·基础研究·

长期有氧运动对代谢综合征大鼠炎症及心肌组织过氧化物酶体增殖物激活受体α表达的影响*

王 卉[1] 刘绍生[1] 夏 志[1] 丁孝民[1] 张崇林[1,2]

摘要

目的:研究有氧运动对代谢综合征(MS)大鼠炎症反应的影响以及心肌组织过氧化物酶体增殖物激活受体α(PPARα)的表达,探讨运动对MS心血管炎症反应调节的可能机制。

方法:4周龄SD雄性大鼠随机分为基础对照组(C)和高脂高盐饲料喂养组。18周后将MS大鼠随机分为模型对照组(MC)、模型运动组(ME)。运动组大鼠行60min/d、27m/min、5%坡度跑台训练12周。ELISA法测定血清IL-6、TNF-α、MCP-1含量;荧光定量R-PCR测定心肌组织PPARαmRNA表达、Western Blot测定心肌PPARα蛋白含量。

结果:①与C组相比,MC组血清IL-6、TNF-α、MCP-1含量显著升高($P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.01$)、MC组心肌PPARα mRNA和蛋白表达显著降低($P<0.05$);②与MC组相比,ME组大鼠血清IL-6、TNF-α、MCP-1含量显著降低($P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.01$)、ME组心肌PPARα mRNA和蛋白表达显著升高($P<0.05$、$P<0.01$)。

结论:MS大鼠炎症反应明显,长期有氧运动干预能有效降低其炎症反应,PPARα可能介导了机体的炎症反应。

关键词 运动;代谢综合征;过氧化物酶体增殖物激活受体α;炎症

中图分类号:R493, R541 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-12-1351-05

Effects of long-term aerobic exercise on inflammatory and PPARα in myocardium of metabolic syndrome rats/WANG Hui, LIU Shaosheng, XIA Zhi, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(12): 1351—1355

Abstract

Objective: To research the effects of aerobic exercise on the cardiovascular inflammatory response in rats suffering from metabolic syndrome (MS).And its possible mechanism will be studied through observing the changes of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) expressing in the myocardial tissues.

Method: 4-week old male SD rats were randomly divided into control group (C) and high-fat-high-salt feed group. After 18 weeks, MS rats were randomly divided into model control group(MC) and model exercise group(ME). Rats in ME group were forced to run on a treadmill for 12 weeks with the intensity of 60min/d, 27m/min and 5% gradient. Serum IL-6, TNF-α, and MCP-1 were detected by ELISA. The expression of PPARα mRNA in myocardium was determined by RT-PCR. Western Blot was applied to detect the protein expression of PPARα in myocardium.

Result: ①Compared with C group, the MC group showed significant increase in serum IL-6, TNF-α, MCP-1 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$) and significant decrease in PPARα mRNA and protein expression in myocardium ($P<0.05$).②Compared with MC group, the ME group showed significant decrease in serum IL-6, TNF-α, MCP-1 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$) and significant increase in PPARα mRNA and protein expression in myocardium($P<0.05$, $P<0.01$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.12.006

*基金项目:江西省教育厅科技计划项目(GJJ150772);井冈山大学博士科研启动项目(自然科学)(JZB1314)

1 井冈山大学体育学院,江西吉安,343009; 2 通讯作者

作者简介:王卉,女,博士,讲师; 收稿日期:2016-12-01

Conclusion: The inflammation in MS rats occurred obviously. Long-term aerobic exercise can effectively improve it. PPARα mediates the inflammatory in MS rats potentially.

