

# 急性力竭运动后小鼠肾细胞凋亡水平的变化及牛磺酸的保护作用

李艳

淮北师范大学生命科学学院 淮北 235000

**摘要:** 为探讨急性力竭运动后小鼠(*Mus musculus*)肾细胞凋亡水平的时相性变化及牛磺酸对肾的保护作用,将56只雄性小鼠随机分为对照组、力竭运动组(分为运动后即刻组、12 h组、24 h组和48 h组)及牛磺酸运动组(分为12 h组和24 h组),每组8只,一次性力竭游泳运动后检测肾细胞凋亡水平、Bcl-2和Bax蛋白表达、一氧化氮(NO)含量及结构型一氧化氮合酶(cNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性的变化。结果显示,力竭运动后各组小鼠肾细胞凋亡水平呈先升高后下降的趋势,其中运动后24 h组的凋亡水平达峰值( $P < 0.05$ )。与对照组相比,运动各组Bax表达均显著增强( $P < 0.05$ )。除运动后即刻组外,运动各组Bcl-2表达显著减弱( $P < 0.05$ )。各组Bax/Bcl-2比值显著升高,并在运动后24 h达峰值( $P < 0.01$ ),后出现下降趋势。小鼠力竭游泳后24 h和48 h肾组织NO含量显著高于对照组( $P < 0.05$ ),同时iNOS活性升高( $P < 0.01$ ),cNOS活性无显著性变化。相比同时刻运动组,牛磺酸运动组小鼠肾细胞凋亡水平、Bax表达及Bax/Bcl-2比值、iNOS活性显著降低( $P < 0.05$ ),Bcl-2表达显著升高( $P < 0.05$ )。以上结果表明,急性力竭运动可导致肾细胞凋亡的发生,iNOS、Bax、Bcl-2水平及Bax/Bcl-2比值可能在肾细胞凋亡的发生过程中发挥重要的介导作用。牛磺酸可通过调控iNOS活性及Bax/Bcl-2比值,抑制急性力竭运动后小鼠肾细胞凋亡的发生。

**关键词:** 力竭运动;肾;一氧化氮;Bax;Bcl-2;牛磺酸

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2013)01-102-07

## Changes of Renal Cell Apoptosis Level after Acute Exhaustive Exercise and Preventive Effect of Taurine in Mice

LI Yan

School of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China

**Abstract:** To study the changes of renal cell apoptosis after acute exhaustive exercise and the protective effect of taurine, forty six male mice (*Mus musculus*) were randomly divided into control group, exhaustive exercise group (instant group, 12, 24 and 48 hours after exercise group), and taurine group (12 and 24 hours after exercise group), 8 mice in each group. Changes of cell apoptosis, Bcl-2 and Bax expressions, nitric oxide (NO) content, constitutive nitric oxide synthase (cNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity of renal tissue were detected. The results showed that renal cell apoptosis level first increased, and then decreased, with a peak level at 24 h ( $P < 0.05$ ). Compared to the control group, Bax expression in exercise group significantly increased ( $P < 0.05$ ). Bcl-2 expression of exercise groups significantly decreased except for

**基金项目** 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(No. KJ20098132Z),淮北师范大学校青年项目;

**第一作者简介** 李艳,女,硕士;研究方向:生理学;E-mail:jylycs@126.com。

收稿日期:2012-06-12,修回日期:2012-09-30

instant group ( $P < 0.05$ ). The ratio of Bax/Bcl-2 increased, and reached a peak level at 24 h ( $P < 0.05$ ), and then decreased. The NO level of exercise group was significantly higher than that of the control group 24 h and 48 h after exhaustive exercise ( $P < 0.05$ ), and iNOS activity increased at the same time ( $P < 0.01$ ). The activity of cNOS had no significant change. Compared to the exercise group, the apoptosis level, Bax expression, Bax/Bcl-2 ratio and iNOS activity of taurine group decreased at the same time point ( $P < 0.05$ ), while Bcl-2 expression increased ( $P < 0.05$ ). The results indicate that acute exhaustive exercise leads to renal cell apoptosis, and that iNOS, Bax, Bcl-2 and the Bax/Bcl-2 ratio may play an important role in the process of renal cell apoptosis. Taurine can inhibit renal cell apoptosis by regulating iNOS activity, Bax and Bcl-2 expression as well as the Bax/Bcl-2 ratio.

