

# 大豆多肽对过度训练大鼠肾脏滤过屏障形态结构和尿液成分的影响及其机制\*

徐清泉<sup>1</sup> 邓玉强<sup>1</sup>

**摘要 目的:**探讨补充大豆多肽对过度训练大鼠肾脏滤过屏障形态结构和功能的影响及其可能的机制。**方法:**将30只雄性大鼠随机平均分为3组,分别为对照组(C)、过度训练组(OT)、过度训练+补充大豆多肽组(OS)。检测各组大鼠肾组织SOD活性和MDA含量以及尿液总蛋白、白蛋白和 $\beta_2$ -微球蛋白含量,并观察各大鼠肾脏滤过屏障形态结构的变化。**结果:**电镜下,OT组大鼠肾组织出现毛细血管系膜增生,基膜基质增多,足细胞肿胀、融合,裂孔不清晰等变化;OS组肾小球基底膜厚度均匀,轻微增厚;足细胞排列有序,有足细胞足突有轻度融合现象,裂孔变小。与C组相比,OT组大鼠血清睾酮水平显著降低( $P<0.01$ ),皮质醇水平显著增高( $P<0.01$ ),尿液中的TP、Alb、 $\beta_2$ -MG含量显著增高( $P<0.01$ ),肾组织SOD活性显著下降( $P<0.01$ ),MDA水平显著升高( $P<0.01$ );与OT组相比,OS组SOD活性显著升高( $P<0.01$ ),MDA水平显著下降( $P<0.01$ ),尿液TP、Alb、 $\beta_2$ -MG含量显著降低( $P<0.01$ )。**结论:**大豆多肽可能是通过提高肾脏的抗氧化能力和加快自由基的清除的机制,实现了对过度训练大鼠肾脏滤过屏障形态结构完整性的维持。

**关键词** 谷氨酰胺;大豆多肽;过度训练;肾脏滤过屏障;形态;尿液成分

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-11-0979-04

**Research on the effects and mechnism of soybean peptide supplementation on the over-training rats' kidney filtration barrier structure and component of urine/XU Qingquan, DENG Yuqiang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(11): 979—982**

**Abstract Objective:** To investigate the effects and mechnism of glutamine and soybean peptide supplementation on the structure of kidney filtration barrier and component of urine in over-training rats. **Method:** Thirty male rats were randomly divided into three groups, namely the control group (C), over-training group (OT), and over-training + Soybean peptides group (OS). The activity of SOD and levels of MDA in the kidney, and the content of TP, Alb,  $\beta_2$ -MG and observe the changes of filtration barrier in every group were examined. **Result:** Under electronic microscope, the OT group appeared glomerulus mesangium hyperplasia, glomerular basement membrane increased, podocyte swelled, inosculate, and the slit pore was not clearly. The thickness of glomerular basement membrane was symmetrical, the array of podocyte kept orderly, the foot process appeared light fusion occasionally and the slit pores got smaller in OS group. Compared with C, OT rats' serum testosterone levels and SOD activity decreased significantly, and the corticosterone levels and SOD were significantly increased at the same time. The urine contents of TP, Alb,  $\beta_2$ -MG increased markedly. Compared with OT group, urinary contents the content of MDA, and TP, Alb,  $\beta_2$ -MG of OS group decreased significantly, while the activity of SOD increased abviously in OS group. **Conclusion:** The supplement of glutamine had obvios effects on maintaining the structure of kidney filtration barrier by increasing the activity of SOD and descreasing the level of MDA in the kindy.

