

姜黄素对运动性肾缺血再灌注损伤大鼠肾组织中炎症因子蛋白及基因表达的影响

周海涛^{1,2},曹建民³,米生权^{1,2*},张静^{1,2},李浩¹

¹北京联合大学生物化学工程学院,北京 100023;

²北京联合大学 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室,北京 100191;

³北京体育大学运动人体科学学院,北京 100084

摘要:本文以姜黄素对过度训练所致运动性肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏病理改变,炎症因子蛋白及基因表达的影响为目的进行了研究。72只7周龄SPF级雄性Wistar大鼠随机分为安静对照组(C)、一般训练组(M)、过度训练组(OM)和姜黄素+过度训练组(COM)。实验中OM、COM组进行8周递增负荷游泳训练,COM组大鼠以200 mg/kg/d、5 mL/kg姜黄素灌胃56 d,其他组给予等体积0.5%的羧甲基纤维素钠灌胃。末次训练24 h后处死大鼠,光镜和电镜观察肾组织形态和超微结构改变;测定血清肌酐、尿素氮;肾组织IL-1 β 、TNF- α 、IL-6基因和蛋白表达。结果显示:8周的递增负荷游泳训练后,光镜下C、M组大鼠肾组织结构正常;OM组出现组织病理学改变;COM组较OM组明显减轻。Paller评分,OM组显著高于C组,COM组显著低于OM组。电镜下C组结构正常;M组结构出现轻微改变;OM组结构改变明显;COM组较M组病变程度明显减轻。血清肌酐、尿素氮水平,OM组显著高于C组,COM组显著低于OM组。OM组肾组织IL-1 β 、TNF- α 、IL-6蛋白表达显著高于C组,COM组显著低于OM组;OM组肾组织IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA表达上调显著高于C组,COM组显著低于OM组。血清睾酮/皮质酮比值,OM组显著低于C组。从而说明8周的游泳训练导致大鼠出现过度训练及运动性肾缺血再灌注损伤,肾脏发生病理改变。姜黄素可以延缓过度训练的发生与发展,通过抑制炎症因子的蛋白和基因表达,预防和延缓过度训练导致的运动性肾缺血再灌注损伤的发生与发展,有效地改善了大鼠肾脏功能,缓解组织形态学及超微结构改变。

关键词:姜黄素;过度训练;运动性肾缺血再灌注损伤;炎症因子

中图分类号:C804.7

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.10.005

Effects of Curcumin on the Protein and Gene Expression of Inflammatory Cytokines in Renal Tissue of Rat with Exercise-related Renal Ischemia-reperfusion Injury

ZHOU Hai-tao^{1,2}, CAO Jian-min³, MI Sheng-quang^{1,2*}, ZHANG Jing^{1,2}, LI Hao¹

¹Biochemical Engineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China;

²Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing, 100191, China;

³Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing 100084, China

Abstract: In this paper, the effects of curcumin on the histomorphology, ultrastructure, protein and gene expression of inflammatory factors in the kidney of rats with exercise-related renal ischemia-reperfusion injury was studied. 72 SPF male Wistar rats at the age of 7-week-old were divided into 4 groups randomly: control group (C), general training group (M), overtraining group (OM), curcumin + overtraining group (COM). The rats in OM, COM groups were assigned under progressively increasing load training for 8 weeks, while the rats of COM group were given 200 mg/kg/d of curcumin in the volume as 5 mL/kg, other groups were given the same volume of 0.5% sodium carboxymethyl cellulose. Kill the rats 24 h after the last training, the renal tissue morphological was conducted by optical and electronic microscopy; serum creatinine and blood urea nitrogen was measured. Protein and gene of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in renal tissue were detec-

ted. The results showed: after progressively increasing load training for 8 weeks, renal tissue structures of C group and M group appear normal in pathology slice; histopathological abnormalities appear in OM group; the pathological changes of kidney tissue in COM group were significantly less than those in OM group. Paller score of OM group was significantly higher than that in C group, COM group was significantly lower than that of OM group. Under electron microscope, the structure of C group were normal; that of M group change slightly; OM group change obviously, and the pathological changes of COM group was significantly reduced compared to M group. Blood urea nitrogen and serum creatinine of OM group were significantly higher than those of C group, and those two in COM group were significantly lower than in OM group;

IL-1 β , TNF- α and IL-6 protein of renal tissue in OM group was significantly higher than that in C group, and those proteins in COM group was significantly lower than those of OM group; for the expression of OM group, renal IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA and IL-6 mRNA were significantly higher than those in C group, but in COM group were lower than in OM group. Serum testosterone / corticosterone ratio in group OM was significantly lower than that in group C. The 8 weeks progressively increasing-load swimming training resulted in overtraining and exercise-induced renal ischemia-reperfusion injury in rats, accompanied by ultrastructure and pathological changes in the kidney. Curcumin can significantly reduce renal dysfunction and kidney tissue ultrastructure of the extent of the damage and the histopathological changes, which may be achieved by inhibiting the expression of inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6, resistance to various stress stimuli, as a result, curcumin can protect the rats from exercise-related renal ischemia-reperfusion injury, effectively improved the renal function, and alleviated the morphological and ultrastructural changes.

