

# 力竭运动后24 h模型大鼠肾脏结构和炎症因子对黑加仑提取物干预的反应

刘霞<sup>1</sup>, 蒋嘉焯<sup>2</sup>, 陆海英<sup>3</sup>, 顾翠英<sup>1</sup>, 蔡美琴<sup>4</sup> (上海中医药大学, <sup>1</sup>公共健康学院, <sup>2</sup>教学实验中心, <sup>3</sup>护理学院, 上海市 201203; <sup>4</sup>上海交通大学医学院, 上海市 200025)

## 文章亮点:

黑加仑提取物可减少急性运动后24 h模型大鼠肾脏组织中核因子κB蛋白、肿瘤坏死因子α蛋白表达,降低核因子κB mRNA和肿瘤坏死因子α mRNA表达水平,减少炎症反应,保护肾脏组织结构,为今后研制运动营养补充剂提供实验依据。

## 关键词:

实验动物: 组织工程; 黑加仑提取物; 力竭运动后24 h; 核因子κB; 肿瘤坏死因子α; 肾脏结构

## 主题词:

醋栗属; 运动; 肾; NF-κB; 肿瘤坏死因子α

## 基金资助:

上海市教委预算内项目(A1-20140315)

## 摘要

**背景:** 急性运动后肾脏组织易出现运动性肾缺血再灌注现象, 自由基生成增加, 发生炎症反应, 导致肾功能异常。

**目的:** 观察黑加仑提取物对力竭运动后24 h大鼠肾脏结构、肿瘤坏死因子α和核因子κB表达的影响。

**方法:** 30只雄性Wistar健康大鼠随机分为3组, 每组10只, 黑加仑提取物组给予0.44 g/kg黑加仑提取物灌胃, 安静对照组、力竭运动后24 h组灌服同等体积的蒸馏水, 连续灌胃6周。力竭运动后24 h组和黑加仑提取物组于末次灌胃后进行无负重游泳运动直至力竭疲劳, 于24 h后取材, 电镜和光镜观察肾脏组织形态和超微结构变化, 免疫组化法检测肿瘤坏死因子α蛋白和核因子κB蛋白表达, RT-PCR检测肿瘤坏死因子α mRNA和核因子κB mRNA的表达。

**结果与结论:** 与安静对照组比较, 力竭运动后24 h组中肾脏核因子κB蛋白和肿瘤坏死因子α蛋白高表达, 核因子κB mRNA和肿瘤坏死因子α mRNA表达水平极显著增加( $P < 0.01$ ); 与力竭运动后24 h组比较, 黑加仑提取物组中肾脏核因子κB蛋白和肿瘤坏死因子α蛋白低表达, 核因子κB mRNA表达水平显著性降低( $P < 0.05$ ); 肿瘤坏死因子α mRNA表达水平极显著性下降( $P < 0.01$ )。力竭运动后24 h组大鼠肾脏发生明显的形态变化和超微结构损伤, 黑加仑提取物组大鼠肾脏结构趋于正常。结果表明黑加仑提取物可修复力竭运动后24 h肾脏组织结构, 减少炎症因子的表达, 防止肾脏发生炎症性损伤。

刘霞, 蒋嘉焯, 陆海英, 顾翠英, 蔡美琴. 力竭运动后24 h模型大鼠肾脏结构和炎症因子对黑加仑提取物干预的反应[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(49):8020-8025.

## Response of the structure of rat kidney and inflammatory factors to Blackcurrant Extract at 24 hours after exhaustive exercise

Liu Xia<sup>1</sup>, Jiang Jia-ye<sup>2</sup>, Lu Hai-ying<sup>3</sup>, Gu Cui-ying<sup>1</sup>, Cai Mei-qin<sup>4</sup> (<sup>1</sup>School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; <sup>2</sup>Experiment Center for Teaching and Learning, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; <sup>3</sup>School of Nursing, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; <sup>4</sup>School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** The kidney tissues easily affected exercise ischemia reperfusion, increased free radicals and inflammation, resulted in abnormal renal function after acute exercise.

**OBJECTIVE:** To observe the influence of Blackcurrant Extract on the structure of kidney and expression of tumor necrosis factor-α and nuclear factor-κB at 24 hours after exhaustive exercise.

