

• 方药研究 •

前健脾后补肾对力竭运动大鼠
肾功能和肾细胞凋亡的影响

刘祥梅 谭 军 吴宇强 刘文锋 唐瑶函 严 秋 吴 钢 刘清波 蒋振华

(湖南师范大学体育学院运动人体科学教研室, 湖南省长沙市河西左家垅麓山南路, 410012)

[摘要] 目的 研究中药前健脾后补肾对力竭运动大鼠肾功能的影响及其作用机制。方法 将 24 只雄性 SD 大鼠分为安静对照组、力竭运动组、力竭运动前健脾后补肾组, 力竭运动后 24 小时取材, 检测血清尿素氮、肌酐和尿蛋白含量, HE 染色观察肾组织细胞, 原位末端标记法(TUNEL)检测肾凋亡细胞。结果 力竭运动前健脾后补肾组比力竭运动组的血清尿素氮、肌酐、尿蛋白及凋亡指数低($P < 0.05$), 无类似于力竭运动组的肾组织坏死现象。结论 力竭运动造成的肾功能降低可能与肾细胞凋亡、病理损害有关, 前健脾后补肾能减轻这些变化, 起到一定的保护肾功能作用。

[关键词] 健脾; 补肾; 力竭运动; 细胞凋亡; 肾功能

Effect of Strengthening the Spleen and Tonifying the Kidney on the Function and Apoptosis of Kidney in Rats after Exhaustive Exercise

LIU Xiang-mei, TAN Jun, WU Yu-qiang, et al.

(Physical Education of Hunan Normal University, Changsha 410012)

ABSTRACT Objective To study the effect and mechanism of strengthening the spleen and tonifying the kidney on the function and apoptosis of kidney in rats. **Methods** The 42 male SD rats were randomly divided into quiet control group, exhausted exercise group and strengthening the spleen and tonifying the kidney group. Twenty-four hours after exhaustive exercise, the concentrations of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine and urinary protein were determined. The apoptosis in kidneys of rats was detected by TUNEL. The structure of kidney was observed in the HE stain. **Results** Comparing with the exhausted exercise group, the concentrations of BUN, serum creatinine and apoptotic index were lower significantly ($P < 0.05$) and there wasn't necrosis of kidney tissues in the strengthening the spleen and tonifying the kidney group. **Conclusion** Strengthening the spleen and tonifying the kidney play a certain role in protecting the renal function by inhibiting apoptosis and decreasing necrosis of kidney tissues.

Key Words Strengthening the spleen; Tonifying the kidney; Exhaustive exercise; Apoptosis; Renal function

力竭运动可以改变肾脏超微结构导致肾功能异常, 肾细胞凋亡的增加是肾功能损害的机制之一^[1~3]。慢性疲劳性运动过程中, 运用中药前健脾后补肾对延缓和消除疲劳有多方面的作用^[4~6]。我们将前健脾后补肾运用于一次性力竭运动的大鼠并观察其对肾功能和肾细胞凋亡的影响, 试图从肾细胞凋亡角度探索其对肾脏的作用, 现报告如下。

1 材料

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠, 体重 180~220g。由湖南农学院实验动物中心提供, 常规分笼、以标准啮齿类动物饲料饲养, 自由饮水进食。室温(22 ± 3)℃, 相对湿度 50%, 光照时间 15 小时。

1.2 药物及试剂

方药的制备与给药: 将西洋参、白术、茯苓、甘草、

大枣, 按比例 1:2:2:2:3 组成补脾方, 将淫羊藿、仙茅、枸杞子、熟地黄、肉苁蓉、泽泻、山药、茯苓、牡丹皮、山茱萸, 按比例 4:3:4:8:4:3:4:3:3:4 组成补肾方。两方分别加水煎煮两次, 取两次煎取药液过滤、去渣合并, 用烧杯在恒温水浴锅内浓缩为 1g/ml, 贮存于冰箱备用。给药时用双蒸水稀释, 健脾方使用液的稀释浓度为 25%(v/v), 补肾方使用液的稀释浓度为 50%(v/v)。

