

菟丝子对大鼠运动性肾脏缺血再灌注的保护作用

郭爱民¹, 曹建民², 周海涛^{3*}, 郑孟君⁴, 李琳娜⁵

- (1. 中国石油大学, 北京 102249; 2. 北京体育大学, 北京 100084;
3. 北京联合大学, 北京 100023; 4. 江南大学体育部, 江苏 无锡 214000;
5. 辽宁省军区大连第十干休所, 辽宁 大连 116001)

[摘要] **目的:**研究菟丝子对大鼠运动性肾缺血再灌注损伤的保护作用及机制。**方法:**将 7 周龄雄性 Wistar 大鼠 75 只为对象随机分为 4 组: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)、菟丝子 + 过度训练组(COM 组, 24 只), 进行 56 d 的力竭游泳训练。菟丝子 + 过度训练组灌胃(ig)给药, 每天 1 次, 剂量为 $6.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig 体积为 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 其他各组 ig 等量生理盐水。末次训练后 24 h, 进行血清尿素氮、血清肌酐等生化指标检测。**结果:**8 周的过度训练导致大鼠运动性肾缺血“再灌注”, 自由基代谢紊乱, 肾组织超微结构被严重破坏、组织病理学发生明显改变, 肾功能受到严重损坏。尿素氮和血清肌酐:过度训练组、菟丝子 + 过度训练组高于对照组($P < 0.01$); 菟丝子 + 过度训练组低于过度训练组($P < 0.05$)。SOD 活性:过度训练组、菟丝子 + 过度训练组低于对照组($P < 0.01$); 菟丝子 + 过度训练组高于过度训练组($P < 0.05$)。MDA 含量:过度训练组、菟丝子 + 过度训练组高于对照组($P < 0.01$), 菟丝子 + 过度训练组低于过度训练组($P < 0.05$)。**结论:**菟丝子改善了过度训练大鼠肾缺血再灌注所引起的自由基代谢紊乱, 肾脏超微结构趋于正常, 对运动性缺血再灌注肾脏具有保护作用。

[关键词] 菟丝子; 运动性缺血再灌注; 保护作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0232-05

[doi] 10.11653/syfy2013180232

Protective Effect of *Cuscuta chinensis* on the Movement Renal Ischemia-reperfusion in Rats

GUO Ai-min¹, CAO Jian-min², ZHOU Hai-tao^{3*}, ZHENG Meng-jun⁴, LI Lin-na⁵

- (1. China University of Petroleum, Beijing 102249, China;
2. Beijing Sport University, Beijing 100084, China;
3. Beijing Union University, Beijing 100023, China;
4. Department of Physical Education, Jiangnan University, Wuxi 214000, China;
5. 10th Retired Cadres of Dalian, Military Region, Dalian 116001, China)

[Abstract] **Objective:** To study *Cuscuta chinensis*. protective effect and mechanism of movement renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Method:** Divided the 75 7-week-old male Wistar rats into 4 groups randomly: control group (group C, 12), general training group (group M, 12), overtraining group (group OM, 24), *C. chinensis* + overtraining group (group COM, 24), 56 days of exhaustive swimming training. The COM group with professional gavages for gastric lavage (ig) once a day, the dose was $6.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and ig volume was $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; other groups were for ig normal saline. Detect biochemical parameters of serum urea nitrogen and serum creatinine after 24 hours when the last training ends. **Result:** In the 8 week of overtraining rats resulted in movement of

[收稿日期] 20130305(004)

