

姜黄素预处理对干热环境下不同程度中暑大鼠 肾病理损伤及氧化应激的影响

李建瑛¹, 肇寅辉¹, 康 燕², 张东辉¹, 许 琴¹, 董 翔¹, 李佳佳¹,
是文辉¹, 马 娜¹, 沈才福¹, 刘江伟^{1*}

(1. 新疆军区总医院新疆特殊环境医学重点实验室, 乌鲁木齐 830000;
2. 解放军 69240 部队医院, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 观察姜黄素预处理对不同程度中暑大鼠肾病理变化以及肾组织氧化应激水平的影响。**方法** 雄性健康SD大鼠80只,随机分为2组($n=40$):盐水对照组以及姜黄素预处理组。每组再分为4个亚组($n=10$):干热0 min组(即常温组),干热50 min组(轻度中暑组),干热100 min组(中度中暑组),干热150 min组(重度中暑组)。盐水组大鼠给予0.9%生理盐水灌胃,姜黄素组大鼠给予剂量为200 mg/kg姜黄素灌胃;各组大鼠均连续灌胃7 d。0 min组置于常温环境中,其余组放置在西北特殊环境人工实验舱内,设置干热环境温度:(41 ± 0.5)℃,湿度(10 ± 1)%,并在相应时间点麻醉大鼠,取血液以及肾组织。检测血液中肌酐及尿素氮含量;肾组织制成匀浆进行超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)、过氧化氢酶(catalase)以及丙二醛(malondialdehyde)活性的检测;将肾组织制片,HE染色,观察病理变化。**结果** 病理学检测发现,肾组织病理变化及评分随着干热环境时间的延长而加重,在同一时间点姜黄素预处理组大鼠肾病理损伤评分明显低于盐水组($P < 0.05$, $P < 0.01$);血清肌酐、尿素以及肾组织中MDA含量在三个中暑阶段中,姜黄素组均明显低于盐水组($P < 0.05$);肾组织中抗氧化酶SOD、CAT的活性姜黄素组均明显高于盐水组($P < 0.05$),经相关性分析提示,MDA与病理损伤评分密切相关($r = 0.75$, $P < 0.01$)。**结论** 姜黄素预处理对干热环境下不同程度中暑大鼠肾损伤均具有保护作用,其可能部分通过抗氧化应激反应来实现。

【关键词】 干热环境;氧化应激;姜黄素;肾损伤;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0048-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.009

Effect of curcumin pretreatment on renal pathological changes and the level of oxidative stress in rats with various degrees of heat stroke in a dry heat environment

LI Jianying¹, ZHAO Yinwei¹, KANG Yan², ZHANG Donghui¹, XU Qin¹, DONG Xiang¹, LI Jiajia¹, SHI Wenhui¹,
MA Na¹, SHEN Caifu¹, LIU Jiangwei^{1*}

(1. Key Laboratory of the Special Environmental Medicine of Xinjiang, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000, China. 2. The No. 69240 Army Hospital, Urumqi 830000)