主要试剂: 血清尿素氮、血清肌酐和尿蛋白定量检测试剂(南京建成生物工程研究所); 原位末端标记细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); 苏木素和伊红染色剂(湖南中医药大学)。

1.3 主要仪器

(1)PT 动物电动跑台(浙江杭州立泰科技有限公司); (2)全自动数显立式高压蒸汽灭菌器(上海博迅医疗器械公司); (3)轮转组织石蜡切片机(广州市华俊医疗器械有限公司); (4)SHH-W21.600 型三用电热恒

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(05JJ40114)

通讯作者: 刘祥梅, liulxiangmei@126.com, (0731)8857942

温水箱(天津市莱斯特仪器有限公司);(5)TGL-16C 台式高速离心机(湖南星科科学仪器设备有限公司);(6)半自动生化仪(深圳雷杜科技有限公司);(7)尤尼柯 7200 型分光光度计(上海第三分析仪器厂);(8)纯水双蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);(9)LEICA DM LB₂ 型双目显微镜(德国 LEICA 公司);(10)Motic B₅ 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。(11)微量移液器(浙江华威医疗器械有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与训练

静养与观察 3 日,进行适应性跑台训练,持续时间 15 分钟,速度 10m/min,坡度为 0°,筛选出不能跑台训练的大鼠。正式实验前一天称重,按体重分层随机分为安静对照组、力竭运动组、力竭运动前健脾后补肾组,每组 8 只。安静对照组不参加运动训练,其他两组在 PT 动物实验跑台上进行,跑台的坡度为 0°。力竭运动按以下安排进行:18m/min 的速度跑 10 分钟,22m/min 的速度跑 10 分钟,26m/min 的速度跑 15 分钟,30m/min 的速度跑 15 分钟,最后稳定在 34m/min 的速度。力竭标准:电刺激大鼠尾部,仍跟不上预定速度,臀部压在跑台后壁,经电刺激仍无力运动,后肢随转动皮带后拖达 30 秒,取出放在平台上也无力走动,视为力竭。力竭运动前和后 40 分钟,力竭运动组灌服生理盐水,力竭运动前健脾后补肾组灌服相应的药物,灌胃溶液量均为 2ml。

2.2 取材方法

安静对照组于安静状态、其他两组于力竭后 24 小时的安静状态下,采用 2%戊巴比妥钠(30~40mg/kg)腹腔注射,麻醉至理想即断头处死,颈部取血、离心取血清,待测血清尿素氮和肌酐。剖开腹腔,用 4 号针头及微量注射器从膀胱抽取尿样立即检测尿蛋白含量,迅速摘取双肾,将右肾纵行剖开,取一半置入 4℃的 4%多聚甲醛中固定,24 小时后常规石蜡包埋待进行光镜和凋亡细胞的测定。

2.3 检测指标与方法

2.3.1 肾功能生化指标 血清尿素氮(二乙酰一肟比色法)、血清肌酐(苦味酸比色法)和尿蛋白定量(CBB 法),方法与操作完全按试剂盒说明进行。

2.3.2 HE 染色 组织切片在常规脱蜡水化后用 HE 染色,胞核染成蓝色,胞质染成红色,光镜下观察肾组织细胞的结构。

2.3.3 凋亡细胞检测 原位末端标记法(TUNEL),操作严格按照试剂盒说明书,免疫组化 ABC 染色法,DAB 显色,苏木素轻度复染、脱水、透明、封片。细胞核中出现棕黄色颗粒为原末端标记阳性细胞,即凋亡细胞。在光镜(×400)下每张切片对 10 个连续不重叠的视野中阳性细胞进行计数,计算每 100 个细胞中平均阳性凋亡细胞数(AI)。

2.4 统计学方法

所有数值以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。实验数据处理使用 SPSS 11.5 统计软件,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

