

有氧运动改善 db/db 小鼠肾脏凋亡的研究

洪昱文

南京体育学院，江苏南京，210014；

摘要：目的：探究有氧运动对 db/db 小鼠肾脏凋亡的影响。方法：将选取 10 只 SPF 级 7 周龄雄性 BKS 小鼠、20 只 SPF 级 7 周龄雄性 BKS-db/db 小鼠作为实验对象，10 只 BKS 小鼠为安静对照组（WT 组），其中 20 只 BKS-db/db 小鼠根据空腹血糖水平筛选糖尿病病发小鼠。将血糖含量符合要求的 db/db 小鼠随机分为两组：阳性对照组（C 组）、单纯运动组（E 组）每组 10 只。E 组小鼠先适应性运动一周后，再进行正式的有氧运动训练，为期八周，WT 组、C 组小鼠不运动。使用 TUNEL 染色观察各组的阳性染色面积，Western blot 蛋白印迹检测观察肾脏 Caspase-3 蛋白表达量。结果：与 C 组相比，E 组的 TUNEL 阳性染色面积更少，而与 WT 组相比，C 组的 TUNEL 阳性染色面积更多。与 C 组相比，E 组的 Caspase-3 蛋白含量增多，而与 WT 组相比，C 组的 Caspase-3 蛋白含量减少。结论：有氧运动可以改善 db/db 小鼠肾脏细胞的凋亡。

关键词：有氧运动；细胞凋亡；肾脏细胞；糖尿病

DOI：10.69979/3029-2808.25.04.009

引言

糖尿病作为一种普遍的慢性疾病，其发病率一直占较高水平。长期血糖升高会引发众多并发症，严重甚至累及身体的部分脏器，例如肾脏，心脏，脑等，累及肾脏时出现肾功异常等，引发糖尿病足等疾病。糖尿病肾病是糖尿病引起的并发症中占比较高的一种，但由于其发病原因和机制复杂，国内外相关研究尚未十分明确，但其根本原因是出现了糖代谢的异常，生长因子和细胞因子等多种免疫损伤。近年来国内外大量的研究表明，在糖尿病肾脏疾病中，细胞凋亡与其发病之间有着密切的关系。有氧训练是一种如今广泛应用的运动形式，基于有氧代谢，为身体提供在运动时所需的能量，是一种可以有效干预机体健康的运动方式。研究表明有氧运动可以控制血糖，缓解糖尿病的症状，还能够降低心血管疾病的死亡率。

运动对肾脏形态结构和功能的影响，包括结构、自由基损伤、细胞凋亡和基因表达等一直是国内外众多研究的主题。有相关研究指出，有氧运动可以抑制肾脏细胞的凋亡，并且有氧运动也可以缓解糖尿病的症状，保护肾脏功能，降低糖尿病血糖。但很少有有氧运动改善糖尿病肾病引起的肾脏细胞凋亡的研究，因此有氧运动是否可以改善 db/db 小鼠肾脏细胞凋亡值得深入研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

本实验选取 10 只 SPF 级 7 周龄雄性 BKS 小鼠、20 只 SPF 级 7 周龄雄性 BKS-db/db 小鼠作为实验对象，10 只 BKS 小鼠为安静对照组（WT 组），db/db 小鼠根据空腹血糖水平筛选糖尿病病发小鼠。将血糖含量符合要求的 db/db 小鼠随机分为两组：阳性对照组（C 组）、单纯运动组（E 组）每组 10 只。饲养期间喂以小鼠普通饲料，自由进食进水，光照比为 12h:12h，环境温度 22±2℃。E 组小鼠在进行第一周的适应性训练后，进行正式的有氧运动训练，为期八周，WT 组、C 组小鼠不运动。

1.2 动物取材

8 周有氧运动干预实验结束后，各组小鼠均禁食 24 小时，腹腔注射 5% 的戊巴比妥钠，眼静脉取血后脱颈处死。收集小鼠肾脏并称重，置于液氮速冻，后转入-80℃ C 超低温冰箱冻存备用。

