

姜黄素对大鼠肾毒血清肾炎肾组织细胞外基质积聚的影响

鲍华英¹, 陈荣华², 黄松明¹, 张爱华¹, 郭梅², 费莉², 潘晓勤²

(1. 南京医科大学附属南京市儿童医院肾内科, 江苏 南京 210008; 2. 南京医科大学小儿肾脏病研究中心, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:观察姜黄素是否抑制肾炎大鼠肾组织Ⅲ型胶原和纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的积聚而对肾脏起保护作用。方法:72只雄性SD大鼠随机分成3组,每组24只。对照组尾静脉及腹腔注射生理盐水作对照;模型组尾静脉注射肾毒血清0.5 ml/d,连用2 d,腹腔注射二甲亚砷0.5 ml·kg⁻¹·d⁻¹;姜黄素组尾静脉注射肾毒血清0.5 ml/d,连用2 d,同时腹腔注射姜黄素50 mg·kg⁻¹·d⁻¹。分别于第3、7、14、28天各处死6只大鼠,部分肾组织福尔马林固定、石蜡包埋后进行免疫组织化学染色。结果:对照组大鼠肾小球基膜Ⅲ型胶原以及FN染色弱阳性。模型组大鼠肾小球Ⅲ型胶原和FN沉积的范围随着病程的进展逐渐增多,与相应时间对照组比较有显著差异(P<0.01)。姜黄素组肾小球Ⅲ型胶原和FN沉积的范围亦随时间的发展逐渐扩大,然而Ⅲ型胶原较同期模型组比较染色范围却明显缩小(P<0.01),而FN于7 d后才比模型组减少(P<0.01)。结论:姜黄素可抑制肾炎组织内Ⅲ型胶原和FN的积聚并可能延缓肾小球硬化的发生发展。

[关键词] 姜黄素;肾毒血清肾炎;胶原;纤维连接蛋白

[中图分类号] R692.31 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2004)01-0030-03

Effect of curcumin on extracellular matrix accumulation in the glomeruli in nephrotoxic sera nephritis rats

BAO Hua-Ying¹, CHEN Rong-Hua², HUANG Song-Ming¹, ZHANG Ai-Hua¹, GUO Mei², FEI Li², PAN Xiao-Qing²

(1 Department of Nephrology, Nanjing Children's Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu Province 210008, China; 2. Institute of Children Nephrology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu Province 210008, China)

ABSTRACT Objective: To observe whether curcumin could inhibit the accumulation of the collagen III and fibronectin in the glomeruli in nephrotoxic sera nephritis rats. **Methods:** Seventy-two healthy male Sprague-Dawley rats were divided into three groups, with 24 animals in each group. For normal control group, normal saline (0.5 ml/d) was injected through intra-caudal-vein for two days, and at the same time normal saline (0.5 ml/kg) was also daily administered intraperitoneally. For nephrotoxic sera nephritis group, nephrotoxic sera (0.5 ml/d) was injected through the tail vein for two days and dimethyl sulfoxide (0.5 ml/kg) was given intraperitoneally daily. For curcumin group, nephrotoxic sera was injected as above and meanwhile curcumin (50 mg·kg⁻¹·d⁻¹) was administered intraperitoneally every day. Six rats in each group were killed on the 3rd, 7th, 14th and 28th day. Their renal tissue was fixed in 10% formalin for examining the expression of collagen III and fibronectin. **Results:** Minimal staining of collagen III and fibronectin was detected in the basement membrane of normal control rats glomeruli. In the nephrotoxic sera nephritis rats and curcumin treated nephrotoxic sera nephritis rats, the accumulation of collagen III and fibronectin was increased progressively, with significant difference in the accumulation of collagen III (P<0.01) between these two groups at the same time points, while the significant difference in fibronectin accumulation (P<0.05) appeared only after the 7th days. **Conclusion:** Curcumin can reduce the accumulation of collagen III and fibronectin in the glomeruli. Hence we postulated that curcumin might have beneficial effect for retarding glomerulosclerosis.

KEY WORDS curcumin; nephrotoxic sera nephritis; collagen III, fibronectin

J Chin Integr Med, 2004, 2(1): 30-32

笔者既往研究发现姜黄素(curcumin)具有减少肾毒血清肾炎大鼠尿蛋白的排泄,降低血清胆固醇,抑制肾小球内细胞增殖、肾组织炎细胞浸润,减轻肾小管间质损害,阻止肾小球上皮细胞足突的融合,延缓基底膜的增厚等作用。肾小球疾病发病机制极其复杂,而细胞外基质(extracellular matrix, ECM)积聚是各类肾小球肾炎发展至肾小球硬化过程中常见而又突出的病理特征。本研究观察姜黄素是否抑制肾毒血清肾炎大鼠肾脏 ECM 中的Ⅲ型胶原和纤维连接蛋白(fibronectin, FN)积聚而对肾脏起保护作用。

1 材料和方法

1.1 药物和试剂 肾毒血清(兔抗大鼠肾皮质血清)参照本研究中心方法自制^[1],效价为1:32。姜黄素购于上海生物化学试剂厂。小鼠抗大鼠Ⅲ型胶原多克隆抗体、兔抗大鼠 FN 多克隆抗体、第二抗体