**Key words:** Exhaustive exercise; Kidney; Nitric oxide; Bax; Bcl-2; Taurine

目前对于运动与肾细胞凋亡关系的研究认为,过度运动可导致凋亡异常增加,与运动性蛋白尿、运动性血尿等各种运动性肾损伤的发生有关(袁海平等 2003)。如何通过营养手段调控机体细胞凋亡水平,提高人体运动能力是当前的研究热点。牛磺酸是动物体内的一种含硫氨基酸,研究表明牛磺酸能减少运动时脂质过氧化产物的产生,促进运动后机体抗氧化酶活力的增加(张宜龙等 1999)。目前,关于牛磺酸对机体保护作用的研究多集中于心血管、神经及生殖等系统,对运动所致肾损伤的保护作用未见报道。本实验选用牛磺酸作为营养补剂,观察急性力竭运动及运动前补充牛磺酸对小鼠(*Mus musculus*)肾细胞凋亡、一氧化氮(nitric oxide, NO)含量、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、结构型一氧化氮合酶(constitutive nitric oxide synthase, cNOS)活性及凋亡调控蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响,研究肾细胞凋亡与运动损伤的关系,探讨牛磺酸对运动所致肾损伤的影响及其机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 昆明种系雄性健康小白鼠 56 只,体重(18~22)g,购于徐州医学院实验动物中心,进行 3 d 适应性喂养后,随机分为对照组(8 只,无运动,安静状态下取材),力竭运动组(32 只)和牛磺酸运动组(16 只)。力竭运动组又根据运动后的取材时间分为即刻组、运动后 12 h 组、运动后 24 h 组、运动后 48 h 组,每组 8 只。牛磺酸运动组根据运动后的取材时间又分

为牛磺酸 12 h 组、牛磺酸 24 h 组,每组 8 只。各组动物常规喂养 2 周,补牛磺酸组小鼠每日灌胃一次牛磺酸溶液(按照小鼠的体重 300 mg/kg)。

**1.2 运动方案** 在玻璃钢水池中[水深 45 cm,水温(30±1)℃]进行游泳运动。训练时用玻璃棒驱赶不游小鼠以保证负荷量。正式实验开始前先进行 3 d 适应性游泳,每天一次,每次 15 min,第 4 天进行一次性力竭游泳。力竭标准:游泳动作明显不协调;小鼠沉入水面下 10 s 不能自主浮出水面;放在平板上无法完成翻正反射(黄旭东等 2011)。

**1.3 取材方法** 各组小鼠运动后相应时段取材,采用颈椎脱臼方法处死。剖开腹腔,迅速摘取肾,用生理盐水漂洗干净,滤纸吸干水分,一部分样本常规 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,另一部分用电动匀浆器制备成 10% 的匀浆,用于检测 NO 含量及 NOS 活性。

**1.4 观测指标及方法** 采用 TUNEL 法检测肾组织细胞凋亡,试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,细胞核中有棕黄色颗粒者判定为阳性细胞,即凋亡细胞。每张切片计数 5 个高倍视野(400×)中的阳性细胞数,计算凋亡指数(apoptosis index, AI): $AI = (\text{阳性细胞数} / \text{视野内所有细胞数}) \times 100\%$ 。免疫组织化学技术检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达,检测试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达产物呈棕黄色或棕褐色颗粒,位于胞浆,偶见于胞膜或胞核,细胞核被苏木素复染成蓝色。在光学显微镜(×400)下每张切

片随机观察 5 个视野, Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定 Bax、Bcl-2 蛋白表达的平均光密度。硝酸还原酶法测定 NO 浓度。NOS 有 eNOS 和 iNOS 两种类型, 其测定原理是根据 NOS 催化 L-精氨酸(L-Arg) 和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核性物质生成有色化合物, 在 530 nm 波长下测定吸光度, 根据吸光度大小可计算出 NOS 活力。通过加入抑制剂可抑制结构型(eNOS)的活力, 从而测出诱导型(iNOS)的活力。考马斯亮蓝法测定组织蛋白质含量。试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

