肾下极部分包膜及肾蒂处包膜,分离右侧输尿管,UUO 组和褪黑素处理组,用 4-0 丝线在近右肾下极处结扎右侧输尿管(在紧靠肾盂处约 1 cm 处结扎输尿管),逐层缝合腹壁各层及腹部皮肤,青霉素消毒,包裹无菌纱布。Sham 组大鼠仅做分离,不结扎右侧输尿管,其余处理同上。

给药:分别将姜黄素溶于生理盐水配置成 50 和 75 mg·mL<sup>-1</sup>溶液。给姜黄素组大鼠分别按体重 50 和 75 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃,均于手术当天开始灌胃给药,每 24 h 灌胃 1 次,持续 14 d。Sham 组和 UUO 组按 1 mL·kg<sup>-1</sup>生理盐水灌胃。所有动物均采用标准颗粒饲料喂养,自由进食、饮水。

1.2.2 标本收集和处理 手术后第 14 天,腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹正中切口暴露右肾并摘除,小心去除肾包膜,放出积水。沿肾冠状面用手术剪剖开,一半放入超低温冰箱中保存以提取 RNA 做实时荧光定量 PCR、氧化抗氧化检测;另一半放入 4%多聚甲醛中固定,常规脱水石蜡包埋,待做 Masson 染色。

1.2.3 肾脏组织病理分析 肾组织标本从 4%多聚甲醛中取出,酒精梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,常规切片(厚度为 3 μm),梯度脱蜡,Masson 染色,中性树胶封片,显微镜下观察肾组织病理变化。

1.2.4 肾总蛋白及氧化抗氧化检测 按照试剂盒操作测定肾组织丙二醛(MAD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽 S 转移酶(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、总蛋白(TP)。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测应用 DNA-MAN 软件设计 Nrf2 信号通路分子 Nrf2、HO-1 的特异性引物,以 β-actin 作为内参对照。引物由博迈德生物技术有限公司合成;序列:Nrf2 Forward:gac cta aag cac agc caa cac at,Reverse:ctc aat cgg ctt gaa tgt ttg tc;HO-1 Forward:tgt ccc agg att tgt ccg ag,Reverse:act ggg ttc tgc ttg ttctgc t;β-actin Forward:cgt tga cat ccg taa aga cc,Reverse:gata gag cca cca atc cac a。从超低温冰箱中取出小鼠肾脏组织,依照试剂盒说明提取大鼠肾组织 RNA,测定 260/280 nm 分析 RNA 的纯度和浓度,用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂合成 cDNA 第一条链,最后用 SuperReal 荧光定量预混试剂彩色版 SYBR Green 进行实时荧光定量 PCR。PCR 程序为:95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,70 ℃ 45 s,40 个循环。同时采用溶解曲线分析以评价 PCR 结果的可靠性。以 β-actin 为内参,用相对表达量 = 2<sup>-ΔΔCt</sup>表示待测基因相对表达水平。

1.2.6 数据分析 用 ABI Step onePlus 实时荧光定量 PCR 自带软件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠肾组织的病理改变

如图 1 所示,Sham 组肾小管、肾小球结构完整,细胞排列整齐,肾小管管腔正常,无纤维化;姜

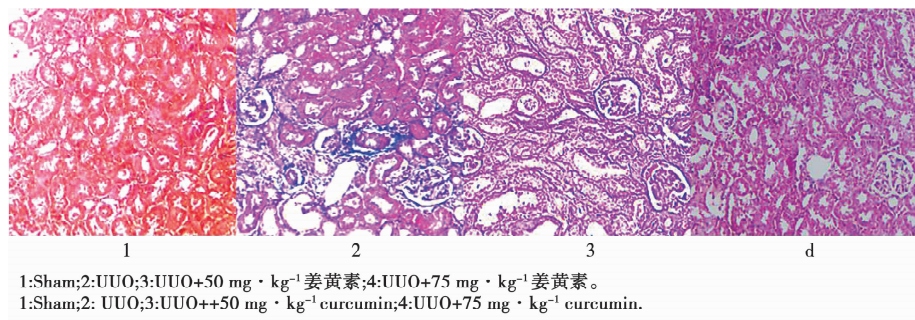


图 1 第 14 天各组大鼠肾组织病理学改变(10×)

