

文章编号 1006-8147(2023)01-0046-05

论 著

过量运动对健康大鼠肾脏结构与功能的影响

王大宁,何瑞波,高洁,马刚,薄海,秦永生,彭朋

(中国人民武装警察部队后勤学院卫生勤务系,天津 300309)

摘要 目的:观察过量运动对健康大鼠肾脏结构与功能的影响并探讨其可能机制。方法:将30只健康Sprague-Dawley(SD)大鼠按照随机数字表随机分为安静对照组和过量运动组,每组15只。安静对照组在鼠笼内安静饲养,过量运动组进行16周高强度跑台力竭运动。实验后,测定24h尿蛋白(UP)、血尿素氮(BUN)和血清肌酐(SCr)含量评价肾功能;分别行HE、Masson染色观察肾脏组织病理学改变,同时获取肾小球和肾小管损伤评分以及纤维化指数(FI);免疫印迹测定转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和E-钙黏蛋白(E-CA)蛋白表达量。结果:与安静对照组比较,过量运动组肾脏结构异常,肾小球损伤评分、肾小管损伤评分、FI、UP、BUN和SCr增加(t 分别为-6.895、-7.365、-9.234、-4.964、-7.753、-16.444,均 $P<0.05$),MMP-9蛋白表达下调($t=5.077$, $P<0.05$),而TGF- β 1、 α -SMA和E-CA蛋白表达差异无统计学意义(t 分别为-1.801、-1.129、1.585,均 $P>0.05$)。结论:长期过量运动可导致健康大鼠肾脏损伤、纤维化及肾功能下降,其机制可能与肾脏胶原降解受抑制有关。

关键词 过量运动;大鼠;肾脏损伤;纤维化;肾小管上皮-间质转化

中图分类号 G804.5

文献标志码 A

Effects of excessive exercise on structure and function of kidney in healthy rats

WANG Da-ning, HE Rui-bo, GAO Jie, MA Gang, BO Hai, QIN Yong-sheng, PENG Peng

(Department of Health Service, Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300309, China)

Abstract **Objective:** To observe the effect of excessive exercise on the structure and function of kidney in healthy rats and explore the possible mechanism. **Methods:** A total of 30 healthy Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into rest control group(RC) and excessive exercise(EE) group according to the random number table, with 15 rats in each group. The rats in RC group were reared quietly in cages, while those of EE group were given high-intensity treadmill exhaustive exercise for 16 weeks. After the experiment, 24 hour urinary protein(UP), blood urea nitrogen(BUN) and serum creatinine(SCr) were measured to evaluate renal function; renal histopathological changes were observed by HE and Masson staining, glomerular and tubular injury score and fibrosis index(FI) were obtained; Western blotting method was used to detect the protein expressions of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), α -smooth muscle actin (α -SMA) and E-cadherin (E-CA). **Results:** Compared with RC group, the renal structure of EE group was abnormal, glomerular injury score, renal tubular injury score, FI, UP, BUN and SCr were increased ($t=-6.895, -7.365, -9.234, -4.964, -7.753, -16.444, P<0.05$), and the expression of MMP-9 protein was downregulated ($t=5.077, P<0.05$), however, there was no significant difference in the expression of TGF- β 1, α -SMA and E-CA protein ($t=-1.801, -1.129, 1.585, P>0.05$). **Conclusion:** Excessive exercise may induce renal injury, fibrosis and decline of renal function in healthy rats, which may be related to the inhibiting collagen degradation in the kidney.

Key words excessive exercise; rat; renal injury; fibrosis; renal tubular epithelial-interstitial transformation

规律适量运动对多种慢性非传染性疾病(心血管疾病、代谢性疾病、肿瘤等)具有预防作用^[1-2],然而过量运动则损害免疫功能并引发运动伤病^[3-6]。中低强度有氧运动对肾脏的结构与功能具有有益作用,可改善慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)患者临床症状和生活质量^[7]。研究发现,肾脏纤维化

是CKD发生、发展的病理生理学基础^[8],而转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)^[9]、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)^[10]介导的细胞外基质合成与分解稳态失衡(合成增加、分解减少)以及肾小管上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transdifferentiation, EMT)^[9]是肾脏纤维化最主要的分子机制。但长期大负荷训练对肾脏的不良效应鲜有关注,其表现与机制是否与CKD类似尚不得而知。本研究旨在观察长期过量运动对健康大鼠肾脏结构与功能的影响并探讨其可能机制。

