

跑台运动训练对 apoE 基因敲除小鼠高同型半胱氨酸血症及氧化应激的影响*

钟兴明¹ 尤少华¹ 王秀杰¹ 张玉琴¹ 周 军¹

摘要

目的:研究跑台有氧运动训练对血浆同型半胱氨酸(Hcy)水平及氧化应激的影响,探讨其可能机制,为进一步探寻延缓高同型半胱氨酸血症(HHcy)致动脉粥样硬化的有效方法提供依据。

方法:6周龄雌性 apoE^{-/-}小鼠随机分为三组:对照组、HHcy 组和 HHcy + 有氧运动组。饮用水中加入 Hcy(1.8g/L)制作 HHcy 模型。HHcy + 有氧运动组在 1 周适应性训练后进行 8 周跑台训练(0°, 15m/min, 60min/d, 每周训练 5 天,间隔 2 天)。采用酶法检测血浆 Hcy 及血脂水平。羟胺法试剂盒检测血浆超氧化物歧化酶(SOD)活性。

结果:与对照组相比,HHcy 组血浆 Hcy 水平明显增高($P=0.001$),HHcy + 有氧运动组血浆 Hcy 水平较 HHcy 组明显下降($P=0.016$)。三组之间体重增长,饮水量及血浆总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、甘油三酯水平差异无显著性意义。HHcy 组小鼠血浆 SOD 活性较对照组显著降低($P=0.014$),而有氧运动使 HHcy 小鼠血浆 SOD 活性明显增高($P=0.035$)。

结论:有氧运动可以降低 HHcy apoE^{-/-}小鼠血浆同型半胱氨酸水平,延缓同型半胱氨酸血症,上调氧化应激因子表达水平,改善氧化应激水平,而且该作用独立于血脂水平的改变。

关键词: 跑台训练;有氧运动;高同型半胱氨酸血症;血脂;氧化应激

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-10-0907-04

Influences of treadmill exercises training on hyperhomocysteinemia and anti-oxidant agent in ApoE knock-out mice/ ZHONG Xingming, YOU Shaohua, WANG Xiujie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(10): 907—910

Abstract

Objective:To investigate the influences of aerobic exercise on hyperhomocysteinemia (HHcy) and superoxide dismutase(SOD) activities in apoE^{-/-} mice and to explore its mechanism.

Method:Six-week old female apoE^{-/-} mice were assigned to three groups: control group, HHcy group and HHcy + exercises group. HHcy animal model was made by feeding high Hcy chow (1.8g/L in water). After 1 week of acclimatization, HHcy + exercises group was trained on a motorized rodent treadmill for 8 weeks (speed: 15m/min, slope: 0°, 60min/d, 5d/week). Plasm Hcy level and lipid level were measured enzymatically by auto-biochemistry analysis system. Plasm SOD activities were determined by hydroxylamine assay kit.

Result:Plasm Hcy level in HHcy group were significantly higher than that in control group ($P=0.001$), Hcy level decreased significantly in HHcy + exercises group compared with HHcy group ($P=0.016$). There was no significant difference in body weight, daily drinking amount, plasm total cholesterol, LDL-C, HDL-C and triglyceride concentrations in three groups. Compared with control group, plasm SOD activities were lower in HHcy group ($P=0.014$); however, it increased in HHcy + exercises group significantly($P=0.035$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.10.004

*基金项目:北京市教育委员会科技计划面上项目(KM 200910029004)

1 首都体育学院体育保健康复系,北京,100088

作者简介:钟兴明,男,讲师; 收稿日期:2010-12-01

Conclusion: Aerobic exercise could decrease plasm Hcy level and up-regulate the expression of anti-oxidant agent in HHcy apoE^{-/-} mice, which does not depend on the decrease of cholesterol level.

