

杨明凤,冉利梅. 姜黄素对妊娠高血压大鼠急性肾损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 89-94.
Yang MF, Ran LM. Protective effect of curcumin on acute kidney injury in rats with pregnancy-induced hypertension [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 89-94.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.06.014

姜黄素对妊娠高血压大鼠急性肾损伤的保护作用

杨明凤^{1,2}, 冉利梅^{1*}

(1. 贵州医科大学公共卫生学院, 贵阳 550004; 2. 黔南州妇幼保健院, 贵州 黔南 558000)

【摘要】 目的 探讨姜黄素(curcumin, Cur)对妊娠高血压引发的大鼠急性肾损伤保护作用并探索其潜在机制。**方法** 32只怀孕的Sprague-Dawley雌性大鼠,分为四组:正常组、姜黄素组、妊娠高血压(pregnancy induced hypertension, PIH)组和PIH+姜黄素组。PIH组和PIH+姜黄素组大鼠则每天注射26 mol/L的NG-硝基-L-精氨酸甲酯以诱导PIH模型,持续4 d。姜黄素组和PIH+姜黄素组大鼠自第18天起,喂食姜黄素204.8 mol/L(悬浮在2%羧甲基纤维素溶液中),持续7 d。通过苏木精-伊红染色,酶联免疫吸附测定和分光光度法分别检测一系列指标,评估肾组织的病理形态、肾功能、氧化应激和炎症反应。采用免疫组织化学法和蛋白质免疫印迹法检测TGF-β1和p-Smad3的表达和分布。**结果** 与PIH组相比,PIH+姜黄素组大鼠的肾功能显著改善($P < 0.01$),肾组织损伤和氧化应激也有显著的恢复($P < 0.01$),其中肾组织评分由(191.23±18.82)下降到(108.35±11.24) ($P < 0.01$)。PIH组大鼠肾TGF-β1和p-Smad3显著增高,而应用了姜黄素后显著下降,其中TGF-β1表达由(356.25±40.13)%下降至(178.40±18.45)% ($P < 0.01$),而p-Smad3/Smad3则由(312.82±30.26)%下降至(143.05±15.31)% ($P < 0.01$)。**结论** 姜黄素可通过调节TGF-β1通路保护妊娠高血压大鼠的急性肾损伤。

【关键词】 妊娠高血压;急性肾损伤;姜黄素

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)06-0089-06

Protective effect of curcumin on acute kidney injury in rats with pregnancy-induced hypertension

YANG Mingfeng^{1,2}, RAN Limei^{1*}

(1. School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China.

2. Qiannan Maternity and Child Health Hospital, Qiannan 558000)

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of curcumin (Cur) on acute renal injury caused by pregnancy-induced hypertension (PIH) and to explore the mechanism of any effect. **Methods** Thirty-two pregnant Sprague-Dawley female rats were divided into four groups: normal, curcumin, PIH, and PIH + curcumin groups. Rats in the PIH and PIH + curcumin groups were injected with 26 mol/L NG-nitro-L-arginine methyl ester every day for 4 days to induce PIH. The rats in the curcumin and PIH + curcumin groups were fed curcumin 204.8 mol/L (suspended in 2% carboxymethyl cellulose solution) from day 18 for 7 days. Hematoxylin-eosin staining, enzyme-linked immunosorbent assays and spectrophotometry were used to detect a series of indicators to evaluate the pathological morphology of kidney tissue, renal function, oxidative stress and inflammation. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression levels and distribution of TGF-β1 and p-SMAD3. **Results** Compared with the PIH group, the renal function of

[作者简介] 杨明凤(1978—),女,本科,在职研究生。E-mail: aihaim799@163.com

[通信作者] 冉利梅(1973—),女,博士。E-mail: asffww124@sina.com

rats in the PIH + curcumin group was significantly improved ($P < 0.01$), and renal tissue damage and oxidative stress were also significantly reduced ($P < 0.01$). The renal tissue score decreased from 191.23 ± 18.82 to 108.35 ± 11.24 ($P < 0.01$). Levels of TGF- β 1 and p-SMAD3 in the kidneys of PIH group rats were significantly increased, but decreased significantly after the application of curcumin. The expression of TGF- β 1 decreased from $(356.25 \pm 40.13)\%$ to $(178.40 \pm 18.45)\%$ ($P < 0.01$). p-SMAD3/SMAD3 decreased from $(312.82 \pm 30.26)\%$ to $(143.05 \pm 15.31)\%$ ($P < 0.01$). **Conclusions** Curcumin can protect against acute kidney injury in pregnant hypertensive rats by regulating the TGF- β 1 pathway.

