

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.07.002

文章编号: 1005-8982(2020)07-0005-05

茶多酚对脂多糖诱导小鼠急性肾损伤的保护作用及机制

许明贤¹, 唐瑞娣¹, 张洁容¹, 曹舒晴¹, 秦理璐¹, 肖嘉琪¹, 王桂房²

(广州医科大学 1. 基础学院生理教研室, 2. 基础学院机能实验中心, 广东 广州 511436)

摘要: **目的** 从氧化应激、炎症反应两方面探讨茶多酚对脂多糖(LPS)诱导小鼠急性肾损伤(AKI)保护作用的可能机制。**方法** 24只雄性无特定病原体(SPF)级体重为(35±3)g的KM小鼠随机分为假手术组、模型组和茶多酚治疗组(治疗组),每组8只。模型组腹腔注射LPS(10 mg/kg)诱导复制小鼠AKI模型,假手术组注射等剂量生理盐水。治疗组于术前7天开始,用茶多酚溶液灌胃(200 mg/kg, 1次/d),其他两组均用等量蒸馏水灌胃,1次/d,持续8d。复制模型24h后眼球取血,分离血清检测血肌酐(Scr)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和尿素氮(BUN)水平,收集24h尿液检测BUN、尿蛋白(Upro)和尿肌酐(Ucr)的水平;取肾脏处理后计算肾脏系数,ELISA法检测肾组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平,并取部分肾脏组织做HE染色切片,观察肾组织损伤情况。**结果** 与假手术组比较,模型组小鼠血清BUN、MDA、Scr水平提高,SOD和GSH-Px水平降低(均 $P < 0.05$);尿液BUN、Upro、Ucr水平提高(均 $P < 0.05$);肾组织中TNF- α 和IL-1 β 水平提高(均 $P < 0.05$),镜下组织结构明显破坏,肾系数增加。与模型组比较,治疗组以上指标改善(均 $P < 0.05$)。**结论** 茶多酚对LPS诱导的AKI保护作用机制与茶多酚对抗氧化应激和抑制肾组织炎症反应有关。

关键词: 急性肾损伤;茶多酚;脂多糖;氧化应激;炎症反应

中图分类号: R692

文献标识码: A

Effects and mechanism of tea-polyphenol on LPS inducing acute kidney injury of mice

Ming-xian Xu¹, Rui-di Tang¹, Jie-rong Zhang¹, Shu-qing Cao¹,
Li-lu Qin¹, Jia-qi Xiao¹, Gui-fang Wang²

(1. Department of Physiology, School of Basic Medical Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511436, China; 2. Functional Experimental Centre, School of Basic Medical Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511436, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of Tea-polyphenol on lipopolysaccharide (LPS) inducing acute kidney injury of mice. **Methods** Twenty four male KM mice were randomly divided into 3 groups ($n = 8$): sham group, LPS group and tea-polyphenol +LPS group. Tea-polyphenol +LPS group was given tea-polyphenol solution (200 mg/kg in distilled water) once daily. Other groups received same dosage of distilled water once daily. After 7 days, the acute kidney injury model was induced by intraperitoneal injection of LPS (10 mg/kg), the sham group received same dosage of saline instead of LPS. After 8 days, the blood was collected for testing the contents of serum creatinine (Scr), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione

收稿日期: 2019-11-11

[通信作者] 王桂房, E-mail: wgfz@qq.com; Tel: 13928789001

peroxidase (GSH-Px) and urea nitrogen (BUN) in serum. Urine levels of urea nitrogen (BUN), urine protein (Pro) and creatinine (Ucr) were measured by corresponding kits. Renal expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured by ELISA. HE staining and renal index were employed for determining the damage of renal tissues. **Result** Compared with sham group, in LPS group, BUN, Scr and MDA in serum increased; SOD and GSH in serum decreased; BUN, Pro and Ucr in urine increased; TNF- α and IL-1 β expression in renal tissue increased, which also showed typical tissue damage in HE staining slides. Compared with LPS group, above indicators significantly ameliorated in tea-polyphenol +LPS group. **Conclusion** Tea-polyphenol had protective effect on LPS inducing acute kidney injury from inhibiting oxidative stress and inflammatory reaction in renal tissues.

