

虾青素对运动性肾缺血再灌注损伤 ECM 表达的影响

周海涛, 曹建民², 郭 娴², 龚 平^{1*}, 冯 玮², 王 灿², 万子一¹

¹北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023; ²北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084

摘要: 本文对虾青素对运动性肾缺血再灌注损伤大鼠肾组织炎症因子及 ECM 表达的影响进行了研究。72 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为 4 组: 安静对照组(C 组, $n = 12$)、一般训练组(M 组, $n = 12$)、过度训练组(OM 组, $n = 24$)和虾青素 + 过度训练组(AM 组, $n = 24$)。实验中对大鼠以 20 mg/(kg · d) 虾青素灌胃 56 d, 并进行递增负荷游泳训练。末次训练 24 h 后观察肾小球 ECM 沉积情况并测试血清尿素氮、肌酐及肾组织炎症因子蛋白和基因表达、TGF- β 1 基因表达等生化指标。结果显示, 8 周的训练导致大鼠运动性肾缺血再灌注, ECM 沉积加强, 肾功能损伤。肾小球 ECM 沉积, C、M 组间无显著差异($P > 0.05$); OM 组较 C、M 组显著增加($P < 0.01$); AM 组显著低于 OM 组($P < 0.05$)。血清尿素氮和肌酐水平, OM 组和 AM 组显著高于 C 组($P < 0.01$), AM 组显著低于 OM 组($P < 0.05$); 肾组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 蛋白表达, OM 组和 AM 组显著高于 C 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), AM 组显著低于 OM 组($P < 0.05$); 肾组织 TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA 和 IL-18 mRNA 表达, OM、AM 组显著高于 C 组($P < 0.01$), AM 组显著低于 OM 组($P < 0.05$); 肾组织 TGF- β 1 mRNA 表达, AM 组($P < 0.05$)和 OM 组($P < 0.01$)显著高于 C 组, AM 组显著低于 OM 组($P < 0.05$)。从而说明补充虾青素可以有效地抑制肾组织中炎症因子表达从而减轻过度训练诱导的运动性肾脏缺血再灌注发生时肾脏组织 TGF- β 1 的表达, 维护 ECM 的动态平衡, 延缓或避免对肾脏的损伤。

关键词: 虾青素; 运动性肾缺血再灌注损伤; 炎症因子; TGF- β 1; 细胞外基质

中图分类号: C804.7

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.11.007

Effect of Astaxanthin on Kidney ECM Expression in Exercise-related Renal Ischemia-reperfusion Injury Rats

ZHOU Hai-tao¹, CAO Jian-min², GUO Xian², GONG Ping^{1*}, FENG Wei², WANG Can², WAN Zi-yi¹

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

²Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing 100084, China

Abstract: The aim of study was to investigate the protective effects of astaxanthin on kidney inflammation factors and extracellular matrix (ECM) expression in exercise-related renal ischemia-reperfusion injury rats. 72 SPF Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control group (C group, $n = 12$), general training group (M group, $n = 12$), overtraining group (OM group, $n = 24$) and astaxanthin + overtraining group (AM group, $n = 24$). During the experiment, the rats were given astaxanthin, gavage (ig) dose was 20 mg/kg per day. The rats were assigned to a 56-day increasing load swimming training. 24 hours after the last training, we observed the glomerular ECM deposition, the serum urea nitrogen and creatinine, the expression of inflammatory cytokines protein and gene, TGF- β 1 gene in renal tissue. The results showed that 8 weeks of training caused exercise-induced renal ischemia reperfusion in rats, with the increasement of glomerular ECM deposition and the impairment of renal function. The glomerular ECM deposition of C group and M group appear no differences ($P > 0.05$); OM group was significantly higher than that in C group and M group ($P < 0.01$); AM group was significantly lower than that of OM group ($P < 0.05$). The serum urea nitrogen and creatinine levels of OM group and AM group were significantly higher than C group ($P < 0.01$), AM group was significantly lower than OM group ($P < 0.05$); the expression of renal TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-18 protein in OM group and AM group were significantly higher than C group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), AM group was significantly lower than OM group ($P < 0.05$);

the expression of renal TNF- α mRNA, IL-1 β mRNA, IL-6 and IL-18 mRNA in OM group and AM group were significantly higher than C group ($P < 0.01$), AM group was significantly lower than OM group ($P < 0.05$); the expression of renal TGF-

