

辣木叶多糖通过TLR4/NF-κB信号通路减轻横纹肌溶解致急性肾损伤

黄开兰¹, 张明¹, 卢娟², 田洋^{1*}, 白忠彬^{3*}, 马啸^{1,2*}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 云南农业大学云南省高原特色农业产业研究院, 云南昆明 650201) (3. 云南农业大学动物医学院, 云南昆明 650201)

摘要: 为了探究辣木叶多糖 (*Moringa oleifera* Leaf Polysaccharide, MLP) 对横纹肌溶解致急性肾损伤 (RM-AKI) 的保护作用, 并探索其潜在的作用机制。本研究通过建立小鼠 RM-AKI 模型和亚铁肌红蛋白诱导的肾小管上皮细胞 (HK-2) 损伤模型, 使用生化试剂盒检测小鼠血清中肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN)、肌酸激酶 (CK) 以及肾脏组织中细胞因子 (IL-1β、IL-6、TNF-α) 的水平变化。此外, 采用 HE 和 TUNEL 染色评估肾脏组织的病理学变化和细胞凋亡情况, Western blot 分析肾组织及 HK-2 细胞中相关蛋白的表达。结果显示, 与模型组相比, 高剂量 MLP 处理的小鼠 Cr、BUN、CK、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平分别下降了 67.87%、43.03%、21.39%、31.05%、54.20% 和 51.66% ($P<0.001$)。同时, 肾小管上皮细胞的凋亡显著抑制, 并有效降低了亚铁肌红蛋白诱导的 HK-2 细胞中的氧化应激水平。MLP 显著下调了体内 TLR4、P-p65/p65 以及 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达。上述结果表明, MLP 对横纹肌溶解致急性肾损伤具有明显的保护作用, 为 RM-AKI 患者的临床治疗提供了科学依据。

关键词: 辣木叶多糖; 横纹肌溶解; 急性肾损伤; TLR4/NF-κB 信号通路; 氧化应激

文章编号: 1673-9078(2026)04-22-31 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.4.0049

Moringa oleifera Leaf Polysaccharide Alleviates Acute Renal Injury Induced by Rhabdomyolysis via TLR4/NF-κB Signaling Pathway

HUANG Kailan¹, ZHANG Ming¹, LU Juan², TIAN Yang^{1*}, BAI Zhongbin^{3*}, MA Xiao^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2. Yunnan Plateau Characteristic Agricultural Industry Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China) (3. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the protective effects of *Moringa oleifera* leaf polysaccharide (MLP) on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (RM-AKI) and the potential mechanisms of such effects. A mouse RM-AKI model and a ferrous myoglobin-induced injury model were established in renal tubular epithelial cells (HK-2). Biochemical kits were used to

引文格式:

黄开兰,张明,卢娟,等.辣木叶多糖通过TLR4/NF-κB信号通路减轻横纹肌溶解致急性肾损伤[J].现代食品科技,2026, 42(4):22-31.

HUANG Kailan, ZHANG Ming, LU Juan, et al. *Moringa oleifera* leaf polysaccharide alleviates acute renal injury induced by rhabdomyolysis via TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(4): 22-31.

收稿日期: 2025-01-10 ; 修回日期: 2025-02-27 ; 接受日期: 2025-02-28

基金项目: 云南省科技计划项目 - 农业联合专项 (202301BD070001-195); 云南省兴滇英才青年人才专项 (YNWR-QNBJ2018-173)

作者简介: 黄开兰 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品功效研究, E-mail : 3121442046@qq.com

通讯作者: 马啸 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品, E-mail : maxiao.ynau@qq.com ; 共同通讯作者: 白忠彬 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品, E-mail : baizhongbin69@163.com ; 田洋 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品, E-mail : tianyang1208@163.com

measure the levels of creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), and creatine kinase (CK) in mouse serum, as well as cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) in kidney tissue. Furthermore, hematoxylin and eosin staining and TUNEL staining were used to evaluate pathological changes and apoptosis in kidney tissue. Western blotting was performed to evaluate the expression of key proteins in both kidney tissue and HK-2 cells. The results revealed that, compared with the model group, the levels of Cr, BUN, CK, IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the high-dose MLP-treated mice decreased by 67.87%, 43.03%, 21.39%, 31.05%, 54.20%, and 51.66%, respectively ($P<0.001$). In addition, HK-2 apoptosis was significantly inhibited, and oxidative stress levels notably decreased in ferrous myoglobin-induced HK-2 cells. A significant downregulation in the expression of TLR4, P-p65/p65, and cleaved caspase-3, both *in vivo* and *in vitro*, was observed after MLP treatment. These results indicate that MLP has a significant protective effect on RM-AKI, which provide a scientific basis for the clinical treatment of patients with RM-AKI.

Key words: *Moringa oleifera* leaf polysaccharide; rhabdomyolysis; acute kidney injury; TLR4/NF- κ B signaling pathway; oxidative stress

急性肾损伤 (AKI) 是一种进展迅速的肾脏疾病, 主要表现为肾小管损伤等, AKI 的发病机制复杂, 涉及缺血、梗阻、毒性损伤和感染等多种致病因素^[1]。其中, 败血症是引发 AKI 的主要原因之一^[2], 而脂多糖 (LPS) 在败血症引起的 AKI 发病机制中发挥着关键作用^[3]。线粒体损伤会导致活性氧 (ROS) 过量产生, 并通过氧化修饰蛋白质、脂质和核酸, 进而诱发细胞损伤^[4]。横纹肌溶解症常引发多种并发症^[5], 其中急性肾损伤 (RM-AKI) 是最为危急的一种^[6]。RM-AKI 的典型特征是血清肌酐水平的迅速升高^[7]。在严重情况下, 患者可能需要接受血浆置换或透析治疗, 而这两种治疗方法不仅费用高昂, 还可能导致住院时间延长。因此, 探索天然且具有药食同源特性的食品用于治疗或预防 AKI, 显得尤为重要。

辣木 (*Moringa oleifera* Lam.) 是一种多年生的热带落叶树, 属于辣木科 (Moringaceae)。这种植物广泛分布于热带和亚热带地区, 以其多种营养和药用价值而著称^[8]。辣木的叶子是其主要食用部分之一, 富含多种营养物质且热量低, 成为理想的食物添加剂^[9]。2012 年, 中国卫生部正式将辣木叶批准为新型食品, 这一举措进一步确认了辣木叶在营养方面的潜力与价值^[10]。同时还含有一系列具有生物活性的化合物, 如酚类化合物、葡萄糖异硫氰酸盐、异硫氰酸酯、类胡萝卜素和生物碱等^[11,12]。辣木叶因其显著的药用价值, 如抗氧化、抗炎及肝脏保护作用^[13-16]。研究表明, 辣木叶提取物对氯化钴引起的肾脏损伤具有显著的预防作用^[17]。并在清除自由基方面表现出显著效果, 从而为肾脏提供抗氧化保护作用^[18]。然而, 关于辣木叶多糖在治疗横纹肌溶解症引起的急性肾损伤中的作用研究仍显不足。本研究使用甘油肌肉注射诱导的小鼠 AKI 模型和体外亚铁肌红蛋白诱导的肾小管上皮细胞 (HK-2) 模型, 探讨了不同剂量辣木叶多糖 (MLP) 的保护效果, 并深入分析其潜在的作用机制。研究旨

