



跑台运动和二甲双胍在改善2型糖尿病小鼠血管炎症中的作用及机制研究

Effects of Treadmill Exercise and Metformin on the Improvement of Vascular Inflammation in Type 2 Diabetic Mice and Its Mechanism

姬丽丽¹,王丹²,江东谋¹,余蓉蓉¹,许桂清²,王少兵¹,刘一平^{1*}

Ji Lili¹,WANG Dan²,JIANG Dongmou¹,YU Rongrong¹,XU Guiqing²,
WANG Shaobing¹,LIU Yiping^{1*}

摘要:目的:探讨跑台运动、二甲双胍及二者联合干预对2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)小鼠主动脉ox-LDL、LOX-1蛋白表达、血管炎症反应与细胞凋亡的影响,评价防控血管损伤的干预手段。方法:清洁级雄性C57BL/6J小鼠随机分为正常组、T2DM造模组、跑台运动组、二甲双胍组和运动+二甲双胍组。运动组进行8周跑台运动,药物组进行8周二甲双胍干预。干预结束后,采用相应试剂盒检测脂质代谢指标;硝酸还原酶法检测血清NO水平;ELISA法检测血清胰岛素、ET-1、TNF- α 、IL-1 β 水平;Western Blot法检测主动脉eNOS、ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65、VCAM-1和Caspase-3蛋白表达。结果:1)高脂饲料联合STZ诱导的T2DM小鼠出现糖脂代谢紊乱,主动脉ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65蛋白表达显著上调,但NO/ET-1未见显著性变化;继续高脂饲料喂养9周后,糖脂代谢进一步紊乱,机体处于炎症状态,NO/ET-1显著性降低,主动脉ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65、VCAM-1和Caspase-3蛋白显著上调,eNOS蛋白表达显著下调。2)8周跑台运动、二甲双胍及二者联合干预均改善T2DM小鼠糖脂代谢紊乱,降低机体炎症,降低ET-1水平,显著下调主动脉ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65、Caspase-3蛋白表达,显著上调eNOS蛋白表达;运动和联合干预增加NO、NO/ET-1水平,显著下调主动脉VCAM-1蛋白表达,二甲双胍对其未见显著性差异。3)跑台运动在降低ET-1,下调主动脉ox-LDL、LOX-1、VCAM-1蛋白表达方面较二甲双胍效果显著;联合干预在改善T2DM小鼠糖脂代谢,降低机体炎症,升高NO/ET-1,上调主动脉eNOS蛋白表达,下调ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65、VCAM-1、Caspase-3蛋白表达较单一的跑台运动和(或)二甲双胍干预效果更为显著。结论:T2DM小鼠造模成功后未进行运动或药物干预,糖脂代谢紊乱进一步加重,血管舒张功能障碍,其可能机制主动脉炎症反应增强,血管细胞凋亡增加,导致血管损伤;8周跑台运动在降低血管炎症、改善血管舒张功能方面较二甲双胍作用显著,联合干预显示出更为有效的血管舒张功能改善效应。推测:8周跑台运动干预可能是通过下调ox-LDL、LOX-1蛋白表达,减轻血管炎症与细胞凋亡,从而改善血管舒张功能,联合干预则显示出运动与二甲双胍的协同作用。

关键词:跑台运动;二甲双胍;血管损伤;ox-LDL;NF- κ Bp65;Caspase-3

Abstract: Objective: To explore the effects of treadmill exercise, metformin and combined intervention on the protein expression of ox-LDL and LOX-1, vascular inflammation and apoptosis of aorta from type 2 diabetic mice, and evaluate the prevention of vascular injury. Methods: Clean grade male C57BL/6J mice were randomly divided into normal group, type 2 diabetes model group, treadmill exercise group, metformin group and exercise combined with metformin group. The exercise group received treadmill exercise for 8 weeks, meanwhile the drug group received metformin intervention for 8 weeks. After the intervention, lipid metabolism indexes were detected by the corresponding kit. Serum NO level was detected by nitrate reductase method. Serum insulin, ET-1, TNF- α and IL-1 β levels were detected by ELISA. Western Blot analysis was performed to detect the protein expressions of eNOS, ox-LDL, LOX-1, NF- κ Bp65, VCAM-1, Caspase-3 in the aorta. Results: 1) Type 2 diabetes model was induced by high fat di-

基金项目:

福建省社会科学规划项目(FJ2019B043);福建省社会科学基金项目(FJ2021B138);中国博士后科学基金项目(2021M700782);运动与健康福建省高校重点实验室资助项目

第一作者简介:

姬丽丽(1993-),女,硕士,主要研究方向为运动与心血管健康,E-mail:2500323928@qq.com。

*通信作者简介:

刘一平(1966-),女,教授,博士,主要研究方向为运动与心血管健康,E-mail:ypliu1966@126.com。

作者单位:

1.福建师范大学,福建福州350117;
2.福建医科大学,福建福州350122
1. Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China;
2. Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China.

