

## 表没食子儿茶素没食子酸酯对顺铂诱导大鼠肾损伤的改善作用

王凤仙, 杨伟, 高春华, 张诗缙, 胡相卡, 陈香, 代春美\*

(锦州医科大学, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:** **目的** 考察表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对顺铂诱导大鼠肾损伤的改善作用及其作用机制。**方法** 50只SD雄性大鼠(10只/组)随机分为空白对照组,肾损伤组,EGCG低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg)。肾损伤组及给药组腹腔注射7.5 mg/kg顺铂制备肾损伤模型,空白对照组腹腔注射生理盐水。给药14 d后,观察各组大鼠一般状况,HE染色法观察肾组织形态学变化;ELISA试剂盒检测血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、胱抑素C(Cys-c)的含有量和尿液中白介素-18(IL-18)、肾损伤分子-1(KIM-1)的含有量;试剂盒法检测肾皮质中丙二醛(MDA)、抗氧化酶体系谷胱甘肽(GSH)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)的含有量;Western blot法检测肾皮质胞浆、胞核中核因子2相关因子2(Nrf2)蛋白的含有量及血红素氧合酶1(HO-1)蛋白的表达水平。**结果** EGCG干预可以改善顺铂诱导大鼠肾损伤病理结构改变,肾指数降低,血清中Cr、Cys-c含有量降低,尿液中IL-18、KIM-1含有量降低,肾皮质中MDA浓度降低,GSH浓度、T-SOD活性升高。同时,肾皮质中胞浆Nrf2含有量降低,胞核Nrf2、总细胞HO-1含有量升高。**结论** EGCG可通过激活Nrf2/HO-1信号通路,发挥对顺铂诱导大鼠肾损伤的改善作用。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯;顺铂;肾损伤;Nrf2/HO-1信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)07-1336-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.002

## Improving effects of epigallocatechin gallate on rat kidney injury induced by cisplatin

WANG Feng-xian, YANG Wei, GAO Chun-hua, ZHANG Shi-ti, HU Xiang-ka, CHEN Xiang, DAI Chun-mei\*

(Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the improving effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on rat kidney injury induced by cisplatin and its mechanism of action. **METHODS** Fifty male SD rats (10 rats/group) were randomly divided into blank control group, kidney injury group, EGCG low-, middle- and high-dose (25, 50 and 100 mg/kg) groups. The kidney injury group and the drug administration group were treated with 7.5 mg/kg cisplatin by intraperitoneal injection to build the kidney injury model, and the blank control group was intraperitoneally injected with normal saline. After fourteen days of administration, the general condition and morphological changes of kidney tissue by HE staining were observed; BUN, Cr, Cys-c contents in serum, and IL-18, KIM-1 contents in urine were detected by ELISA; MDA, GSH and T-SOD contents in renal cortex were determined by kit; Western blot method was used to determine the contents of Nrf2 protein in renal cortex cytoplasm and nucleus, and the expression level of HO-1 protein. **RESULTS** EGCG intervention could improve the pathological structural changes of rat kidney injury induced by cisplatin, decrease kidney index, and decrease serum Cr, Cys-c contents and urine IL-18, KIM-1 contents. Moreover, renal cortex MDA concentration decreased, and renal cortex GSH concentra-

收稿日期: 2017-03-07

基金项目: 辽宁省教育厅一般科学基金项目(L2014322); 中国博士后科学基金项目(2015M571251); 锦州医科大学横向课题(LY-HX2013033)

作者简介: 王凤仙(1988—),女,硕士生,从事中药药理及毒理研究。Tel: 17704161756, E-mail: wangfengxian0109@163.com

\*通信作者: 代春美(1977—),女,博士,教授,从事中药药理及毒理研究。Tel: 139416708016, E-mail: 916759222@qq.com

tion, T-SOD activity increased. At the same time, renal cortex cytoplasm Nrf2 content reduced, but nucleus Nrf2 and total cell HO-1 contents increased. **CONCLUSION** EGCG plays a role in the improvement of rat kidney injury induced by cisplatin through the activation of Nrf2/HO-1 signal pathway.