**1.5 数据处理** 采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据分析。所有数据以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示, 采用方差分析和配对样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠肾细胞凋亡指数的变化** 小鼠力竭运动后肾细胞凋亡水平呈现先上升后下降的趋势, 力竭运动后 12 h、24 h、48 h 均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。与同时刻运动组相比, 牛磺酸组细胞凋亡指数显著降低 ( $P < 0.05$ ) (表 1, 图 1)。

### 2.2 各组小鼠肾 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化

从检测结果来看, 各组小鼠肾小管和肾小球细胞浆中均可见 Bcl-2 蛋白表达, 呈棕黄色。运动后 12 h、24 h、48 h 组均显著低于对照组; 牛磺酸组显著高于同时刻运动组 ( $P < 0.05$ ),

**表 1 各组小鼠肾细胞凋亡指数**  
**Table 1 The renal cell apoptosis index in different groups of mice**

组别 Group	细胞凋亡指数 Apoptosis index	
对照组 Control group	1.79 ± 0.41	
即刻组 Instant group	3.61 ± 0.85	
运动组 Exercise group	12 h 组 12 hours group 24 h 组 24 hours group 48 h 组 48 hours group	11.73 ± 2.82* 27.04 ± 6.93* 22.52 ± 3.66*
牛磺酸组 Taurine group	12 h 组 12 hours group 24 h 组 24 hours group	5.27 ± 1.64# 7.91 ± 1.95#

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与同时刻运动组比较, #  $P < 0.05$ 。

Compared to control group, \*  $P < 0.05$ ; Compared to the exercise group of the same time, #  $P < 0.05$ .

而与对照组无显著差异(表 2, 图 2)。力竭运动各组及牛磺酸组 Bax 表达均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ) (表 2, 图 3); 牛磺酸组与同时刻运动组比较, Bax 表达明显减弱 ( $P < 0.05$ )。运动各组 Bax/Bcl-2 比值均显著高于对照组(表 2), 其中, 运动后 24 h 达峰值, 与对照组相比有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 至运动后 48 h 呈现下降趋势, 但仍显著高于对照组; 牛磺酸各组显著低于同时刻运动组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 各组小鼠肾 NO 含量、NOS 活性的变化

小鼠力竭游泳后 12 h 内, 肾 NO 水平呈现先升高后下降的趋势, 但均与对照组无显著差异。运动后 24 h 再次升高, 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 并于运动后 48 h 又出现下降趋势(表 3)。

**表 2 各组小鼠肾 Bcl-2、Bax 蛋白表达**

**Table 2 Expression of Bax and Bcl-2 in renal tissue of different groups of mice**

组别 Group	Bcl-2	Bax	Bax/Bcl-2
对照组 Control group	0.27 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.67 ± 0.23
即刻组 Instant group	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.01*	0.88 ± 0.35*
运动组 Exercise group	12 h 组 12 hours group 24 h 组 24 hours group 48 h 组 48 hours group	0.24 ± 0.03* 0.18 ± 0.01* 0.20 ± 0.02*	1.13 ± 0.57* 1.63 ± 0.48** 1.45 ± 0.42*
牛磺酸组 Taurine group	12 h 组 12 hours group 24 h 组 24 hours group	0.28 ± 0.01# 0.26 ± 0.02#	0.77 ± 0.29*# 0.92 ± 0.31*#

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与同时刻运动组比较, #  $P < 0.05$ 。

Compared to control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Compared to the exercise group of the same time, #  $P < 0.05$ .

