

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002847

姜黄素通过 TGF- β /Smads 信号通路对肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化抑制作用

王学敏, 庞 欣, 王晓蒙, 庞欣欣, 张建伟

(河南中医药大学第二附属医院肾病科, 郑州 450002)

【摘要】目的:探究姜黄素通过 TGF- β /Smads 信号通路对肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化的抑制作用。**方法:**将 40 只健康 SD 大鼠按随机数字表法平均分为假手术组、模型组、低剂量组和高剂量组。使用夹闭法松开肾蒂的方法复制肾缺血再灌注大鼠模型。检测血清中血清肌酐(serum creatinine, Scr)和尿素氮(urea nitrogen, BUN)水平、肾组织胶原含量、肾组织的病理变化以及肾脏中转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)、Smad3 和 Smad7 蛋白表达水平。**结果:**假手术组肾小管形态正常, 模型组肾小管间质呈现明显的病理变化, 低剂量组和高剂量组肾小管间质纤维病理变化明显改善, 且高剂量组改善程度高于低剂量组; 模型组的肾小管间质纤维化评分、Scr、BUN、胶原含量、TGF- β 1 和 Smad3 明显高于假手术组, Smad7 明显低于假手术组($P<0.05$); 低剂量组和高剂量组肾小管间质纤维化评分、Scr、BUN、胶原含量、TGF- β 1 和 Smad3 均明显低于模型组, Smad7 明显高于模型组($P<0.05$); 高剂量组肾小管间质纤维化评分、Scr、BUN、胶原含量、TGF- β 1 和 Smad3 评分明显低于低剂量组, Smad7 明显高于低剂量组($P<0.05$)。**结论:**姜黄素对肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化具有抑制作用, 其作用机制可能为抑制 TGF- β /Smad 信号转导通路。

【关键词】姜黄素; 肾缺血后再灌注; 肾小管间质纤维化; TGF- β /Smads 信号通路

【中图分类号】R692.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-10-22

Curcumin inhibits tubulointerstitial fibrosis after renal ischemia-reperfusion through TGF- β /Smads signaling pathway

Wang Xuemin, Pang Xin, Wang Xiaomeng, Pang Xinxin, Zhang Jianwei

(Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To explore the inhibitory effect of curcumin inhibits tubulointerstitial fibrosis after renal ischemia-reperfusion through TGF- β /Smads signaling pathway. **Methods:** Forty healthy SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, low dose group and high dose group. Clamped and loosened renal pedicle to make renal ischemia-reperfusion rat model. Serum creatinine(Scr) and urea nitrogen(BUN) levels, collagen content in kidney tissue, pathological changes of kidney tissue and expression of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 protein in kidney were measured. **Results:** The shape of renal tubules was normal in sham-operation group, and there were significant pathological changes of renal tubular fibers in model group. The pathological changes of tubulointerstitial fibers in low dose group and high dose group were significantly improved, and the improvement degree in high dose group was higher than that in low dose group. The renal tubulointerstitial fibrosis score, Scr, BUN, collagen content, TGF- β 1 and Smad3 in the model group were significantly higher than those in the sham operation group, and Smad7 was significantly lower than that in the sham operation group($P<0.05$). The tubulointerstitial fibrosis score, Scr, BUN, collagen content, TGF- β 1 and Smad3 in low dose group and high dose group were significantly lower than those in model group, and Smad7 was significantly higher than that in model group($P<0.05$). The scores of renal tubulointerstitial fibrosis, Scr, BUN, collagen content, TGF- β 1 and Smad3 in high dose

group were significantly lower than those in low dose group, and Smad7 was significantly higher than that in low dose group($P<0.05$). **Conclusion:** Curcumin can inhibit tubulointerstitial fibrosis after renal ischemia-reperfusion, and the mechanism may be inhibition of TGF- β /Smad signal transduction pathway.