1.3 TUNEL 染色

1.3.1 石蜡包埋、切片与 TUNEL 染色

小鼠肾脏取材后用 4% 多聚甲醛进行灌注固定，80%~100% 梯度的乙醇脱水，再置于二甲苯中透明，最后浸入石蜡。采取石蜡包埋后，用 Leica 切片机对蜡块进行连续切片，切片厚度为 4 μm，用于组织切片染色。

取肾组织石蜡切片，置于 60℃ 烘片机上烘片 10min，然后二甲苯浸洗 10min 两次，梯度乙醇清洗，然后流水清洗 3min 两次，在黑暗环境下滴加 TUNEL 放置于湿盒中，避光，在室温下等待 60min，然后用 PBST 清洗 3

遍，每次 5 分钟，再滴加 DAPI 等待 10 分钟，然后在 d d 双蒸水中清洗 3 次每次 5 分钟，最后滴加防荧光猝灭液后封片。

1.3.2 光学显微镜观察

每组随机选取 5 张切片，每张切片随机选取 10 个非连续视野，使用 ZEISS 荧光显微镜 Axio ImagerA2($\times 400$) 进行观察并摄片。

1.4 Western blot 蛋白免疫印迹检测

取定量相应肾脏组织样本，加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂后充分研磨，研磨液离心取上清即为胞浆蛋白。BCA 法测定各样本蛋白浓度，并使用 RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂混合液将所有样本蛋白浓度调整至 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。加入蛋白上样缓冲液后置入 95°C 金属浴锅进行蛋白变性 5min。样本蛋白加入浓度为 10% 的 SDS-PAGE 凝胶并电泳，采用湿转法将凝胶蛋白转印至 PVDF 膜上，使用封闭液封闭 90min。加入兔源一抗，BSA 稀释一抗，Caspase-3 比例 1:1000，GAPDH 比例 1:5000，置于摇床 4°C 孵育过夜。次日回收一抗，足量 TBST 洗膜 3 次，每次 1

0min，孵育由 BSA 稀释的羊抗兔二抗室温孵育 60min。孵育二抗结束后，TBST 洗净膜上残留抗体后加入 ECL 超敏化学试剂，置于多色凝胶成像系统中曝光蛋白条带。

1.5 数据统计与分析

Western blot 蛋白免疫印迹结果采用 Bio-Rad 多色凝胶成像系统图像分析，使用 Image Lab Software 5.2 分析蛋白条带灰度，组织学 TUNEL 染色通过计算凋亡指数进行分析。所有数据均采用 SPSS 20 软件进行统计学分析，使用单因素方差分析进行组间比较，采用 Graph Pad Prism 5.01 软件作图，所有计量数值结果都用均数士标准误的形式呈现，以 $P < 0.05$ 标准认为组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL 染色结果

小鼠肾脏细胞经 TUNEL 染色后于显微镜下观察，图像显示，WT 组只有很少一部分的阳性染色，C 组的 TUNEL 染色阳性细胞数目明显多于 WT 组，而 E 组 TUNEL 染色阳性细胞数目明显少于 C 组，多于 WT 组。