et combined with STZ which showed glucose and lipid metabolism disorders. The protein expression of ox-LDL, LOX-1, and NF- κ Bp65 of aorta from T2DM were distinctly increased, and NO/ET-1 had no difference. After that, the glucose and lipid metabolism further disrupted, and at the same time, the body was in an inflammatory state with continued high-fat diet for 9 weeks. And NO/ET-1 significantly decreased, while the proteins expression of ox-LDL, LOX-1, NF- κ Bp65, VCAM-1 and Caspase-3 obviously up-regulated, and the protein expression of eNOS significantly down-regulated. 2) 8 weeks treadmill exercise, metformin and combined intervention could improve the glucose and lipid metabolism disorders, reducing inflammation, serum ET-1 level, resulting in a conspicuous downregulate of the proteins expression in aorta including ox-LDL, LOX-1, NF- κ Bp65 and Caspase-3, while the protein expression of eNOS up-regulated in T2DM mice, remarkably. Exercise and combined intervention increased the levels of serum NO, NO/ET-1, but significantly down-regulated the protein expression of VCAM-1 in aorta. However, there was no difference with metformin intervention among of NO, NO/ET-1, and the protein expression of VCAM-1 in aorta. 3) Compared with metformin intervention, treadmill exercise had a striking effect on reducing serum ET-1 and down-regulating the protein expression of ox-LDL, LOX-1 and VCAM-1 in aorta. The combined intervention had more effective effects than the single treadmill exercise and/or metformin intervention in improving the glucose and lipid metabolism, reducing inflammation, increasing NO/ET-1, up-regulating the protein expression of aortic eNOS, and down-regulating the expression of ox-LDL, LOX-1, NF- κ Bp65, VCAM-1 and Caspase-3 protein of T2DM mice. Conclusions: The glucose and lipid metabolism disorders are further aggravated in type 2 diabetic mice without exercise or drug intervention, and the vasodilatory function is impaired seriously. It may be associated with the enhanced inflammatory response of aorta and increased apoptosis of vascular cells, and then lead to vascular injury. Eight-week treadmill exercise intervention has a valid effect on reducing vascular inflammation and improving vascular diastolic function than metformin intervention, and among these interventions, combined intervention is more effective on improving vascular diastolic function. It is speculated that the 8-week treadmill exercise intervention may reduce vascular inflammation and apoptosis, and improve vascular diastolic function by down-regulating the expression of ox-LDL and LOX-1 proteins, moreover the combined intervention shows a synergism between exercise and metformin.

Keywords: treadmill exercise; metformin; vascular injury; ox-LDL; NF- κ Bp65; Caspase-3

中图分类号: G804.5 **文献标识码:** A

糖尿病是一组由多病因引起的以慢性高血糖为特征的常见且高发的代谢性疾病。血管病变是糖尿病的主要并发症,是其导致患者致残、致死的主要原因。目前,我国糖尿病患者人数居于全球首位,因此,防控糖尿病血管病变刻不容缓。2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)机体内脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗、氧化应激以及炎症反应相互作用,导致血管内皮功能障碍,促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生与发展。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)是一氧化氮(nitric oxide, NO)合成的关键酶,NO和内皮素-1(endothelin 1, ET-1)是血管内皮细胞分泌的具有拮抗作用的血管活性因子,NO/ET-1的失衡可促进糖尿病血管损伤与病变,因此,eNOS在维持血管功能中起着重要作用。在体内,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化修饰主要发生在动脉管壁(潘玉婷等,2014)。在糖尿病氧化应激状态下,LDL易被氧化成氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)。凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体-1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)是一种II型单链跨膜

蛋白,属于C型凝集素家族分子,是介导内皮细胞摄取ox-LDL的主要受体。研究表明,LOX-1介导血管内皮细胞摄取ox-LDL后,其脂质成分可通过损伤内皮细胞结构、诱导血管炎症反应、降低血管舒张功能等导致内皮功能损伤(徐雅琴等,2000),促进AS的发生发展,但其作用机制尚未明确。核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)是调控转录多种炎性因子的中心环节和共同通路,参与调控炎症反应、免疫反应、凋亡及细胞增殖与分化。NF- κ Bp65发生核转位时,可激活下游炎症靶基因表达。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cysteine-dependent aspartate-directed proteases-3, caspase-3)是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶家族成员介导的蛋白酶级联反应下游最关键的凋亡执行者,是多种凋亡途径的共同下游效应部分(董雅洁等,2012)。因此,本研究首先以NF- κ Bp65和Caspase-3探讨ox-LDL、LOX-1对T2DM血管炎症及细胞凋亡的影响。

目前,T2DM的治疗以控制血糖为主,二甲双胍是一种具有胰岛素增敏效应的口服降糖药,在控制血糖和预防糖尿病心血管并发症中具有良好效果,成为众多国家和组

织控制 T2DM 的一线用药。由于 T2DM 及其血管病变是血糖血脂代谢紊乱的多因素结果,有氧运动具有改善糖脂代谢、减少心血管危险因素、延缓血管损伤等作用,已成为防控糖尿病及其血管并发症的基础疗法。研究报道,有氧运动可提高糖尿病胰岛素敏感性,控制血糖,减轻血清白介素-1 β (interleukin-1-beta, IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) 水平,下调主动脉 NF- κ Bp65 基因及蛋白表达,改善血管内皮功能(李俊等, 2019;刘一平等, 2007)。那么,作为胰岛素增敏剂的双胍与可改善糖脂代谢紊乱的有氧运动对 T2DM 血管损伤的保护作用机制是否存在异同呢?本研究以 ox-LDL、LOX-1 为切入点,在探讨 T2DM 血管炎症损伤的基础上,进一步比较有氧运动和二甲双胍对 T2DM 血管保护效应的异同,评价有氧运动和二甲双胍对 T2DM 血管脂代谢、炎症反应的影响,并探讨其影响的可能途径。