【基金项目】 军队临床高新技术重大项目(2010gxjs016)。

【作者简介】 李建瑛(1977—),女,主管技师,研究方向:实验动物学。E-mail: 1610801584@qq.com

【通信作者】 刘江伟(1970—),男,博士后,教授,主任医师,博士生导师,主要研究方向:特殊环境战创伤研究。E-mail: ljw273273@

【Abstract】 Objective To observe the effects of curcumin pretreatment on renal pathological changes and the level of oxidative stress in rats with various degrees of heat stroke. **Methods** Eighty male healthy SD rats were randomly divided into two groups ($n=40$): saline control and curcumin pretreatment groups. Each group was divided into four subgroups ($n=10$): 0 min (normal temperature), 50 min, 100 min, and 150 min groups in dry heat environment. Rats of the saline group were administered 0.9% normal saline, and the curcumin group was administered 200 mg/kg curcumin. The rats were treated continuously for 7 days. Rats of the 0 min group were subjected to room temperature, while the other groups were transferred to a climate cabin (The Simulated Climate Cabin for Special Environment of Northwest of China) under the conditions of $40.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $10 \pm 1\%$ relative humidity to establish the rat heat stroke model by a dry heat environment. The rats were anesthetized at the corresponding time points, and blood and kidney tissue were collected. The contents of creatinine and urea nitrogen in serum and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) activities in homogenates of kidney tissue were detected. Renal tissue was stained with HE, and pathological changes were observed. **Results** Pathological changes of renal tissue were aggravated by prolonged exposure to the dry heat environment. Pathological renal injury scores were higher in the saline group compared with curcumin pretreatment groups at the same time points ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The contents of serum creatinine, urea, and MDA were decreased in the curcumin groups compared with the saline group at the three heatstroke periods ($P < 0.05$). The activities of renal tissue antioxidant enzymes SOD and CAT were increased in the curcumin group compared with the saline group ($P < 0.05$). Correlation analysis indicated that renal injury scores were correlated with MDA ($r = 0.75$, $P < 0.01$). **Conclusions** Curcumin pretreatment has a protective effect on rat renal injury induced by various degrees of heat stroke in a dry heat environment, and its mechanism may be mediated partly by antioxidant effects.

【Keywords】 dry heat environment; oxidative stress; curcumin; renal injury; rat

中暑是以核心体温升高的并伴有一系列症状的致命性疾病,主要表现为核心体温升高($\geq 41^\circ\text{C}$),中枢神经症状,肝肾功能受损等,严重者可表现为多器官衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndrome)^[1-2]。中暑在南方多发生于湿热环境,而我国西北部夏季炎热干燥且分布大面积沙漠,在干热环境下中暑具有体液大量丢失,循环衰竭,器官缺血缺氧严重等特点。干热环境下机体体液丢失,循环血流重新分布,肾血流减少,肾细胞缺血缺氧以及高热对细胞的直接损伤,造成细胞内氧自由基大量堆积,氧化应激失衡^[3]。

姜黄素作为一种细胞抗氧化剂,对脑、心、肝、肾等重要脏器均能起到保护作用。有实验表明,姜黄素可使异丙肾上腺素诱导的大鼠心电图缺血性改变减轻,抑制血清肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶、谷草转氨酶活性的升高以及血清游离脂肪酸升高,同时还可以降低缺血心肌丙二醛的含量^[4]。我们前期实验也发现姜黄素能提高沙漠干热环境大鼠的生存时间^[5],因此我们推测,姜黄素对于干热环境下大鼠肾损伤具有保护作用。本研究通过复制干热环境大鼠中暑模型,观察姜黄素预处理对于不同程度大鼠中暑模型肾病理变化以及氧化应激水平的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

80只6~8周龄的SPF级雄性SD大鼠(190~220 g),购自新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2016-0003]。饲养于温度($25 \pm 2^\circ\text{C}$)的SPF级动物实验室中,12 h白天与黑夜循环,饲料与水充足供应[SYXK(新)2016-0003]。随机分为2组($n=40$):盐水对照组以及姜黄素预处理组。每组下分为4个亚组($n=10$):干热0 min组(即常温组),干热50 min组(轻度中暑组),干热100 min组(中度中暑组),干热150 min组(重度中暑组)。盐水组大鼠给予0.9%生理盐水灌胃,姜黄素组大鼠给予200 mg/kg姜黄素+5%羧甲基纤维素钠溶液配置成混悬液灌胃;各组大鼠均连续灌胃7 d。0 min组置于常温环境中[温度($25 \pm 2^\circ\text{C}$),相对湿度($35 \pm 5\%$)],其余组在西北特殊环境人工实验舱(新疆军区总医院研制)设置的干热环境[($41 \pm 0.5^\circ\text{C}$),湿度($10 \pm 1\%$)]中复制不同程度的大鼠中暑模型^[6]。在相应时间麻醉大鼠并处死大鼠,下腔静脉采血,取一部分肾组织于10%甲醛溶液,另一部分于液氮中冻存。动物实验方案符合新疆军区总医院动物伦理委员会管理要求,按3R原则给予人道关怀,批准文号为DWLL2018001。