Key words: Curcumin; kidney, Overtraining; exercise-induced ischemia-reperfusion; inflammatory factors

研究表明,长期的大强度运动可致机体出现过度训练综合症,引发运动能力和免疫功能降低的同时影响正常的肾脏功能。肾脏组织出现轻度组织形态与结构的改变和损伤,且损伤在运动终止后有加重趋势,其中以肾小管最为明显,主要表现为细胞凋亡^[1]。机体在稳定状态下,肾血流量在神经和体液因素的影响下保持相对的恒定,且肾血流量约占心输出量的20%~25%。但在急性大强度运动状态下,全身血液分配发生明显改变,肌肉组织的血流量迅速增加,心、脑、肾等器官血流量急剧下降,并伴随运动的持续进行和强度的增加表现的愈发明显。而运动终止后,随着血流从肌肉等活动器官中回流到相关器官,血流量恢复到正常范围后,极易引发“运动性缺血再灌注”,进一步加重器官的组织结构的损伤和功能障碍。肾脏作为高敏感器官,对运动性缺血再灌注造成的损伤,反应极为强烈。运动性肾缺血再灌注损伤的成因与发展过程具有特殊性和动态性,与一般临床医学的肾缺血再灌注损伤的发生机制存在较大区别。相关研究指出过度训练引发的运动性肾缺血再灌注损伤的主要原因为过度训练打破了肾脏组织抑炎与促炎因子间的动态平衡,促炎因子表达增加,炎症因子引发肾小管周围毛细血管密度发生改变和肾脏细胞凋亡,进而引起肾小管间质损害,造成肾脏的病理性改变^[2]。

姜黄素是从姜科、天南星科植物的根茎中提取的一种多酚类化合物,具有抑炎、抗氧化、抗凝、降

脂、抗动脉粥样硬化、抗衰老、消除自由基及抑制肿瘤生长等药理作用。同时已有研究表明姜黄素对大鼠脑、心脏、肾脏等器官的缺血再灌注损伤均具有保护作用,其机制与减轻凋亡、抑制炎症等有关^[3]。本实验选用姜黄素,结合前期研究,观察其对过度训练致运动性肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏炎症细胞因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)这组功能密切相关的炎症细胞因子蛋白和基因表达的抑制作用及组织形态学与超微结构的改变,探讨其对大鼠运动性肾缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与仪器

1.1 实验动物^[4]

SPF级75只雄性Wistar大鼠,49天龄,体重 220.2 ± 10.4 g,由北京大学医学部实验动物科学部提供,动物生产合格证编号SCXK(京)2006-0008。实验过程中,实验室温度控制在 (22 ± 2) °C,相对湿度55%~75%,光照时间随自然变化。大鼠以基础饲料(北京大学医学部实验动物科学部提供)和蒸馏水常规饲养,自由饮食。实验时间为63天,正式训练56天。动物实验于北京体育大学运动营养实验室完成。

1.2 试验用药及试剂

姜黄素 Curcumin(纯度>99%,陕西源泰生物

科技公司购得,批号 17012571)。用 0.5% 的羧甲基纤维素钠配成混悬液,4 ℃ 存放备用。

Jaffe 苦味酸法测定血清肌酐(编号 20170327),二乙酰-肼法测定血清尿素氮(试剂盒编号 20170309),放射免疫法测定血清睾酮(编号 20170322)和皮质酮(编号 20170323),免疫组织化学法测定检测肾组织 TNF- α (编号 20170323,)、IL-1 β (编号 20170314)、IL-6(编号 20170313),RT-PCR 法测定肾组织 TNF- α (编号 20170308)、IL-1 β (编号 20170322)、IL-6(编号 20170316)基因表达。以上试剂盒和抗体分别由南京建成生物工程研究所、Abcam 公司提供。各指标的测定严格按照试剂盒说明书进行,计算公式等详见试剂盒使用说明书。

1.3 仪器

ALCYON300 全自动生化分析仪(美国雅培),LEICA RM2135 病理切片机(德国 RM 公司),LKB-V 型超薄切片机(瑞典 LKB 公司),JEM-1200EX 透射电镜(日本 Hitachi 公司),Olympus-BH2 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司),CM-2000B 型生物医学图像分析系统(北京航空航天大学),BS224S 型电子分析天平(德国赛多利斯)。