在深入探讨辣木叶的健康益处, 并为其实际应用提供科学支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物与细胞

实验中使用的 C57/BL6J 小鼠 (雄性, 8 周龄, 体质量 18~21 g, $n=40$), 由河南斯科贝斯生物科技有限公司提供 (许可证号: SCXKK2020-0005)。所有小鼠饲养在云南农业大学实验动物中心, 环境为无病原、温控条件, 并设有 12 h 光暗循环。小鼠自由饮水, 提供颗粒饲料。所有实验操作严格遵循中国实验动物使用与护理相关法规, 并符合云南农业大学实验动物研究所制定的指导方针, 已获得云南农业大学动物保护与使用委员会的批准 (伦理批准号为: 20240303)。

HK-2 细胞由云南省细胞工程有限公司提供。其培养基为 DMEM/F12, 添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素, 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中进行常规培养。

1.1.2 主要试剂

辣木叶多糖 (批号 MF2023071503), 沐凡生物科技有限公司; 甘油 (批号 CG5811), 北京酷来搏科技有限公司; 肌酐 (Cr, 货号 C011-2-1)、尿素氮 (BUN, 货号 C013-2-1)、肌酸激酶 (CK, 货号 A032-1-1), 南京南京建成生物工程研究所, 丙二醛 (MDA, 货号 BC0025)、谷胱甘肽 (GSH, 货号 BC1175)、过氧化氢 (CAT, 货号 BC0205)、超氧化物歧化酶 (SOD, 货号 BC0175), 北京索莱宝科技有限公司; 活性氧试剂盒 (ROS, 货号 S0033S), 碧云天; 肌红蛋白 (货号 M0630)、抗坏血酸, Sigma; IL-1 β 、IL-6、TNF- α (货号依次为 GEM0002、GEM0001、GEM0004)、

TUNEL 法试剂盒（货号 G1502）、组织固定液、脱蜡透明液，武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器

CX43 型光学生物显微镜，上海光学仪器厂；DYY-6D 型电泳仪型号，北京市六一仪器厂；Fluor Chem E 多功能酶标仪，美国分子设备公司；Leica DMil 型倒置显微镜，北京万泰恒通国际科贸有限公司；JS-780 型全自动成像分析系统，Proteinsimple；RM2016 型病理切片机，上海徕卡仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 横纹肌溶解致急性肾损伤

小鼠适应性饲养 7 d,随机将小鼠分为 5 组 ($n=6$),肌肉注射 50% 甘油的剂量为 10 mL/kg·BW, 实验动物分组与建模如表 1 所示, 造模 48 h 后收集小鼠肾脏和血液。

表 1 实验分组及周期

Table 1 Experimental grouping and period

组别	1~7 d	第 8 d
Con	灌胃蒸馏水	肌肉注射生理盐水
MLP-Con	灌胃 200 mg/kg·BW MLP	肌肉注射生理盐水
Mod	灌胃蒸馏水	肌肉注射 50% 甘油
L-MLP	灌胃 50 mg/kg·BW MLP	肌肉注射 50% 甘油
H-MLP	灌胃 100 mg/kg·BW MLP	肌肉注射 50% 甘油

1.2.2 亚铁肌红蛋白诱导肾小管上皮细胞凋亡模型

辣木叶多糖含量为 60%，其它化合物包括粗蛋白（6.80%）、总黄酮（13.55%）和其它未知化合物（19.65%）。MLP 母液质量浓度为 5 mg·mL⁻¹（溶于无菌水），待细胞贴壁后，弃去上清液，设置对照组、模型组及不同质量浓度的 MLP 处理组（12.50、25、50 μg·mL⁻¹）。亚铁肌红蛋白溶解于无血清培养基中，浓度分别为 200 μmol·mL⁻¹ (Mb)和 2 mmol·mL⁻¹ (Vc)^[19]。MLP 孵育 12 h，弃旧培养基加入亚铁肌红蛋白，继续培养 48 h，建立细胞损伤模型。

1.2.3 细胞中氧化应激水平的检测

细胞的 ROS 检测是根据碧云天试剂盒的使用说明进行的，使用 DCFH-DA 荧光探针，在 37 ℃下避光孵育 20 min，随后用 PBS 溶液洗涤 2 次，并通过荧光显微镜分析 ROS 水平。MDA、GSH、CAT 和 SOD 的检测则依据索莱宝试剂盒说明书操作。

1.2.4 肾功能、组织学和TUNEL的测定

为了评估肾功能，采用商业化试剂盒检测血清中的肾功能标志物，包括肌酸激酶（CK）、尿素氮

（BUN）和肌酐（Cr）。此外，研究还收集了固定的肾脏和肌肉组织，并进行了苏木精－伊红（H&E）染色。组织处理过程包括：首先进行水洗，然后依次进行梯度脱水、二甲苯透明化、石蜡包埋和切片，接着进行梯度酒精水化，最后完成染色并拍摄显微镜图像。

肾脏组织的急性小管坏死（ATN）评分根据坏死程度、小管扩张和管型形成进行评估，评分标准为 0 至 5，其中 0 表示无损伤，1 表示损伤<15%，2 表示损伤 15%~30%，3 表示损伤 31%~50%，4 表示损伤 51%~75%，5 表示损伤>75%。

将肾脏切片置于 65 ℃环境中孵育 1.5 h 后，按照试剂盒的操作说明进行 TUNEL 染色。利用显微镜在 200 倍放大倍率下观察凋亡细胞，DAB 染色反应可将凋亡细胞染成棕黄色。为进行半定量分析，每组通过随机选择 10 个视野，计数 TUNEL 阳性细胞的数量。

1.2.5 ELISA和免疫组织化学

为测定炎症因子（TNF-α、IL-6 和 IL-1β）表达水平,收集 50 mg 肾脏组织,用匀浆器在适量 PBS 中匀浆。根据试剂盒说明书测定炎症因子水平含量。

为了研究 TLR4 相关信号通路中蛋白质的表达水平，包括 TLR4、P-p65 和 Cleaved Caspase-3，肾脏组织切片依次进行：二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水、抗原修复、过氧化氢处理切片、PBS 洗涤、牛血清蛋白（BSA）封闭^[20]、一抗（稀释比例 TLR4 1:500、P-p65 1:100、Cleaved Caspase-3 1:500）孵育过夜、二抗孵育 1 h、PBS 洗涤后加入 DAB 显色液（1:1 000），显色反应完成后，用水终止反应并多次冲洗。苏木精复染，通过梯度酒精系列脱水后，用中性树胶封片。最后，进行显微观察并拍照。

