

冯丽洁,李俊. 二甲双胍与有氧运动对 2 型糖尿病大鼠血管氧化应激的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 58 – 63,81.

Feng LJ, Li J. Effects of metformin and aerobic exercise on vascular oxidative stress in type 2 diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 58 – 63,81.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 04. 010

二甲双胍与有氧运动对 2 型糖尿病大鼠血管氧化应激的影响

冯丽洁,李 俊*

(南京信息工程大学体育部,南京 210044)

【摘要】 目的 评价二甲双胍、有氧运动及二甲双胍与有氧运动联合干预对 2 型糖尿病大鼠血管氧化应激的影响。方法 采用高脂饮食、小剂量 STZ 诱导 2 型糖尿病模型,将大鼠分为 5 组:正常对照组(NC)、糖尿病对照组(DC)、糖尿病运动组(DS)、糖尿病二甲双胍干预组(DM)和糖尿病二甲双胍+运动联合干预组(DMS)。8 周干预后,采用 HE 染色病理学检查、Western blotting 和 ELISA 方法对大鼠血管形态、组织蛋白表达和血清指标进行检测。结果 DS、DM 和 DMS 组空腹血糖和胰岛素均有不同程度的降低。与 DC 组相比,DS、DM 和 DMS 组大鼠血管 Nrf2 和 HO-1 白表达增加,NOX4 蛋白表达降低。DS 和 DMS 组大鼠血管 SOD 活性升高,DM 和 DMS 组 MDA 降低。DS、DM 和 DMS 组大鼠血清 VCAM-1 和 TNF- α 浓度均存在不同程度的降低。结论 二甲双胍与有氧运动可能通过调节 Nrf2 和 NOX4 平衡来降低 2 型糖尿病大鼠血管氧化应激。

【关键词】 二甲双胍;有氧运动;氧化应激;糖尿病;大鼠

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】1671-7856(2019) 04-0058-06

Effects of metformin and aerobic exercise on vascular oxidative stress in type 2 diabetic rats

FENG Lijie, LI Jun*

(Department of Physical Education, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of metformin, aerobic exercise alone or in combination on the vascular oxidative stress in type 2 diabetic rats. **Methods** Rat models of type 2 diabetes were established by feeding a high-fat diet combined with low dose streptozotocin (STZ). Rats were assigned into five groups: normal control (NC), diabetes control (DC), diabetes swimming (DS), diabetes metformin (DM), and diabetes metformin plus swimming (DMS). After undergoing the respective interventions for 8 weeks, indicators of vascular morphology, protein expression in the vascular tissue, and serum indicators were tested by histopathology using HE staining, western blotting, and ELISA. **Results** All the DS, DM, and DMS groups showed decrease to different degrees in fasting blood glucose and insulin levels. Compared with the DC group, the DS, DM, and DMS groups exhibited significant increases in the protein expression of Nrf2 and HO-1, and exhibited a clear decrease in the expression of NOX4. The activities of SOD in the DS and DMS groups were higher than in the DC group. MDA levels in the DM and DMS groups were lower than in the DC group. The concentrations of TNF- α and VCAM-1 were decreased to varying degrees in the DS, DM, and DMS groups. **Conclusions**

[作者简介]冯丽洁(1984—),女,讲师,硕士,研究方向:运动与健康。E-mail: 279948111@qq.com

[通信作者]李俊(1977—),男,博士,副教授,研究方向:运动生理学。E-mail: njxxgcdxlj@aliyun.com

Metformin and aerobic exercise may relieve vascular oxidative stress in type 2 diabetic rats, by regulating the balance between Nrf2 and NOX4.

【Keywords】 metformin; aerobic exercise; oxidative stress; diabetes mellitus; rat

血管并发症是糖尿病致残、致死的主要原因,动脉粥样硬化是引起血管并发症的直接原因。研究显示,氧化应激在血管损伤及动脉粥样硬化形成过程中发挥关键的作用^[1]。糖尿病状态下高血糖和脂质代谢紊乱对血管内皮的损伤主要是通过氧化应激实现的。因此,降低氧化应激对防止血管内皮损伤,预防和治疗血管并发症具有十分重要意义。