**KEY WORDS:** epigallocatechin gallate; cisplatin; kidney injury; Nrf2/HO-1 signal pathway

顺铂临床效果显著, 价格低廉, 但同时也有广泛的毒副作用, 肾毒性、耳毒性、血液毒性、神经毒性显著, 正成为人们关注热点之一。氧化应激损伤可能是顺铂肾毒性的主要原因之一, 具体表现为顺铂诱发肾损伤的同时可引起脂质过氧化产物浓度增加、抗氧化酶的浓度降低或活性下降等<sup>[1-2]</sup>。在临床中, 通过检测 BUN、Cr 反应肾脏功能的整体变化, 检测 Cys-c 反应肾小球滤过功能及检测 IL-18、KIM-1 来反应肾小管功能的损伤<sup>[3-7]</sup>。

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)广泛存在于绿茶、五倍子、没食子、大黄、柯子等植物, 富含酚羟基, 有非常显著的抗氧化功能。药理研究表明, EGCG 可通过清除体内各种自由基、抑制活性氧的形成、抑制 NO 合成、增强抗氧化酶活性等发挥抗氧化作用, 此外, 还有抗炎、抗癌变等活性<sup>[8-9]</sup>。顺铂对肾脏的损伤与氧化应激相关, EGCG 的化学结构中有酚羟基, 是具有抗氧化作用的基团。目前, 对于顺铂造成的氧化应激肾损伤, EGCG 是否具有保护作用还不清楚。机体受到氧化应激刺激, 产生过剩的活性氧等亲电性物质, 可以激活 Nrf2/ARE (抗氧化反应元件) 信号通路, 诱导抗氧化应激基因激活, 发挥内源性抗氧化应激作用, 使机体适应氧化应激状态, 恢复正常功能<sup>[10-11]</sup>。其下游的血红素氧合酶 1 (HO-1) 基因在大多数组织以低水平表达, 是机体中重要的可诱导酶, 不仅可以促进血红素降解, 还具有抗氧化应激、抗炎、抗凋亡等生物作用<sup>[12]</sup>。基于以上认识, 本实验选择 EGCG (含有量大于 95% 单体) 对大鼠肾损伤的保护作用进行研究, 考察其对肾损伤大鼠的肾功能恢复、肾指数恢复、肾组织病理恢复的影响, 并从分子水平探讨 EGCG 对大鼠肾损伤改善作用与 Nrf2/HO-1 信号蛋白表达关系的可能机制。

## 1 实验材料与方法

1.1 药物与试剂 EGCG (含有量 >95%, 批号 20140426, 宁波禾普生物科技有限公司); 顺铂 (批号 307026CF, 齐鲁制药有限公司); BUN 试剂盒 (批号 20140501)、Cr 试剂盒 (批号 20140422) (南京建成生物工程研究所有限公司); Cys-c 试剂盒 (批号 20140420)、KIM-1 试剂盒 (批号

20140425)、IL-18 试剂盒 (批号 20140425) (武汉优尔生科技股份有限公司); 兔抗鼠 Nrf2 抗体 (批号 20140512)、HO-1 抗体 (批号 20140520) 购于北京博奥森生物技术有限公司。β-Actin 抗体、兔二抗、鼠二抗、总蛋白提取试剂盒及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 20140525), 购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 胞浆/胞核蛋白提取试剂盒 (批号 20140428, 碧云天生物技术研究所)。

1.2 动物模型与分组 50 只雄性 SD 大鼠, 4~6 周龄, 体质量 180~200 g, 由锦州医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK (辽) 2014-0004。50 只 SD 雄性大鼠 (10 只/组), 按体质量随机分为空白对照组, 肾损伤组, EGCG 25、50、100 mg/kg 不同剂量干预组, 后 4 组一次性腹腔注射顺铂 7.5 mg/kg 制备肾损伤模型<sup>[13]</sup>, 空白对照组腹腔注射等体积生理盐水。造模当日, EGCG 不同剂量干预组灌胃给药, 空白对照组和肾损伤组灌胃同体积生理盐水, 连续给药 14 d<sup>[14]</sup>。