1.2.6 Western blot 检测细胞及小鼠肾组织相关蛋白表达

使用 Bicinchoninic Acid（BCA）试剂盒测定各组小鼠肾组织和细胞中的蛋白浓度。将变性蛋白在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中分离后，转移至 PVDF 膜上。接着，使用 5% 的脱脂奶粉对膜进行封闭处理，并加入稀释后的 TLR4、P-p65、Cleaved Caspase-3、p65 和 β-Tubulin 一抗，在 4 ℃下孵育过夜。经过洗涤后，加入二抗并孵育 1 h。最后，利用成像系统显现蛋白条带，并通过 ImageJ 软件进行半定量分析。

1.2.7 数据分析

数据分析和绘图使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行处理。所有数据以均值 ± 标准差的形式呈现。对于多组间的比较，采用单因素方差分析，且当 *P* 值小于 0.05 时，认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 MLPRM-AKI小鼠肾脏组织病理学的影响

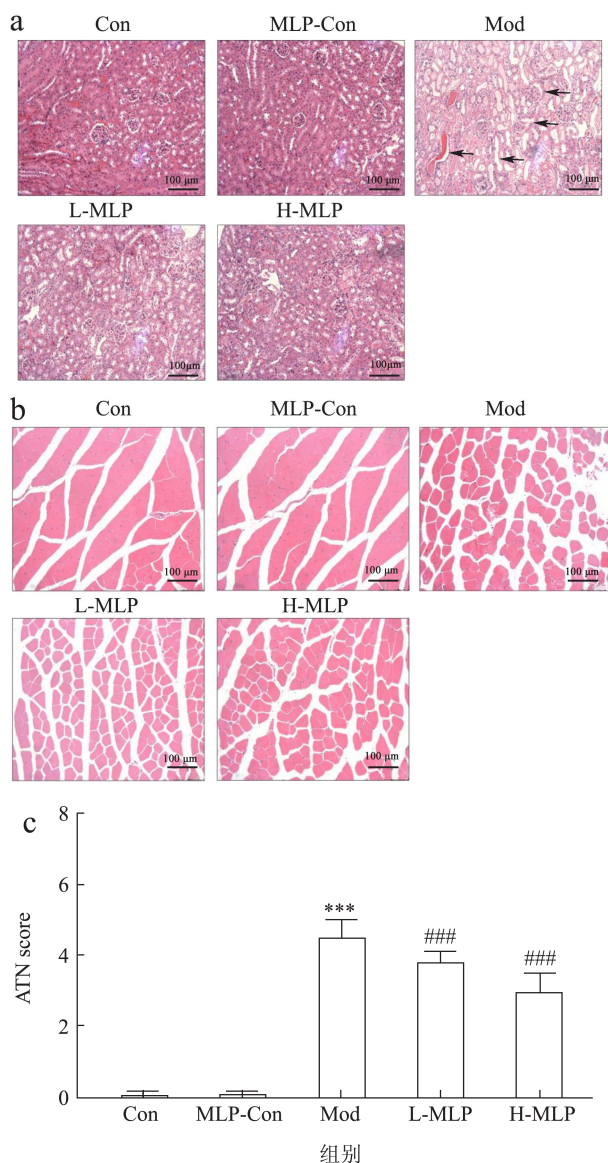


图1 MLP对RM-AKI小鼠肾脏和肌肉组织病理改变的影响

Fig.1 Effect of MLP on pathological changes of kidney and muscle tissue in RM-AKI mice

注: Con组相比, *** $P < 0.001$; 与Mod组相比, ### $P < 0.001$ 。下图同。

为进一步探讨辣木叶多糖(MLP)对肾脏损伤和横纹肌溶解的作用,通过H&E染色评估了其对病理组织的保护效果。如图1所示,肾脏H&E染色结果(图1a)表明,与Con相比,MLP-Con对肾脏没有显著的毒性作用。箭头标示的Mod小鼠则表现出明显的病理变化,观察到肾小管上皮细胞出现空泡变性,且小管内形成均质红色蛋白管型。此外,还发现小管腔扩张、间质水肿,鲍曼囊增厚以及肾小球萎缩的现

象。这些均为甘油诱导的严重肾脏损伤的典型特征。在L-MLP和H-MLP组中,蛋白管型形成、空泡变性、肾小球结构改变、小管扩张及间质水肿等病理变化得到了显著改善($P < 0.001$)。此外,图1b中显示的小鼠后肢肌肉组织的H&E染色结果表明,与Con组相比,Mod组小鼠的肌肉溶解现象明显。然而,MLP治疗显著缓解了甘油诱导的横纹肌溶解。

为了量化肾小管损伤,通过肾小管坏死、小管扩张和管型形成等评估标准来计算急性肾小管坏死(ATN)评分,如图1c所示Mod组的ATN评分比Con组的升高了4.5倍,而两个MLP治疗组的损伤得到了明显缓解。其ATN评分分别降低了14.54%和20.83%($P < 0.001$),这些结果表明,MLP对肾脏损伤具有显著的保护作用。