**Author's address** College of Physical Education of Nantong University, 226007

**Key words** soybean peptides; over-training; kidney filtration barrier structure; urinary component

肾脏是维持机体内环境相对稳定的重要器官之一,对机体的生理功能起着重要的调节作用。以往的研究表明<sup>[1-3]</sup>,适宜的有氧运动对肾脏的结构和功能有良好影响,剧烈运动可能会导致肾脏结构与功能的改变,表现为尿液成分等变化。然而,目前却鲜见有关营养物质补充与肾脏形态结构与功能之间的关系的文献报道。大豆多肽是大豆蛋白经蛋白酶水解后,再经特殊处理而得到的蛋白分解产物,由多种分

子链长度不等的低分子寡肽混合而成,还含有少量的游离氨基酸、糖类和无机盐等成分<sup>[4]</sup>。研究表明,与传统大豆蛋白相比,大豆多肽具有易于消化吸收,能迅速给机体提供能量,蛋白质含量在80%以上且氨

\* 基金项目:江苏省教育厅自然科学基金资助项目(E0109188)

<sup>1</sup> 南通大学体育科学学院,南通市,226007

作者简介:徐清泉,男,讲师,硕士

收稿日期:2008-09-01

氨基酸组成齐全,可以由肠道内直接吸收,具有丰富的营养价值<sup>[9]</sup>。因此,本实验拟研究过度训练时大鼠肾脏滤过屏障形态和尿液成分的变化,并探讨补充大豆多肽对过度训练大鼠肾脏滤过屏障形态和尿液成分影响的机制,以期运动训练实践提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象与分组

选用清洁级雄性 SD 大鼠 30 只,体重(142.72±5.76)g,动物购回后,分笼适应性饲养,每笼 3—5 只,自由进食、饮水,室温 25±3℃,湿度 55%±15%,自然光照。1 周后,将大鼠随机分为 3 组,每组 10 只,分别为对照组(C 组)、过度训练组(OT 组)、过度训练+补充大豆多肽组(OS 组)。

### 1.2 实验方案

动物购回后适应性饲养 1 周,参照郑陆等<sup>[6]</sup>的方法建立大鼠跑台过度训练模型。对照组:不进行任何训练,每天以同剂量的生理盐水(安慰剂)灌胃。过度训练组:进行持续性大运动量跑台训练 8 周,跑台坡度为 10°,周日休息。第 1 周每天适应性训练 10m/min×30min。第 2 至 7 周进行正式训练,每次从 15m/min 开始,每 5min 速度增加 5m/min,直至 40m/min,保持此强度至力竭,并记录每只大鼠运动到力竭的总时间,算出其总平均值。大豆多肽干预组:训练方法同过度训练组,训练时间为过度训练组的平均值。但是在每次训练后灌服用生理盐水新鲜配制的大豆多肽溶液,补充剂量为 500mg/BW,对照组灌等量的生理盐水作为安慰剂。大豆多肽由山东中食生物技术有限公司馈赠。主要分子量分布在 200—600 之间,经质谱法测定多肽的氨基酸序列为:①Leu Ala Pro Glu; ②Met Ser Leu Pro Thr Asn; ③Arg Leu Met Leu His Leu Ala Pro。同时,在训练过程中动态观察大鼠的精神状态、饮食情况和体重等指标的变化。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 实验取材:**所有动物在末次训练结束后,禁食 12h,称量体重。依次按照 50mg/kg BW 的剂量腹腔注射 2%的戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,腹主动脉取血 10ml,将血样注入试管,4℃以下,4000r/min 离心 10min 后,吸取上清液保存于-20℃冰箱,以备测血清睾酮(T)、皮质酮(C)含量。末次训练结束后迅速结扎大鼠外尿道口,处死大鼠后用一次性注射器穿刺膀胱取尿液 2ml,以备测尿液中的 TP、Alb、β<sub>2</sub>-MG 的含量。

**1.3.2 指标的测定:**血清睾酮采用放射免疫法测试,试剂盒购于北京北方生物技术研究所,测定仪器为国产 GC-911 型 γ-计数器。血清皮质酮,采用 ELIZA 法测试,试剂盒由美国 ADL 公司提供,测量仪器为美国 Bio-Rad 公司 55 型酶标仪。TP 采用 SDS-CBC 测定法、Alb 和 β<sub>2</sub>-MG 含量采用放射免疫法测定。超氧化物歧化酶(SOD)采用黄嘌呤氧化酶法,丙二醛(MDA)采用硫代巴比妥酸法,肾组织蛋白采用考马氏亮兰法测定。