1.3 仪器 725 N UV1800 型分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); GENIOSPLoS 型功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); Mirofuge 20 R 型低温高速离心机 (美国 Thermo Fisher); RM 2235 型石蜡切片机 (德国 Leica); ChemTron KSW 型光学显微镜 (德国 Leica); EC3 型凝胶图像分析系统和凝胶电泳仪 (美国 Bio-Rad)。

## 1.4 检测指标与方法

1.4.1 大鼠肾指数测定 雄性 SD 大鼠最后一次灌胃给药后放入代谢笼中, 禁食自由饮水, 收集 12 h 尿液, 4℃、2 000 r/min 离心 10 min, 将分离的上清标本分装于 0.5 mL EP 管中, 于 -80℃ 冰箱冻结保存待用, 从采集尿液到样本冻存在 30 min 之内完成。至所有样本统一测定前, 将冻存尿液样本置于室温中融化, 避免反复冻融。称定体质量, 腹腔注射 20% 乌拉坦, 按 0.5 mL/100 g 体质量麻醉。眼静脉丛取血, 室温静置 2 h, 4℃、4 000 r/min 离心 10 min, 取上清置于 -80℃ 冰箱保存, 用于生化指标测定。取肾脏, 剪去器官周围组织及血管, 冰生理盐水洗净残血, 滤纸吸干后分别称定记录肾脏质量, 计算相应肾指数 (肾指

数 = 肾脏质量/体质量 × 1 000)。取部分肾组织放于4%多聚甲醛中用于HE染色,其余肾脏组织分离出肾皮质置于-80℃冰箱保存,用于Western blot实验和其它实验。

#### 1.4.2 大鼠肾组织形态学观察及病理半定量分析

4%中性多聚甲醛固定部分大鼠肾组织24 h后,用梯度酒精脱水,二甲苯透明处理,浸蜡,包埋,制备4 μm厚度石蜡切片。进行常规HE染色,中性树脂封片,光学显微镜(10×40)下观察分析各组大鼠肾脏组织病理变化。

病理半定量评分标准参照任强<sup>[15]</sup>等方法。1分:小球基底膜及间质轻度增生,小管上皮细胞轻度水肿,少量管型,小灶性坏死,少量炎细胞浸润。2分:小球基底膜及间质增生较明显,弥漫性小管上皮细胞中度水肿,较多管型,明显炎细胞浸润。3分:小球基底膜及间质明显增生,弥漫性小管上皮细胞重度水肿,大量管型,弥漫性炎细胞浸润。

#### 1.4.3 大鼠血清BUN、Cr、Cys-c、尿液IL-18、KIM-1含有量测定

取“1.4.1”项下冻存的血清、尿液,严格按照ELISA试剂盒说明书操作,酶标仪检测波长为640 nm (BUN)、510 nm (Cr)、450 nm (Cys-c、IL-18、KIM-1),样品稀释液孔调零,测定各孔吸光度,绘制标准曲线。

#### 1.4.4 大鼠肾皮质MDA、GSH含有量和T-SOD活性测定

取“1.4.1”项下冻存的大鼠肾皮质,精密称取质量,按质量:体积=1:9的比例,加入9倍生理盐水制成10%肾皮质匀浆,2 500 r/min离心10 min,取上清液待测,严格按照MDA、GSH含有量测定和T-SOD活性检测试剂盒说明书操作。检测波长:MDA 532 nm, GSH 405 nm, T-SOD 550 nm。双蒸水调零,测定吸光度。

