

姜黄素对阿霉素肾病大鼠 NADPH 氧化酶和 nephrin 表达的影响

彭湘玲¹, 李庆军¹, 张 林^{2,3}

(1. 宁乡县人民医院儿科, 湖南 宁乡 410600; 2. 长沙市四医院肾内科;
3. 中南大学湘雅附属二医院肾内科)

摘要: **目的** 通过观察姜黄素对阿霉素肾病大鼠肾组织中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH), 氧化酶与肾小球裂隙膜分子 nephrin 表达的影响, 探讨姜黄素治疗肾病综合征的作用机制。 **方法** 将 Sprague-Dawley 大鼠 50 只随机分为 5 组(正常对照组、模型组、姜黄素低剂量干预组、姜黄素高剂量干预组和波尼松干预组)。除正常组大鼠外, 各组大鼠尾静脉一次性注射阿霉素(5 mg/kg)造模。分别在建模后第 28 天收集 24 h 尿液, 第 29 天处死所有大鼠, 取肾脏组织, 应用化学比色法检测肾组织氧化应激指标丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD), 实时荧光定量聚合酶链式反应法和蛋白质印迹法检测肾组织 NADPH 氧化酶活性的关键亚基 p47^{phox} 和 nephrin mRNA 与蛋白的表达变化。 **结果** 与正常对照组相比, 模型组大鼠 24 h 尿蛋白量、肾组织 MDA 含量明显增加, 肾组织 p47^{phox} mRNA 和蛋白表达明显增加, SOD 活性明显下降; 肾组织中 nephrin mRNA 和蛋白表达均明显减少。与模型组比较, 姜黄素干预组尿蛋白、肾组织 MDA 明显减少, SOD 活性明显增加。姜黄素干预组可显著下调 p47^{phox} mRNA 和蛋白表达; 姜黄素干预组 nephrin mRNA 和蛋白表达均明显增加。 **结论** 姜黄素能减轻肾小球滤过屏障损伤, 降低尿蛋白, 抑制肾组织 p47^{phox} 表达和增加 nephrin 表达可能是其作用机制之一。

关键词: 姜黄素; NADPH 氧化酶; Nephrin; 阿霉素; 肾病; 大鼠

中图分类号: R692 **文献标识码:** A

Effect of Curcumin on Expression of NADPH Oxidase and Nephrin in the Renal Tissue of Rats with Adriamycin-induced Nephrosis

PENG Xiangling, LI Qingjun, ZHANG Lin

(Department of Pediatrics, People's Hospital, Ningxiang, Hunan 410600, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanisms of curcumin in treating nephrotic syndrome by observing the alteration of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and nephrin in renal tissue of rats with adriamycin (ADR)-induced nephrosis. **Methods** Nephrosis was induced by single intravenous injection of ADR (5 mg/kg). Fifty Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: control group, nephrosis model group, nephrosis rats treated with low-dose and high-dose curcumin, and nephrosis rats treated with glucocorticoid. The 24-hour urine was collected 28 days after ADR injection to measure 24-hour urinary protein, and all rats were sacrificed 29 days after ADR injection. The levels of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in renal tissue were determined by chemiluminescence assay, and the mRNA and protein expression of NADPH oxidase p47^{phox} and nephrin in renal tissue were determined by real time polymerase chain reaction and western blotting. **Results** The levels of urinary protein increased significantly in ADR-induced nephrosis group compared to control group; the treatment of curcumin could reduced markedly urinary protein compared to ADR-induced nephrosis group. Compared with control group, ADR-induced nephrosis group showed an elevation in MDA levels and a reduction in SOD activity in renal tissue. Treatment of curcumin markedly de-

creased the levels of MDA and increased the activity of SOD compared to ADR-induced nephrosis group. Compared with control group, the mRNA and protein expression of p47^{phox} in ADR-induced nephrosis groups were significantly increased. Treatment of curcumin significantly decreased the expression of p47^{phox} in renal tissue compared to ADR-induced nephrosis group. Compared with control group, the mRNA and protein expression of nephrin in ADR-induced nephrosis were significantly reduced. Treatment of curcumin significantly increased the expression of nephrin compared to ADR-induced nephrosis group. **Conclusion** Curcumin reduced excretion of urine protein in response to adriamycin via downregulation of p47^{phox} expression and upregulation of nephrin expression. Thereby, curcumin may protect against ADR-induced nephrosis.