1 研究对象与方法

1.1 实验动物与分组

2 周龄清洁级雄性 C57BL/6J 小鼠 69 只(吴氏实验动物中心提供),体质量 12~15 g,健康状况良好,合格证号: SCXK(沪)2017-0005。饲养房室温:(24 \pm 1) $^{\circ}$ C,湿度:50%~60%,昼夜循环 12 h:12 h。所有小鼠普通饲料适应性喂养一周。小鼠随机分为 8 组,具体如下:正常组(N, $n=8$)、正常对照组(NC, $n=8$)、正常跑台运动组(NE, $n=8$)、T2DM 组(D, $n=9$)、T2DM 对照组(DC, $n=9$)、T2DM 跑台运动组(DE, $n=9$)、T2DM 二甲双胍组(DM, $n=9$)、T2DM 跑台运动+二甲双胍组(DEM, $n=9$)。正常组给予普通饲料喂养, T2DM 造模组给予高脂饲料喂养(64.8% 基础饲料, 15% 蔗糖, 15% 猪油, 5% 蛋黄粉, 0.2% 胆酸钠)。

1.2 T2DM 小鼠模型制备

采用高脂饮食和多次小剂量腹腔注射链脲佐菌素制备 T2DM 小鼠模型(冯润等, 2017)。高脂饲料自由进食 4 周,禁食 12~14 h,称量小鼠空腹体质量,连续 3 天以 40 mg/kg 的剂量腹腔注射链脲佐菌素[STZ 溶于 0.1 mmol/L 冰柠檬酸缓冲液(pH=4.4),现配现用,避光放置, 30 min 内完成注射],常规饲养的正常组腹腔注射相同剂量的柠檬酸缓冲液。注射后第 7、14 天,在小鼠尾静脉采血测其血糖,最终随机血糖 \geq 16.7 mmol/L 确定为糖尿病模型。依据小鼠腹腔糖耐量实验和血清胰岛素水平判断其是否为 T2DM 模型。每天观察小鼠的活动状态和饮食情况,造模成功后每周记录小鼠的血糖变化。

1.3 运动干预方案

依据 Fernando 等(1993)制作的跑速与最大摄氧量($\dot{V}O_{2max}$)对应表,运动组小鼠进行 8 周 12 m/min(75% $\dot{V}O_{2max}$)跑台运动干预。运动组小鼠先进行一周适应性跑台运动,之后以 60 min/次、5 天/周,进行 8 周正式运动干预。适应性运动方案:第一天 8 m/min, 25 min,第二天 8 m/min,

30 min,第三天 8 m/min, 40 min,第四天 10 m/min, 40 min,之后以 12 m/min、40 min 进行 3 天的跑台干预。正式运动干预分为 4 部分:热身期(5 min)、中间期(10 min)、主负荷期(40 min)、恢复期(5 min)。热身期和恢复期的速度均为 8 m/min,中间期将速度逐渐增加到 12 m/min,在主负荷期以 12 m/min 运动强度进行 40 min 的运动干预。

1.4 给药方案

参考陈致瑜等(2017)的研究,二甲双胍给药剂量为 200 mg/(kg \cdot 天),给药体积为 0.05 ml/10 g 体质量,每周根据小鼠体质量调整灌胃剂量。

1.5 腹腔糖耐量实验

小鼠空腹 12~14 h,尾部静脉采血测其空腹血糖,然后按照 1.5 g/kg 体质量给予小鼠腹腔注射 50% 葡萄糖注射液,于注射后 15、30、60、120 min 尾部静脉取血,测其血糖水平,以近似梯形的计算公式计算其曲线下面积。

1.6 样品制备

按照 0.1 ml/10 g 体质量剂量腹腔注射 10% 水合氯醛,待小鼠完全麻醉,摘眼球取血,室温静置 20 min, 4 $^{\circ}$ C 离心机 3 000 r/min 离心 25 min,吸取上层血清, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。打开小鼠胸腹部,迅速剥离主动脉,放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱里冷冻,用于 Western blot 实验。

1.7 血清指标检测

血糖采用罗氏血糖仪和配套血糖试纸进行尾部采血检测;脂质指标采用相应试剂盒检测;NO 采用硝酸还原酶法检测;胰岛素、TNF- α 、IL-1 β 、ET-1 采用 ELISA 法检测。

1.8 Western Blot 法

用 10 mg 组织加入 100 μ l 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,提取主动脉总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。制备凝胶、上样、电泳、转膜、5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育一抗过夜。次日 TBST 清洗一抗 3 次(10 min/次),二抗室温孵育 2 h, TBST 清洗二抗 3 次(10 min/次)。之后,进行双色红外激光成像与分析。

1.9 统计学分析

运用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析,组间比较采用独立样本 t 检验或 One-way ANOVA,所有数据用平均值 \pm 标准差表示。 $P < 0.05$ 表示具有显著差异, $P < 0.01$ 表示具有极显著差异。

2 实验结果

2.1 T2DM 小鼠模型构建

2.1.1 空腹胰岛素水平和腹腔糖耐量实验

与 N 组相比, D 组空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)水平和腹腔糖耐量实验的时间-血糖曲线下面积(area under curve, AUC)显著升高($P < 0.01$; 图 1)。D 组各时间点血糖水平远高于 N 组。120 min 时, N 组血糖恢复到 0 min 时的血糖水平, D 组血糖明显高于 0 min 时的血糖水平。