#### 1.4.5 大鼠肾皮质胞浆Nrf2、胞核Nrf2和肾皮质HO-1蛋白表达测定

取冻存的大鼠肾皮质组织约100 mg,加入1 mL蛋白匀浆缓冲液,用前加入1% PMSF混匀,冰上匀浆操作,12 000 r/min、4℃、离心30 min后取上清,提取大鼠全细胞蛋白。另称取冻存的大鼠肾皮质0.1 g,加入新鲜配制的胞浆/胞核提取组织匀浆液330 μL,剪碎,并在玻璃匀浆器内充分匀浆(需在冰浴或4℃下),严格按照胞浆/胞核蛋白提取试剂盒操作说明进行,提取大鼠肾皮质胞浆、胞核蛋白。BCA法进行蛋白含有量测定,制样,灌10%分离胶、5%浓缩胶,上样,进行SDS-PAGE电泳。浓缩胶电压80 V,分离胶电压110 V,半干法将蛋白质转移到

聚偏二氟乙烯膜上,恒压电泳15 V,室温20 min。BSA封闭1 h, TBST洗膜,加入1:500一抗,4℃孵育过夜, TBST洗膜后加入1:2 500二抗,室温下摇床杂交2 h, TBST洗膜后加显色剂显影,上机检测,分析结果。

#### 1.4.6 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行分析,数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间显著性检验采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 EGCG对大鼠一般生长状态的影响

空白对照组大鼠生长良好,毛顺色亮,活动敏捷,体质量稳定增长;肾损伤组大鼠在顺铂造模后2~3 d多数呈现饮食活动减少、精神迟钝、身体消瘦、弓背蜷曲、毛色失光等症状,体质量增长缓慢;EGCG 25 mg/kg组大鼠给药后也出现上述症状,体质量增长缓慢,与肾损伤组出现时间及症状程度相当;EGCG 50、100 mg/kg组给药后,大鼠摄食量减少、毛色失光症状的出现时间延迟和程度减轻。

#### 2.2 EGCG对大鼠肾脏组织形态学的影响

由图1和表1可见,空白对照组大鼠肾组织结构正常;肾损伤组全部大鼠肾脏皮髓交界处呈现程度不等的局部肾小管扩张,许多肾小管上皮细胞变性甚至坏死脱落,肾小管基底膜裸露,肾小管腔内有大量红染但无结构的颗粒状物质,较多肾小管腔内有蛋白管型<sup>[2]</sup>,且肾损伤组大鼠肾小球囊腔变大。与空白对照组比较,肾损伤组大鼠肾小球囊腔增大,病理改变显著( $P < 0.01$ );与肾损伤组比较,EGCG 25 mg/kg组肾组织染色结果未见明显改善( $P > 0.05$ ),50、100 mg/kg组显著改善( $P < 0.01$ ),肾小管上皮细胞变性、坏死脱落和基底膜裸露情况减轻,肾小管腔内红染无结构的颗粒状物质和蛋白管型减少。

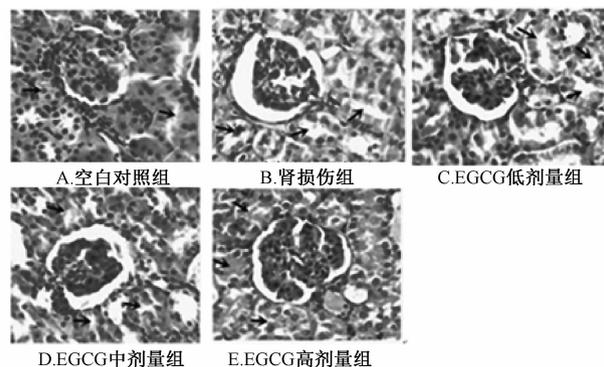


图1 EGCG对大鼠肾脏组织形态学的影响(HE, ×400)  
Fig. 1 Effect of EGCG on kidney tissue morphology of rats (HE, ×400)

**表1 EGCG 对大鼠肾损伤半定量分析评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )**

**Tab. 1 Effect of EGCG on semi quantitative analysis score of kidney injury in rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )**

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	评分/分
空白对照组	-	0.00 ± 0.00
肾损伤组	-	2.90 ± 0.32 <sup>##</sup>
EGCG 低剂量组	25	2.60 ± 0.52
EGCG 中剂量组	50	1.80 ± 0.42 <sup>**</sup>
EGCG 高剂量组	100	1.10 ± 0.32 <sup>**</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与肾损伤组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