**METHODS:** A total of 30 male Wistar rats were randomly divided into three groups ( $n=10$ ). Rats in the Blackcurrant Extract group were intragastrically administered 0.44 g/kg Blackcurrant Extract. Rats in the quietness control group and 24-hour exhaustive exercise group were intragastrically given an equal volume of distilled water for 6 consecutive weeks. Rats in the 24-hour exhaustive exercise group and Blackcurrant Extract group received no swimming motion until exhaustion fatigue after final intragastric administration. Twenty-four hours later, samples were obtained. Kidney tissue morphology and ultrastructure were observed by electron microscopy and light microscopy. Protein expression of tumor necrosis factor-α and nuclear factor-κB was detected using immunohistochemistry. Tumor necrosis factor-α mRNA and nuclear factor-κB mRNA expression was detected using RT-PCR.

刘霞, 女, 1981年生, 江苏省盐城市人, 硕士, 讲师, 主要从事运动营养与健康方面的研究。

通讯作者: 蔡美琴, 教授, 上海交通大学医学院, 上海市 200025

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.49.026  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:2095-4344  
(2014)49-08020-06  
稿件接受:2014-10-20

Liu Xia, Master, Lecturer, School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Corresponding author: Cai Mei-qin, Professor, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Accepted: 2014-10-20

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the quietness control group, tumor necrosis factor- $\alpha$  protein and nuclear factor- $\kappa$ B protein expression in the kidney was higher in the 24-hour exhaustive exercise group, and tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA and nuclear factor- $\kappa$ B mRNA expression was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the 24-hour exhaustive exercise group, tumor necrosis factor- $\alpha$  protein and nuclear factor- $\kappa$ B protein expression was lower in the Blackcurrant Extract group, and nuclear factor- $\kappa$ B mRNA expression was significantly decreased ( $P < 0.05$ ); tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA expression was significantly reduced ( $P < 0.01$ ). Kidney in the 24-hour exhaustive exercise group showed obvious morphological changes and ultrastructural damage. The structure of the kidney in the Blackcurrant Extract group tended to be normal. Results suggested that Blackcurrant Extract can repair the kidney tissue injury, reduce the expression of inflammatory factors, and prevent inflammatory damage in the kidney at 24 hours after exhaustive exercise.

**Subject headings:** ribes; exercise; kidney; NF-kappa B; tumor necrosis factor-alpha

**Funding:** the Budget Program of Shanghai Municipal Education Commission, No. A1-20140315

Liu X, Jiang JY, Lu HY, Gu CY, Cai MQ. Response of the structure of rat kidney and inflammatory factors to Blackcurrant Extract at 24 hours after exhaustive exercise. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(49):8020-8025.

## 0 引言 Introduction

有研究证实急性大强度运动后肾功能下降, 肾脏组织发生损伤, 尤以肾小管为著, 且损伤在运动终止后有加重趋势<sup>[1]</sup>。急性大强度运动导致横纹肌细胞急性破坏和崩解, 以及肌酸激酶、肌红蛋白等肌细胞内成分进入细胞外液及血循环, 引起内环境紊乱, 诱发横纹肌溶解症, 引起急性肾损伤<sup>[2]</sup>, 而在急性肾损伤后停止运动, 随着肾血供的逐渐恢复, 又易出现“运动性肾缺血再灌注”现象<sup>[3]</sup>, 使肾脏损伤进一步加重, 导致肾功能异常, 具有较高的发病率。因此如何减缓或预防力竭运动后肾脏缺血再灌注损伤, 探讨力竭运动后肾脏损伤机制已然成为研究热点。

黑加仑(blackcurrant)是一种超级水果<sup>[4]</sup>, 具有很强的抗氧化性<sup>[5]</sup>、保护心血管<sup>[6-7]</sup>、抗疲劳<sup>[8-9]</sup>、抗突变<sup>[10-11]</sup>、抗微生物<sup>[12]</sup>、抗肿瘤等生物学功能<sup>[13-14]</sup>。但是, 它是否会在促进急性运动后肾脏炎症性损伤中起重要作用还不确定。所以, 本研究建立力竭运动肾损伤24 h后动物模型, 观察黑加仑提取物改善肾脏炎症性损伤的程度, 促进其肾脏组织结构快速恢复, 保护肾组织。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2013年2至8月在上海中医药大学科技实验中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 雄性Wistar健康大鼠30只, 体质量(130±10)g, 由上海中医药大学动物实验室提供。分笼饲养, 自由饮水进食, 动物室温度控制在22-24℃, 湿度控制在40%-60%, 自然光照, 适应性喂养1周后进入实验。

**实验方法:**

**动物分组:** 雄性Wistar大鼠30只, 随机分为安静对照组、力竭运动后24 h组、黑加仑提取物组, 每组10只。适应性喂养后1周后开始给药。

**给药方案:** 黑加仑提取物组每日清晨以0.44 g/kg<sup>[15]</sup>灌

黑加仑提取物干预力竭运动后24 h大鼠肾脏结构和炎症因子实验用药品、试剂和仪器:

药品、试剂和仪器	来源
黑加仑提取物(花青素含量为25%)	上海诺特生物科技有限公司
戊巴比妥钠	上海中医药大学实验动物中心
Trizol	美国Invitrogen
Fast SYBR Green Master Mix, GeneAmp RNA PCR	美国Applied Biosystems
GAPDH、核因子 $\kappa$ B和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 引物	生工生物工程(上海)股份有限公司
Stepone™实时荧光定量PCR扩增仪	美国Applied Biosystems
TECNAI-12透射电镜	荷兰PHILIPS-FEI公司
EM UC7超薄切片机	德国Leica公司
光学显微镜	日本Olympus公司
Bond-max 全自动免疫组化染色机	德国Leica公司
全自动生化分析仪	湖南永和阳光生物科技有限公司
SK-1快速混匀漩涡器	常州图美电子设备有限公司
80-2离心机	上海手术器械厂

服黑加仑提取物1次, 安静对照组和力竭运动后24 h组分别灌服等体积生理盐水1次, 持续6周。第1次灌胃前和第6周末最后1次灌胃结束后分别称量各组大鼠体质量。力竭运动后24 h组和黑加仑提取物组末次灌胃后进行无负重游泳运动直至力竭疲劳。

**力竭运动方案:** 力竭运动后24 h组和黑加仑提取物组大鼠在恒温不锈钢游泳池[150 cm×60 cm, 水深80 cm, 水温(30±1)℃]进行无负重游泳。大鼠游泳力竭标准按Thomas等<sup>[16]</sup>报道的标准进行判断: 大鼠沉入水中10 s不能自主上水面, 且放在平面上无法完成翻身反射。

**样本采集:** 按文献标准实验动物达力竭运动终点时, 迅速捞离游泳槽, 记录力竭时间, 于24 h后采用戊巴比妥钠麻醉, 迅速取出肾脏, 浸入冰生理盐水中洗净残余血液后, 左肾组织用于实时定量PCR检测, 右肾组织用于形态学观察和免疫组化检测。

表 1 合成引物序列及扩增产物

Table 1 Synthetic primer sequences and amplification products

基因	引物序列
肿瘤坏死因子 $\alpha$	5'- CAT GGA TCT CAA AGA CAA CAA A -3'
	5'- CTC CTG GTA TGA AAT GGC AAA T -3'
核因子 $\kappa$ B	5'- TTT TCT CTA TTG GCC TCT GACC C -3'
	5'- CGC TAG AGT GAC CCC CTG C -3'
GAPDH	5'- CAG AAC ATC ATC CCT GCA TC -3'
	5'- CTG CTT CAC CAC CTT CTT GA -3'

### 指标检测:

苏木精-伊红染色观察肾脏组织病理变化: 甲醛溶液固定, 通过石蜡包埋, 采用Leica超薄切片机, 切片厚度为 4  $\mu$ m, 苏木精-伊红染色, 选用日本Olympus显微镜进行观察并照相。

透射电镜观察肾脏组织超微结构: 安静对照组任选2只, 力竭运动后24 h组、黑加仑提取物组分别任选3只大鼠, 肾脏置于2%-2.5%戊二醛固定2 h, 磷酸缓冲液清洗3次, 用1%锇酸固定1.0-2.0 h, 再用磷酸缓冲液清洗3次, 脱水, 无水丙酮与包埋液浸透4 h, 分别在37  $^{\circ}$ C, 60  $^{\circ}$ C包埋12, 48 h, 半薄定位超薄切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染法染色, TECNAI-12透射电镜观察并摄片。

免疫组化检测核因子 $\kappa$ B蛋白和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 蛋白表达: 采用Leica Bond-max 全自动免疫组化染色机染色, 染色完毕以后, 待玻片晾干, 中性树脂胶进行封固, 于显微镜下观察。

RT-PCR法检测核因子 $\kappa$ B mRNA和肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达水平: 取大鼠肾脏组织约100 mg, 直接加Trizol试剂1 mL, 严格按试剂盒说明进行RNA提取, 所用RNA的 $A_{260}/A_{280}$ 均在1.8-2.0之间。①将各样本的RNA反转录成cDNA; 反应条件为42  $^{\circ}$ C 2 h $\rightarrow$ 95  $^{\circ}$ C 5 min。②分别用相应的引物(表1)扩增肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、核因子 $\kappa$ B及GAPDH。其中实时荧光定量PCR反应条件为: 95  $^{\circ}$ C预变性20 s, 1个循环; 95  $^{\circ}$ C 3 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环, 绘制溶解曲线。③结果由荧光定量分析仪自动采集给出目的基因和对照基因的Ct值, 参照文献将Ct值转化为相对倍数, 基因表达量采用实验组/对照组 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