基金项目 天津市自然科学基金项目(17JCYBJC27400);全军军事理论科研计划项目一般项目(2022250);武警后勤学院基础研究项目(WHY202107);武警后勤学院创新团队项目

作者简介 王大宁(1979-),女,副教授,博士,研究方向:军事训练医学;通信作者:彭朋, E-mail: doctorpeng2006@126.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物 3月龄雄性SPF级Sprague-Dawley (SD)大鼠30只,体重(215 ± 13)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2018-0027。将其随机分为安静对照组($n=15$)和过量运动组($n=15$)。大鼠分笼(5只/笼)饲养,12 h/12 h昼夜交替,自由进食水。动物适应环境1周后开始实验,其中安静对照组在鼠笼内安静饲养,过量运动进行8周高强度跑台力竭运动。实验实施过程中,由于拒跑、意外死亡等原因,安静对照组剔除1只、过量运动组剔除3只动物,因此最终纳入统计的样本量为:安静对照组($n=14$)、过量运动组($n=12$)。

1.2 大鼠跑台训练方案 各组大鼠在正式训练前先进行1周跑台适应性训练,方法简述如下:运动强度为10~15 m/min(跑速),跑台坡度为 0° ,运动时间为15~30 min/d,运动强度和时间逐渐递增。随后参照 Benito 等^[3]的既往研究并稍加修改制定本研究过量运动组的训练方案,即大鼠先进行为期2周的渐进跑台训练,速度(强度)从10 cm/s 逐渐增加至60 cm/s,时间从10 min/次递增至持续60 min,5次/周。此后,维持该运动强度、运动时间动和运动频率,共训练16周。

1.3 血液、尿液收集与组织取材 末次训练后72 h(避免急性运动的影响),利用代谢笼收集动物24 h的尿液。大鼠称重后行腹腔麻醉,心脏取血3 mL、离心取血清,随后迅速分离左侧肾脏组织并将其分为两等份,一部分利用HE或Masson染色进行组织病理学观察,另一部分采用免疫印迹检测相关蛋白表达水平。

1.4 肾脏功能测定 肾脏功能的检测指标包括24 h蛋白尿(24-hour urinary protein, UP)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, SCr)。将尿液离心(0°C 、4 000 r/min)30 min后取上清,全自动生化分析仪(迈瑞 BS-280,美国)检测肾脏功能各指标含量。

1.5 骨骼肌损伤标志物测定 利用酶联免疫吸附法(BIO-RAD 680型酶标仪,美国)测定血清肌酸激酶(creatine kinase, CK)骨骼肌型(CK-MM)和尿液中肌红蛋白(myoglobin, Mb)含量。严格按试剂盒说明书步骤操作。

1.6 肾脏组织病理学观察及肾脏损伤与纤维化检测 将肾脏组织置于4%多聚甲醛溶液中固定12 h,依次经过脱水、包埋等步骤制作4 μm 厚度组织切片。随后脱蜡,利用HE或Masson染色,中性树胶封

片。每张切片选取10个视野,采用日本产欧林巴斯IX71型倒置相差显微镜进行组织病理学观察。通过HE染色观察肾小球和肾小管损伤情况并进行组织损伤评分^[11-12],利用Masson染色观察胶原沉积情况,用胶原面积与所测视野面积的比值作为肾脏纤维化指数(fibrosis index, FI)。利用美国产Image Pro Plus 6.0图像分析软件进行测量。

1.7 免疫印迹检测蛋白水平 取适量肾脏组织进行匀浆,离心(0°C 、13 000 r/min)15 min后取上清,采用考马斯亮蓝法测定总蛋白浓度。利用Western印迹法(免疫印迹技术)检测肾脏蛋白表达水平,包括TGF- $\beta 1$ 、MMP-9、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-CA),方法为:取100 μg 蛋白样品在垂直电泳仪上经10% SDS-PAGE分离蛋白,随后转移至PVDF膜上。兔抗鼠一抗(TGF- $\beta 1$, 1:1 000; MMP-9, 1:2 000; α -SMA: 1:1 000; E-CA, 1:500; 均购自美国Santa公司)4 $^\circ\text{C}$ 静置孵育过夜,羊抗兔二抗(1:5 000, 武汉博士德生物工程有限公司)37 $^\circ\text{C}$ 孵育2 h。充分洗涤后,ECL发光成像,利用美国产ChemiDoc XRS型凝胶成像系统拍摄并扫描各条带灰度值。以 β -actin(一抗1:2 000, 美国Santa公司)作为内参蛋白对各目的蛋白进行标准化,取各组目的蛋白与安静对照的比值作为相对表达量。