目前对糖尿病的临床治疗主要以控制血糖为主,二甲双胍是治疗 2 型糖尿病最常用的双胍类药物,具有降低血糖,改善胰岛素抵抗,降低氧化应激等作用^[2]。除了临床干预外,生活方式改变尤其是运动已被认为是预防和治疗 2 型糖尿病的推荐方法。规律性有氧运动可以调节血糖代谢,提高机体抗氧化能力,降低慢性炎症,对心血管具有保护作用^[3],但其作用效果还并不十分明确。本研究拟通过对 2 型糖尿病大鼠进行 8 周二甲双胍和有氧运动干预,评价二甲双胍、有氧运动及两者联合干预对 2 型糖尿病大鼠血管氧化应激的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,6 周龄共 46 只,体重 220~270 g,由吴氏实验动物中心提供[SCXK(闽)2012-0001],饲养在福建师范大学实验动物中心[SYXK(闽)2015-0004]。环境温度:22℃~24℃,湿度:50%~70%,光照:12 h:12 h。大鼠分笼饲养,自由饮食。随机抽取 6 只作为正常对照组,并给予正常饲料喂养,其余大鼠用于制作 2 型糖尿病模型。实验过程按照实验动物的使用 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

二甲双胍(上海生工生物工程公司);胰岛素(insulin)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)Elisa 试剂盒(南京建成生物工程研究所);NADPH 氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4)4 抗体、GADPH 抗体、核因子相关因子 2(nuclear factor-e2-related factor 2, Nrf2)抗体、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体(Abcam 英国);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测试盒、

总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。低温高速离心机(Eppendorf 德国);血糖仪(罗氏 美国);凝胶电泳仪、转膜槽(Bio-Rad 美国);凝胶电泳成像分析仪(ProteinSimple 美国);酶标仪(Tecan 美国);分光光度计(Bio-Rad 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 2 型糖尿病模型构建

采用高脂饮食,小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导 2 型糖尿病模型。40 只大鼠高脂饲料(15%蔗糖,15%猪油,5 蛋黄粉,0.2%胆酸钠,64.8%基础饲料)喂养四周后,禁食 12 h,腹腔注射 STZ(溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液;剂量 30 mg/kg)^[4-5],正常对照组注射相应容量的柠檬酸缓冲液。STZ 注射 2 周后,空腹血糖值持续大于 11.1 mmol/L,确定为 2 型糖尿病模型,最终符合糖尿病模型大鼠共 32 只。

1.3.2 实验分组

将大鼠分为 5 组:正常对照组(NC, n=6);糖尿病对照组(DC, n=7);糖尿病运动组(DS, n=9),有氧运动干预;糖尿病二甲双胍干预组(DM, n=7),进行二甲双胍处理;糖尿病二甲双胍+运动联合干预组(DMS, n=9),同时给予二甲双胍和有氧运动处理。干预时间共 8 周。

1.3.3 给药方法

二甲双胍溶入饮水中给予大鼠摄取,药物剂量参考已有的研究^[6],第 1 周剂量为 150 mg/(kg·d),第 2 周为 300 mg/(kg·d),第 3 周调整为 450 mg/(kg·d),该剂量一直保持到实验结束。监控大鼠体重和饮水量变化,每周根据体重变化调整一次药物剂量。

1.3.4 运动方案

运动组大鼠采用游泳运动方式,每天 1 h,每周 5 d,共 8 周。1~4 周大鼠无负重进行游泳,5~8 周负重 1%体重(重物系尾部)。游泳池为圆形塑料桶(直径 60 cm×高 75 cm),水深不低于 45 cm,水温控制在 32℃~34℃,每桶同时容纳 3 只大鼠。时刻监控大鼠游泳状况,以防大鼠溺水。

1.3.5 样本制备

最后一次运动结束后 24 h 处死。血液样本以 4℃, 3500 r/min 离心 10 min,取上清液, -20℃保

存。迅速剥离主动脉,取小部分放入 4% 多聚甲醛中固定,其余放置-80℃ 冰箱中保存待用。

1.3.6 生化指标检测

大鼠禁食 12 h 后尾部取血,使用血糖仪和试纸检测大鼠血糖浓度。采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法检测大鼠血清 insulin、TNF-α 和 VCAM-1 浓度。