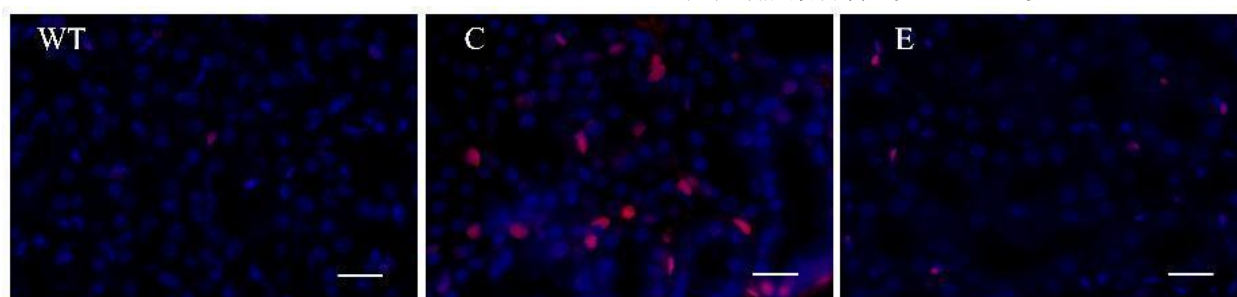


图 1 肾脏细胞 TUNEL 染色结果

注：TUNEL 染色观察肾脏细胞形态结构。“—”标尺显示长度为 $20\mu\text{m}$ 。

2.2 TUNEL 染色阳性凋亡指数

这三组染色结果各选 10 张显微镜下的染色成像，计算不重叠视野中阳性凋亡（玫红色）以及细胞核（蓝色）的个数，阳性凋亡个数除以总细胞核个数计算每组的凋亡指数。使用 SPSS 计算出 WT 组与 C 组，C 组与 E 组显著性均小于 0.05。C 组 TUNEL 染色凋亡指数明显多于 WT 组，E 组 TUNEL 染色凋亡指数少于 C 组多于 WT 组，具有统计学意义。

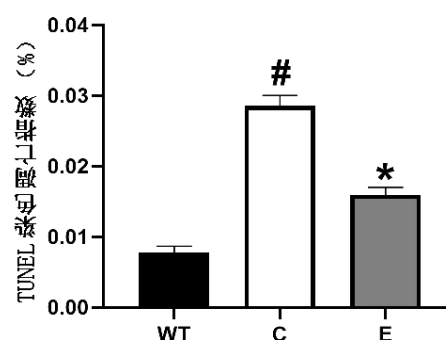


图 2 运动干预与 TUNEL 染色凋亡指数

注：图中#表示 C 组与 WT 组相比， $P < 0.05$ ；*表示 E 组和 C 组相比， $P < 0.05$ 。

2.3 小鼠肾脏组织 Caspase-3 表达的变化

如图 a 所示, C 组的肾脏细胞 Caspase-3 含量水平高于 WT 组, E 组的肾脏细胞 Caspase-3 含量水平低于 C 组。

使用 SPSS 计算出 WT 组与 C 组, C 组与 E 组显著性

均小于 0.05, 图 b, C 组中 Caspase-3 蛋白表达多于 WT 组, E 组中 Caspase-3 蛋白表达少于 C 组多于 WT 组, 具有统计学意义。

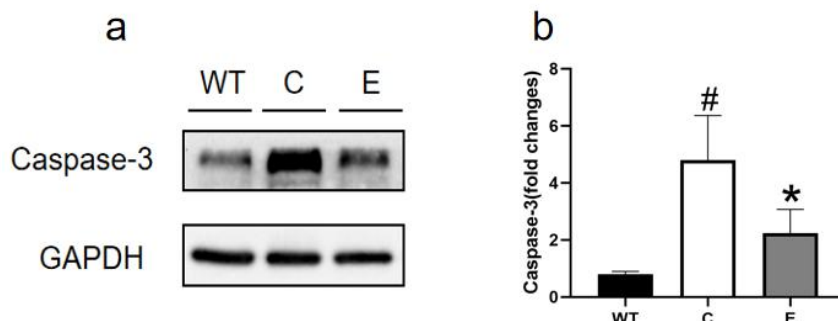


图 a 肾脏细胞凋亡相关蛋白条带; 图 b 运动干预与肾脏细胞中 Caspase-3 蛋白表达

注: 图中#表示 C 组与 WT 组相比, $P < 0.05$; *表示 E 组和 C 组相比, $P < 0.05$ 。

3 分析与讨论

细胞凋亡是有序的死亡, 是一种受基因调节的、生理上的正常改变, 凋亡的产生主要是为了保持体内环境的稳定, 又称为细胞程序性死亡。细胞凋亡是细胞主动的、自发的死亡, 是为了更好的适应环境, 而选择的死亡。细胞凋亡在机体内环境稳定, 调节机体的生长和形态, 起着至关重要的作用。细胞凋亡是一个需要消耗能量才能完成的过程, 因为在细胞凋亡过程中需要转录新的基因和合成蛋白。