投稿日期: 2015-05-11 接受日期: 2015-07-03

基金项目: 国家体育总局科研项目(2013A101)

* 通讯作者 Tel: 86-013911514571; E-mail: gongping@buu.edu.cn

$\beta 1$ mRNA in AM group ($P < 0.05$) and OM group ($P < 0.01$) was significantly higher than C group, AM group was significantly lower than OM group ($P < 0.05$). To conclude, the supplement of astaxanthin can effectively inhibit the expression of inflammatory cytokines in renal tissue thereby reducing the expression of TGF- $\beta 1$ in renal tissue when over-training-induced renal ischemia-reperfusion occurs, maintain ECM homeostasis, delay or avoid the injury of renal.

Key words: astaxanthin; exercise-related renal ischemia-reperfusion injury; inflammation factors; TGF- $\beta 1$; extracellular matrix

肾脏作为高灌注器官,对缺血以及缺血再灌注极为敏感。前期研究表明:长时间、大强度的训练由于训练周期长、大运动量负荷、恢复不及时等因素可造成大鼠肾脏运动性肾缺血再灌注损伤(exercise-related renal ischemia-reperfusion injury, ERRI-RI)^[1-4]。肾缺血再灌注损伤引发的炎症因子表达可促进肾脏固有细胞的增殖,刺激其表达粘附分子并生成过多的细胞外基质(extracellular matrix, ECM),进而打破肾脏细胞外基质代谢的动态平衡并直接影响到组织细胞结构和功能的变化^[5]。天然虾青素(Astaxanthin)广泛存在于自然界,作为类胡萝卜素合成的最高级别产物,具有特殊结构。国内外大量研究已证实虾青素具有极强的抗氧化活性,在提高免疫力,预防肝肾损伤、肿瘤、心血管疾病等疾病的发生与发展,延缓衰老等方面具有积极的促进作用^[6]。因其具有多靶点、多途径作用且无任何毒副作用、不含兴奋剂成分的特点业已逐渐地应用于运动医学及运动营养领域。本实验观察虾青素对肾脏组织中 TGF- $\beta 1$ 基因表达、炎症细胞因子蛋白及基因表达的影响以及对肾脏 ECM 代谢、ECM 沉积的调节作用,进而研究其对过度训练导致的运动性肾缺血再灌注损伤的保护作用和机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物^[1]

SPF 级 75 只雄性 Wistar 大鼠,49 d 龄,体重(225.5 ± 10.8)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。整个实验中,实验室温度保持在(22 ± 2)℃,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 d,正式训练 56 d。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

虾青素(Astaxanthin),5% 纯度,北京志政生物科技有限公司购得,批号:140824102 并经天津中瑞

药业有限公司高占友高级工程师鉴定。称取虾青素 8 g 融于 100 mL 蔗糖脂肪酸酯,相当于 4 mg(纯品虾青素)/mL,4℃ 存放备用。

1.3 仪器

CM-2000B 型生物学图像分析系统(北京航空航天大学),BS224S 型电子分析天平(德国赛多利斯);光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);ALCY-ON300 全自动生化分析仪(美国雅培);LKB-V 型超薄切片机(瑞典 LKB 公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组

大鼠适应性饲养 4 d 后,以 20 min/d 的运动量对其进行为期 3 d 的筛选,淘汰个别不适应的游泳者,剔除不符合实验要求的大鼠,剩余大鼠以数字随机分组法分为 4 组: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)和虾青素 + 过度训练组(AM 组,24 只)^[1-4]。采用专业灌胃器每天灌胃一次,虾青素干预组剂量为 400 mg/kg(实际灌服虾青素纯品剂量为 20 mg/kg,查阅文献^[7,8]及预实验获得最佳剂量),灌胃体积为 5 mL/kg,其他各组灌胃等量蔗糖脂肪酸酯。

2.2 训练及测试方案^[1-4]