[第一作者] 郭爱民, 硕士, 讲师, 从事体育教育训练科学研究, Tel: 13811195466, E-mail: gam2002@163.com

[通讯作者] * 周海涛, 硕士, 讲师, 从事运动人体科学研究, Tel: 13611383040, E-mail: zsettle@sina.com

‘renal ischemia reperfusion’ and disordered free radicals metabolism. The ultrastructure of kidney was severely damaged, the histopathological changes obviously, and renal function was seriously damaged. Serum creatinine and blood urea nitrogen of OM group and COM group were higher than in group C ($P < 0.01$); COM group was lower than the OM group ($P < 0.05$). SOD activity of OM group and COM group were lower than in group C ($P < 0.01$); COM group was higher than the OM group ($P < 0.05$). The content of MDA in OM group and COM group was higher than in group C ($P < 0.01$); COM group was lower than the OM group ($P < 0.05$). **Conclusion:** *C. chinensis* can improve disordered free radicals metabolism in overtraining rats which is caused by renal ischemia reperfusion. Kidney ultramicrostructure is normal. Moreover, it has a protective effect on exercise-induced ischemia-reperfusion kidney.

[**Key words**] *Cuscuta chinensis*; exercise-induced ischemia-reperfusion; protective effect

随着现代中医药理论的发展、现代药理学理论及现代生物技术的更新,更多的单剂或配伍组方应用于体育实践。中药以其多靶点、多途径作用且几乎不含违禁成分的特点日益显示出其独特的优势,在提高运动员身体机能及缓解疲劳方面取得了一定的成就。

机体在稳定状态下,肾血流量可以通过自身调节机制来维持相对恒定。在剧烈运动时,肾血流在神经和体液因素的影响下发生改变。由于各器官血流量重新分配,使活动器官特别是肌肉的血流量增多,肾血流量急剧下降,并伴随运动过程的持续和强度递增表现的更加明显^[1]。肾脏的这种不完全缺血状态形成了“运动性肾缺血”。运动停止后,肾血供应恢复形成运动性肾缺血后的“再灌注”^[2]。再灌注引起的氧自由基大量生成而引发脂质过氧化导致肾组织损伤是肾缺血再灌注发病的重要原因,减少氧自由基生成能起到保护作用。研究表明,菟丝子具有提高过氧化物歧化酶活性、降低脂质过氧化物的药理作用,可以有效清除自由基^[3]。本文研究菟丝子对大鼠缺血再灌注肾脏的影响,探讨其在运动性缺血再灌注损伤中的作用及其机制,旨在为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 75 只,42 d 龄,平均体重(197 ± 12)g,北京大学医学部实验动物科学部提供,许可证号 SCXK(京)2006-0008。在整个试验过程中,实验室内温度保持在(22 ± 2)℃,相对湿度 55% ~ 75%,光照时间随自然变化。所有试验大鼠均以基础饲料(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。试验时间为 63 d,正式训练时间为 56 d。

1.2 试验用药 菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. (产自河北,北京同仁堂购得,批号 110124257),并经天

津中瑞药业有限公司高占友高级工程师鉴定。称取菟丝子干品 500 g 加水 4 000 mL,浸泡 120 min,至微涨,文火煎 60 min,将所得水煎液过滤,再将过滤出的菟丝子加水 4 000 mL 煎 60 min,将所得水煎液过滤。将 2 次过滤出的水煎液混合,浓缩至生药质量浓度 2 g·mL⁻¹,4℃ 存放备用。

1.3 试剂 血清肌酐(Cr)采用 Jaffe 苦味酸法测定,血尿素氮(BUN)采用二乙酰-脲法测定,丙二醛(MDA)采用比色法测定;超氧化物歧化酶(SOD)采用黄嘌呤氧化酶法测定(均采用南京建成生物工程研究所提供试剂盒,试剂盒编号 20120509,并严格按照使用说明操作)。

1.4 仪器 BS224S 型电子分析天平(德国赛多利斯),光学显微镜(日本 Olympus 公司),日本产 JEM-1200EX 透射电镜,ALCYON300 全自动生化分析仪(美国雅培),756M C 型紫外-可见分光光度计(上海精密仪器厂)及 GL-20G 高速冷冻离心机(上海安亭)。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠适应性饲养 4 d 后,以 20 min·d⁻¹的运动量对其进行为期 3 d 的筛选,淘汰个别不适应游泳训练者,将剩余大鼠以数字随机分组法分 4 组: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,菟丝子+过度训练组(COM 组)24 只进行 56 d 的游泳训练。训练期间,COM 组灌胃给药(ig),每天 1 次,剂量为 6.96 g·kg⁻¹,ig 体积为 5 mL·kg⁻¹;其他各组 ig 等量生理盐水。