1.2 主要试剂与仪器

姜黄素由东京化成工业株式会社生产,溶解于 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMCNa) 中使用;超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 以及丙二醛 (MDA) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;BCA 试剂盒购自 Thermo Fisher 公司。全自动生化检测仪 (BS-180) (中国迈瑞公司);光学显微镜 CKX41 (日本 Olympus);TS-12U 生物组织脱水机 (中国亚鹏);LEICA RM213 型组织切片机 (德国);BI-2000 医学图像分析系统 (成都泰盟科技公司);YB-6D 型生物组织石蜡包埋机 (湖北孝感亚光电子技术公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 血清肌酐、尿素氮检测

在相应时间点 3% 戊巴比妥麻醉大鼠,下腔静脉收集血液,3000 r/min 离心 10 min,取血清,全自动生化分析仪进行肌酐及尿素氮含量检测。

1.3.2 肾病理学检测

取大鼠肾组织于 10% 中性甲醛中固定,脱水、石蜡包埋,切片,脱蜡,HE 染色,并在双盲的条件下阅片,光镜下观察肾组织形态学改变,在 400 倍视野下连续观察 100 个不同视野,进行 Paller's 评分^[7]:每个高倍镜视野随机选择 10 个有病变的肾小管,按 100 个肾小管记分,标准:肾小管明显扩张、细胞扁平为 (1) 分;刷状缘损伤 (1) 分,脱落为 (2) 分;管型 (2) 分,肾小管管腔内有脱落的、坏死的细胞 (未成管型或细胞碎片) 计 (1) 分。

1.3.3 肾组织中 SOD、CAT 及 MDA 活性的检测

取 0.1 g 冻存肾组织,置于玻璃匀浆器中研磨至无块状,加入 900 μ L PBS 溶液,12 000 r/min 离心

10 min 取上清,分装进行 SOD、CAT 及 MDA 含量检测。SOD 由黄嘌呤氧化酶法检测,单位为 U/mg pro;CAT 由可见光法检测,单位为 U/mg pro;MDA 由硫代巴比妥法检测,单位为 mmol/mg pro。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组内比较采用独立样本 *t* 检验,MDA 与 Paller's 评分相关性采用 Spearman 等级相关分析,以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

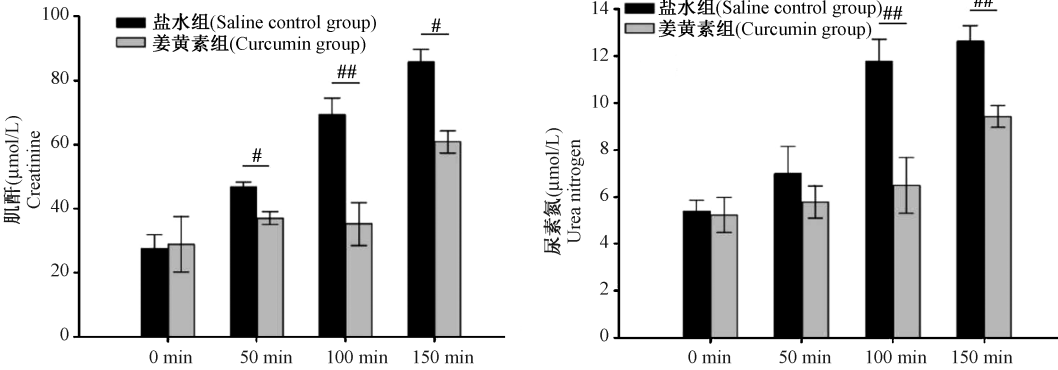
2 结果

2.1 血清中肌酐、尿素氮含量

如图 1 所示,在持续干热环境下 50 min、100 min 以及 150 min 经姜黄素预处理的大鼠血清肌酐含量明显低于盐水组,差异有显著性 (*P* < 0.05, *P* < 0.01),血清尿素氮含量呈现相同趋势,但在干热环境 50 min 时,姜黄素组尿素氮含量较盐水组也有所下降,但差异无显著性 (*P* > 0.05),在 100 min 和 150 min 时,姜黄素组尿素氮明显低于盐水组,差异有显著性 (*P* < 0.01)。