### 1.4 肾组织石蜡切片和透射电镜切片的制作

取新鲜的肾组织,按照常规方法制作肾组织石蜡切片,在 Olympus 显微镜下仔细观察并拍照。肾组织透射电镜切片的制作在扬州大学测试中心进行,观察仪器为 philips 公司生产的 Tecnai 12 型透射电子显微镜。

### 1.5 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,结果用均数±标准差表示,统计学分析采用两组之间的独立样本 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 一般观察指标

对照组大鼠眼睛显得有神,活泼好动,毛皮整齐有光泽。过度训练组大鼠懒惰,眼睛目光呆滞、无光,皮毛凌乱且有脱落。OS 组大鼠的神情、疲惫程度以及毛发的情况要明显好于过度训练组。同时,与对照组相比(表 1),过度训练组大鼠体重显著下降( $P<0.01$ )。与过度训练组相比,补充大豆多肽组大鼠体重明显高于过度训练组( $P<0.01$ )。

表 1 实验过程中各组大鼠体重变化情况 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	试验前		试验后	
	鼠数	体重(g)	鼠数	体重(g)
C 组	10	212.11±8.29	10	475.81±37.52
OT 组	10	213.72±5.69	10	402.58±22.25 <sup>①</sup>
OS 组	10	214.79±7.41	10	423.60±13.95 <sup>②</sup>

①OT 组与 C 组相比  $P<0.01$ ;②OS 组、OT 组比较  $P<0.05$

### 2.2 各组大鼠血清 T、C 的变化

与对照组相比,OT 组大鼠血清睾酮水平显著降低( $P<0.01$ ),同时伴有血清皮质酮水平显著增高( $P<0.01$ );与 OT 组相比,补充大豆多肽使得 OS 组大鼠血清睾酮和 T/C 比值显著增高( $P<0.01$ ),并且显著降低了 OS 组大鼠血清皮质酮水平( $P<0.01$ )见表 2。

表 2 各组大鼠血清 T 和 C 以及 T/C 变化 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠数	血清睾酮 (nmol/L)	皮质酮 (nmol/L)	血清睾酮/ 皮质酮
C 组	10	4.33±0.56	224.70±49.09	0.020±0.006
OT 组	10	2.36±0.56 <sup>①</sup>	710.63±13.67 <sup>①</sup>	0.003±0.001 <sup>①</sup>
OS 组	10	3.11±0.53 <sup>②</sup>	310.66±16.05 <sup>②</sup>	0.010±0.002 <sup>②</sup>

①OT 组与 C 组相比  $P<0.01$ ;②OS 组、OT 组比较  $P<0.01$ 。

### 2.3 各组大鼠尿液 TP、Alb、 $\beta_2$ -MG 变化

由表 3 可知,与 C 组相比,OT 组尿液中 TP、Alb 和  $\beta_2$ -MG 的含量显著增高;与 OT 组相比,OS 组大鼠尿液中 TP、Alb 和  $\beta_2$ -MG 的含量显著降低。

表 3 各组大鼠尿液 TP、Alb、 $\beta_2$ -MG 变化

组别	鼠数	TP( $\mu$ g/ml)	Alb(ng/ml)	$\beta_2$ -MG( $\mu$ g/ml)
C 组	10	0.38±0.072	37.111±4.20	0.09±0.02
OT 组	10	1.08±0.258 <sup>②</sup>	89.60±16.04 <sup>②</sup>	0.24±0.04 <sup>②</sup>
OS 组	10	0.53±0.085 <sup>②③</sup>	43.8±5.53 <sup>②③</sup>	0.12±0.02 <sup>①③</sup>