Key words: curcumin; NADPH oxidase; nephrin; adriamycin; nephrosis; rat

肾病综合征是儿童时期的常见病,目前在临床上主要采取肾上腺糖皮质激素治疗,但是有相当部分患儿对激素治疗抵抗或频繁复发,因此,如何有效地防治肾病综合征日益迫切。姜黄素是从姜黄中提取的一种植物多酚,能清除体内超氧离子、过氧化氢离子及一氧化氮,减少各种炎症因子分泌和表达^[1-2]。近年研究发现,姜黄素能有效防治糖尿病肾病^[3],但其对儿童肾病综合征相似的阿霉素所致肾脏损伤是否有保护作用以及其作用机制尚不清楚。

蛋白尿是肾病综合征最常见的临床表现,也是促使肾脏损伤的重要因素。氧化应激是肾病综合征和终末性肾病的重要病理因素,参与了肾小球足细胞、系膜细胞、内皮细胞的损伤及蛋白尿的发生。研究报道,儿童和成人肾病综合征患者、IgA 肾病患者、新月体肾炎和糖尿病肾病患者肾小球、肾间质活性氧明显增加^[4-6]。已知,蛋白尿的发生主要与肾小球滤过屏障受损有关。表达于足细胞上或裂孔隔膜的蛋白分子 nephrin 对维系肾小球滤过屏障的结构和功能起关键作用,其表达降低可导致蛋白尿发生。最近研究发现,在糖尿病肾病大鼠,氧化应激可诱导肾小球损害、nephrin 表达减少和足细胞凋亡,导致蛋白尿发生^[7]。鉴于氧化应激可能通过减少 nephrin 表达导致肾小球滤过屏障受损进而引起肾脏损伤,而姜黄素具有抗氧化和很好的肾脏保护作用,因此,本研究以蛋白尿为主要表现且与儿童肾病综合征相似的阿霉素肾病大鼠模型作为研究对象,以氧化应激和 nephrin 为切入点,观察姜黄素对阿霉素肾病大鼠肾组织内尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶活性的关键亚基 p47^{phox} 和 nephrin 表达水平的影响,探讨姜黄素改善肾病综合征的作用及机制,为防治儿童肾病综合征提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

50 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠,清洁级,体重 180 ± 20 g,由湖南农业大学实验动物中心提供;大鼠丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;nephrin 抗体和 p47^{phox} 抗体由 Santa Cruz 公司提供;注射用盐酸阿霉素由上海华联制药有限公司提供;ECL 试剂盒由美国 Pierce 提供;丙烯酰胺、考马斯亮兰由美国 Amersco 公司提供。

1.2 模型制备

健康清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 50 只,尿蛋白阴性。实验前大鼠经适应性标准饲养 1 周,随机分为正常对照组、模型组、姜黄素低剂量干预组(每天 50 mg/kg)、姜黄素高剂量干预组(每天 150 mg/kg)和波尼松干预组(每天 10 mg/kg),每组各 10 只大鼠。除正常对照组外,各组大鼠经尾静脉一次性注射盐酸阿霉素 5 mg/kg,正常对照组大鼠从尾静脉一次性注射等体积生理盐水。姜黄素在使用时将其溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠配成混悬液,对照组、模型组大鼠分别给予羧甲基纤维素钠生理盐水灌胃,从造模后第一天起连续灌胃 28 天。