1.3.7 病理标本制备

从固定液中取出主动脉组织,进行脱水、透明和石蜡包埋。组织切片 4 μm,脱蜡复水、HE 染色、脱水、透明、树胶封片,最后显微镜拍照。

1.3.8 大鼠血管组织 SOD 和 MDA 检测

将主动脉按 1:9 比例加入生理盐水研磨制作组织匀浆液;然后采用 BCA 法测量匀浆液的蛋白浓度,最后按照试剂盒检测说明书进行操作,并根据公式计算出组织匀浆液 SOD 活性和 MDA 浓度。

1.3.9 Western blotting

先提取主动脉总蛋白并检测蛋白浓度。95℃ 加热变性后放入-80℃ 保存备用。制备分离胶和浓缩胶,上样,打开电源,直到溴酚蓝到达电泳槽底部。电泳完成后转膜 1.5 h。转膜后 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,4℃ 孵育过夜,洗膜,二抗室温孵育 1 h,洗膜。ECL 化学发光显色、拍照,并进行蛋白条带灰度检测。

1.4 统计学方法

运用 SPSS 19.0 统计软件,数据采用平均数+标准误($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

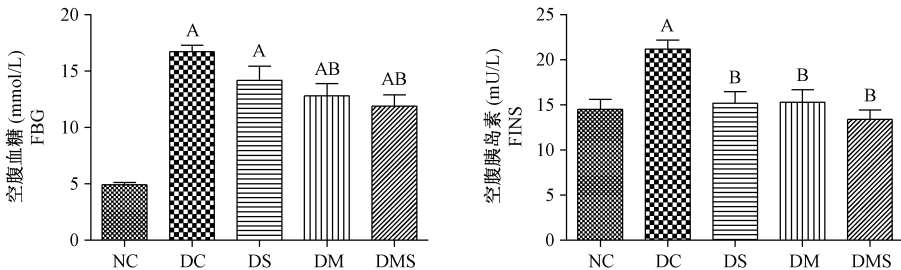
2 结果

2.1 大鼠血糖代谢相关指标

图 1 显示了 8 周干预后大鼠血糖代谢指标变化。从图中看出,糖尿病大鼠空腹血糖 (FBG) 均显著高于正常组 ($P<0.01$),其中 DC 组空腹血糖值最高,DM 和 DMS 组大鼠空腹血糖显著低于 DC 组 ($P<0.01$)。DC 组空腹胰岛素 (FINS) 显著高于 NC 组 ($P<0.01$),DS、DM 和 DMS 组与 DC 组相比,空腹胰岛素有了明显的降低 ($P<0.01$)。

2.2 大鼠主动脉血管形态

镜下观察显示 8 周干预后大鼠主动脉的结构形态 (图 2)。NC 组大鼠主动脉内壁光滑,内皮细胞完整,平滑肌细胞排列整齐。DC 组与 NC 组相比,血管内壁粗糙,内皮细胞破损相对严重,平滑肌细胞排列凌乱。DS、DM 和 DMS 组血管内皮细胞具有一定程度的损伤,但与 DC 组相比,血管病变有所缓解,其中 DMS 组大鼠主动脉结构保持相对完整。



注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$,^A $P<0.01$;与 DC 组比较,^b $P<0.05$,^B $P<0.01$ 。

图 1 大鼠空腹血糖和空腹胰岛素

Note. Compared with the NC group, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$; compared with the DC group, ^b $P<0.05$, ^B $P<0.01$.

Figure 1 Fasting blood glucose and fasting insulin levels in the rats

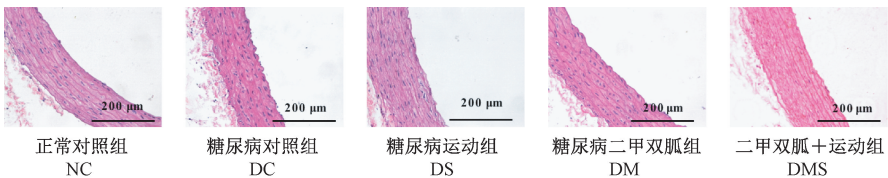


图 2 大鼠主动脉的病理改变 (HE 染色, ×200)

Figure 2 Histological changes of the rat aortas (HE staining)