OT 组与 C 组相比:① $P<0.05$ ,② $P<0.01$ ;OS 组、OT 组比较:③ $P<0.01$

### 2.4 各组大鼠肾脏组织 SOD、MDA 以及 SOD/MDA 比值变化

与 C 组相比,OT 组肾脏 SOD 活性显著降低,MDA 浓度显著上升,同时 SOD/MDA 比值显著降低。而补充大豆多肽后,OS 组肾脏 SOD 活性显著上升,MDA 浓度显著降低,同时,SOD/MDA 比值显著增高,见表 4。

表 4 各组大鼠肾组织 SOD、MDA 以及 SOD/MDA 比值变化 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠数	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)	SOD/MDA
C 组	10	160.65±4.77	1.21±0.03	133.14±4.17
OT 组	10	124.28±8.21 <sup>①</sup>	1.63±0.09 <sup>①</sup>	76.22±5.74 <sup>①</sup>
OS 组	9	143.52±6.26 <sup>②</sup>	1.41±0.03 <sup>②</sup>	102.04±5.0 <sup>②</sup>

①OT 组与 C 组相比, $P<0.01$ ;②OS 组、OT 组比较, $P<0.01$

### 2.5 各组大鼠肾组织石蜡切片

如图 1 所示(见前置彩色插页),C 组大鼠肾小球结构正常,均匀,肾小囊囊腔平滑、腔廓均匀一致;远曲小管和近曲小管结构清晰。OT 组大鼠肾小球不规则、变小,血管球毛细血管襻破裂。肾小囊囊腔变窄,肾小球球体与囊腔有粘连;OS 组大鼠肾小球结构基本正常,肾小囊囊腔平滑、腔廓大小均匀一致;远曲小管和近曲小管结构清晰。

### 2.6 各组大鼠肾脏滤过屏障的超微结构变化

如图 2 所示(见前置彩色插页),C 组大鼠肾小球基底膜(M)厚度均匀;足细胞(Pd)排列有序,裂孔(Sp)大小均匀一致;内皮细胞腔面细胞衣与基底膜紧密结合。OT 组大鼠基底膜(M)增厚、疏松、有沉积物;肾小球系膜增生,基质增多;足细胞(Pd)肿胀、足突(Fp)融合,裂孔(Sp)不清晰。血小板(Bp)游出毛细血管内皮,有溶酶体和大量的空泡出现。OS 组大鼠肾小球基底膜(M)厚度均匀一致,足细胞(Pd)排列有序,裂孔(Sp)大小均匀一致;线粒体结构清晰,有溶酶体出现。

## 3 讨论

### 3.1 过度训练大鼠模型的建立

目前对过度训练的诊断,还没有稳定的、敏感

的、可操作性强的单一指标。本研究考察了各组大鼠诸方面的表现,以判断过度训练。

在训练初期 OT 组大鼠表现为适应良好,体重、运动能力等一般性指标没有明显的变化。然而,从第 5 周开始,OT 组大鼠逐渐出现一系列过度训练反应症状,主要表现为懒惰、无力、易受惊吓,目光呆滞黯淡等常见的疲劳症状,以及皮毛凌乱、无光泽且有脱落。

过度训练时交感神经兴奋性增强,机体用力程度增加、体内能源物质消耗增大、食欲不振、睡眠障碍等症状,均可导致体重下降<sup>[7]</sup>。因而,体重减轻也被作为过度训练的辅助指标。本研究结果显示,实验前各组大鼠的体重无显著性差异。实验前 4 周后,过度训练组大鼠体重与对照组大鼠体重无显著性差异。第 5 周结束时,OT 组大鼠体重明显低于 C 组,第 6—9 周末 OT 组大鼠体重显著低于 C 组。