统计学分析: 采用SPSS13.0软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方法分析(ANOVA检验),  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加实验大鼠有30只, 中途有3只大鼠游泳死亡, 其中力竭运动后24 h组2只, 黑加仑提取物组1只, 进入结果分析共计27只。

2.2 黑加仑提取物对肾脏结构的影响

2.2.1 光镜观察结果 安静对照组肾脏组织着色均匀, 结构清晰致密, 核大小均匀(图1A)。力竭运动后24 h组

表 2 各组肾组织核因子  $\kappa$ B mRNA 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA 表达情况Table 2 Nuclear factor- $\kappa$ B mRNA and tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA expression in the kidney of rats from every group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	核因子 $\kappa$ B	肿瘤坏死因子 $\alpha$
安静对照组	10	1.03 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.19
力竭运动后 24 h 组	8	2.84 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	2.10 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
黑加仑提取物组	9	2.30 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	1.01 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>

表注: 与安静对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与力竭运动后 24 h 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

肾小管上皮细胞出现疏松化, 重度空泡变性, 肾间质少量炎细胞浸润(图1B)。黑加仑提取物干预后肾组织少数肾小管上皮细胞空泡变性, 较力竭运动后24 h组有明显改善(图1C)。

2.2.2 电镜观察结果 安静对照组肾小管微绒毛排列整齐(图2A)。力竭运动后24 h组中系膜区增宽, 肾小管微绒毛排列紊乱, 肾小管上皮细胞空泡变性, 部分肿胀, 溶酶体吞噬(图2B)。黑加仑提取物组较力竭运动后24 h组有改善, 肾小管微绒毛排列稍紊乱, 系膜区基质增生(图2C)。

2.3 黑加仑提取物对肾脏组织中核因子 $\kappa$ B蛋白和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 蛋白表达的影响 安静对照组大鼠肾脏细胞胞浆未见任何染色的阳性颗粒, 核因子 $\kappa$ B蛋白和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 蛋白呈阴性表达(图3A, 4A); 力竭运动后24 h组大鼠肾脏细胞胞浆内可见棕黄色阳性颗粒数明显增多, 着色较深, 核因子 $\kappa$ B蛋白和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 蛋白呈阳性表达(图3B, 4B), 尤以病灶及其周边部位明显; 黑加仑提取物组肾脏细胞胞浆内阳性颗粒数明显减少, 着色变浅(图3C, 4C)。

2.4 补充黑加仑提取物对肾脏组织中核因子 $\kappa$ B mRNA和肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达的影响 与安静对照组比较, 力竭运动后24 h组核因子 $\kappa$ B mRNA和肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达水平极显著增加( $P < 0.01$ ); 与力竭运动后24 h组比较, 黑加仑提取物组核因子 $\kappa$ B mRNA表达水平显著性降低( $P < 0.05$ ); 肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达水平极显著性下降( $P < 0.01$ )。黑加仑提取物组核因子 $\kappa$ B mRNA和肿瘤坏死因子 $\alpha$  mRNA表达水平与安静组相比差异均无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见表2。

## 3 讨论 Discussion

3.1 黑加仑提取物对力竭运动大鼠肾脏结构的影响 肾脏是机体的重要生命器官, 其生理功能主要是排泄代谢产物和调节水、电解质酸碱平衡, 从而维持机体内环境的稳定, 同时还具有内分泌功能。有研究报道力竭运动后, 肾脏出现功能下降和一系列的病理形态学的改变<sup>[17-18]</sup>, 其中力竭运动后24 h肾脏损伤最严重<sup>[19]</sup>, 如何防止肾脏损伤程度, 已成为亟需解决的问题。因此本研究建立力竭运动后