3 结果

3.1 肾功能检测结果

附表示,力竭运动组的血清尿素氮和肌酐显著高于安静对照组和力竭运动前健脾后补肾组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。尿蛋白含量力竭运动组最高,与安静对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$),与力竭运动前健脾后补肾组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。力竭运动前健脾后补肾组的血清尿素氮肌酐、尿蛋白均略高于安静对照组,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3.2 HE 染色结果

光镜下安静对照组的肾小球毛细血管球结构正常,无坏死,无细胞及纤维增生,囊腔无狭窄或扩张;肾小管上皮细胞无水肿、变性或坏死脱落,无管腔狭窄和扩张;间质无水肿和炎性细胞浸润。力竭运动组肾小球毛细血管球偶见小灶性均质红染、无结构的细胞破碎坏死,部分肾小管上皮细胞可见轻度水肿,管腔可见狭窄或扩张,肾小管排列疏松,间质有轻度水肿。力竭运动前健脾后补肾组肾小管上皮细胞也偶见轻度水肿和增生,但无坏死脱落,管腔未有明显狭窄或扩张,肾间质和肾小球毛细血管球结构正常。

3.3 细胞凋亡检测结果

应用 TUNEL 法检测细胞凋亡,凋亡细胞核呈棕

附表 各实验组大鼠血清尿素氮、肌酐、尿蛋白含量和肾组织细胞凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血清尿素氮(mmol/L)	血清肌酐(μ mol/L)	尿蛋白(mg/L)	AI
安静对照组	8	4.43±0.89	89.22±58.24	19.91±8.71	2.28±0.26
力竭运动组	8	5.48±1.00**△	190.19±35.90**△	39.53±12.57*	14.26±4.19**△
力竭运动前健脾后补肾组	8	4.55±0.77	130.68±15.25	30.58±11.15	5.36±2.88

与安静对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与力竭运动前健脾后补肾组比较,△ $P < 0.05$ 。

褐染色,而正常细胞和坏死细胞的胞核则由苏木素染成蓝紫色。本实验中大鼠肾组织,安静对照组的紫蓝色肾细胞核大而清晰,大小一致,只偶见染棕褐色细胞核;力竭运动组可见较多散在、大小不一致或成片状分布的棕褐色细胞核;力竭运动前健脾后补肾组可见细胞核少量的棕褐色阳染颗粒。附表示,力竭运动组的 AI 显著高于安静对照组和力竭运动前健脾后补肾组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

肾脏负担泌尿、调节水电解质平衡及机体的一些内分泌功能,是维持机体内环境稳定的重要器官,其血流量大约占心输出量的 25%,功能的正常有赖于有效的血液供应。力竭运动由于需要满足运动器官的大量血液供应,肾上腺素和去甲肾上腺素作用下血液将发生明显的重新分配。肾脏由于血流量明显降低而形成“运动性肾缺血”,运动停止后又发生肾缺血“再灌注”^[1,3],肾脏的血流量要求高,对缺血、缺氧十分敏感^[3],由于缺血/再灌注使大量的自由基产生,自由基对肾组织产生损害,将导致肾功能降低现象^[7]。已有的研究表明,慢性疲劳性运动前健脾后补肾能降低肾组织的自由基损害^[6],对肾组织有保护作用。

血清尿素氮、血肌酐和尿蛋白是反映肾功能的重要指标,检测结果显示,力竭运动组含量显著高于安静对照组,肾脏功能损害明显;力竭运动前健脾后补肾组虽然比安静对照组高,但差异均无显著性意义,而且血清尿素氮和血肌酐显著低于力竭运动组。因此,反映了力竭运动给肾脏带来损害,力竭运动前健脾后补肾却有一定保护肾功能的作用。