安静对照组常规饲养,不运动,无任何干预。一般训练组进行正式中等强度游泳训练 8 周(无负重),每周 6 d,每天 1 次。第 1 次下水游 20 min,此后逐渐增加,至第 1 周末每天游 60 min,第 2 周末加至每天游 90 min,第 3 周末加至每天游 120 min,此后 5 周均保持此运动量。前 3 周训练时间安排,过度训练组和虾青素干预组同一般训练组,但训练中大鼠负 0.5% 体重。第 4 周起开始安排高强度训练,每次训练至力竭。力竭标准以大鼠下沉后 10 s 不露出水面为准。第 4 周负 1% 体重,第 5 周负 2% 体重,每天训练 1 次。第 6 周负 2% 体重,每天上午、下午各训练 1 次。第 7 ~ 8 周,每天上午、下午、夜间各训练 1 次,均负 5% 体重。

安静对照组、一般训练组大鼠正常生长,无意外

死亡。过度训练组和虾青素干预组大鼠因尾部负重, 疲劳、力竭无法及时恢复及训练过程中意外死亡等原因。至第 8 周末时, 过度训练组 24 只仅剩 14 只, 虾青素干预组 24 只仅剩 11 只。

2.3 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, 加入柠檬酸钠溶液抗凝, 37 °C 水浴 30 min 后, 4 °C、3000 rpm 离心 10 min, 分离制备血清, 置 -20 °C 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 °C 冰箱冻存待测^[4]。

Jaffe 苦味酸法测定血清肌酐(试剂盒编号 20141027), 采用二乙酰-脲法测定血清尿素氮(试剂盒编号 20141009), 采用免疫组织化学法测定检测肾组织 TNF- α (试剂盒编号 20141023)、IL-1 β (试剂盒编号 20141014)、IL-6(试剂盒编号 20140912)、IL-18 蛋白表达(试剂盒编号 20140909), 采用 RT-PCR 法测定肾组织 TNF- α (试剂盒编号 20141008)、IL-1 β (试剂盒编号 20140922)、IL-6(试剂盒编号 20141016)、IL-18(试剂盒编号 20141027)、TGF- β 1(试剂盒编号 20141103) 基因表达。以上试剂盒均由上海恒远生物科技有限公司提供。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。

2.4 PAS 染色切片图像分析

取部分肾组织, 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 制成 4 μ m 厚切片, PAS 染色并进行组织病理学分析。PAS 染色切片, 在 400 \times 物镜下采用北航图象采集模块软件采集视野中同时切到尿极和血管极的肾小球(每张切片约有 8 ~ 10 个), 随后运用北航医学病理图象分析软件描绘肾小球毛细血管拌轮廓, 区分基质和细胞成分, 并测量单个肾小球平均面积及其基质面积。

2.5 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, 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。 ≤ 1 分为阴性(-), >1 分 ≤ 3 分为弱阳性(+), >3 分 ≤ 5 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。

2.6 PCR 产物分析

根据 Trizol 试剂盒说明书要求提取各组大鼠肾组织总 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 5V/cm) 约 1 h, 0.5 μ g/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。

2.7 数据统计

采用 SPSS13.0 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, 组间差异采用方差分析, 等级计数资料采用秩和检验分析, 相关关系采用 Pearson 相关分析。显著性水平为 $P < 0.05$, 非常显著性水平为 $P < 0.01$ 。

3 实验结果

3.1 肾组织 PAS 染色检查结果

应用肾脏组织 PAS 染色切片分析肾小球 ECM 沉积情况。安静对照组与一般训练组大鼠间肾小球 ECM 沉积无显著差异($P > 0.05$); 过度训练组大鼠肾小球 ECM 的沉积较安静对照组显著增加($P < 0.01$); 虾青素干预组大鼠肾小球 ECM 的沉积显著低于过度训练组大鼠($P < 0.05$)(见表 1 和图 1)。

表 1 各组大鼠肾小球 ECM 沉积比较

Table 1 The glomerular ECM deposition of rats

组别 Group	<i>n</i>	基质/肾小球面积 Matrix / Glomerular area
安静对照 Control	12	0.049 \pm 0.021
一般训练 General training	12	0.066 \pm 0.016

过度训练 Overtraining	11	0.116 ± 0.024 ²⁾
虾青素 + 过度训练 Astaxanthin + Overtraining	14	0.086 ± 0.026 ^{2,3)}

注:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与安静对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compare with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compare with overtraining group.