2.2 肾组织病理学变化

干热环境 50 min 时盐水组肾病理变化表现为肾小球囊腔变窄,轻微充血,肾小管上皮细胞水肿,部分细胞脱落;姜黄素预处理组可见肾病理变化较盐水组减轻。干热 100 min 时盐水组病理变化进一步加重,可见肾小球囊腔消失,肾小管上皮细胞颗粒样变,水肿,胞质淡染,细胞脱落;姜黄素预处理组肾小球囊腔狭窄但未消失,肾小管上皮细胞肿胀,管腔内少量脱落细胞碎片。150 min 时可见肾小



注:与盐水组相同时间点比较, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01。

图 1 各时间点血清肌酐、尿素氮的变化

Note. Compared with the saline control group at the same time, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01.

Figure 1 Changes in the serum creatinine and urea at various time points

球充血、水肿,肾小管内可见管型形成;姜黄素预处理组,可见肾小球充血,肾小管内大量脱落细胞但未形成管型。经姜黄素预处理肾组织病理变化呈现不同程度的减轻,见图 2。病理损伤 Paller's 评分结果:在同一时间点,姜黄素预处理组肾损伤病理评分明显低于盐水组,差异有显著性(其中 50 min 和 100 min 组 $P < 0.05$,150 min 组 $P < 0.01$),见图 3。

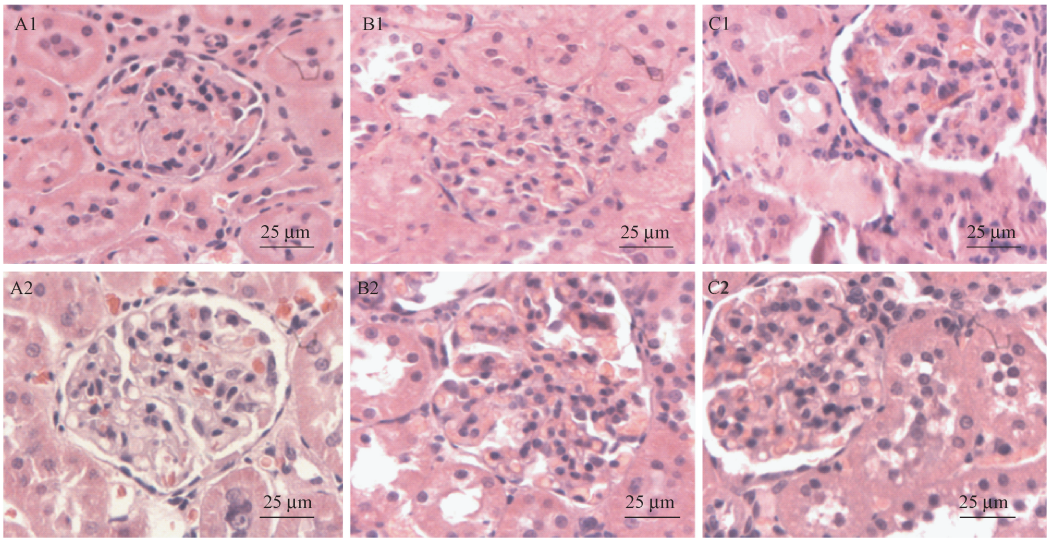
2.3 肾组织中 SOD、CAT、MDA 活性

盐水组以及姜黄素组中肾组织匀浆中 SOD 以及 CAT 的活性随着干热环境持续时间的延长均呈现下降趋势,相反 MDA 呈现上升趋势。在同一时间点经姜黄素预处理大鼠的肾组织中 SOD、CAT 活性较盐水组升高,除了 CAT 在 100 min 组外,其余各组差异均有显著性($P < 0.05$)。而 MDA 的含量经姜黄素预处理后在各个时间点均较盐水组明显下降($P < 0.05$)。见图 4。Spearman 相关性分析提示,MDA 与肾小管损伤的 Paller's 评分呈正相关($r = 0.75, P < 0.01$)。