Author's address Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi,343009

Key word exercise; metabolic syndrome; PPARα; inflammatory

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)是以中心性肥胖为核心,伴随高血糖、高血压、血脂紊乱等多种组分构成的临床综合征,而静坐、少动、高脂饮食的现代生活方式,是MS发病率逐年上升的主要原因[1]。2014年对重庆市35岁及以上人群调查显示MS标化患病率达到18.72%[2],吴迺淞等[3]对近5年广州市参加体检的人群的体检结果进行统计分析表明,普通人群的患病率以平均每年0.97%的速度递增。MS已经成为危害健康和生存质量的重大公共卫生问题,引起学界广泛关注。心血管病变是代谢综合征主要的危险因素,研究表明,炎症反应是心血管病变的重要因素,并且炎症反应状态直接决定代谢综合征心血管病变的进程[4]。过氧化物酶体增殖剂激活受体α(peroxisome proliferators-activated receptor α,PPARα)是核受体家族配体激活基因启动子,在细胞线粒体含量丰富的组织如骨骼肌、心肌、血管平滑肌等高表达。PPARα通过配体结合激活后,调控靶基因的表达而发挥其生理功能。对此,针对PPARα配体开发的如贝特类药物在调节糖脂代谢方面效果显著[5]。研究显示,运动对炎症有调节作用[6],也可改变机体PPARα的表达[7],但运动是否通过PPARα介导了机体的炎症反应尚缺少研究证据。以MS为研究对象,探讨运动调控机体炎症反应机制的研究鲜有报道。本实验以高脂高盐饮食建立MS的动物模型,观察有氧跑台运动对MS大鼠血清炎症因子的变化以及心肌PPARα mRNA表达和蛋白含量,探讨运动对MS大鼠心血管炎症反应的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

清洁级3周龄SD纯系雄性大鼠50只(河北省实验动物中心提供),体质量60—90g。大鼠单笼饲养,自由饮水,自然光照,室温控制在22±2℃,湿度控制在55%左右。常规啮齿类动物饲料购北京大学医学部实验动物中心;高脂高盐饲料是在普通饲料的基础上添加20%猪油、2%胆固醇和2%食盐(即每100g高脂高盐饲料中含普通饲料76g,猪油20g,胆固醇2g,食盐2g),充分混匀后,重新制作使用。血清相关因子测定:IL-6和TNF-α均采用ELISA测试法,试剂盒购自北京北方生物技术研究所(批号:F16355;F16510);单核细胞趋化因子(MCP-1)采用ELISA测试法,试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司(批号:SXR0431502)。

1.2 动物分组及运动干预方案

所有大鼠适应性基础饲养3天,大鼠跑台(杭州段氏,PT2000型)适应性训练3天(0坡度,10m/min,10min/d),剔除先天性不会运动大鼠1只。49只大鼠随机分为对照组8只(C组),和造模组41只。C组一直以普通饲料饲养至实验结束,造模组予以高脂高盐饲料饲养18周,参照2005年国际糖尿病联盟(IDF)颁布的MS诊断标准,即存在中心性肥胖,伴有胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)或空腹血糖受损/糖耐量异常、高血压、低HDL和高TG血症等其中两项者,判定为MS成模大鼠。本次造模成功26只(成模率63.4%)。成模大鼠随机分为模型对照组9只(MC组)和模型运动组10只(ME组)。MC组和ME组继续高脂饲料喂养,MC组不实施运动干预,ME组实施运动干预12周。期间MC组于干预期第8周因过度肥胖死亡1只(体质量596g),ME组干预期第2周和第3周分别猝死1只。ME组每周训练6天。第1周6天训练对应的时间(min)/速度(m/min)/跑台坡度(%)分别为30/15/0、30/15/5、45/15/5、45/20/5、45/25/5、60/27/5,第2周至第12周都维持60/27/5的训练方案。

1.3 标本采集

所有动物试验结束后统一取材,ME组取材前24h停训,取材前8h禁食。3%浓度的戊巴比妥钠(美国SIGMA公司)按1ml/kg体重行腹腔注射腹膜麻醉。打开腹腔,腹主动脉取血致死。全血室温静置20min,3500r/min,15min离心(离心机,YXJ-2,湘仪离心机仪器有限公司),取血清,-80℃保存备用。

处死后大鼠立即摘除心脏,冻存于液氮中,待检PPARα mRNA。

1.4 心肌组织PPARα mRNA测定

每组取4只大鼠的心脏标本进行PPARα mRNA的检测,采用Trizol法抽提大鼠心肌总RNA,RT-PCR反应依据TaKaRa- RNAPCRkit(购自上海生工生物工程有限公司,批号:SK2445)说明进行。PCR反应扩增PPARα所用引物(Primer Premier 5.0软件设计生成)见表1。20μl逆转录体系中加入RNA 1μg。TU-1901紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)测定RNA量和纯度。Actin为内参照。PCR反应采用TaKaRa SybrGreen PCR Master Mix试剂(购自上海生工生物工程有限公司,批号:SK1312),在ABI 7500型荧光定量PCR仪(美国ABI公司)上进行PCR反应。使用Sequence Detection software version 1.3.1软件(Applied Biosystems公司),参照相对标准曲线法$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$对相对定量结果进行分析。