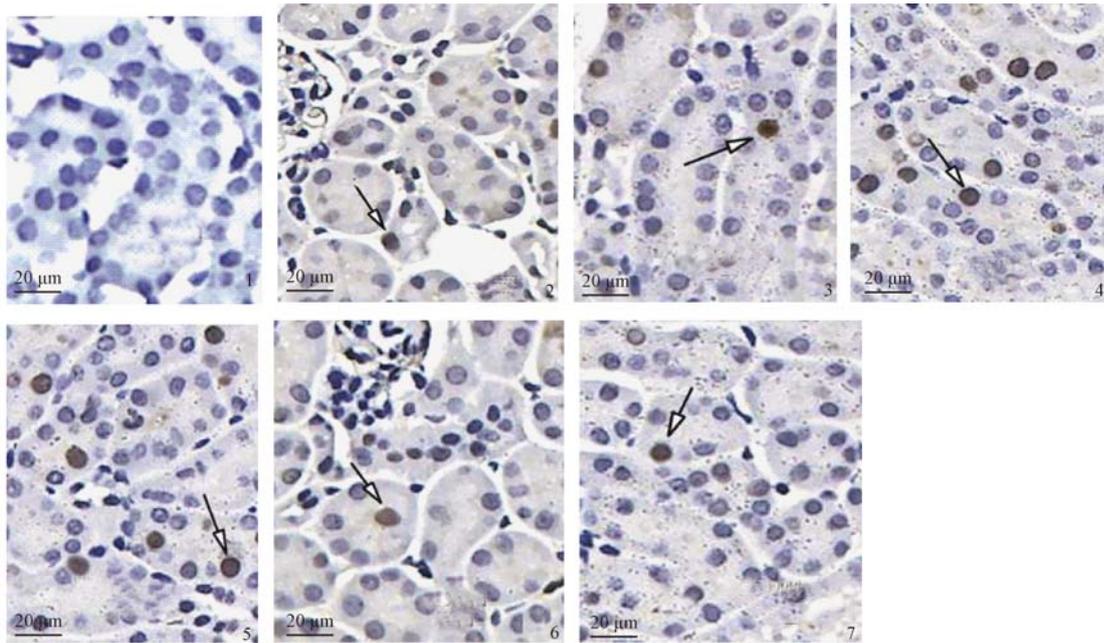


图 1 各组小鼠肾组织 TUNEL 染色 (×400)

Fig.1 The TUNEL dying of renal tissue in different groups of mice

1. 对照组; 2. 运动后立即组; 3. 运动后 12 h 组; 4. 运动后 24 h 组; 5. 运动后 48 h 组; 6. 牛磺酸 12 h 组; 7. 牛磺酸 24 h 组。箭头示凋亡细胞。

1. Control group; 2. Instant group; 3. 12 hours group; 4. 24 hours group; 5. 48 hours group; 6. Taurine 12 hours group; 7. Taurine 24 hours group. Arrow shows the apoptotic cell.

表 3 各组小鼠肾的 NO 含量、NOS 活性

Table 3 The NOS activity and NO content in renal tissue of different groups

组别 Group	一氧化氮 Nitric oxide NO ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	结构型一氧化氮合酶 Constitutive nitric oxide synthase cNOS (U/mg prot)	诱导型一氧化氮合酶 Inducible nitric oxide synthase iNOS (U/mg prot)
对照组 Control group	$6.48 \pm 4.20$	$0.28 \pm 0.02$	$0.08 \pm 0.03$
即刻组 Instant group	$8.37 \pm 5.48$	$0.34 \pm 0.04$	$0.11 \pm 0.03$
运动组 Exercise group			
12 h 组 12 hours group	$1.74 \pm 0.92$	$0.25 \pm 0.03$	$0.13 \pm 0.02$
24 h 组 24 hours group	$15.95 \pm 7.85^*$	$0.24 \pm 0.02$	$0.31 \pm 0.03^{**}$
48 h 组 48 hours group	$11.64 \pm 3.63^*$	$0.25 \pm 0.03$	$0.30 \pm 0.04^{**}$
牛磺酸组 Taurine group			
12 h 组 12 hours group	$2.62 \pm 1.43$	$0.32 \pm 0.03$	$0.12 \pm 0.05$
24 h 组 24 hours group	$13.36 \pm 3.27^*$	$0.35 \pm 0.04$	$0.17 \pm 0.12^{*#}$

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与运动组同时刻比较, #  $P < 0.05$ 。

Compared to control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Compared to the exercise group of the same time, #  $P < 0.05$ .

牛磺酸 12 h 组与对照无显著差异,牛磺酸 24 h 组显著高于对照组,而与同时刻运动组无显著差异。cNOS 各组均与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。iNOS 活性呈逐渐升高的趋势,运动后 24 h 和 48 h 均极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

牛磺酸 24 h 组 iNOS 活性显著高于对照,而低于同时刻运动组 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

