

雷欢, 桂颖, 邓琴, 等. 姜黄素通过调控 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路减轻对乙酰氨基酚诱导的大鼠急性肾损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 59-65.

Lei H, Gui Y, Deng Q, et al. Curcumin alleviates acetaminophen-induced acute kidney injury by regulating the Trx-1/TXNIP/NLRP3 signaling pathway in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 59-65.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.008

姜黄素通过调控 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路减轻对乙酰氨基酚诱导的大鼠急性肾损伤

雷欢¹, 桂颖¹, 邓琴¹, 刘子源¹, 张维¹, 梅之南², 徐凌云^{1*}

(1. 武汉轻工大学生命科学与技术学院, 武汉 430023; 2. 中南民族大学药学院, 武汉 430074)

【摘要】 目的 探究姜黄素 (curcumin, CUR) 对对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导的大鼠急性肾损伤的保护作用及机制。**方法** 48 只雄性 SD 大鼠随机均分为正常组、模型组、阳性药 NAC 组、CUR 低 (50 mg/kg)、中 (100 mg/kg)、高 (200 mg/kg) 剂量组。NAC 及 CUR 灌胃给药 10 d 后, 一次性灌胃给予 2 g/kg APAP 建立急性肾损伤模型, 造模 24 h 后, 取血并分离大鼠, 计算肾指数; 检测血清肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 水平; HE 染色评价大鼠肾病理变化; 检测大鼠肾组织谷胱甘肽 (GSH)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性及丙二醛 (MDA) 水平; Western blot 检测大鼠肾组织 Trx-1、TXNIP、NLRP3 炎症小体等蛋白的表达水平。**结果** 与正常组相比, 模型组大鼠肾指数显著增加 ($P<0.01$), 血清 Cr、BUN 水平显著升高 ($P<0.01$), 病理切片显示大鼠肾组织出现明显的损伤, 大鼠肾组织中 GSH、T-SOD、CAT 的活性显著降低 ($P<0.01$), MDA 的含量显著升高 ($P<0.01$), 大鼠肾组织中 Trx-1 的表达明显下调 ($P<0.05$), TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1、mature IL-1 β 蛋白的表达明显上调 ($P<0.01$)。与模型组相比, CUR 中、高剂量组肾指数显著降低 ($P<0.01$), 病理损伤改善, 血清 Cr、BUN 水平显著降低 ($P<0.01$), 肾组织中 GSH、T-SOD、CAT 活性显著升高, MDA 含量显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Trx-1 的表达明显上调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1、mature IL-1 β 蛋白表达明显下调 ($P<0.01$)。**结论** 姜黄素预防性给药通过调控 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路减轻 APAP 诱导的大鼠急性肾损伤。

【关键词】 姜黄素; 对乙酰氨基酚; 肾损伤; Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 03-0059-07

Curcumin alleviates acetaminophen-induced acute kidney injury by regulating the Trx-1/TXNIP/NLRP3 signaling pathway in rats

LEI Huan¹, GUI Ying¹, DENG Qin¹, LIU Ziyuan¹, ZHANG Wei¹, MEI Zhinan², XU Lingyun^{1*}

(1. School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China.
2. School of Pharmaceutical Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074)

【Abstract】 Objective To explore the protective effect and mechanism of curcumin (CUR) on acetaminophen (APAP) -induced acute kidney injury in rats. **Methods** Forty-eight male SD rats were randomly divided into normal, model, positive, CUR low (50 mg/kg), medium (100 mg/kg), and high (200 mg/kg) dose group. After intragastric administration of N-acetylcysteine (NAC) and CUR for 10 days, acute kidney injury models were established by intragastric administration of 2 g/kg APAP. After 24 hours, blood was collected and kidneys were collected, the kidney index was calculated, the levels of serum creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) were measured. Pathological injury of the kidney was evaluated by HE staining, activities of glutathione (GSH), total superoxide dismutase (T-SOD), and catalase (CAT), and the malondialdehyde (MDA) level in kidneys were assessed. Expression of Trx-1, TXNIP, and

【作者简介】 雷欢 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 抗炎免疫药理学。E-mail: 2695730502@qq.com

【通信作者】 徐凌云 (1967—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 抗炎免疫药理学。E-mail: doctorxly9898@163.com