2.2 训练及测试方案 C 组常规饲养,不加任何干预,平时不运动。M 组进行中等强度游泳训练,正式游泳训练 8 周。每周训练 6 d,每天训练 1 次,第 1 次下水游 20 min,此后逐渐增加,至第 1 周末时每天游 60 min,第 2 周末时加至每天游 90 min,第 3 周

末时加至每天游 120 min, 此后 5 周均保持此运动量。其他各组前 3 周训练安排同 M 组, 第 4 周起开始安排高强度训练。大鼠进行负重游泳, 每次训练至力竭。力竭标准以大鼠下沉后 10 s 不露出水面为度。第 1~3 周负 0.5% 体重, 第 4 周负 1% 体重, 第 5 周负 2% 体重, 每天训练 1 次。第 6 周每天上、下午各训练 1 次, 第 7~8 周, 每天上、下午、夜间各训练 1 次, 均负 5% 体重。至第 8 周末, C、M 组大鼠, 均正常生长, 无意外死亡发生。其他各组大鼠因尾部负重, 疲劳衰竭不能恢复及训练意外死亡等原因, 死亡率较高。OM 组、COM 组分别剩余 14, 18 只。各组分别取 10 只用于实验取材, 其他随机剔除。

2.3 指标测定 各组大鼠于末次游泳训练 24 h 后, 乙醚适度麻醉, 从颈总动脉处取血加入柠檬酸钠溶液抗凝, 37 °C 水浴中 30 min 后, 4 °C 3 000 r·min⁻¹ 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, 肉眼观察肾脏大小, 色泽、质地。分离左肾, 取肾上腺组织 0.5 g, 用 1.5 mL 生理盐水在 1 °C 下以 12 000 r·min⁻¹ 研磨制成 10% 肾组织匀浆; 10% 甲醛固定肾组织标本, 石蜡包埋, 制成 4 μm 厚切片, HE 染色, 观察组织病理学变化; 另取部分 4% 戊二醛固定待做超微结构分析。

2.3.1 肾脏病理变化评价参照 Paller 标准^[4] 在 400 倍光镜下随机选 5 个视野, 每个视野选 10 个肾小管评分。①肾小管明显扩张, 细胞扁平为 1 分; ②

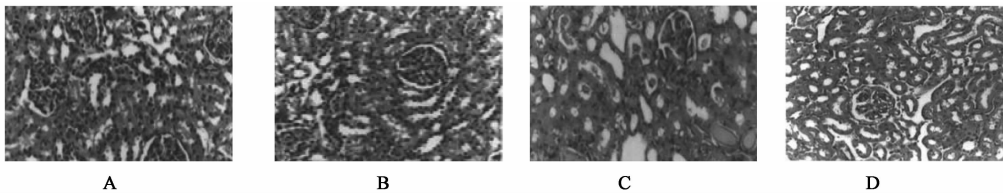
刷状缘损伤为 1 分, 脱落为 2 分; ③细胞膜大泡 1 分, 细胞浆空泡 1 分; ④间质水肿 1 分; ⑤肾小管腔内有脱落的坏死细胞未形成管型或碎片为 1 分, 形成管型或碎片为 2 分。肾小管评分由 2 名技术员双盲计算, 取其平均值。

2.3.2 大鼠肾组织超微结构变化 用日本产 JEM-1200EX 透射电镜观察超薄切片 (×8 000) 肾小球基底膜的厚度, 每张电镜切片随机选择 8 个包含肾小球基底膜的视野, 观察基底膜厚度、系膜基质及足突变化情况, 并摄像。