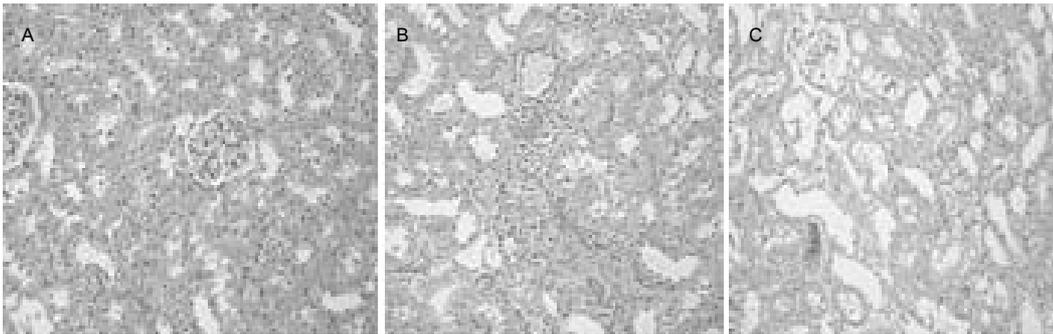


图 1 各组 Wistar 大鼠肾脏组织病理形态观察(苏木精-伊红染色, ×200)

Figure 1 Pathomorphological observation of the kidney in Wistar rats of every group (hematoxylin-eosin staining, ×200)

图注: 图中 A 显示安静对照组肾脏组织着色均匀, 结构清晰致密, 核大小均匀; B 显示力竭运动后 24 h 组肾小管上皮细胞出现疏松化, 重度空泡变性, 肾间质少量炎细胞浸润; C 显示黑加仑提取物组肾脏组织少数肾小管上皮细胞空泡变性, 较力竭运动后 24 h 组有明显改善。

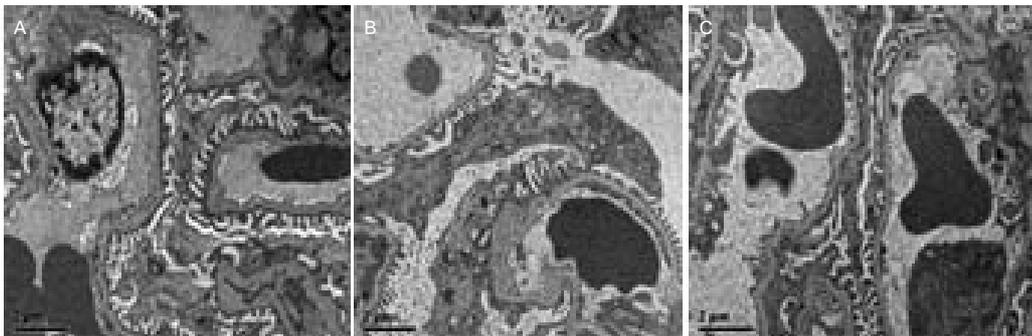


图 2 各组 Wistar 大鼠肾脏组织超微结构观察(透射电镜, ×6 000)

Figure 2 Ultrastructural observation of the kidney in Wistar rats of every group (transmission electron microscopy, ×6 000)

图注: 图中 A 显示安静对照组肾脏组织肾小管微绒毛排列整齐; B 显示力竭运动后 24 h 组中系膜区增宽, 肾小管微绒毛排列紊乱, 肾小管上皮细胞空泡变性, 部分肿胀, 溶酶体吞噬; C 显示黑加仑提取物组较力竭运动后 24 h 组有改善, 肾小管微绒毛排列稍紊乱, 系膜区基质增生。

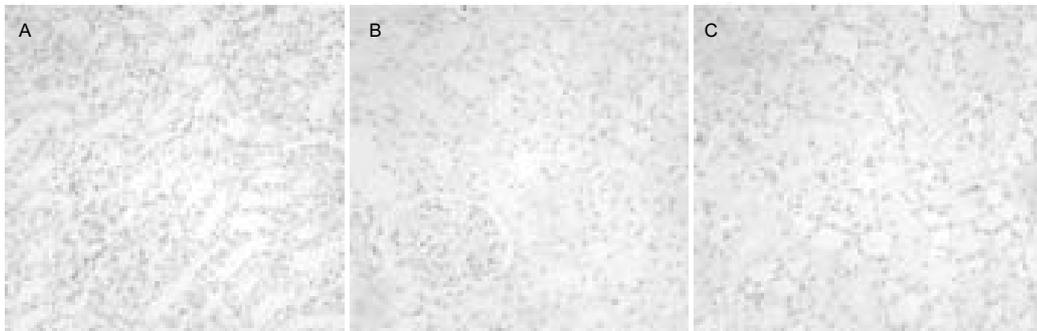


图 3 各组 Wistar 大鼠肾脏组织核因子 κB 蛋白表达(免疫组化, ×400)

Figure 3 Expression of nuclear factor-κB protein in the kidney of Wistar rats of every group (immunohistochemistry, ×400)