表1 目的基因及内参引物

mRNA		引物序列	扩增片段长度(bp)
PPARα	F	ACTCGCAGGAAAGACTAGCA	143bp
	R	AGCAGTGGAAGAATCGGACC	
Actin	F	CGTTGACATCCGTAAAGAC	159bp
	R	TGGAAGGTGGACAGTGAG	

1.5 心肌PPARα蛋白表达

取心尖部位心肌组织200mg,在液氮中研磨成粉末,1mlRIPA裂解液后4℃、12000r/min离心30min,取上清液,按照体积比1:4(5×)加入缓冲液,95℃10min。其余操作按Western blotting说明书严格执行。一抗为兔抗,购自上海生工生物工程有限公司,批号:AF6284。

1.6 统计学分析

采用SPSS16.0统计软件进行分析。实验数据采用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,显著性水平α=0.05。

2 结果

2.1 血清炎症因子含量

表2显示,ME组IL-6显著低于C组和MC组($P<0.05$),并且MC组显著高于C组;血清TNF-α含量,ME组高于C组但差异无显著性($P>0.05$),而MC组显著性高于C组和ME组($P<0.01$);血清MPC-1含量,E组低于C组但无显著性差异($P>0.05$),MC组显著性高于C组和ME组($P<0.01$)。结果表明,高脂诱导的MS大鼠炎症反应增加,而运动干预可降低其炎症反应。

2.2 大鼠心肌PPARαmRNA和蛋白表达

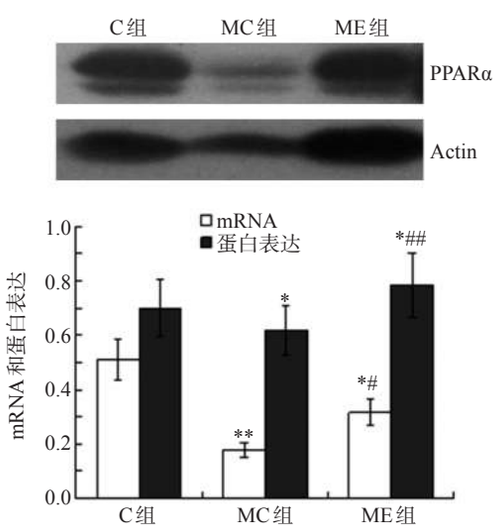
图1显示,转录水平分析,高脂诱导大鼠PPARα转录水平较普通膳食组显著降低($P<0.05$),运动干预后其转录水平显著提高($P<0.05$),但依然低于普通膳食组,表明高脂膳食抑制PPARα转录水平而运动能改善高脂诱导的PPARα转录;PPARα翻译水平分析,结果显示高脂膳食抑制PPARα翻译水平($P<0.05$),对其实施运动干预后显著提高PPARα翻译水平($P<0.01$),与转录水平一致,表明运动能提高高脂诱导MS大鼠心肌PPARα转录和翻译水平,激活PPARα的生物学功能。

表2 各组血清炎症因子含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IL-6(pg/ml)	TNF-α(ng/ml)	MPC-1(pg/ml)
C组	8	164.351±39.513	1.205±0.193	782.563±209.855
MC组	8	173.142±50.578①	1.896±0.487②	980.292±261.414②
ME组	8	145.445±18.601①③	1.329±0.166④	652.135±147.368④

注:C组:对照组;MC组:模型对照组;ME组:模型运动组。与C组相比:①$P<0.05$,②$P<0.01$;与MC组相比:③$P<0.05$,④$P<0.01$