NLRP3 inflammasome in kidneys was detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the kidney index and the levels of serum Cr and BUN in the model group were increased significantly ($P < 0.01$), pathological sections showed obvious lesions in the kidney, activities of GSH, T-SOD, and CAT in kidneys were significantly decreased ($P < 0.01$), the MDA content was significantly increased ($P < 0.01$), Trx-1 expression in the kidney was significantly decreased ($P < 0.05$), and expression of TXNIP, NLRP3, ASC, Cleaved caspase-1, and mature IL-1 β was significantly upregulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, the kidney index in CUR medium, and high dose groups was significantly decreased ($P < 0.01$), pathological damage had improved, levels of serum Cr and BUN were decreased ($P < 0.01$), activities of GSH, T-SOD, and CAT in the kidney were increased, MDA content was decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), Trx-1 expression was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and expression of TXNIP, NLRP3, ASC, Cleaved caspase-1, and mature IL-1 β protein was significantly downregulated ($P < 0.01$). **Conclusions** CUR pretreatment alleviates acetaminophen-induced acute kidney injury by regulating the Trx-1/TXNIP/NLRP3 signaling pathway in rats.

【**Keywords**】 curcumin; acetaminophen; kidney injury; Trx-1/TXNIP/NLRP3 signaling pathway; rats

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是世界上广泛使用的解热镇痛药,长期和过量使用会导致严重的肝毒性甚至急性肝衰竭^[1-2]。在 APAP 诱导的急性肝衰竭患者中有超过 34% 的患者伴有急性肾损伤且需要进行肾移植^[3],而过量使用 APAP 也具有直接的肾毒性^[4]。治疗剂量的 APAP 主要在肝发生葡萄糖醛酸化和硫酸化被代谢为无毒的水溶性物质并通过肾排泄,过量 APAP 在肝 CYP2E1 的作用下被代谢为毒性产物 N-乙酰对苯醌亚胺 (N-acetyl-p-benzoquinonimine, NAPQI),进而引发肝毒性^[5]。研究表明,在肾中同样存在 CYP2E1 的表达,游离的 APAP 在肾 CYP2E1 的作用下代谢为 NAPQI, NAPQI 与肾组织中的 GSH 结合形成 APAP-谷胱甘肽而解毒,当肾细胞中 GSH 被耗竭时,过量的 NAPQI 与含有半胱氨酸残基的肾细胞蛋白结合形成 APAP-谷胱甘肽、APAP-半胱氨酸、APAP-N-乙酰半胱氨酸等 NAPQI-蛋白加合物,进而导致肾细胞的氧化应激和炎症反应,最终引发肾损伤^[6-7]。

N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 是临床上唯一被美国食品药品监督管理局批准用于 APAP 肝毒性的解毒剂^[8],由于其可提高机体 GSH 水平,在 APAP 引起的肾损伤中也被广泛研究^[7,9]。姜黄素 (curcumin, CUR) 是一种主要存在于姜科植物姜黄根茎中的多酚类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[10-11],大量的动物模型和临床试验表明口服高剂量的姜黄素几乎不会对机体功能造成任何毒副作用,因此,关于姜黄素在医药领域的有益作用正在被广泛研究^[10]。研究表明,姜黄素可减轻过量 APAP 诱导的肾毒性^[9,12],但其具体作用机制不明。本实验通过预防性给予姜黄素研究其对 APAP 诱导的大鼠急性肾损伤的影响及作

用机制,为进一步探究姜黄素在 APAP 诱导的急性肾损伤中的作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6 周龄,体重 150~170 g,购买于湖北省实验动物研究中心 [SCXK (鄂) 2020-0018]。动物合格证编号:42000600044761,饲养于中南民族大学实验动物中心 [SYXK (鄂) 2021-0089],适应性饲养 1 周后进行实验,期间自由进食和饮水,饲养室温度为 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度为 50%~60%,维持 12 h 光照和 12 h 黑暗的昼夜节律。本实验经由武汉轻工大学实验动物福利伦理委员会 IACUC 批准 (WPU-202110001),实验过程中严格遵守动物实验 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