【Keywords】 pregnancy-induced hypertension; acute kidney injury; curcumin

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是一种临床综合征,主要表现为肾功能快速下降^[1]。大量研究报告了不同研究人群和临床环境中 AKI 的发生率、风险特征和转归^[2-3]。对于妇女而言,怀孕是一种独特的状态,在这种状态下,妊娠高血压(pregnancy induced hypertension, PIH)引起的肾疾病可能会同时影响产妇和后代的肾健康。AKI 是妊娠期间罕见但严重的并发症,与不良结局的风险增加息息相关^[4],其病理生理基础及其并发症包括炎症、氧化应激和细胞凋亡^[5]。姜黄(Curcumin, Cur)是一种传统药物,主要用于治疗各种疾病,例如风湿病,糖尿病性溃疡,厌食症,咳嗽和鼻窦炎^[6]。据报道,姜黄素抗炎,抗氧化,抗癌,和抗感染等^[7-8]广泛的治疗作用。姜黄素可以调节酶、细胞因子、转录因子、生长因子、受体、微核糖核酸、信号分子和活性氧,从而对炎症和氧化应激产生积极影响。姜黄素可以钝化炎症分子的产生或作用并减轻肾病的进程。因此,本研究将以妊娠高血压大鼠为模型,探讨姜黄素对急性肾损伤的保护效果,并试图阐明其分子机制,为妊娠高血压急性肾损伤的药物开发提供思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Sprague-Dawley 雄性大鼠(230~300 g, 4 只)和雌性大鼠(210~280 g, 36 只)(SPF 级)(8~10 周龄)购买自贵州医科大学实验动物中心[SCXK(黔)2018-0001]。所有动物均饲养在贵州医科大学实验动物中心的动物房中[SYXK(黔)2018-0023],房间在 22℃~25℃ 保持恒温,并提供充足的食物和饮用水。第 2 天,进行阴道涂片检查精子。观察到许多精子细胞则表明发生成功性交。发现精子的首日算为怀孕的第 0 天。本实验总共选择了 32 只妊娠大鼠用于实验。动物实验遵循 3R 原则,并得到了贵州省人民医院动物伦理委员会的批准(IACUC-20180604-01)。所有实验程序均严格遵循国际疼

痛研究协会的动物保护原则执行。

1.2 主要试剂与仪器

姜黄素(西格玛,美国圣路易斯);NG-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME,西格玛,美国圣路易斯);凋亡检测试剂盒(Promega, Madison, WI);抗 TGF- β 1(sigma, 圣路易斯,密苏里州);抗 p-Smad3 和抗 Smad3(Cell Signaling Technology, Beverly, MA);抗 GAPDH(SantaCruz Biotechnology);NG-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME,西格玛,美国圣路易斯)。

临床自动生化分析仪 7600(日立,日本);光学显微镜(Leica DM3000LED,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

选择 32 只怀孕的 Sprague-Dawley 雌性大鼠,随机均分为四组:正常组、姜黄素组、PIH 组和 PIH+姜黄素组。从妊娠第 14 天开始,正常组和姜黄素组大鼠每天连续静脉注射尾静脉 0.8 mL 生理盐水,连续 4 d,而 PIH 组和 PIH+姜黄素组大鼠则每天注射 26 mol/L NG-硝基-L-精氨酸甲酯以诱导 PIH 模型,连续 4 d。在怀孕的第 14 和 17 天,测量各组的收缩压。观察到收缩压增加 30 mmHg 以上,则认为成功建立了 PIH 模型大鼠,并在第 18 天选择了该模型进行干预治疗。姜黄素组和 PIH+姜黄素组大鼠自第 18 天起,喂食姜黄素 204.8 mol/L(悬浮在 2% CMC 中),持续 7 d^[9]。