2.3 大鼠血管 Nrf2、HO-1、SOD 指标

图 3 显示了 8 周二甲双胍和有氧运动干预后大鼠血管抗氧化水平。从图 A 中可以看出,NC 和 DC 组 Nrf2 蛋白表达较低,而 DS、DM、DMS 组表达显著性升高($P<0.01$),给予二甲双胍处理的两个组 Nrf2 表达水平均高于 DS 组,其中 DMS 组与 DS 组相比,具有统计意义($P<0.05$)。从图 B 中看出,DC 组血管 HO-1 蛋白表达显著低于 NC 组($P<0.01$)。三组干预组表达水平均显著高于 DC 组($P<0.01$),DM 和 DMS 组 HO-1 蛋白表达水平不仅高于 DC 组,而且还明显高于 NC 和 DS 组($P<0.01$, $P<0.05$)。图 C 显示了大鼠血管 SOD 水平。DC 组 SOD 水平最低,三个干预组 SOD 水平均高于 DC 组,其中 DS 和 DMS 组 SOD 水平与 DC 组相比具有统计性意义($P<0.05$)。

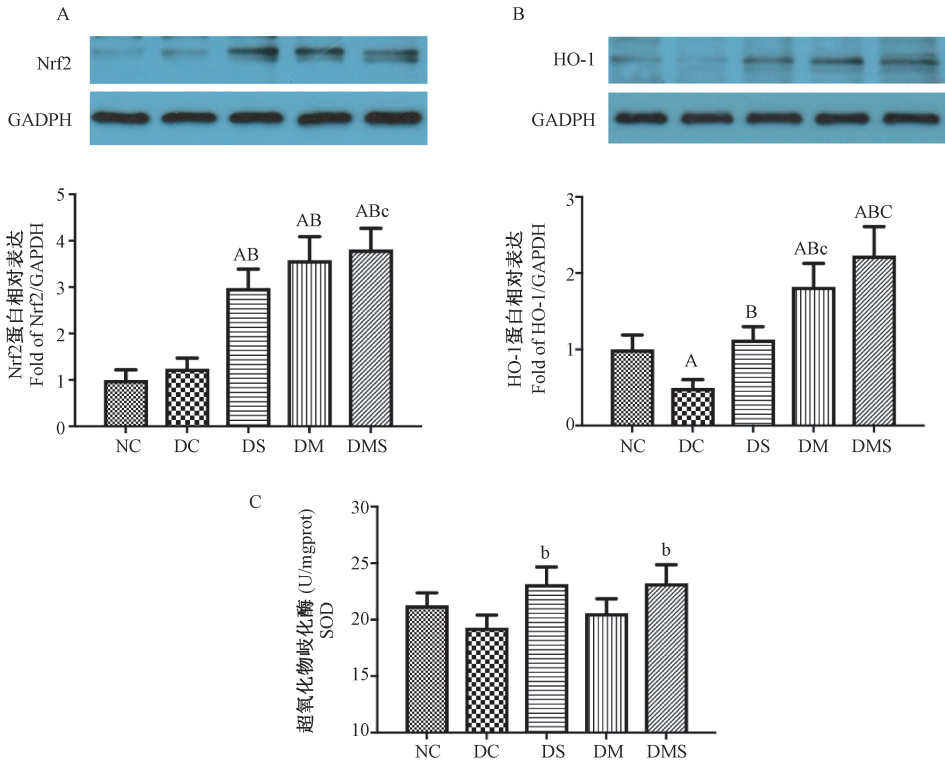
2.4 大鼠血管 NOX4 和 MDA 指标

图 4 反映了糖尿病大鼠血管氧化水平。从图 A 中可以看出,糖尿病组血管 NOX4 蛋白表达水平均明显高于正常对照组($P<0.01$, $P<0.05$),其中,DC

组表达量最高。三组干预组 NOX4 表达水平均显著低于 DC 组($P<0.01$),其中 DM 组最低,与 DS 组相比,有统计性差异($P<0.05$)。从图 B 可以看出,DC 组血管组织 MDA 水平明显高于 NC 照组($P<0.05$)。8 周干预后,DM 组和 DMS 组血管 MDA 水平均显著低于 DC 组($P<0.05$)。DS 组 MDA 水平低于 DC 组,但没有统计学意义。

