

## • 论著 •

## 姜黄素对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管上皮细胞转分化影响的研究

赵爱青<sup>1</sup>, 张晓明<sup>1</sup>, 侯 恒<sup>1</sup>, 李荣山<sup>2</sup>, 马存根<sup>1</sup>

(1. 山西大同大学医学院内科教研室, 山西 大同 037008;

2. 山西医科大学第二临床医学院肾内科, 山西 太原 030001)

**【摘要】** 目的:探讨姜黄素对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾小管上皮细胞转分化的作用。方法:采用 UUO 致肾间质纤维化大鼠模型。将 24 只大鼠随机均分为假手术组、模型组和姜黄素组。从制模后 2 d 起,姜黄素组给予  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  姜黄素腹腔注射。术后 4 周心脏穿刺抽血,测定各组大鼠血清尿素氮(BUN)和血肌酐(SCr)值。处死大鼠,用苏木素-伊红(HE)、Masson 染色评定肾小管间质纤维化程度;用免疫组化方法检测肾组织内转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、波形蛋白(Vimentin)的蛋白表达部位及表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠 BUN 水平显著增加( $P < 0.01$ ),肾间质纤维组织相对面积显著扩大( $P < 0.01$ ),肾组织内 TGF- $\beta 1$ 、 $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 的蛋白表达均显著上调( $P$  均  $< 0.01$ )。姜黄素干预后,上述上调指标都被显著抑制( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论:姜黄素可能通过抑制 UUO 大鼠肾小管上皮细胞转分化而减轻肾间质纤维化。

**【关键词】** 姜黄素; $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白;波形蛋白;肾小管上皮细胞转分化

中图分类号:R285.5;R693.2 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)06-0348-04

**Effect of curcumin (姜黄素) on trans-differentiation of renal tubular epithelial cells in rats with unilateral ureteral obstruction** ZHAO Ai-qing<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-ming<sup>1</sup>, HOU Heng<sup>1</sup>, LI Rong-shan<sup>2</sup>, MA Cun-gen<sup>1</sup>.  
1. Department of Medicine, Medical College, Shanxi Datong University, Datong 037008, Shanxi, China;  
2. Department of Nephrology, The Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

Corresponding author: MA Cun-gen (Email: macungen2001@yahoo.com.cn)

**【Abstract】 Objective:** To investigate the effect of curcumin (姜黄素) on trans-differentiation of renal tubular epithelial cells in rats with unilateral ureteral obstruction (UUO). **Methods:** UUO rat animal models were used. Twenty four rats were randomly divided into three groups (each  $n = 8$ ): sham operation group (0.9% saline), model group (dimethyl sulphoxide), and curcumin treatment group. Two days after the establishment of the model, curcumin  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  was given intra-peritoneally in curcumin treatment group. All rats were killed 4 weeks after surgery. Firstly, the blood obtained from heart puncture was used for the examination of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) in each rat. Secondly, the degree of tubulointerstitial fibrosis was scored by hematoxylin and eosin(HE) and Masson staining, and the sites and levels of protein expression of transforming growth factors, type beta1 (TGF- $\beta 1$ ),  $\alpha$ -smooth muscle antibody ( $\alpha$ -SMA) and Vimentin were detected by immunohistochemistry staining. **Results:** Compared with shame-operation group, the BUN level was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the relative area of interstitial fibrosis was also significantly enlarged in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with shame-operation group, the expression of TGF- $\beta 1$ ,  $\alpha$ -SMA and Vimentin protein was significantly up-regulated in their kidney tissue (all  $P < 0.01$ ). After intervention with curcumin, the upregulation of the above-mentioned parameters was significantly inhibited ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The ameliorating effect of curcumin on renal interstitial fibrosis may be partly mediated by inhibiting the trans-differentiation of renal tubular epithelial cells towards myofibroblast in rats with UUO.