**表2 EGCG 对大鼠体质量、肾质量、肾指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )**

**Tab. 2 Effects of EGCG on body weight, kidney weight and kidney index of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )**

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g	肾质量/g	肾指数/(g·kg <sup>-1</sup> )
空白对照组	-	296.80 ± 12.65	1.85 ± 0.21	6.21 ± 0.59
肾损伤组	-	179.70 ± 10.89 <sup>##</sup>	2.23 ± 0.31 <sup>#</sup>	12.40 ± 1.61 <sup>##</sup>
EGCG 低剂量组	25	193.00 ± 11.40	2.02 ± 0.18	10.48 ± 0.87 <sup>*</sup>
EGCG 中剂量组	50	220.90 ± 19.10 <sup>**</sup>	2.02 ± 0.46	9.17 ± 2.06 <sup>**</sup>
EGCG 高剂量组	100	236.90 ± 21.30 <sup>**</sup>	2.08 ± 0.53	8.83 ± 2.24 <sup>**</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与肾损伤组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

**2.4 EGCG 对大鼠血清 BUN、Cr 含有量的影响**  
由表3可见,与空白对照组比较,肾损伤组大鼠血清 BUN 含有量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,EGCG 各给药组 BUN 含有量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。与空白对照组比较,肾损伤组大鼠血清 Cr 含有量显著升高 ( $P < 0.01$ );与肾损伤组比较,EGCG 25、50 mg/kg 组大鼠血清 Cr 含有量显著降低 ( $P < 0.05$ ),100 mg/kg 组极显著降低 ( $P < 0.01$ )。

**2.5 EGCG 对大鼠血清 Cys-c 和尿液 IL-18、KIM-1 含有量的影响**  
由表4可见,与空白对照组比较,肾损伤组大鼠血清 Cys-c 和尿液 IL-18、KIM-1 含有量显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与肾损伤组比较,EGCG 25、50 mg/kg 组大鼠血清 Cys-c 含有量显著降低 ( $P < 0.05$ ),100 mg/kg 组极显著降低

( $P < 0.01$ );EGCG 100 mg/kg 组大鼠尿液中 IL-18 含有量显著降低 ( $P < 0.05$ );EGCG 25、50、100 mg/kg 组大鼠尿液中 KIM-1 含有量显著降低 ( $P < 0.05$ )。

**表3 EGCG 对大鼠血清 BUN、Cr 含有量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )**

**Tab. 3 Effects of EGCG on serum BUN and Cr contents in rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )**

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	BUN/(mmol·L <sup>-1</sup> )	Cr/( $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> )
空白对照组	-	6.77 ± 1.98	46.49 ± 7.10
肾损伤组	-	29.93 ± 2.31 <sup>##</sup>	206.25 ± 46.44 <sup>##</sup>
EGCG 低剂量组	25	29.22 ± 1.20	130.30 ± 56.94 <sup>*</sup>
EGCG 中剂量组	50	25.96 ± 4.96	123.10 ± 83.72 <sup>*</sup>
EGCG 高剂量组	100	26.78 ± 8.74	84.46 ± 32.16 <sup>**</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与肾损伤组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

**表4 EGCG 对大鼠血清 Cys-c 和尿液 IL-18、KIM-1 含有量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )**

**Tab. 4 Effects of EGCG on serum Cys-c, urine IL-18 and urine KIM-1 contents in rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )**

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	Cys-c/(ng·mL <sup>-1</sup> )	IL-18/(pg·mL <sup>-1</sup> )	KIM-1/(pg·mL <sup>-1</sup> )
空白对照组	-	0.95 ± 0.03	16.29 ± 5.50	503.54 ± 82.99
肾损伤组	-	1.49 ± 0.05 <sup>##</sup>	29.07 ± 4.90 <sup>##</sup>	1 911.98 ± 856.36 <sup>##</sup>
EGCG 低剂量组	25	1.12 ± 0.44 <sup>*</sup>	21.90 ± 5.65	1 638.83 ± 76.35 <sup>*</sup>
EGCG 中剂量组	50	1.12 ± 0.10 <sup>*</sup>	21.89 ± 8.12	1 609.52 ± 91.93 <sup>*</sup>
EGCG 高剂量组	100	1.10 ± 0.04 <sup>**</sup>	18.13 ± 1.69 <sup>*</sup>	1 572.86 ± 329.67 <sup>*</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与肾损伤组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