2.4 数据统计 采用 SPSS 12.0 软件对所有数据进行处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 运动及菟丝子对大鼠肾组织的病理改变 光镜下静止对照组、一般训练组大鼠肾组织结构正常, 无瘀血、变性和水肿, 肾小管管腔内无管型。过度训练组大鼠肾小球有瘀血现象, 小管上皮细胞水肿、空泡变性、管腔扩张, 管腔中有少量的脱落绒毛和上皮细胞, 以及各种管型。菟丝子组组织病理学改变较过度训练组轻, 有轻微的小管上皮细胞水肿、空泡变性, 管腔扩张现象, 无蛋白管型和细胞管型。各组大鼠肾小管 Paller 评分, 静止对照组、一般训练组组间无显著差异, 静止对照组、一般训练组明显低于其他组 ($P < 0.01$), 菟丝子组显著低于过度训练组大鼠 ($P < 0.05$) (表 1), 且均未见肾小球明显病理改变。



A. 静止对照组; B. 一般训练组; C. 过度训练组; D. 菟丝子 6.96 g·kg⁻¹ 组 (图 2 同)

图 1 运动及菟丝子对大鼠肾组织病理改变的影响 (HE, ×400)

表 1 各组大鼠肾小管损害评分、血清尿素氮、肌酐含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肾小管损害评分/HP	BUN/mmol·L ⁻¹	Cr/μmol·L ⁻¹
静止对照	-	2.49 ± 1.75	8.28 ± 1.14	30.74 ± 9.83
一般训练	-	2.88 ± 1.52 ⁴⁾	9.05 ± 1.03 ^{1,4)}	36.29 ± 9.37 ^{1,4)}
过度训练	-	12.86 ± 1.89 ²⁾	15.02 ± 1.14 ²⁾	79.54 ± 10.34 ²⁾
菟丝子 + 过度训练	6.96	9.43 ± 1.43 ^{2,3)}	10.33 ± 1.54 ^{2,3)}	61.58 ± 10.85 ^{2,3)}

注: 与静止对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与过度训练组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 运动及菟丝子对大鼠肾组织超微结构变化 对照组大鼠肾小球基底膜均匀, 系膜区正常, 上皮足

突排列整齐, 结构正常。一般训练组大鼠肾小球基底膜轻微增厚, 系膜区正常, 系膜细胞不增多, 滤过

膜结构正常,上皮足突排列整齐,结构基本正常。过度训练组大鼠肾小球基底膜呈不规则增厚,系膜细胞增生,系膜基质明显增多,上皮细胞足突广泛融

合,结构出现异常。菟丝子+过度训练组大鼠仍有较轻系膜区扩大和基底膜呈不规则增厚,但上皮细胞足突融合不明显,异常程度明显减轻(图2)。

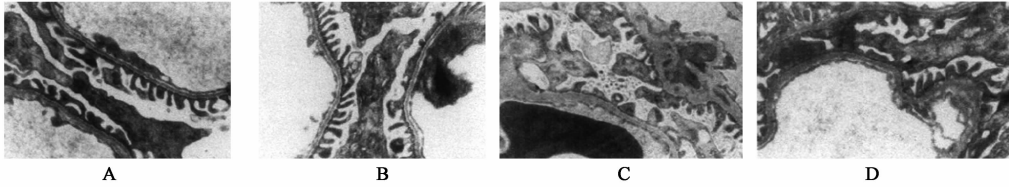


图2 运动及菟丝子对大鼠肾组织超微结构变化的影响(透射电镜,×8 000)

3.3 运动及菟丝子对大鼠血清 BUN 和 Cr 的影响 血清尿素氮、肌酐水平,一般训练组、过度训练组、菟丝子+过度训练组高于静止对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);一般训练组、菟丝子+过度训练组低于过度训练组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表1。

