

·基础研究·

游泳训练对载脂蛋白E基因敲除小鼠过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 及脂代谢酶肉碱棕榈酰转移酶-1、中链酰基辅酶A脱氢酶的影响*

孙垂华¹ 蔡颖¹ 张文亮¹ 谢康玲¹ 刘元¹ 刘遂心^{1,2}

摘要

目的:观察游泳训练对ApoE基因敲除小鼠胰岛素抵抗模型血清游离脂肪酸(FFA)、肝脏组织过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)及肉碱棕榈酰转移酶-1(CPT-1)、中链酰基辅酶A脱氢酶(MCAD)mRNA表达的影响,初步探讨游泳训练改善ApoE基因敲除小鼠胰岛素抵抗(IR)的可能机制。

方法:选取8周雄性ApoE基因敲除小鼠26只,随机分为:高脂运动组(n=13)和高脂静止组(n=13)。高脂运动组小鼠给予高脂饮食加游泳训练12周,高脂静止组除不进行游泳训练外,余同高脂运动组。另以健康雄性C57BL/6J(n=10)小鼠为正常对照组,普通饲料喂养12周。干预12周后,测各组小鼠空腹胰岛素(FIN)、空腹血糖(FPG)、并以HOMA法计算胰岛素抵抗指数(IRI),确定胰岛素抵抗模型建立;全自动生化分析仪测定血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度胆固醇脂蛋白(HDL)、低密度胆固醇脂蛋白(LDL)、游离脂肪酸(FFA)含量;RT-PCR法测肝脏组织中PPAR- γ 、CPT-1、MCAD mRNA表达水平。

结果:运动训练干预12周以后:①与正常对照组相比较,高脂静止组体重显著增加($P < 0.05$);与高脂静止组比较,高脂运动组体重显著下降($P < 0.05$)。②与正常对照组相比较,高脂静止组FIN、FPG、Homa-IRI水平明显升高(P 均 < 0.01);与高脂静止组相比较,高脂运动组FIN、FPG、Homa-IRI明显降低(P 分别 $< 0.05, 0.01, 0.01$)。③与正常对照组相比较,高脂静止组TC、LDL、FFA水平明显升高(P 均 < 0.01);与高脂静止组相比较,高脂运动组TC、LDL、FFA水平明显降低(P 分别 $< 0.05, 0.05, 0.01$),HDL水平明显升高($P < 0.05$)。④与正常对照组相比较,高脂静止组PPAR- γ 、CPT-1、MCAD mRNA表达明显降低(P 均 < 0.01);与高脂静止组相比较,高脂运动组PPAR- γ 、CPT-1、MCAD mRNA表达明显增加(P 均 < 0.01)。

结论:游泳训练可能通过上调肝脏组织PPAR- γ 表达,进而上调CPT-1、MCAD的表达,改善小鼠脂代谢,从而改善ApoE基因敲除小鼠胰岛素抵抗。

关键词 胰岛素抵抗;运动;过氧化物酶体增殖物激活受体- γ ;肉碱棕榈酰转移酶-1;中链酰基辅酶A脱氢酶

中图分类号:R587.1, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-02-0134-05

The effect of swimming exercise on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and carnitine palmitoyl transferase-1, medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase of lipid metabolism in the apolipoprotein E knockout mice/SUN Chuihua, CAI Ying, ZHANG Wenliang, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(2): 134-138

Abstract

Objective: To observe the effects of swimming training on serum free fatty acid (FFA) level and the expressions of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), carnitine palmitoyl transferase-1(CPT-1), medi-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.02.008

*基金项目:湖南省科学技术厅科技计划课题(06FJ4096);湖南省卫生厅科研基金课题(B2006-036)

1 中南大学湘雅医院康复科,长沙,410008; 2 通讯作者

作者简介:孙垂华,男,住院医师; 收稿日期:2012-03-06

um-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase(MCAD) mRNA in the apolipoprotein E(ApoE) knockout mice, and to explore the possible mechanisms of swimming training in improving insulin resistance(IR) of ApoE-null mice.