**2.6 EGCG 对大鼠肾皮质 MDA、GSH 含有量和 T-SOD 活性的影响**  
由表5可见,与空白对照组比较,肾损伤组大鼠肾皮质 MDA 含有量极显著升高

( $P < 0.01$ ),GSH 含有量和 T-SOD 活性极显著降低 ( $P < 0.01$ );与肾损伤组比较,EGCG 50、100 mg/kg 组大鼠肾皮质 MDA 含有量显著降低 ( $P < 0.05$ ),50、

100 mg/kg 组大鼠肾皮质 GSH 含有量显著升高 ( $P < 0.05$ ); EGCG 100 mg/kg 组大鼠肾皮质 T-SOD 活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。

表 5 EGCG 对大鼠肾皮质 MDA、GSH 含有量和 T-SOD 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 5 Effects of EGCG on MDA, GSH contents and T-SOD activity in the renal cortex of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg prot <sup>-1</sup> )	GSH/(μmol·g prot <sup>-1</sup> )	T-SOD/(U·mg prot <sup>-1</sup> )
空白对照组	-	2.28 ± 0.80	377.48 ± 129.41	217.67 ± 40.26
肾损伤组	-	3.84 ± 1.05 <sup>##</sup>	205.95 ± 29.91 <sup>##</sup>	168.69 ± 15.44 <sup>##</sup>
EGCG 低剂量组	25	3.53 ± 1.00	212.91 ± 70.21	173.04 ± 28.77
EGCG 中剂量组	50	2.95 ± 0.63 <sup>*</sup>	244.78 ± 46.44 <sup>*</sup>	193.07 ± 35.33
EGCG 高剂量组	100	2.73 ± 0.73 <sup>*</sup>	273.74 ± 69.89 <sup>*</sup>	207.84 ± 29.16 <sup>*</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与肾损伤组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$

2.7 EGCG 对大鼠肾皮质胞浆 Nrf2、胞核 Nrf2 和肾皮质 HO-1 蛋白表达相对含有量的影响 由表 6 和图 2 可见,与空白对照组比较,肾损伤组大鼠肾皮质 HO-1 和胞浆 Nrf2 蛋白表达的相对含有量极显著升高 ( $P < 0.01$ ),胞核 Nrf2 蛋白表达的相对含有量显著升高 ( $P < 0.05$ );与肾损伤组比较,

EGCG 100 mg/kg 组大鼠肾皮质胞浆 Nrf2 含有量显著降低 ( $P < 0.05$ ),50、100 mg/kg 组极显著升高 ( $P < 0.01$ );EGCG 50 mg/kg 组大鼠肾皮质总细胞 HO-1 含有量显著升高 ( $P < 0.05$ ),100 mg/kg 组极显著升高 ( $P < 0.01$ )。

表 6 EGCG 对大鼠肾皮质胞浆 Nrf2、胞核 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达相对含有量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Tab. 6 Effects of EGCG on the relative contents of cytoplasm Nrf2, nucleus Nrf2 and HO-1 protein expressions in the renal cortex of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	肾皮质胞浆 Nrf2	肾皮质胞核 Nrf2	肾皮质 HO-1
空白对照组	-	0.14 ± 0.03	0.97 ± 0.04	1.23 ± 0.13
肾损伤组	-	0.23 ± 0.05 <sup>##</sup>	1.14 ± 0.06 <sup>#</sup>	1.47 ± 0.15 <sup>##</sup>
EGCG 低剂量组	25	0.22 ± 0.01	1.16 ± 0.05	1.53 ± 0.06
EGCG 中剂量组	50	0.20 ± 0.04	1.25 ± 0.03 <sup>**</sup>	1.64 ± 0.09 <sup>*</sup>
EGCG 高剂量组	100	0.19 ± 0.04 <sup>*</sup>	1.35 ± 0.07 <sup>**</sup>	1.85 ± 0.14 <sup>**</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与肾损伤组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