HE 染色光镜检测结果表明,力竭运动主要造成肾小管上皮细胞及间质轻度水肿,肾小球可见局灶性坏死,肾小管和肾小球都可能发生结构损害,从而形成肾功能降低。力竭运动前健脾后补肾组肾小球无明显异常变化,肾小管上皮细胞偶见轻度水肿和增生,其病理变化程度明显轻于力竭运动组,因此肾功能指标比力竭运动组较优。研究中也显示,力竭运动后肾脏结构的损害和功能降低,伴随着肾细胞凋亡数目的增高,运动造成的肾功能损害与肾细胞凋亡有关,与继往的研究具有一致性。

细胞凋亡检测结果显示,正常安静对照组偶有肾细胞的凋亡,而力竭运动组的阳染凋亡细胞明显增多, AI 比安静对照组极显著增高;力竭运动前健脾后补肾组阳染凋亡细胞和 AI 虽略高于安静对照组,却显著低于力竭运动组。结合 HE 染色结果,反映力竭运动前

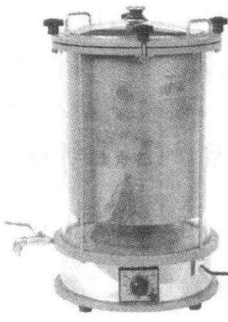
健脾后补肾控制了力竭运动造成的严重肾损伤和细胞凋亡,减轻了肾功能降低的程度。

中医学认为,脾肾互为先后天之本,功能上相互影响。运动前健脾可促进过量运动造成的湿浊运化清除,有益于肾;运动后补肾能使肾精化肾气、肾阴阳充足,肾主水泻浊的功能增强,并温煦和促进脾的运化,使体内的水湿邪浊得以及时清除。两者相辅相成,使力竭运动所形成的过多水湿邪浊免于壅积,而不致伤肾,达到保护肾的功能。因此,前健脾后补肾对力竭运动肾组织损伤的不同形式——坏死或细胞凋亡都能起到影响,对减轻由力竭运动而造成的肾功能降低有一定作用。

参考文献

- [1]袁海平,陈佩杰,史仍飞,等.运动性蛋白尿与肾细胞凋亡及氧自由基代谢的关系.中国运动医学杂志,2003,22(3):254~257.
- [2]吴广礼,温进坤,韩梅,等.山莨菪碱对过度训练大鼠急性肾损伤的保护作用.中国微循环,2006,10(4):241~244.
- [3]陈伟,汤长发,唐凯.运动性蛋白尿与肾脏细胞凋亡之间关系的初探.四川体育科学,2004,(2):33~36.
- [4]刘祥梅,谭军,郑澜,等.训练前后补脾补肾对大鼠糖和氨基酸代谢某些指标的影响.中医杂志,2005,46(7):535~537.
- [5]刘祥梅,吴宇强,郑澜,等.训练前补脾后补肾对大鼠血清自由基代谢和某些生化指标的影响.体育科学,2005,25(3):55~57.
- [6]刘祥梅,郑澜,吴宇强,等.运动前后补脾、补肾对大鼠脑、肾和骨骼肌组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响.北京体育大学学报,2005,28(10):1359~1361.
- [7]王丽娜.运动性肾功能异常研究及进展.解放军体育学院学报,2005,22(1):74~77.

(收稿日期:2006-07-11;修回日期:2006-09-30)



真空式全自动煎药器

海元牌真空式全自动煎药器是国家专利产品(ZL 032127057)。本产品采用电加热,在密闭状态下可一次煎煮完成整剂中草药。采用内外两层特殊轻质耐高温玻璃真空煎煮,符合国家卫生标准。利用真空原理挤压药物,使中药有效成分得到充分析出,浓度高,成分均匀,煎完后不必人工榨药。自动控制药量、电源定时、调高低温3种控制系统。采用高效率的加热器,加热均匀,热效率高,省时、省电。产品有:3000ml 真空式全自动、3000ml 陶瓷全自动,适用于家庭;7000ml、14000ml、18000ml 真空式全自动,适用于中小中医院。产品还有简易封袋机,高温药液真空包装袋。

黑龙江省尚志市汇元塑胶有限公司电话:0451-86027273,传真:86027283,手机:13039977082。