1.8 统计学处理 所有数据采用SPSS 20.0统计软件进行分析。各组数据经正态性检验,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用独立样本 t 检验。显著性水平定为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组肾脏功能的比较 肾脏功能检测显示,与安静对照组比较,过量运动组UP、BUN和SCr升高($P<0.05$),见表1。

表1 肾脏功能的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of kidney function($\bar{x}\pm s$)

分组	<i>n</i>	UP(mg/24 h)	BUN(mmol/L)	SCr($\mu\text{mol/L}$)
RC组	14	91.6 \pm 8.7	5.3 \pm 1.1	38.1 \pm 5.0
EE组	12	163.1 \pm 51.5	12.9 \pm 3.6	87.6 \pm 9.9
<i>t</i>		-4.964	-7.753	-16.444
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:UP:24 h蛋白尿;BUN:血尿素氮;SCr:血清肌酐;RC:安静对照组;EE:过量运动组

2.2 两组骨骼肌损伤标志物的比较 骨骼肌损伤标志物检测显示,与安静对照组比较,过量运动

组血清 CK-MM 和尿 Mb 含量的变化无统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

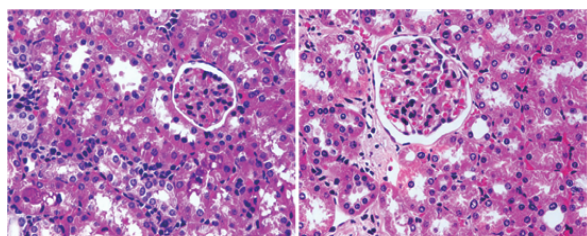
表 2 骨骼肌损伤标志物的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of markers of skeletal muscle injury ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	血清 CK-MM(U/L)	尿 Mb(ng/mL)
RC 组	14	550.4±280.1	2.92±2.01
EE 组	12	600.7±229.2	3.50±1.49
<i>t</i>		-0.495	-0.829
<i>P</i>		0.625	0.415

注:CK-MM:肌酸激酶骨骼肌型;Mb:肌红蛋白;RC:安静对照组;EE:过量运动组

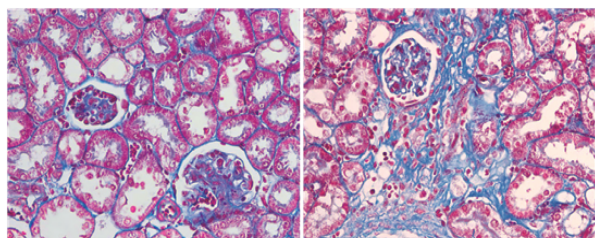
2.3 两组肾脏病理组织学改变 安静对照组大鼠肾脏组织 HE 染色(图 1)可见肾小球、肾小管形态与结构并无异常,Masson 染色(图 2)显示肾间质中几乎未见胶原沉积;过量运动组动物肾脏组织 HE 染色显示肾小球基底膜明显增厚,肾小球显著扩张,肾小管上皮细胞出现水肿坏死,管腔增大,Masson 染色显示肾间质中出现大量胶原沉积。与安静对照组比较,过量运动组肾小球损伤评分、肾小管损伤评分以及 FI 均显著性升高($t = -6.895, -7.365, -9.234$, 均 $P < 0.05$),见图 3、4。



注:RC:安静对照组;EE:过量运动组

图 1 肾脏组织 HE 染色(400×)

Fig 1 HE staining of kidney tissue(400×)

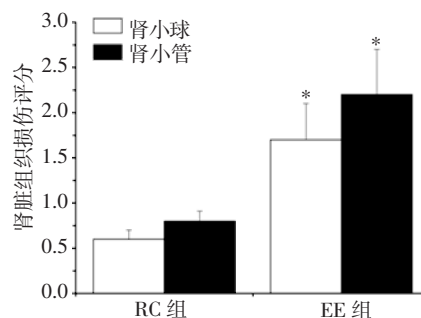


注:RC:安静对照组;EE:过量运动组

图 2 肾脏组织 Masson 染色(400×)