Keyword: acute renal injury; tea polyphenols; lipopolysaccharides; oxidative stress; inflammation

脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 是革兰阴性细菌内毒素主要成分, 也是革兰阴性细菌激发宿主免疫应答, 导致机体损伤的重要因素。人体聚集的革兰阴性杆菌最丰富的部位是肠道。革兰阴性菌感染时, 可导致肾脏缺血、肾灌注减少及肾功能的改变, 因细胞损伤凋亡、氧化应激、线粒体功能障碍^[4]和炎症反应等多种复杂的病理生理学机制导致急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI)。LPS 不仅可直接间接地造成肾脏细胞损伤^[5-7], 而且其诱导的肾细胞坏死在重症肾炎的发展中起重要作用。茶多酚是从茶叶中提取出来的一种含多酚类化合物的混合物, 包含多个酚羟基结构, 具有强大的抗氧化作用。多项研究表明, 茶多酚还具有抗衰老、保护心脑血管、降血脂等作用^[8-9]。本研究拟从氧化应激、炎症反应两方面探讨茶多酚对脂多糖诱导小鼠急性肾损伤的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

无特定病原体 (SPF) 级 KM 雄性小鼠, 体重 (35 ± 3) g, 购自中山大学动物中心; 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒、肌酐 (Cr) 试剂盒、血尿素氮 (BUN) 试剂盒及尿蛋白 (Upro) 定量试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, LPS 购自合肥博美生物科技有限责任公司, 茶多酚 (纯度 98.35%, 食品级) 购自陕西嘉禾生物科技股份有限公司。

1.2 动物模型制备

24 只 KM 雄性小鼠随机分为假手术组、模型组和茶多酚治疗组 (治疗组), 每组 8 只。采用腹腔注射 LPS (10 mg/kg) 的方法复制小鼠 AKI 模型^[1-2], 假

手术组注射同样剂量生理盐水。治疗组于术前 7 d 开始用茶多酚溶液灌胃 (200 mg/kg, 1 次/d)^[3], 其他两组均用等量蒸馏水灌胃, 1 次/d, 持续 8 d, 正常饲食。

1.3 血尿生化指标、细胞因子检测和肾组织 HE 染色

眼球取血, 分离血清测定 BUN、血肌酐 (Scr)、MDA、SOD 水平和 GSH-Px 活性。留取模型复制后 24 h 尿液, 检测 BUN、Upro 和尿肌酐 (Ucr) 的水平。取小鼠双侧肾脏, 冰生理盐水洗去血液, 用滤纸吸去表面水分, 称重并计算小鼠肾脏系数 (肾脏重量/小鼠体重 × 100%)。随后取部分肾脏, 加入冰生理盐水, 冰上匀浆, 低温离心并取上清液检测 TNF- α 和 IL-1 β 的浓度, 余下部分置于 Bouin 液防腐, 用苏木精-伊红 (HE) 染色, 切片, 光学显微镜 (×400) 下观察肾组织损伤情况。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 软件统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 Duncan's 新复极差法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠血清和尿液 BUN、Cr, Upro 水平及肾脏系数比较

3 组小鼠 Scr、血 BUN、Ucr、Upro、尿 BUN 及肾脏系数比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。与假手术组比较, 模型组和治疗组小鼠 Scr、血 BUN、Ucr、Upro、尿 BUN 水平及肾脏系数均提高 (P < 0.05)。与模型组比较, 治疗组上述指标降低 (P < 0.05)。见表 1。

2.2 小鼠血清 MDA、SOD 和 GSH-Px 水平比较

3 组 MDA、SOD 及 GSH-Px 比较, 差异有统计

学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组和治疗组小鼠血清 MDA 水平提高, SOD 和 GSH-Px 水平下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 治疗组 MDA 水平降低, 而 SOD 和 GSH-Px 水平提高 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 小鼠肾脏组织中 TNF- α 和 IL-1 β 水平比较

3 组 IL-1 β 和 TNF- α 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组和治疗组小鼠肾脏组织 IL-1 β 和 TNF- α 水平提高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 治疗组 IL-1 β 和 TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$)。