姜黄素 (纯度 $\geq 99\%$, 批号:20190916) 由武汉回盛生物科技有限公司提供;APAP、NAC (批号: B14A9E58584、K1919009) 购自上海源叶生物科技有限公司;羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 批号:201621) 购自 Biosharp 公司;肌酐 (Creatinine, Cr, 批号: 20211127)、尿素氮 (Blood Urea nitrogen, BUN, 批号: 20211129)、谷胱甘肽 (Glutathione, GSH, 批号: 20211108)、总超氧化物歧化酶 (Total Superoxide Dismutase, T-SOD, 批号: 20211127)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT, 批号: 20201107)、脂质过氧化物 (Malondialdehyde, MDA, 批号: 202111126) 等检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;彩色 SDS-PAGE 快速凝胶试剂盒 (批号: WB812C) 购自上海威奥生物科技有限公司;Trx-1 兔抗 (货号: 14999-1-AP)、TXNIP 兔抗 (货号: 18243-1-AP) 购自

proteintech 公司; β -actin 鼠抗(货号:T0022)、NLRP3 兔抗(货号:DF7438)、Caspase-1 兔抗(货号:AF-5418)、Cleaved caspase-1 兔抗(货号:AF4022)、IL-1 β /mature IL-1 β 兔抗(货号:AF5103)、HRP 标记的羊抗兔二抗(货号:S0001)、HRP 标记的羊抗鼠二抗(货号:S0002)等购自 Affinity 公司。

V5600 紫外分光光度计购自上海元析仪器有限公司; AL204 电子天平购自梅特勒仪器有限公司; DYCZ-24DH 型垂直电泳仪、DYY7C 型电泳仪电源、WD9405F 型脱色摇床购自北京六一生物科技有限公司; Dox XR⁺ 型凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; CX23 型光学显微镜购自日本 Olympus 公司; EnSpire 多功能酶标仪购自美国 PerkinElmer 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组给药

48 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 6 组: 正常组(0.5% CMC-Na, normal group)、模型组(2 g/kg APAP, model group)^[13-14]、阳性药组(150 mg/kg NAC, NAC group)^[9]、姜黄素低剂量组(50 mg/kg CUR, CUR-L group)^[12]、姜黄素中剂量组(100 mg/kg CUR, CUR-M group)^[15]、姜黄素高剂量组(200 mg/kg CUR, CUR-H group)^[9]、APAP、NAC 及 CUR 均分别混悬于 0.5% CMC-Na 溶液中, 每组 8 只大鼠。姜黄素各剂量组及 NAC 组每天灌胃给予对应剂量的药物, 正常组及模型组每天灌胃给予 0.5% CMC-Na, 每天 1 次, 连续 10 d。第 10 天灌胃前禁食不禁水 24 h, 灌胃结束后 2 h, 除正常组外, 其余各组一次性灌胃 2 g/kg APAP 混悬液建立 APAP 急性肾损伤模型^[13-14], 正常组灌胃等体积 0.5% CMC-Na。实验中给药体积均为 1.6 mL/100 g。给药后 2 h 恢复饮食, 以补充大鼠体力, 此后, 禁食不禁水 24 h, 麻醉后眼眶后静脉丛取血, 处死大鼠并分离大鼠肾组织, 部分肾立即浸泡在 4% 多聚甲醛溶液中固定, 剩余肾组织存储于 -80℃ 冰箱备用。

1.3.2 脏器系数

各组大鼠麻醉前称重, 处死后分离肾组织并称重, 计算脏器系数(脏器系数(%) = $A(g)/B(g) \times 100$, 其中 A 为大鼠处死时的肾质量, B 为大鼠处死前的体重)。

1.3.3 血清 Cr、BUN 水平

大鼠血液室温静置 2 h 后, 4℃, 4000 r/min, 离心 10 min 取上清, 按试剂盒说明书, 检测血清 Cr、BUN 水平。

1.3.4 肾组织 GSH、T-SOD、CAT 活性及 MDA 含量
每只大鼠分别称取约 150 mg 肾组织, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4℃, 2500 r/min, 离心 15 min 得 10% 组织匀浆。按试剂盒说明书检测 GSH、T-SOD、CAT 活力及 MDA 含量。

1.3.5 肾组织病理学检测

大鼠肾组织用 4% 多聚甲醛固定最少 24 h, 然后进行石蜡包埋, 制成 5 μ m 厚的切片, 进行 HE 染色, 每组随机选取 4 只大鼠并对每张切片的 3 个区域在显微镜下观察并拍照, 肾组织中的细胞损伤和病理特征采用半定量法进行评分: - : 无病理变化; + : 少量(<25% 组织受影响); ++ : 中等(25% ~ 50% 组织受影响); +++ : 严重(51% ~ 75% 组织受影响); ++++ : 非常严重(>75% 组织受影响)^[13]。