【Key words】 curcumin; renal ischemia-reperfusion; renal tubulointerstitial fibrosis; TGF- β /Smads signaling pathway

作者简介: 王学敏, Email: wangxueminb@163.com,

研究方向: 中医药防治慢性肾脏疾病。

通信作者: 庞欣欣, Email: doctorpang@aliyun.com。

基金项目: 2018 年河南省高等学校重点科研资助项目(编号: 19A360009);

2018 年河南省中医院院级课题资助项目(编号: 2018YJKT01)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210519.1308.006.html>

(2021-05-19)

血管手术、心血管疾病、肾脏移植等多种疾病或手术会造成肾脏缺血再灌注,严重的肾缺血再灌注不仅会出现急性肾衰竭,而且还会导致肾小管间质纤维化,严重损伤肾功能^[1-2]。目前研究认为,上皮细胞向肌成纤维细胞转分化是肾小管间质纤维化的重要发病机制之一^[3]。上皮细胞向肌成纤维细胞转分化是在多种细胞因子、激素及生长因子共同作用之下完成。转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)具有较强的促纤维化作用,TGF- $\beta 1$ 激活 Smads 信号转导通路,诱导 Smads 信号转导通路的下游因子表达,调控上皮细胞向肌成纤维细胞转分化^[4]。姜黄素是从中药姜黄中提取的一种多酚类活性物质,已有研究表明姜黄素具有抗肾脏纤维化作用^[5-6]。本研究通过复制肾缺血再灌注大鼠模型,观察姜黄素对肾缺血再灌注大鼠肾小管间质纤维化的抑制作用,并探究姜黄素对 TGF- β /Smads 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雄性,体质量为 220~250 g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证编号为 SYXK(京)2015-0001。动物购买后适应性喂养 1 周。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 姜黄素(美国 Sigma 公司,用 0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制混悬液),天狼星红/快绿胶原蛋白染色试剂盒(上海士峰生物科技有限公司),兔抗大鼠 TGF- $\beta 1$ (美国 Sigma 公司)。

1.2.2 主要仪器 冰冻切片机和石蜡切片机(德国莱卡公司)、倒置显微镜(日本奥林巴斯公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)、全自动生化仪(美国雅培公司)。

1.3 动物分组及模型复制

将大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、低剂量组和高剂量组,每组 10 只。模型组、低剂量组和高剂量组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠,备皮,正中线开腹,腹腔内肠管拉向右侧,充分暴露左肾,分离左肾蒂,无菌无损伤微血管夹夹闭肾蒂,使左肾缺血 45 min,松开微血管夹,恢复左肾血供,复位肠管,关闭缝合腹腔,消毒。假手术组仅分离肾蒂,不夹闭肾蒂,其余操作和其他 3 组相同。

1.4 给药

各组大鼠在手术完成后第 2 天开始给药,假手术组和模型组灌胃 0.5%羧甲基纤维素钠溶液,低剂量组和高剂量组均灌胃含姜黄素的羧甲基纤维素钠溶液,低剂量组剂量为 100 mg/kg,高剂量组剂量为 200 mg/kg,灌胃体积为 10 mL/kg,每日早晚各灌胃 1 次,连续灌胃 4 周。

1.5 指标检查

1.5.1 采集标本 末次灌胃 1 h 后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,辅助动脉取血,静止,离心,分离收集血清。取左肾,部分保存于 4.0%多聚甲醛中,部分保存于液氮中,备用。

1.5.2 肾功能检测 用全自动生化仪检测各组大鼠血清中的血清肌酐(serum creatinine, Scr)和尿素氮(urea nitrogen, BUN)水平。

1.5.3 肾中胶原检测 使用冰冻切片机将肾组织切成 10 μ m 的切片,使用天狼星红/快绿胶原蛋白染色试剂盒的操作说明,检测光密度(optical density, OD)_{540 nm} 及 OD_{605 nm} 的值,公式计算组织胶原量及非胶原量,计算胶原量所占百分比。

