·基础研究·

运动和葡萄籽原花青素对高脂饮食大鼠血脂代谢及自由基水平的影响*

许思毛[1] 上官若男[2] 王第亮[1] 苏全生[2] 彭峰林[1]

摘要

目的:探讨长期中等负荷耐力运动和葡萄籽原花青素(GSP)干预对血脂异常及自由基水平异常的预防作用。

方法:32只大鼠随机分为4组:普通饲料组 (A组)、高脂饮食组 (B组)、高脂饮食+GSP组(C组)、高脂饮食+运动组 (D组)。B、C与D组大鼠采用高脂饮食喂养。C与D组大鼠在高脂饮食喂养的同时,分别给予GSP、中等负荷耐力跑台运动干预9周;不进行GSP干预的其他三组采用同等体重剂量安慰剂干预。比较各组大鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)与高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平。

结果:B、C与D组大鼠血清TC、TG、LDL-C浓度明显升高及HDL-C浓度明显下降,血清SOD活性明显下降及MDA含量明显增加。但C、D组大鼠血清TC、TG、LDL-C浓度均比B组低,其中D组TG、LDL-C水平又比C组低;D组HDL-C浓度比B组高;C与D组大鼠血清SOD、MDA指标分别高于、低于B组。

结论:长期中等负荷耐力运动和GSP干预均对高脂饮食大鼠血脂异常形成具一定抵抗作用,但GSP效果不如运动;两者均可减轻血脂异常大鼠SOD活性的下降程度,减少脂质过氧化反应。

关键词 耐力运动;葡萄籽原花青素;血脂异常;自由基;预防

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-04-0325-05

The intervention effects of exercise and grape seed proanthocyanidins on lipid metabolism and free radical level in rats fed with high-fat-diet/XU Simao, SHANGGUAN Ruonan, WANG Diliang, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(4):325—329

Abstract

Objective: To explore the preventive effects of long-term medium load endurance exercise and grape seed proanthocyanidins (GSP) intervention on abnormal levels of lipid and free radicals.

Method:A total of 32 rats were randomly divided into 4 groups: normal diet group (roup A), high fat diet group (group B), high fat diet plus GSP group (group C), high fat diet plus exercise group (group D).Group B, C and D rats were fed with high-fat diet. At the same time groups C and D rats with high-fat diet feeding were respectively given GSP or medium load endurance run intervention for 9 weeks. In other three groups without GSP intervention, were intervened with the same weight dose of placebo. Rats' serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C) and superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde (MDA) levels were compared.

Result: In groups B, C and D rats' serum TC, TG, LDL-C concentrations increased significantly and HDL-C concentration decreased significantly, activity of serum SOD decreased significantly and content of MDA increased obviously. In groups C and D rats' serum TC, TG, LDL-C concentrations were lower than those in B group,

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.04.010

*基金项目:国家自然科学基金项目(C31060146/C1106);广西师范大学青年科研基金资助项目

1 广西师范大学体育学院,桂林,541004; 2 成都体育学院运动医学系

作者简介:许思毛,男,硕士,讲师; 收稿日期:2012-05-13

LDL-C and TG concentrations on group D were lower than those in group C. HDL-concentration of group D was higher than that in group B; in groups C and D rats, activities of serum SOD were higher than that in group B, contents of MDA were lower than that in group B.

Conclusion: The intervention effect of long-term medium load endurance exercise or GSP on the informing of lipid abnormalities in rats fed with high fat diet present a certain resistance, but the resistance effect of GSP is not so better than exerciser.Long-term medium load endurance run or GSP intervention can improve SOD activity in dyslipidemia rat, thus reducing the lipid peroxidation.

Author's address Department of Physical Education,Guangxi Normal University,Guilin,541004

Key word endurance exercise;grape seed proanthocyanidins;dyslipidemia; free radical;prevention

近年来,随着人们饮食习惯的改变,由动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)引起的缺血性心肌病已成为严重影响人类健康的一类疾病,其发病率呈逐年增高以及发病“年轻化”的趋势。AS发生与血脂水平、血压、血糖等因素密不可分[1];血脂异常是AS形成的独立高危因素[2]。血脂是指血液中的脂类,主要由血液总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)及非酯化脂肪酸等组成,其组成和含量可反映体内脂类代谢情况。血脂异常是血液脂质代谢异常的简称,它主要是指血中TC、TG与低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)浓度过高,以及血中高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDL-C)浓度过低。血清TC、TG、LDL-C浓度增高及HDL-C浓度下降与缺血性心血管疾病的发生密切相关。大量病理生理学基础研究表明[3—6]:血脂异常可导致生物体内自由基水平增加,而自由基损伤作用贯穿在AS形成的整个过程。因此,改善生物体血脂异常、下调自由基水平对防治AS及缺血性心脏病具重要作用及意义。

葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidin,GSP)是天然中药提取物,是一种高效的抗氧化剂和自由基清除剂。关于GSP是否具防治血脂异常的作用尚有争议。本实验通过血清TC、TG、LDL-C及HDL-C水平的检测,探讨长期中等负荷耐力运动和GSP对高脂饮食大鼠血脂异常形成的干预作用;通过血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)及丙二醛(malondialdehyde,MDA)水平的检测,探讨长期中等负荷耐力运动和GSP对高脂饮食大鼠自由基代谢的影响。本研究以期为血脂异常及脂质过氧化损伤的预防提供安全、经济的参考方法,并为运动和GSP抗AS及缺血性心脏病的发生做一前期研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

DSPT202型小动物跑台(杭州立泰);7600-020型全自动生物化学分析仪(日本日立);UV-2450型紫外可见分光光度计(日本岛津)。

TC、TG、LDL-C、HDL-C试剂盒均由北京中生生物工程高技术公司提供。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA) 试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。

1.2 药物

GSP购自于天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,为红棕色粉末,纯度为95%。

1.3 实验动物

SD雄性普通级大鼠32只,5周龄,体重142—168g,由四川大学华西医学院动物研究中心提供。大鼠自购回后在标准啮齿目动物饲养笼分笼喂养,每笼3—5只,自由饮水进食。进食保证通风条件良好,室温控制在20—25℃,相对湿度40%—60%,自然光照。

1.4 方法

1.4.1 动物分组与处理:将32只大鼠随机分成4组:普通饲料组(A组,n=8)、高脂饮食组(B组,n=8)、高脂饮食+GSP组(C组,n=8)、高脂饮食+运动组(D组,n=8)。按实验分组分别给予普通饲料(由南京安立默科技有限公司提供)和高脂饲料(80%普通饲料、14%猪油、2%胆固醇、0.5%胆酸盐、0.5%食盐、3%麻油,由南京安立默科技有限公司配制)。每天清晨测量体重。

A组:普通饲料喂养。每日清晨以蒸馏水(安慰

剂)灌胃,剂量标准为每千克体重150mg,持续9周。

B组:高脂饲料喂养。每日清晨以蒸馏水(安慰剂)灌胃,剂量标准为每千克体重150mg,持续9周。

C组:高脂饲料喂养。将GSP粉末配制成10mg/ml的原花青素水溶液,每日清晨用来灌胃大鼠,剂量标准为每千克体重150mg,持续9周。

D组:高脂饲料喂养。每日清晨以蒸馏水(安慰剂)灌胃,剂量标准为每千克体重150mg,持续9周。运动方案:根据Bedford标准制定运动强度。先进行1周适应性跑台运动,跑台坡度0°,速度12m/min,第1天运动持续时间为15min,以后每天递增10—20min,经1周增加至60min。以后各周大鼠,以速度16m/min,坡度为5°进行持续跑台运动,每天60min,每周6d,周日休息,共持续9周。

1.4.2 指标提取与测试:大鼠在末次灌胃或运动结束后,禁食12h(自由饮水),而后用2%戊巴比妥钠腹腔麻醉,股动脉取血10ml。所取血以3000r/min离心10min, 取血清,于4h内进行相关指标的测试。TC、TG、LDL-C、HDL-C指标采用酶法测定,测定仪器为日立7600-020型全自动生物化学分析仪。血清SOD指标采用黄嘌呤氧化酶法,MDA指标采用硫代巴比妥酸法测定。

1.5 统计学分析

测得数据用均数±标准差表示。统计分析使用SPSS 17.0版统计分析软件完成。所有数据均采用单因素方差分析,在方差齐性的情况下用least-significant difference(LSD)法进行后效检验,方差不齐的情况下用Tamhane T2方法进行后效检验。以$P<0.05$作为差异具有显著性的标准,以$P<0.01$作为差异具有非常显著性的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠血清TC、TG、LDL-C与HDL-C指标

血脂检查通常共4项,即TC、TG、LDL-C与HDL-C。血脂异常可表现为血液TC、TG与LDL-C浓度生高,HDL-C浓度下降。如表1所示:与普通饲料组 (A组)相比,高脂饲料组(B组)大鼠血清TC、TG与LDL-C浓度明显升高,均具非常显著性差异;血清HDL-C浓度明显降低,具有非常显著性差异。