1.3.6 肾组织 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路相关蛋白表达

每只大鼠分别称取 100 mg 肾组织于 10 mL 离心管中, 加入 900 μ L 预冷的含有蛋白酶抑制剂及磷酸化酶抑制剂的蛋白裂解液, 冰水浴条件下机械匀浆, 冰上裂解 30 min 后, 匀浆液在 4℃, 10 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度。取适量上清液, 按 4 : 1 体积比加入 5 $\times$ 含溴酚蓝的上样缓冲液, 并调整各组蛋白浓度到相同浓度, 100℃ 煮沸 10 min, 充分变性, 即为蛋白样品。每个样本取 30 μ g 蛋白, 以 10% ~ 12.5% 的凝胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳条件为 80 V, 30 min; 120 V, 1 h。此后以湿转法恒流 200 mA 转膜 1~2 h, 转膜完成后, 将 PVDF 膜浸泡于购买的封闭液中, 室温下封闭 30 min, 加入稀释后的一抗 4℃ 摇床孵育过夜(一抗稀释比例为: Trx-1, 1 : 2000; TXNIP, 1 : 1000; NLRP3, 1 : 1000; ASC, 1 : 1000; Caspase-1, 1 : 1000; Cleaved caspase-1, 1 : 1000; IL-1 β , 1 : 1000; mature IL-1 β , 1 : 1000)。第 2 天, 使用 TBST 清洗膜 3 次, 每次 10 min, 再加入 HRP 标记的羊抗兔二抗或羊抗鼠二抗孵育 2 h(二抗稀释比例均为 1 : 5000), 此后, 使用 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min。使用化学发光系统成像扫描, Image J 软件分析条带的灰度值, 以 β -actin 作为参照, 进行定量分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 统计学软件对数据进行分析, 计量数据采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 GraphPad Prism 处理数据, 组间比较采用单因素方

差分析,两组间比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CUR 对 APAP 诱导损伤大鼠肾指数及血清 Cr、BUN 水平的影响

与正常组相比,模型组大鼠肾指数显著增加($P<0.01$),血清 Cr、BUN 水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,CUR 低、中、高剂量组及 NAC 组大鼠肾指数均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清 Cr、BUN 水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 1。

2.2 CUR 对大鼠肾组织 T-SOD、GSH、CAT 活性及 MDA 含量的影响

与正常组相比,模型组大鼠肾组织中 T-SOD、GSH、CAT 的活性显著降低($P<0.01$),MDA 的含量显著升高($P<0.01$);与模型组相比,NAC 可明显提高大鼠肾 T-SOD、GSH、CAT 活性,降低大鼠肾 MDA 水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。CUR 中、高剂量组可明显提高大鼠肾 T-SOD、GSH、CAT 活性,降低大鼠肾 MDA 水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 2。

2.3 CUR 对大鼠肾病理学变化的影响

正常组大鼠肾未见明显变化,模型组大鼠肾髓

质肾小管内见透明管型,伴有肾小管扩张及上皮细胞变性,此外,在间质组织观察到充血和炎症浸润;与 APAP 组相比,NAC 组肾小管上皮细胞结构正常,肾小管内透明管型减少,肾小管扩张减轻,肾间质无明显充血和炎症浸润;不同剂量的 CUR 预防性给药均有效改善上述病理学变化,与病理检查结果一致,不同剂量的 CUR 处理后,APAP 诱导的肾各项病理学评分均降低。见图 1、表 3。

2.4 CUR 对大鼠肾 Trx-1/TXNIP/NLRP3 炎症小体通路的影响

与正常组相比,模型组大鼠肾组织中 Trx-1 蛋白的表达水平明显下调($P<0.05$),TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1、mature IL-1 β 蛋白的表达水平显著上调($P<0.01$);与模型组相比,NAC 组、CUR 中、高剂量组 Trx-1 蛋白的表达水平明显上调($P<0.01$),此外,NAC 组 TXNIP、NLRP3、Cleaved caspase-1、mature IL-1 β 蛋白的表达水平明显下调($P<0.01$),CUR 低剂量组 TXNIP、Cleaved caspase-1、mature IL-1 β 蛋白的表达水平明显下调($P<0.01$),CUR 中、高剂量组 TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1、mature IL-1 β 蛋白的表达水平均明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 4、图 2。

表 1 CUR 对 APAP 诱导损伤大鼠肾指数及血清 Cr、BUN 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 1 Effects of CUR on kidney index and serum Cr, BUN in rats with APAP induced injury