Method: Twenty-six male ApoE knockout mice were randomly divided into two groups: the high-fat diet group (HFD, n=13) and the high-fat diet group with exercise training (HFD+Ex, n=13). The mice of HFD+Ex group were fed with high-fat diet with exercise training for 12 weeks. The intervention of HFD group was identical to that of HFD+Ex group except swimming training. Ten healthy male C57BL/6J (ND, n=10) mice, as the control group, were fed with normal diet(ND) for 12 weeks. After 12 weeks, the mice were dissected, and the liver tissues were excised off immediately. Serum insulin and glucose were determined, while Homa-IRI was calculated to ascertain the establishment of IR. Serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol(LDL), FFA were determined. The PPAR- γ , CPT-1, MCAD mRNA in liver were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Result: ①Compared with ND group, the body weight of mice of HFD group was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with HFD group, the body weight of mice of the HFD+Ex group was significantly lower ($P < 0.05$). ② Compared with ND group, fasting glucose, insulin and Homa-IRI of HFD group were significantly higher ($P < 0.01$ all). Compared with HFD group, fasting insulin, glucose and Homa-IRI of HFD+Ex group was significantly lower ($P < 0.05, 0.01, 0.01$ separately). ③Compared with ND group, TC, LDL, FFA of HFD group were significantly higher ($P < 0.01$ all). Compared with HFD group, TC, LDL, FFA of HFD+Ex group were significantly lower ($P < 0.05, 0.05, 0.01$ separately), HDL was significantly higher ($P < 0.05$). ④Compared with ND group, the expressions of PPAR- γ , CPT-1, MCAD mRNA of HFD group decreased significantly($P < 0.01$ all). Compared with HFD group, the expressions of PPAR- γ , CPT-1, MCAD mRNA increased significantly($P < 0.01$ all).

Conclusion: Swimming training can improve IR of ApoE-null mice which possibly acts by upregulating the expressions of PPAR- γ , CPT-1 and MCAD mRNA.

Author's address Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008

Key word insulin resistance; exercise; peroxisome proliferators-activated receptor gamma; carnitine palmitoyl transferase 1; medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase

随着人民生活物质水平提高及生活方式的改变,高脂饮食及肥胖发生率越来越普遍,由此伴生的胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)及2型糖尿病、心脑血管疾病等代谢综合征相关疾病已成为全球的流行病。已有的研究表明,运动可以显著改善胰岛素抵抗现象,但关于其复杂的分子机制和信号转导途径仍需进一步研究。近期研究发现,过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ)激活后可以明显改善胰岛素抵抗^[1-3],而控制脂肪酸代谢的关键酶如肉碱棕榈酰转移酶-1(carnitine palmitoyl transferase-1, CPT-1),中链酰基辅酶A脱氢酶(medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase,MCAD)与肝脏组织PPAR- γ 的功能密切相关^[4-6]。本实验试图通过建立高脂饮食诱导载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)基因敲除小鼠胰岛素抵抗模型,探讨游泳训练对小鼠PPAR- γ 、CPT-1和MCAD mRNA表达的

影响和其改善胰岛素抵抗的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组与动物模型的建立

26只健康雄性8周龄ApoE基因敲除小鼠,适应性喂养1周,随机分为高脂运动组和高脂静止组各13只,各组处理方法如下,其中高脂运动组为:采用小鼠游泳训练+高脂饮食喂养(脂肪21%,胆固醇0.21%)。正式运动前给予适应性训练1周。正式运动方案:水温34—36℃,水深38cm。游泳训练总时间为12周,每周运动5d,每天1h,休息2d,每天均在相同时间内游泳训练^[7-8]。高脂静止组:除不进行运动干预外,余同高脂运动组。另以10只健康8周龄C57BL/6J小鼠作为正常对照组,给予普通饮食喂养。