**【Key words】** curcumin; $\alpha$ -smooth muscle antibody;vimentin;renal tubular epithelial trans-differentiation

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(20021120)

通讯作者:马存根(Email:macungen2001@yahoo.com.cn)

作者简介:赵爱青(1972-),女(汉族),山西省人,医学硕士,讲师,主要从事肾脏病的研究(Email:sxdztzhaoaiqing@126.com)。

目前研究发现,肾小管上皮细胞转分化在肾间质纤维化发生发展过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。所以积极探索有效的预防、抑制甚至逆转转分化的发生正成为研究热点。肾小管上皮细胞转分化表现为,在一定病理条件下,肾小管上皮细胞失去表达细胞角蛋白、钙黏蛋白等上皮细胞标记物,开始表达间充质细胞的标记物,如 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、波形蛋白(Vimentin)、成纤维细胞特异蛋白-1(Fsp-1)和过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)<sup>[2-3]</sup>。国内外有关学者认为,抑制转分化可能对控制肾间质纤维化起重要作用<sup>[4]</sup>。其中已发现依那普利、缬沙坦及肝细胞生长因子等均能抑制肾小管上皮细胞转分化。姜黄素(curcumin)是从姜科植物姜黄中提取的一种植物多酚,也是姜黄发挥药理作用最重要的活性成分。近年研究表明,姜黄素对多种原因所致的肾损害、糖尿病大鼠肾脏都具有保护作用<sup>[5-6]</sup>;在大鼠模型中,姜黄素可明显减轻肺纤维化和肝纤维化程度<sup>[7-8]</sup>。但姜黄素能否减轻单侧输尿管梗阻(UUO)模型大鼠肾间质纤维化,其机制是否与抑制肾小管上皮细胞转分化有关,目前国内外鲜见报道。本研究拟用 UUO 大鼠模型对此进行探讨,报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 主要试剂:**小鼠抗大鼠 $\alpha$ -SMA 单克隆抗体(1:100)、兔抗大鼠转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)多克隆抗体(1:50)、小鼠抗大鼠 Vimentin 单克隆抗体(1:100)、生物素化山羊抗兔(小鼠)IgG、链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)工作液、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司;多聚赖氨酸粘片剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司;姜黄素购自西安绿康天然药物研究所。

**1.1.2 实验动物:**6~8 周龄清洁级雄性 Wistar 大鼠 24 只,体重 180~200 g,由山西医科大学动物实验中心提供。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物模型建立和分组:**按随机数字表法将动物分为假手术组(8 只,仅给予生理盐水)、模型组(8 只,仅给予二甲基亚砷)、姜黄素组(8 只,于术后 2 d 开始腹腔注射姜黄素 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。UUO 致肾小管间质纤维化模型制备按文献<sup>[9]</sup>方法;假手术组打开腹腔后分离左侧输尿管,不结扎即关闭腹腔。各组于术后 4 周从右心耳心脏穿刺抽血约 6 ml,用自动生化仪测定血尿素氮(BUN)、血肌酐

(SCr);处死大鼠,左侧肾脏行原位灌流去除血细胞后,部分肾组织用体积分数为 10% 的中性甲醛液固定,其余肾组织放入液氮中保存备用。

**1.2.2 肾组织病理学检查:**动物麻醉后取双侧肾脏观察其大体外观变化。取部分梗阻肾,经固定、脱水、透明、浸蜡、包埋,切 4  $\mu$ m 厚的切片,行苏木素-伊红(HE)染色及 Masson 染色,光学显微镜( $\times 200$ )采集 Masson 染色图像(每只大鼠随机采集 15 个视野),以多功能彩色病理图像分析系统(山西医科大学研制)进行自动测量分析,计算肾间质纤维组织相对面积(肾间质绿染区面积/视野总面积 $\times 100\%$ )。

**1.2.3 免疫组化染色:**采用 SABC 法进行免疫组化检测。切片经常规处理后,用微波处理 10 min(TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、Vimentin)修复抗原;分别滴加相应第一抗体,4  $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜;然后加入相应的生物素化第二抗体,37  $^{\circ}$ C、20 min;滴加 SABC,37  $^{\circ}$ C、20 min;最后加入 DAB 显色液,显微镜下控制显色。每次染色用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗设立阴性对照。TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、Vimentin 蛋白的阳性表达部位呈棕黄色深染。免疫组化半定量分析借助多媒体病理彩色分析系统完成。在 200 倍光镜下采集免疫组化图像,每张切片随机采集 10 个不重叠视野(避开肾小球及动脉血管),计算肾小管间质相对阳性面积(肾小管间质阳性面积/视野总面积 $\times 100\%$ ),并取平均值。