运动对睾酮的影响因运动时间、强度等诸多因素的不同而不同<sup>[8]</sup>。多数研究表明:一次长时间较大强度的运动、长期大运动量训练或过度训练时引起机体血清血睾酮下降<sup>[9-12]</sup>。一般认为皮质醇是代表机体分解代谢快慢的指标,如果运动后的机体皮质醇还保持较高的水平,就会导致机体分解代谢过旺,容易形成过度训练<sup>[13]</sup>。但也有人认为皮质醇的变化幅度大且是一过性的。因此,在运动实践的监控中,常把睾酮、皮质醇以及血睾酮/皮质醇和运动成绩结合起来综合诊断过度训练<sup>[14]</sup>。本研究观察到,与对照组比较,其血清睾酮浓度明显降低,OT 组大鼠出现了“运动性低血睾酮”,血清皮质酮浓度显著升高( $P<0.01$ );T/C 比值显著下降( $P<0.05$ )。

因此,8 周递增负荷的跑台运动中,大鼠始终处于对运动负荷的不适应或勉强适应状态,体内合成代谢和分解代谢的动态平衡受到了破坏,机体疲劳累积,运动能力的明显下降,提示大鼠过度训练模型造模成功。从而为进一步研究过度训练对机体器官机能的影响,以及预防和治疗过度训练症候群提供了良好的实验工具。

### 3.2 过度训练对大鼠肾脏滤过屏障和尿液成分的影响

以往的研究表明,适宜的有氧运动对肾脏的结构和功能有良好影响,而剧烈运动可引起肾脏的短暂损伤,甚至是永久损伤<sup>[2-3,15]</sup>。有研究表明,小鼠在持续高强度跑步和负重游泳之后,肾组织结构的变化表现为肾小球毛细血管扩张充血、内皮小孔间距和孔径大小不等,近球内肾小球毛细血管壁 3 层结构出现完全破裂和分离现象等<sup>[2-3]</sup>。本研究表明,

过度训练大鼠出现血管球基底膜增厚、疏松、肿胀,有沉积物;肾小球系膜增生,基质增多;足细胞肿胀、融合,裂孔间距变小且不清晰;血小板游出毛细血管内皮等现象。

运动后尿中蛋白质排出的数量,可以作为评定运动员身体机能状态、运动负荷强度和量的指标。虽然有关运动性尿蛋白已有不少研究,但其发生的确切机制却尚无定论<sup>[16-17]</sup>。在正常情况下,由于Alb分子量大,带有负电,正常情况下不能通过肾小球滤过膜,尿液中出现大量Alb提示肾小球损伤; $\beta_2$ -MG是小分子量蛋白,可以自由通过肾小球,但在近曲小管99.9%的 $\beta_2$ -MG可被重吸收<sup>[18]</sup>。因此,测定运动后尿蛋白中的Alb和 $\beta_2$ -MG的浓度,可以说明肾小球和肾小管在运动时的机能变化,运动后尿蛋白的出现往往提示肾脏已经受到损伤。本研究结果表明,与对照组相比,过度训练大鼠尿液TP、Alb、 $\beta_2$ -MG含量显著增高,提示OT组大鼠肾脏受到了一定的损害,已经形成肾小球-肾小管混合型的运动性尿蛋白。因而,过度训练所导致的肾脏组织的形态变化可能是尿蛋白排量增多的原因。

### 3.3 补充大豆多肽对过度训练大鼠肾脏滤过屏障和尿液成分的影响及其可能机制

脂质过氧化反应生成各种脂质过氧化物,其中含双键的脂肪酸发生脂质过氧化可以生成MDA,MDA的化学性质比较活泼,可以由生成部位扩散到其他部位产生毒性作用,也可以引起其他产物产生过氧化作用的连锁反应。MDA的产生量与脂质过氧化相平行,因而,测定丙二醛含量可以推测脂质氧化的程度<sup>[19]</sup>。机体有自由基氧化损伤的存在,同样也有防御自由基反应的保护系统。SOD是体内最重要的氧自由基清除剂,能够对损伤线粒体基质的氧自由基起歧化作用,在减少氧自由基引起的胞液和细胞核的自由基损伤中起着重要作用<sup>[19]</sup>。因而SOD活性的高低也是机体抗氧化能力强弱的标志。