Fig. 1 Renal tubular damage on the 14th day(10×)

黄素干预组肾小球、肾小管排列比较紧密,未见明显异常,但发生纤维化;UUO 组肾小球球囊间隙明显扩大,细胞排列紊乱,肾小管上皮细胞出现样变,并出现空泡样变性,胶原纤维明显增多,间质纤维化程度明显增加;姜黄素干预组与 UUO 组比,肾小管上皮细胞的空泡样变性、纤维化程度明显减轻,细胞排列相对整齐、紧密。

2.2 各组大鼠肾组织匀浆中 MDA、GSH 含量和 SOD、CAT 活力测定

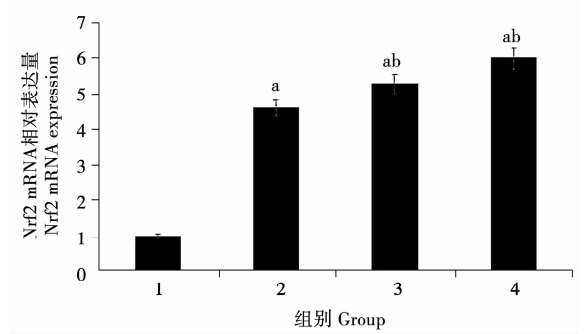
与 Sham 组相比,UUO 组和姜黄素干预组在各自处理后的第 14 天肾组织中 MDA 显著升高,

表 1 第 14 天各组大鼠肾组织匀浆 MDA、GSH、SOD 和 CAT 值的变化

Table 1 Changes of MDA,GSH,SOD and CAT in renal of rats on the 14th day

组别 Group	SOD/(U·mg <sup>-1</sup> )	GSH/(U·mg <sup>-1</sup> )	CAT/(U·mg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> )
Sham	13.99±0.59	132.35±4.64	24.42±0.72	1.54±0.09
UUO	4.18±0.39 a	42.87±2.06 a	5.59±0.81 a	5.49±0.83 a
UUO+50 mg·kg <sup>-1</sup> 姜黄素	6.17±0.55 ab	81.82±4.05 ab	7.43±1.23 ab	3.93±0.54 ab
UUO+75 mg·kg <sup>-1</sup> 姜黄素	10.27±0.76 ab	97.21±2.08 ab	13.10±1.76 ab	2.77±0.41 ab

与 Sham 组比,a:P<0.05;与 UUO 组比,b:P<0.05。下同。  
Compared with Sham group,a:P<0.05;Compared with Sham group;b:P<0.05. The same below.



1;Sham; 2;UUO; 3: UUO+50 mg·kg<sup>-1</sup>姜黄素;4:UUO+75 mg·kg<sup>-1</sup>姜黄素。  
1; Sham; 2: UUO; 3: UUO + 50 mg·kg<sup>-1</sup> curcumin;  
4;UUO+75 mg·kg<sup>-1</sup> curcumin.

GSH、SOD、CAT 活力显著下降(P<0.05);与 UUO 组比,姜黄素干预组 MDA 含量显著下降,GSH、SOD、CAT 活力均显著升高(P<0.05)。见表 1。

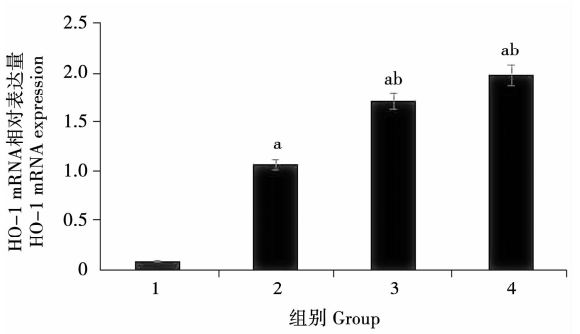
2.3 各组大鼠肾组织中 Nrf2 mRNA 表达  
由图 2 可知,Sham 组的 Nrf2 mRNA 表达较少;与 Sham 组比,UUO 组和姜黄素干预组的 Nrf2 mRNA 表达在第 14 天均有显著升高(P<0.05);与 UUO 组比,姜黄素干预组的 Nrf2 mRNA 表达也有显著升高(P<0.05),并且随姜黄素浓度升高 Nrf2 mRNA 水平也明显升高。