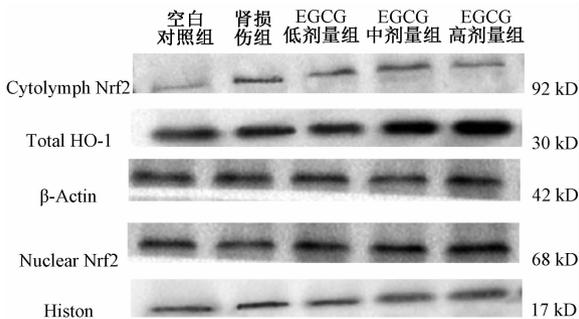


图 2 EGCG 对大鼠肾皮质胞浆 Nrf2、胞核 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达相对含有量的影响

Fig. 2 Effects of EGCG on the relative contents of cytoplasm Nrf2, nucleus Nrf2 and HO-1 protein expressions in the renal cortex of rats

### 3 讨论

本实验通过腹腔注射顺铂建立大鼠肾损伤模型,检测大鼠血清中 BUN、Cr、Cys-c 含有量,尿液中 IL-18、KIM-1 含有量以评价肾功能。结果,与肾损伤组比较,EGCG 25、50 mg/kg 组大鼠血清

中 Cr 含有量显著降低,100 mg/kg 组极显著降低;EGCG 100 mg/kg 组大鼠血清中 Cys-c、尿液中 IL-18、KIM-1 含有量显著降低,表明 EGCG 对顺铂诱导的大鼠肾损伤具有一定改善作用。

EGCG 可以通过清除体内各种自由基、抑制活性氧形成、抑制 NO 合成、增强抗氧化酶活性等方面起到抗氧化作用<sup>[9]</sup>。机体处于氧化应激状态时,机体通过活化一些特异的转录因子(如 Nrf2)对机体进行保护;机体受到氧化应激刺激时,产生的过剩活性氧等亲电物质诱导 Keap-1 蛋白发生分子构象变化而释放 Nrf2,启动具 ARE 序列的经典抗氧化酶基因血红素氧合酶(HO-1)、醌氧化还原酶(NQO1)、过氧化氢酶等,使机体更适于氧化应激状态。本实验检测 EGCG 对肾损伤大鼠肾皮质中 MDA、GSH 浓度、T-SOD 活性的影响,研究 EGCG 对肾损伤大鼠氧化应激水平及抗氧化能力的影响,检测 EGCG 对肾损伤大鼠肾皮质中胞浆、胞核内 Nrf2 蛋白及其下游调控的肾皮质抗氧化蛋白 HO-1 的表达水平的影响,研究 EGCG 对肾损伤大鼠抗氧化应激通路 Nrf2/HO-1 的影响。与肾损伤组比较,

EGCG 100 mg/kg 组中大鼠肾皮质中MDA 含有量降低, 抗氧化酶体系 GSH 含有量和 SOD 活性升高, 提示 EGCG 能降低肾损伤大鼠氧化应激水平, 提高其抗氧化能力; EGCG 100 mg/kg 组中大鼠肾皮质中胞浆 Nrf2 含有量降低, 其机制可能与 EGCG 抗氧化能力有关, 清除肾组织自由基, 胞浆中的含有量因而降低; EGCG 100 mg/kg 组中大鼠肾皮质中胞核内 Nrf2 蛋白及其下游调控的抗氧化蛋白 HO-1 的相对含有量升高, 提示 EGCG 可能通过激活细胞内源性 Nrf2/HO-1 抗氧化通路, 发挥对顺铂诱导的大鼠肾损伤的保护作用。此外, 许多能激活 Nrf2/ARE 通路的天然产物先后被发现, 如姜黄素、七叶苷、五味子乙素等能通过激活 Nrf2, 诱导其下游靶基因酶而对抗氧化应激损伤<sup>[16-17]</sup>, 具体机制可能为 EGCG 一方面可以依靠其强大的抗氧化能力直接清除机体过量的自由基与活性氧, 另一方面 EGCG 激活了 Nrf2/ARE 通路, 通过诱导 II 相解毒酶和抗氧化酶的表达增强机体自身的抗氧化能力<sup>[18-20]</sup>。