组别 Groups	肾指数(%) Kidney index	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)
正常组 Normal group	0.83 $\pm$ 0.06	36.23 $\pm$ 11.32	10.27 $\pm$ 1.03
模型组 Model group	1.06 $\pm$ 0.08 ^{##}	76.49 $\pm$ 17.22 ^{##}	26.82 $\pm$ 8.66 ^{##}
阳性药组 NAC group	0.89 $\pm$ 0.15 [*]	43.76 $\pm$ 9.80 ^{**}	15.87 $\pm$ 6.37 [*]
姜黄素低剂量组 CUR-L group	0.89 $\pm$ 0.09 ^{**}	52.87 $\pm$ 19.11 [*]	17.20 $\pm$ 3.68 [*]
姜黄素中剂量组 CUR-M group	0.88 $\pm$ 0.15 ^{**}	43.84 $\pm$ 18.11 ^{**}	13.90 $\pm$ 1.98 ^{**}
姜黄素高剂量组 CUR-H group	0.81 $\pm$ 0.10 ^{**}	38.97 $\pm$ 10.66 ^{**}	12.69 $\pm$ 1.86 ^{**}

注:与正常组相比, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with normal group, ^{##} $P<0.01$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

表 2 CUR 对大鼠肾组织 T-SOD、GSH、CAT 活性及 MDA 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Effects of CUR on T-SOD, GSH, CAT activities and MDA content in rat kidney

组别 Groups	T-SOD (U/mg Pro)	GSH ($\mu\text{mol/mg Pro}$)	CAT (U/mg Pro)	MDA (nmol/mg Pro)
正常组 Normal group	418.26 $\pm$ 33.15	2.28 $\pm$ 0.28	156.99 $\pm$ 16.05	0.94 $\pm$ 0.24
模型组 Model group	311.32 $\pm$ 53.66 ^{##}	1.29 $\pm$ 0.26 ^{##}	94.55 $\pm$ 29.39 ^{##}	2.05 $\pm$ 0.42 ^{##}
阳性药组 NAC group	378.93 $\pm$ 51.45 [*]	1.60 $\pm$ 0.24 [*]	140.81 $\pm$ 32.77 [*]	1.30 $\pm$ 0.18 ^{**}
姜黄素低剂量组 CUR-L group	352.80 $\pm$ 41.89	1.49 $\pm$ 0.21 [*]	129.54 $\pm$ 27.95	1.52 $\pm$ 0.26
姜黄素中剂量组 CUR-M group	376.43 $\pm$ 49.96 [*]	1.57 $\pm$ 0.20 [*]	132.78 $\pm$ 29.34 [*]	1.31 $\pm$ 0.24 ^{**}
姜黄素高剂量组 CUR-H group	378.24 $\pm$ 31.35 [*]	1.73 $\pm$ 0.33 ^{**}	143.00 $\pm$ 12.48 [*]	1.26 $\pm$ 0.32 ^{**}

注:与正常组相比, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with normal group, ^{##} $P<0.01$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

