

·基础研究·

游泳训练对糖尿病大鼠主动脉血管内皮依赖性舒张功能的改善及机制*

杨惠玲¹ 李 伟¹ 高前进¹ 王彦伟^{1,2}

摘要

目的:观察游泳训练对糖尿病大鼠血管内皮依赖性舒张功能的影响及其可能机制。

方法:40只健康雄性SD大鼠随机分为正常对照组(CG),糖尿病对照组(DCG),糖尿病游泳组(DSG)。游泳训练8周后,取胸主动脉,离体灌注法检测其对乙酰胆碱(ACh)诱导的内皮依赖性舒张反应,及其对硝普钠(SNP)诱导的非内皮依赖性舒张反应。并测定血清一氧化氮(NO)浓度及血清葡萄糖、胰岛素、总胆固醇、甘油三酯、氧化应激状态(超氧化物歧化酶,谷胱甘肽过氧化物酶,丙二醛)。

结果:糖尿病组大鼠胸主动脉对ACh诱导的舒张反应明显减弱($P<0.05$);游泳运动能明显改善糖尿病胸主动脉内皮依赖性舒张反应;各组对SNP诱导的非内皮依赖性舒张反应无显著差异。糖尿病组的NO浓度低于正常组($P<0.05$),游泳运动显著提高了糖尿病大鼠的NO浓度。与糖尿病组相比,糖尿病游泳组大鼠血糖、胰岛素敏感性、脂质代谢改善,同时氧化应激状态显著降低。

结论:游泳运动能明显改善糖尿病大鼠胸主动脉对ACh诱导的内皮依赖性舒张反应,其机制可能是通过降低血糖,降低氧化应激,增加NO的生物活性来实现的。

关键词 主动脉;内皮依赖性血管舒张;一氧化氮;高血糖;氧化应激

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-08-0740-05

Effects of swimming training on endothelium-dependent vasodilation function of aorta in diabetic rats and its mechanisms/YANG Huiling, LI Wei, GAO Qianjin, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(8): 740—744

Abstract

Objective: To investigate the effects of swimming training on endothelium-dependent vasodilation function of aorta in diabetic rats and to explore its possible mechanism.

Method: Forty male SD rats were assigned into normal control group(CG), diabetic control group(DCG) and diabetic swimming group(DSG). After 8 weeks swimming, aortic rings were isolated for recording vascular tension in vitro; end othelium-dependent dilation induced by acetylcholine (ACh) and endothelium-independent dilation induced by sodium nitroprusside(SNP) were measured. The serum NO levels were determined by Griess reaction. The serum glucose, insulin, total cholesterol(TC), triglycerides(TGs), malondialdehyde(MDA), glutathione peroxidase(GSH-Px), superoxide-dismutase(SOD) were detected.

Result: In diabetic group endothelium-dependent vasodilation reaction of aorta induced by Ach was significantly weakened($P<0.05$). In diabetic swimming group endothelium-dependent vasodilation reaction of aorta could be ameliorated significantly. However, the endothelium-independent vasodilation reactions induced by SNP were not significantly different in aorta of all groups($P>0.05$). The NO levels of diabetic group were significantly lower

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.08.010

*基金项目:石家庄学院科研平台启动基金项目(xJpT005)

1 石家庄学院,体育学院,050035; 2 通讯作者

作者简介:杨惠玲,女,硕士研究生; 收稿日期:2013-09-27

($P<0.05$), In diabetic swimming group NO levels improved significantly($P<0.05$). Compared with diabetic group, in-diabetic swimming group glycaemia and insulin showed amelioration, accompanied by remarkable reduction of oxidative stress.

Conclusion: Swimming can improve the aortic endothelium-dependent vasodilation reaction in diabetic rats, which involved the improvement of hyperglycemia, the reduction of oxidative stress, and increasing NO bio-availability.