见表 3。

2.4 小鼠肾脏组织 HE 染色病理结果

肾脏组织 HE 染色切片显示, 假手术组肾小球、肾曲管结构正常清楚, 肾间质及肾小球无充血和炎症细胞浸润。模型组相对于假手术组肾小管上皮细胞出现变性坏死, 肾小管出现蛋白管型, 并明显扩张; 肾间质充血水肿并有大量炎症细胞浸润, 肾小球可见中性粒细胞浸润及纤维素渗出。与模型组比较, 治疗组肾脏组织损伤情况明显缓解。见图 1。

表 1 3 组小鼠血清和尿液 BUN、Cr、Upro 和肾脏系数比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	Scr/ ($\mu\text{mol/L}$)	血 BUN/ (mmol/L)	Ucr/ ($\mu\text{mol/L}$)	Upro/ ($\mu\text{mol/L}$)	尿 BUN/ (mmol/L)	肾脏系数 / (g/kg)
假手术组	15.12 \pm 1.83	5.38 \pm 0.43	1 758.93 \pm 262.14	1 144.38 \pm 132.54	261.04 \pm 49.31	1.15 \pm 0.08
模型组	56.50 \pm 10.55 ^①	49.38 \pm 8.63 ^①	5 829.91 \pm 565.40 ^①	2 755.83 \pm 257.18 ^①	539.72 \pm 33.27 ^①	1.58 \pm 0.07 ^①
治疗组	35.47 \pm 7.95 ^{①②}	29.95 \pm 3.10 ^{①②}	3 239.73 \pm 304.18 ^{①②}	2 075.29 \pm 183.87 ^{①②}	302.23 \pm 37.50 ^{①②}	1.23 \pm 0.05 ^{①②}
F 值	57.758	138.361	211.884	133.651	114.551	96.733
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 3 组小鼠氧化应激指标比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA/ (nmol/L)	SOD/ (u/ml)	GSH-Px/ (u/ml)
假手术组	5.22 \pm 0.77	15.55 \pm 2.16	58.65 \pm 1.28
模型组	10.97 \pm 1.92 ^①	10.46 \pm 1.14 ^①	34.20 \pm 4.62 ^①
治疗组	7.63 \pm 0.40 ^{①②}	12.27 \pm 1.32 ^{①②}	114.12 \pm 12.39 ^{①②}
F 值	45.356	18.217	199.670
P 值	0.000	0.000	0.000

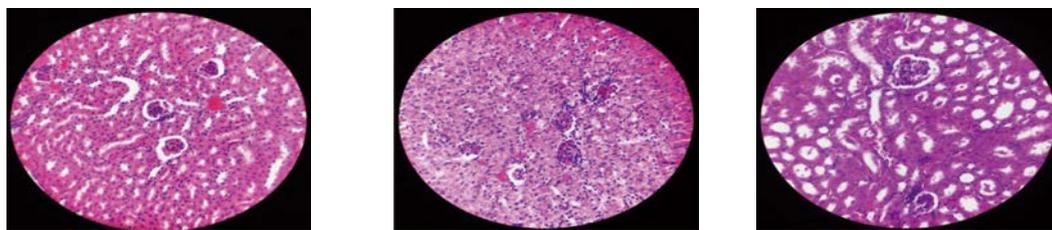
注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 3 组小鼠肾脏组织炎症因子比较

($n=8, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	TNF- α
假手术组	33.49 \pm 2.30	32.59 \pm 1.11
模型组	64.24 \pm 0.13 ^①	55.12 \pm 1.06 ^①
治疗组	56.05 \pm 0.38 ^{①②}	49.49 \pm 1.36 ^{①②}
F 值	556.305	392.132
P 值	0.000	0.000

注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。



假手术组

模型组

治疗组

图 1 小鼠肾脏组织病理切片 (HE 染色 $\times 400$)

3 讨论

LPS 进入机体诱发脓毒血症可引起全身多器官衰竭^[5-6], 其中 AKI 是脓毒血症中常见的致死原因^[10]。研究表明, 内毒素血症时诱导白细胞 (主要是中性粒

细胞) 表面黏附分子发生改变, 被激活后产生大量超氧化物和一系列炎症因子, 形成级联瀑布式炎症反应, 主要通过自由基和炎症因子作用引起局部组织细胞损伤^[11-12]。同时氧化应激改变线粒体膜的通透性, 从而