Author's address Department of Health Care and Rehabilitation, Capital Institute of Physical Education, Beijing, 100088

Key word treadmill training; aerobic exercise; hyperhomocysteinemia; blood lipid; oxidative stress

动脉粥样硬化是导致心脑血管患病及死亡的主要因素之一。近年研究表明,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)是动脉粥样硬化发生和发展的独立危险因素^[1,2],氧化应激可能是HHcy致动脉粥样硬化的重要发病机制之一。有氧运动已被证明可以通过降低高血压、高血脂等动脉粥样硬化传统危险因素而延缓动脉粥样硬化的发展^[3]。然而,有氧运动是否能够延缓HHcy所致动脉粥样硬化目前仍然不清楚,运动对血浆同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)水平的影响仍有争议。因此,本研究旨在观察有氧运动训练对HHcy apoE^{-/-}小鼠血浆Hcy水平的影响和小鼠氧化应激水平的变化,探讨有氧运动训练是否能够有效降低HHcy及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

6周龄雌性apoE^{-/-}小鼠,体重约16—18g,由北京大学医学部实验动物科学部提供。Homocysteine购自美国Sigma公司;酶法血浆脂质成分检测试剂购自北京中生北控生物有限公司;循环酶法Hcy检测试剂购自北京九强生物技术有限公司。自动跑台为中国杭州段式小动物跑台(BCPT-98),全自动生化分析仪(Olympus AU5400,日本),图像处理系统(IPP 5.0)。

1.2 HHcy小鼠动物模型建立

小鼠随机分为3组:对照组、HHcy组和HHcy+有氧运动组,每组8只,分笼饲养于22℃,12h/12h光照/黑暗环境中。于每日8时定时定量的投喂固体小鼠饲料和饮水,饮水水中按1.8g/L加入Hcy^[4]。每周称重,并记录每日饮水量。动物实验操作遵照北京大学医学部实验动物使用规则。

1.3 跑台有氧运动训练方案

HHcy+有氧运动组在1周适应性跑台训练(d1: 0°,10m/min×10min,逐渐递增至d5:0°,14m/min×

50min)后开始正式跑台训练8周:速度15m/min,坡度0°,60min/d,每日下午4:00—6:00进行训练,每周训练5d,间隔2d。

1.4 血浆Hcy和脂质水平检测

肝素抗凝,1000g,4℃,10min离心取上层血浆。使用全自动生化分析仪进行检测。循环酶法测定Hcy浓度,胆固醇氧化酶法测定总胆固醇(T-CHO),表面活性剂清除法测定低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),反应促进剂过氧化物酶法测定高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及甘油氧化酶法测定甘油三酯(TG)浓度。

1.5 血浆氧化应激水平的检测

肝素抗凝,1000g,4℃,10min离心取上层血浆。使用全自动生化分析仪进行检测。羟胺法试剂盒检测血浆超氧化物歧化酶(SOD)活性。

1.6 统计学分析

实验结果以均数±标准差表示,两组结果比较采用 t 检验;多组结果比较采用单因素/双因素方差分析,组间两两比较采用Student-Newman-Keuls检验。采用Prism 4.0统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 Hcy饮水喂养对小鼠生长和饮水量的影响

监测apoE^{-/-}小鼠的生长情况和每日饮水量,发现apoE^{-/-}小鼠平均饮水量为3.48ml/d,对照组(3.42±2.00ml/d)、HHcy组(3.22±1.64 ml/d)与HHcy+有氧运动组(3.53±2.07ml/d)之间差异无显著性意义($P=0.947$)。各组apoE^{-/-}小鼠生长及营养状况正常,双因素方差分析结果显示apoE^{-/-}小鼠每周体重匀速增长($P<0.001$),三组apoE^{-/-}小鼠间比较体重增长差异无显著性意义($P=0.094$),见图1。

2.2 有氧运动对apoE^{-/-} HHcy小鼠血浆Hcy水平的影响

对照组、HHcy组与HHcy+有氧运动组apoE^{-/-}小鼠之间血浆Hcy水平的不同结果显示,与对照组

相比,HHcy组小鼠血浆Hcy水平明显增高($P=0.001$),差异有显著性意义;HHcy+有氧运动组血浆Hcy水平较HHcy组明显下降($P=0.016$),且差异有显著性意义(见表1)。

2.3 有氧运动对apoE-/-小鼠脂质水平的影响

对照组、HHcy组与HHcy+有氧运动组apoE-/-小鼠血浆总胆固醇,低密度脂蛋白胆固醇,高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯水平差异无显著性意义(见表1)。