1.3.2 临床自动生化分析仪检测肾功能和氧化应激水平

使用临床自动生化分析仪 7600 测量大鼠肾组织中的血尿素氮、肌酐、24 h 尿白蛋白排泄率和肌酐清除率。使用 Roche Diagnostics(曼海姆,德国)提供的套件检测大鼠肾组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)和一氧化氮(NO)水平。

1.3.3 组织病理学方法评估肾损伤

将肾组织固定在 4% 中性低聚甲醛溶液中,包埋石蜡,切成 4 μ m 切片,并用苏木精-伊红染色。在光学显微镜下(Leica DM3000LED,德国)检查整

个冠状切片,并根据损伤程度根据肾受累百分比进行分级。使用以下参数对肾组织对应的 10 个区域的损伤定量进行分级:肾小管细胞坏死,凋亡,胞质液泡形成,出血和肾小管扩张(1,组织病理学变化<10%;2,10%~25%;3,25%~50%;4,50%~75%;5,75%~100%)^[10]。计算每个大鼠的平均得分,并进行统计分析。

1.3.4 免疫荧光染色法检测 caspase-3 的活化

在 4%多聚甲醛中将 3 μm 厚度的肾切片固定 15 min,然后在室温下用 0.2% TritonX-100 的 PBS 透化 5 min。用 2%驴血清封闭 60 min 后,将玻片用抗裂解的 caspase-3 (目录号:9664, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) 的一抗进行免疫染色。然后将载玻片用 TRITC 缀合的第二抗体染色。用 Nikon Eclipse 80i Epifluorescence 显微镜观察并拍照。用 Image J 进行灰度值分析并统计。

1.3.5 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)染色检测凋亡

通过使用凋亡检测系统 (Promega, Madison, WI) 使用末端环氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记染色来确定凋亡细胞的死亡。阳性细胞用 FITC 标记,记录每个视野中的阳性细胞数并进行统计分析。

1.3.6 免疫组织化学法分析 TGF- β 1 和 p-Smad3 的表达和分布

将 4 μm 石蜡包埋切片去石蜡并在柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 6.0)中加热;然后将切片置于 3%过氧化氢中,并与 TGF- β 1 和 p-Smad3 的一级抗体(1:200; Cell Signaling Technology)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。将切片与相应的二抗在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。使用 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐显色,并用苏木精复染色核。用 Nikon Eclipse 80i Epifluorescence 显

显微镜观察并拍照。

1.3.7 蛋白质印迹法检测 TGF- β 1、p-Smad3 和 Smad3 的表达

将肾组织用含有 1% NP40、0.1% SDS、100 mg/mL PMSF、1%蛋白酶抑制剂混合物以及 1%磷酸酶 I 和 II 抑制剂混合物(Sigma, 圣路易斯, 密苏里州)的 RIPA 溶液溶解。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 13000 r/min 离心 30 min 后收集上清液。通过二辛可宁酸蛋白质测定法测定蛋白质浓度。将等量的蛋白质上样到 10% 或 15% SDS-PAGE 中,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。一抗如下:抗 TGF- β 1 (Sigma, 圣路易斯, 密苏里州), 抗 p-Smad3 和抗 Smad3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), 抗 GAPDH (SantaCruz Biotechnology)。视野 National Health Institute 图像软件包测量信号强度,并进行定量分析。

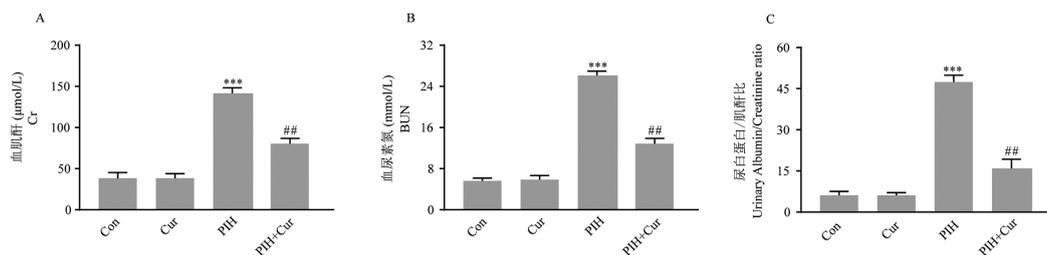
1.4 统计学方法

所有数据均以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 Sigma Stat 软件(加利福尼亚州圣拉斐尔市的 Jandel Scientific 软件)对数据进行统计分析。使用单向方差分析进行三组或更多组之间的比较。 $P < 0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对妊娠高血压大鼠的肾功能的影响