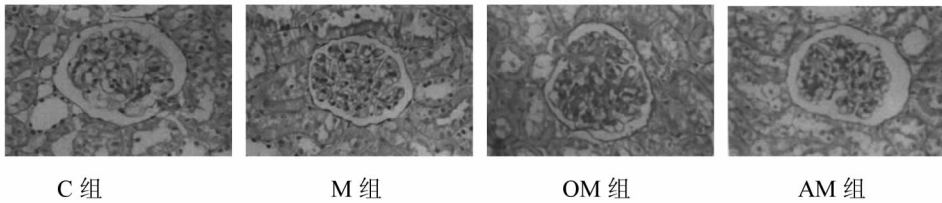


图1 4组肾小球 ECM 沉积情况 (PAS, ×400)

Fig. 1 The glomerular ECM deposition (PAS, ×400) of four groups

3.2 血清尿素氮和肌酐

练组、虾青素干预组显著高于安静对照组 ($P < 0.01$); 虾青素干预组显著低于过度训练组 ($P < 0.05$)。

表2显示: 血清尿素氮和肌酐水平, 安静对照组与一般训练组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。过度训

练组、虾青素干预组显著高于安静对照组 ($P < 0.01$); 虾青素干预组显著低于过度训练组 ($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠血清尿素氮和肌酐水平比较

Table 2 The serum urea nitrogen and creatinine levels of rats

组别 Group	n	血清尿素氮 BUN (mmol/L)	血清肌酐 SCr (μmol/L)
安静对照 Control	12	8.41 ± 1.03	31.29 ± 6.01
一般训练 General training	12	9.25 ± 0.35	36.60 ± 8.04
过度训练 Overtraining	11	14.29 ± 1.96 ²⁾	81.21 ± 15.75 ²⁾
虾青素 + 过度训练 Astaxanthin + Overtraining	14	11.71 ± 1.32 ^{2,3)}	51.15 ± 12.66 ^{2,3)}

注:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与安静对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compare with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compare with overtraining group.

3.3 肾组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-18 蛋白水平

IL-1β 水平仅轻度表达, 组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。其余两组与安静对照组比较皆存在显著性差异 ($P < 0.01$)。过度训练组阳性表达较强, 虾青素干预组较之表达减轻 ($P < 0.05$)。

3.3.1 IL-1β 蛋白水平

表3显示: 安静对照组、一般训练组大鼠肾组织

表3 各组肾组织 IL-1β 蛋白水平比较

Table 3 The comparison of renal IL-1β protein expression of rats

组别 Group	n	-	+	++	+++
安静对照 Control	12	7	5		
一般训练 General training	12	5	4	2	1
过度训练 Overtraining ²⁾	11	0	2	6	3
虾青素 + 过度训练 ^{2,3)} Astaxanthin + Overtraining	14	3	6	4	1

注:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与安静对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compare with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compare with overtraining group.

3.3.2 IL-6 蛋白水平

表4显示: 安静对照组、一般训练组大鼠肾组织 IL-6 蛋白水平仅轻度表达且组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。其余两组与安静对照组比较皆存在显著

性差异 (分别为 $P < 0.01$, $P < 0.05$)。过度训练组阳性表达较强, 虾青素干预组较之表达减轻 ($P < 0.05$)。

表 4 各组肾组织 IL-6 蛋白水平比较

Table 4 The comparison of renal IL-6 protein expression of rats

组别 Group	n	-	+	++	+++
安静对照 Control	12	7	4	1	
一般训练 General training	12	6	2	3	1
过度训练 Overtraining ²⁾	11	1	4	5	1
虾青素 + 过度训练 Astaxanthin + Overtraining ^{1,3)}	14	4	6	3	1

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与安静对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compare with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compare with overtraining group.

