

8周游泳运动干预对高脂饲养小鼠炎性细胞因子和脂肪因子的影响

张 旖¹ 张洪兵^{1,2}

摘要

目的:研究运动干预对高脂饲养的小鼠炎性细胞因子和脂肪因子的影响。

方法:将SPF级C57BL/6小鼠41只(雄性20只,雌性21只)随机分成正常对照组(NC组, n=11, 雄性5只, 雌性6只)和高脂饮食组(HFD组, n=30, 雄性15只, 雌性15只),分别以普通饲料和高脂饲料喂养。9周后,将HFD小鼠25只随机分为肥胖运动组(OE组, n=13, 雄性5只, 雌性8只)与肥胖对照组(OC组, n=12, 雄性5只, 雌性7只)。OE组进行为期8周无负重游泳训练。8周后每组随机挑选8只(雄性4只, 雌性4只)小鼠,用ELISA法测定其血清脂联素(APN)、网膜素、瘦素、内脂素、C-反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平。

结果:①OE组与OC组小鼠体重均显著高于NC组($P<0.01$),OE组体重显著低于OC组($P<0.05$)。②与NC组比较,OC组小鼠血清瘦素、内脂素、CRP、IL-6、TNF- α 水平均显著上升($P<0.01$);脂联素和网膜素有下降趋势,但差异不显著($P>0.05$)。与OC组相比,OE组小鼠血清脂联素($P<0.05$)、网膜素($P<0.01$)水平显著上升;内脂素水平下降($P<0.05$);瘦素、CRP、IL-6、TNF- α 水平均显著下降($P<0.01$)。③小鼠血清脂联素与血清IL-6有微弱的负相关关系($P<0.05$);血清脂联素与网膜素有较弱的正相关关系($P<0.05$);小鼠血清网膜素与血清CRP有中等程度的负相关关系($P<0.01$);小鼠血清瘦素、内脂素均与血清IL-6、TNF- α 有中等程度的正相关关系($P<0.01$)。

结论:8周游泳运动干预可以通过刺激能抑制炎症因子的脂联素、网膜素的分泌及抑制促炎因子瘦素、内脂素的分泌有效减轻肥胖小鼠炎症反应。

关键词 肥胖;运动干预;炎性细胞因子;脂肪因子

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2020)-03-0301-05

Effects of 8-week swimming exercise intervention on inflammatory cytokines and adipokines in mice with high-fat diet/ZHANG Yi,ZHANG Hongbing//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(3): 301—305

Abstract

Objective: To investigate the effect of exercise intervention on inflammatory cytokines and adipokines in mice with high-fat diet.

Method: Forty-one SPF C57BL/6 mice (20 males and 21 females) were randomly divided into normal control group (NC, n=11, 5 males, 6 females) and high-fat diet group (HFD, n=30, 15 males and 15 females), and fed with ordinary food and high fat diet separately. After 9 weeks, twenty-five obese mice were randomly divided into obesity exercise intervention group (OE, n=13, 5 males, 8 females) and obesity control group (OC, n=12, male 5, 7 females), and continued the high fat diet. The OE group was trained for 8 weeks with weight-bearing swimming. After the 17 weeks program, the APN, omentin, leptin, visfatin, CRP, IL-6, TNF- α in serum were measured by ELISA for all rats.

Result: ① Compared with NC, mice in both OC and OE's body weight increased ($P<0.01$). Compared with

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.03.009

1 南京中医药大学,210023; 2 通讯作者

第一作者简介:张旖,女,硕士研究生; 收稿日期:2019-01-14

OC, mice in OE's weight increased more($P<0.05$).②Compared with NC, the serum leptin,visfatin,CRP,IL-6 and TNF- α levels in OC increased significantly ($P<0.01$), the serum APN and omentin decreased, but not significant ($P>0.05$). Compared with the OC, the serum APN levels ($P<0.05$) and the serum omentin levels ($P<0.01$) of the OE increased, the levels of visfatin decreased ($P<0.05$), the levels of leptin,CRP,IL-6,TNF- α decreased significantly ($P<0.01$).③There was a weak negative correlation between serum APN levels and serum IL-6 in mice ($P<0.05$). Serum APN levels are weak positively correlated with serum omentin in mice ($P<0.05$). Serum omentin levels are intermediate negatively correlated with serum CRP($P<0.01$), serum leptin and serum visfatin were intermediate positively correlated with both serum IL-6 and TNF- α ($P<0.01$).