[基金项目] 南京市医学重点科技发展基金资助项目(No. ZKX0105)

[作者简介] 鲍华英(1963-),女,博士,副主任医师。

Correspondence to: BAO Hua-Ying, MD, Associate Professor. E-mail: baohy67@hotmail.com

山羊抗小鼠 IgG 试剂盒、山羊抗兔 IgG 试剂盒以及 DAB 显色试剂盒均为武汉博士德公司产品。

1.2 动物模型的建立^[1] 雄性 SD 大鼠 72 只(南京医科大学动物实验中心提供, 苏动质 97001, 普通级), 体重 80 ~ 110 g, 两次尿蛋白定性阴性, 随机分成 3 组, 每组 24 只, 正常对照组尾静脉注射 0.5 ml 生理盐水, 1 次/d, 连续 2 d, 同时腹腔注射生理盐水 0.5 ml · kg⁻¹ · d⁻¹; 模型组尾静脉注射兔抗鼠肾毒血清 0.5 ml/d, 1 次/d, 连续 2 d, 注射肾毒血清的第 1 天下午即开始腹腔注射二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 0.5 ml · kg⁻¹ · d⁻¹; 姜黄素组尾静脉注射肾毒血清 0.5 ml, 连续 2 d, 亦于注射肾毒血清的第 1 天下午开始腹腔注射姜黄素 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 姜黄素采用 DMSO 溶解, 并配制成 100 g/L 浓度备用。所有大鼠分笼饲养, 自由饮水进食。

1.3 肾组织 Ⅲ型胶原、FN 蛋白表达测定 各组于第 3、7、14、28 天分别随机处死 6 只大鼠, 取出双侧肾脏, 部分肾组织用 10% 福尔马林固定, 进行免疫组织化学染色检查。将肾组织蜡块切成 4 μm 厚的切片, 常规烤片、脱蜡后, 按试剂盒说明先后加一抗、二抗、DAB 显色、苏木素复染等分别对 Ⅲ型胶原、

FN 进行染色。每份标本在高倍镜下随机观察 10 个肾小球, 应用多媒体彩色病理形态学图像分析系统(江苏省捷达科技公司产品), 采集 400 倍图像, 输入图像分析系统内, 按肾小球内 Ⅲ型胶原或 FN 染色阳性面积占肾小球总面积的百分比进行计数, 取其平均数。

1.4 统计学方法 各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行析因设计资料的方差分析 (F 和 q 检验), $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾组织 Ⅲ型胶原蛋白表达的比较 经免疫组织化学方法检测肾组织 Ⅲ型胶原染色情况发现, 正常组大鼠肾小球基底膜少许着色; 而模型组大鼠肾小球 Ⅲ型胶原沉积的范围随着病变的进展逐渐增多, 于第 14 天时达高峰, 与相应对照组比较均明显增多 ($P < 0.01$)。而姜黄素组肾小球 Ⅲ型胶原沉积的范围亦随时间的进展逐渐增多, 与对照组比较也明显增多 ($P < 0.05$), 然而较同期模型组比较 Ⅲ型胶原的染色范围却明显缩小 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间肾小球 Ⅲ型胶原表达阳性面积

Tab 1 Positive expression area of collagen Ⅲ in glomeruli of rats at different time

Group	n	$\bar{x} \pm s, (\%)$			
		3rd day	7th day	14th day	28th day
Normal control group	6	2.40 ± 0.65	2.15 ± 0.33	2.08 ± 0.32	2.58 ± 0.41
Nephrotoxic sera nephritis group	6	10.20 ± 2.61	16.00 ± 1.84	27.64 ± 5.21	27.24 ± 4.03
Curcumin group	6	4.08 ± 2.25**	7.78 ± 2.45**	9.64 ± 1.81**	13.35 ± 4.60**

$P < 0.05$, $P < 0.01$, vs normal control group; ** $P < 0.01$, vs nephrotoxic sera nephritis group

2.2 各组大鼠肾组织 FN 蛋白表达的比较 用免疫组织化学方法对肾组织中 FN 进行染色, 发现在正常组大鼠肾小球基膜及肾小管基膜有少量的 FN 沉积; 而在模型组随着模型的进展肾小球内 FN 沉积逐渐增多, 与对照组比较有明显的差异 ($P <$

0.01), 我们还观察到于模型第 28 天时肾小管基膜以及小管间质亦可见 FN 染色明显增强; 姜黄素组肾小球内 FN 沉积也随着时间延长逐渐增多, 然而与模型组进行比较, 于第 7 天后两组之间才有显著差别 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠不同时间肾小球 FN 表达阳性面积

Tab 2 Positive expression area of fibronectin in glomeruli of rats at different time