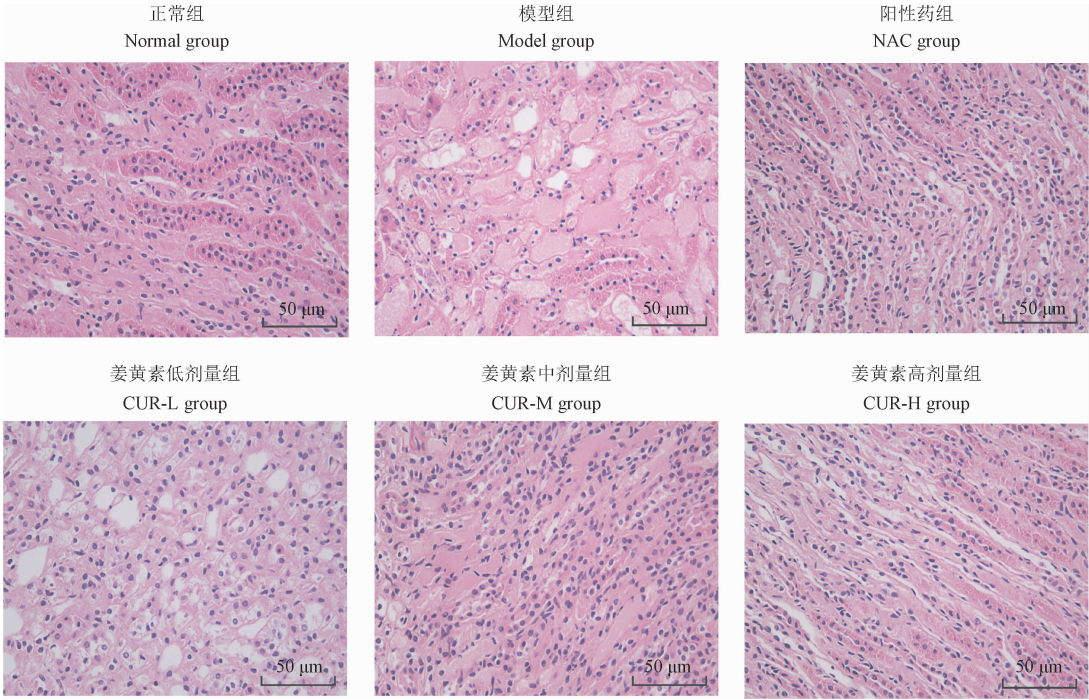


图 1 姜黄素对大鼠肾病理损伤的影响

Figure 1 Effects of CUR on pathological injury of rat kidney

表 3 CUR 减轻 APAP 诱导的大鼠肾组织病理学变化

Table 3 CUR alleviates APAP-induced histopathologic changes in kidney tissues of rats

组别 Groups	上皮细胞变性 Degeneration of Epithelial cells	透明管型 Hyaline casts	肾小管扩张 Tubular dilatation	充血 Congestion	炎症浸润 Inflammatory infiltration
正常组 Normal group	-	-	-	-	-
模型组 Model group	+++	++++	+++	++	+++
阳性药组 NAC group	+	+	+	-	+
姜黄素低剂量组 CUR-L group	++	+++	++	++	++
姜黄素中剂量组 CUR-M group	+	++	+	+	+
姜黄素高剂量组 CUR-H group	+	++	+	-	+

注：-：无病理变化；+：少量（<25%组织受影响）；++：中等（25%~50%组织受影响）；+++：严重（51%~75%组织受影响）；++++：非常严重（>75%组织受影响）。

Note. -, No pathological change. +, Mild (<25% of sections). ++, Moderate (25%~50% of sections). +++, Severe (50%~75% of sections). +++++, Very severe (>75% of sections).

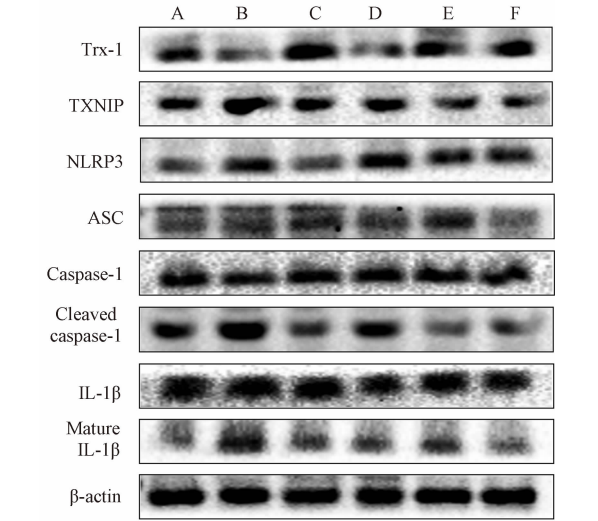
表 4 各组大鼠肾组织 Trx-1/TXNIP/NLRP3 炎症小体通路蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Comparison of Trx-1/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway protein expression in rat's kidney tissue of each group