1.5.4 肾脏组织病理 HE 染色和 Masson 染色 取经 4.0%多聚甲醛固定的肾脏,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,石蜡切片机切片,HE 染色、Masson 染色,封片,显微镜下观察,在显微镜观察时尽量避免血管和肾小球,在 200 倍视野下,每张切片随机选取 10 个不重复视野,用 HPIAS1000 病理图文分析系统,根据肾脏中病变的百分数计算积分,积分计算规则:0 分:无病变(每个视野,以下均是);0.5 分:<5.0%;1 分:5.0%~15.0%;1.5 分:16.0%~25.0%;2.0 分:26.0%~35.0%;2.5 分:36.0%~45.0%;3 分:>45.0%。积分越高,肾小管间质纤维化越严重。

1.5.5 肾脏中 TGF- $\beta 1$ 、Smad3 和 Smad7 蛋白表达检测 使用 Western blot 和免疫荧光染色法检测各组大鼠肾脏中 TGF- $\beta 1$ 、Smad3 和 Smad7 蛋白表达水平。Western blot:取各组肾脏,匀浆,提取总蛋白,加样,电泳,转膜,封闭,TGF- $\beta 1$ (稀释 800 倍)、Smad3 和 Smad7(均稀释 600 倍)一抗下 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,冲洗,滴加二抗,室温孵育 2.0 h,冲洗,滴加 ECL 荧光试剂,暗室曝光,Image J 图像处理软件分析图像,计算各组大鼠肾脏中 TGF- $\beta 1$ 、Smad3 和 Smad7 灰度值。免疫荧光染色法:各组大鼠肾脏组织经过脱水、包埋、固定后,加入 TGF- $\beta 1$ (稀释 800 倍)、Smad3 和 Smad7(均稀释 600 倍)一抗并在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,冲洗,滴加荧光标记的二抗,室温孵育 1 h,封片,荧光显微镜下观察。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 进行统计学处理。计数资料采用百分率(%)表示,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间计数资料的差异用卡方检验进行统计分析,多组间计量资料的差异用单因素方差分析,多组均数之间两两比较使用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组肾脏病理学变化比较

假手术组大鼠肾脏的肾小管和肾间质组织学正常,没有病理变化;模型组大鼠肾脏中肾小管呈弥漫性扩张,肾小管上皮细胞出现肿胀、坏死、萎缩等病理变化,肾小管间质呈弥漫性单核细胞浸润,肾小管间质纤维化严重;低剂量组大鼠肾脏中肾小管弥漫性扩张明显降低,肾小管上皮细胞及肾小管间质纤维化病理变化明显改善;高剂量组大鼠肾脏的肾小管和肾小管间质病理改善情况好于低剂量组(图 1、图 2)。