1.2 取材与方法

12周干预后,禁食12h过夜,将小鼠用10%水合氯醛腹腔麻醉,摘眼球采血,分离血清,置于-20℃

冰箱冷保存,以备测定胰岛素、血脂、游离脂肪酸含量。在灭酶条件下快速取出肝脏组织,用0—4℃生理盐水洗去血液,滤纸吸干表面水分,转移至-80℃冰箱保存。

1.2.1 空腹血糖(FPG)、胰岛素(FIN)的测定和胰岛素抵抗指数(IRI)的计算。全自动生化分析仪测空腹血糖,放射免疫法测各组小鼠空腹胰岛素(FIN)。计算胰岛素抵抗指数 IRI (IRI=[FPG(mmol/L) × FIN(μIU/mL)]/22.5),HOMA 法^[9]。

1.2.2 血脂和游离脂肪酸(FFA)的测定。全自动生化分析仪测总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、游离脂肪酸(FFA)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL),按 Friedewald 公式计算低密度脂蛋白胆固醇(LDL):

$$LDL(mmol/L)=TC-HDL-TG/2.2$$

1.2.3 测定肝脏组织中 PPAR-γ、CPT-1、MCAD mRNA 的表达。肝脏组织在液氮中迅速研碎,加入 1ml TRNzol,按照说明抽提总 RNA,紫外分光光度计测定 A260/ A280 比值,检验纯度,A260/ A280 比值在 1.8—2.0 之间。按照逆转录试剂盒上步骤进行逆转录操作。根据 GeneBank 中查得小鼠目的基因 mRNA 序列,再通过 Primer Premier 5 软件设计引物:

PPAR-γ: 上游引物 5'- ACCACTCGCATTCCTTTGAC-3', 下游引物 5'- ATCGCACTTTGCTATTCTTGAG-3';

CPT-1: 上游引物 5' - GACAGAGGCACTTCTCAGCA-3', 下游引物 5'- GCTGCTTGCACATTTGTGTT-3';

MCAD: 上游引物 5'- AGAGTTGGCGTATGGGTGTA-3', 下游引物 5'- GATAACATACTCGTCACCCCTTC-3';

β-actin: 上游引物 5' - AGCTATGAGCTGCCTGACGG-3', 下游引物 5'- CCAGACAGCACTGTGTTGG-3';

GAPDH: 上游引物 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 下游引物 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'。

取 cDNA 4μl 作为模板,依次加入 100μM 的上游和下游引物各 0.5μl, 2 × Taq PCR MasterMix 12.5μl (成分为 0.11U/μl Taq Polymerase, 5000μM dNTP each, 20mM Tris-HCl pH8.3, 100mMKCl, 3mMMgCl₂, 其他稳定剂和增强剂),总反应体系为 10μl。反应条件为: PPAR-γ: 95℃ 预变性 4min, 95℃ 变性 30s, 30℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 35cycles, 72℃ 延伸 8min, 4℃ 保存。CPT-1: 95℃ 预变性

4min, 95℃ 变性 30s, 54℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 35cycles, 72℃ 延伸 8min, 4℃ 保存。MCAD: 95℃ 预变性 4min, 95℃ 变性 30s, 50℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 35cycles, 72℃ 延伸 8min, 4℃ 保存。β-actin: 95℃ 预变性 4min, 95℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 35cycles, 72℃ 延伸 8min, 4℃ 保存。GAPDH: 95℃ 预变性 4min, 95℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 35cycles, 72℃ 延伸 8min, 4℃ 保存。2.5% 琼脂糖凝胶中加入溴乙锭(10mg/ml)使其终浓度为 0.5μg/ml, 成胶后置于电泳槽,加入 0.5 × TBE 缓冲液,取 5μl PCR 产物与 1μl 载样缓冲液混匀点样,在 60V 恒压下电泳 40min。TANON GIS2020 凝胶分析仪数码拍照,运用 Image-proplus 6.0 版图像分析软件对结果进行半定量分析。