组别 Groups	Trx-1 / β -actin	TXNIP / β -actin	NLRP3 / β -actin	ASC / β -actin	Cleaved caspase-1 /caspase-1	Mature IL-1 β /IL-1 β
正常组 Normal group	0.82 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.03
模型组 Model group	0.67 $\pm$ 0.03 [#]	0.92 $\pm$ 0.03 ^{##}	0.96 $\pm$ 0.03 ^{##}	1.11 $\pm$ 0.03 ^{##}	1.11 $\pm$ 0.04 ^{##}	1.07 $\pm$ 0.04 ^{##}
阳性药组 NAC group	0.92 $\pm$ 0.03 ^{**}	0.61 $\pm$ 0.04 ^{**}	0.64 $\pm$ 0.04 ^{**}	1.03 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.07 ^{**}	0.77 $\pm$ 0.04 ^{**}
姜黄素低剂量组 CUR-L group	0.67 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.04 ^{**}	0.99 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.02 ^{**}	0.89 $\pm$ 0.04 ^{**}
姜黄素中剂量组 CUR-M group	0.78 $\pm$ 0.04 [*]	0.63 $\pm$ 0.05 ^{**}	0.75 $\pm$ 0.02 ^{**}	0.96 $\pm$ 0.02 ^{**}	0.63 $\pm$ 0.06 ^{**}	0.82 $\pm$ 0.03 ^{**}
姜黄素高剂量组 CUR-H group	0.79 $\pm$ 0.02 ^{**}	0.60 $\pm$ 0.06 ^{**}	0.73 $\pm$ 0.04 ^{**}	0.74 $\pm$ 0.04 ^{**}	0.67 $\pm$ 0.06 ^{**}	0.82 $\pm$ 0.06 ^{**}

注：与正常组相比，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组相比，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.



注:A:正常组;B:模型组;C:阳性药组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组。

图 2 大鼠肾组织 Trx-1/TXNIP/NLRP3 炎症小体通路相关蛋白的表达

Note. A, Normal group. B, Model group. C, NAC group. D, CUR-L group. E, CUR-M group. F, CUR-H group.

Figure 2 Expression of Trx-1/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway related proteins in kidney tissues of rats

3 讨论

APAP 是世界上广泛应用的解热镇痛药,但 APAP 过量使用会导致严重的急性肝损伤和肾损伤^[1,7]。APAP 诱导急性肝损伤的防治作用及机制已进行了广泛的研究^[5,8],但 APAP 过量所致肾损伤的研究较少。线粒体是 APAP 肝、肾毒性的主要作用靶点,过量的 NAPQI 导致 GSH 耗竭进而与线粒体蛋白中巯基结合导致线粒体氧化应激和功能障碍,最终导致肝、肾细胞坏死及炎症反应^[6,8]。因此,降低氧化应激和炎症反应是防治 APAP 肝毒性和肾毒性的重要策略。

硫氧还蛋白 1 (thioredoxin 1, Trx 1)作为一种小分子抗氧化蛋白,可减轻多种刺激引发的氧化应激性肾损伤^[16],硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP)是 Trx-1 的负性调节蛋白同时也是无菌性炎症反应的关键调节蛋白,二者的相互作用在调控炎症和氧化应激引起的肝、肾损伤中发挥重要作用^[17-18]。研究表明,过量 APAP 导致机体 GSH 耗竭并诱发大量 ROS 生成,ROS 促使 TXNIP 活化进而与 Trx-1 分离,高表达的 TXNIP 与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3

(NLRP3)连接,激活由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)及 caspase-1 形成的 NLRP3 炎症小体,最终诱发炎症性肝损伤^[17,19]。然而,关于 Trx-1 在 APAP 诱导的肾损伤中的作用未见相关报道。姜黄素是一种天然多酚类化合物,通过抗氧化、抗炎作用对多种因素引发的肾病具有较好的防治作用^[20]。研究表明,姜黄素通过提高肾 GSH、SOD、CAT 等抗氧化酶的活性缓解 APAP 诱导的肾损伤,但其具体机制仍不清楚^[9,12]。

Cr 和 BUN 是反映肾损伤的常见生化标志物^[12],本研究中,单次灌胃给予 2 g/kg APAP 导致大鼠肾指数显著增加且血清 Cr、BUN 水平显著升高,这表明 APAP 诱导的急性肾损伤模型建立成功。病理学检查结果显示,过量 APAP 导致大鼠肾上皮细胞变性、肾小管扩张、炎性浸润等病理学改变,CUR 及 NAC 预防给药显著降低大鼠肾指数、血清 Cr、BUN 水平并明显改善肾病理学变化及病理评分。进一步研究显示,CUR 及 NAC 预防性给药显著提高损伤大鼠肾组织中 GSH、T-SOD、CAT 的活性,降低 MDA 含量,这些结果表明,CUR 及 NAC 通过抗氧化作用改善过量 APAP 导致的急性肾损伤。机制研究表明,过量 APAP 导致大鼠肾组织中 Trx-1 的表达明显下调, TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1 及 mature IL-1β 的表达均显著上调,CUR 及 NAC 预防性给药增强了 Trx-1 的表达,下调 TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1 及 mature IL-1β 蛋白的表达,这些结果表明,CUR 及 NAC 可能通过调控 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路缓解过量 APAP 导致的急性肾损伤。