**1.3 统计学方法:**实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,由 SPSS11.0 统计软件完成, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 血生化检测结果(表 1):**模型组 BUN 较假手术组显著增加( $P<0.01$ ),姜黄素组 BUN 较模型组显著下降( $P<0.05$ )。各组间 SCr 均在正常范围。

表 1 各组 BUN、SCr 和肾间质纤维组织相对面积比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数 (只)	BUN (mmol/L)	SCr ( $\mu$ mol/L)	肾间质纤维组织 相对面积(%)
假手术组	8	7.08 $\pm$ 0.53	34.00 $\pm$ 0.63	0.039 $\pm$ 0.007
模型组	8	10.59 $\pm$ 1.53 $\Delta$	35.02 $\pm$ 1.53	0.319 $\pm$ 0.104 $\Delta$
姜黄素组	8	8.26 $\pm$ 0.41*	34.27 $\pm$ 0.41	0.162 $\pm$ 0.026*

注:与假手术组比较; $\Delta P<0.01$ ;与模型组比较;\* $P<0.05$ ,  
\* $P<0.01$

### 2.2 肾脏病理学改变

**2.2.1 大体观察:**假手术组大鼠两侧肾脏外观正常,大小如黄豆。模型组、姜黄素组左侧肾脏大小平

均约 3.6 cm×1.8 cm×1.7 cm;可见肾内积水、积液清亮透明;肾实质明显变薄,厚度<1 mm;肾盂扩张,肾盏乳头受压,穹隆部乳头变平钝,部分成凹型,乳头缺血萎缩,最后锥体消失。

**2.2.2 HE 染色结果:**假手术组大鼠双侧肾脏无明显病理改变。模型组大鼠于术后 4 周左肾肾小球大小、形态基本正常;肾小管结构遭到严重破坏,代之以浸润的炎性细胞弥漫于大量增生的纤维组织中,主要为巨噬细胞和淋巴细胞;残存肾小管上皮细胞水肿、变性、坏死、间质间隙增宽,肾间质纤维化明显。姜黄素组上述变化有所减轻,肾间质纤维组织相对面积减小。

**2.2.3 Masson 染色结果(表 1):**假手术组肾脏胶原染色主要位于小管基膜、肾小囊、系膜区和肾小管间的毛细血管周围,而小管周围间质染色较少。与假手术组比较,模型组术后 4 周肾间质明显增宽,间质细胞及细胞外基质成分增多,肾间质纤维化程度明显加重,肾间质纤维组织相对面积较假手术组明显增大( $P<0.01$ )。姜黄素组肾间质纤维组织相对面积明显减小,与模型组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 2.3 免疫组化染色结果

**2.3.1 肾组织 TGF- $\beta$ 1 表达的变化(表 2):**假手术组大鼠肾组织中 TGF- $\beta$ 1 蛋白仅散在表达于肾小管上皮细胞胞浆内,主要在近曲小管表达,肾小球、肾间质及肾血管内均未见表达。模型组阳性染色的肾小管上皮细胞明显增多,肾间质细胞也时有表达;而肾小球未见阳性表达。与假手术组比较,模型组肾组织 TGF- $\beta$ 1 表达明显增多,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。姜黄素组 TGF- $\beta$ 1 表达量则明显下降,与模型组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

表 2 各组大鼠肾组织 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 蛋白的表达( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Expression of TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA and Vimentin protein of renal tissue in each group( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	TGF- $\beta$ 1 蛋白	$\alpha$ -SMA 蛋白	Vimentin 蛋白
假手术组	8	0.005±0.003	0.008±0.001	0.014±0.011
模型组	8	0.288±0.058 $\Delta$	0.232±0.018 $\Delta$	0.354±0.051 $\Delta$
姜黄素组	8	0.078±0.013 $\#$	0.061±0.009 $\#$	0.092±0.013 $\#$