### 3 分析与讨论

在运动过程中,由于血液向骨骼肌的重新

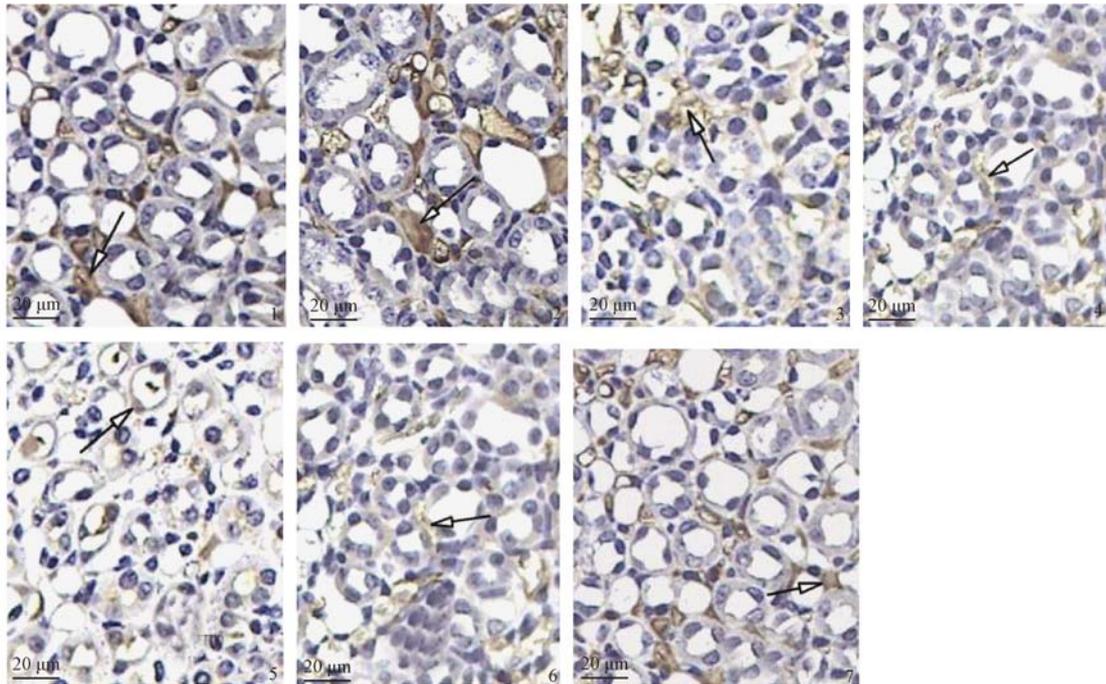


图 2 各组小鼠肾 Bcl-2 的表达(×400)

Fig. 2 Expression of Bcl-2 in renal tissue of different groups

1. 对照组; 2. 运动后立即组; 3. 运动后 12 h 组; 4. 运动后 24 h 组; 5. 运动后 48 h 组; 6. 牛磺酸 12 h 组; 7. 牛磺酸 24 h 组。箭头示阳性细胞。

1. Control group; 2. Instant group; 3. 12 hours group; 4. 24 hours group; 5. 48 hours group; 6. Taurine 12 hours group; 7. Taurine 24 hours group. Arrow shows the positive cell.

分配使肾血流量下降,至运动结束后肾血流逐渐恢复,整个过程中血流量的变化可直接导致运动性血尿、运动性蛋白尿等肾结构和功能异常的发生。运动性肾损伤的发生机制复杂,细胞凋亡在其中发挥重要作用。本实验研究结果显示,急性力竭运动可诱导肾细胞凋亡异常增加,且运动后肾的细胞凋亡在不同阶段存在一定的差异,24 h 内呈现持续上升趋势,后开始下降。运动诱导肾细胞凋亡的机制可能与凋亡相关基因、氧化与抗氧化系统失衡,细胞内  $Ca^{2+}$  浓度变化以及机械损伤等因素有关。牛磺酸是机体的内源性氨基酸,现在研究证明,其可参与调节肾多项生理功能,在缺血再灌注损伤中对肾发挥保护作用(Guz et al. 2007, Li et al. 2009)。本实验结果显示,牛磺酸运动组小鼠肾细胞凋亡指数与同时刻运动组相比显著降低,表明牛磺酸可抑制急性运动所诱导的细胞