1.3 尿蛋白含量检测

代谢笼收集大鼠注射阿霉素前 1 天(用尿蛋白试纸定性)和注射阿霉素 28 天后 24 h 尿液,记录尿量,用考马斯亮兰法测定尿蛋白。

1.4 肾组织 MDA 和 SOD 测定

肾组织在预冷的生理盐水中漂洗,滤纸拭干,称重,剪碎,置入试管,取预冷生理盐水,匀浆,制成 10% 的肾组织匀浆,4 ℃,3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,硫代巴比妥法测定 MDA 含量和黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,操作按照试剂盒说明书进行。结果分别以 nmol/mg 蛋白和 U/mg 蛋白表示。

1.5 肾组织 nephrin 和 NADPH 亚基 p47^{phox} mRNA

检测

取冰冻肾组织, TRIzol 法提取总 RNA, 以随机六核苷酸寡聚合物为引物, 采用 Promega 公司的 M-MLV 逆转录酶将其逆转录为 cDNA。实时 PCR 用 SybrGreen 法, 引物利用 Primer Premier 5.0 辅助设计, 由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。实时荧光定量 PCR 反应体系: 上下游引物各 0.2 μ L, 样本 cDNA 2 μ L, SYBR Mix 液 5 μ L, 用灭菌注射用水补足 10 μ L。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火和延伸 30 s, 共 40 个循环。mRNA 表达量采用内参 β -actin 校正。

1.6 肾组织 nephrin 和 NADPH 亚基 p47^{phox} 蛋白检测

将冰冻肾组织剪碎, 加裂解液匀浆后, 低温离心, 收集上清液, 用考马斯亮兰法测蛋白浓度, 蛋白 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后分装保存。10% ~ 15% SDS-PAGE 电泳分离, 转 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入 nephrin 和 p47^{phox} 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 洗涤, 化学发光增强法显影。结果均用实测值与内参 β -actin 的比值表示。

表 1 引物序列及扩增片段长度

基因名称	引物序列	产物长度
Rat-p47 ^{phox}	Forward: 5'-GGACACCTATCGCCG CAACAG-3' Reverse: 5'-GATGAGGTCCGAGCTGGGTCTC-3'	154 bp
Rat-nephrin	Forward: 5'-CCCCAACATCGACTTCACIT-3' Reverse: 5'- CTGGATGTTGGTGTGTCAG - 3'	199 bp
Rat- β -actin	Forward: 5'- CCCATCTATGAGGGTTACGC - 3' Reverse: 5'- TTTAATGTCACGCACGATTTC - 3'	149 bp

1.7 统计学方法

各组数值以均数 $\pm$ 标注差表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义, 应用 SPSS 13.0 统计分析软件对所得数据进行统计学处理。

2 结 果

2.1 24 h 尿蛋白定量

与对照组相比, 模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量明显增加; 与模型组相比, 姜黄素低剂量和高剂量组 24 h 尿蛋白定量显著减少, 波尼松干预组 24 h 尿蛋白定量明显低于模型组(图 1)。

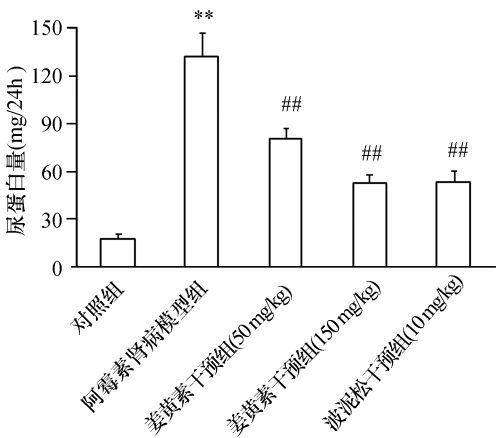


图 1 姜黄素对阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白量的影响($n = 10$) 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

2.2 肾组织 SOD 活性和 MDA 含量

与对照组相比, 模型组大鼠肾脏 SOD 活性明显下降, 脂质过氧化产物 MDA 含量明显增加; 与模型组比较, 姜黄素低剂量和高剂量组肾脏 MDA 含量显著下降, SOD 活性显著增加, 而波尼松干预组肾脏 MDA 含量和 SOD 活性无明显改变(图 2 和图 3)。