Conclusion: The 8-weeks swimming exercise intervention can effectively reduce the inflammatory response of obese mice and slow down the inflammatory process by stimulating the secretion of the factors APN and omentin which inhibit inflammatory factors and inhibiting the proinflammatory cytokines Leptin and visfatin.

Author's address Nanjing University of Chinese Medicine,210023

Key word obesity; exercise intervention; inflammatory cytokines; adipokines

代谢综合征(metabolic syndrome,MS)是包括中心性肥胖、高血压、糖脂代谢异常、高尿酸血症、胰岛素抵抗等的一组代谢紊乱症候群,好发于中青年肥胖人群。其与心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)增加密切相关,防治MS是CVD一级预防的重要环节。高热量的摄入引起的肥胖已被证实是引起MS的重要原因,其中内脏脂肪是触发MS的主要因素^[1]。另外慢性炎症也被认为是参与了MS发生、发展并导致CVD的主要病理因素之一^[2]。

MS目前在临床上尚没有有效的药物预防,运动对代谢综合征可以起到多靶点的积极作用,适量有氧运动能促进脂肪组织分解,调节相关脂肪因子的分泌失衡^[3],如白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、脂联素(APN)、瘦素(leptin)等,并且起到抗炎作用^[4],是MS和内皮功能障碍一、二级预防的重要手段。因此从早期控制危险因素来防治MS和CHD、揭示可能存在的康复机制为出发点,本实验拟以高脂饮食诱导肥胖小鼠模型,8周游泳运动干预后检测小鼠血清中脂联素、网膜素(omentin)、瘦素、内脂素(visfatin)、C反应蛋白(CRP)、IL-6、TNF- α 水平,研究运动干预对高脂饲养的肥胖小鼠炎性细胞因子(CRP、IL-6、TNF- α)和脂肪因子(脂联素、网膜素、瘦素、内脂素)的影响,探讨其作用机制,并为之后有针对性的研究运动干预与防治MS的量效关系,以及其对内皮功能障碍的作用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

实验动物选用SPF级C57BL/6小鼠,共41只(其中雄性20只,雌性21只),购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号SCXK(苏)2016-0010,分笼饲养,按照南京中医药大学动物实验中心相关伦理标准进行操作。饲养环境为动物房温度维持在(22 ± 5) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度维持在(50 ± 10)%,光照时间为12h/天,进食方式为自由饮食和饮水。观察小鼠健康状况。将41只小鼠随机分为正常对照组(normal control, NC,n=11,雄性5只,雌性6只)和高脂饮食组(high fat diet, HFD, n=30,雄性15只,雌性15只),分别进食普通饲料和高脂饲料,所有饲料均由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供,其中每100g高脂饲料由2%胆固醇,1%胆酸钠,10%炼猪油及87%普通饲料配制而成^[5]。饲养过程中,意外死亡5只(HFD组雄性)。9周后建立肥胖模型^[6](以HFD组小鼠体重超过NC组平均体重的20%为模型成功标准)。将HFD组小鼠25只随机分为肥胖运动组(obesity exercise, OE,n=13,雄性5只,雌性8只)与肥胖对照组(obesity control, OC,n=12,雄性5只,雌性7只),继续予高脂饲料。其中OE组小鼠实施8周的无负重游泳运动干预;OC组小鼠不进行游泳运动干预;NC组小鼠进食普通饲料,不进行游泳运动干预。8周后每组随机挑选8只(雄性4只,雌性4只)小鼠取样。

1.2 运动干预方案

运动方式采用无负重游泳训练,水温为 $32\pm 1^{\circ}\text{C}$,游泳池内径55cm,水深60cm。游泳方案采用改进的唐东辉的游泳训练方案^[7]:第1—3天适应性游泳时间为30min,此后游泳训练时间均为60min/

次/天,6次/周,持续训练8周。

1.3 取材

小鼠运动8周后,禁食12h,置于电子天平上称重,记录数据,并摘眼球取血,EP管收集全血,3000rp/min,离心10min后,取上清液。

1.4 血液生化指标

采用ELISA酶联免疫吸附法测定血清中脂联素、网膜素、瘦素、内脂素、CRP、IL-6、TNF- α 水平。ELISA试剂盒购于南京森贝伽生物科技有限公司,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析