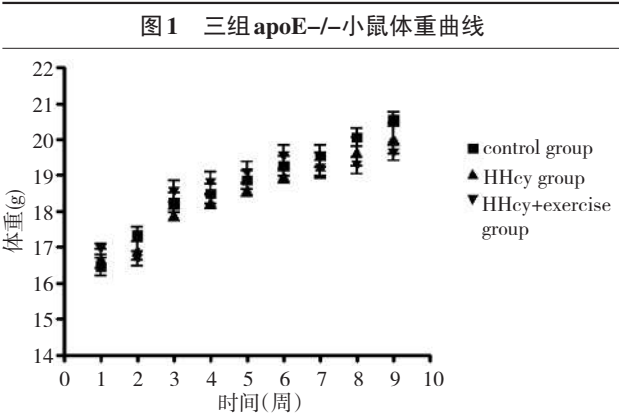


表1 三组apoE-/-小鼠Hcy和血脂水平 ($\bar{x}\pm s$)

	对照组	HHcy组	HHcy+ 有氧运动组	P值
Hcy($\mu\text{mol/L}$)	7.8 $\pm$ 1.1	20.88 $\pm$ 5.79 ^①	14.01 $\pm$ 2.30 ^②	<0.001
饮水量(ml/d)	3.42 $\pm$ 2.00	3.22 $\pm$ 1.64	3.53 $\pm$ 2.07	0.947
T-CHO(mmL)	9.34 $\pm$ 1.40	10.62 $\pm$ 0.91	10.23 $\pm$ 0.68	0.113
LDL-C(mmL)	1.40 $\pm$ 0.21	1.70 $\pm$ 0.34	1.77 $\pm$ 0.21	0.146
HDL-C(mmL)	0.43 $\pm$ 0.13	0.40 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.15	0.070
T-G(mmL)	1.01 $\pm$ 0.28	1.03 $\pm$ 0.33	1.01 $\pm$ 0.18	0.99

2.4 有氧运动对氧化应激的影响

与对照组相比较,HHcy组小鼠血浆SOD活性较对照组显著降低(U/L: 43.05 $\pm$ 21.65 vs 73.12 $\pm$ 10.09, $P=0.014$),而有氧运动使HHcy小鼠血浆SOD活性明显增高(U/L:70.58 $\pm$ 10.92 vs 43.05 $\pm$ 21.65, $P=0.035$),差异有显著性意义。

3 讨论

本研究通过对HHcy apoE-/-小鼠进行8周的跑台有氧运动训练,观察有氧运动对小鼠血浆HHcy及氧化应激水平的影响。结果发现有氧运动可以降低HHcy小鼠血浆Hcy水平,但是对血脂水平无影响,

该作用独立于血脂水平的改变。有氧运动可以上调氧化应激因子表达水平,提高机体抗氧化能力。这些结果提示有氧运动可能有助于延缓HHcy所致动脉粥样硬化进展。

近年来,国内外大规模临床试验及动物基础研究证实HHcy是致动脉粥样硬化的新的独立危险因素^[5]。一些不存在高血压、高脂血症、糖尿病、吸烟等传统危险因素的冠心病患者中HHcy患者占很大比例,尤其年轻患者更为显著。研究发现Hcy每升高5 μM ,冠心病的患病风险增加1.6—1.8倍^[6]。因此HHcy越来越受到人们的关注,如何防治HHcy引起的动脉粥样硬化也成为了当前国内外研究的热点和新的方向。动物研究结果发现叶酸、维生素B12和B6对HHcy所致动脉硬化可能具有预防作用。但愈来愈多的临床研究证明小剂量叶酸虽然可以降低血浆Hcy浓度,但对预防动脉粥样硬化进展和并发症没有太大作用^[7-8]。本研究结果发现长期有氧运动不仅可以降低HHcy小鼠血浆Hcy水平,为运动防治HHcy致动脉粥样硬化的发生和发展提供了实验基础。

本研究结果显示长期、适量的有氧运动可以降低HHcy小鼠血浆Hcy水平。回顾既往研究发现运动与血浆Hcy水平的关系一直存在争议。Herrmann等^[9]发现急性耐力运动后血浆Hcy水平具有不同程度的增加,其变化与运动项目、运动周期、运动强度有密切关系。Konig等^[10]的研究显示急性高强度运动训练可以使血浆Hcy水平升高,而低强度运动训练对血浆Hcy水平影响不显著。Okura等^[11]研究20周规律性有氧运动对血浆Hcy的影响,发现HHcy组人群血浆Hcy水平明显降低。这些结果表明不同的运动强度和运动方案对血浆Hcy水平有不同的影响。根据既往研究结果^[12-13],本研究中采用了适量的有氧运动方案,运动训练中监测小鼠的生长和心脏结构,结果运动组和非运动组小鼠生长发育情况及心脏结构无显著性差异,但是运动组小鼠血浆Hcy水平下降。这些结果提示长期规律的有氧运动可以降低HHcy小鼠血浆Hcy水平,运动过程中动态监测运动强度,指导运动方案至关重要。