进一步减少线粒体内的氧化型辅酶 (NAD) 加重氧化应激作用。根据 DENG 等^[13] 的研究, 实验中脓毒症 AKI 是潜在、可逆的发病过程, 即早期抗炎和 / 或抗氧化治疗可以改善肾功能。

本研究发现, 腹腔注射 LPS 可导致小鼠肾功能下降、肾脏系数增加、肾组织损伤; 连续茶多酚灌胃给药能改善肾功能, 表现为血清 BUN、Scr 水平下降, 24 h 尿液 BUN、Ucr 和 Upro 水平下降, 这些结果提示口服茶多酚可改善 LPS 引起的肾功能损伤。

文献表明 LPS 引起 AKI 的机制与自由基的产生、脂质过氧化和炎症反应有重要关系^[2, 14]。MDA 是体内脂质过氧化的重要产物, 可间接反映脂质过氧化程度, 是评价氧化应激水平的重要指标。而 SOD 可以清除体内的氧自由基, 可以缓解组织由于自由基导致的损伤, 同时超氧化物可以影响 SOD 的活性, 组织损伤严重时 SOD 功能减退甚至失活。GSH-Px 是机体重要的抗氧化剂和自由基清除剂, 通过与自由基、重金属等结合, 从而把机体内有害的毒物转化为无害的物质, 排出体外。因此, SOD、GSH-Px 在机体的抗氧化作用方面有重大意义。本研究结果提示, 治疗组小鼠血清 MDA 水平比模型组降低, 血清中 SOD 和 GSH-Px 水平提高, 并且治疗组血清 GSH-Px 水平高于假手术组。提示茶多酚有上调正常机体 GSH-Px 表达水平的作用, 从而减少自由基的生成。治疗组小鼠血清 SOD 的水平高于模型组, 说明茶多酚可以使小鼠血清 SOD 水平提高, 从而缓解自由基对机体肾脏组织损伤起到保护作用。

IL-2 和 TNF- α 均为组织细胞释放的细胞因子。IL-2 是由 T 细胞分泌参与 T 细胞分化和增殖的细胞因子, 同时参加炎症反应和自身免疫反应。TNF- α 主要启动炎症相关反应通路, 如 NF- κ B 信号通路。正常情况下, 细胞因子组成动态平衡的网络。内毒素可以作用于机体单核-巨噬细胞系统, 诱导组织细胞产生一系列炎症因子, 如前列腺素、IL-1、TNF- α 等, 各种炎症因子参与一系列细胞因子网络反应, 其中最重要的炎症通路是 Toll 样受体 4 (TLR4) 通路^[15], 炎症因子相互促进和诱发级联炎症反应。焦路阳等^[15] 研究报道急性百草枯中毒大鼠的血清 IL-2、IL-6 和 TNF- α 水平升高, 以上炎症因子参与肾损伤的发生、发展过程。血清 IL-2 和 TNF- α 水平除用作反映机体炎症反应的指标外, 还可作为评价本实验中肾损伤治疗效果的依据。治疗组肾脏组织中 IL-2 和 TNF- α

水平相比假手术组升高, 同模型组比较降低, 提示本研究中茶多酚可缓解 LPS 导致的小鼠 AKI。此外, 茶多酚治疗组的肾脏系数较模型组降低, 肾脏 HE 染色病理切片提示治疗组肾小管肿胀和间质水肿, 但出血不明显, 炎症细胞浸润现象程度也较模型组轻。

本实验中模型组相比假手术组 BUN、Cr 和 Upro 水平升高, 血清中 MDA 水平上调, 血清中 SOD 和 GSH-Px 水平降低, 肾脏组织中 IL-2 和 TNF- α 水平均高于假手术组, 说明在 LPS 作用下成功诱导小鼠 AKI 模型。治疗组相比模型组肾功能改善, 其作用机制与茶多酚的抗氧化应激作用和抗炎反应有关, 与徐文萍等的研究结果^[16] 一致。我国茶叶资源丰富, 茶多酚的来源广泛, 且毒副作用小, 但在临床应用并不普遍。沈海涛等^[3] 的研究表明, 茶多酚干预对百草枯大鼠肾脏有保护作用, 且该作用在一定浓度范围内呈现剂量相关性。目前, 国内研究已经证明茶多酚对多种毒物因氧化应激等机制造成的急性损伤有保护作用^[17], 根据欧春雨等^[18] 的研究, 茶多酚口服给药的安全性较好, 小鼠的给药量达到 108 g / (kg · d) 灌胃第 7 天时仍未出现明显急性毒性反应。本实验在给药期间小鼠无明显不良反应, 治疗组小鼠相比模型组小鼠肾功能改善。