1.3 统计学分析

所有数据用 SPSS 16.0 统计软件处理,数据均以均数 ± 标准差表示。数据方差齐性用 Levene 检验, P 值 > 0.05 认为方差齐。两样本均数比较采用独立样本 t 检验统计。多样本均数比较采用单因素方差分析和重复测量数据的两因素多水平方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。PPAR-γ、CPT-1、MCAD 为相对光密度值,采用 q 检验, P 值 < 0.05 认为差异有显著性意义(其中胰岛素抵抗指数呈偏态分布,经对数转换后再行统计分析)。

2 结果

2.1 游泳训练对小鼠体重的影响

干预开始时,正常对照组、高脂运动组及高脂静止组小鼠体重无差异;12 周干预后,高脂静止组较正常对照组明显增加 (P < 0.05),高脂运动组较高脂静止组明显降低 (P < 0.05),与正常对照组无明显差异(表 1)。

2.2 游泳训练对小鼠空腹血糖、胰岛素和 Ln Homa-IRI 的影响

干预 12 周以后,与正常对照组相比较,高脂静

表 1 12 周干预前后各组小鼠体重比较 (x̄ ± s, g)

组别	例数	干预前体重	干预后体重
正常对照组	10	18.8 ± 2.4	26.8 ± 2.5
高脂静止组	13	19.0 ± 2.3	32.0 ± 3.0 ^①
高脂运动组	13	18.9 ± 2.6	27.1 ± 2.4 ^②

与正常对照组比较:①P < 0.05;与高脂静止组比较:②P < 0.05

止组 FIN、FPG 和 Ln Homa-IRI 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与正常对照组比较, 高脂运动组 Ln Homa-IRI 明显升高 ($P < 0.01$), 而与高脂静止组相比较, 高脂运动组 FIN、FPG 和 Ln Homa-IRI 水平则明显降低 (P 分别 < 0.05 、 0.01 、 0.01)。见表 2。

2.3 游泳训练对血脂和游离脂肪酸的影响

与正常对照组相比较, 高脂静止组 TC、LDL、FFA 水平明显升高 (P 均 < 0.01); 与高脂静止组相比较, 高脂运动组 TC、LDL、FFA 水平明显降低 (P 分别

< 0.05 、 0.05 、 0.01), HDL 水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 游泳运动对肝脏组织中 PPAR- γ 、CPT-1 和 MCAD mRNA 表达的影响

12 周游泳运动干预后, 与正常对照组相比较, 高脂静止组 PPAR- γ 、CPT-1、MCAD mRNA 表达明显降低 (P 均 < 0.01); 与高脂静止组相比较, 高脂运动组 PPAR- γ 、CPT-1、MCAD mRNA 表达明显增加 (P 均 < 0.01), 见表 4, 图 1—3。

表 2 各组小鼠空腹胰岛素、空腹血糖、胰岛素抵抗指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FIN(mmol/L)	FPG(mmol/L)	Homa-IRI	Ln Homa-IRI
正常对照组	10	5.41 ± 2.42	6.91 ± 1.02	1.69 ± 0.87	0.04 ± 0.06
高脂静止组	13	11.98 ± 2.47 ^①	8.94 ± 1.41 ^①	4.80 ± 1.28	1.52 ± 0.32 ^①
高脂运动组	13	8.54 ± 3.50 ^③	6.39 ± 0.66 ^④	2.40 ± 0.95	0.93 ± 0.24 ^{②⑤}

高脂静止组与正常对照组比较: ① $P < 0.01$; 高脂运动组与正常对照组比较: ② $P < 0.01$; 高脂运动组与高脂静止组比较: ③ $P < 0.05$; ④ $P < 0.01$; ⑤ $P < 0.01$

表 3 各组小鼠血脂和 FFA 比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	例数	TC	TG	HDL	LDL	FFA
正常对照组	10	2.14 ± 0.37	0.53 ± 0.12	2.01 ± 0.35	0.48 ± 0.23	1.00 ± 0.24
高脂静止组	13	19.38 ± 4.15 ^①	0.85 ± 0.44	1.50 ± 0.89	3.46 ± 1.02 ^①	1.36 ± 0.27 ^①
高脂运动组	13	13.27 ± 3.37 ^②	0.65 ± 0.18	3.75 ± 2.04 ^④	3.08 ± 0.86 ^②	1.08 ± 0.20 ^③