如表1所示:虽然高脂饮食+GSP组(C组)大鼠血清TC、TG、LDL-C浓度仍明显高于A组(具显著或非常显著性差异),其HDL-C浓度明显低于A组(具显著性差异);但与B组相比,C组大鼠TC、TG与LDL-C浓度明显下降(具显著或非常显著性差异),而HDL-C浓度无明显差异。虽然高脂饮食+运动组 (D组)大鼠血清TC、TG、LDL-C浓度仍明显高于A组(具显著或非常显著性差异);但与B组相比,D组TC、TG与LDL-C浓度明显下降(具显著或非常显著性差异),另D组HDL-C浓度明显升高且已基本正常。另外,D组血清TG、LDL-C又明显低于C组,具显著性差异; D组HDL-C浓度明显高于C组,具显著性差异。

2.2 各组大鼠血清SOD、MDA水平

如表2所示:与普通饲料组 (A组)相比,高脂饲料组(B组)大鼠血清SOD活性明显下降,具非常显著性差异;血清MDA含量明显升高,具非常显著性差异。虽然高脂饮食+GSP组(C组)与高脂饮食+运动组 (D组)大鼠血清SOD活性仍明显低于A组(具显著性差异)、MDA含量明显高于A组(具显著性差异);但与B组相比,无论是C组还是D组,SOD活性明显要高,MDA含量明显要低,均具显著性差异。

表1 各组大鼠血清脂代谢指标比较 ($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	鼠数	TC	TG	LDL-C	HDL-C
A组	8	2.23 ± 0.27	0.93 ± 0.18	0.51 ± 0.08	2.09 ± 0.22
B组	8	3.04 ± 0.33②	2.06 ± 0.29②	1.06 ± 0.13②	1.47 ± 0.34②
C组	8	2.64 ± 0.36①③	1.74 ± 0.20②③	0.80 ± 0.16②④	1.62 ± 0.28①
D组	8	2.59 ± 0.34①③	1.48 ± 0.25②④⑤	0.65 ± 0.13①④⑤	1.92 ± 0.30④⑤

注:与A组相比,①$P<0.05$;②$P<0.01$;与B组相比,③$P<0.05$;④$P<0.01$;与C组相比,⑤$P<0.05$

表2 各组大鼠血清自由基代谢指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
A组	8	112.13 ± 17.93	5.25 ± 0.73
B组	8	71.75 ± 14.63②	7.24 ± 1.03②
C组	8	95.03 ± 14.40①③	6.25 ± 0.85①③
D组	8	91.38 ± 15.21①③	6.36 ± 0.75①③

注:与A组相比,①$P<0.05$;②$P<0.01$;与B组相比,③$P<0.05$

3 讨论

3.1 长期中等负荷耐力运动和GSP对高脂饮食大鼠血脂代谢的干预效应

目前,有关血脂异常模型的实验动物有大鼠、兔、猫、家鸽、猪、猴等;其方法多在动物饲料中加入过量胆固醇及脂肪,饲养动物以形成实验性血脂异常模型[7—8]。由于大鼠具有便宜、易饲养等特点,因而目前较多采用大鼠作为实验动物建立血脂异常模型。本实验中,共对大鼠进行9周的高脂饲料喂养,结果发现其血清TC、TG、LDL-C水平上升、HDL-C水平下降,表明成功建立血脂异常模型。

关于运动防治血脂异常的研究国内外均有文献报道。张培珍等[9]总结了大量有关运动防治血脂异常的人体实验研究,结果发现:在运动防治血脂异常运动方案的选择上,多是选择长期中、低等强度的耐力运动;长期中低等强度的耐力运动可有效防治血脂异常、且各年龄阶段表现一致。朱淦芳等[10]采用21d的大、中、小强度耐力跑运动干预高脂饮食大鼠,发现3种运动方式均可减轻高脂饮食引起的大鼠血清TC、TG升高程度,并减轻血清HDL-C的下降程度,表明各种强度的耐力运动均可改善高脂饮食引起的血脂异常;但高强度耐力运动的干预效果却显著优于中、低强度的耐力运动。李宁川等[11]发现10周不负重游泳耐力运动可抗高脂饮食大鼠血脂异常的形成,表现为减轻了高脂饮食大鼠血清和肝脏TC、TG水平升高幅度。本研究在前人的研究基础上进行运动干预方案的探索。基于健身角度的思考选择长期中等负荷耐力运动作为运动方案。本实验中大鼠运动强度依据Bedford标准制定[12]。根据Bedford标准推算,本实验中的SD大鼠在坡度为5°、速度为16m/min的情况下进行跑台运动,运动强度约为65%最大摄氧量强度,属中等强度。最终,本实验中大鼠先在跑台上做适应性耐力跑1周。以后各周以坡度为5°、速度为16m/min的中等运动强度在跑台上进行耐力跑运动,60min/d、6d/周,共持续9周。本研究结果显示,长期中等负荷耐力跑可显著减轻高脂饮食大鼠血清TC、TG、LDL-C水平的升高程度及HDL-C水平的下降程度,表明其对高脂饮食大鼠血脂异常形成具一定预防作用。关于运动调节血脂代谢的机制可能是由于运动增强了脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase,LPL),活化β-氧化途径,加速脂肪分解,增强肌肉组织摄取和氧化游离脂肪酸(free fatty acid,FFA)的能力,促进肌肉对非酯化脂肪酸和胆固醇的利用,从而降低LDL、TG、TC水平,提高血清HDL水平。总的来说,运动调节血脂代谢的机制尚不十分清楚。