3.3.3 TNF- α 蛋白水平

>0.05)。其余两组与安静对照组比较存在显著性

表 5 显示: 安静对照组、一般训练组大鼠肾脏组
织 TNF- α 蛋白水平仅轻度表达且无显著性差异 (P

差异 ($P < 0.05$)。过度训练组阳性表达较强, 虾青
素干预组较之表达减轻 ($P < 0.05$)。

表 5 各组肾组织 TNF- α 蛋白水平比较

Table 5 The comparison of renal TNF- α protein expression of rats

组别 Group	n	-	+	++	+++
安静对照 Ctrol	12	7	4	1	
一般训练 General training	12	4	4	3	1
过度训练 Overtraining ¹⁾	11	1	5	3	2
虾青素 + 过度训练 Astaxanthin + Overtraining ^{1,3)}	14	3	6	3	2

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与安静对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compare with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compare with overtraining group.

3.3.4 IL-18 蛋白水平

0.05)。其余两组与安静对照组比较存在显著性差

表 6 显示: 安静对照组、一般训练组大鼠肾脏组
织 IL-18 蛋白水平仅轻度表达且无显著性差异 ($P >$

异 ($P < 0.05$)。过度训练组阳性表达较强, 虾青素
干预组较之表达减轻 ($P < 0.05$)。

表 6 各组肾组织 IL-18 蛋白水平比较

Table 6 The comparison of renal IL-18 protein expression of rats

组别 Group	n	-	+	++	+++
安静对照 Ctrol	12	8	2	2	
一般训练 General training	12	6	5	1	
过度训练 Overtraining ¹⁾	11	1	3	5	2
虾青素 + 过度训练 Astaxanthin + Overtraining ^{1,3)}	14	4	6	4	

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与安静对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compare with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compare with overtraining group.

表 7 各组肾脏组织 IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA、TNF- α mRNA、IL-18 mRNA 相对表达量比较

Table 7 The comparison of renal IL-1 β mRNA, IL-6, TNF- α mRNA and IL-18 mRNA relative expression of rats

组别 Group	n	IL-1 β (GAPDH)	IL-6 (GAPDH)	TNF- α (GAPDH)	IL-18 (GAPDH)
安静对照 Ctrol	12	0.206 \pm 0.061	0.317 \pm 0.061	0.231 \pm 0.079	0.354 \pm 0.079
一般训练 General training	12	0.241 \pm 0.053	0.431 \pm 0.041	0.253 \pm 0.068	0.401 \pm 0.049
过度训练 Overtraining	11	0.845 \pm 0.128 ²⁾	0.969 \pm 0.192 ²⁾	0.945 \pm 0.257 ²⁾	0.947 \pm 0.192 ²⁾
虾青素 + 过度训练 Astaxanthin + Overtraining	14	0.537 \pm 0.121 ^{2,3)}	0.671 \pm 0.178 ^{2,3)}	0.671 \pm 0.219 ^{2,3)}	0.691 \pm 0.151 ^{2,3)}

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与安静对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compare with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compare with overtraining group.

3.4 肾组织 IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA、TNF- α mRNA、IL-18 mRNA 相对表达量

表 7 显示:安静对照组、一般训练组间肾脏组织 IL-1 β mRNA、L-6 mRNA、TNF- α mRNA、IL-18 mRNA 表达水平均无显著性差异 ($P > 0.05$),其余两组与安静对照组比较存在显著性差异 ($P < 0.01$),虾青素干预组较过度训练组表达减轻 ($P < 0.05$)。

表 8 各组肾脏组织 TGF- β 1 mRNA 相对表达量比较

Table 8 The comparison of renal TGF- β 1 mRNA relative expression of rats

组别 Group	<i>n</i>	TGF- β 1 mRNA (GAPDH)
安静对照 Ctrol	12	0.821 \pm 0.053
一般训练 General training	12	0.921 \pm 0.037
过度训练 Overtraining	11	1.341 \pm 0.015 ²⁾
虾青素 + 过度训练 Astaxanthin + Overtraining	14	1.069 \pm 0.116 ^{1,3)}

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与安静对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与过度训练组比较。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compare with control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compare with overtraining group.