糖尿病肾病是糖尿病引起的并发症中常见的一种, 是导致慢性肾功能衰竭的主要原因^[1]。通过对基因调控、信号传导、细胞凋亡和疾病的相关性的深入研究, 在糖尿病肾脏病变过程中, 细胞凋亡深度参与, 揭示了细胞凋亡在糖尿病肾脏病变中的作用机理^[2]。有相关研究显示, 足细胞在糖尿病肾病的发病过程中起重要作用。足细胞又称为肾小球上皮细胞, 是位于肾小球基底膜最外层的一种高分化终末细胞。相邻的足细胞形成裂孔, 裂孔上覆盖的是裂孔隔膜。裂孔隔膜作为一个过滤屏障, 它会进行选择性过滤, 在防止蛋白流失形成蛋白尿方面起到主要的作用。所以当足细胞发生凋亡时会引起蛋白流失形成蛋白尿、肾小球肥大以及肾小球基底膜增厚, 从而会导致肾功能的损伤, 严重可能会转化为慢性肾衰竭, 是糖尿病肾病发生、发展的关键。显而易见的是糖尿病患者的体内处于一个高血糖的水平, 而有研究表明, 不论是在高糖浓度的环境下培养的细胞或是在糖尿病大鼠体内的细胞, 这种高糖环境可导致足细胞凋亡水平

增高, 足细胞从基底膜脱落等, 最后会导致肾小球过滤屏障遭到破坏, 过滤屏障的通透性增加, 从而引起蛋白流失形成蛋白尿、肾功能丧失、肾小球硬化等后果。近来有研究也表明早期糖尿病肾病的特点之一是足细胞的丧失。此外 2 型糖尿病患者体内大量的血胰岛素水平也是其细胞凋亡的重要因素。胰岛素是一种促进细胞生长的因子, 当胰岛素浓度过高时, 激活凋亡调节基因, 细胞会过度聚集, 从而引起细胞的凋亡, 然后主动地将多余的细胞排出体外。

运动是对机体健康进行有效干预的一种方式, 对机体健康有良好的影响。黄志辉^[3]等人对有氧运动干预老年大鼠肾脏细胞凋亡水平进行研究结果显示, 老年运动组大鼠的脑组织细胞凋亡比率虽与青年对照组和青年运动组对比更高, 但与老年对照组相比明显降低。这表明, 有氧运动可以显著减少由于年龄增长而增加的脑、肾脏细胞的凋亡, 能有效的降低脑组织和肾脏细胞的损伤。李艳^[4]对游泳运动对增龄小鼠肾脏细胞凋亡和自由基代谢的影响进行研究。在游泳运动训练结束后, 研究表明增龄对照组小鼠的凋亡细胞明显多于经过运动训练的小鼠的凋亡细胞水平, 这说明适量的运动可以减少增龄小鼠的肾脏细胞的凋亡, 对肾脏的各项功能具有一定的保护作用。有氧运动对血糖含量具有改善作用, 并且可以改善胰岛素抵抗。当糖尿病患者进行有氧运动时, 肝糖原的分解所得小于肌肉所利用的血糖含量, 产生血糖含量差, 进而导致机体的血糖水平降低^[5]。许多研究已经证明, 运动能够改善胰岛素受体的质量, 有助于减肥和减少炎症因子等, 所以运动对胰岛素抵抗是具有