图注: 图中 A 显示安静对照组大鼠肾脏组织核因子 κB 蛋白呈阴性表达; B 显示力竭运动后 24 h 组大鼠肾脏细胞胞浆内可见棕黄色阳性颗粒数明显增多, 着色较深, 核因子 κB 蛋白呈阳性表达; C 显示黑加仑提取物组肾脏细胞胞浆内阳性颗粒数明显减少, 着色变浅。

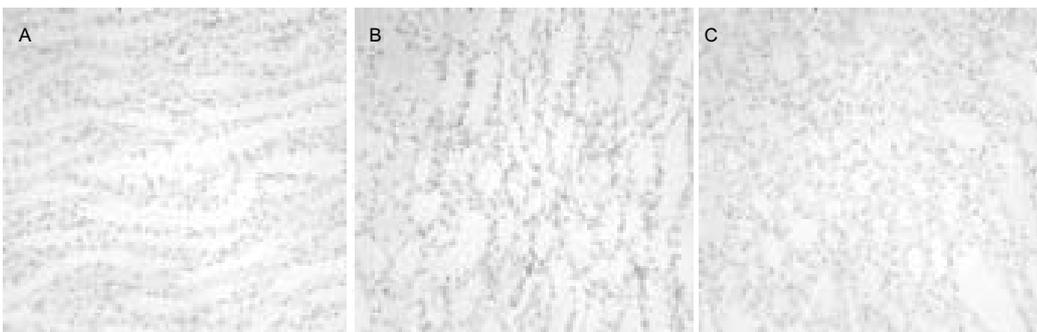


图 4 各组 Wistar 大鼠肾脏组织肿瘤坏死因子 α 蛋白表达(免疫组化, ×400)

Figure 4 Expression of tumor necrosis factor-α protein in the kidney of Wistar rats of every group (immunohistochemistry, ×400)

图注: 图中 A 显示安静对照组大鼠肾脏组织肿瘤坏死因子 α 蛋白呈阴性表达; B 显示力竭运动后 24 h 组大鼠肾脏细胞胞浆内可见棕黄色阳性颗粒数明显增多, 着色较深, 肿瘤坏死因子 α 蛋白呈阳性表达; C 显示黑加仑提取物组肾脏细胞胞浆内阳性颗粒数明显减少, 着色变浅。

24 h 的动物模型, 观察黑加仑提取物对力竭运动后 24 h 大鼠肾脏形态学的影响, 实验中光镜和电镜研究结果显示力竭运动后 24 h 组肾小管上皮细胞出现疏松化, 重度空泡变性, 肾小管微绒毛排列紊乱, 部分肿胀, 系膜区增宽, 溶酶体吞噬肾间质少量炎细胞浸润, 其原因是正常生理条件下, 肾血流量约占心输出量的 25%, 运动时, 由于全身血液重新分配, 肾血流量急骤下降, 形成运动性肾缺血, 停止运动后, 随着肾血供的逐渐恢复, 形成运动性肾缺血再灌注, 导致自由基增多, 使细胞膜的流动性下降、通透性增高<sup>[3]</sup>, 引起钙离子浓度升高, 诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>, 进而导致肾脏结构损伤。黑加仑提取物干预后肾脏结构有明显改善, 肾小管上皮细胞少部分空泡变性, 微绒毛排列稍紊乱, 系膜区基质少量增生, 其原因是黑加仑提取物可提高肾脏的抗氧化能力<sup>[5]</sup>, 减少肾脏自由基的生成, 保护细胞膜的流动性和通透性, 进而使细胞和组织损伤减轻。

**3.2 黑加仑提取物对力竭运动大鼠 24 h 后炎症因子的影响** 核因子  $\kappa\text{B}$  是一种普遍存在的转录因子, 几乎存在于体内所有细胞, 主要参与体内许多炎性细胞及炎症介质基因转录调节, 诱发炎症反应。它调控多种基因的表达, 是多种信号传导途径的汇聚点, 在调节炎症反应的基因中起关键作用<sup>[20-22]</sup>。

肿瘤坏死因子  $\alpha$  是一种主要由单核巨噬细胞, 淋巴细胞产生的细胞因子, 参与机体炎症和免疫应答的调节, 在多种肾脏疾病的发生、发展中发挥重要作用。

近年发现, 转录因子核因子  $\kappa\text{B}$  与炎症反应密切相关, 活化的核因子  $\kappa\text{B}$  可直接调控参与肾缺血再灌注后炎症损伤的多种介质基因的表达, 因而, 核因子  $\kappa\text{B}$  活化被认为是介导或加剧肾缺血再灌注后炎症损伤的中心环节<sup>[23]</sup>。