GSP是从葡萄籽中提取的一类多酚化合物,它是一种具有生物学活性的原花青素的寡聚体,主要成分是原花青素。GSP具有调节血脂的功能[13]。Terra等[14]研究GSP对泡沫细胞的抑制作用,发现GSP干预过泡沫细胞中的TC、酯化胆固醇以及TG的堆积减少;同时深入研究发现,GSP是通过下调调控胆固醇的关键基因,来减少泡沫细胞的形成,从而达到预防AS的作用。薛燕潍等[15]通过测定血清TC、TG和HDL和LDL的含量,发现GSP能减轻高脂饮食大鼠血清TC、TG、LDL、LDL-C水平的升高程度及HDL水平的下降程度。GSP能对高脂饮食大鼠血液TG和LDL-C异常水平具一定调节作用,延缓TC血症和脂肪肝的发展,从而改善高脂饮食导致的血脂异常[16]。Del Bas等[17]研究发现GSP能降低机体血清高TG水平。本实验结果分析发现:GSP对高脂饮食大鼠血脂异常形成具一定预防效应,可减轻高脂饮食大鼠血清TC、TG、LDL-C水平升高程度,但不能减轻其血清HDL-C水平下降程度;GSP对高脂饮食大鼠血清TG、LDL-C水平升高预防作用不如耐力运动。总的来说,关于耐力运动和GSP对血脂异常的调节作用还需要进一步研究。

3.2 长期中等负荷耐力运动和GSP对高脂饮食大鼠自由基水平的干预效应

近年来,随着自由基研究的发展,发现血脂异常引发的自由基代谢异常是AS发生的关键[3—6]。因此,减少自由基的生成对保护心血管结构功能具重要作用。一般认为运动训练提高的抗氧化能力是机体抗自由基损伤的主要机制。有研究发现[18],运动可使Mn-SOD基因表达增加;可能是由于运动引起肿瘤坏死因子-α和白细胞介素1β等多种细胞因子增加,这种效应可通过核因子kB途径激活Mn-SOD基因表达。有研究发现[19],高脂饮食可造成大鼠血液SOD活性下降,而为期8周的耐力跑能改善这一异常变化。Ribeiro等[20]研究表明,运动可

提高机体血液SOD活性,从而减少血脂异常机体的过氧化损伤。本实验结果分析发现,长期中等负荷的耐力运动对高脂饮食大鼠血清SOD水平的下降、脂质过氧化反应水平的增加具一定预防作用。

GSP具有极强的抗氧化活性,是一种良好的氧游离基清除剂和脂质过氧化抑制剂,具有很强的抗氧化活性和自由基清除功能[21]。GSP的抗氧化活性呈现剂量-效应关系,即在一定剂量范围内,才能发挥出最佳抗氧化效应。原花青素含有多个酚性羟基,在体内被氧化后释放出H^+,它能竞争性地与自由基及氧化物结合,从而保护脂质不被氧化,阻断自由基链式反应[22]。GSP可提高人体血清SOD活性,同时使血清MDA含量下降[22]。刘香菊等[23]研究发现GSP能减少高脂饮食大鼠血浆氧化应激水平。对本实验结果分析发现:GSP能对脂饮食大鼠血清SOD活性下降、脂质过氧化反应水平的增加具一定预防作用。然而,关于运动、GSP对血脂异常机体的自由基代谢是否具协同调节作用,尚需进一步实验证明。

4 结论

本研究探讨了长期中等负荷耐力运动和GSP对高脂饮食大鼠血脂代谢及自由基水平的影响,发现:耐力运动和GSP均可减轻高脂饮食大鼠血清TC、TG、HDL-C水平的升高幅度,其中GSP对TG、HDL-C水平这种调节作用不及耐力运动;另外,耐力运动还可减轻高脂饮食大鼠血清HDL-L水平的下降幅度。与此同时,耐力运动和GSP均对高脂饮食引起的血清SOD水平下降、MDA水平的升高均具一定抵抗作用。因此,长期中等负荷耐力运动和GSP对血脂异常形成及自由基水平、脂质过氧化反应的增加均具一定预防作用,而GSP对血脂异常的预防效应不及前者。

参考文献

[1] 刘梅梅,肖继,唐朝克. 血管健康促进机制与动脉粥样硬化[J]. 生命的化学,2010,30(5):783—787.