数据结果分析采用SPSS 18.0软件,数据的正态分布检验采用Shapiro-Wilk检验,运动后体重、血液生化指标组间比较采用单因素方差分析,数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,相关分析采用Pearson相关分析, $P>0.05$ 表示没有显著差异, $P<0.05$ 表示有显著差异, $P<0.01$ 表示有非常显著性差异。

2 结果

2.1 各组小鼠体重的变化

与NC组($28.91\pm 4.24\text{g}$)比较,OC组($41.90\pm 6.03\text{g}$)、OE组($36.35\pm 6.03\text{g}$)小鼠体重分别增长了44.93%、25.72%($P<0.01$)。相较于OC组,OE组小鼠体重下降了13.26%($P<0.05$)。

2.2 各组小鼠血液指标的比较

与NC组比较,OC组小鼠血清瘦素、内脂素、CRP、IL-6、TNF- α 水平均显著上升($P<0.01$);脂联素和网膜素有下降趋势,但差异不显著($P>0.05$)。与OC组相比,OE组小鼠血清脂联素($P<0.05$)、网膜素($P<0.01$)水平显著上升;内脂素水平下降($P<0.05$);瘦素、CRP、IL-6、TNF- α 水平均显著下降($P<0.01$)。与NC组比较,OE组小鼠血清网膜素水平显著升高($P<0.05$);脂联素虽有上升趋势,但差异不显著($P>0.05$);内脂素、CRP、IL-6、TNF- α 水平仍升高($P<0.01$),瘦素水平也升高($P<0.05$)(表1)。

2.3 各组小鼠血液指标的相关性

小鼠血清脂联素与血清IL-6为负相关关系,相关程度微弱,相关系数 $r=-0.34(P<0.05)$;血清脂联素与网膜素有较弱的正相关关系,相关系数 $r=0.45(P<0.05)$ 。小鼠血清网膜素与血清CRP为线性负相关关系,相关程度中等,相关系数 $r=-0.57(P<0.01)$ 。小鼠血清瘦素与血清IL-6、TNF- α 均为正相关关系,相关程度中等,相关系数 r 分别为0.75($P<0.01$)、0.71($P<0.01$);血清内脂素水平与血清IL-6、TNF- α 均为正相关关系,其中与血清IL-6相关程度较高,相关系数 $r=0.81(P<0.01)$,与血清TNF- α 相关程度中等,相关系数 $r=0.73(P<0.01)$,图1。

3 讨论

近年来研究发现MS因其糖脂代谢紊乱导致脂质异位沉积,易发生氧化应激反应,逐渐成为心血管疾病发生的高危因素之一^[8],而脂肪细胞内的慢性炎症在肥胖引起的代谢紊乱的发生发展中起到关键作用^[9]。MS目前在临床上缺少有效的药物预防,运动对肥胖导致的MS可以起到多靶点的防治作用,是MS一、二级预防重要手段。其可能存在的作用机制亦是心脑血管疾病康复预防基础研究的重要方向之一。本研究旨在建立肥胖小鼠模型,探讨了运动干预对高脂饲养小鼠炎性细胞因子和脂肪因子的影响,以及炎性细胞因子和脂肪因子之间的关系,以便于进一步分析合适的有氧运动对MS及CVD的康复机制。研究表明肥胖会导致系统和脂肪组织炎性及抗炎性等众多介质之间的平衡紊乱,从而发生炎症反应,这表现为高脂饮食诱导肥胖的小鼠的炎性细胞因子和脂肪因子水平的变化。

OC组小鼠体重显著高于NC组,说明高脂饮食能够诱导肥胖。而OE组小鼠体重较OC组有明显下降,提示有氧运动能够有效抑制肥胖进展。但OE组小鼠体重仍高于NC组可能与运动时间、强度不够等有关。高脂膳食导致的肥胖诱发脂肪组织炎性