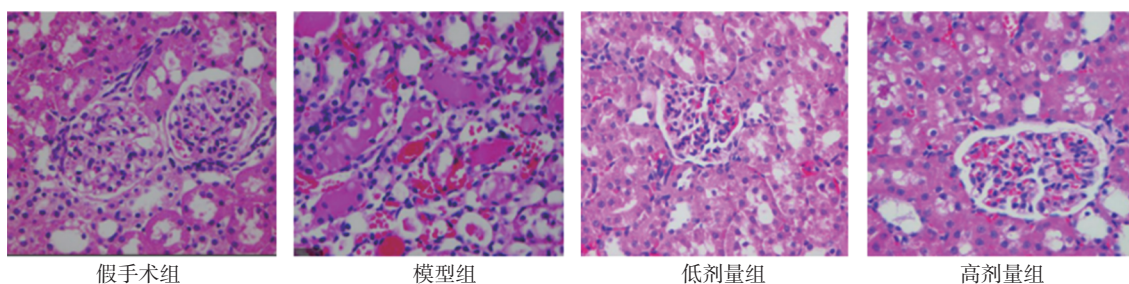


图 1 各组肾脏病理学 HE 染色变化比较

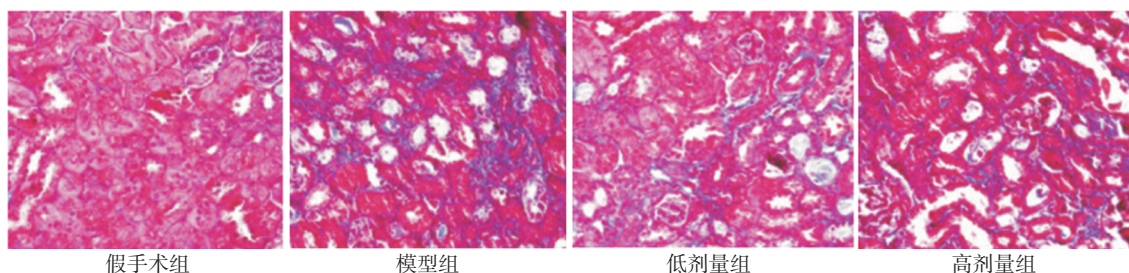


图 2 各组肾脏病理学 Masson 染色变化比较

2.2 各组肾小管间质纤维化评分比较

模型组的肾小管间质纤维化评分明显高于假手术组 ($P < 0.05$); 低剂量组和高剂量组肾小管间质纤维化评分均明显低于模型组 ($P < 0.05$); 高剂量组肾小管间质纤维化评分明显低于低剂量组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组肾小管间质纤维化评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	肾小管间质纤维化评分
假手术组	0.52 ± 0.10
模型组	2.34 ± 0.21^a
低剂量组	1.89 ± 0.23^b
高剂量组	1.23 ± 0.31^{bc}
F 值	124.136
P 值	0.000

注: a, 与假手术组比较, $P < 0.05$; b, 与模型组比较, $P < 0.05$; c, 与低剂量组比较, $P < 0.05$

2.3 各组大鼠血清中 BUN 和 Scr 及肾组织胶原含量比较

模型组 BUN、Scr 和胶原含量明显高于假手术组 ($P < 0.05$); 低剂量组和高剂量组 BUN、Scr 和胶原含量明显低于假手术组 ($P < 0.05$); 高剂量组 BUN、Scr 和胶原含量明显低于低剂量组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组大鼠血清中 BUN 和 Scr 及肾脏胶原含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)	胶原含量/%
假手术组	6.23 ± 0.59	68.40 ± 9.43	3.76 ± 0.58
模型组	25.69 ± 3.29^a	175.42 ± 20.14^a	12.54 ± 0.78^a
低剂量组	17.48 ± 3.01^b	130.21 ± 14.39^b	8.45 ± 0.59^b
高剂量组	12.19 ± 2.11^{bc}	102.33 ± 13.57^{bc}	5.63 ± 0.38^{bc}
F 值	110.517	92.532	405.877
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与假手术组比较, $P < 0.05$; b, 与模型组比较, $P < 0.05$; c, 与低剂量组比较, $P < 0.05$

2.4 各组大鼠肾脏中 TGF-β1、Smad3 和 Smad7 蛋白表达水平比较

模型组肾脏中 TGF-β1、Smad3 蛋白表达水平明显高于假手术组, Smad7 蛋白表达水平明显低于假手术组 ($P < 0.05$); 低剂量组和高剂量组肾脏中 TGF-β1、Smad3 蛋白表达水平明显低于模型组, Smad7 蛋白表达水平明显高于模型组 ($P < 0.05$); 高剂量组肾脏中 TGF-β1、Smad3 蛋白表达水平明显低于低剂量组, Smad7 蛋白表达水平明显高于低剂量组 ($P < 0.05$)。免疫荧光染色显示和 Western blot 检测相似的结果 (表 3、图 2 和图 3)。

表 3 各组大鼠肾脏中 TGF-β1、Smad3 和 Smad7 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β	Smad3	Smad7
假手术组	0.31 ± 0.08^a	0.28 ± 0.05^a	0.94 ± 0.10^a
模型组	0.93 ± 0.12	0.77 ± 0.11	0.44 ± 0.06
低剂量组	0.87 ± 0.12^b	0.56 ± 0.15^b	0.72 ± 0.07^b
高剂量组	0.60 ± 0.07^{bc}	0.38 ± 0.12^{bc}	0.87 ± 0.09^{bc}
F 值	80.424	36.058	73.822
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与假手术组比较, $P < 0.05$; b, 与模型组比较, $P < 0.05$; c, 与低剂量组比较, $P < 0.05$