高脂静止组与正常对照组比较: ① $P < 0.01$; 高脂运动组与高脂静止组比较: ② $P < 0.05$; ③ $P < 0.01$; ④ $P < 0.05$

表 4 各组肝脏组织中 PPAR- γ 、CPT-1、MCAD mRNA 表达相对值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PPAR- γ	CPT-1	MCAD
正常对照组	10	1.46 ± 0.17	1.57 ± 0.23	1.15 ± 0.12
高脂静止组	13	1.03 ± 0.24 ^①	1.07 ± 0.18 ^①	0.68 ± 0.18 ^①
高脂运动组	13	1.92 ± 0.48 ^②	1.84 ± 0.31 ^②	1.94 ± 0.45 ^②

高脂静止组与正常对照组比较: ① $P < 0.01$; 高脂运动组与高脂静止组比较: ② $P < 0.01$

图 1 各组小鼠肝脏组织 PPAR- γ mRNA 表达

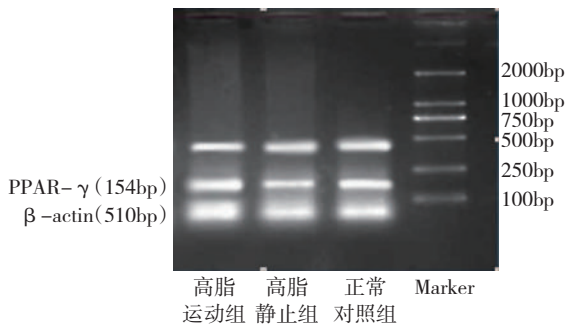


图 2 各组小鼠肝脏 CPT-1 mRNA 表达

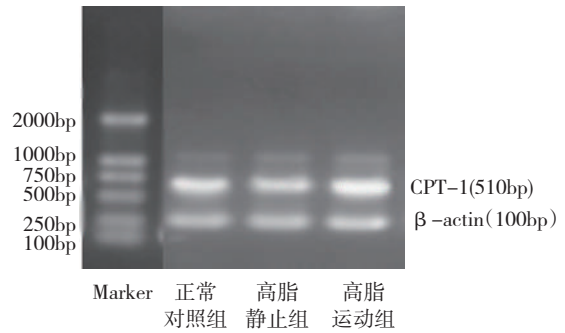
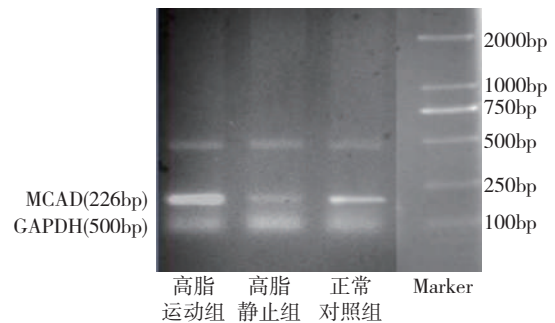


图 3 各组小鼠肝脏组织 MCAD mRNA 表达



3 讨论

目前血脂代谢障碍以及体内脂类代谢产物异常堆积被认为是引发 IR 的重要原因。大量研究发现游离脂肪酸及脂类代谢产物的累积可抑制外周葡萄

糖摄取氧化^[10],干扰胰岛素信号传导的多个环节^[11];游离脂肪酸还可促进肝糖异生等,从而诱导IR形成。本实验采用高脂饮食诱导ApoE基因敲除小鼠,构造胰岛素抵抗模型,结果显示高脂静止组较正常对照组空腹血糖和胰岛素水平、Homa-IRI均显著增加(P 均 <0.01),且高脂静止组的胆固醇(TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、游离脂肪酸显著高于正常对照组(P 均 <0.01),具备了高血糖、高胰岛素血症和高血脂等IR的基本特征,表明胰岛素抵抗模型造模成功。同时对高脂运动组的结果观察显示其较高脂静止组小鼠体重减轻,TC、FFA降低,HDL升高,空腹血糖、空腹胰岛素水平下降,血脂代谢紊乱得到改善,胰岛素抵抗指数降低。结果表明游泳训练可能通过降低体重、改善脂代谢紊乱来改善胰岛素抵抗。