运动时由于血液重新分配,肾脏的血流量急剧下降,并随运动过程的持续和强度的递增表现得更加明显,肾脏的这种不完全供血状况形成了“运动性肾缺血”。而运动后血供恢复,形成了运动缺血的“再灌注”<sup>[10]</sup>。缺血时,缺血组织中的辅酶Q脱离了电子传递呼吸链,发生了自动氧化,导致了自由基的产生;另外,脱离电子传递呼吸链的泛半醌自由基(QH·)可从邻近的多不饱和脂肪酸分子中夺取氢形成脂质自由基(LO·),引发脂质过氧化反应<sup>[19]</sup>。French等<sup>[20]</sup>研究的认为在再灌注阶段也促成了氧自由基的生成,因为在缺血时,组织细胞Ca<sup>2+</sup>超载,细

胞黄嘌呤脱氢酶(XD)在Ca<sup>2+</sup>依赖蛋白(calpain)作用下迅速转变成成为黄嘌呤氧化酶(XO),同时在缺血、缺氧时细胞内ATP已经部分降解成为次嘌呤,从而为氧自由基的产生创造了条件,当血液循环恢复时,氧分子进入缺血组织,分子氧和次嘌呤均即作为次嘌呤氧化酶的底物,反应生成尿酸和氧自由基。自由基的存在,一方面使膜性脂质双层发生脂质过氧化反应,脂质双分子层的生理性稳态和膜表面的糖蛋白含量发生改变<sup>[21]</sup>;另一方面,自由基可使膜内蛋白质分子发生链式聚合反应,使ATP酶、碱性磷酸酶和核苷酸酶的结构损伤,ATP生成减少,膜的主动运输能力下降,致使一些细胞内的酶和蛋白质溢出细胞外<sup>[22]</sup>。本研究发现OT组大鼠肾脏SOD活性显著降低,MDA浓度显著上升,且SOD/MDA的比值显著降低,而尿液中TP、Alb、 $\beta_2$ -MG含量均明显升高。提示运动后,肾组织自由基生成增加、脂质过氧化水平升高和自由基清除的能力下降,可能是肾脏组织滤过屏障形态结构损伤的主要发生机制。

大豆多肽是大豆蛋白质经蛋白酶作用后,再经特殊处理而得到的蛋白质水解产物。具有易消化吸收、能迅速给机体提供能量、促进脂质代谢和恢复体力等功能。服用大豆多肽固体饮料可促进中长跑运动员瘦体重的增加,提高血清睾酮的水平。本研究发现,与OT组相比,OS组血清睾酮水平明显上升,这与王启荣等<sup>[23]</sup>报道的相一致。同时,OS组大鼠尿液中TP、Alb、 $\beta_2$ -MG含量均明显下降,证明大豆多肽能够显著改善过度训练所致的运动性低血睾酮和运动性尿蛋白。另有研究认为补充大豆多肽能够调节运动所致的骨骼肌降解,在维持骨骼肌形态和机能方面扮演重要角色<sup>[24]</sup>。本实验研究了补充大豆多肽对过度训练大鼠肾脏滤过屏障形态的影响,通过透射电镜观察到,OS组大鼠肾小球基底膜厚度均匀,轻微增厚;足细胞虽排列有序,但有足细胞足突有轻度融合现象,从而导致裂孔变小。另外,上皮细胞膜有轻微肿胀。说明补充大豆多肽可以在一定程度上减轻过度训练机体体内旺盛的分解对机体的危害以及由运动引起的其他生理改变,有增强运动能力和促进机体机能恢复的作用。但是由于过度训练的发生机制极为复杂,大豆多肽改善过度训练大鼠肾脏结构和尿液成分的确切机制还需要进行进一步的研究。

### 参考文献

- [1] Ichikawa M, Fujita Y, Ebisawa H, et al. Effects of longterm, light exercise under restricted feeding on age related changes

(下转 989 页)