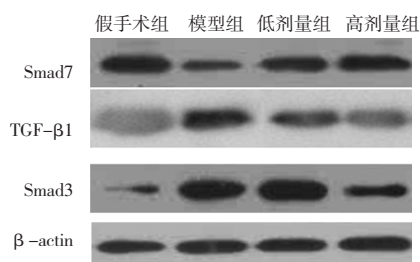
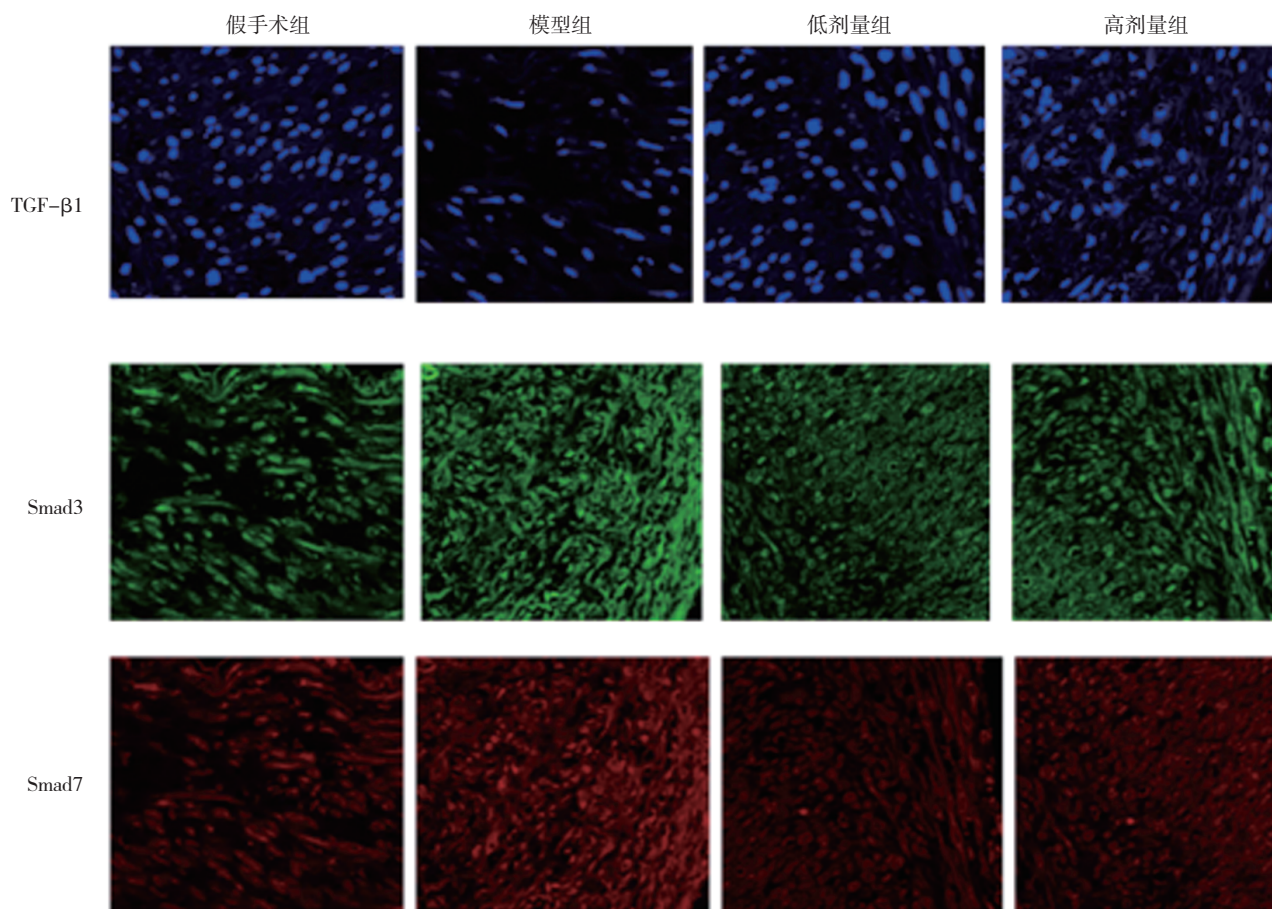