2 实验方法

2.1 动物分组

75 只大鼠经适应性饲养 4 天后,以 20 min/d 的运动量进行为期 3 天的筛选,剔除不符合实验要求的 3 只大鼠后,剩余的 72 只大鼠以数字随机分组法分为 4 组(直接标号法编号):安静对照组(C 组,12 只)、一般训练组(M 组,12 只)、过度训练组(OM 组,24 只)和姜黄素 + 过度训练组(COM 组,24 只)^[5,6]。

2.2 实验方法

2.2.1 训练方案^[4,5]

C 组常规饲养,无任何运动及营养干预。M 组进行训练周期为 8 周的无负重、中等强度的游泳训练,每周训练 6 天,每天训练 1 次。第 1 天训练时间为 20 min,第 2 天开始逐步递增训练时间,至第 5 天时每天游泳时间递增至 60 min,此后的训练均保持此运动量。OM、COM 组采用 8 周递增负荷游泳训练,具体方案详见表 1。训练过程中,选用姜黄素对大鼠进行营养干预。每天采用专业灌胃器灌胃一次,根据文献及预实验确定姜黄素干预组剂量为 200 mg/kg^[6],灌胃体积为 5 mL/kg,其他各组灌胃等量 0.5% 的羧甲基纤维素钠。

表 1 大鼠的游泳训练方案

Table 1 Swimming training program in rats^[4,5]

周次 Week	星期一 Mon.	星期二 Tue.	星期三 Wed.	星期四 Thur.	星期五 Fri.	星期六 Sat.
1	20	30	40	50	60	60
2	70	75	80	85	90	90
3	95	100	105	110	115	120
4	120 * 1	120 * 1	120 * 1	120 * 1	120 * 1	120 * 1
5	120 * 2	120 * 2	120 * 2	120 * 2	120 * 2	120 * 2
6	120 * 5 * 2	120 * 5 * 2	120 * 5 * 2	120 * 5 * 2	120 * 5 * 2	120 * 5 * 2
7	120 * 6 * 3	120 * 6 * 3	120 * 5 * 3	120 * 6 * 3	120 * 6 * 3	120 * 6 * 3
8	120 * 7 * 3	120 * 7 * 3	120 * 7 * 3	120 * 7 * 3	120 * 7 * 3	120 * 7 * 3

注: * 后数值依次代表体重负荷率(体重%)和训练频率。

Note: * represents load percentage of the body weight (body weight %) and frequency of training.

2.2.2 指标测定

末次游泳训练 24 h 后,各组大鼠乙醚适度麻醉,颈总动脉取血,37 ℃ 自然凝固,待血清出现后,放入冰箱 24 h 后,4 ℃、3 000 rpm 离心 10 min,得到的上清液即为血清,置-20 ℃ 的冰箱中保存待查。迅速取双肾,剔除筋膜,置于预冷的生理盐水中洗净血污,观察肾脏大小、色泽、质地,切取肾组织,分别

用消毒铝箔包好,迅速投入液氮暂存,随后保存于-70 ℃ 冰箱冻存待测^[4,5]。

取部分肾组织,10% 甲醛固定,石蜡包埋,制成 4 μ m 厚切片,进行 HE 染色和组织病理学及免疫组化分析。另取部分皮质,4% 戊二醛固定,超薄切片机制成 50 nm 的超薄切片,透射电镜观察超薄切片(\times 8 000 倍)肾小球基底膜的厚度,每张电镜切片

随机选择 8 个包含肾小球基底膜的视野,观察基底膜厚度、系膜基质及足突变化情况,并摄像,电子染色进行超微结构分析。

2.2.3 HE 染色结果判断

参照 Paller 标准^[7]进行肾脏病理变化评价,在 400 倍光镜下随机选 5 个视野,每个视野选 10 个肾小管评分。(1)肾小管明显扩张,细胞扁平为 1 分;(2)刷状缘损伤为 1 分,脱落为 2 分;(3)细胞膜大泡 1 分,细胞浆空泡 1 分;(4)间质水肿 1 分;(5)肾小管腔内有脱落的坏死细胞未形成管型或碎片为 1 分,形成管型或碎片为 2 分。肾小管评分由两名技术员双盲计算,取其平均值。

2.2.4 免疫组化结果半定量积分评价

免疫组化结果半定量积分评价根据染色程度和范围进行分析评定。基本不着色为 0 分,着色淡者为 1 分,着色明显者为 2 分,着色深者为 3 分;着色范围参照 Riera 等标准^[8],阴性为 0 分,着色范围 $\leq 25\%$ 为 1 分; $>25\%$, $\leq 50\%$ 为 2 分; $>50\%$, $\leq 75\%$ 为 3 分; $>75\%$ 为 4 分。将每张切片的染色程度和范围相乘即为其最后得分。 ≤ 0 , 分为阴性(-); >1 分, ≤ 2 分, 分为弱阳性(+); >3 分, ≤ 4 分, 分为阳性(++); >5 分为强阳性(+++)。免疫组化结果半定量积分由两名技术员双盲计算,取其平均值。