表 1 第 14 天各组大鼠肾组织匀浆 MDA、GSH、SOD 和 CAT 值的变化

Table 1 Changes of MDA,GSH,SOD and CAT in renal of rats on the 14th day

组别 Group	SOD/(U·mg <sup>-1</sup> )	GSH/(U·mg <sup>-1</sup> )	CAT/(U·mg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> )
Sham	13.99±0.59	132.35±4.64	24.42±0.72	1.54±0.09
UUO	4.18±0.39 a	42.87±2.06 a	5.59±0.81 a	5.49±0.83 a
UUO+50 mg·kg <sup>-1</sup> 姜黄素	6.17±0.55 ab	81.82±4.05 ab	7.43±1.23 ab	3.93±0.54 ab
UUO+75 mg·kg <sup>-1</sup> 姜黄素	10.27±0.76 ab	97.21±2.08 ab	13.10±1.76 ab	2.77±0.41 ab

与 Sham 组比,a:P<0.05;与 UUO 组比,b:P<0.05。下同。  
Compared with Sham group,a:P<0.05;Compared with Sham group;b:P<0.05. The same below.



1;Sham;2;UUO; 3: UUO+50 mg·kg<sup>-1</sup>姜黄素;4: UUO+75 mg·kg<sup>-1</sup>姜黄素。  
1; Sham; 2: UUO; 3: UUO + 50 mg·kg<sup>-1</sup> curcumin;  
4;UUO+75 mg·kg<sup>-1</sup> curcumin.

图 2 术后 14 天各组大鼠肾组织 Nrf2 mRNA 表达水平  
Fig.2 Comparison of Nrf2 mRNA expression in renal tissue 14 days after operation

图 3 术后 14 天各组大鼠肾组织 HO-1 mRNA 表达水平  
Fig.3 Comparison of HO-1 mRNA expression in renal tissue 14 days after operation

2.4 各组大鼠肾组织中 HO-1 mRNA 表达

由图 3 可知,Sham 组的 HO-1 mRNA 几乎不表达;与 Sham 组比,UUO 组和姜黄素干预组的 HO-1 mRNA 在第 14 天表达均有显著升高(P<0.05);与 UUO 组比,14 天姜黄素干预组的 HO-1 mRNA 表达显著升高,并且随姜黄素浓度升高 Nrf2 mRNA 水平也显著升高(P<0.05)。

3 结论与讨论

肾间质纤维化是几乎所有慢性肾脏疾病发展至终末期肾病的共同通路,是以肾小管基底膜增厚、肾间质成分增多及外基质沉积为主要表现,炎症反应、氧化应激、多种细胞因子及信号通路参与该过程。大鼠单侧输尿管梗阻可引起肾脏氧化损伤,进一步引发肾间质纤维化。MDA 是脂质过