定改善作用的。因此运动对于糖尿病的症状也是具有缓解作用的。综上所述,运动既能抑制肾脏细胞的凋亡,又能改善糖尿病患者的症状。

基于以上推测我们可以通过运动前后糖尿病小鼠肾脏中凋亡细胞的含量变化来检验关于有氧运动改善 db/db 小鼠肾脏凋亡的效果。TUNEL 染色和 Caspase-3 凋亡分子标记检测都是检测细胞凋亡的手段。TUNEL 染色是通过脱氧核糖核酸的末端转移酶与 DNA 的三羟基端结合,实现对细胞凋亡的检测,由于正常或正在发生增殖的细胞中的 DNA 很少断裂,所以不会产生三羟基,也很难被染色,因此可以通过 TUNEL 染色阳性来观察细胞凋亡的情况。细胞在发生凋亡时的分子机制十分复杂,Caspase 家族在细胞凋亡过程中起着不可或缺的核心作用,重要蛋白之一就是 Caspase-3,是在细胞凋亡过程中起调节作用的一种关键蛋白酶^[6]。细胞凋亡的过程实际上是一个不可逆的和有限的由 Caspase 进行水解底物放大的级联过程,而 Caspase-3 在细胞凋亡的过程中起着重要的调控作用,活跃的 Caspase-3 可以通过降解细胞内的特定的蛋白底物、酶解失活凋亡抑制剂和酶促裂解相关的 DNA 修复分子来触发凋亡的级联反应,使细胞的凋亡进入无法逆转的状态^[7]。因此,Caspase-3 又被称为凋亡的“执行者”^[8]。因此 Caspase-3 凋亡分子标记检测可以通过 Western blot 蛋白免疫印迹法来检测肾脏细胞中 Caspase-3 的含量。因此可以将肾脏细胞中 Caspase-3 的含量作为检验细胞凋亡的一个重要指标,通过 Western Blot 蛋白免疫印迹法检测肾脏细胞中 Caspase-3 的含量来对运动干预肾脏细胞凋亡的效果进行探究。

在 TUNEL 染色实验中,对 3 组小鼠肾脏细胞行 TUNEL 凋亡检测。结果显示,WT 组小鼠肾脏阳性染色较少,说明凋亡的细胞很少;C 组小鼠肾脏细胞则有大量阳性染色,说明凋亡的细胞很多;E 组相较于 C 组阳性染色减少,但多于 WT 组,这提示在有氧运动凋亡细胞数量减少,抑制了凋亡的发生。在蛋白印迹检测中,可见 WT 组的蛋白条带灰度最低,WT 组的蛋白条带灰度最高,E 组相对 C 组灰度较低,这表明有氧运动后 E 组小鼠肾脏细胞中 Caspase-3 含量低于 C 组高于 WT 组。TUNEL

染色阳性凋亡指数和 Caspase-3 含量均可以反应出小鼠肾脏细胞凋亡的程度,将两组实验结果分别进行统计学分析,C 组相较于 WT 组,E 组相较于 C 组 P 均小于 0.05,具有显著性差异,有统计学意义。

4 结论

本次实验数据结果显示 8 周的有氧运动能够降低 db/db 小鼠肾脏细胞 TUNEL 染色阳性凋亡指数,能降低 db/db 小鼠肾脏细胞中 Caspase-3 蛋白的表达水平。该结果表明有氧运动可以改善 db/db 小鼠肾脏细胞的凋亡。

参考文献

- [1] Mandrup proulsen TH. cell apoptosis [J]. Diabetes, 2001, 50 (Suppl 1): s58
- [2] 赵燕,杨秋萍. 糖尿病肾病与细胞凋亡及其相关基因研究进展[J]. 医学综述,2007(12):911-913
- [3] 黄志辉,刘浩. 老年大鼠脑组织、肾脏细胞凋亡水平及有氧运动的干预效果[J]. 山东体育学院学报,2008(08),47-50:10.14104/j.cnki.1006-2076.2008.08.003
- [4] 李艳. 游泳运动对增龄小鼠肾脏细胞凋亡和自由基代谢的影响[J]. 淮北师范大学学报(自然科学版),2011,32(03):44-47
- [5] 祝恩梅. 生活方式干预对糖调节受损患者糖尿病发病的影响[J]. 山东医药,2011,51(37):51-52
- [6] 曾耀英. 细胞凋亡分子机制的研究进展[J]. 中国科学基金,1999(03):11-18
- [7] 朱婧. 大鼠肝原代细胞分离方法的改进及异硫氰酸丙烯酯对大鼠肝原代细胞凋亡的影响[D]. 上海:上海交通大学,2005
- [8] 肖华平. 异丙酚对鼠发育中大脑神经干细胞增殖与凋亡的影响及相关机制研究[D]. 广东:南方医科大学,2011

作者简介:洪昱文(2000.6-),女,汉族,江苏如皋,在读硕士研究生,研究方向:运动康复