2.2 MLP对RM-AKI小鼠Cr、BUN和CK的影响

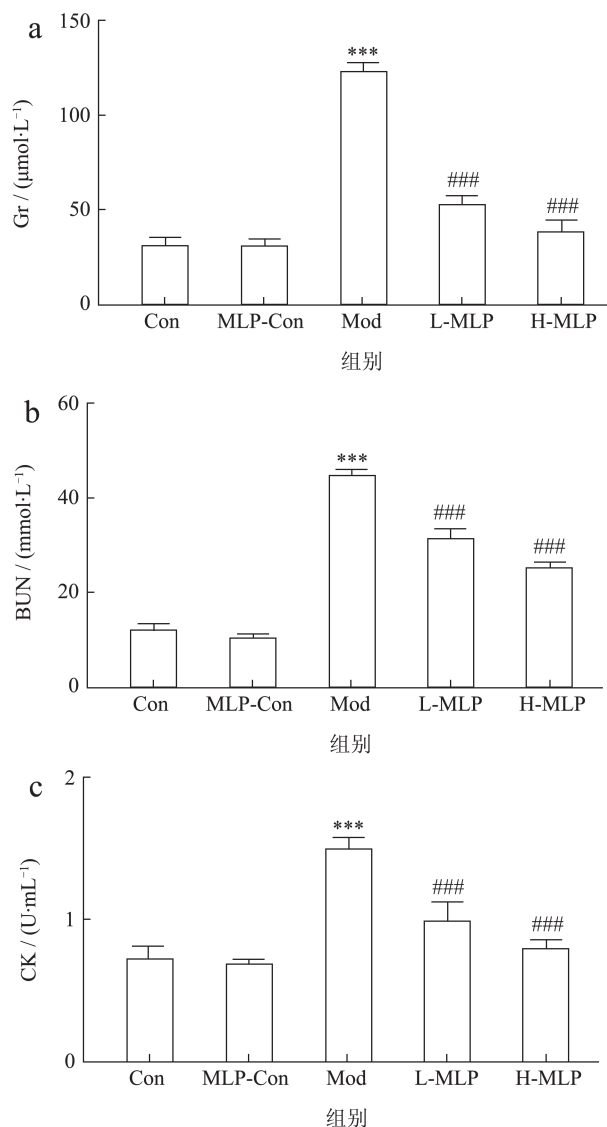


图2 MLP对RM-AKI小鼠Cr、BUN和CK的影响

Fig.2 Effects of MLP on Cr, BUN and CK in RM-AKI mice

肌酐 (Cr) 和血尿素氮 (BUN) 是评估肾功能的重要参数。肾功能受损时, 这些指标通常会出现升高。如图 2a 和 2b 所示, Mod 组与 Con 对照组相比, 小鼠血清中 Cr 的含量增加了 $89.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.001$), BUN 含量增加了 $32.46 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.001$)。与 Mod 组相比, H-MLP 组的 Cr 和 BUN 的含量分别降低了 67.87% 和 43.03% ($P<0.001$), 减轻了甘油诱导的肾功能损伤。肌酸激酶 (CK) 常用于评估与横纹肌溶解相关的急性肾损伤, 并反映肌肉损伤的严重程度^[21]。如图 2c 所示, Mod 组的 CK 含量比 Con 组高出 0.80 U/mL ($P<0.001$), 而 MLP-Con 组未对 CK 水平产生显著影响。L-MLP 和 H-MLP 治疗有效抑制了 CK 水平的升高, 分别降低了 30.41% 和 21.39%, 提示辣木叶多糖可能通过减轻肌肉损伤来缓解肾脏损伤。

2.3 MLP对RM-AKI小鼠细胞凋亡的影响

细胞凋亡通过 TUNEL 染色法进行评估。如图 3 所示, 与 Con 组相比, Mod 组中阳性细胞数量显著增多 ($P<0.001$), 表明肾小管上皮细胞的凋亡明显增加。与肾功能和形态学结果一致, 辣木叶多糖治疗组显著减少了凋亡细胞的数量, 其 H-MLP 组的效果最为显著 ($P<0.001$), 研究表明, 辣木叶多糖能够显著减轻肾小管上皮细胞的凋亡。

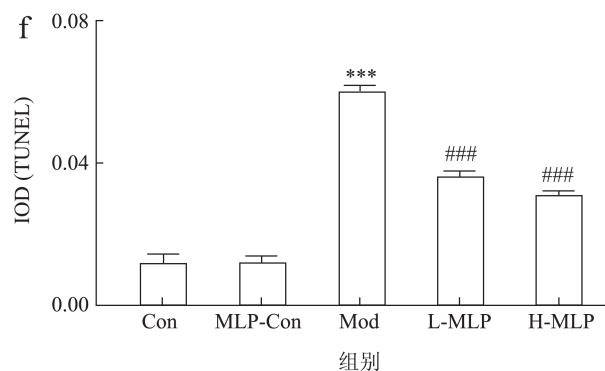
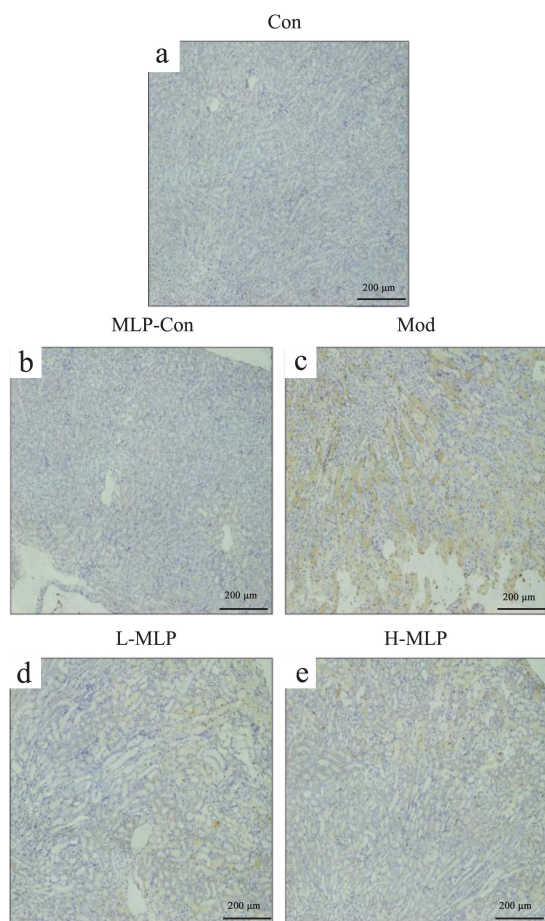


图 3 MLP 对 RM-AKI 小鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of MLP on apoptosis of renal tubular epithelial cells in RM-AKI mice