2.5 大鼠血清 TNF-α 和 VCAM-1 指标

图 5 显示了大鼠血清炎症标志物浓度水平。从图中可以看出所有糖尿病组 TNF-α 浓度均高于正常对照组,其中,DC 组浓度最高。三个干预组 TNF-α 浓度都有下降的趋势,其中,DS 组明显低于 DC 组($P<0.05$),DMS 组 TNF-α 浓度最低,并显著低于其他三个糖尿病组($P<0.05$, $P<0.01$)。为了进一步了解主动脉血管炎症状态,对大鼠血清 VCAM-1 浓度进行了检测,糖尿病大鼠血清 VCAM-1 浓度明显高于正常对照组($P<0.01$),其中 DC 组最高。DS、DM 和 DMS 组 VCAM-1 水平都明显低于

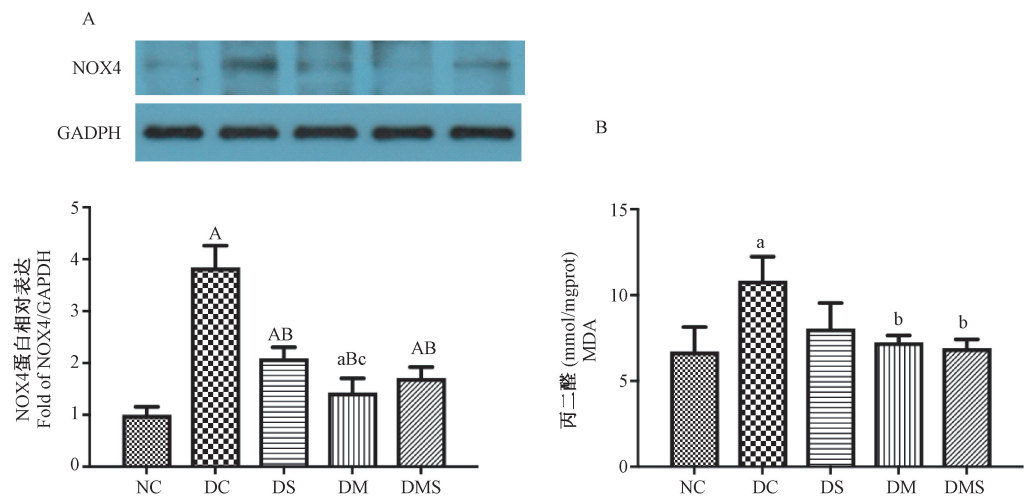


注:A;Nrf2 蛋白表达;B;HO-1 蛋白表达;C;SOD 活性。与 NC 组比较,^a $P<0.05$,^A $P<0.01$;与 DC 组比较,^b $P<0.05$,^B $P<0.01$;与 DS 组比较,^c $P<0.05$,^C $P<0.01$ 。

图 3 大鼠主动脉组织中的 Nrf2、HO-1 蛋白表达和 SOD 活性

Note. A, Protein expression of Nrf2; B, Protein expression of HO-1; C, Activity of SOD. Compared with the NC group, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$. Compared with the DC group, ^b $P<0.05$, ^B $P<0.01$. Compared with the DS group, ^c $P<0.05$, ^C $P<0.01$.

Figure 3 The expression of Nrf2 and HO-1 proteins and activity of SOD in the rat aorta tissues

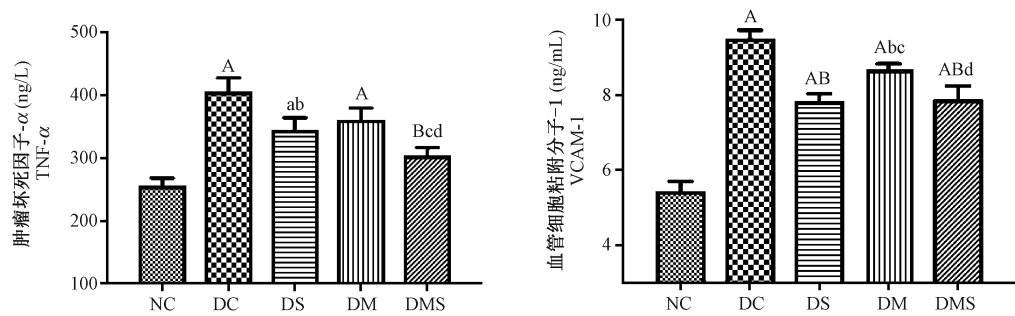


注:A:NOX4 蛋白表达,B:MDA 浓度. 与 NC 组比较,^a $P<0.05$,^A $P<0.01$;与 DC 组比较,^b $P<0.05$,^B $P<0.01$;与 DS 组比较,^c $P<0.05$,^C $P<0.01$ 。