Group	n	$\bar{x} \pm s, (\%)$			
		3rd day	7th day	14th day	28th day
Normal control group	6	2.82 ± 1.33	5.43 ± 2.61	7.04 ± 1.65	7.46 ± 1.55
Nephrotoxic sera nephritis group	6	15.44 ± 1.86	19.30 ± 3.69	23.53 ± 3.74	29.41 ± 2.63
Curcumin group	6	12.44 ± 5.04	15.40 ± 2.88*	17.22 ± 3.46*	18.72 ± 3.25**

$P < 0.01$, vs normal control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs nephrotoxic sera nephritis group

3 讨论

ECM 增多是各类肾小球肾炎发展至肾小球硬化过程中常见而又突出的病理特征。ECM 主要的蛋白成分有胶原蛋白、FN、层黏蛋白、蛋白多糖,它们也是正常肾小球毛细血管基底膜、系膜基质的构成成分^[2]。ECM 在肾小球中异常积聚,一方面是其合成增多,另一方面是其降解减少,特别是 I 型胶原和 FN。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 已被公认是导致 ECM 积聚的重要生长因子^[3], TGF- β_1 不仅刺激肾小球系膜细胞合成 I 型胶原和 FN, 而且对肾小球上皮细胞也有同样的功能,使 ECM 增多,加速肾小球硬化。其机制主要在于 TGF- β_1 能稳定 ECM 基因并通过激活核转录因子 NF- κ B、转录激活蛋白-1 (activating protein-1, AP-1) 而提高其转录效率。与此同时, TGF- β_1 还能抑制降解 ECM 蛋白酶的形成,增加基质受体的表达,而且和组织硬化密切相关^[2~4]。

姜黄素是从姜黄中提取到的一种植物多酚。现代研究表明姜黄素具有抗炎、抗凝血、抗氧化、保肝、抗纤维化、抗癌等多种作用^[5]。许多学者研究都认为姜黄素可抑制 AP-1 及 NF- κ B 转录因子的活性及其调节的基因表达^[6], 并通过降低 FN 等对阿霉素肾损害起保护作用^[7]。减轻糖尿病肾病蛋白尿及小管酶的分泌,降低缺血再灌注肾和单侧输尿管阻塞模型大鼠血肌酐水平,抑制肾组织中移植物抑制因子、单核巨噬细胞趋化蛋白-1 和同种移植物炎症因子 mRNA 等表达,减轻肾小管损伤及其间质炎症反应。在体外,姜黄素可抑制氧化低密度脂蛋白以及高糖诱导的系膜细胞 TGF- β_1 的表达^[8,9], 我们同期的实验也证实姜黄素体外也可抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的系膜细胞 TGF- β_1 的表达,亦明显抑制 LPS 刺激的系膜细胞 I 型胶原分泌。这些均提示姜黄素具有潜在的免疫抑制及肾脏保护作用。

由于肾毒血清肾炎模型是经典的肾小球肾炎模型,在其病变发展过程中除了可有肾固有细胞的增殖,大量的炎细胞浸润外,亦可见肾小球基底膜的增厚、系膜基质的增多。我们的研究发现肾毒血清肾

炎模型与正常组比较,第 3 天肾小球内 I 型胶原和 FN 即明显积聚,并随着病情的进展增多一直持续至第 28 天, I 型胶原的沉积于第 14 天达高峰,与周钦等^[8]报道的结果相近。而用姜黄素后,能明显降低细胞外基质 I 型胶原的沉积;第 7 天后肾小球内 FN 的沉积明显少于模型组。这无疑有助于减轻肾脏的病变。本研究结果提示姜黄素可通过抑制肾组织 I 型胶原和 FN 的积聚,从而减少 ECM 在肾组织的沉积,提示姜黄素的应用可能为治疗肾小球疾病提供一种新的手段。

[参考文献]

- 1 鲍华英,钱倩,姜新猷. TH 蛋白在肾组织中的定位观察及其意义[J]. 南京医学院学报, 1993, 13(2): 141-143.
- 2 Lin S, Sahai A, Chugh SS, *et al*. High glucose stimulates synthesis of fibronectin via a novel protein kinase C, Rap1b, and B-Raf signaling pathway[J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 41725-41735.
- 3 Klahr S, Morrissey JJ. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease[J]. Kidney Int Suppl, 2000, 75: S7-S14.
- 4 Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, *et al*. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta[J]. J Clin Invest, 1994, 93(2): 536-542.
- 5 鲍华英,陈荣华. 姜黄素的研究进展[J]. 国外医学·儿科学分册, 2003, 30(5): 62-64.
- 6 Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Piwocka K, *et al*. Inhibition of proliferation and apoptosis of human and rat T lymphocytes by curcumin, a curry pigment[J]. Biochem Pharmacol, 1997, 54(8): 899-907.
- 7 Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats[J]. Br J Pharmacol, 2000, 129(2): 231-234.
- 8 周钦,兰洋,王远程,等. AP-1 在转录水平调控氧化低密度脂蛋白诱导的转化生长因子- β_1 表达[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(9): 1346-1350.
- 9 Weigert C, Sauer U, Brodbeck K, *et al*. AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF-beta1 promoter in mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(11): 2007-2016.

[收稿日期] 2003-04-08 [本文编辑] 周亚兵 白玉金