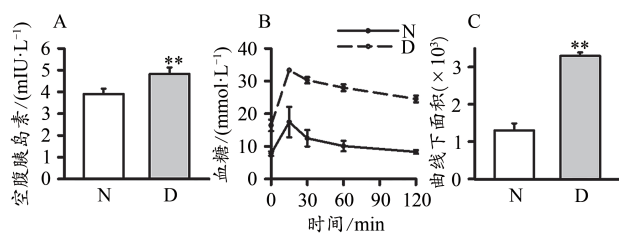


图1 空腹胰岛素水平和腹腔糖耐量实验

Figure 1. Fasting Insulin Level and Intraperitoneal Glucose Tolerance Test

注:与N组相比,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。

2.1.2 N组和D组小鼠主动脉eNOS、ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65、VCAM-1、Caspase-3蛋白表达变化

如图2所示,与N组相比,D组ox-LDL、LOX-1及NF- κ Bp65蛋白表达显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$),eNOS、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和Caspase-3蛋白表达无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 T2DM建模9周后糖脂代谢、炎症状态、血管功能比较

如表1显示,与N组相比,D组空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、FINS、胰岛素抵抗(HOMA-insulin resistance, HOMA-IR)、胰岛素敏感性指数(insulin sensitivity index, ISI)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(tri-

glyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)显著升高($P < 0.01$),高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)显著降低($P < 0.05$),TNF- α 、IL-1 β 、NO、ET-1、NO/ET-1无显著性差异($P > 0.05$)。与D组相比,DC组FBG、HOMA-IR、TG、HDL-C、TNF- α 、ET-1显著升高($P < 0.01$),ISI、HDL-C、NO、NO/ET-1显著降低($P < 0.01$),FINS、TC、LDL-C、IL-1 β 无显著性差异($P > 0.05$)。

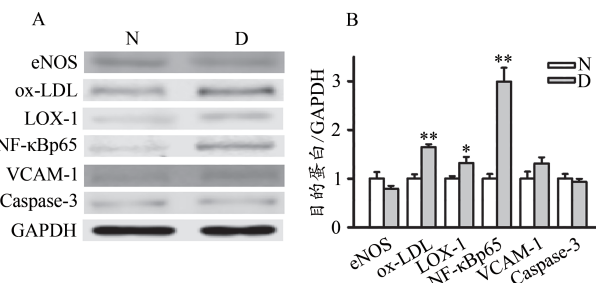


图2 N组和D组主动脉eNOS、ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65、VCAM-1、Caspase-3蛋白表达

Figure 2. Results of Protein Expression of Aortic ENOS, Ox-LDL, LOX-1, NF- κ Bp65, VCAM-1, Caspase-3 in N and D Groups

注:与N组相比,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。

表1 T2DM小鼠建模9周后糖脂代谢、炎症状态与血管功能情况

Table 1 Glucolipid Metabolism, Inflammatory Status and Vascular Function in T2DM Mice after 9 Weeks

Indexes	$M \pm SD, n=5 \sim 9$		
	N	D	DC
FBG/(mmol·L ⁻¹)	7.77 ± 0.69	16.42 ± 1.76 ^{##}	25.12 ± 1.63 ^{**}
FINS/(mIU·L ⁻¹)	3.91 ± 0.24	4.82 ± 0.30 ^{##}	5.18 ± 0.47
HOMA-IR	1.35 ± 0.18	3.52 ± 0.43 ^{##}	5.78 ± 0.50 ^{**}
ISI	-3.41 ± 0.13	-4.36 ± 0.13 ^{##}	-4.87 ± 0.10 ^{**}
TC/(mmol·L ⁻¹)	2.42 ± 0.30	4.93 ± 0.51 ^{##}	5.58 ± 1.17
TG/(mmol·L ⁻¹)	0.30 ± 0.14	0.64 ± 0.07 ^{##}	1.45 ± 0.11 ^{**}
LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	0.31 ± 0.07	0.96 ± 0.20 ^{##}	1.05 ± 0.19
HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	2.56 ± 0.39	2.13 ± 0.40 [#]	0.75 ± 0.12 ^{**}
TNF- α /(ng·L ⁻¹)	1 015.15 ± 81.68	1 093.03 ± 108.69	1 504.96 ± 78.52 ^{**}
IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	69.26 ± 12.00	79.11 ± 5.30	83.84 ± 4.85
NO/(μ mol·L ⁻¹)	24.49 ± 5.66	21.53 ± 5.72	11.30 ± 2.79 ^{**}
ET-1/(ng·L ⁻¹)	32.61 ± 8.97	35.25 ± 6.15	122.22 ± 8.78 ^{**}
NO/ET-1	0.82 ± 0.23	0.65 ± 0.14	0.09 ± 0.02 ^{**}

注:与N相比,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$;与D相比,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。

2.3 跑台运动和二甲双胍对T2DM小鼠糖脂代谢、炎症状态、血管功能的影响

图3显示,干预周期内,NC组和NE组血糖维持在稳定状态,DC组、DE组、DM组和DEM组血糖明显高于NC组和NE组,DC组血糖呈逐渐升高趋势。干预前5周内,DE组、DM组和DEM组血糖水平维持在稳定状态;5周后,DE组、DM组和DEM组血糖呈逐渐下降趋势,DE组整体血糖高于DM组和DEM组。表2显示,与NC组比,