图 4 大鼠主动脉组织中的 NOX4 蛋白表达和 MDA 浓度

Note. A, Protein expression of NOX4. B, Concentration of MDA. Compared with the NC group, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$. Compared with the DC group, ^b $P<0.05$, ^B $P<0.01$. Compared with the DS group, ^c $P<0.05$, ^C $P<0.01$.

Figure 4 Expression of NOX4 protein and concentration of MDA in the rat aorta tissues



注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$,^A $P<0.01$;与 DC 组比较,^b $P<0.05$,^B $P<0.01$;与 DS 组比较,^c $P<0.05$,^C $P<0.01$;与 DM 组比较,^d $P<0.05$,^D $P<0.01$ 。

图 5 大鼠血清 TNF-α 和 VCAM-1 浓度

Note. Compared with the NC group, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$. Compared with the DC group, ^b $P<0.05$, ^B $P<0.01$. Compared with the DS group, ^c $P<0.05$, ^C $P<0.01$.

Figure 5 Serum concentrations of TNF-α and VCAM-1 in the rats

DC 组($P<0.01$, $P<0.05$),其中 DS 和 DMS 组水平明显低于 DM 组($P<0.05$)。

3 讨论

大量的研究表明,有氧运动可以改善糖尿病患者胰岛素抵抗,降低血糖^[7-10],美国糖尿病协会已将运动作为治疗糖尿病的推荐方法^[11]。本实验研究结果显示,二甲双胍和有氧运动均可以降低糖尿病大鼠空腹血糖,但联合干预的控糖效果更为显著。二甲双胍主要是通过抑制肝脏糖异生作用,增加外周组织对胰岛素敏感性来控制血糖。有氧运动可

以增加骨骼肌含量,促进骨骼肌对对血糖的吸收,除此之外,运动过程中肌源性 IL-6 浓度增加能够刺激 GLUT₄ 转运,促进外周组织对葡萄糖的吸收^[12]。二甲双胍与有氧运动联合干预在降低胰岛素水平,提高胰岛素敏感性上的效果要优于单纯二甲双胍或有氧运动的治疗效果,说明二甲双胍和有氧运动可能分别通过不同的信号途径来提高胰岛素敏感性,从而使得联合干预在改善胰岛素敏感性具有叠加效应。

在脉管系统中,氧化应激与许多血管损伤的病理过程有关,过多的 ROS 能够导致血管发生紊乱。

本实验研究显示,二甲双胍和有氧运动均能有效缓解糖尿病大鼠血管内皮损伤,这可能与降低血糖和血管氧化应激有关。NOX4 是心血管系统中 ROS 最主要的来源之一,其主要表达在血管内皮细胞和平滑肌细胞^[13]。在血管内皮细胞中,多种细胞应激包括血流切应力,糖基化蛋白, TNF- α 等都可以上调 NOX4 表达, NOX4 增加反过来损伤内皮细胞^[14]。本实验研究显示,糖尿病对照组大鼠血管 NOX4 蛋白表达比正常组高达接近 3 倍的水平, MDA 浓度也显著高于正常组。8 周二甲双胍和有氧运动干预下调血管 NOX4 蛋白表达水平,同时 MDA 水平也同步下降,说明二甲双胍和有氧运动可能通过降低血管 NOX4 表达以及 MDA 水平来缓解血管氧化应激。二甲双胍同样具有抗氧化功能, Sato 等^[15] 研究显示二甲双胍可以通过抑制 NOX4 来缓解肺纤维化的发展。但本实验研究数据发现,给予二甲双胍处理组大鼠 NOX4 表达明显低于运动组,而运动和联合干预也并没有比二甲双胍干预产生更好的效果,运动可能反而阻碍了二甲双胍的抗氧化效用。这是否与运动激活机体的氧化系统有关,这还需要进行进一步的实验研究。