Author's address The Sport College of Shi Jia Zhuang College, Hebei, Shijiazhuang, 050035

Key word aorta; endothelium-dependent vasodilation; nitric oxide; hyperglycemia; oxidative stress

2型糖尿病是诱发心血管疾病的主要危险因素之一^[1-2],糖尿病患者或动物内皮依赖性血管舒张功能明显减弱^[3-5]。一般情况下,动脉血流是受血管内皮细胞分泌的几个舒张血管和收缩血管物质所调节的^[6]。血管内皮细胞功能障碍主要由一氧化氮(NO)减少及氧自由基增加所致^[7]。

氧化应激是体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species,ROS)产生过多,氧化系统和抗氧化系统失衡引起。过多的ROS可损伤脂质、蛋白质、破坏心血管的活动和降低NO活性^[7]。NO是由血管内皮产生,具有调节血管舒张,抗血小板凝集黏附,使平滑肌松弛扩张的作用^[7-8]。动物实验证明血管舒张因子NO的生物合成减少是糖尿病血管内皮功能障碍的共同特点^[9]。因此“保护NO的生物学活性”成为了当前治疗糖尿病性血管内皮功能障碍的靶点。

运动疗法被很多医疗机构推荐作为糖尿病治疗的方法之一,例如美国糖尿病协会、美国心脏协会等推荐有规律的运动作为2型糖尿病患者的治疗手段^[10]。但以往的研究多是测定间接指标来探讨运动对血管内皮细胞功能的影响,我们采用“直接测定血管张力”的方法来研究运动对糖尿病血管内皮细胞的影响,即通过离体胸主动脉环张力实验直接观察运动前后血管舒张功能的变化,然后从运动对氧化应激、高血糖、高血脂的影响入手,探讨运动对糖尿病大鼠血管舒张功能影响的机制,为运动防治糖尿病血管并发症提供更详尽的资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)、苯肾上腺素(phenylephrine, PE)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)、

硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)购自Sigma公司;NO试剂盒、SOD、GSH-PX、MDA试剂盒购于南京建成生物工程研究所,胰岛素放射免疫试剂盒北京科美东雅公司。

Krebs- Henseleit(K- H)液(mmol/L):NaCl 118, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, glucose10, CaCl_2 2.5, pH7.4。

1.2 动物模型建立和分组

健康雄性SD大鼠40只,体重200—240g,由河北医科大学实验动物中心供应[实验动物生产许可证号:SCXK(冀)2008-1-003,使用许可证号:SYXK(冀)2008-0026]。随机抽取10只大鼠为正常对照组(control group, CG),喂以标准饲料。其余30只喂以高脂饲料,至第4周末,禁食12h(自由饮水),每只大鼠一次性腹腔注射30mg/kg链脲佐菌素STZ(美国SIGMA公司生产,临用前溶解在pH=4.0的0.1mmol/L柠檬酸缓冲液内),2周后空腹尾静脉采血,用快速血糖仪测空腹血糖,以空腹血糖 ≥ 7.8 mmol/L者为造模成功,选取造模成功的20只纳入实验,分为2组:糖尿病对照组(diabetic control group, DCG),糖尿病游泳组(diabetic swimming group, DSG),每组各10只。

1.3 游泳运动方案

游泳运动方案采用Ploug等报道的方法^[11],水温维持在 $(33\pm 2)^\circ\text{C}$,水深50cm,保证每只大鼠有200cm²的活动面积以保证持续运动。开始大鼠以15min/d,每周5天的强度进行训练1周,之后运动强度逐渐增加为1h/d,每周3天,连续训练8周。

1.4 离体胸主动脉内皮依赖性血管舒张功能

糖尿病游泳组训练8周后休息48h,麻醉迅速取出约2cm的胸主动脉立即放入4℃的Krebs-Henseleit(K-H)液中,去除周围结缔组织将主动脉切

出两段长约3—4mm宽的血管环,根据实验需要其中一段动脉环用棉签摩擦血管环内表面以去除内皮细胞(去除内皮的动脉环),通过Power Lab生物信号采集系统连续记录血管张力变化。内皮完整的动脉环浴槽依次加入不同浓度(10^{-9} — 10^{-5} mol/L)的乙酰胆碱(ACh);去除内皮的动脉环浴槽加入(10^{-9} — 10^{-5} mol/L)的硝普钠(SNP)。记录每一浓度下主动脉环的张力,以各浓度下血管环张力与PE诱发的最大张力之间的比值反映血管环的舒张性能^[12]。

1.5 NO及其他血清指标测定

根据Griess原理,血清NO含量用硝酸还原酶法测量,NO的转化产物(NO_2/NO_3)代表NO水平。

采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活力,采用硫代巴比妥酸化学比色法测定MDA含量,751分光光度计。葡萄糖氧化酶法测定大鼠血清空腹血糖水平,放射免疫法检测大鼠血清空腹胰岛素水平,酶法测定血清总胆固醇TC,甘油三酯TGs。