PPAR- γ 是由Issemn等发现的一种由配体调节的核激素受体,近期研究表明PPAR- γ 在脂代谢中起着至关重要的调节作用,可促进脂肪分解代谢和脂肪燃烧,被称为“能量平衡的感受器,可预防饮食性和遗传性肥胖”^[12]。我们前期的研究^[13]表明运动可以上调肝脏组织PPAR- γ 的表达。本研究进一步结果显示,高脂运动组小鼠肝脏组织PPAR- γ mRNA的表达水平明显高于高脂静止组,表明游泳训练可以使PPAR- γ mRNA的表达水平增加,结合我们研究中高脂运动组TC、FFA、胰岛素抵抗指数降低结果,这提示游泳训练改善IR的机制可能是通过上调PPAR- γ mRNA的表达来实现的。其机制可能与调节众多与脂代谢相关基因的表达有关^[14];还能通过促进PI-3K亚单位P85的表达^[15]来增强胰岛素信号转导,从而改善胰岛素抵抗等。

脂肪酸氧化过程中,CPT-1是一种限速酶,催化脂肪酸转运至线粒体进行 β 氧化。CPT-1位于线粒体外膜,在能量代谢中起关键作用。MCAD是中链脂肪酸 β 氧化第一步的关键酶,在脂肪酸 β 氧化中具有重要地位,脂肪酸氧化增强,MCAD表达增高,选用MCAD可以直接反映脂肪酸 β 氧化变化。CPT-1及MCAD受许多蛋白酶的调节作用,其中,PPAR- γ 的调节作用受到重视,研究表明PPAR- γ 上调后可以进一步诱导CPT-1、MCAD的表达,进而增加脂肪酸的 β 氧化^[4-6]。在我们的实验中,12周运

动训练后,高脂运动组CPT-1和MCAD的表达有明显升高。由此推测,运动可能通过上调PPAR- γ mRNA的表达,增加CPT-1和MCAD的表达,提高了机体对脂肪酸的利用,增强了机体的对脂肪酸氧化能力,改善了脂代谢紊乱,改善胰岛素抵抗。

综上所述,经12周游泳训练后,高脂运动组小鼠脂代谢紊乱得到明显改善,胰岛素抵抗明显减轻,高脂运动组肝脏PPAR- γ 、CPT和MCAD表达显著提高,推测游泳训练改善小鼠胰岛素抵抗机制可能与游泳训练激活肝脏组织PPAR- γ 的表达,从而上调CPT-1和MCAD的表达,增加机体对脂肪酸的利用,改善脂代谢有关。

参考文献

- [1] Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al. 15-Deoxy- δ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma[J]. Cell, 1995, 83(5):803—812.
- [2] Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)[J]. J Biol Chem, 1995, 270(22):12953—12956.
- [3] Hammarstedt A, Andersson CX, Rotter Sopasakis V, et al. The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005, 73(1):65—75.
- [4] Pellioux C, Aasum E, Larsen TS, et al. Overexpression of angiotensinogen in the myocardium induces downregulation of the fatty acid oxidation pathway[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 41(3):459—466.
- [5] Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism[J]. Circ Res, 2003, 92(5): 518—524.
- [6] Gulick T, Cresci S, Caira T, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(23):11012—11016.
- [7] 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(6 Pt 1):E778—786.
- [8] Freimann S, Scheinowitz M, Yekutieli D, et al. Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression[J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(6):931—938.

(下转第153页)