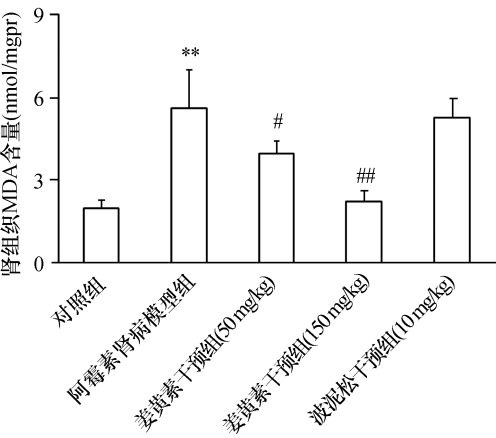


图 2 姜黄素对阿霉素肾病大鼠肾脏组织 MDA 含量的影响($n = 10$) 与正常对照组比较, $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, # $P < 0.01$

2.3 肾组织 NADPH 亚基 p47^{phox} mRNA 和蛋白表达

与对照组相比, 模型组大鼠肾脏 NADPH 亚基 p47^{phox} mRNA 和蛋白表达均明显增加; 与模型组比较, 姜黄素低剂量和高剂量组肾脏 NADPH 亚基 p47^{phox} mRNA 和蛋白表达显著下降, 而波尼松干预组对肾脏 NADPH 亚基 p47^{phox} mRNA 和蛋白表达无明显影响(图 4)。

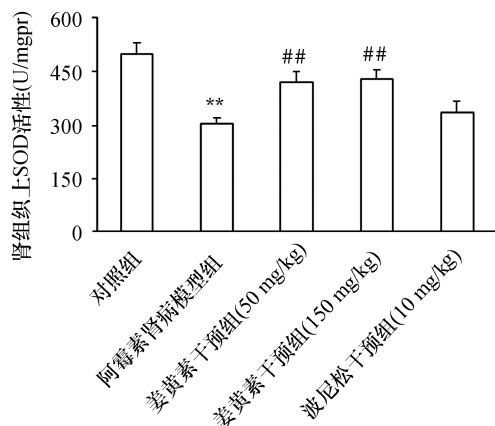


图 3 姜黄素对阿霉素肾病大鼠肾脏组织 SOD 活性的影响 ($n=10$) 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$

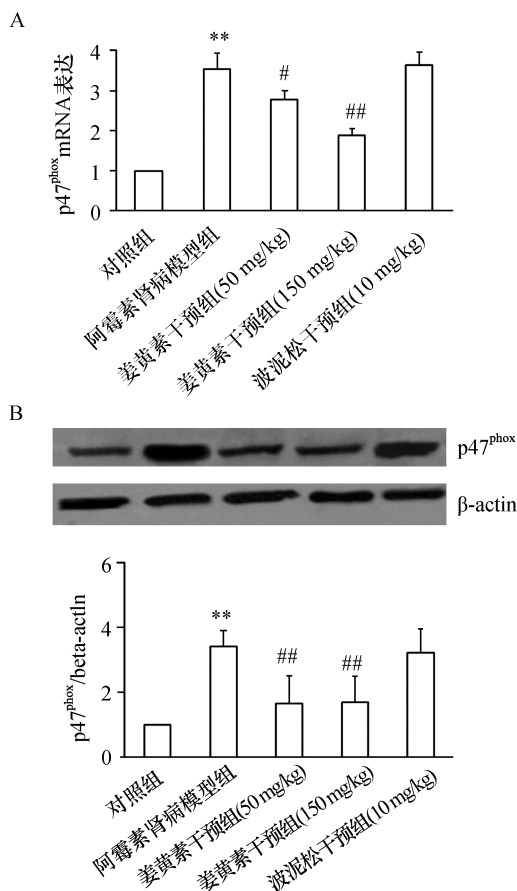


图 4 姜黄素对肾脏组织 p47^{phox} mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达的影响 ($n=10$) 与对照组比较, ** $P<0.01$, 与模型组比较, ## $P<0.05$, ### $P<0.01$