2.4 MLP对RM-AKI小鼠的炎症因子的影响

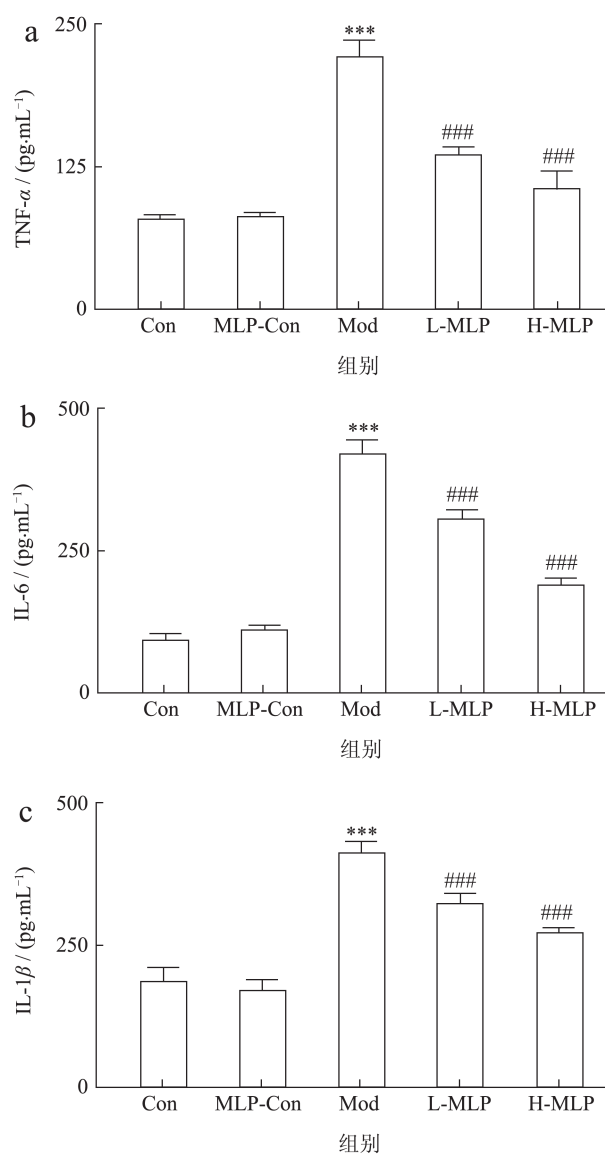


图 4 MLP 对 RM-AKI 小鼠炎症因子水平的影响

Fig.4 Effect of MLP on the level of inflammatory factors in RM-AKI mice

TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 能够引发其他炎症因子和介质的释放^[22], 这些细胞因子会加重炎症反应, 并进一步推动肾脏损伤的进程。本研究使用 ELISA 试剂盒测定小鼠肾脏中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的质量浓度。如图 4 所示, 与 Con 组相比, Mod 组中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 增加了 214.20、326.98 和 141.45 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.001$), 而 MLP-Con 组未见显著变化。L-MLP 和 H-MLP 治疗能够有效抑制这些因子的升高 ($P < 0.001$), H-MLP 组小鼠的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 分别降低了 51.66%、31.05% 和 54.20%。这些结果表明, 辣木叶多糖可以有效降低 RM-AKI 小鼠肾脏组织中炎症因子的含量。

2.5 MLP对HK-2-AKI细胞的氧化应激的影响

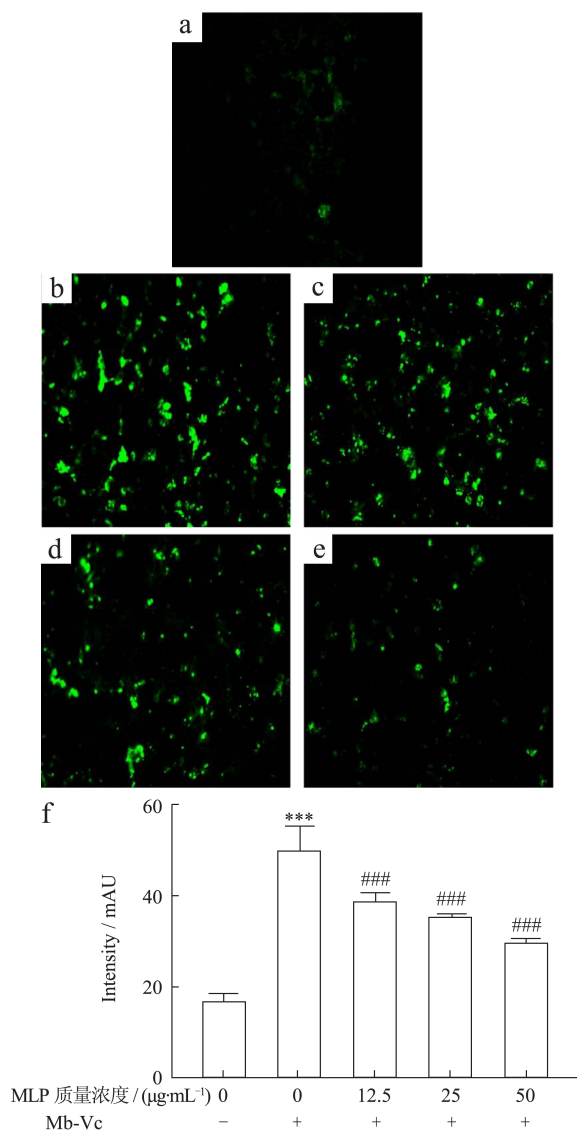
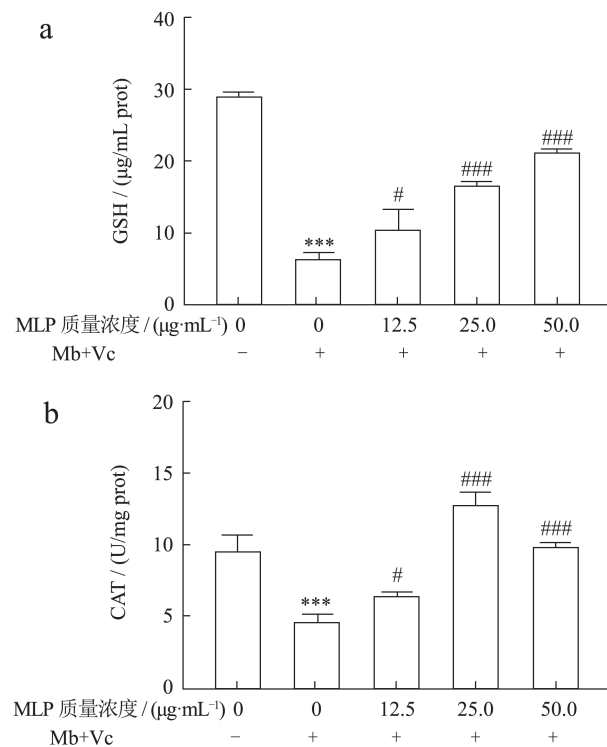


图 5 MLP 对 HK-2 细胞活性氧的影响

Fig.5 Effect of MLP on reactive oxygen species in HK-2 cells

注: (a) 空白组; (b) Mb+Vc 组; (c) Mb+Vc+12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MLP; (d) Mb+Vc+25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MLP; (e) Mb+Vc+50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MLP; (f) ROS Intensity。

本试验所用 MLP 质量分数为 60%, 其他化合物包括粗蛋白及总黄酮, 研究表明, 高浓度的植物多糖会因为与细胞渗透压之差使细胞失水破裂而影响细胞的存活率^[23]。因此本研究选用多糖质量分数为 60% 进行试验是可行的。氧化应激在急性肾损伤 (RM-AKI) 的病理生理中发挥着重要作用。反应性氧通过氧化生物分子、灭活酶类和损伤 DNA, 引发细胞损伤^[24]。研究发现, RM-AKI 中的肾小球滤过障碍可能由小管直接的缺血性损伤、小管阻塞以及肾内血管收缩 (VC) 等因素共同引起^[25]。研究表明, MDA 水平的升高与甘油诱导的急性肾损伤 (AKI) 中的氧化应激增加密切相关^[26]。如图 5 所示, 与空白对照组 (5a) 相比, 模型组 (5b) 的平均荧光强度显著上升, 表明亚铁肌红蛋白能够诱导 HK-2 细胞内 ROS 大量积累 ($P < 0.001$), 从而引发氧化应激反应。与模型组 (5b) 相比, MLP 处理组的细胞内 ROS 含量显著下降 ($P < 0.001$), 且呈剂量依赖性变化, 表明 MLP 能有效清除细胞内 ROS, 减轻其对细胞的氧化损伤。与空白对照组相比 (图 6), 模型组细胞中 CAT、SOD 和 GSH 活性分别降低了 5.05 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ($P < 0.001$)、3.13 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ($P < 0.01$) 和 22.83 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{prot}$ ($P < 0.001$), MDA 含量增加了 2.84 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ($P < 0.001$); 与模型组相比, 在 MLP 处理组中, 高剂量 MLP 组中 CAT、SOD 和 GSH 的活性分别增加了 5.38 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ($P < 0.001$)、8.63 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ($P < 0.001$) 和 15.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{prot}$ ($P < 0.001$), 同时 MDA 的含量降低了 2.16 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ($P < 0.001$)。