本实验研究结果显示, 力竭运动后 24 h, 肾脏组织核因子  $\kappa\text{B}$  阳性细胞明显表达, 且核因子  $\kappa\text{B}$  mRNA 表达显著增加。其机制可能是: 力竭运动恢复期, 随着肾血供的逐渐恢复, 形成运动性肾缺血再灌注。缺血再灌注时, 出现活性氧产生增多和机体抗氧化能力的下降, 产生氧化应激, 组织脂质过氧化水平提高, 能够激活核因子  $\kappa\text{B}$ , 主要机制是蛋白激酶诱导核因子  $\kappa\text{B}$  抑制蛋白发生磷酸化降解, 核因子  $\kappa\text{B}$  抑制蛋白/核因子  $\kappa\text{B}$  二聚体解离, 暴露核因子  $\kappa\text{B}$  的核定位片段, 核因子  $\kappa\text{B}$  则转移至胞核, 与核内有  $\kappa\text{B}$  序列的 DNA 结合, 进而活化核因子  $\kappa\text{B}$ 。核因子  $\kappa\text{B}$  的过度活化又可上调炎症因子的表达, 又是引起肾脏过度炎症反应和炎症损伤的关键因素。

有研究发现肿瘤坏死因子  $\alpha$  作为核因子  $\kappa\text{B}$  的调节产物<sup>[24]</sup>, 含有核因子  $\kappa\text{B}$  的结合位点, 又可作为核因子  $\kappa\text{B}$  的细胞外刺激信号, 再次激活核因子  $\kappa\text{B}$ , 核转录因子抑制亚单位的磷酸化, 导致核转录因子抑制亚单位-核转录因子复合体中的核转录因子抑制亚单位解离, 游离的核转录因子进入细胞核内结合于核转录因子结合部(肿瘤坏死因子  $\alpha$  启动

子), 从而引起肿瘤坏死因子  $\alpha$  转录, 进一步放大初始的炎症信号导致“瀑布效应”的发生<sup>[25]</sup>。本实验研究结果显示, 力竭运动后 24 h, 肾脏组织肿瘤坏死因子  $\alpha$  阳性细胞表达增加, 且肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA 表达显著增加, 提示肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达可能与其上游的核因子  $\kappa\text{B}$  调控有关。同时肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达增强, 一方面可促使炎症性细胞因子的合成与释放, 使炎症细胞聚集、黏附, 引起肾组织的炎症性损伤; 另一方面, 在缺血缺氧的情况下, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  与细胞表面的死亡受体结合, 通过肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体受体通路介导肾组织细胞凋亡的发生。本研究结果提示, 力竭运动恢复期肾脏组织的损伤与大鼠肾组织核因子  $\kappa\text{B}$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  分布及其表达量增强有关, 提示力竭运动 24 h 后大鼠肾缺血再灌注, 引发炎症性损伤。

有研究表明, 黑加仑提取物可降低高强度运动引起的血清中肿瘤坏死因子  $\alpha$  的含量, 抑制炎症反应<sup>[26]</sup>, 而关于黑加仑提取物是否可抑制力竭运动后 24 h 中肾脏组织中炎症反应, 研究甚少。本实验结果显示, 补充黑加仑提取物后, 大鼠力竭运动 24 h 后核因子  $\kappa\text{B}$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  的阳性细胞表达减少, 核因子  $\kappa\text{B}$  mRNA 表达显著性下降和肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA 表达极显著性下降, 提示黑加仑提取物可抑制力竭运动后 24 h 中肾脏组织中炎症因子的表达, 促进肾脏组织炎症损伤的快速恢复。

**结论:** 力竭运动后 24 h 大鼠肾脏组织结构和超微结构发生病理性变化, 肾组织核因子  $\kappa\text{B}$  mRNA 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA 表达增加, 上调肾组织炎症信号通路的表达, 导致肾脏炎症性损伤。黑加仑提取物可减少肾脏中核因子  $\kappa\text{B}$  mRNA 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA 表达减少, 修复肾脏组织结构, 预防炎症性损伤, 为力竭运动致肾损伤的治疗提供一个新的治疗靶点。