Nrf2 是维持细胞内氧化还原平衡的重要调节器,与内源性抗氧化反应元件(ARE) 结合,促进下游 NQO1、HO-1、SOD 等抗氧化酶基因的表达^[16]。除此之外, Nrf2 还能通过其下游 HO-1 发挥对血管的保护作用。本实验研究显示,二甲双胍和有氧运动不仅上调糖尿病大鼠血管 Nrf2 蛋白水平,同时还增加了下游因子 HO-1 蛋白表达和 SOD 活性,说明二甲双胍和有氧运动可能激活糖尿病大鼠血管 Nrf2/ARE 信号通路。目前研究已经证明运动能够提高机体抗氧化能力,且许多研究认为运动的抗氧化效应可能是通过 Nrf2 实现的^[17],本研究结果与之前研究较为相似。近年来许多报道显示了二甲双胍的抗氧化特性^[18]。Zhou 等^[19] 研究发现给予 4 周二甲双胍处理能明显上调胰岛素抵抗小鼠肝脏和骨骼肌 Nrf2 及 NQO1 和 HO-1 蛋白表达。因此,可以推测,二甲双胍与有氧运动可能通过激活 Nrf2 信号及下游抗氧化酶基因表达来增加糖尿病大鼠血管抗氧化能力。

氧化应激在许多疾病的发病机制中发挥重要的作用。糖尿病状态下长期高血糖诱导机体产生过多的 ROS,损伤血管内皮细胞,同时激活相关炎症信号通路,促进 VCAM-1 和 TNF- α 等炎症基因的

表达,促使血管发生病变^[20-21]。研究数据显示,二甲双胍和有氧运动均能有效降低糖尿病大鼠血清 TNF- α 和 VCAM-1 浓度。VCAM-1 主要表达于血管组织,是血管炎症的主要标志^[22],说明二甲双胍和有氧运动能够缓解糖尿病大鼠血管炎症。近年来有证据表明,二甲双胍除了具有调节血糖平衡外,还能够降低炎症^[23-24]。长期有氧运动能够促进肌源性 IL-6 的分泌,改善循环血液的抗炎环境^[25]。二甲双胍与有氧运动的抗炎作用主要是通过降低氧化应激途径实现,这与上述的研究结果一致。

综上所述,二甲双胍和有氧运动能够调节糖尿病大鼠血糖代谢平衡,缓解糖尿病大鼠血管氧化应激和炎症反应。二甲双胍和有氧运动可能是通过激活 Nrf2 信号,增加下游抗氧化酶表达,抑制 NOX4 表达,降低 ROS 生成来降低糖尿病大鼠血管氧化应激。

参考文献:

- [1] Odegaard AO, Jacobs JDR Jr, Sanchez OA, et al. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes [J]. Cardiovasc Diabetol, 2016, 15(1):51.
- [2] 潘小康. 二甲双胍降糖机制研究进展 [J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(7): 665-668.
- [3] Golbidi S, Laher I. Exercise and the aging endothelium [J]. J Diabetes Res, 2013, 2013(22):1-12.
- [4] 陈永欣, 韦锦斌. 链脲佐菌素诱导大鼠 2 型糖尿病并发症模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3):63-66.
- [5] Fu X, Song B, Tian GW, et al. The effects of the water-extraction of Astragali radix and Lycopi herba on the pathway of TGF- α -smads-UPP in a rat model of diabetic nephropathy [J]. Pharmacogn Mag, 2014, 10(40):491-496.
- [6] Linden MA, Fletcher JA, Morris EM, et al. Combining metformin and aerobic exercise training in the treatment of type 2 diabetes and NAFLD in OLETF rats [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013, 306:300-310.
- [7] 龚云, 张鑫. 运动对糖尿病大鼠胰岛的影响及其机制探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8):22-27.
- [8] Colberg SR, Sigal RJ, Yardley JE, et al. Physical activity/ exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association [J]. Diabetes Care, 2016, 39(11):2065-2079.
- [9] Colberg SR, Hernandez MJ, Shahzad F. Blood glucose responses to type, intensity, duration, and timing of exercise [J]. Diabetes care, 2013, 36(10):e177.
- [10] Shaban N, Kenno KA, Milne KJ. The effects of a 2 week modified high intensity interval training program on the homeostatic model of insulin resistance (HOMA-IR) in adults with type 2 diabetes [J]. J Sports Med Phys Fitness, 2014, 54(2):203-209.