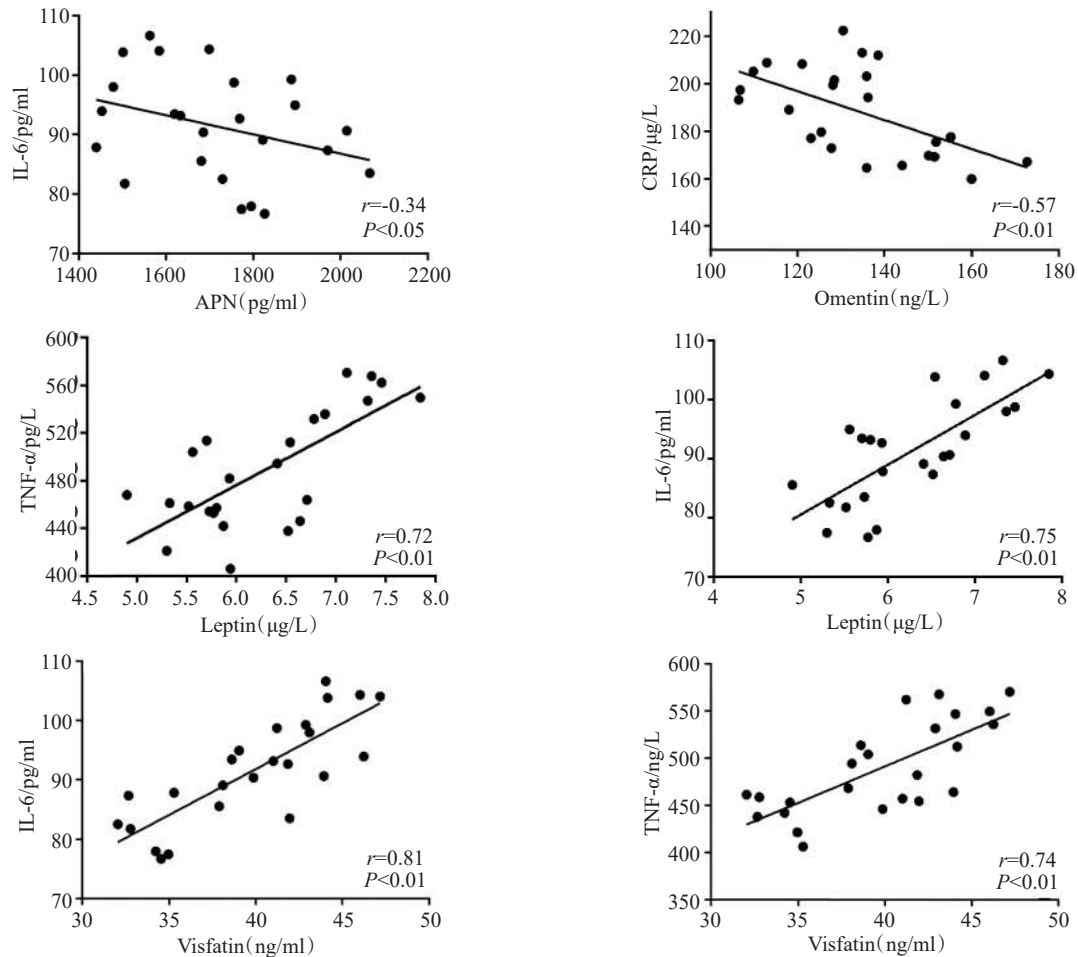
表1 各组小鼠血液生化指标比较

($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	APN(pg/ml)	omentin(ng/L)	leptin($\mu\text{g/L}$)	visfatin(ng/ml)	CRP($\mu\text{g/L}$)	IL-6(pg/ml)	TNF- α (ng/L)
NC组	1715.11 $\pm$ 172.43	126.54 $\pm$ 10.80	5.64 $\pm$ 0.49	34.30 $\pm$ 1.87	168.63 $\pm$ 5.78	82.14 $\pm$ 4.49	443.58 $\pm$ 21.31
OC组	1615.3 $\pm$ 152.13	121.5 $\pm$ 10.50	7.16 $\pm$ 0.42 ^②	44.36 $\pm$ 2.00 ^②	209.29 $\pm$ 6.64 ^②	101.11 $\pm$ 4.26 ^②	547.20 $\pm$ 19.88 ^②
OE组	1813.21 $\pm$ 169.02 ^③	152.65 $\pm$ 10.87 ^{①④}	6.06 $\pm$ 0.46 ^{①④}	40.55 $\pm$ 2.00 ^{②③}	187.85 $\pm$ 10.03 ^{②④}	90.99 $\pm$ 3.56 ^{②④}	477.09 $\pm$ 25.20 ^{②④}