注:与假手术组比较; $\Delta P<0.01$ ;与模型组比较; $\# P<0.01$

**2.3.2 肾组织  $\alpha$ -SMA 表达的变化(表 2):**假手术组大鼠肾组织中  $\alpha$ -SMA 仅在血管平滑肌细胞有表达,肾小球、肾小管及肾间质细胞未见表达。模型组近端、远端肾小管上皮细胞基底膜侧及肾间质细胞胞浆中均呈阳性表达,仅肾小球仍呈阴性。与假手

术组比较,模型组肾组织  $\alpha$ -SMA 表达明显增多,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。姜黄素组  $\alpha$ -SMA 表达量明显下降,与模型组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

**2.3.3 肾组织 Vimentin 蛋白表达的变化(表 2):**假手术组大鼠肾组织中 Vimentin 蛋白表达于血管平滑肌细胞、肾小球系膜细胞及少数肾间质细胞,肾小管上皮细胞未见表达。模型组血管及肾小球内表达与假手术组相同,但近端及远端肾小管上皮细胞出现表达,其表达多数分布于细胞底部;肾间质中 Vimentin 阳性细胞也明显增多,与假手术组比较,模型组肾组织 Vimentin 蛋白表达明显增多,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。姜黄素组 Vimentin 蛋白表达明显下降,与模型组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 3 讨论

由于肾小管上皮细胞转分化在肾脏纤维化形成中的重要性已被人们所认识,故探讨抑制或逆转肾小管上皮细胞转分化作用也成为预防和治疗慢性肾间质纤维化的一个新思路。

肾小管上皮细胞转分化是在多种损伤因子长期刺激下发生的细胞表型改变,其特征是肾小管上皮细胞逐步失去原有的上皮细胞特性而获得间质肌成纤维细胞特性,如表达  $\alpha$ -SMA、Vimentin、Fsp-1 等,同时具有高度增殖性,能大量分泌细胞外基质,在纤维化过程中起重要作用。故肾小管上皮细胞转分化是肾间质纤维化的重要机制之一<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -SMA 是肌成纤维细胞的重要标志,而 Vimentin 是间充质来源细胞的标志,肌成纤维细胞表达也阳性。Yang 等<sup>[10]</sup>用 TGF- $\beta$  诱导人类近端肾小管上皮细胞,观察到细胞形态由典型的鹅卵石状变为长梭形,似成纤维母细胞,同时胞浆内出现大量的( $\alpha$ -SMA+)微丝,小管基底膜发生崩解,细胞迁移,进入基质,证明肾小管上皮细胞可以转分化为肌成纤维细胞。其次,慢性马兜铃酸肾病患者的肾小管上皮细胞也可转分化为肌成纤维细胞,参与肾间质纤维化,其机制很可能与其自身高表达 TGF- $\beta$ 1 相关<sup>[11]</sup>。在本研究中也观察到,模型组大鼠肾小管上皮细胞出现了  $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 的阳性表达,提示肾小管上皮细胞已转分化为肌成纤维细胞。

姜黄素是一种从姜科植物姜黄中提取的天然药物,中医认为姜黄能行气、散风活血、通经止痛。近年的研究还揭示,姜黄具有抗炎、抗氧化、保护肝脏和肾脏、抗肺纤维化和肝纤维化等作用<sup>[12]</sup>,而且无明显

显的不良反应。国外最新研究显示,姜黄素能明显抑制 UUO 大鼠肾间质炎症和纤维化,其机制可能与抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的表达有关<sup>[13]</sup>。但姜黄素抗 UUO 大鼠肾间质纤维化作用是否也与抑制肾小管上皮细胞转分化有关,其机制如何,国内外鲜见相关报道。本研究结果显示:姜黄素能明显下调肾组织内  $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 的蛋白表达,提示抑制肾小管上皮细胞转分化可能是其在体内发挥作用的主要机制。

TGF- $\beta$ 1 是最重要的致纤维化因子。它可以通过促使肾小管上皮细胞转分化、抑制细胞外基质降解酶(金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶等)活性等作用,使细胞外基质合成增加、降解减少,过度沉积于肾间质,逐渐发生纤维化<sup>[14]</sup>。本研究也发现,姜黄素也能明显下调肾组织内 TGF- $\beta$ 1 的表达,二者之间是否存在一定的关系有待进一步观察。