2.2.5 PCR 产物分析

根据 Trizol 试剂盒说明书要求提取各组大鼠肾脏组织总 RNA,并参照各相关指标逆转录扩增试剂盒要求进行 cDNA 合成。根据不同指标的 PCR 扩增条件,进行相应 PCR 扩增。得到的扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳(稳定电压 5 V/cm)约 1 h, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭染色 20 min 后,在紫外灯下观察。用 UVP 凝胶成像系统扫描分析电泳结果。以扩增带灰度与 GAPDH 扩增灰度比值对待测 mRNA 表达量进行半定量分析。

2.3 数据统计

采用 SPSS 19.0 软件对所有数据进行分析、处理,数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析,等级计数资料采用 Kruskal-Wallis H 检验。显著性水平为 $P < 0.05$,非常显著性水平为 $P < 0.01$ 。

3 结果

训练结束后,C、M 组大鼠未出现意外死亡;受训练强度、频度、负重情况、恢复时间等因素影响,OM、COM

组大鼠出现意外死亡,仅剩 11 只和 14 只。

3.1 各组大鼠肾组织病理学及超微结构改变

3.1.1 超微结构改变(图 1)

电镜下观察:C 组大鼠肾小球基底膜均匀一致,未出现增厚,系膜区未出现扩张,系膜细胞无明显增多,上皮足突排列整齐,结构正常;M 组大鼠基底膜偶见轻微增厚,系膜区未出现扩张,系膜细胞数量稳定,滤过膜结构正常,上皮足突无融合;OM 组大鼠部分基底膜出现不规则节段性增厚,系膜基质明显增多,系膜细胞增生,上皮细胞足突广泛融合。COM 组大鼠存在轻微系膜区扩张,基底膜出现不规则节段性增厚,上皮细胞足突融合不明显,病变程度较 OM 组明显减轻。

3.1.2 组织病理学改变(图 2)

光镜下观察:C、M 组大鼠肾脏组织形态正常,肾小球未出现淤血、变性和水肿,肾小管管腔内未发现管型;OM 组大鼠肾脏组织形态发生改变,肾小球出现淤血,肾小管严重损伤,上皮细胞水肿、空泡变性、管腔扩张,管腔中可见少量脱落绒毛和上皮细胞,同时出现多种管型;COM 组大鼠肾脏组织形态明显轻于 OM 组,小管上皮细胞出现轻度水肿、空泡变性、管腔扩张现象,无蛋白管型和细胞管型。表 1 显示:肾小管 Paller 评分,C、M 组间无显著差异($P > 0.05$),OM 组显著高于 C 组($P < 0.01$),COM 组显著低于 OM 组($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肾小管损害评分比较

Table 2 Comparison of renal tubular damage scores among rats in each group

组别 Group	n	损害评分(scores/HP)
安静对照 Control	12	2.45 \pm 1.73
一般训练 General training	12	3.01 \pm 0.60
过度训练 Overtraining	11	12.97 \pm 3.67**
姜黄素 + 过度训练 Curcumin + Overtraining	14	10.37 \pm 1.62 Δ

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与安静对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$,与过度训练组比较。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compare with control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, compare with overtraining group.

3.2 各组大鼠肾组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达水平(图 3)

表 3 显示:C、M 组大鼠肾脏组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白仅轻度表达,且组间无显著性差异($P > 0.05$);OM 组阳性表达较 C 组明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);COM 组较 OM 组阳性表达减弱($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠肾组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- β 蛋白表达水平

Table 3 The expression levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α protein in the renal tissue of rats

组别 Group	n	-	+	++	+++
安静对照 Control	12	IL-1 β	8	3	1
		IL-6	7	4	1
		TNF- α	6	5	1
一般训练 General training	12	IL-1 β	7	2	3
		IL-6	6	3	3
		TNF- α	5	4	3
过度训练 Overtraining	11	IL-1 β ^{**}	1	2	6
		IL-6 ^{**}	1	4	5
		TNF- α [*]	2	3	4
姜黄素 + 过度训练 Curcumin + Overtraining	14	IL-1 β ^{Δ}	4	6	4
		IL-6 ^{Δ}	2	6	6
		TNF- α ^{Δ}	3	8	3

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与安静对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compare with control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, compare with overtraining group.