4 讨论

肾小球 ECM 是由多种成分形成的高度有序的动态网络结构,主要由胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白多糖和糖蛋白构成。ECM 主要分布于细胞的周围,对细胞承担支持、连接作用。同时在维持细胞的营养、形态、粘附、增殖、分化等方面及维护正常组织结构与功能方面也发挥重要作用。ECM 作为肾小球基底膜的构成成分,在保证肾小球滤过屏障完整性中发挥重要作用。同时在保护肾小管上皮细胞结构、功能及肾小管间质纤维化发展过程中也发挥着重要作用。正常状态下,其处于不断的代谢更新和降解重塑的动态平衡。但在某些病理状态下,ECM 的质变和量变可导致细胞周围微环境的变化并直接影响细胞功能及器官形态^[10]。ECM 在肾小球内的发生机制及沉积过程较为复杂,但其主要机制为小球内 ECM 产生增多或(和)ECM 降解减少^[11]。

TGF- β 作为一种多功能的细胞因子可以以自分泌、旁分泌的方式,通过细胞表面的复杂的受体信号传导途径调控细胞的增殖、分化和凋亡,在多种组织的发育形成过程中发挥重要作用。其三种异构体中尤以 TGF- β 1 在肾脏组织中表达最为显著。研究表明:TGF- β 1 作为体内 ECM 的调节器,控制着 ECM 的合成和降解以及粘附分子受体的表达、整合素的表达,从而影响 ECM 的重建,其表达增加与 ECM 沉积增加相一致^[12]。目前已知在不同的肾脏细胞包

3.5 肾组织 TGF- β 1 mRNA 相对表达量

表 8 显示:肾脏组织 TGF- β 1 mRNA 表达水平,安静对照组、一般训练组间无显著性差异 ($P > 0.05$),其余两组显著高于安静对照组(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$),虾青素干预组显著低于过度训练组 ($P < 0.05$)。

括肾小球上皮细胞、肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞以及正常肾间质中的成纤维细胞均可观察到 TGF- β 1 导致的 ECM 含量的增加^[13]。TGF- β 1 可通过三大途径导致 ECM 的含量升高^[14,15]:一是通过促进 ECM 组成成分如 Col-I、Col-III、Col-IV 及 FN 的表达进而促进胶原组织合成增加;二是通过抑制 ECM 的降解,包括抑制降解 ECM 成分的酶类的合成,促进诸如纤溶酶原激活物抑制因子和金属蛋白酶组织抑制因子等蛋白酶抑制因子的表达;三是促进整合素表达进而影响 ECM 的表达。同时 TGF- β 1 在免疫应答中也具有重要的调节作用,较其他细胞因子有更强的免疫抑制作用,可抑制免疫活性细胞的增殖和分化及细胞因子和抗体的产生^[16]。

已有研究表明,长时间、大强度训练可引发大鼠免疫应答,进而激活肾脏炎症效应细胞,导致炎症介质释放和细胞外基质代谢紊乱。同时炎症介质、细胞外基质又可反作用于效应细胞。炎症细胞、炎症介质及细胞外基质间的“交互应答”作用,导致并加重了缺血再灌注肾脏损害的发生与发展,从而导致肾脏组织微细结构发生变化^[14,15]。同时长时间、大强度运动训练引发大鼠肾缺血再灌注损伤时,肾脏组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 含量与肌酐和尿素氮成正相关,可以反映运动性肾缺血再灌注损伤的严重程度^[1-3]。本研究结果显示:8 周的递增负荷训练已造成大鼠过度训练及运动性肾缺血再灌注,并引发大鼠血清肌酐、尿素氮水平升高;肾组织相关炎症