Fig 2 Masson staining of kidney tissue(400×)

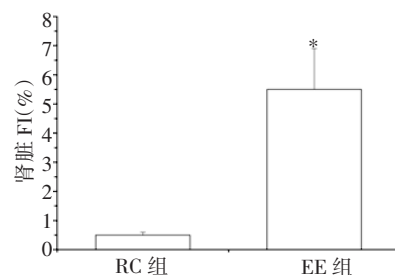
2.4 两组蛋白表达水平的比较 与安静对照组比较,过量运动组 MMP-9 蛋白表达下调($t = 5.077$, $P < 0.05$),而 TGF- $\beta 1$ ($t = -1.801$, $P = 0.092$)、 α -SMA ($t = -1.129$, $P = 0.279$)和 E-CA 蛋白($t = 1.585$, $P = 0.128$)表达差异无统计学意义,见图 5~8。



注:RC:安静对照组;EE:过量运动组;与 RC 组比较, $*P < 0.05$

图 3 肾脏组织损伤评分

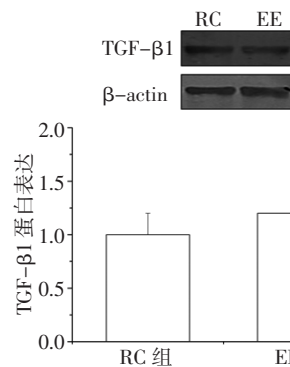
Fig 3 Injury score of kidney tissue



注:FI:纤维化指数;RC:安静对照组;EE:过量运动组;与 RC 组比较, $*P < 0.05$

图 4 肾脏 FI 的变化

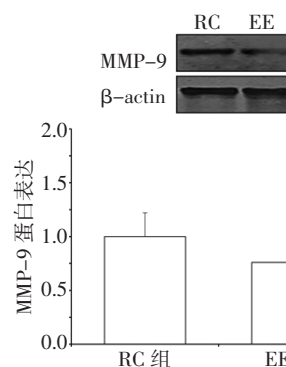
Fig 4 Changes of FI in kidney tissue



注:TGF- $\beta 1$:转化生长因子- $\beta 1$;RC:安静对照组;EE:过量运动组

图 5 两组 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达水平的比较

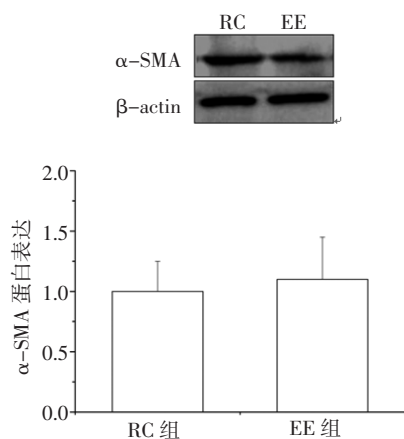
Fig 5 Comparison of TGF- $\beta 1$ protein expression levels between two groups



注:MMP-9:基质金属蛋白酶-9;RC:安静对照组;EE:过量运动组;与 RC 组比较, $*P < 0.05$

图 6 两组 MMP-9 蛋白表达水平的比较

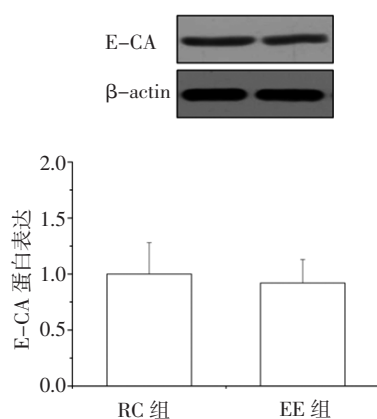
Fig 6 Comparison of MMP-9 protein expression levels between two groups