**致谢:** 感谢上海中医药大学科技实验中心陆熊老师、林敏老师、袁琳老师和胡娜老师对病理切片及观察给予的指导! 感谢本科生张婷、许清参与实验!

**作者贡献:** 实验设计刘霞, 实验实施刘霞、顾翠英、蒋嘉辉, 实验评估陆海英, 资料收集为顾翠英。刘霞成文, 蔡美琴审核并对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 核因子  $\kappa\text{B}$  是一种普遍存在的转录因子, 几乎存在于体内所有细胞, 主要参与体内许多炎性细胞及炎症介质基因转录调节, 诱发炎症反应。它调控多种基因的表达, 是多种信号传导途径的汇聚点, 在调节炎症反应的基因中起关键作用。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] 黄旭东, 吴广礼. 一种新的过度运动致肾损伤模型的建立[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(7): 593-596.
- [2] Wu GL, Chen YS, Huang XD, et al. Exhaustive swimming exercise related kidney injury in rats - protective effects of acetylbritannilactone. *Int J Sports Med.* 2012;33(1):1-7.
- [3] 扈诗兴. 运动对肾脏形态结构和功能影响的研究进展[J]. 四川体育科学, 2009, 12(4): 31-34, 38.
- [4] Bishayee A, Mbimba T, Thoppil RJ, et al. Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats. *J Nutr Biochem.* 2011; 22(11):1035-1046.
- [5] Szachowicz-Petelska B, Dobrzyńska I, Skrzydlewska E, et al. Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol. *J Membr Biol.* 2012;245(4):191-200.
- [6] Nour V, Stampar F, Veberic R, et al. Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chem.* 2013;141(2):961-966.
- [7] Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J, et al. Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells. *J Agric Food Chem.* 2011;59(16):8616-8624.
- [8] 顾亚静, 赵效国, 李莉, 等. 黑加仑提取物抗疲劳作用与GAT-2、Scd-2基因的关系[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(2):119-122.
- [9] 李莉, 赵效国, 马龙, 等. 黑加仑提取物抗疲劳作用的动物实验研究[J]. 营养学报, 2008, 30(5): 499-501.
- [10] 宋燕华, 严峻, 夏勇, 等. 黑加仑提取物的致突变性和亚急性毒性研究[J]. 浙江预防医学, 2009, 21(3): 1-3, 15.
- [11] 郑云燕, 蔡德雷, 严峻, 等. 黑加仑提取物对SD大鼠致畸作用的研究[J]. 浙江预防医学, 2010, 22(12):20-23.
- [12] Desjardins J, Tanabe S, Bergeron C, et al. Anthocyanin-rich black currant extract and cyanidin-3-O-glucoside have cytoprotective and anti-inflammatory properties. *J Med Food.* 2012;15(12):1045-1050.
- [13] 肖辉, 张月明, 冷爱枝, 等. 黑加仑提取物抑制肿瘤生长及其机制的研究[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(2):132-134
- [14] Thoppil RJ, Bhatia D, Barnes KF, et al. Black currant anthocyanins abrogate oxidative stress through Nrf2-mediated antioxidant mechanisms in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; 12(9):1244-1257.
- [15] 赵君操, 刘瑞雪, 罗彬. 黑加仑提取物抗疲劳作用的动物实验研究[J]. 河南医学研究, 2011, 20(2): 131-133.
- [16] Thomas DP, Marshall KI. Effects of repeated exhaustive exercise on myocardial subcellular membrane structures. *Int J Sports Med.* 1988;9(4):257-260.
- [17] 张琳, 熊正英, 郝选明, 等. 白藜芦醇对大强度运动大鼠肾脏功能的保护作用[J]. 天津体育学院学报, 2011, 26(3): 208-210.
- [18] 何芳. 姬松茸多糖对运动力竭小鼠肾脏的保护作用研究[J]. 海军医学杂志, 2013, 34(3):155-157.
- [19] 黄旭东, 吴广礼. 一种新的过度运动致肾损伤模型的建立[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(7):593-596.
- [20] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood.* 2001;97(1):46-55.
- [21] Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2001;107(2):135-142.
- [22] Chung KC, Park JH, Kim CH, et al. Novel biphasic effect of pyrrolidine dithiocarbamate on neuronal cell viability is mediated by the differential regulation of intracellular zinc and copper ion levels, NF-kappaB, and MAP kinases. *J Neurosci Res.* 2000;59(1):117-125.
- [23] Lentsch AB, Ward PA. The NFkappaBb/IkappaB system in acute inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000; 48(2):59-63.
- [24] 王建春, 姜鹏, 谢艳萍, 等. 急性肺损伤大鼠肺组织NF-κB表达的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(16): 2448-2452.
- [25] 杨季云, 张思仲, 郭红, 等. 肿瘤坏死因子α通过激活NF-κB信号通路加快肝细胞周期进程[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(6): 604-610.
- [26] Lyall KA, Hurst SM, Cooney J, et al. Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297(1):R70-81.