肾小管上皮细胞转分化的发生机制目前还不十分清楚,已有的研究认为某些细胞因子可能起着重要的调节作用,其中 TGF- $\beta$ 1 诱导肾小管上皮细胞转分化的作用已得到公认。肾脏损伤使 TGF- $\beta$ 1 等多种细胞因子产生增加,一定浓度的 TGF- $\beta$ 1 可诱导肾小管上皮细胞向间质肌成纤维细胞转分化,肾小管上皮细胞呈现间质细胞特性后,包括 TGF- $\beta$ 1 在内的多种细胞因子表达上调<sup>[15]</sup>。这种正反馈机制可能是肾间质纤维化持续发展的原因之一,而姜黄素可能通过打断这一恶性循环,从而抑制肾间质纤维化的发生发展。

综上所述,本实验结果显示:姜黄素能明显下调肾组织内 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 的蛋白表达,说明姜黄素具有抗肾纤维化的作用,可能与其抑制 UUO 大鼠肾小管上皮细胞转分化有关。

#### 参考文献:

[1] Kalluri R, Neilson E G. Epithelial - mesenchymal transition and its implications for fibrosis [J]. J Clin Invest, 2003, 112 (12): 1776 - 1784.

- [2] Jinde K, Nikolic-Paterson D J, Huang X R, et al. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis [J]. Am J Kidney Dis, 2001, 38 (4): 761 - 769.
- [3] 阳晓, 张海燕, 张亚杰, 等. PPAR $\gamma$  和  $\alpha$ -SMA 在单侧输尿管梗阻大鼠肾组织中的表达及其意义 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17 (10): 611 - 614.
- [4] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15 (1): 1 - 12.
- [5] Shahed A R, Jones E, Shoskes D. Quercetin and curcumin up-regulate antioxidant gene expression in rat kidney after ureteral obstruction or ischemia/reperfusion injury [J]. Transplant Proc, 2001, 33 (6): 2988.
- [6] 黄映红, 刘晓城, 黄征宇, 等. 姜黄素对大鼠糖尿病肾的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14 (7): 94 - 97.
- [7] Punithavathi D, Venkatesan N, Babu M. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Br J Pharmacol, 2000, 131 (2): 169 - 172.
- [8] Kang H C, Nan J X, Park P H, et al. Curcumin inhibits collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro [J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54 (1): 119 - 126.
- [9] Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation [J]. Kidney Int, 1993, 44 (2): 313 - 321.
- [10] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubulorepithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis [J]. Am J Pathol, 2001, 159 (4): 1465 - 1475.
- [11] 陈文, 谌贻璞, 张晶, 等. 慢性马兜铃酸肾病患者肾小管上皮细胞转分化的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2003, 19 (1): 6 - 9.
- [12] Han S S, Keum Y S, Seo H J, et al. Curcumin suppresses activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells [J]. J Biochem Mol Biol, 2002, 35 (3): 337 - 342.
- [13] Kuwabara N, Tamada S, Iwai T, et al. Attenuation of renal fibrosis by curcumin in rat obstructive nephropathy [J]. Urology, 2006, 67 (2): 440 - 446.
- [14] 孙元莹, 李志军, 史晓峰, 等. 益肾康对糖尿病大鼠转化生长因子  $\beta$ 1 表达的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11 (3): 169 - 172.
- [15] 王玉, 李晓玫, 邹万忠, 等. 人类肾小球肾炎中肾小管及间质细胞表型转化的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16 (1): 7 - 10.

(收稿日期: 2007-01-23 修回日期: 2007-06-20)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

### 关于论文作者的署名问题

依照《著作权法》有关规定,文稿的著作权,除《著作权法》另有规定外,属于作者。作者应具备下列条件:①参与研究的设计和选题,或参与资料的分析和解释者。②起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者。③最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。仅参加获得资金或收集资料者不能列为作者;仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。集体署名的文章可以署名单位、协作组等,也可以以几个主要负责人代表某个协作组,但必须明确对该文负责的关键人员。其他对该研究有贡献者可列入正文末“志谢”部分。作者中如同时有外籍作者应征得本人同意,并附书面文字说明或信函。文章作者的排序应在投稿时确定,不得在编排中再作更改。

(本刊编辑部)