注:α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白;RC:安静对照组;EE:过量运动组

图7 两组α-SMA蛋白表达水平的比较

Fig 7 Comparison of α-SMA protein expression levels between two groups



注:E-CA:E-钙黏蛋白;RC:安静对照组;EE:过量运动组

图8 两组E-CA蛋白表达水平的比较

Fig 8 Comparison of E-CA protein expression levels between two groups

3 讨论

CKD常伴随肾脏纤维化和肾功能损害^[8],而高强度剧烈运动或不习惯的离心运动同样可导致肾脏损伤^[13]。肾脏损伤最主要的表现是纤维化,表现为间质胶原过度沉积以及肾脏硬度增加^[8]。在本研究中,过量运动组组织病理学观察显示,肾小球和肾小管发生损伤性变化以及间质纤维化,同时UP、BUN和SCr升高,提示过量运动诱导的肾脏结构损伤与功能损害与CKD表型相似。Aparicio等^[14]报道,健康大鼠在完成为期12周(每周4次)的高强度力量训练后肾脏组织形态与结构均发生损伤,胶原纤维含量明显升高,但肾脏功能却并未出现显著改变,这可能与肾单位具有巨大的代偿能力以及训练干预周期较短有关。研究发现,高强度离心运动(如跑台下坡跑)可诱导肌肉损伤甚至肌细胞崩解,

严重时可发生横纹肌溶解症,肌红蛋白等肌肉蛋白漏出后损伤肾小管^[15]。然而在本研究中,过量运动组大鼠血清CK-MM以及尿Mb含量均与安静对照组无显著性差异,提示本研究采用的大强度向心运动(跑台上坡跑)并未造成明显的肌肉损伤,因此过量运动组肾脏损伤并非肌肉损伤造成的。大强度向心运动诱导的肾脏损伤可能与肾脏缺血一再灌注有关^[13],能量耗竭、炎症、氧化应激、内质网应激和细胞自噬等则是介导这一过程的主要病理生理机制^[8,13]。

TGF-β1是迄今研究最多、最重要的致纤维化细胞因子(促胶原合成因子)^[9],而MMP-9则是介导胶原降解的关键酶^[10],两者对于维持胶原代谢(合成、降解)稳态平衡具有重要作用。CKD时MMP-9表达下调,TGF-β1上调,故病理性肾脏纤维化是胶原降解减少和胶原合成增加共同作用的结果^[8]。然而在本研究中,与安静对照组比较,过量运动组MMP-9蛋白表达下调,而TGF-β1则无显著性变化,提示过量运动诱导的肾脏纤维化是通过抑制胶原降解实现的,对胶原合成并无显著影响,这一点与CKD肾脏纤维化不同。运动下调MMP-9可能与组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)表达上调有关,后者具有抑制MMP-9表达并以防止ECM过度降解的作用^[16]。此外,CKD时TGF-β1尚能够诱发肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转化,后者则具有强大的细胞外基质分泌能力,这一现象称为EMT。研究证实,EMT是多种病因造成肾脏纤维化发生、发展的重要生物学机制。在EMT进程中,肾小管上皮细胞分泌大量细胞外基质,同时细胞抗凋亡水平以及迁移能力显著提高^[9]。此外,肾小管上皮细胞表型亦发生明显改变,即逐渐丧失上皮细胞黏附特性及E-CA等表皮黏附分子表达水平下调,转为重新表达α-SMA等间充质细胞表型。然而本研究却发现,过量运动组E-CA和α-SMA蛋白表达量与安静对照组均无显著性差异,说明过量运动并未诱导肾脏发生EMT,其机制未明。

关于心肌纤维化的研究较为透彻,其中Aschar等^[17]发现,长期高强度运动诱导小鼠发生心房纤维化,但组织中肌成纤维细胞数量并未显著增加。心肌纤维化表型依据有无细胞坏死及瘢痕形成可分为3种类型:反应型心肌纤维化、浸润型心肌纤维化以及替代型心肌纤维化^[18]。其中反应型心肌纤维化一般不存在细胞坏死,浸润型和替代型心肌纤

维化存在炎性细胞浸润、细胞凋亡坏死甚至瘢痕组织,同时伴随成纤维细胞向成肌纤维细胞转分化,后者胶原蛋白合成及分泌能力显著提高,因此成肌纤维细胞具有较强的促纤维化作用^[18],其特征性生物标志物 α -SMA 表达水平显著升高。研究标明, α -SMA 表达量是辨别心肌纤维化类型的主要参考标准^[19]。Benito 等^[3]采用与本研究相似的跑台运动方案,结果发现,16 周持续高强度训练诱发健康大鼠出现心肌胶原沉积以及心肌纤维化,然而 α -SMA 蛋白表达水平并未出现显著性改变,说明剧烈运动诱导心肌发生反应性纤维化。该研究还发现,大鼠经过高强度训练后停训 8 周,心肌纤维化得以完全逆转。根据 Benito 等^[3]的研究数据以及本研究结果,推测高强度运动诱导的组织纤维化与病理性纤维化具有本质区别,运动性肾脏纤维化的病理表现、细胞表型及发生机制可能与反应型心肌纤维化类似并可能具有可逆性特征,若及时停训或降低运动强度及运动量则可能减轻肾脏纤维化程度,然而这一假设尚需要进一步证实。