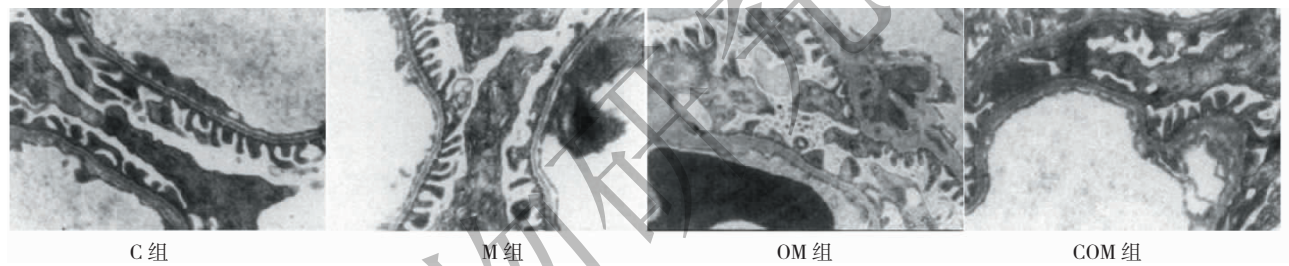


图 1 4 组大鼠的肾组织超微结构的改变 (×8000)

Fig. 1 Ultrastructural changes of kidney tissue in 4 groups of rats (×8000)

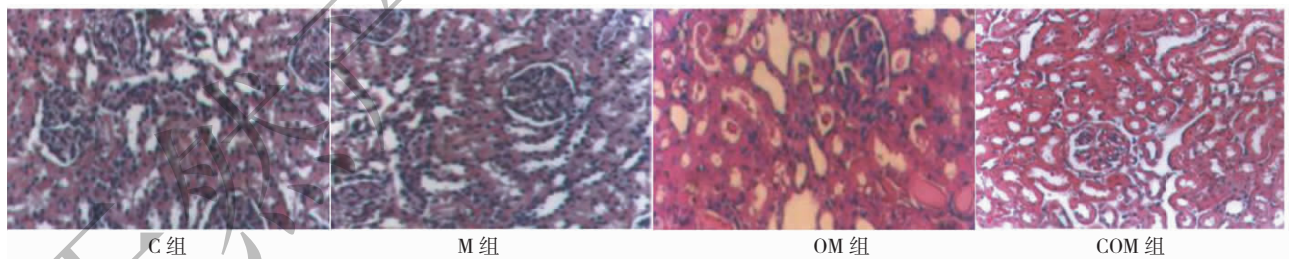


图 2 4 组大鼠的肾组织病理学改变 (HE, ×400)

Fig. 2 Pathological changes of kidney tissue in rats in each group (HE, ×400)

3.3 各组大鼠血清睾酮、皮质酮、尿素氮、肌酐水平

表 4 显示:血清睾酮, M 组较 C 组降低, 但无显著性差异 ($P > 0.05$); OM 组显著低于 C 组 ($P < 0.01$); COM 组显著高于 OM 组 ($P < 0.01$)。血清皮质酮, M 组较 C 组升高, 但无显著性差异 ($P > 0.05$); OM 组显著高于 C 组 ($P < 0.01$); COM 组显著低于 OM 组 ($P < 0.01$)。且存在组间睾酮/皮质

酮比值变化与睾酮变化相一致的现象。血清尿素氮和肌酐水平, C、M 组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。OM 组显著高于 C 组 ($P < 0.01$); COM 组显著低于 OM 组 ($P < 0.05$)。

3.4 各组大鼠肾组织 IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA、TNF- α mRNA 相对表达量

表 5 显示: C 组大鼠肾脏组织 IL-1 β mRNA、IL-6

mRNA、TNF- α mRNA 表达水平与 M 组比较均无显著性差异 ($P > 0.05$), OM 组显著高于 C 组 ($P < 0.01$), COM 组显著低于 OM 组 ($P < 0.05$)。