综上所述,过量 APAP 诱导的急性肾损伤与 Trx-1/TXNIP 失衡引起的氧化应激以及 NLRP3 炎症小体激活诱导的炎症反应有关。CUR 可通过增强 Trx-1 的表达,并抑制 TXNIP/NLRP3 通路的活化减轻过量 APAP 引发的肾氧化应激及炎症反应。然而,APAP 诱导的急性肾损伤是一个复杂的病理学过程,CUR 如何调节 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路各蛋白间的作用还有待进一步探究。

参考文献:

[1] Fisher ES, Curry SC. Evaluation and treatment of acetaminophen toxicity [J]. Adv Pharmacol, 2019, 85: 263-272.

[2] Yoon E, Babar A, Choudhary M, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update [J]. J Clin Transl Hepatol, 2016, 4(2): 131-142.

- [3] Tujios SR, Hynan LS, Vazquez MA, et al. Risk factors and outcomes of acute kidney injury in patients with acute liver failure [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13(2): 352-359.
- [4] Leithead JA, Ferguson JW, Bates CM, et al. The systemic inflammatory response syndrome is predictive of renal dysfunction in patients with non-paracetamol-induced acute liver failure [J]. Gut, 2009, 58(3): 443-449.
- [5] 余朋飞, 吴桥, 段钟平, 等. 对乙酰氨基酚致药物性肝损伤的机制研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(9): 2108-2112.
- [6] Akakpo JY, Ramachandran A, Orhan H, et al. 4-methylpyrazole protects against acetaminophen-induced acute kidney injury [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 409: 115317.
- [7] Alshahrani S, Ashafaq M, Hussain S, et al. Renoprotective effects of cinnamon oil against APAP-Induced nephrotoxicity by ameliorating oxidative stress, apoptosis and inflammation in rats [J]. Saudi Pharm J, 2021, 29(2): 194-200.
- [8] Yan M, Huo Y, Yin S, et al. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions [J]. Redox Biol, 2018, 17: 274-283.
- [9] El-Maddawy ZK, El-Sayed YS. Comparative analysis of the protective effects of curcumin and N-acetyl cysteine against paracetamol-induced hepatic, renal, and testicular toxicity in Wistar rats [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(4): 3468-3479.
- [10] Soleimani V, Sahebkar A, Hosseinzadeh H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances; review [J]. Phytother Res, 2018, 32(6): 985-995.
- [11] 牟海军, 金海, 陈幸幸, 等. 姜黄素对肝癌模型小鼠 Keap1/ARE 信号通路及胆汁酸肝肠循环的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 8-14.
- [12] Kheradpezhoh E, Panjeshahin MR, Miri R, et al. Curcumin protects rats against acetaminophen-induced hepatorenal damages and shows synergistic activity with N-acetyl cysteine [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 628(1/2/3): 274-281.
- [13] Wans EM, Ahmed MM, Mousa AA, et al. Ameliorative effects of corn silk extract on acetaminophen-induced renal toxicity in rats [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(2): 1762-1774.
- [14] Canayakin D, Bayir Y, Kilic Baygatalp N, et al. Paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats; the protective role of *Nigella sativa* [J]. Pharm Biol, 2016, 54(10): 2082-2091.
- [15] Ahmad MM, Rezk NA, Fawzy A, et al. Protective effects of curcumin and silymarin against paracetamol induced hepatotoxicity in adult male albino rats [J]. Gene, 2019, 712: 143966.
- [16] Watanabe R, Nakamura H, Masutani H, et al. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2 [J]. Pharmacol Ther, 2010, 127(3): 261-270.
- [17] Lv H, Zhu C, Wei W, et al. Enhanced Keap1-Nrf2/Trx-1 axis by daphnetin protects against oxidative stress-driven hepatotoxicity via inhibiting ASK1/JNK and Txnip/NLRP3 inflammasome activation [J]. Phytomedicine, 2020, 71: 153241.
- [18] An X, Zhang Y, Cao Y, et al. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1516.
- [19] Iverson SV, Eriksson S, Xu J, et al. A Txnrd1-dependent metabolic switch alters hepatic lipogenesis, glycogen storage, and detoxification [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 63: 369-380.
- [20] Farkhondeh T, Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, et al. Protective effects of curcumin against nephrotoxic agents [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2019, 19(3): 176-182.

[收稿日期] 2022-02-10