[2] Madhumathi BG,Venkataranganna MV, Gopumadhavan S,et al. Induction and evaluation of atherosclerosis in New Zealand white rabbits[J]. Ind J Exp Biol,2006,44(3):203—208.

[3] Cuevas-Rodríguez EO, Yousef GG, García-Saucedo PA,et al. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (Rubus spp.) [J]. J Agr Food Chem,2010,58(12):7458—7464.

[4] Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2010,30 (12):2311—2316.

[5] 白慧称,李军,刘敬浩,等. 高脂膳食对小鼠生化及病理形态的影响[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(1):41—45.

[6] Brewer HB Jr. The evolving role of HDL in the treatment of high-risk patients wite cardiovascular disease[J]. J Clin Endocrinol Metab,2011,96(5):1246—1257.

[7] 张军平,彭立,李良军,等. 实验性兔主动脉粥样硬化易损斑块模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报,2009,17(3):161—165.

[8] 林彦君,李佳川,杨明. 中医药防治高脂血症实验研究概况[J]. 美中医学,2007,4 (6):16—19.

[9] 张培珍,田野. 运动与血脂异常的防治(一)—经常性运动与血脂异常的防治[J]. 北京体育大学学报,2005,28(7):934—936.

[10] 朱淦芳,魏纯镭,程东庆. 不同运动强度对高脂血症小鼠血脂的调节作用研究[J]. 中国体育科技,2012,48(2):91—95.

[11] 李宁川,邓玉强,金其贯. 运动训练及大豆多肽对高脂饮食诱导大鼠脂肪肝形成的干预作用[J]. 中国运动医学杂志,2011,30(10):931—935.

[12] Beadford TG, Tipton CM,Wilson NC. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. J Appl Physiol: Respirat environ exercise physiol,1979,47(6):1278—1283.

[13] 周坦洋,罗芙蓉,白彬. 葡萄籽原花青素生物药理活性的研究进展[J]. 哈尔滨医科大学学报,2012,46(1):94—96.

[14] Terra X,Fernandez-Larrea J,Pujadas G,et al. Inhibitory effects of grape seed procyanidins on foam cell formation in vitro[J]. Agric Food Chem,2009,57(6):2588—2594.

[15] 薛燕潍,王峰. 葡萄籽原花青素预防大鼠动脉粥样硬化作用机制研究[J]. 中国实用医药,2010,5(13):44—45.

[16] Quesada H,del Bas JM,Pajuelo D,et al. Grape seed proantho-cyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver[J]. Int J Obes(Lond),2009,33(9):1007—1012.

[17] Del Bas JM,Ricketts ML,Vaqué M,et al. Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitroand reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner[J]. Mol Nutr Food Res,2009,53(7):805—814.

[18] Staib JL,Tumer N,Powers SK. Increased temperature and protein oxidation lead to HSP72mRNA and protein accumulation in the vivo exercised rat heart[J]. Exp Physiol,2009,94 (1):7—8.

[19] Ajijola OA,Dong C,Herderick EE,et al. Voluntary running suppresses proinflammatory cytokines and bone marrow endothelial progenitor cell levels in apolipoprotein-E-deficient mice[J]. Antioxid Redox Signal,2009,11(1):15—23.

[20] Ribeiro F,Alves AJ,Duarte JA, et al. Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation?[J]. Int J Cardiol, 2010 141(3):214—221.

[21] Zhang XY,Li WG,Wu YJ,et al. Proanthocyanidin from grape seeds enhances doxorubicin-induced antitu-moreffect and reverses drug resistance in doxorubicin-resistant K562/DOX cells[J]. Can J Physiol Phanacol,2005,83(3):309—318.

[22] 高峰,张琨,宋昕恬,等. 葡萄籽提取物抗氧化作用人体实验研究[J]. 中国卫生工程学,2010,9(2):99—100.

[23] 刘相菊,高海青,邱洁,等. 葡萄籽原花青素对兔动脉粥样硬化氧化应激的影响[J]. 山东大学学报(医学版),2010,48(8):25—28.