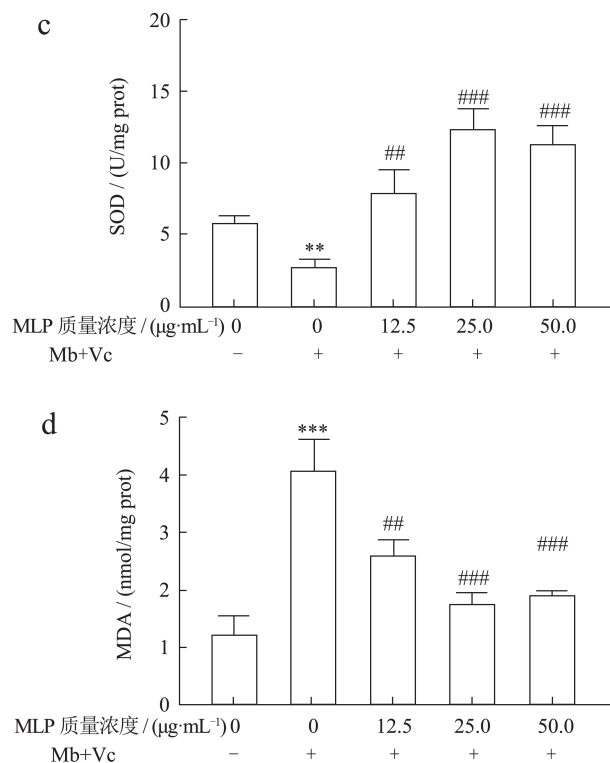


图 6 MLP 对 HK-2-AKI 细胞氧化应激的影响

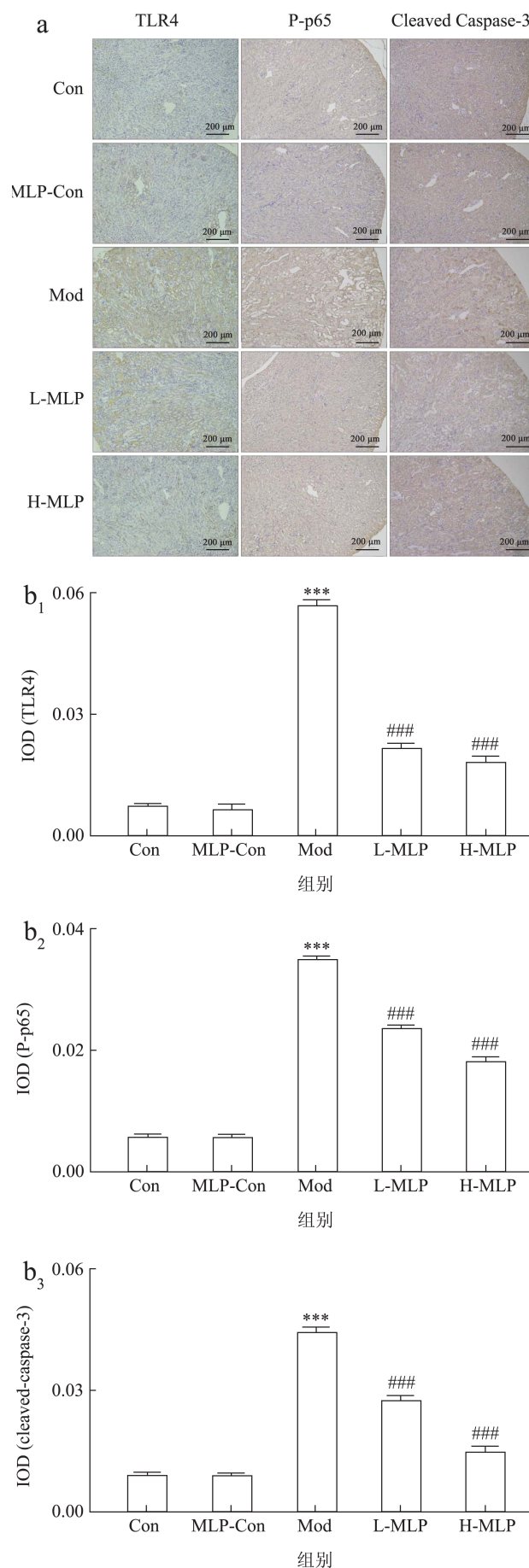
Fig.6 Effect of MLP on oxidative stress in HK-2-AKI cells

注: Con 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 Mod 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

2.6 MLP对TLR4/NF- κ B信号通路的影响

TLR4/NF- κ B 信号通路在多种疾病中的炎症、氧化应激及免疫反应中发挥关键作用^[27]。Cleaved Caspase-3 是一种重要的凋亡蛋白, 研究发现, 辣木叶乙醇提取物能够恢复酸铊胁迫处理后大鼠睾丸中正常的 NF- κ B 表达^[28]。此外, 发酵辣木通过抑制 NF- κ B/TLR4 信号通路, 调节 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中的炎症反应^[29], 辣木叶多糖通过 TLR4 信号通路发挥抗肺癌作用^[30]。研究发现, 辣木茎甲醇提取物可通过抗氧化作用及抑制 NF- κ B 的激活, 改善 RM-AKI^[31], 这表明, 辣木叶多糖可能具有类似的生物学活性。

通过免疫组织化学 (IHC) 染色, 分析了各组小鼠肾脏组织中蛋白的表达水平。与 Con 组相比, Mod 组中 TLR4、P-p65 和 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.001$), 而辣木叶多糖能够抑制这些蛋白的表达 ($P < 0.001$) (图 7a、7b)。为了进一步验证这些结果, 从肾脏组织中提取蛋白, 并通过 Western blotting 进行分析, 结果与 IHC 结果一致。这些数据表明, 辣木叶多糖通过下调 TLR4 蛋白水平 (图 7c) 减轻了肾损伤。