此外,本研究结果发现有氧运动训练对HHcy apoE-/-小鼠的血脂水平无影响。高胆固醇血症是

动脉粥样硬化的传统危险因素,既往研究证实有氧运动可以降低血脂水平^[14],然而本研究中有氧运动降低Hcy水平,却没有改变HHcy apoE-/-小鼠的血浆胆固醇水平,表明有氧运动降低HHcy的作用独立于血脂水平的改变。与我们研究结果相似,Okabe等^[15]和Ramachandran^[13]等的研究也发现运动可以改善高脂喂养的apoE-/-小鼠和LDLr-/-小鼠的动脉粥样硬化程度,但对血浆胆固醇水平无影响,其原因可能与基因敲除小鼠血脂水平主要受内源性因素影响有关。既往的研究还揭示HHcy促进动脉粥样硬化与趋化因子表达、损伤内皮功能和扰乱凝血/抗凝平衡等有关^[16-17]。

本研究结果提示有氧运动可以提高HHcy apoE-/-小鼠的氧化应激水平,促进机体氧化还原平衡^[18],这可能是有氧运动延缓HHcy致动脉粥样硬化进展的机制之一,更深入的机制还需要进一步研究证实。

总之,长期规律有氧运动可以降低高同型半胱氨酸血症小鼠血浆同型半胱氨酸水平,上调氧化应激因子表达水平,该作用独立于血脂的改变。这些结果为运动防治高同型半胱氨酸血症致动脉粥样硬化的发生、发展提供了新的理论和实验基础,为进一步合理推广到临床康复应用提供了依据。

参考文献

- [1] Mangoni AA, Jackson SH. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects[J]. Am J Med, 2002, 112(7):556—565.
- [2] 谢荣,李金贤,牛晓珊.血浆同型半胱氨酸与脑血管病相关性研究进展[J].中国康复医学杂志,2008,23:1056—1058.
- [3] 钟兴明,姚鸿恩,陈佑学.运动锻炼对冠心病患者的康复作用及其机制[J].中国康复医学杂志,2007,22:570—573.
- [4] Dai J, Li W, Chang L, et al. Role of redox factor-1 in hyperhomocysteinemia-accelerated atherosclerosis[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41(10):1566—1577.
- [5] Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis[J]. JAMA, 2002, 288(16):2015—2022.
- [6] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, et al. A quantitative

assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes [J]. JAMA, 1995, 274(13):1049—1057.

- [7] The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease[J]. N Engl J Med, 2006, 354:1567—1577.
- [8] Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial [J]. JAMA, 2004, 291(5):565—575.
- [9] Herrmann M, Schorr H, Obeid R, et al. Homocysteine increases during endurance exercise[J]. J Clin Chem Lab Med, 2003, 41:1518—1524.
- [10] König D, Bissé E, Deibert P, et al. Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men: interactions with plasma folate and vitamin B12[J]. Ann Nutr Metab, 2003, 47(3—4):114—118.
- [11] Okura T, Rankinen T, Gagnon J, et al. Effect of regular exercise on homocysteine concentrations: the HERITAGE Family Study[J]. Eur J Appl Physiol, 2006, 98:394—401.
- [12] Lee YI, Cho JY, Kim MH, et al. Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis[J]. Eur J Appl Physiol, 2006, 97(2):216—224.
- [13] Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, et al. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice[J]. Atherosclerosis, 2005, 178(1):33—38.
- [14] Herzberg GR. Aerobic exercise, lipoproteins, and cardiovascular disease: benefits and possible risks[J]. Can J Appl Physiol, 2004, 29(6):800—807.
- [15] Okabe TA, Shimada K, Hattori M, et al. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects[J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(3):537—545.
- [16] Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, et al. Acute hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction[J]. Lancet, 1998, 351(9095):36—37.
- [17] Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model[J]. J Clin Invest, 2001, 107(6):675—683.
- [18] Hayward R, Ruangthai R, Karnilaw P, et al. Attenuation of homocysteine-induced endothelial dysfunction by exercise training[J]. Pathophysiology, 2003, 9(4):207—214.