DC组FBG、FINS、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C、TNF- α 、IL-1 β 、ET-1显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),ISI、HDL-C、NO、NO/ET-1显著降低($P < 0.01$)。与DC组比,DE组、DM组和DEM组FBG、FINS、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C、TNF- α 、IL-1 β 、ET-1显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),ISI、HDL-C显著升高($P < 0.01$);DE组和DEM组NO、NO/ET-1显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),DM组NO、NO/ET-1无显著性差异($P > 0.05$)。与DE组比,DM组ET-1显著升高($P <$

0.01); DEM组 TC、TNF- α 、ET-1 显著降低($P<0.01$, $P<0.05$), NO/ET-1 显著升高($P<0.01$)。与 DM 组比, DEM 组 FINS、HOMA-IR、TG、LDL-C、ET-1 显著降低($P<0.01$, $P<0.05$), ISI、HDL-C、NO/ET-1 显著升高($P<0.01$, $P<0.05$)。

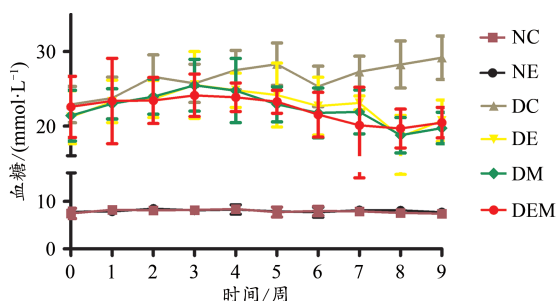


图3 各组小鼠干预周期内血糖水平($M\pm SD$, $n=7\sim9$)

Figure 3. Blood Glucose Levels of Mice in Each Group during the Intervention Period

2.4 跑台运动和二甲双胍对T2DM小鼠主动脉eNOS、ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65、VCAM-1、Caspase-3蛋白的影响

图4显示,与NC组比较,NE组、DEM组eNOS蛋白表达显著升高($P<0.01$),DC组eNOS蛋白表达显著降低($P<0.01$),DE组、DM组eNOS蛋白表达无显著差异($P>0.05$);NE组ox-LDL、NF- κ Bp65和VCAM-1蛋白表达显著降低($P<0.01$, $P<0.05$),LOX-1和Caspase-3蛋白表达无显著性差异($P>0.05$);DC组、DE组、DM组和DEM组ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65和VCAM-1蛋白表达显著升高;DC组和DM组Caspase-3蛋白表达显著升高($P<0.01$, $P<0.05$),DE组和DEM组无显著性差异($P>0.05$)。与DC组比较,DE组、DM组和DEM组eNOS蛋白表达显著升高($P<0.01$),ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65和Caspase-3蛋白表达均显著降低($P<0.01$, $P<0.05$);DE组和DEM组VCAM-1蛋白表达显著降低($P<0.01$),DM组VCAM-1蛋白表达无显著性差异($P>0.05$)。DE组和DM组相比,DEM组eNOS蛋白表达显著增加($P<0.01$),ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65和Caspase-3蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与DE组相比,DEM组VCAM-1蛋白表达无显著性差异($P>0.05$);与DM组相比,DEM组VCAM-1蛋白表达显著降低($P<0.01$)。

表2 T2DM小鼠糖脂代谢、炎症状态、血管功能

Table 2 Glucolipid Metabolism, Inflammatory Status and Vascular Function in T2DM Mice

$M\pm SD$, $n=5\sim8$

Indexes	NC	NE	DC	DE	DM	DEM
FBG/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	6.46 \pm 0.67	6.22 \pm 0.70	25.12 \pm 1.63**	19.22 \pm 2.06***	19.87 \pm 1.51***	18.46 \pm 1.74***
FINS/($\text{mIU}\cdot\text{L}^{-1}$)	3.87 \pm 0.23	3.75 \pm 0.16	5.19 \pm 0.47**	4.14 \pm 0.19##	4.37 \pm 0.30***	3.85 \pm 0.28###
HOMA-IR	1.11 \pm 0.16	1.04 \pm 0.14	5.78 \pm 0.50**	3.53 \pm 0.30***	3.86 \pm 0.40***	3.20 \pm 0.37***
ISI	-3.21 \pm 0.14	-3.14 \pm 0.14	-4.87 \pm 0.10**	-4.38 \pm 0.09***	-4.47 \pm 0.11***	-4.26 \pm 0.15***
TC/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.24 \pm 0.49	1.57 \pm 0.31**	5.58 \pm 1.17**	4.52 \pm 0.41***	3.80 \pm 0.65***	3.00 \pm 0.68***&&
TG/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.50 \pm 0.07	0.41 \pm 0.07*	1.45 \pm 0.11**	0.63 \pm 0.09**	0.73 \pm 0.07***	0.54 \pm 0.08###
LDL-C/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.36 \pm 0.06	0.34 \pm 0.06	1.05 \pm 0.19**	0.60 \pm 0.14***	0.72 \pm 0.12***	0.44 \pm 0.10###
HDL-C/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.77 \pm 0.21	3.53 \pm 0.89**	0.75 \pm 0.12**	1.32 \pm 0.30**	1.21 \pm 0.36***	1.55 \pm 0.24###
TNF- α /($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	1 247.20 \pm 167.78	965.01 \pm 124.30*	1 504.96 \pm 78.52*	1 356.53 \pm 81.73#	1 315.5 \pm 76.49#	1 209.7 \pm 123.53###
IL-1 β /($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	74.23 \pm 5.41	72.49 \pm 3.86	83.84 \pm 4.85*	78.00 \pm 2.36#	78.05 \pm 1.32#	76.63 \pm 3.79#
NO/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	20.84 \pm 4.36	39.70 \pm 8.23**	11.30 \pm 2.79**	18.21 \pm 2.67#	17.28 \pm 5.34	20.91 \pm 6.37#
ET-1/($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	27.30 \pm 9.55	28.10 \pm 10.45	122.22 \pm 8.78**	69.81 \pm 5.21***	94.39 \pm 16.96***&&	49.23 \pm 5.42***&&\$\$
NO/ET-1	0.83 \pm 0.33	1.56 \pm 0.58*	0.09 \pm 0.2**	0.26 \pm 0.05***	0.18 \pm 0.06**	0.43 \pm 0.14***&&\$\$