2.4 肾脏组织 nephrin mRNA 和蛋白表达

与对照组相比,模型组大鼠肾脏 nephrin mRNA 和蛋白表达均显著下降;与模型组比较,姜黄素低剂量和高剂量组肾脏 nephrin mRNA 和蛋白表达显著

上升,波尼松干预也有类似的作用(图 5)。

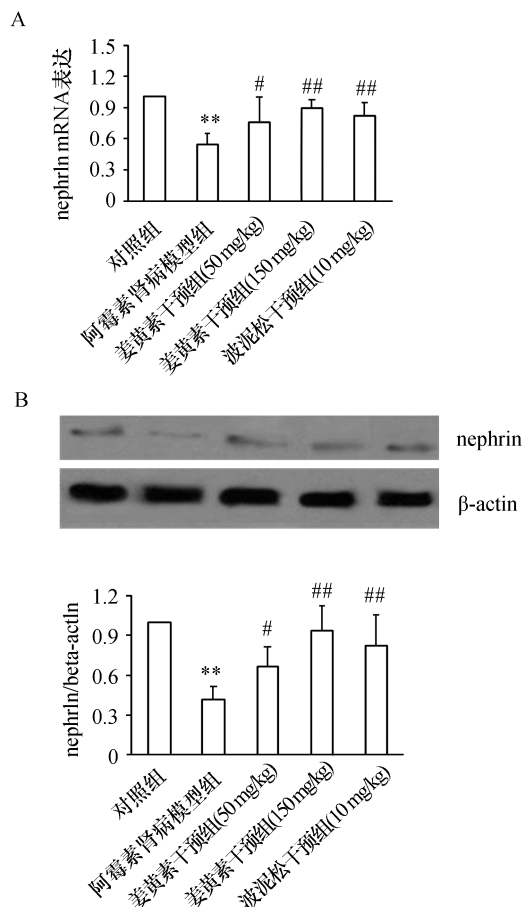


图 5 姜黄素对肾脏组织 nephrin mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达的影响 ($n=10$) 与对照组比较, ** $P<0.01$, 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

3 讨论

微小病变型肾病是儿童肾病综合征最常见病理类型,临床表现为大量蛋白尿、低白蛋白血症和明显水肿。由于蛋白尿不仅是肾病综合征的主要特征,而且本身还可引发肾小管、间质损害,加剧肾病恶化进程。因此,治疗儿童肾病综合征的关键是控制蛋白尿。

研究发现肾脏是对氧化损伤敏感的器官之一。活性氧在肾病综合征、糖尿病肾病、肾脏缺血再灌注损伤和顺铂所致肾毒损伤等多种肾脏疾病的发展过程中起重要作用^[8-10]。过量活性氧可造成肾小球足细胞永久性损伤,促使蛋白尿产生,引起肾小球毛细血管通透性增加,刺激细胞外基质过度增殖,造成肾小球肥大^[4]。已有研究表明,NADPH 氧化酶过度

活化是细胞内高水平活性氧产生的重要来源^[11]。体内多种因素如糖代谢紊乱、糖基化终末产物、血管紧张素Ⅱ等均可引起 NADPH 氧化酶表达升高,活性氧产生增多,造成细胞和组织氧化应激损伤^[11]。p47^{phox} 是 NADPH 氧化酶发挥活性的关键亚基,具有影响 NADPH 氧化酶介导活性氧产生的作用^[11],因此抑制 p47^{phox} 活性可有效降低氧化应激反应,减少尿蛋白,保护肾脏。姜黄素是从姜黄的根茎中提取出来的一种脂溶性酚类色素,具有抗氧化、抗炎、抗纤维化、降血脂等作用^[1,2]。已有研究报道姜黄素可直接干预糖尿病肾病多个发病环节^[3],但姜黄素是否对儿童肾病综合征有治疗作用尚不清楚。姜黄素的抗氧化和清除氧自由基的生物活性已被广泛认识。研究显示,姜黄素可通过增强 SOD 活性,减轻氧化应激损伤^[12]。本实验通过一次尾静脉注射阿霉素 5 mg/kg,成功建立了跟儿童肾病综合征相似的阿霉素肾病大鼠模型,并发现模型组 p47^{phox} 表达增加,氧化应激增强;姜黄素干预可剂量依赖性下调 p47^{phox} 表达,增强 SOD 活性,减少 MDA 生成,显著减少阿霉素肾病大鼠 24 h 蛋白尿。