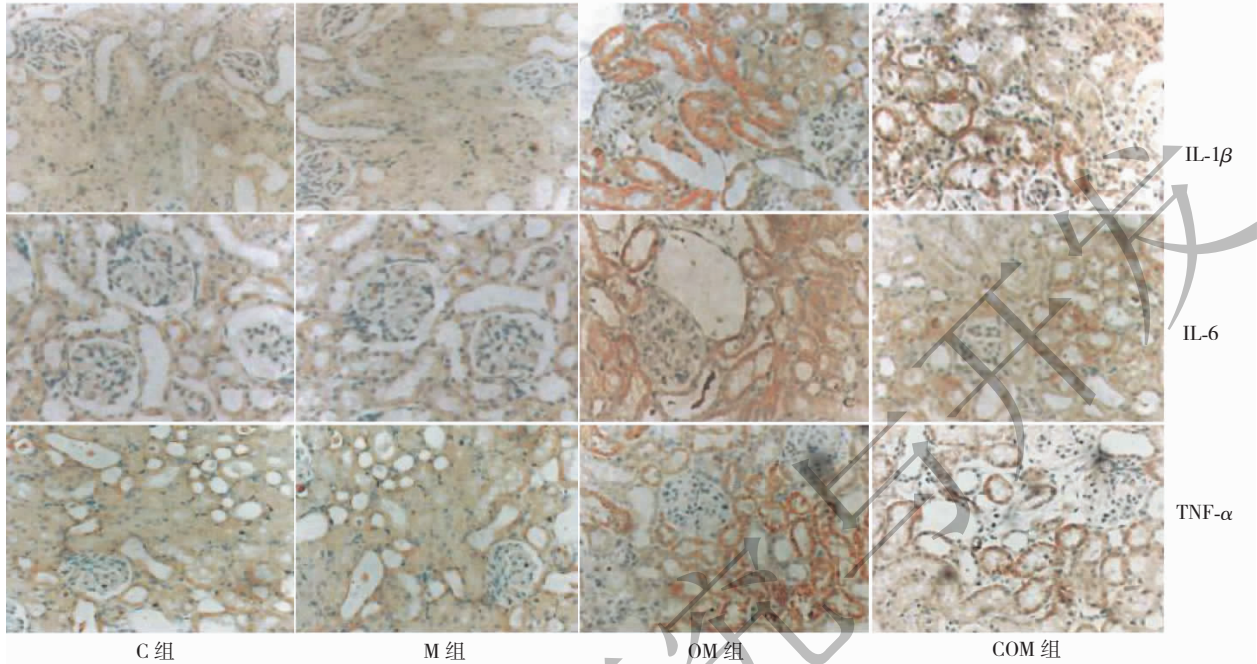


图 3 4 组大鼠肾脏组织肾脏 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达
Fig. 3 IL-1 β , IL-6, TNF- α in kidney tissue of 4 groups rats

表 4 各组大鼠血清睾酮和皮质酮水平
Table 4 The Serum testosterone, corticosterone levels of rats

组别 Group	n	血清睾酮	血清皮质酮	血清尿素氮	血清肌酐	SCr ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
		T (ng/mL)	C (ng/mL)	T/C (10^{-2})	BUN (mmol/L)	
安静对照 Control	12	1.816 \pm 0.714	23.81 \pm 3.91	8.34 \pm 4.37	8.10 \pm 1.22	28.81 \pm 7.52
一般训练 General training	12	1.731 \pm 0.657	24.69 \pm 3.14	7.47 \pm 3.61	10.01 \pm 1.04	40.70 \pm 7.33
过度训练 Overtraining	11	0.496 \pm 0.121 **	45.95 \pm 6.93 **	1.14 \pm 0.44 **	14.90 \pm 1.85 **	82.09 \pm 11.62 **
姜黄素 + 过度训练 Curcumin + Overtraining	14	1.223 \pm 0.657 $\Delta\Delta$	30.11 \pm 8.41 $\Delta\Delta$	4.40 \pm 4.26 $\Delta\Delta$	12.87 \pm 1.16 Δ	60.11 \pm 10.01 Δ

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与安静对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compare with control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, compare with overtraining group.

表 5 各组大鼠肾脏组织 IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA、TNF- α mRNA 相对表达量比较
Table 5 The expression levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA in the renal tissue of rats

组别 Group	n	IL-1 β (GAPDH)	IL-6 (GAPDH)	TNF- α (GAPDH)
安静对照 Control	10	0.201 \pm 0.063	0.351 \pm 0.048	0.211 \pm 0.081
一般训练 General training	10	0.231 \pm 0.067	0.413 \pm 0.039	0.241 \pm 0.081
过度训练组 Overtraining	10	0.821 \pm 0.138 *	0.961 \pm 0.199 *	0.914 \pm 0.275 *
姜黄素 + 过度训练 Curcumin + Overtraining	10	0.511 \pm 0.131 Δ	0.658 \pm 0.191 Δ	0.609 \pm 0.245 Δ

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与安静对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compare with control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, compare with overtraining group.