注:与NC组比,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$;与DC组比,#表示 $P<0.05$,##表示 $P<0.01$;与DE相比,&表示 $P<0.05$,&&表示 $P<0.01$;与DM相比,\$表示 $P<0.05$,\$\$表示 $P<0.01$ 。

3 分析与讨论

3.1 高脂联合STZ诱导的T2DM小鼠早期血管发生炎症反应

高脂饮食联合低剂量STZ多次腹腔注射诱导的T2DM小鼠模型与人类T2DM有相似的病理结构和生化特点(曾位森等,2014)。T2DM通常表现出高TG、高LDL-C、低HDL-C。在机体代谢应激状态下,LDL易被氧化成ox-LDL。ox-LDL对 endothelial cells 具有毒性作用,可诱导中性粒细胞黏附于内皮细胞(Alouffi et al., 2018),促进巨噬细胞内脂质蓄积,增加活性氧(reactive oxygen species, ROS)和脂质过氧化产物丙二醛(Yao et al., 2013),导致血

管功能障碍。LOX-1作为介导内皮细胞摄取ox-LDL的主要受体,ox-LDL/LOX-1/ROS通路的激活可促进各种丝裂原激活蛋白激酶类、NF- κ B和黏附分子的表达,促进炎症因子、生长因子和趋化因子的产生(Nègre-Salvayre et al., 2017)。本研究显示,实验诱导的T2DM小鼠早期随机血糖、FINS显著升高;TC、TG、LDL-C显著升高,HDL-C显著降低;主动脉ox-LDL、LOX-1和NF- κ Bp65蛋白表达显著升高,eNOS、VCAM-1、Caspase-3蛋白表达无显著性差异,说明该模型小鼠糖脂代谢紊乱,胰岛素抵抗,血管处于炎症状态但还未发生明显的炎症损伤。

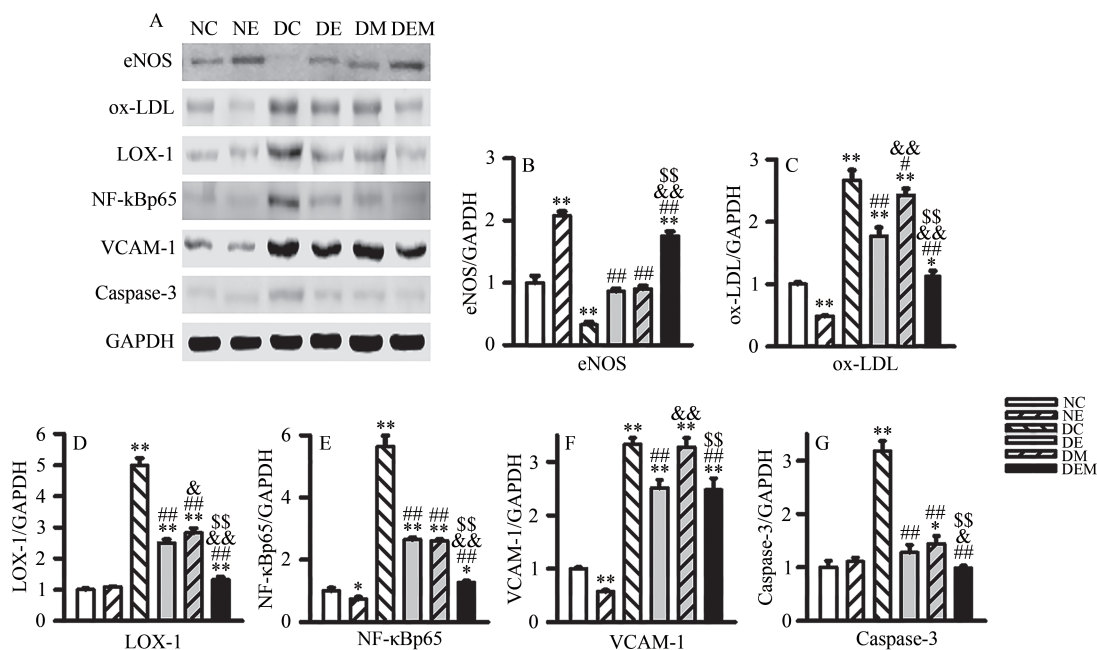


图4 各组小鼠主动脉eNOS、ox-LDL、LOX-1、NF-κBp65、VCAM-1、Caspase-3蛋白表达

Figure 4. Protein Expression of Aortic ENOS, Ox-LDL, LOX-1, NF-κBp65, VCAM-1, Caspase-3 among NC, NE, DC, DE, DM, and DAM Groups