图 2 各组大鼠肾脏中 TGF-β1、Smad3 和 Smad7 蛋白表达水平比较

图3 各组大鼠肾脏中 TGF- β 1、Smad3 和 Smad7 免疫荧光染色检测

3 讨论

肾脏是机体中血液高灌注器官,易因缺血再灌注发生损伤,缺血再灌注对肾功能的损伤大于单纯缺血造成的肾功能损伤,是临床中引起肾功能衰竭的高危险病因^[7-8]。肾缺血再灌注损伤后肾小管间质会发生纤维化,肾小管间质纤维化是间质成纤维细胞大量增生及细胞外基质大量堆积,致使肾小管间质纤维化和肾小球硬化。肾小管间质纤维化是多种肾病进展的共同途径^[9-10]。本实验通过夹闭和松开大鼠肾蒂复制肾缺血再灌注动物模型,模型复制后,大鼠肾组织中胶原含量及血清中 BUN 和 Scr 水平明显升高,肾小管呈弥散性扩张,肾小管上皮细胞出现肿胀、坏死、萎缩等病理变化,肾间质呈弥漫性单核细胞浸润,间质纤维化严重。血清中的 BUN 和 Scr 是临床中评定肾功能的主要指标^[11]。细胞外基质的主要成分是胶原,肾组织中胶原的含量高低可以

直接反映肾小管间质纤维化程度^[12]。从上述结果可以看出通过复制肾脏缺血再灌注大鼠模型后,大鼠的肾功能明显降低,肾小管间质出现严重的纤维化,通过缺血再灌注复制肾小管间质纤维化是可行且成功的。给肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化大鼠灌胃姜黄素后,大鼠肾小管及肾小管间质纤维化的病理改善,血清中的 BUN 和 Scr 水平降低,肾组织中的胶原含量减低,并且随着姜黄素剂量的增加,上述指标的改善程度增加,这说明姜黄素对肾缺血再灌注后纤维化有很好的保护作用,能有效抑制或改善肾缺血再灌注后肾纤维化,改善肾功能。

肾小管间质纤维化受多种细胞因子、激素及生长因子通过多种信号转导通路的调节而进行。近年来国内外研究表明 TGF- β 是机体中重要的促进肾纤维化活性因子,TGF- β 1 是 TGF- β 家族中活性最强的一种,能够促进产生细胞外基质,致纤维化的作用最强^[13-14]。Smad 蛋白是 TGF- β 蛋白家族下游作用蛋白,TGF- β 1 和 TGF- β 1 受体结合,激活 Smad3

蛋白磷酸化,进入细胞核,与 DNA 或其他转录因子结合,调节基因转录,促进上皮细胞向成纤维细胞转分化,促进肾小管间质纤维化^[15]。Smad7 蛋白是 TGF- β 1 特有的内源性抑制因子,可抑制 TGF- β 1 激活 Smad3 磷酸化激活,抑制 TGF- β /Smad 信号转导通路抑制肾小管间质纤维化^[16]。经过姜黄素干预的肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化的大鼠肾脏中的 TGF- β 1 和 Smad3 蛋白表达水平降低,同时 Smad7 蛋白表达水平升高,说明姜黄素对肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化的抑制作用可能是通过抑制 TGF- β /Smad 信号转导通路实现的。机体内的信号转导通路有多种,且很多信号转导通路有相互联系。上述研究虽然发现经过姜黄素干预后肾缺血再灌注大鼠内肾脏中的 TGF- β 1 和 Smad3 蛋白表达水平降低,但不能完全确切地说明姜黄素是通过 TGF- β /Smad 信号转导通路实现对肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化的抑制,这需要在后期的研究中通过体内、体外实验,如给予 TGF- β /Smad 信号转导通路中关键蛋白(酶)的抑制剂、siRNA 实验等进一步验证。