3 讨论

肾是中暑时的常见受累器官之一,前期研究表明干热环境下肾呈现充血,管型形成等病理变

化^[6]。本实验通过复制干热环境下不同程度大鼠中暑模型,观察姜黄素预处理与相应盐水对照组之间肾病理学变化以及肾组织氧化应激水平的变化。本研究发现干热环境下,肾呈现相似病理变化,并且随着干热环境持续时间的延长而加重。中暑被认为是剧烈的失控性炎症反应^[8],中暑损伤主要是由于核心体温过高对细胞产生热损伤作用,引起细胞膜损伤、线粒体功能障碍和有氧代谢途径中断,被激活的中性粒细胞和巨噬细胞甚至内皮细胞均可产生大量的氧自由基^[9]。氧化应激是机体正常的氧化和抗氧化失衡所致^[10],氧化应激与人类多种疾病的发生、发展密切相关^[11],热应激引起的大量氧自由基释放可造成细胞内氧化以及抗氧化失衡,引起细胞损伤。SOD 与 CAT 是机体细胞内的重要抗氧化酶,在本实验中可发现随着干热环境的延长肾组织中 SOD 与 CAT 的活性逐渐下降,而细胞脂质过氧化的产物 MDA 初步上升,且 MDA 与肾小管损伤的 Paller's 评分呈正相关($r = 0.75, P < 0.01$)。由此可见,肾组织的氧化应激水平升高可能是干热环境下肾损伤的机制之一。在本研究中,在干热环境 50 min、100 min 以及 150 min 姜黄素组的肌酐与尿素氮值均较盐水组有所下降,说明姜黄素对于干热环境下大鼠的肾功能具有一定的保护

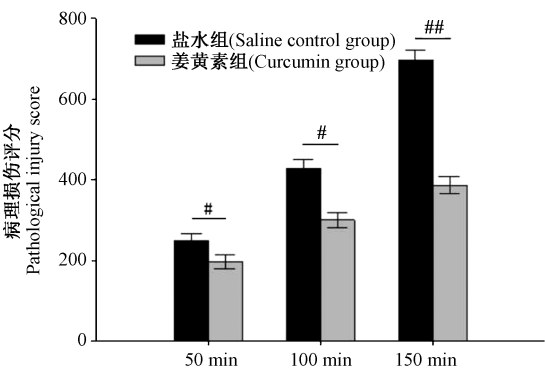


注:A1: 50 min 盐水组;A2: 50 min 姜黄素预处理组;B1: 100 min 盐水组;B2: 100 min 姜黄素预处理组;C1: 150 min 盐水组;C2: 150 min 姜黄素组。

图 2 肾病理组织学变化(HE 染色, × 200)

Note. A1: 50 min saline group; A2: 50 min curcumin pretreatment group; B1: 100 min saline group; B2: 100 min curcumin pretreatment group; C1: 150 min saline group; C2: 150 min curcumin pretreatment group.