3.4 运动及菟丝子对大鼠肾组织匀浆中 SOD 活性和 MDA 含量的影响 SOD 活性,一般训练组、过度训练组($P < 0.01$)、菟丝子+过度训练组低于静止对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);菟丝子+过度训练组($P < 0.05$)高于过度训练组($P < 0.05$)。MDA 含量,一般训练组、过度训练组、菟丝子+过度训练组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、高于静止对照组;菟丝子+过度训练组低于过度训练组($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠肾组织匀浆中 SOD 活性和 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD/nU·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
静止对照	305.35 ± 3.07	9.89 ± 1.68
一般训练	273.03 ± 2.95 ^{1,4)}	11.54 ± 2.12 ^{1,4)}
过度训练	214.92 ± 1.24 ²⁾	20.14 ± 1.98 ²⁾
菟丝子+过度训练	248.14 ± 1.43 ^{2,3)}	12.58 ± 1.41 ^{2,3)}

4 讨论

肾缺血再灌注(Ischemic reperfusion, I/R)损伤是一个复杂的病理生理变化过程。氧自由基(Oxygen free radicals, OFR)在 I/R 发生、发展过程中起着至关重要的作用^[5]。正常情况下,体内可产生少量自由基,但由于体内具有灭活自由基酶系统,自由基被迅速清除,不产生损伤作用。运动时由于 I/R 使自由基产生增加,可引发膜脂质过氧化反应,导致膜的液态性、流动性及通透性改变,进而造成膜功能障碍,尤其是线粒体膜的破坏将影响细胞的代谢和机能,并干扰整个器官的生理功能。SOD 是体内重要的自由基清除剂,其活性高低可间接反映机体清除自由基的能力^[6]。MDA 是膜脂质在氧化性

极强的自由基作用下发生氧化反应的终末产物,MDA 水平的变化可以反映细胞受损的程度^[7-8]。肌酐和尿素氮分别是肌肉和蛋白质的分解代谢产物,主要经血循环从肾脏排除体外,其血中的浓度取决于肾小球滤过能力,当肾脏实质受到损伤,肾小球滤过率降到临界点后,二者的浓度就会明显上升^[9]。

实验结果显示,8 周的过度训练导致大鼠肾组织超微结构被严重破坏、组织病理学发生明显改变;血尿素氮、血清肌酐增高[过度训练组、菟丝子+过度训练组高于静止对照组($P < 0.01$)]；SOD 活性降低[过度训练组、菟丝子+过度训练组低于静止对照组($P < 0.01$)]；MDA 含量升高[过度训练组、菟丝子+过度训练组高于静止对照组($P < 0.01$)]。说明过度训练已造成大鼠肾脏运动性缺血“再灌注”损伤,肾功能受到严重损坏。但肾组织超微结构破坏程度、组织病理学改变,菟丝子+过度训练组较过度训练组明显减轻。血尿素氮和血清肌酐含量菟丝子+过度训练组低于过度训练组($P < 0.05$)；SOD 活性,菟丝子+过度训练组高于过度训练组($P < 0.05$)；MDA 含量,菟丝子+过度训练组低于过度训练组($P < 0.05$)。表明,菟丝子可以有效清除自由基,减轻肾脏的缺血缺氧,抑制脂质过氧化作用,提高 SOD 活性,有效减轻肾脏缺血再灌注损伤。其机制可能为:①菟丝子中所含菟丝子多糖具有抗脂质过氧化及清除氧自由基作用。通过改善机体供氧能力,改善运动机体微循环,增强机体免疫力,使 SOD 增加,活力增强,降低脑组织的过氧化脂质(LPO)含量^[10]；②菟丝子中所含菟丝子黄酮具有较强的抗氧化能力,可以通过清除机体内超氧阴离子自由基和羟自由基^[11],而使 SOD 的消耗相应降低。两方面的共同作用能够调节机体维持 SOD 的动态平衡,显著地提高肾组织 SOD 活性,对清除机体自由基、减轻自由基对线粒体膜和肌浆网膜造成的氧化损伤起到积极作用。

千金苇茎汤促进撤血清舌鳞癌细胞凋亡机制的研究

冯颖,张军峰*,张旭,许冬青,董伟,孟玉芬,詹臻
(南京中医药大学中西医结合学科,南京 210046)