氧化的产物之一,可反映脂质过氧化损伤程度。SOD、GSH 和 CAT 都是体内重要的抗氧化酶,SOD 可催化  $O_2^{\cdot-}$  生成  $O_2$  和  $H_2O_2$ ,CAT 可催化  $H_2O_2$  分解为  $H_2O$  和  $O_2$ ,而 GSH 是非蛋白的巯基化合物,可清除  $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$  等;SOD、CAT、GSH 等抗氧化酶水平能反映机体抗氧化能力<sup>[7]</sup>。血红素加氧酶(HO-1)是血红素分解代谢过程起始和限速酶,大量研究表明 HO-1 及血红素分解的胆绿素、CO 及  $Fe^{2+}$  均能起到抗氧化应激、抗炎护肾作用;正常情况下,HO-1 在肾内少量表达。Nrf2 被认为是细胞防御氧化应激损伤的关键调控因子,当受到氧化应激或亲电子试剂作用时,Nrf2 与 Keap1 解离,转移入细胞核,与抗氧化反应元件(ARE)结合后上调抗氧化酶表达,增强细胞抗氧化能力<sup>[8]</sup>。研究发现,各种氧化应激条件可激活 Nrf2,上调 HO-1、SOD、CAT、CAT 等抗氧化酶表达。本研究结果显示 UUO 组 Nrf2 mRNA 水平较 Sham 组明显升高,表明输尿管阻塞可诱导自身 Nrf2 上调,发挥抗氧化应激作用;HO-1 在 Sham 组肾组织中极低水平表达,但在 UUO 组肾组织中明显升高,表明在受到应激后体内抗氧化系统被激活。

姜黄素是从姜科植物姜黄等根茎中分离出的一种低分子量多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗纤维化等作用,且副作用小。近年来,有研究发现姜黄素对各种原因引起的急性或慢性肾功能损害均有保护作用<sup>[8]</sup>。韩文文等研究发现,姜黄素能够激活细胞的 Nrf2 通路,并诱导下游抗氧化酶类表达,减轻对氧化应激,减轻肾脏损伤<sup>[9]</sup>。本试验结果表明,与 UUO 组相比给予姜黄素组能进一步上调肾组织 Nrf2 表达水平,同时

提高肾 HO-1、SOD、CAT、GSH 等抗氧化酶活力,降低 MDA 水平,提示姜黄素可能通过 Nrf2 途径提高肾组织抗氧化能力,减轻单侧输尿管阻塞引发大鼠肾间质纤维化。

#### 参考文献:

- [1] Healy E, Brady H R. Role of tubule epithelial cells in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis induced by glomerular disease[J]. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 1998, 7(5): 525-530.
- [2] Poulianiti K P, Kaltsatou A, Mitrou G I, et al. Redox imbalance in chronic kidney disease: A systematic review[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016: 8598253. doi:10.1155/2016/8598253.
- [3] Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, et al. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: Examination with the redox state of albumin[J]. Kidney International, 2004; 66(5): 1988-1993.
- [4] Uruno A, Motohashi H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles[J]. Nitric Oxide, 2011, 25(2): 153-160.
- [5] 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[J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(6): 391-396.
- [6] Xu W, Hellerbrand C, Köhler UA, et al. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis[J]. Lab Invest, 2008, 88: 1068-78.
- [7] We T, Tian W, Liu F, et al. Protective effects of exogenous  $\beta$ -hydroxybutyrate on paraquat toxicity in rat kidney[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 447(4): 666-671.
- [8] Trujillo J, Chirino Y I, Molina-Jijón E, et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings[J]. Redox Biol, 2013, 1(1): 448-456.
- [9] 韩文文, 吴冬, 刘虹, 等. 姜黄素对急性百草枯中毒大鼠肝氧化损伤的干预[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2014, 32(5): 352-356.

## Curcumin Inhibits Oxidative Stress and Alleviates Renal Interstitial Fibrosis in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction

HAN Tie-ling<sup>1</sup>, SHI Yan-xia<sup>1</sup>, AN Cai-hong<sup>1</sup>, YANG Hao<sup>1</sup>, SONG Yuan-ming<sup>1</sup>, ZHANG Xue-ming<sup>2</sup>, YAN Qiao-mei<sup>2</sup>, DING Hai-mai<sup>2</sup>

(1. Bayan Nur Clinical Hospital, Baotou Medical College, Bayan Nur 015000, China; 2. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014060, China)

**Abstract:** To investigate the intervention mechanism of curcumin on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction, SD rats were randomly divided into Sham group, UUO group, UUO+50 mg·kg<sup>-1</sup> curcumin group, UUO+75 mg·kg<sup>-1</sup> curcumin group, 6 rats in each group, they were administered by intragastric administration on the evening of the operation, once every 24 h. Kidney tissue was sacrificed on the 14th day,