注:与NC比,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$;与DC比,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$;与DE比,&表示 $P < 0.05$,&&表示 $P < 0.01$;与DM比,\$表示 $P < 0.05$,\$\$表示 $P < 0.01$ 。

大量流行病学数据显示,糖尿病是多种心血管疾病的独立危险因素,高血糖会增加心血管疾病的风险,但血糖控制并不能显著降低心血管疾病的发生率(Meigs et al., 2003),说明糖尿病血管并发症的发生还存在血糖之外的因素。本研究中,T2DM小鼠继续高脂饲料喂养9周后,其血清TC、TG、LDL-C显著升高,HDL-C显著降低,脂代谢紊乱进一步加重;TNF- α 和IL-1 β 显著升高,机体处于明显的炎症状态;主动脉ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65、VCAM-1蛋白表达显著上调,血管处于炎症状态;ET-1显著升高,NO、NO/ET-1显著降低,eNOS蛋白表达显著下调,血管舒张与收缩功能障碍。LDL的氧化修饰主要发生在动脉管壁,作为ox-LDL主要受体的LOX-1是一种有效的促炎介质。研究证实,ox-LDL可增加ET-1表达,降低内皮细胞活力,抑制内皮细胞迁移能力,降低eNOS蛋白表达,增加内皮黏附分子表达,诱导血管内皮功能障碍(Chen et al., 2019)。糖脂代谢紊乱、氧化应激、胰岛素抵抗均可诱导血管炎症的发生与发展。可见,造模成功后,仍高脂喂养且未进行运动干预的小鼠,将发生T2DM血管炎性损伤。

可见,糖尿病小鼠在早期就存在血管炎性反应,但血管功能正常,提示糖尿病早期就存在血管问题。但在不进行任何干预情况下,血管炎性反应会逐渐增加,并出现血管功能紊乱的现象,说明糖尿病后期若任其自然发展,血管病变将会加重。

3.2 跑台运动和二甲双胍可显著抑制T2DM小鼠血管的炎症反应,减少血管的细胞凋亡

运动锻炼作为慢性病防控的非药物手段,有助于降低代谢应激,减少心血管危险因素,防止糖尿病血管并发症的发生。有氧运动具有血管保护作用,与其提高胰岛素敏感性、抑制炎症反应和改善线粒体功能等密切相关(Zanuso et al., 2017)。其可增加大动脉血管内皮eNOS活性,增加NO基础释放量,改善内皮依赖性血管舒张功能(Silva et al., 2016)。虽然认识到运动能够改善糖尿病血管并发症,但其作用机制并不完全明确。二甲双胍是目前应用最广泛的抗糖尿病药物,可通过抑制肝脏糖异生和肝糖分解,增加肝脏和外周组织对胰岛素的敏感性,有效降低血糖,改善脂质代谢,增加脂肪酸氧化,降低LDL-C水平,还具有独立于降糖外的心血管保护作用(DeFronzo, 1999)。那么,运动、二甲双胍以及联合干预在防控T2DM血管并发症的发生与发展上又有哪些异同?本研究显示,8周75% $\dot{V}O_{2max}$ 跑台运动、二甲双胍及其联合干预后,ox-LDL、LOX-1、NF- κ Bp65蛋白表达显著下调,血管炎性反应降低;Caspase-3蛋白表达显著下调,血管细胞凋亡减少;主动脉eNOS蛋白表达显著上调,血管功能改善。这更加说明在糖尿病早期进行药物或运动干预的重要性。

研究表明,LOX-1的激活可导致氧化应激和炎症增加(Vincent et al., 2009),ox-LDL(Zhang et al., 2014)和高浓度葡萄糖(5.6~30.0 mmol/L)(Li et al., 2003)均以时间和剂量依赖性增加内皮细胞LOX-1 mRNA及蛋白表达。而胞内ox-LDL积累可诱导NF- κ Bp65磷酸化,促进线粒体细

胞色素C释放到细胞质,激活Caspase-3,导致内皮细胞凋亡(Lin et al., 2018)。血管内皮细胞的过度凋亡是造成血管病变的始动环节。高糖(40 mmol/L 葡萄糖)引起人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HU-VECs)炎症因子IL-1 β 、TNF- α 分泌增多,Caspase-3表达增多,使细胞存活率降低(谭其平等,2018)。诱导血管内皮细胞凋亡的信号通路均需激活Caspase-3才能产生细胞凋亡效应(吴云飞等,2013)。因此,推测运动可通过下调主动脉ox-LDL与LOX-1的表达,减轻血管炎症,减少血管细胞凋亡,以改善血管功能。此外,运动和联合干预均可增加NO水平、NO/ET-1,显著下调主动脉VCAM-1蛋白表达;二甲双胍对血清NO、NO/ET-1及VCAM-1蛋白表达未见显著影响,该现象可能与二甲双胍的用药剂量和用药时长有关。本研究还显示,联合干预在改善T2DM小鼠脂质代谢紊乱和血管炎症反应上的效果更显著,说明运动和二甲双胍在改善脂质代谢和血管炎症反应上可能存在协同效应。