因子基因表达上调,继而引发蛋白表达上调。这些改变加剧了肾缺血再灌注损伤中肾脏组织的炎症反应,引发 TGF- β 1 基因表达上调,ECM 代谢失衡。而一般训练组大鼠相关指标未呈现显著性变化,说明中等强度的训练方式未对肾脏功能造成损害。虾青素干预组大鼠肾组织相关炎症因子蛋白、基因表达 ($P < 0.05$) 及 TGF- β 1 基因表达 ($P < 0.05$) 低于过度训练组大鼠;血清肌酐、尿素氮水平也较过度训练组有所降低 ($P < 0.05$);肾小球 ECM 的沉积显著低于过度训练组大鼠 ($P < 0.05$)。说明虾青素可以有效地从基因到蛋白质水平抑制由于过度训练对肾脏缺血再灌注诱导的肾脏组织炎症细胞因子的表达,从而下调肾组织 TGF- β 1 表达,保持 ECM 的代谢平衡,避免和延缓了肾功能障碍的发生。其机制可能为:(1)氧自由基与炎症密切相关,是炎症发生、发展的重要病理机制之一。肾缺血再灌注发生时,黄嘌呤脱氢酶(XD)转变为黄嘌呤氧化酶(XO)等途径导致了超氧阴离子自由基过量产生,同时内源性自由基清除系统的代谢底物缺乏,也导致自由基清除量减少,进而造成组织细胞内氧自由基增多,引起肾组织过氧化损伤。补充虾青素,一方面由于虾青素结构端含有较长共扼双键,且末端含有不饱和羟酮基,可以与肾脏靶细胞结合,末端未配对电子与自由基或活性氧离子结合,加速清除淬灭肾脏缺血再灌注引起的自由基和活性氧的产生增多^[8]。另一方面可以通过提高组织内抗氧化酶活性,有效地提高机体的抗氧化能力。两方面的共同作用,可以有效地改善机体氧化/抗氧化系统平衡调节能力,维持氧自由的动态平衡,降低脂质过氧化反应,保护细胞膜的完整性并提高酶促系统和非酶系统的防御能力,进而抑制由过度训练导致的氧化应激增加所引发的肾脏组织细胞大量分泌炎症细胞因子^[7]。(2)虾青素作为强效的免疫推动剂,可以显著增强机体局部及全身的免疫功能,促进人体免疫球蛋白的产生,增强免疫系统中 B 细胞的活力表达,有效减轻 DNA 的损伤,增强机体消灭外源入侵的病原体,从而减轻肾脏缺血再灌注免疫炎症性损害^[17]。(3)虾青素可以有效地上调抗凋亡基因 Bcl-2 表达,抑制促凋亡基因 Bax 表达,使 Bax/Bcl-2 表达趋向平衡,从而抑制 Caspase3 的激活^[18]。(4)基质金属蛋白酶(MMPs)、丝氨酸蛋白酶系统/纤溶酶原激活物(PAs)等对于 ECM 的降解起主要作用。而 TGF- β 1 可以有效地抑制 MMPs 的转录^[19]。虾青素有效地

抑制 TGF- β 1 的表达,进而保证了 MMPs 的活性,加速了 ECM 的降解。

5 总结

虾青素可以有效地抑制肾组织中炎症因子表达从而减轻过度训练诱导的运动性肾脏缺血再灌注发生时肾脏组织 TGF- β 1 的表达,维护 ECM 的动态平衡,延缓或避免对肾脏的损伤。

参考文献

- 1 Zhou HT (周海涛), Cao JM (曹建民). Chinese tonic medicine reduces the exercise-related renal ischemia reperfusion injury in rat. *Chin J Sports Med* (中国运动医学杂志), 2013, 32: 518-524.
- 2 Guo AM (郭爱民), Cao JM (曹建民), Zhou HT (周海涛). Protective effects of Fructus Cnidii combined with vitamin C on exercised-induced renal ischemia-reperfusion injury of rats. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 335-339.
- 3 Cui XM (崔笑梅), Cao JM (曹建民), Zhou HT (周海涛). Protective effects of *Cynomorium songarium* Rupr with vitamin C on exercise-induced renal ischemia-reperfusion injury of rats. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 506-511.
- 4 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. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7: 5730-5736.
- 5 Klahr S, Morrissey J. Progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41 (3): 3-7.
- 6 Tao SY (陶姝颖), Ming J (明建). Research advance on the functional characteristics of astaxanthin and its application in functional food. *Food Ind* (食品工业), 2012, 33: 110-115.
- 7 Shen N (沈宁). Influence of natural astaxanthin supplementation on the increasing load training filtration skeletal muscle metabolism of free radicals. *J Chengdu Sport Univ* (成都体育学院学报), 2014, 40(2): 75-79.
- 8 Wang FG (王丰光). Effects of natural astaxanthin on free radical metabolism in rat kidney after exercises. Xuzhou: Jiangsu Normal University (江苏师范大学), MSc. 2013.
- 9 Riera M, Torras J, Cruzado JM, et al. The enhancement of endogenous cAMP with pituitary adenylates polypeptide protects rat kidney against ischemia through the modulation of inflammatory response. *Transplantation*, 2001, 72: 1217-1223.