Figure 2 Renal histopathological changes. HE staining



注:与盐水组相同时间点比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ 。

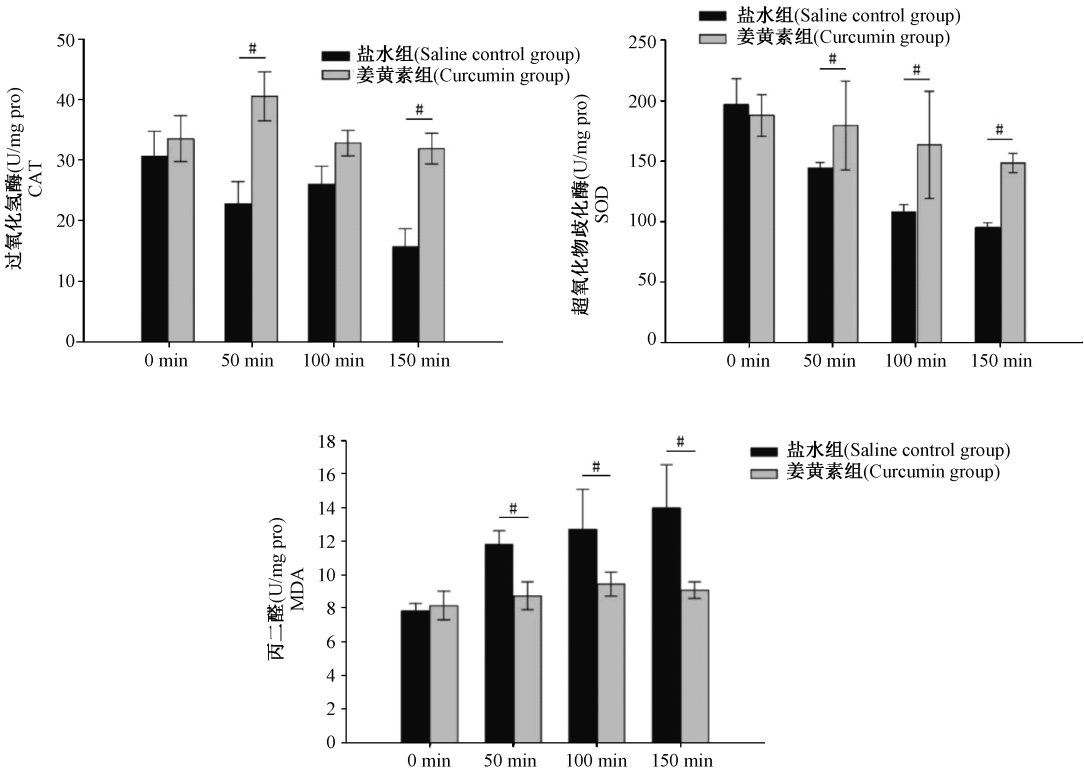
图3 肾损伤 Paller's 评分的变化

Note. Compared with the saline control group at the same time, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$.

Figure 3 Changes in Paller's scores of the renal injury 作用。同时我们也发现,姜黄素预处理组肾组织中的 SOD、CAT 活性较盐水组明显提高,而肾组织 MDA 含量较盐水组下降,表明姜黄素在沙漠干热环境中对肾组织发挥抗氧化作用。

姜黄素是从姜科植物姜黄中提取出的一种天然药物,呈黄色,是姜黄的主要活性成分。目前研究普遍认为姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用,并且具有安全高效等特点,是近年来国内外的研究热点。姜黄素还可以通过清除自由基和增强抗氧化酶活性来实现其抗氧化功能^[12]。一些动物实验研究发现姜黄素可以对糖尿病肾病以及人为诱导的急性肾损伤具有保护作用,其中均发现,姜黄素可提高肾组织内 CAT、SOD 的活性,同时降低 MDA 的活性,说明姜黄素抗氧化的机制可能与提高组织内抗氧化酶的活性有关^[13-16]。

本实验将姜黄素预处理大鼠,进行干热环境下不同程度中暑大鼠肾损伤的保护作用的研究,实验结果发现,姜黄素预处理对于干热环境下不同程度中暑的大鼠模型肾损伤均具有预防保护作用,其机制可能部分通过姜黄素的抗氧化作用而发挥肾保护作用。姜黄素作为传统药物,具有高效、副作用小等特点,在沙漠干热环境下预防肾损伤具有潜在的临床应用价值。



注:与盐水组相同时间点比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图4 肾组织中 SOD、CAT 以及 MDA 在不同时间的变化

Note. Compared with the saline control group at the same time, $^{\#}P < 0.05$.

Figure 4 Changes of SOD, CAT, and MDA in the renal tissues at various time points