凋亡的发生。

在调控细胞凋亡的一系列基因中,Bcl-2 家族在其中发挥重要作用。Bcl-2 可抑制自由基对细胞的损伤,与促凋亡 Bax 蛋白相拮抗,抑制细胞色素 C 由线粒体释放至胞质,阻止其对 Caspase 蛋白酶的激活,从而抑制凋亡(Adams et al. 2007)。研究表明 Bax/Bcl-2 的比值对细胞凋亡的发生具有决定性作用(Lalier et al. 2007),本实验中急性力竭运动后,小鼠肾组织 Bcl-2 表达持续下降,而 Bax 的表达持续增强,运动后 24 h 组 Bax/Bcl-2 比值升高达峰值,运动后 48 h 开始呈现下降趋势,但仍显著高于对照组。实验中运动后 Bax/Bcl-2 比值的变化与细胞凋亡水平的变化在时间上呈现同步性,表明其可能在肾细胞凋亡的发生过程中发挥重要的介导作用,从而进一步导致运动性肾损伤的发生。牛磺酸组运动小鼠肾 Bcl-2 蛋白表达与

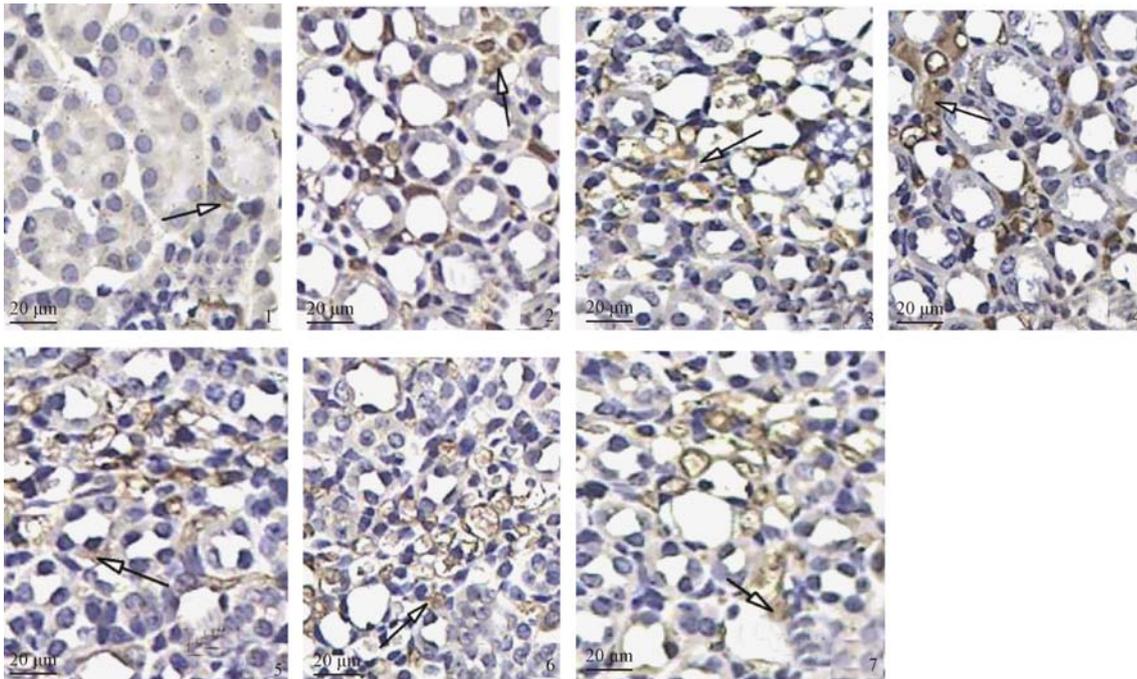


图3 各组小鼠肾 Bax 的表达(×400)

Fig.3 Expression of Bax in renal tissue of different groups

1. 对照组; 2. 运动后立即组; 3. 运动后 12 h 组; 4. 运动后 24 h 组; 5. 运动后 48 h 组; 6. 牛磺酸 12 h 组; 7. 牛磺酸 24 h 组。箭头示阳性细胞。

1. Control group; 2. Instant group; 3. 12 hours group; 4. 24 hours group; 5. 48 hours group; 6. Taurine 12 hours group; 7. Taurine 24 hours group. Arrow shows the positive cell.