如图 1 所示,与正常对照组和姜黄素组相比,PIH 组大鼠的血肌酐、尿素氮和尿蛋白/肌酐比显著升高($P < 0.001$),肌酐清除率则显著下降($P < 0.001$)。姜黄素治疗可以使血肌酐、尿蛋白/肌酐比显著回落($P < 0.01$),而肌酐清除率则有效改善($P < 0.01$)。这些结果表明姜黄素可以改善妊娠高血压大鼠的肾功能损伤。



注:A:血肌酐;B:血尿素氮;C:尿蛋白/肌酐比。与 Con 组相比,*** $P < 0.001$;与 PIH 组相比,## $P < 0.01$ 。

图 1 不同组大鼠的肾功能变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Note. A, Blood creatinine. B, Blood urea nitrogen. C, Urinary albumin/creatinine ratio. Compared with Con group, *** $P < 0.001$. Compared with PIH group, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Renal function changes in different groups of rats

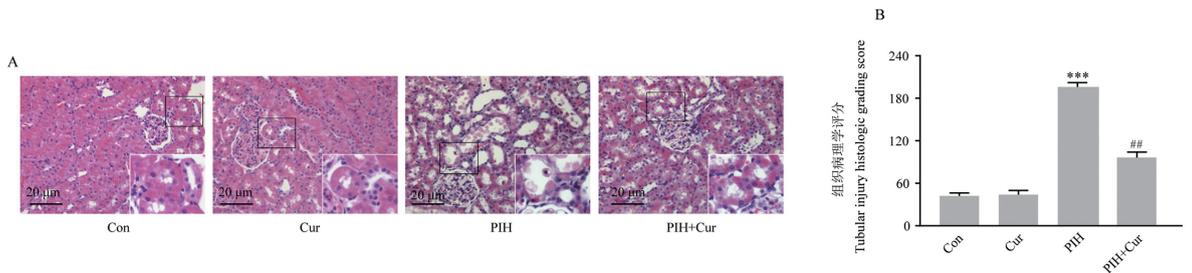
2.2 姜黄素对 PIH 大鼠肾小管的组织病理学的影响

与正常对照组和姜黄素组的肾组织相比,PIH 组大鼠肾小管显著扩张,肿胀,管腔充血和核固缩,甚至部分区域发生变性,姜黄素治疗可以有效减轻上述变化(图 2A)。与组织学观察相一致,在用姜黄素治疗的大鼠组织病理学损伤的总评分显著降低($P < 0.01$)(图 2B)。

2.3 姜黄素对 PIH 大鼠肾中的肾小管细胞凋亡和氧化应激的影响

肾小管细胞凋亡是 PIH 诱导的急性肾损伤的

关键环节。在这项研究中,我们通过 TUNEL 染色法和 cleaved caspase-3 免疫染色来观察肾小管细胞的凋亡水平。如图 3A~3C 所示,在对照或姜黄素组的大鼠的肾组织中,几乎没有检测到凋亡细胞,cleaved caspase-3 染色也是阴性的。但是,PIH 诱导的 AKI 大鼠肾中,TUNEL 染色阳性和 cleaved caspase-3 免疫染色阳性的细胞数量显著增加,而姜黄素治疗后,细胞凋亡显著减少($P < 0.01$)。为了评估姜黄素在 PIH 大鼠肾氧化应激中的作用,我们在肾组织中检测了 MDA 和 NO 的水平。如图 3D~3E 所示,与 PIH 组相比,PIH+Cur 组的 MDA 和 NO