1.6 统计学分析

数值以平均数±标准差表示,应用SPSS11.5统计分析软件,以单因素ANOVA分析各组别之间的差异,各实验组间均数比较采用LSD检验。

2 结果

2.1 游泳运动对糖尿病大鼠离体主动脉内皮依赖性舒张反应的影响

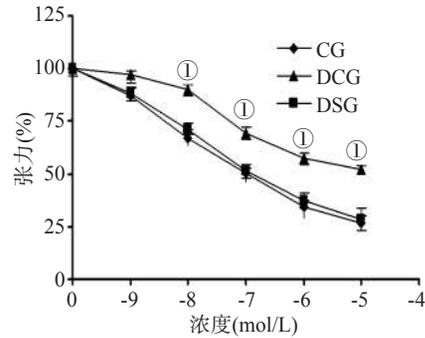
见图1。糖尿病对照组胸主动脉环对ACh诱导的内皮依赖性舒张反应显著降低,ACh所致的最大舒张百分比与正常对照组比较下降了48.50%($P<0.05$);8周游泳运动可明显改善糖尿病大鼠胸主动脉的内皮依赖性舒张反应,ACh诱导的最大舒张百分比与糖尿病对照组相比,提高了45.72%($P<0.05$),与正常对照组无差异。糖尿病大鼠胸主动脉环对SNP诱导的非内皮依赖性舒张反应无明显下降,8周游泳运动不改变对SNP的舒张反应。

2.2 游泳运动对糖尿病大鼠NO的影响

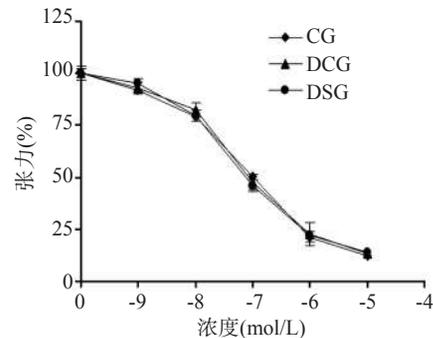
糖尿病对照组NO显著降低,与正常对照组比较有显著差异($P<0.05$),糖尿病游泳组(DSG)NO水平升高,与糖尿病组有显著差异($P<0.05$)。见图2。

2.3 游泳运动对大鼠体重、血糖、胰岛素、脂质代谢的影响

图1 各组大鼠离体胸主动脉环内皮依赖性血管舒张功能比较

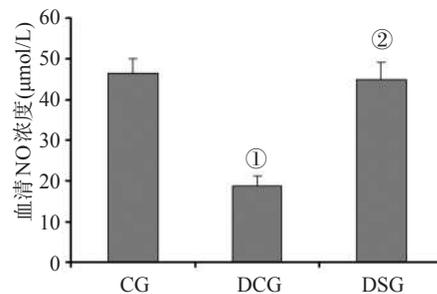


糖尿病对照组(DCG)胸主动脉环对乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应显著降低,与正常对照组比较有显著差异($P<0.05$),糖尿病游泳组(DSG)血管舒张功能显著改善,接近正常对照组水平。①与正常对照组(CG)比较 $P<0.05$



各组去内皮胸主动脉环对硝普钠诱导的血管非内皮依赖性舒张反应差异无显著性($P>0.05$)

图2 各组大鼠血清一氧化氮浓度变化



①与正常对照组(CG)比较 $P<0.05$;②与糖尿病对照组(DCG)比较 $P<0.05$

见表1。从体重变化看,饲养8周后,与正常对照组(CG)相比,糖尿病对照组体重显著下降,糖尿病游泳组明显抑制糖尿病大鼠体重下降。

从血糖,胰岛素,总胆固醇,甘油三酯变化看,糖尿病游泳组显著降低了以上各指标,与糖尿病对照组比较有显著差异($P<0.05$)。

2.4 游泳运动对糖尿病大鼠血清氧化应激的影响

见表2。从血清氧化应激状态看,糖尿病对照组超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)降低,丙二醛(MDA)升高,与正常对照组比较有显著差异($P<0.05$),糖尿病游泳组显著升高了SOD,GSH-PX,降低了MDA($P<0.05$),与糖尿病对照组比较有显著差异($P<0.05$)。

表1 大鼠体重、血清葡萄糖、胰岛素、总胆固醇、甘油三酯的变化 ($\bar{x}\pm s$)