4 讨论

肾脏是对缺血和再灌注损伤高度敏感的器官。几乎所有的肾脏固有细胞在具有产生细胞因子的能力的同时又是细胞因子生物学作用的靶细胞。已有研究表明过度训练引发的运动性肾缺血再灌注发生时,氧化应激和免疫应答同时发生,肾脏组织中大量效应细胞被激活,促炎因子表达大幅度上调,抑炎与促炎因子间的动态平衡被打破,引发细胞凋亡和坏死,最终导致肾脏损伤^[9]。IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等细胞因子可以作为反映过度训练所致的运动性肾缺血再灌注损伤严重程度的重要指标,且与血肌酐和尿素氮等反映肾功能的重要指标成正相关^[5]。IL-1 β 是炎症反应中最早出现的、起着前炎症因子作用的、反应强烈的细胞因子之一,其在免疫调节中发挥重要作用,可作为炎症信使促使骨髓释放中性粒细胞,促使 T 细胞增殖,介导炎症反应。TNF- α 是创伤或感染后机体最早产生的多功能细胞因子之一,在多种脏器损伤中可以作为始动因子通过自分泌的形式激活单核-巨噬细胞,与其他细胞因子之间实现相互和共同诱生,共同参与炎症损伤的过程。IL-6 兼具致炎和抑炎作用,是机体创伤和修复过程中一种重要的急性期反应介质。作为急性期反应中重要的细胞因子,具有较高的敏感性和特异性,其在创伤或感染早期即表现为增高,较 C 反应蛋白提前 24 ~ 48 h。

睾酮与皮质酮间的比值可以有效地反映机体分解和合成代谢的平衡状况,是判断机体出现过度训练综合症的重要指标^[10]。本实验中过度训练组大鼠睾酮与皮质酮间的比值较安静对照组下降 86.33%,远远超过了冯炜权教授等多位学者^[10]提出的 30% 的人类过度训练的诊断参考标准,有力的证明了实验中过度训练动物模型建立成功。血肌酐和尿素氮作为肌肉和蛋白质的分解代谢产物,主要通过血液循环经肾脏排除体外,其浓度受肾小球滤过能力的影响。肾实质发生损伤后,当肾小球滤过率降低至临界点后,二者浓度明显上升,是公认的反应肾组织损伤程度的指标^[11]。本实验中,过度训练组大鼠较安静对照组血肌酐和尿素氮和水平显著升高,同时出现显著的病理改变,进一步说明 8 周递增负荷游泳训练引发大鼠出现过度训练的同时也造成了运动性肾缺血再灌注损伤。这一结果与课题组前期及其他学者的研究相一致^[5,12]。过度训练引发

大鼠肾脏组织相关炎症因子基因表达上调,进而实现了蛋白表达的上调,促进了炎性作用。而一般训练组大鼠与安静对照组比较,肾脏功能正常,肾组织相关炎症因子基因、蛋白表达无明显变化,未出现病理改变,表明适度负荷的运动训练不会对肾脏组织结构和功能产生影响。姜黄素 + 过度训练组大鼠肾脏组织炎症因子基因、蛋白表达,血尿素氮和肌酐水平较过度训练组显著降低,病理改变明显改善。表明在运动训练期间补充姜黄素,可以通过抑制和延缓过度训练及运动性肾损伤的发生与发展,下调肾脏组织中相关炎症细胞因子的基因和蛋白表达,有效地减轻肾功能障碍、病理改变。其机制可能为:一、氧自由基介导的脂质过氧化反应是肾缺血再灌注损伤的重要环节。姜黄素具有良好的抗氧化能力,可以通过提高肾脏组织中抗氧化酶的活性,清除由于大强度运动训练引发生成的大量氧自由基,减轻脂质过氧化反应,维持肾脏组织细胞膜的流动性和通透性,保护其功能的完整性与稳定性,从而阻止了炎症细胞因子的过度生成。(1)姜黄素具有特殊的分子结构。姜黄素具有 2 个苯丙烯酰基骨架,两个苯环上各有一个酚羟基和一个甲氧基,丙烯基与一个 β -双酮/烯醇式结构连接。酚羟基和 β -二酮这 2 个活性部位均可以在抗氧化过程中提供质子,阻断自由基反应。同时,其结构上存在的甲氧基、苯氧基以及 C = C 双键等功能基团决定了姜黄素具有良好的抗氧化活性^[13](强于常规维生素及白藜芦醇和槲皮素等其他多酚类化合物);(2)姜黄素可以有效地清除羟自由基(\cdot OH),相关实验证明其作用效果超过(\cdot OH)的特异性清除剂甘露醇^[14];(3)姜黄素通过调控 Nrf2-ARE 信号通路,上调 HO-1 表达,降低活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生^[15],促进细胞内还原型谷胱甘肽等抗氧化酶及 γ -谷氨酸半胱氨酸合成酶等 II 相药物代谢酶的产生和活性的提升,增强细胞清除活性氧的能力,进而维持细胞内氧化还原状态的平衡并降低氧化损伤。二、姜黄素通过调控 Nrf2-ARE 信号通路,有效地抑制 NF- κ B 的表达,减轻炎症反应^[16]。三、姜黄素可以通过 Toll 样受体介导的 NADPH 氧化酶/ROS 信号通路,抑制 p22Phoxm 表达水平,降低 ROS 水平,抑制 TNF- α 和 IL-1 的分泌^[17]。四、姜黄素可以通过调控 Notch1 信号通路,下调 Nothc1、Hes1、caspase-3 和 Bax 的表达,上调 Bal-2 的表达,缓解氧化应激造成的损伤^[18]。五、姜黄素可以通过激活