综上所述, 本研究从分子水平探讨 EGCG 对大鼠肾损伤改善作用与 Nrf2/HO-1 信号蛋白表达关系的可能机制, 对阐述 EGCG 及含有该成分中药的抗肾损伤作用及联合化药的增效减毒作用具有一定意义。

#### 参考文献:

[ 1 ] 高丽萍, 马润宇, 周俊波. 顺铂诱导肾性贫血大鼠模型的建立[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(4): 459-460.  
[ 2 ] 霍文谦. KIM-1 在肾小管上皮细胞缺氧损伤中的保护作用及 HIF-1 信号通路调节[D]. 重庆: 第三军医大学, 2011.  
[ 3 ] 于敏, 张双庆, 李佐刚. 早期肾损伤生物标志物的研究进展及其在药物肾毒性早期预测中的应用[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(4): 247-252.  
[ 4 ] Endre Z H, Pickering J W. New markers of acute kidney injury: giant leaps and baby steps[J]. *Clin Biochem Rev*, 2011, 32(2): 121-124.  
[ 5 ] Parikh C R, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(4 Suppl): S159-S165.  
[ 6 ] Stevens L A, Schmid C H, Greene T, et al. Factors other than

glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(6): 652-660.  
[ 7 ] Parikh C R, Jani A, Melnikov V Y, et al. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 43(43): 405-414.  
[ 8 ] 覃鲁珊, 赵海平, 赵艳玲, 等. 大黄蒽醌与鞣质对大鼠肝脏的保护和损伤双向作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(6): 698-703.  
[ 9 ] 张媛媛. EGCG 通过减轻氧化应激与抑制 NALP 3 炎性体对阿霉素肾病有保护作用[D]. 重庆: 第三军医大学, 2014.  
[ 10 ] Wu Y W, Ouyang J, Xiao X H, et al. Antimicrobial properties and toxicity of anthraquinones by microcalorimetric bioassay[J]. *Chin J Chem*, 2006, 24(1): 45-50.  
[ 11 ] Maines M D. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37(37): 517-554.  
[ 12 ] Cooper K L, Liu K L. Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: contribution of NADPH oxidase[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(4): 381-388.  
[ 13 ] 杨佳梅, 刘妍, 张金晓, 等. 肾损伤分子 1 对顺铂诱导的大鼠急性肾损伤的预测研究[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 150-154.  
[ 14 ] Sahin K, Tuzcu M, Gencoglu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats[J]. *Life Sci*, 2010, 87(7-8): 240-245.  
[ 15 ] 任强, 岑国栋, 高永翔. 雷公藤多苷诱导大鼠肾细胞凋亡的 NF- $\kappa$ B 信号转导通路机制研究[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(2): 39-44.  
[ 16 ] 赵钰, 刘素雁, 李春媚, 等. 卡维地洛的抗氧化作用对顺铂肾损伤的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2008, 42(1): 63-66.  
[ 17 ] 李梅, 金晶, 李佳, 等. 五味子乙素激活 Nrf2/ARE 通路对顺铂致 HK-2 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 药学报, 2012, 47(11): 1434-1439.  
[ 18 ] Tkachev V O, Menshchikova E B, Zenkov N K. Mechanism of the Nrf2/Keap 1/ARE signaling system [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2011, 76(4): 407-422.  
[ 19 ] Na H K, Surh Y J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(4): 1271-1278.  
[ 20 ] 韩知峡. EGCG 拮抗微囊藻毒素 LR 诱导小鼠肝细胞氧化损伤以及 I 相酶、II 相酶、Nrf2 参与作用研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2010.