同时刻运动组相比显著升高, Bax 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比值相比同时刻运动组显著降低, 说明牛磺酸对 Bax 及 Bcl-2 基因表达的调控可能是其降低肾细胞凋亡的机制之一。

NO 是生物体内具有广泛生物活性的小分子自由基, NOS 是 NO 合成的限速酶, 目前已发现的 NOS 共有 3 种, 包括神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)(臧强等 2012)。前二者又合称为结构型一氧化氮合酶(cNOS), 合成的 NO 在肾主要用于改善血液动力学状况, 参与发挥维持正常肾血流量和肾小球滤过率、扩张肾血管、抑制血小板聚集和白细胞粘附、抑制炎症细胞浸润等作用(张新志等 2010)。iNOS 在正常情况下表达水平较低或缺乏, 炎症、缺氧等诱因可激发

iNOS 表达, 由 iNOS 催化合成的 NO 比其他两种同工酶合成速率更高, 这就使 NO 对细胞的作用被放大, 因而导致氧应激或亚硝化应激, 对细胞造成伤害(Boyd et al. 2005)。近年来的研究表明 NO 参与了细胞凋亡的发生发展过程。本研究发现, 实验各组间 cNOS 无显著差异, 而运动后 24 h 和 48 h, iNOS 活性显著升高, 说明原来在肾中未表达的 iNOS mRNA 在运动所致缺氧等多种诱因下被激活, 同时 NO 水平也显著高于对照组, 提示 iNOS 活性的升高诱导 NO 生成增多, iNOS 来源的 NO 可能参与诱导肾细胞凋亡的发生, 其机制可能由于运动过程中肾在缺血状态下大量生成的超氧阴离子与 NO 快速反应生成  $\text{NOO}^-$ , 从而诱导肾实质细胞凋亡。牛磺酸 24 h 组 iNOS 活性显著低于同时刻运动组, 说明牛磺酸可通过抑制 iNOS 活性降低细胞凋亡水平。牛磺酸 24 h 组 NO 水平相比同时

刻运动组有下降趋势,但差异不显著,同时刻 cNOS 也处于较高水平,cNOS 和 iNOS 的叠加效应可能是导致 NO 维持较高水平的原因。这可能与牛磺酸同时刺激了 cNOS 活性的升高有关(门秀丽等 2003, Abebe et al. 2011),cNOS 来源的 NO 扩张血管等作用可在肾缺血再灌注过程中对肾发挥保护作用,但其具体机制还需进一步研究。

## 参 考 文 献

- Abebe W, Mozaffari M S. 2011. Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 1(3): 293 - 311.
- Adams J M, Cory S. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, 19(5): 488 - 496.
- Boyd C S, Cadenas E. 2005. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biological Chemistry*, 383(3/4): 411 - 423.
- Guz G, Oz E, Lortlar N, et al. 2007. The effect of taurine on renal ischemia/reperfusion injury. *Amino Acids*, 32(3): 405 - 411.
- Lalier L, Cartron P F, Juin P, et al. 2007. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, 12(5): 887 - 896.
- Li C Y, Deng Y L, Sun B H. 2009. Taurine protected kidney from oxidative injury through mitochondrial-linked pathway in a rat model of nephrolithiasis. *Urological Research*, 37(4): 211 - 220.
- 黄旭东, 吴广礼. 2011. 一种新的过度运动致肾损伤模型的建立. *中国中西医结合肾病杂志*, 12(7): 593 - 596.
- 门秀丽, 张连元, 张一兵, 等. 2003. 牛磺酸对大鼠肢体缺血再灌注所致肺损伤过程中内源性 NO 的影响. *中国药理学通报*, 19(9): 1054 - 1057.
- 袁海平, 陈佩杰, 史仍飞, 等. 2003. 运动性蛋白尿与肾细胞凋亡及氧自由基代谢的关系的研究. *中国运动医学杂志*, 22(3): 254 - 257.
- 臧强, 张东亮, 刘文虎. 2012. 一氧化氮及一氧化氮合酶在慢性肾脏病中的研究进展. *临床和实验医学杂志*, 11(4): 310 - 312.
- 张新志, 黄迪, 何立群, 等. 2010. 抗纤灵颗粒对单侧输尿管梗阻模型大鼠肾组织 NO cNOS iNOS 的影响. *辽宁中医杂志*, 37(7): 1382 - 1384.
- 张宜龙, 陈吉, 刘晓鹏, 等. 1999. 牛磺酸对人体自由基代谢水平和运动能力的影响. *中国运动医学杂志*, 18(1): 73 - 75.