[摘要] 目的:探讨千金苇茎汤辅助治疗舌鳞癌的分子机制。方法:体外培养 SAS 和 TCA-8113 舌鳞癌细胞,撤除血清模拟体内抗血管生成药物治疗环境,千金苇茎汤 3 个部位作用撤血清舌鳞癌细胞 72 h,MTT 法检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞周期分布和凋亡,ELISA 检测细胞培养上清前列腺素 E₂(PGE₂)含量。结果:与撤血清对照相比,千金苇茎汤 07 部位能够降低撤血清舌鳞癌细胞的增殖活性(生长抑制率_{max}34.36%),促进 SAS 和 TCA-8113 细胞凋亡率升高(P<0.05),抑制细胞分泌 PGE₂(P<0.05),且具有剂量和时间依赖性。结论:千金苇茎汤 07 部位促进撤血清舌鳞癌细胞凋亡的机制与抑制 PGE₂合成相关,为深入研究千金苇茎汤辅助治疗恶性肿瘤提供了新的思路和方法。

[关键词] 千金苇茎汤;舌鳞癌;撤血清;细胞周期和凋亡;PGE₂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0236-05

[doi] 10.11653/syfyj2013180236

[收稿日期] 20130531(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30472123&81001502),江苏省自然科学基金(BK2008461),教育部高等学校博士点基金资助项目(20103237110011),江苏省高校自然科学研究项目(10KJB360004),江苏高校优势学科建设工程项目,南京中医药大学优秀中青年教师计划资助

[通讯作者] *张军峰,博士,副教授,从事中西医结合基础研究,Tel:025-85811925,E-mail:zhangjunfeng5_5@163.com

8 周过度训练引起的训练大鼠运动性肾缺血再灌注导致了自由基代谢紊乱,肾组织超微结构被严重破坏,肾组织超微结构异常;菟丝子改善了过度训练大鼠肾缺血再灌注所引起的自由基代谢紊乱,训练大鼠肾脏超微结构趋于正常,对运动性肾缺血再灌注具有良好的保护作用。

[参考文献]

[1] Barclar W F. Review of medical physiology [M]. California:lange Medical Publication. 1995:577.
[2] Heifets M, Davis T A, Tegtmeier E, et al. Exercise training ameliorates progressive renal disease in rats with subtotal nephrectomy [J]. *Kidney Int*, 1987, 32(6):815.
[3] 郭澄,王雅君,张剑萍. 菟丝子的化学成分和药理活性研究[J]. *时珍国医国药*,2005,16(10):1035.
[4] Palazzetti S, Rousseau A S, Richard M J, et al. Antioxidant supplementation preserves antioxidant response in physical training and low antioxidant intake [J]. *Br J Nutr*,2004,91(1):91.

[5] 王丽,梅长林. 缺氧诱导因子 1 α 及氧自由基在肾缺血再灌注损伤中的表达 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2006,22(7):371.
[6] 黄丽亚,张宏,余洁. 板党对冈田酸致大鼠阿尔茨海默病抗氧化作用 [J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(9):1105.
[7] 柳渊洁,李亮,王东红,等. 茴香枳术汤对实验性大鼠粘连性肠梗阻组织 SOD、MDA 及病理的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*,2010,17(1):165.
[8] 石旦,何小舟,徐海燕,等. 肾缺血再灌注损伤及其保护的研究进展 [J]. *医学综述*,2009,15(18):2802.
[9] 洪平,陈耿,李清正,等. 不同温度脱水速降体重对机体部分生化指标的影响 [J]. *体育科学*,2010, 30(4):44.
[10] 马鹏生,朱溶月. 菟丝子多糖药理作用的实验研究 [J]. *内蒙古中医药*,2009,(15),66.
[11] 陈林林,吴春,李伟. 菟丝子黄酮的抗氧化性能研究 [J]. *食品工业科技*,2008,29(11),116.

[责任编辑 聂淑琴]