注:与NC相比,①: $P<0.05$,②: $P<0.01$;与OC相比,③: $P<0.05$,④: $P<0.01$ 。

图1 小鼠血清指标间的相关性



细胞因子分泌,如IL-6、TNF- α ,其作用产生大量CRP,而CRP水平与MS密切相关,并能高度预测随后发生的心血管事件^[10]。这些炎症细胞因子的高表达引起组织慢性低度炎症反应,与胰岛素抵抗息息相关^[11]。本实验结果显示,相较于NC组,OC组及OE组小鼠血清CRP、IL-6、TNF- α 均显著高于NC组,其炎症反应明显,说明肥胖与炎症反应相关,与贺强等^[12]的研究结果一致。同时研究显示,相较NC组,OC组小鼠血清脂联素、网膜素较NC组有一定的下降趋势,而OC组及OE组小鼠血清瘦素、内脂素均显著升高,提示肥胖可能导致体内脂肪因子分泌紊乱。本试验NC组与OC组小鼠脂联素、网膜素水平统计学差异不明显可能与样本量不够大或运动时间、强度不够等有关。相关研究证明,有氧运动可以有效缓解脂肪因子分泌失衡^[13-16]。本实验结果表

明有氧运动可以不同程度的调节相关脂肪因子及炎症细胞因子,相较于OC组,OE组小鼠血清中的脂肪因子脂联素、网膜素水平显著上升,而瘦素、内脂素、CRP、IL-6、TNF- α 均显著下降,说明8周的游泳训练可以明显平衡脂肪因子分泌、抑制体内慢性炎症进展情况。这可能与有氧运动通过调控棕色脂肪组织(BAT)中Jak-STAT、ErbB、TGF- β 和Insulin等信号通路及一系列生物学过程来抵抗机体免疫细胞和促炎因子相关基因的表达,以此增强BAT的抗炎作用相关^[17]。而相较NC组,OE组小鼠仅网膜素水平上升,脂联素水平虽上升,但统计学差异不明显,且瘦素、内脂素、CRP、IL-6、TNF- α 依然增高,可能与本实验运动时间、强度不够等有关,待进一步研究。

大多数脂肪因子与炎症相关,其分泌和表达增加也许是脂肪组织中低程度慢性炎症的标志^[18]。有

研究表明脂联素作为肥胖及胰岛素抵抗的介质,可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和环氧化酶(COX)信号通路发挥抗炎作用^[19]。网膜素可抑制NF- κ B炎症信号通路降低炎症反应^[7],发挥抗炎、调节血管功能的作用,从而减轻脂肪组织炎症反应。本实验中脂联素与IL-6呈负相关关系,说明脂联素有一定的抗炎作用。而网膜素与CRP有一定程度负相关关系,提示高表达的网膜素可能有一定程度的抗炎作用。Ge等^[20]认为脂联素可促进离体的网膜素mRNA表达上调。本实验结果显示血清脂联素与网膜素有一定的正相关性,即脂联素的分泌一定程度可以促进网膜素的高表达。研究表明,瘦素诱导单核细胞和巨噬细胞产生炎症因子^[21],这一现象在炎症的初始阶段就发生^[22]。有研究显示高脂饮食引起的肥胖导致瘦素水平升高。吴小军等^[23]认为内脂素作为一种前炎症因子参与多种血管炎症过程。Kim等^[24]研究发现内脂素对血管内皮细胞具有直接的促炎作用,通过激活NF- κ B信号通路显著增加炎症细胞粘附分子、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)的表达,从而诱导白细胞与内皮细胞的粘附。本实验结果显示,瘦素、内脂素均与炎症因子IL-6、TNF- α 有中高强度的正相关关系,说明瘦素、内脂素作为促炎因子,与机体炎症反应密切相关。

综上,8周游泳运动干预可以有效控制体重,促进脂肪组织分解,并通过刺激能够抑制炎症因子的脂联素、网膜素的分泌及抑制促炎因子瘦素、内脂素的分泌有效减轻肥胖引起的慢性炎症反应,从而改善MS,并对防治内皮功能障碍及CVD有积极意义。