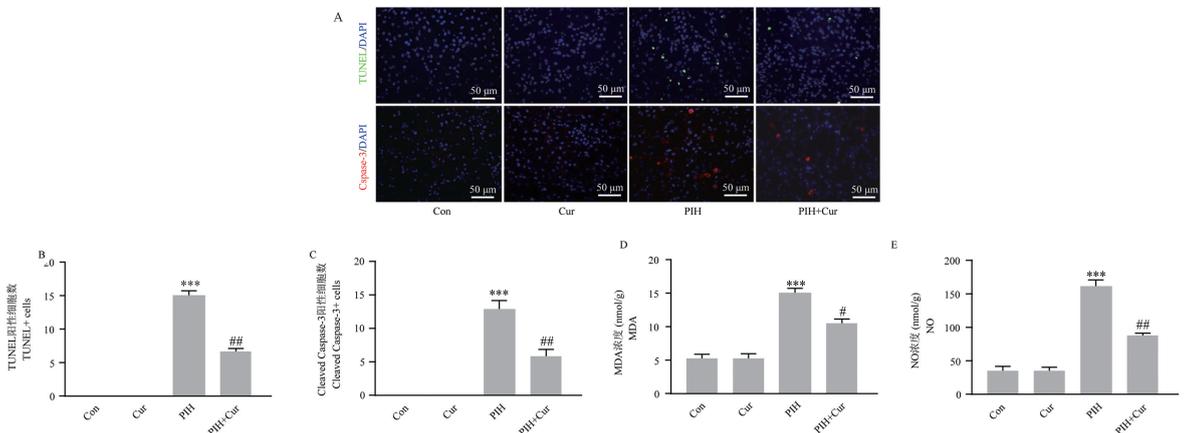


注:A;苏木精伊红染色的肾切片;B:各组大鼠的组织病理学评分。与 Con 组相比,*** $P < 0.001$;与 PIH 组相比,## $P < 0.01$ 。

图 2 组织病理学水平观察各组大鼠肾损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A, Hematoxylin-eosin stained kidney section. B, Histopathological scores of rats in each group. Compared with Con group, *** $P < 0.001$. Compared with PIH group, ## $P < 0.01$.

Figure 2 Histopathological observation of kidney injury in each group



注:A:各组大鼠裂解的 caspase3 的 TUNEL 染色和免疫染色图像的代表性图片。B:各组大鼠 TUNEL 染色阳性细胞数量的定量分析;C:各组大鼠 cleaved-caspase 3 染色阳性细胞数量的定量分析;D:各组大鼠肾 MDA 的含量;E:各组大鼠肾 NO 的含量。与 Con 组相比,*** $P < 0.001$;与 PIH 组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 3 姜黄素可以减少 PIH 大鼠肾中的肾小管细胞凋亡并减轻氧化应激水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A, Representative pictures of TUNEL staining and immunostaining images of lysed caspase3 of rats in each group. B, Quantitative analysis of the number of TUNEL staining positive cells in each group of rats. C, Quantitative analysis of the number of clear-caspase 3 staining positive cells in each group of rats. D, The content of MDA in the kidneys of rats in each group. E, NO content in the kidneys of rats in each group. Compared with Con group, *** $P < 0.001$. Compared with PIH group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 3 Curcumin can reduce renal tubular cell apoptosis and reduce the level of oxidative stress in PIH rat kidneys