	正常对照组 (CG)	糖尿病对照组 (DCG)	糖尿病游泳组 (DSG)
体重(g)	449.80±16.13	421.42±17.61 ^①	447.39±13.75 ^②
血糖(mmol/L)	4.98±0.53	7.82±0.68 ^①	5.32±0.76 ^②
胰岛素(mmol/L)	7.87±1.09	11.14±1.70 ^①	8.45±1.38 ^②
胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)	2.36±0.97	7.74±1.56 ^①	2.85±0.72 ^②
总胆固醇(mmol/L)	1.39±0.17	2.89±1.37 ^①	1.50±2.13 ^②
甘油三酯(mmol/L)	0.80±0.17	1.56±0.36 ^①	0.85±0.87 ^②

①与正常对照组比较 $P<0.05$,与糖尿病对照组比较② $P<0.05$

表2 游泳运动对糖尿病大鼠血清氧化应激的影响 ($\bar{x}\pm s$)

	正常对照组 (CG)	糖尿病对照组 (DCG)	糖尿病游泳组 (DSG)
SOD(U/ml)	112.07±11.65	86.33±12.96 ^①	105.26±13.90 ^②
GSH-PX(U/ml)	290.54±7.29	253.37±7.41 ^①	287.52±4.18 ^②
MDA(nmol/L)	8.09±0.81	10.02±1.22 ^①	8.23±0.83 ^②

①与正常对照组比较 $P<0.05$,②与糖尿病对照组比较 $P<0.05$

3 讨论

3.1 游泳运动改善了糖尿病大鼠胸主动脉内皮依赖性舒张功能

本实验发现,糖尿病大鼠的离体胸主动脉对乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应下降,与正常对照组比较差异有显著性($P<0.05$);糖尿病大鼠经过8周游泳运动后胸主动脉对乙酰胆碱诱导的舒张反应提高,与正常对照组比较差异无显著性($P>0.05$)。说明8周的游泳运动显著改善了早期2型糖尿病大鼠胸主动脉内皮依赖性舒张反应,提高了血管内皮细胞功能;各实验组对硝普钠诱导的非内皮舒张反应差异无显著性,说明游泳运动对血管平滑肌细胞的收缩舒张功能无明显影响。见图1。

3.2 游泳运动改善糖尿病大鼠血管内皮依赖性舒张功能的机制

几乎所有心血管危险因素都可以造成内皮功能障碍。血管内皮功能障碍在一定程度上就是指血管

内皮不能产生足够的活性NO,不能形成NO介导的血管扩张。NO是一种气体分子,由一氧化氮合酶(NOS)催化合成。正常生理条件下,血管内皮细胞中的NO主要源于内皮型一氧化氮合酶(eNOS)。具有生物活性的“NO含量减少的原因”可能有:NO与氧阴离子发生反应,使其灭活;eNOS活性降低;精氨酸酶活性增加造成NOS底物L-精氨酸减少等,这些都可能导致内皮功能障碍^[13-14]。我们的研究发现糖尿病大鼠血清NO水平显著降低,与正常对照组比较差异有显著性($P<0.05$),8周游泳训练使糖尿病大鼠NO水平显著提高,从而使血管内皮依赖性舒张功能改善。

游泳训练使糖尿病大鼠血清NO水平显著提高的机制一定是纠正了“NO含量减少的原因”。首先运动改善了糖尿病大鼠体内的氧化应激状态。由于NO在氧自由基存在的条件下极易失活,而糖尿病高血糖使体内氧自由基增加,所以NO的活性降低。SOD和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)是清除体内氧自由基的重要物质,生物体内自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为丙二醛(MDA),MDA代表了体内自由基水平高低。本室以往的研究表明游泳运动可以显著提高2型糖尿病大鼠SOD的活性^[15],降低MDA水平。本研究发现MDA在2型糖尿病大鼠血清中显著增加,SOD和GSH-PX的活性显著降低,游泳训练后糖尿病大鼠MDA显著降低,SOD和GSH-PX的活性显著升高(表2),说明游泳训练降低了糖尿病大鼠的氧自由基,提高可抗氧化物的活性,因此NO含量增加。

其次,高血糖、高血脂、高血压、高胰岛素血症等因素均可降低或损伤二甲基精氨酸二甲基氨基水解酶(dimethylarginine dimethylaminohydrolase,DDAH)的活性,DDAH能将内源性eNOS活性抑制物非对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine,ADMA)降解为瓜氨酸和二甲基胺而失去活性^[16]。DDAH的活性降低而ADMA的活性升高,从而抑制eNOS的活性,使内皮细胞合成NO减少^[17-18]。本研究发现糖尿病对照组血糖、血脂、胰岛素均升高,与正常对照组有显著差异;糖尿病游泳组8周游泳运动后血糖、血脂、胰岛素均显著降低(表1)。糖尿病大鼠血糖、血脂、高胰岛素水平降低,DDAH活性升