参考文献

- [1] Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, et al. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds[J]. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 2017,11(8):215—225.
- [2] 尹士男, 江华. 代谢综合征的诊治进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2018,20(11):1121—1123.
- [3] 杜海平, 刘晨涛. 运动调节脂肪细胞因子的研究进展[J]. *湖北体育科技*, 2015,34(03):224—227.
- [4] 吴明方. 肥胖者有氧运动抗炎效应的实验研究[J]. *中国体育科技*, 2010,46(03):106—109.
- [5] 屈玉春, 王晶, 唐波炎, 等. 银杏叶提取物对动脉粥样硬化过程中NF- κ B表达的作用及机制[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2014,12(06):726—727.
- [6] Chandler PC, Viana J, Oswald KD, et al. Feeding response to melanocortin agonist predicts preference for and obesity from a high-fat diet[J]. *Physiology & Behavior*, 2005,85(2):221—230.
- [7] 唐东辉, 刘润芝, 李娟, 等. 8周游泳运动干预对肥胖小鼠血管内皮功能的改善及其炎症机制[J]. *中国体育科技*, 2016,(6):86—91.
- [8] 张崇林, 王前进, 刘绍生, 等. 有氧运动对代谢综合征大鼠氧化应激及心肌PPAR α 表达的影响[J]. *卫生研究*, 2018,(5):789—793.
- [9] 陈建, 应汝炯, 盛昭园. 从炎症角度研究单纯性肥胖述评[J]. *河南中医*, 2018,(11):1773—1778.
- [10] Patel B, Taviad D, Malapati B, et al. Association of hs-crp levels with obesity & metabolic syndrome in patients with type-2 diabetes mellitus: a link between inflammation, adiposity & insulin resistance[J]. *Int J Biol Med Res*, 2015,6(3):5104—5108.
- [11] 徐春阳, 李文兰, 杨秀颖, 等. 脂肪代谢障碍与抗炎治疗策略[J]. *中药药理与临床*, 2018,(05):168—172.
- [12] 贺强, 季浏. 4周游泳训练对db/db小鼠脂肪组织巨噬细胞介导炎症的影响[J]. *体育学刊*, 2015,(05):133—138.
- [13] Saremi A, Asghari M, Ghorbani A. Effects of aerobic training on serum omentin-1 and cardiometabolic risk factors in overweight and obese men[J]. *Journal of Sports Sciences*, 2010,28(9):993—998.
- [14] 付鹏宇, 龚丽景, 赵林青, 等. 有氧运动和饮食干预对肥胖小鼠Visfatin水平的影响及其与氧化应激的关系[J]. *中国运动医学杂志*, 2014,(01):52—57.
- [15] Kriketos AD, Gan SK, Poynten AM, et al. Exercise increases adiponectin levels and insulin sensitivity in humans[J]. *Diabetes Care*, 2004,27(2):629.
- [16] Cigarroa I, Lalanza JF, Caimari A, et al. Treadmill intervention attenuates the cafeteria diet-induced impairment of stress-coping strategies in young adult female rats[J]. *PLoS One*, 2016,11(4):e153687.
- [17] 付鹏宇, 龚丽景, 朱榕鑫, 等. 有氧运动调控肥胖小鼠棕色脂肪组织炎症反应相关基因表达及通路的研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2018,(09):764—771.
- [18] 杨庆婵, 朱慧, 王彦, 等. 不同程度间歇低氧对大鼠炎症细胞因子和脂肪因子的影响[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2014,(8):693—696.
- [19] 李洁, 安丽, 任利群. 脂联素对老龄小鼠心肌炎症因子TNF- α 、IL-6表达及左心室舒张功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018,(16):4033—4035.
- [20] Ge Q, Maury E, Rycken L, et al. Endocannabinoids regulate adipokine production and the immune balance of omental adipose tissue in human obesity[J]. *International journal of obesity* (2005), 2013,37(6):874—880.
- [21] López-Mejías R, Castañeda S, González-Juanatey C, et al. Cardiovascular risk assessment in patients with rheumatoid arthritis: The relevance of clinical, genetic and serological markers[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2016,15(11):1013—1030.
- [22] 张贤政, 张玲玲, 魏伟. 炎症因子及脂肪因子参与类风湿关节炎并发心血管疾病的研究进展[J]. *医药导报*, 2017(11):1283—1287.
- [23] 吴晓军, 秦俭. 内脂素与动脉粥样硬化的关系[J]. *心血管病学进展*, 2012,33(01):74—76.
- [24] Kim SR, Bae YH, Bae SK, et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Molecular Cell Research*, 2008,1783(5):886—895.