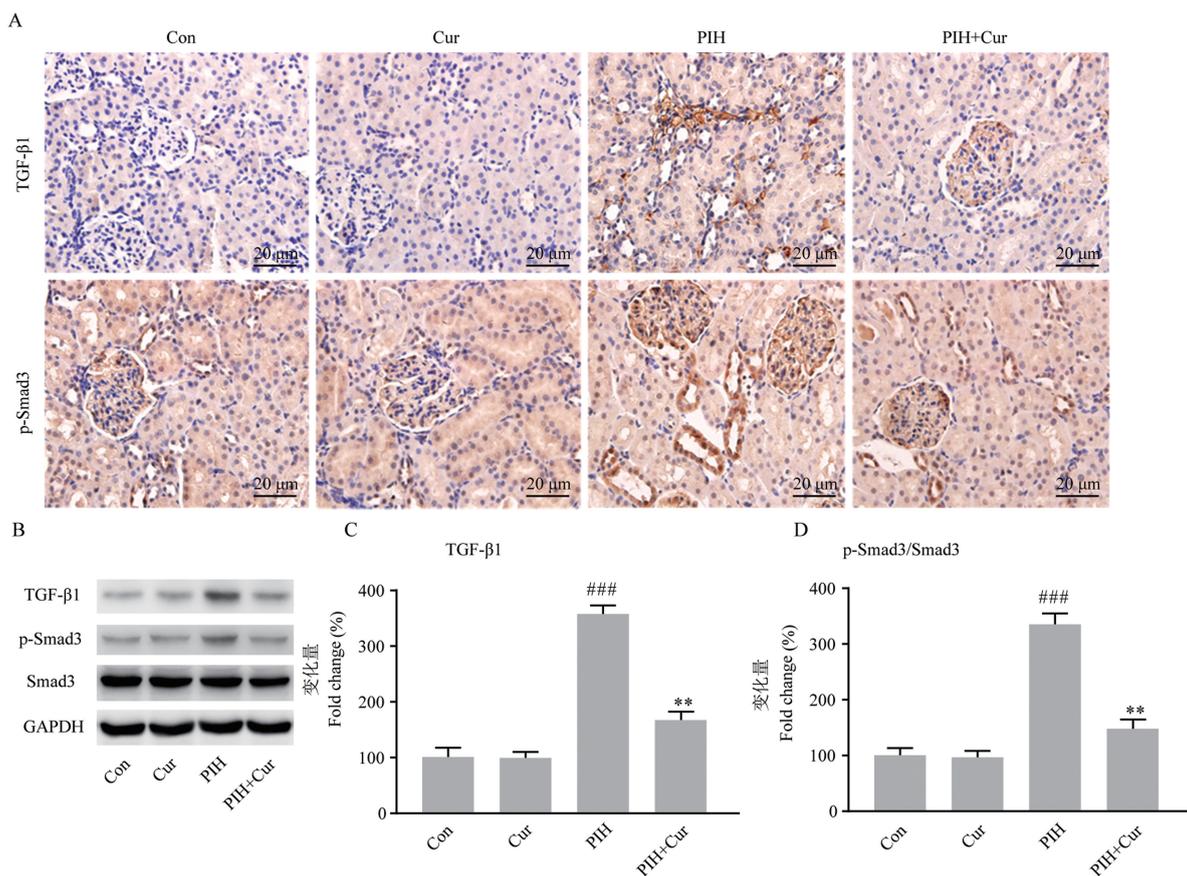
含量均显著下降 ($P < 0.01$)。这些结果,表明姜黄素可以减轻妊娠高血压诱导的大鼠肾小管细胞凋亡和氧化应激。

2.4 姜黄素对 PIH 大鼠肾中 TGF- β 1 和 p-Smad3 的影响

如图 4 所示,与正常对照和姜黄素组相比,PIH 组的 TGF- β 1 和 p-Smad3 的表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。而姜黄素治疗组的 TGF- β 1 和 p-Smad3 的水平显著降低 ($P < 0.01$),同时,蛋白质免疫印迹实验结果显示,姜黄素治疗后,大鼠肾 Smad3 的表达并没有显著改变。以上结果表明,用姜黄素治疗可显著逆转 PIH 大鼠肾中 TGF- β 1 和 Smad3 的表达水平。

3 讨论

我们的研究发现,PIH 大鼠血肌酐、血尿素氮、24 h 尿白蛋白排泄率显著增加,而肌酐清除率则显著下降,同时,PIH 诱导的 AKI 导致大鼠肾组织学改变,包括肾小管显著扩张,肿胀,管腔充血和核固缩,甚至部分区域发生变性,这种肾损伤同时伴随氧化应激相关分子水平和肾小管上皮细胞凋亡率上升,并进一步加剧了肾损伤。值得注意的是,应用姜黄素治疗后,大鼠的肾功各项指标均有所回落,组织学损伤减轻,氧化应激和细胞凋亡水平也均显著下降,这表明,姜黄素可以有效保护妊娠高血压大鼠的急性肾损伤。