4 结论

T2DM小鼠造模成功后未进行运动或药物干预,糖脂代谢紊乱进一步加重,主动脉炎症反应增强,血管细胞凋亡明显增加,血管舒张功能出现障碍;8周跑台运动在降低血管炎症、改善血管舒张功能方面较二甲双胍作用显著,联合干预显示出更有效的血管舒张功能改善效应。推测:8周跑台运动干预可能是通过下调ox-LDL、LOX-1蛋白表达,减轻血管炎症与细胞凋亡,从而改善血管舒张功能的,联合干预则显示出运动与二甲双胍的协同作用。

参考文献:

- 陈致瑜,刘率男,罗振华,等,2017.二甲双胍对高脂饮食诱导的2型糖尿病小鼠胰岛 β 细胞功能的改善及机制探讨[J].药学学报,52(10):1561-1567.
- 董雅洁,高维娟,2012. bcl-2、bax、caspase-3在细胞凋亡中的作用及其关系[J].中国老年学杂志,32(21):4828-4830.
- 冯润,蒋思昉,吕晓锋,等,2017.动物模型在糖尿病研究中的选择与应用[C]//2017年第十五届中国北方实验动物科技年会论文集.呼和浩特:内蒙古自治区实验动物管理委员会.
- 李俊,王少兵,许桂清,等,2019.有氧运动和二甲双胍对2型糖尿病大鼠血管炎症的影响及机制[J].上海体育学院学报,43(2):69-76,96.
- 刘一平,李建卫,刘丽霞,2007.运动对中年糖耐量减低患者血管内皮功能的影响[J].中国运动医学杂志,26(6):685-688.
- 潘玉婷,郭春雨,马晓娟,等,2014.氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的机制及雌激素保护作用[J].中华老年心脑血管病杂志,16(2):209-212.
- 谭其平,陈美姬,林建聪,等,2018.血管紧张素-(1-7)通过抑制GSK-3 β 通路对抗高糖引起的血管内皮细胞凋亡及炎症[J].解剖学研究,40(5):371-376.

- 吴云飞,郑维银,李焰,2013.Caspase-3在血管内皮细胞凋亡中的作用研究进展[J].西南军医,15(4):408-411.
- 徐雅琴,张钧华,柯杨,等,2000.氧化低密度脂蛋白内皮受体在氧化低密度脂蛋白致内皮细胞损伤中的作用[J].中国病理生理杂志,16(10):34-37.
- 曾位森,黄源坚,邵聪文,等,2014.高脂饮食诱导的2型糖尿病模型小鼠的生化及病理分析[J].南方医科大学学报,34(8):1115-1120.
- ALOUFFI S, FAISAL M, ALATRA A A, et al., 2018. Oxidative modification of LDL by various physicochemical techniques: Its probable role in diabetes coupled with CVDs[J]. Biomed Res Int, (3):1-7.
- CHEN L, QIN L J, LIU X, et al., 2019. CTRP3 alleviates ox-LDL-induced inflammatory response and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cells by activating the PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Inflammation, 42(4):1350-1359.
- DEFRONZO R A, 1999. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus[J]. Ann Intern Med, 131(4):281-303.
- FERNANDO P, BONEN A, HOFFMANGOETZ L, 1993. Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice [J]. Can J Physiol Pharmacol, 71 (10-11):854-857.
- LI L, SAWAMURA T, RENIER G, 2003. Glucose enhances endothelial LOX-1 expression: Role for LOX-1 in glucose-induced human monocyte adhesion to endothelium[J]. Diabetes, 52(7):1843-1850.
- LIN F, PEI L, ZHANG Q, et al., 2018. Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis and macrophage migration by regulating caveolin-1 phosphorylation: Ox-LDL induces caveolin-1 phosphorylation[J]. J Cell Physiol, 233(10):6683-6692.
- MEIGS J B, 2003. Epidemiology of cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus[J]. Acta Diabetol, 40(2):s358-s361.
- NÈGRE-SALVAYRE A, AUGÉ N, CAMARÉ C, et al., 2017. Dual signaling evoked by oxidized LDLs in vascular cells[J]. Free Radic Biol Med, 106:118-133.
- SILVA J F, CORREA I C, DINIZ T F, et al., 2016. Obesity, inflammation, and exercise training: relative contribution of iNOS and eNOS in the modulation of vascular function in the mouse aorta[J]. Front Physiol, 7:386-398.
- VINCENT A M, HAYES J M, MCLEAN L L, et al., 2009. Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: The role of oxLDL/LOX-1 [J]. Diabetes, 58(10):2376-2385.
- YAO S, ZONG C, ZHANG Y, et al., 2013. Activating transcription factor 6 mediates oxidized LDL-Induced cholesterol accumulation and apoptosis in macrophages by up-regulating CHOP expression [J]. J Atheroscler Thromb, 20(1):94-107.
- ZHANG Q, LIU J, LIU J, et al., 2014. OxLDL induces injury and defenestration of human liver sinusoidal endothelial cells via LOX1 [J]. J Mol Endocrinol, 53(02):281-293.
- ZANUSO S, SACCHETTI M, SUNDBERG C J, et al., 2017. Exercise in type 2 diabetes: Genetic, metabolic and neuromuscular adaptations. A review of the evidence[J]. Br J Sports Med, 51(21):1533-1538.
- (收稿日期:2019-11-28; 修订日期:2022-03-22; 编辑:马婧)