图1 运动对大鼠心肌PPARα mRNA和蛋白表达的影响



注:与C组相比:*$P<0.05$,**$P<0.01$;与MC组相比:#$P<0.05$,##$P<0.01$

3 讨论

炎症是代谢性疾病的重要特征。诸多研究表明，脂质异位沉积和氧化应激是代谢性疾病炎症反应加强的根本原因[5—6]。炎症浸润使MS其他症状加重，所以减轻炎症反应，是MS防治的重要环节。心血管炎症反应是黏附-趋化-激活连续反应的有序过程，MCP-1属于趋化因子CC亚组，通过与G蛋白偶联的跨膜受体传导信号，下游的信号通路被激活，具有趋化、吞噬和调节炎症因子等多种生物学活性，在炎症的发病中发挥重要作用[10]。MCP-1激活后，可刺激巨噬细胞分泌IL-6、TNF-α 等炎症因子[11]。本研究模拟人类MS发病过程，以高脂高盐饮食、控制运动复制MS大鼠模型，探讨运动干预对MS心血管炎症的效果及机制。本次大鼠MS成模率63.4%，与其他研究者造模成功率基本一致[8—9]。本研究显示，与普通对照组比较，MS大鼠血清MCP-1显著升高，IL-6、TNF-α也显著升高，说明，高脂诱导的MS大鼠机体炎症反应加重，与其他研究结果一致[12—13]。

PPARα属于配体活化的核受体超家族PPARs类型中的一种，是编码心脏脂肪酸β氧化酶类基因的主要核转录因子。PPARα作为调节脂肪酸氧化酶类基因表达的关键核转录因子，对维持心肌能量代谢发挥起关键调节作用[14]。PPARα能够调控编码心肌线粒体大部分FFA氧化酶的基因表达[15]。研究认为，PPARα对炎症反应的调控是通过PPARα调节糖脂代谢，减少心血管脂质沉积及脂质过氧化反应，从而减轻心血管炎症反应。也有研究表明，PPARα对炎症反应的应答是通过核因子κB（nuclear factor κB，NF-κB）和白三烯B4（leukotrienes B4，LTB4）实现的。炎症因子（如IL-6、TNF-α）激活NF-κB和/或LTB4的转录，从而调控心血管炎症反应。研究表明，AMPK是PPARα重要的上游信号分子[16]，其活化后激活PPARα进入细胞核，调控心肌、血管平滑肌炎症相关因子的转录。而AMPK可激活NF-κB信号通路，调控心血管炎症反应[17]。非诺贝特（以PPARα为靶基因治疗MS的药物）可以通过上调PPARα的转录合成抑制THP-1细胞Toll样受体4表达，最终减轻炎症水平。而这种作用可被PPARα拮抗剂GW6741显著抑制[5]，杨纪才[18]通过体外细胞培养研究发现，PPARα激动剂非诺贝特通过抑制NF-κB通路降低高糖诱导的人血管内皮细胞炎症因子的表达，进而减轻心血管炎症的发生，说明PPARα对炎症的调控有独特的信号转导机制。

运动是预防和治疗MS科学有效的方法。研究发现，运动对代谢性疾病全身炎症反应及局部炎症反应都有良好的抑制作用[6—7,19]。Farinha等[6]对MS中年女性有氧运动干预12周，发现血清致炎因子IL-6、IL-1、TNFα含量和单核细胞mRNA表达降低，而抗炎因子IL-10含量降低，说明有氧运动能有效控制MS系统炎症，动物实验有相类似结果[7,20]。本研究结果显示，运动对MS大鼠炎症有良好的抑制作用，但调控机制目前尚未完全明确。研究发现，FFA代谢过程中产生的长链不饱和脂肪酸是PPARα的天然配体[14,20—21]，并发现AMPK在介导PPARα功能方面有重要作用，而AMPK在介导炎症反应的信号通路上也有重要作用，有学者推测，PPARα可能通过AMPK介导了炎症信号通路，对炎症因子的翻译与转录[22]，进而调控炎症反应。

本研究结果显示，高脂诱导的MS大鼠心肌PPARα转录和翻译水平下降，而机体的炎症反应加强；对其运动干预后，PPARα转录和翻译水平提高，机体的炎症反应下降，说明有氧运动提高了机体PPARα转录和翻译水平[19,22]而降低MS的炎症反应[6,23]。本研究结果提示，长时间有氧运动，FFA供能增加，相应的增加了机体长链不饱和脂肪酸即PPARα配体含量，激活PPARα的表达，进而调节机体的炎症反应。可以推测，运动对心血管PPARα表达的促进作用，可减轻MS心血管炎症反应，减少MS心血管病变的发生，也为运动防治代谢性疾病心血管病变提供理论支持。

参考文献

[1] 顾东风，ReynoldsK，杨文杰，等. 中国成年人代谢综合征的患病率[J]. 中华糖尿病杂志，2005，13(3)：181—186.