AMPK/e NOS 通路,增加 P-AMPK 的表达,促进血管内皮细胞 e NOS 的磷酸化,缓解氧化应激造成的损伤^[19]。六、姜黄素通过 MAPK 信号通路,抑制 ERK1/2 的磷酸化,缓解氧化应激造成的损伤^[20]。七、姜黄素可以通过下调 COX-2、iNOS、脂肪氧化酶的活性,下调 Janus 激酶和丝裂原活化蛋白激酶的活性,抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的分泌^[21]。

5 总结

采用姜黄素对过度训练大鼠进行营养干预,能够通过抑制炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的蛋白和基因表达,预防和延缓过度训练导致的运动性肾缺血再灌注损伤的发生与发展,有效地改善大鼠肾脏功能,缓解组织形态学及超微结构改变。

参考文献

- Bergamaschi CA, boim MA, Maura LA. Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 1997, 29: 169-174.
- Lin X, Qu S, Hu M, et al. Protective effect of erythropoietin on renal injury induced by acute exhaustive exercise in the rat [J]. *Int J Sports Med*, 2010, 31: 847-853.
- Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rat [J]. *Life Sci*, 2004, 74: 969-985.
- Zhang H, Sun XQ, Cao JM, et al. Protective effect of epimedium combined with oligomeric proanthocyanidins on exercise-induced renal ischemia-reperfusion injury of rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7: 5730-5736.
- Wang J, Cao JM, Huang AL, et al. Effect of haematococcus pluvialis on exercise-related renal ischemia-reperfusion injury and ECM expression [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 9: 7127-7136.
- Niu AL (牛爱丽). Protective Effect of Curcumin on Renal Injury in Exhausted Rats and Its Mechanisms [D]. Changsha: Human Normal University (湖南师范大学) MSc. 2012.
- Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat [J]. *J Clin Invest*, 1984, 74: 1156-1164.
- Riera M, Torras J, Cruzado JM, et al. The enhancement of endogenous cAMP with pituitary adenylates olpeptide protects rat kidney against ischemia through the modulation of inflammatory response [J]. *Transplantation*, 2001, 72: 1217-1223.
- An YX (安玉香), Xia SH (夏书红), Liu JH (刘金海), et al. Intervention of tetrandrine on the apoptosis of renal cell with exercise albuminuria in rats [J]. *Chin sport sci tech*,

- 2007, 43 (2): 83-86.
- Feng WQ (冯炜权). Biochemical diagnosis of sports fatigue and overtraining [J]. *J Beijing Sport Univ* (北京体育大学学报), 2000, 23: 498-502.
- Wang C (王聪), Wang C (王程). Protective effect of resveratrol on renal ischemia reperfusion injury of rats [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 831-835.
- Zhou HT (周海涛), Cao JM (曹建民), Guo X (郭娴), et al. Effect of astaxanthin on kidney ECM expression in exercise-related renal ischemia-reperfusion injury rats [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 1871-1877.
- Miriyala S, Panchatcharam M, Rengarajulu P. Cardioprotective effects of curcumin [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 359-377.
- Wang JS (王建舜), Rong WQ (容维祺), Kang JH (康九红). Effects of curcumin on hydroxyl free radical and the oxidative hemolysis in erythrocytes [J]. *Chin J Modern Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2000, 17: 469-471.
- Kang KW, Lee SJ, Kim SG. Molecular mechanism of Nrf2 activation by oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7: 1664-1673.
- Chen XL, Dodd G, Thomas S, et al. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290: H1862-1870.
- Zhai HJ (翟海杰), Meng Z (孟哲), Tao HL (陶海龙), et al. Curcumin inhibits LPS-induced inflammation in VSMCs via Toll-like receptor 4/NADPH oxidase/reactive oxygen species signaling pathway [J]. *J Xi an Jiaotong Univ: Med Sci* (西安交通大学学报: 医学版), 2015, 36: 543-548.
- Wang N (王宁). Curcumin attenuates endothelial cell oxidative stress injury through Notch signaling inhibition [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University (第四军医大学), Msc. 2014.
- Wang PJ (王沛坚), Huang MQ (黄鸣清), Pu CH (蒲春华), et al. Curcumin suppressed oxidative stress and improved endothelium dysfunction through aMPK Activation [J]. *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2015, 15: 1237-1240.
- Li J (李军), Xiong K (熊琨), Gong Y (龚元), et al. Advances in studies on anti-oxidant mechanism of curcumin based on signal transduction pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 47: 2373-2380.
- Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of curcuma longa; a review of preclinical and clinical research [J]. *Altern Med Rev*, 2009, 14: 141-153.