综上所述, 茶多酚预处理对 LPS 诱导的脓毒症小鼠 AKI 有一定保护作用, 其机制与茶多酚对抗氧化应激和抑制肾脏炎症反应有关。

参 考 文 献:

- [1] RIPPS H, SHEN W. Review taurine: a 'very essential' amino acid[J]. Mol Vis, 2012(18): 2673-2686.
- [2] ZHU J B, XU S, LI J, et al. Farnesoid X receptor agonist obeticholic acid inhibits renal inflammation and oxidative stress during lipopolysaccharide-induced acute kidney injury[J]. Eur J Pharmacol, 2018(838): 60-68.
- [3] 沈海涛, 吴娜, 赵宏宇, 等. 茶多酚对百草枯中毒大鼠肾脏氧化应激及炎症反应的影响[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(3): 210-213.
- [4] 陈晨, 孙竞, 傅鹤秀, 等. 没食子酸对线粒体氧化应激损伤的保护作用[J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(5): 353-359.
- [5] BELLOMO R, KELLUM J A, RONCO C. Acute kidney injury[J]. Lancet, 2012, 380(9843): 755-766.
- [6] KINSER S, COPPLE B L, ROTH R A, et al. Enhancement of allyl alcohol hepatotoxicity by endotoxin requires extrahepatic factors[J]. Toxicol Sci, 2002, 69(2): 470-481.
- [7] 赵颖, 张雁芳, 龙超良, 等. 埃他卡林对脂多糖、油酸、二甘醇等所致肾脏损伤的影响[J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(1): 51-55.

- [8] TAMBURINI J, GREEN A S, BARDET V, et al. Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2009, 114(8): 1618-1627.
- [9] SARBASSOV D D, GUERTIN D A, ALI S M, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex[J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098-1101.
- [10] MEHTA R L, BOUCHARD J, SOROKO S B, et al. Sepsis as a cause and consequence of acute kidney injury: program to improve care in acute renal disease[J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37(2): 241-248.
- [11] 陈裕洁, 龚楚链, 谭芳, 等. 右美托咪啶预处理对脓毒症肾损伤大鼠炎症因子和氧化应激的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(10): 1472-1475.
- [12] 杜成成, 尹婷, 任如静, 等. 基于脂多糖-Toll样受体4信号通路抗内毒素血症机制研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44(12): 1107-1112.
- [13] DENG A, MIRACLE C M, SUAREZ J M, et al. Oxygen consumption in the kidney: effects of nitric oxide synthase isoforms and angiotensin II[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(2): 723-730.
- [14] AN X, SHANG F. RA-XII exerts anti-oxidant and anti-inflammatory activities on lipopolysaccharide-induced acute renal injury by suppressing NF- κ B and MAPKs regulated by HO-1/Nrf2 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(3): 2317-2323.
- [15] 焦路阳, 宋志善, 郭庆合, 等. 急性百草枯中毒大鼠肾损害时血清中炎症因子的变化 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2011, 29(3): 227-229.
- [16] 徐文萍, 曹永安, 嵇月娥, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对内毒素血症小鼠肾损伤的保护作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2005, 25(10): 727-728.
- [17] 冯亮, 汪燕, 潘小玲, 等. 茶多酚对酒精性肝损伤大鼠的抗炎抗氧化保护作用 [J]. *中国药业*, 2015(22): 37-38.
- [18] 欧春丽, 王硕, 侯小利, 等. 甜茶多酚毒理学研究 [J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(10): 3-7.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 许明贤, 唐瑞娣, 张洁容, 等. 茶多酚对脂多糖诱导小鼠急性肾损伤的保护作用及机制 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(7): 5-9.