注:A,免疫组织化学染色法观察大鼠肾切片中 TGF- β 1 和 p-smad3 的表达和分布;B,蛋白质免疫印迹法检测大鼠肾 TGF- β 1、p-smad3 和 smad3 的表达水平;C:TGF- β 1 的相对灰度值分析;D:p-smad3/smard3 的比值。与 Con 组相比,*** $P < 0.001$;与 PIH 组相比,## $P < 0.01$ 。TGF- β 1:转化生长因子 β 1。

图 4 姜黄素对 PIH 大鼠肾转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 和 smad3 表达和分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A, Immunohistochemical staining was used to observe the expression and distribution of TGF- β 1 and p-smad3 in rat kidney slices. B, Western blot was used to detect the expression levels of TGF- β 1, p-smad3 and smad3 in rat kidney. C, Analysis of relative gray value of TGF- β 1. D, The ratio of p-smad3/smard3. Compared with Con group, *** $P < 0.001$. Compared with PIH group, ## $P < 0.01$. TGF- β 1; Transforming growth factor- β 1.

Figure 4 Effect of curcumin on the expression and distribution of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and smad3 in PIH rats kidney

到目前为止,妊娠高血压引起的急性肾损伤损伤的具体机理尚未完全阐明。研究表明,PIH 引起的急性肾损伤的主要原因是肾氧自由基的增加,细胞内钙超载,能量代谢紊乱和激素分泌紊乱。在这种复杂的病理生理过程中,氧化应激相关分子对肾组织的损害 AKI 的主要病原体之一^[11]。MDA 和 NO 水平是氧化应激的两个主要指标^[12]。在我们的研究中发现,PIH 大鼠肾组织中 MDA 和 NO 升高,这表明存在氧化应激损伤。同时,姜黄素可以通过抑制 cleaved caspase-3 的活化来抑制凋亡,这进一步证实了姜黄素的抗凋亡作用。炎症促进进行性肾损伤,并且 TGF- β 1 被认为是肾损伤进展的关键介质。我们的结果表明,PIH 组中 TGF- β 1 表达显著上调,但应用了姜黄素后其表达会显著下降。因此,我们研究了 Smad3 的磷酸化,发现姜黄素显著降低了 Smad3 的磷酸化。因此,姜黄素的肾保护作用与 TGF- β 1 信号通路的下调有关。综上所述,我们的研究表明,姜黄素可显著改善 PIH 引发的急性肾损伤,这是通过抑制 TGF- β 1 信号通路来实现的,由于姜黄素具有抗氧化和凋亡的作用,可以为临床药物开发提供参考。

参考文献:

- [1] Lewington AJ, Cerdá J, Mehta RL. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer [J]. *Kidney Int*, 2013, 84(3): 457-467.
- [2] Choy KW, Choy KH. Acute kidney injury in critically ill children and young adults [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(13): 1295.
- [3] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury [J].

Lancet, 2012, 380(9843): 756-766.

- [4] Liu Y, Ma X, Zheng J, et al. Pregnancy outcomes in patients with acute kidney injury during pregnancy: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2017, 17(1): 235.
- [5] Okamura DM, Pennathur S. The balance of powers: Redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 495-504.
- [6] Ali BH, Marrif H, Noureldayem SA, et al. Some biological properties of curcumin: a review [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2006, 1(6): 138-149.
- [7] Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings [J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 448-456.
- [8] Gupta S C, Patchva S, Koh W, et al. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3): 283-299.
- [9] Ali BH, Al-Salam S, Al Suleimani Y, et al. Curcumin ameliorates kidney function and oxidative stress in experimental chronic kidney disease [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017, 122(1): 65-73.
- [10] Zhang Y, Qian P, Zhou H, et al. Pharmacological signatures of the exenatide nanoparticles complex against myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43(4): 1273-1284.
- [11] Land WG, Agostinis P, Gasser S, et al. Transplantation and damage associated molecular patterns (DAMPs) [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(12): 3338-3361.
- [12] Qiang M, Xu Y, Lu Y, et al. Autofluorescence of MDA-modified proteins as an *in vitro* and *in vivo* probe in oxidative stress analysis [J]. *Protein Cell*, 2014, 5(6): 484-487.

[收稿日期] 2020-06-03