高将 eNOS 的抑制物 ADMA 降解,因此 eNOS 活性提高,催化 NO 生成增加。

另外,血管切应力是促使 NO 释放强有力的生理刺激,运动增加血液流动,增加血管切应力以刺激 NO 释放,是正常人改善血管内皮功能及长期运动能减少动脉粥样硬化患者血管并发症的基础^[19]。其机制主要是 eNOS 表达增加导致介导的 NO 持续产生增加。表现在培养的内皮细胞给予切应力后,eNOS mRNA 表达增加,这在短期和长期运动的动物试验中都得到了相似的结果^[20]。

总的来说,本研究主要的发现是8周的游泳运动通过降低2型糖尿病大鼠血糖、血脂,增加抗氧化酶活性,降低超氧化物水平增加 NO 生物学活性使糖尿病大鼠胸主动脉的内皮依赖性舒张功能得到改善。

参考文献

- [1] Turenkov IN, Voronkov AV, Slietsans AA. Role of endothelial dysfunction in the development of vascular complications of diabetes[J]. Patol Fiziol Eksp Ter,2013, 2: 80—84.
- [2] Hoang HH, Padgham SV, Meininger CJ. L-arginine, tetrahydrobiopterin, nitric oxide and diabetes[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care,2013,16(1):76—82.
- [3] Park Y, Yang J, Zhang H, et al. Effect of PAR2 in regulating TNF-alpha and NAD(P)H oxidase in coronary arterioles in type 2 diabetic mice[J]. Basic Res Cardiol,2011, 106(1): 111—123.
- [4] Yang J, Park Y, Zhang H, et al. Role of MCP-1 in tumor necrosis factor- alpha induced endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297(4):H1208—1216.
- [5] Gao X, Picchi A, Zhang C. Upregulation of TNF-alpha and Receptors Contribute to Endothelial Dysfunction in Zucker Diabetic Rats[J]. Am J Biomed Sci,2010, 2(1):1—12.
- [6] Porter KE, Riches K. The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in Type 2 diabetes[J]? Clin Sci (Lond), 2013, 125(4):167—182.
- [7] 向光大.关注高血糖与血管内皮功能异常的关系[J].中国糖尿病杂志,2007,15(12):705—707.
- [8] Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, et al. Oxidative stress in cardiovascular disease[J].Indian J Biochem Biophys, 2009, 46(6): 421—440.
- [9] Murea M, Ma L, Freedman BI. Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications[J]. Rev Diabet Stud,2012, 9(1): 6—22.
- [10] Marwick TH, Hordern MD, Miller T, et al. Exercise Training for Type 2 Diabetes Mellitus Impact On Cardiovascular Risk: A Scientific Statement From the American Heart Association[J].Circulation,2009, 119:3244—3262.
- [11] Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen O, et al. Effect of endurance training on glucose transport Capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle[J]. Am J Physiol,1990,259(6Pt1): E2778—E786.
- [12] 王会平. 白细胞介素-2对糖尿病性心血管功能改变的影响及其相关机制研究[D].浙江大学医学院博士学位论文,2008.
- [13] 陈霁辉,杨宝学,周虹. 心血管疾病中氧化应激与一氧化氮合酶脱耦联[J]. 中国心血管杂志,2012, 17(2): 149—151.
- [14] Mangiapane H. Cardiovascular disease and diabetes[J]. Adv Exp Med Biol,2012,771:219—228.
- [15] 柏海平,高前进. 游泳运动对2型糖尿病大鼠炎症和氧化应激状态的影响[J]. 中国康复医学杂志,2013, 28(8): 708—713.
- [16] 孙警,孙苗,张辉. 二甲基精氨酸二甲基水解酶-1的理论研究[J]. 中国科学·化学,2010, 40(8): 1099—1104.
- [17] Guerci B, Kearney-Schwartz A, Bohme P, et al. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function[J]. Diabetes Metab,2001, 27:425—434.
- [18] Kourtoglou GI. Insulin therapy and exercise[J]. Diabetes Res Clin Pract,2011, 8:S73—77.
- [19] Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms[J]. Circulation, 2010,122(12):1221—1238.
- [20] Laughlin MH, Bowles DK, Duncker DJ. The coronary circulation in exercise training[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2012, 302(1):H10—23.