综上所述,姜黄素对肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化具有抑制作用,其作用机制可能是抑制 TGF- β /Smad 信号转导通路。

参 考 文 献

- [1] 陈 烽,任 雨,姚许平. 肾移植后肾间质纤维化和肾小管萎缩研究进展[J]. 中国老年学杂志,2017,37(22):5726-5729.
- [2] 龚 亮,聂 峰,孙煦勇,等. 中国三类心死亡遗体器官捐献成人供肾移植术后的临床病理分析[J]. 中国全科医学,2016,19(33):4137-4141.
- [3] 刘 畅,朱春玲,严 瑞,等. 水飞蓟宾对肾间质纤维化模型大鼠肾小管上皮-间充质转分化的影响[J]. 贵州医科大学学报,2018,43(4):394-399,405.
- [4] 张喜奎,郭远华,许云龙. 基于 TGF- β /Smads 信号通路研究益肾降浊方对慢性肾衰竭大鼠肾纤维化的影响[J]. 湖北中医药杂志,2015,37(9):12-14.
- [5] 唐春银,李玲玉,韩 杨,等. 姜黄素类似物 H8 通过 ERK 信号通路改善糖尿病小鼠肾脏纤维化的研究[J]. 中国糖尿病杂志,2018,26(12):1023-1028.
- [6] 杨 波,刘兰兰,段少峰. 水溶性姜黄素纳米粒的制备[J]. 河南大学学报(医学版),2019,38(1):6-9.
- [7] 巩 晶,陈乙铭,高成杰. 注射用乌司他丁在肾移植手术患者肾脏缺血再灌注损伤后对 IL-1、TNF- α 及尿量的影响[J]. 广东医学,2018,39(S1):S207-S208,S211.
- [8] 方梅荣,肖友文,李 灿. 左卡尼汀对心内直视术患者心肾缺血再灌注损伤的影响[J]. 解放军医药杂志,2016,28(12):87-90.
- [9] Stroot I,Stokman G,Teske GJ,et al. Chemokine expression in renal reperfusion injury is most profound during the reparative phase[J]. Int Immuno,2016,22(6):433-442.
- [10] Choi DE,Jeong JY,Lim BJ,et al. Aliskiren ameliorates renal inflammation and fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in mice[J]. J Urol,2016,186(2):694-701.
- [11] 赵爱萍,吴洋洋,吴 竞,等. 温阳活血法联合常规治疗对阳虚血瘀型 3~4 期慢性肾脏病患者的临床疗效[J]. 中成药,2019,41(1):70-74.
- [12] 丁汉东,廖贵益,钟金彪,等. 低温环境复灌对兔肾缺血-再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 器官移植,2018,9(5):372-378.
- [13] 刘劲松,林 哲,郑燕姣. 肾复康对肾纤维化模型大鼠转化生长因子- β 1、Smad2、Smad7 表达的影响[J]. 世界中医药,2018,13(12):3095-3098,3102.
- [14] 张喜奎,林艳蓝,林雅银,等. 桃核承气汤对 CRF 大鼠 TGF- β 1/Smad3 信号调控的 miR-29 表达的影响[J]. 时珍国医国药,2018,29(11):2591-2593.
- [15] 张永越,曹文富,田 晟,等. 益气、化痰、化痰中药制剂及其合剂对肾间质纤维化大鼠 TGF- β 1/Smad 通路及 TRB3 的影响[J]. 重庆医科大学学报,2018,43(8):1090-1096.
- [16] 陈薪薪,全 欢,陈 宇,等. 白藜芦醇对小鼠肾纤维化 TGF- β 1/Smads 信号转导通路的干预研究[J]. 中华中医药学刊,2016,34(5):1224-1227.

(责任编辑:冉明会)