长期过量运动可导致健康大鼠肾脏损伤、纤维化及肾功能下降,其机制可能与肾脏胶原降解受到抑制有关,但由于胶原合成信号通路以及 EMT 未受影响,因此过量运动诱导的肾脏损伤可能具有可逆性特征。

参考文献:

- [1] PEDERSEN B K, SALTIN B. Exercise as medicine—evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases[J]. Scand J Med Sci Sports, 2015, 25(Suppl 3): 1–72.
- [2] LIEBERMAN D E. Is exercise really medicine? An evolutionary perspective[J]. Curr Sports Med Rep, 2015, 14(4): 313–319.
- [3] BENITO B, GAY-JORDI G, SERRANO-MOLLAR A, et al. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training[J]. Circulation, 2011, 123(1): 13–22.
- [4] 黄凯, 彭朋, 李晓霞. 长期自主跑轮运动对心肌梗死大鼠心肌重塑的影响[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2015, 24(5): 337–341.
- [5] 彭朋, 薄海, 王大宁, 等. 连续 3d 大负荷军事训练对武警战士淋巴细胞亚群的影响[J]. 武警医学, 2012, 23(11): 941–943.
- [6] 彭朋, 孙伯贻, 秦永生, 等. 一次高强度间歇训练对武警士兵淋巴细胞亚群分布以及 Th1/Th2 和 Th17/Treg 稳态平衡的影响[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2019, 28(7): 26–30.
- [7] PEI G, TANG Y, TAN L, et al. Aerobic exercise in adults with chronic kidney disease (CKD): a meta-analysis[J]. Int Urol Nephrol, 2019, 51(10): 1787–1795.
- [8] SUN H J. Current opinion for hypertension in renal fibrosis[J]. Adv-Exp Med Biol, 2019, 1165(15): 37–47.
- [9] HU H H, CHEN D Q, WANG Y N, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis[J]. Chem Biol Interact, 2018, 292(10): 76–83.
- [10] ZHOU J, CHEN X M, LIU S W, et al. Effects of Biejia Ruangan Tablet-containing serum on matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cultured renal interstitial fibroblasts[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(2): 152–156.
- [11] ZHAN M, USMAN I M, SUN L, et al. Disruption of renal tubular mitochondrial quality control by Myo-inositol oxygenase in diabetic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(6): 1304–1321.
- [12] TERVAERT T W, MOOYAART A L, AMANN K, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(4): 556–563.
- [13] BONGERS C, ALSADY M, NIJENHUIS T, et al. Impact of acute versus prolonged exercise and dehydration on kidney function and injury[J]. Physiol Rep, 2018, 6(11): e13734.
- [14] APARICIO V A, TASSI M, NEBOT E, et al. High-intensity exercise may compromise renal morphology in rats [J]. Int J Sports Med, 2014, 35(8): 639–644.
- [15] LOLLO P C, MOURA C S, MORATO P N, et al. Differential response of heat shock proteins to uphill and downhill exercise in heart, skeletal muscle, lung and kidney tissues[J]. J Sports Sci Med, 2013, 12(3): 461–466.
- [16] ZAOUI P, CANTIN J F, ALIMARDANI-BESSETTE M, et al. Role of metalloproteases and inhibitors in the occurrence and progression of diabetic renal lesions[J]. Diabetes Metab, 2000, 26(Suppl 4): 25–29.
- [17] ASCHAR-SOBBI R, IZADDOUSTDAR F, KOROGYI A S, et al. Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNF α [J]. Nat Commun, 2015, 6(19): 1–35.
- [18] 王世强, 常芸, 李丹, 等. 运动性心肌纤维化的发生特征、可能机制和消退逆转[J]. 体育科学, 2018, 38(11): 81–91.
- [19] VERES-SZÉKELY A, PAP D, SZIKSZ E, et al. Selective measurement of α smooth muscle actin: why β -actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs? [J]. BMC Mol Biol, 2017, 18(1): 12–17.

(2022-05-09 收稿)