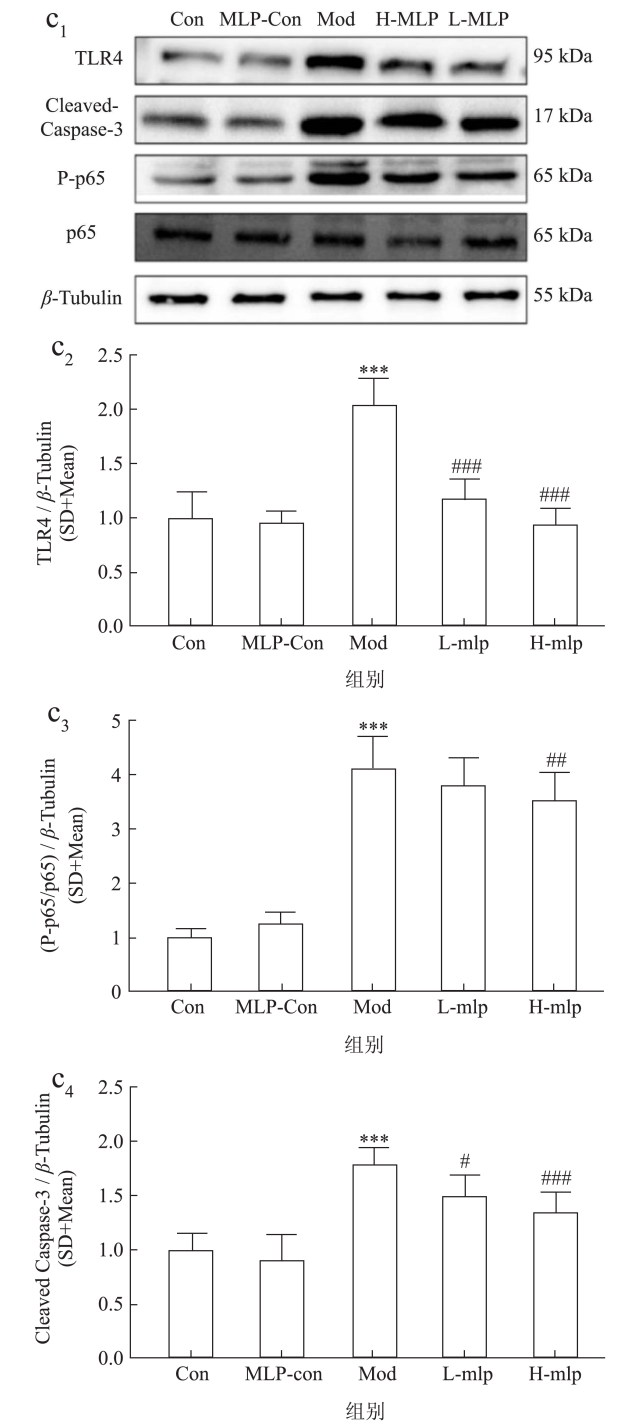


图 7 MLP 对 RM-AKI 小鼠 TLR4/NF-κB 信号通路的影响

Fig.7 Effect of MLP on TLR4/NF-κB signaling pathway in RM-AKI mice

注: Con 组相比, *** $P<0.001$; 与 Mod 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

2.7 MLP对HK-2-AKI细胞中TLR4/NF-κB信号通路的影响

采用亚铁肌红蛋白诱导 HK-2 细胞构建体外损伤模型, 通过 Western blot 检测 HK-2 细胞中 TLR4/NF-κB 信号通路相关蛋白的表达水平 (图 8)。模型组中

Cleaved Caspase-3、P-p65/p65 和 TLR4 蛋白的表达水平相比空白对照组显著上升 ($P<0.01$); 与模型组相比, MLP 预处理组中 Cleaved Caspase-3、P-p65/p65 和 TLR4 蛋白的表达水平明显降低 ($P<0.01$), 此外, MLP 高剂量组的效果优于低剂量组。研究结果提示, MLP 可能通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路发挥肾脏保护作用。

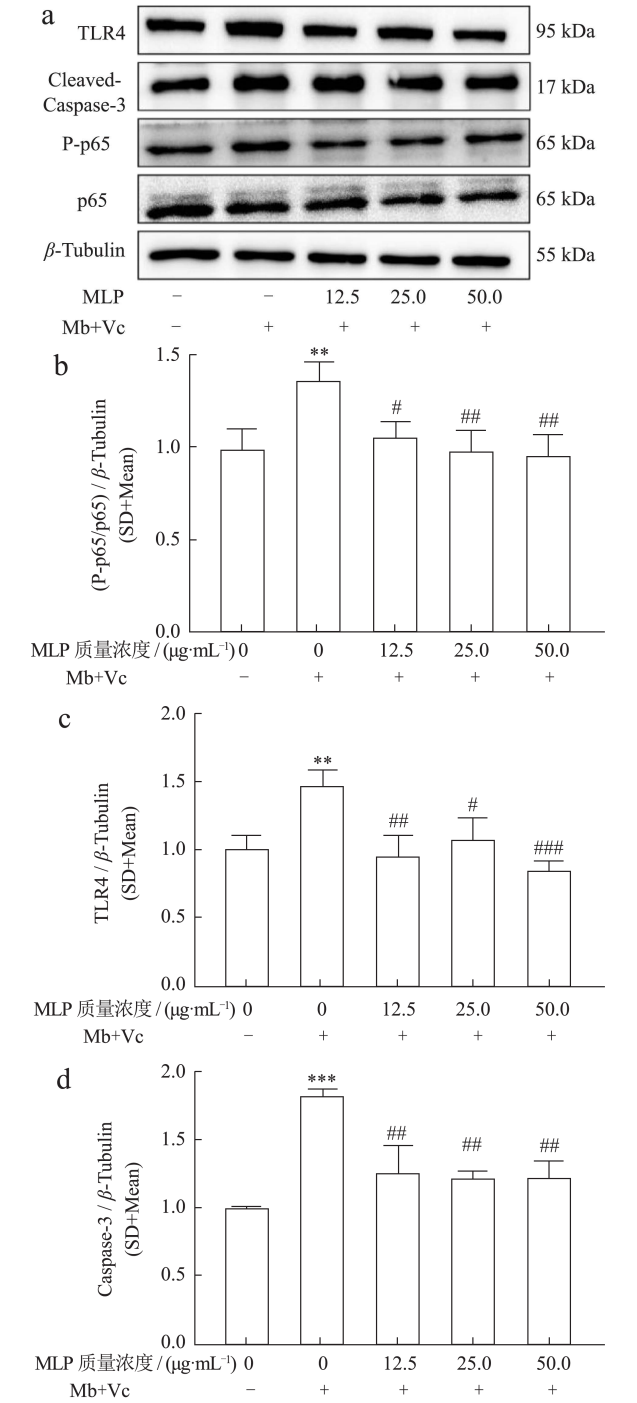


图 8 MLP 对 HK-2-AKI 细胞 TLR4/NF-κB 信号通路的影响

Fig.8 Effect of MLP on TLR4/NF-κB signaling pathway in HK-2-AKI cells

注: Con 组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 Mod 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

3 结论

本实验通过肌肉注甘油诱导 RM-AKI 小鼠模型和亚铁肌红蛋白诱导 HK-2 细胞损伤模型, 并给予辣木叶多糖干预。结果发现, 辣木叶多糖可以减轻 Cr、BUN 及 CK 水平, 缓解肾功损伤并减轻炎症反应, 抑制肾小管上皮细胞的凋亡, 降低 HK-2 细胞氧化应激水平, 对 RM-AKI 肾脏损伤具有明显的保护作用, 其作用机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路激活有关。综上所述, 本研究为辣木叶多糖对 RM-AK 治疗中的应用提供了实验依据, 而且为开发具有肾脏保护功能的新型功能食品提供了理论基础。