[2] 邓敏，邓华聪，王行，等. 重庆市35岁及以上人群代谢综合征的流行病学调查[J]. 中华内分泌代谢杂志，2014，30(9)：760—764.

[3] 吴迺淞，梁佩园. 统计分析代谢综合征的发展趋势给人们敲响警钟[J]. 中国保健营养，2014，24(3)：1746.

[4] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature，2002，420：868—874.

[5] 王卫远,李俊芳,聂尚燕. 非诺贝特通过上调PPARα抑制LPS诱导的THP-1细胞TLR4表达的实验研究[J]. 西部医学,2016,28(1):32—35.

[6] Farinha JB, Steckling FM, Stefanello ST,et al. Response of oxidative stress and inflammatory biomarkers to a 12-week aerobic exercise training in women with metabolic syndrome [J]. Sports Medicine-Open,2015,2(1):1—10.

[7] 周鼎,孙飙,景志强. 游泳运动对非酒精性脂肪肝大鼠血清Irisin及PPARα蛋白表达的影响[J]. 南京体育学院学报(自然科学版),2016,15(3):68—72.

[8] 程霄瀚,刘莉,隋艳波,等. 喂养型代谢综合征大鼠模型成模率分析[J]. 山东医药,2013,53(37):15—17.

[9] 夏燕萍,陈刚,俞茂华. 高糖高脂饮食诱导建立SD大鼠代谢综合征模型[J]. 中国现代医学杂志,2009,19(17):2607—2609.

[10] Westcott DJ,Delproposto JB,Geletka LM,et al. MGL1 promotes adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating 7/4hi monocytes in obesity[J]. J Exp Med,2009,206(13):3143—3156.

[11] Weisberg SP,Hunter D,Huber R,et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding[J]. J Clin Invest,2006,116(1):115—124.

[12] 高雯,李红莉. PPARa在动脉粥样硬化斑块中作用及机制的研究[J]. 国际心血管病杂志,2013,40(3):178—182.

[13] 邹剑,周后凤,先志伟,等. 激活PPARα表达对AngⅡ诱导的心肌细胞肥大及NFATc4与p65-NF-κB相互作用的影响[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(6):1017—1022.

[14] Liu D,Perkins JT,Hennig B. EGCG prevents PCB-126-induced endothelial cell inflame- mation via epigenetic modifications of NF-κB target genes in human endothelial cells[J]. J Nutri Biochem,2016,28:164—170.

[15] Madrazo JA,Kelly DP. The PPAR trio:regulators of myocardial energy metabolism in health and disease[J]. J Mol Cell Cardiol,2008,44(6):968—975.

[16] Meng R,Pei Z,Zhang A,et al. AMPK activation enhances PPARalpha activity to inhibit cardiac hypertrophy via ERK1/2MAPK signaling pathway[J]. Arch Biochem Biophys,2011,511 (1-2):1—7.

[17] 刘辉. 细胞内炎症信号通路交汇作用研究进展[J]. 感染、炎症、修复,2003,12(4):241—245.

[18] 杨纪才. 过氧化物酶增殖物激活受体α激动剂降低高糖诱导的黏附因子的表达[J]. 检验医学与临床,2011,8(7):788—791.

[19] 刘远新. PPARα与运动改善肥胖大鼠心肌细胞脂质代谢的实验研究[J]. 西安体育学院学报,2012,19(5):578—581.

[20] Mahdi E,Mohamed AR,Goh YM,et al. Diet high in α-linolenic acid up-regulate PPAR-α gene expression in the liver of goats[J]. J Biotech,2015,18(3):210—214.

[21] Banke NH,Wende AR,Leone TC,et al. Preferential oxidation of triacylglyceride-derived fatty,acids in heart is augmented by the nuclear receptor PPAR alpha[J]. Circ Res,2010,107(2): 233—241.

[22] 胡玉龙,徐慧,王永梅,等. AMPK在小鼠运动性和病理性心肌肥大能量代谢中的作用[J]. 体育科学,2014,34(9):39—43.

[23] 潘红英,徐晓阳,孙涛. 游泳运动对动脉粥样硬化小鼠心肌脂联素、PPARα和AMPK表达的影响[J]. 沈阳体育学院学报,2015,34(2):77—81.