nephrin 是裂孔隔膜的主要结构蛋白,通过介导上皮细胞与基质相互作用影响肾小球滤过膜通透性和基质沉积。研究表明,多种类型肾小球疾病所导致的蛋白尿发生过程中 nephrin 表达下降:在大鼠阿霉素肾病和链脲霉素诱发的糖尿病肾病, nephrin 表达下降^[7,13];在 NPHS1 突变的芬兰型先天性肾病综合征中, nephrin 检测不到,裂孔隔膜消失^[14-15],提示 nephrin 表达下降或消失是肾小球足细胞损伤诱发蛋白尿的一个重要指标,可能是治疗儿童肾病综合征的另一个重要靶点。本实验结果显示:姜黄素能显著增加阿霉素肾病大鼠肾脏 nephrin mRNA 和蛋白表达,其中高剂量姜黄素作用效果优于波尼松对照组。

总之,氧化应激和 nephrin 在阿霉素肾病发生发展过程中扮演重要角色。姜黄素通过下调 NADPH 氧化酶,增加肾 nephrin 表达,延缓阿霉素肾病发展,但姜黄素作用后,活性氧产生减少和 nephrin 表达增加之间的关系有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 曲建全,范春雷. 姜黄素现代药理研究进展[J]. 现代生物医学进展,2008,8(11):2149-2152.
- [2] Meng B, Li J, Cao H. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(11):2101-13.
- [3] 陈丽,刘晓城,宁勇. 姜黄素对糖尿病大鼠肾脏病变的作用及对肾脏 Smad7 表达的影响[J]. 华中科技大学学报, 2004, 33(4):438-440.
- [4] Khan SR. Stress oxidative: nephrolithiasis and chronic kidney diseases [J]. Minerva Med, 2013, 104(1):23-30.
- [5] Leung JC, Chan LY, Tang SC, et al. Oxidative damages in tubular epithelial cells in IgA nephropathy: role of crosstalk between angiotensin II and aldosterone [J]. J Transl Med, 2011, 9(169):1-15.
- [6] Stanton RC. Oxidative stress and diabetic kidney disease [J]. Curr Diab Rep, 2011, 11(4):330-336.
- [7] 曾庆菊,贾汝汉,王晋文,等. 氧化应激与糖尿病大鼠 nephrin 表达及足细胞凋亡的关系[J]. 中华肾脏病杂志, 2011, 27(2):132-134.
- [8] Khan SR. Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome[J]. Urol Res, 2012, 40(2):95-112.
- [9] 李贞,高丽萍. 氧化应激在顺铂肾毒性中的作用[J]. 广东医学, 2010, 31(19):2600-2602.
- [10] 喻婷婷,廖蕴华. 活性氧与肾缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(6):123-125.
- [11] Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(3):241-248.
- [12] Fleenor BS, Sindler AL, Marvi NK, et al. Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(2):269-276.
- [13] 彭亚琴,莫樱,蒋小云,等. 阿霉素肾病大鼠肾组织中 nephrin 和 CD2AP 的表达及意义[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2009, 30(1):15-20.
- [14] Gadallah MF, Lynn M, Work J. Case report:mannitol nephrotoxicity syndrome: role of hemodialysis and postulate of mechanisms [J]. Am J Med Sci, 1995, 309(4):219-222.
- [15] Dorman HR, Sondheimer JH, Cadnapaphornchai P. Mannitol-induced acute renal failure [J]. Medicine (Baltimore), 1990, 69(3):153-159.

(此文编辑:蒋湘莲)