参考文献

- [1] BELLOMO R, KELLUM J A, RONCO C. Acute kidney injury [J]. The Lancet, 2012, 380(9843): 756-766.
- [2] UCHINO S, KELLUM J A, BELLOMO R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study [J]. JAMA The Journal of the American Medical Association, 2005, 294(7): 813-818.
- [3] XU C, CHANG A, HACK B K, et al. TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis [J]. Kidney International, 2013, 85(1): 72-81.
- [4] VALKO M, JOMOVA K, RHODES C J, et al. Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease [J]. Archives of Toxicology, 2016, 90: 1-37.
- [5] GIANNOGLOU G D, CHATZIZISIS Y S, MISIRLI G. The syndrome of rhabdomyolysis: pathophysiology and diagnosis [J]. European Journal of Internal Medicine, 2007, 18(2): 90-100.
- [6] STAHL K, RASTELLI E, SCHOSER B. A systematic review on the definition of rhabdomyolysis [J]. Journal of Neurology, 2020, 267: 877-882.
- [7] KAUR T, SINGH D, SINGH A P, et al. Stevioside protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury through PPAR- γ agonism in rats [J]. Drug Development Research, 2021, 82(1): 59-67.
- [8] 杨晓丽,李丽,杨静娟,等.辣木籽蛋白酶解物对小鼠肠道黏膜炎的改善作用[J].现代食品科技,2024,40(3):1-8.
- [9] 张世奇,王睿,李成良,等.辣木叶多糖对STZ诱导糖尿病小鼠的降糖效果及其机制[J].食品工业科技,2024,45(19):357-365.
- [10] YADAV L P, GANGADHARA K, APPARAO V, et al. Nutritional, antioxidants and protein profiling of leaves of *Moringa oleifera* germplasm [J]. South African Journal of Botany, 2024, 165: 443-454.
- [11] FAGUNDES-KLEN M R, GULLICH C T B, TRIQUES C C, et al. Valorization of the coagulant bioactive compound of the *Moringa* seed residue: treatability of fish processing residuary waters [J]. Waste and Biomass Valorization, 2023, 14(12): 4113-4126.
- [12] LUQMAN S, SRIVASTAVA S, KUMAR R, et al. Experimental assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using *in vitro* and *in vivo* assays [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2012, 2012(2012): 519084.
- [13] LEI F, LONG J, ZHANG Z, et al. Study on nutritional components and antioxidant activities of extracts of *Moringa oleifolia* [J]. Chinese Food Additives, 2024, 35(7): 40-45.
- [14] ABDEL FATTAH M E, SOBHY H M, REDA A, et al. Hepatoprotective effect of *Moringa oleifera* leaves aquatic extract against lead acetate-induced liver injury in male Wistar rats [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27: 43028-43043.
- [15] MOHAMED HUSIEN H, PENG W, SU H, et al. *Moringa oleifera* leaf polysaccharide alleviates experimental colitis by inhibiting inflammation and maintaining intestinal barrier [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1055791.
- [16] ZHANG B, ZENG M, LI M, et al. Protopine protects mice against LPS-induced acute kidney injury by inhibiting apoptosis and inflammation via the TLR4 signaling pathway [J]. Molecules, 2019, 25(1): 15.
- [17] ABDEL-DAIM M M, KHALIL S R, AWAD A, et al. Ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves influences NF- κ B signaling pathway to restore kidney tissue from cobalt-mediated oxidative injury and inflammation in rats [J]. Nutrients, 2020, 12(4): 1031.
- [18] WEN Y, LIU Y, HUANG Q, et al. *Moringa oleifera* Lam. seed extract protects kidney function in rats with diabetic nephropathy by increasing GSK-3 β activity and activating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Phytomedicine, 2022, 95: 153856.
- [19] 何娇.肌红蛋白诱导肾小管上皮细胞凋亡中lncRNA表达谱探索研究[D].天津:天津医科大学,2020.
- [20] ZHANG M Z, WANG X, WANG Y, et al. IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury [J]. Kidney International, 2017, 91(2): 375-386.
- [21] SAFARI S, YOUSEFIFARD M, HASHEMI B, et al. The value of serum creatine kinase in predicting the risk of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. Clinical and Experimental Nephrology, 2016, 20: 153-161.
- [22] LI L, HUANG L, VERGIS A L, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(1): 331-342.
- [23] 马广明.辣木叶多糖对奶牛乳腺氧化应激和乳中体细胞数的影响[D].哈尔滨:东北农业大学,2021.
- [24] ALADAILEH S, HUSSEIN O, ABUKHALIL M, et al. Formononetin upregulates Nrf2/HO-1 signaling and prevents oxidative stress, inflammation, and kidney injury in methotrexate-induced rats [J]. Antioxidants, 2019, 8 (10): 430.
- [25] BOSCH X, POCH E, GRAU J M. Rhabdomyolysis and acute kidney injury [J]. New England Journal of Medicine, 2009, 361(1): 62-72.
- [26] ALSHEBLAK M M, ELSHERBINY N M, EL-KAREF A, et al. Protective effects of L-carnosine on CCl4-induced hepatic injury in

- rats [J]. European Cytokine Network, 2016, 27: 6-15.
- [27] PÉREZ-CREMADES D, BUENO-BETÍ C, GARCÍA-GIMÉNEZ J L, et al. Extracellular histones trigger oxidative stress-dependent induction of the NF- κ B/CAM pathway via TLR4 in endothelial cells [J]. Journal of Physiology and Biochemistry, 2023, 79(2): 251-260.
- [28] RAGAB S M, ALMOHAIMEED H M, ALGHRIANY A A, et al. Protective effect of *Moringa oleifera* leaf ethanolic extract against uranyl acetate-induced testicular dysfunction in rats [J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 932.
- [29] TUNG K C C, POBRE R F, OYONG G G. Molecular simulations of *Moringa oleifera* phytochemicals as potential antagonists of the proinflammatory NF- κ B p50 transcription factor [J]. Jordan Journal of Biological Sciences, 2023, 16(3): 389-401.
- [30] WANG S, HU Q, CHANG Z, et al. *Moringa oleifera* leaf polysaccharides exert anti-lung cancer effects upon targeting TLR4 to reverse the tumor-associated macrophage phenotype and promote T-cell infiltration. [J]. Food & Function, 2023, 14(10): 4607-4620.
- [31] ADEDAPO A A, ETIM U, FALAYI O O, et al. Methanol stem extract of *Moringa oleifera* mitigates glycerol-induced acute kidney damage in rats through modulation of KIM-1 and NF- κ B signaling pathways [J]. Scientific African, 2020, 9: e00493.