



有氧运动加谷氨酰胺补充对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌炎症因子 NF- κ B、MPO 及 MCP-1 基因表达的影响

Effect of Aerobic Exercise plus Glutamine Supplement on Expression of Muscle NF- κ B, MPO and MCP-1 mRNA of Type 2 Diabetes

付德荣¹, 孙小华¹, 刘承宜², 廖八根³, 李鹏博², 田祯祥²

FU De-rong¹, SUN Xiao-hua¹, LIU Cheng-yi²,

LIAO Ba-gen³, LI Peng-bo², TIAN Zhen-xiang²

摘要:目的:观察长期有氧运动联合谷氨酰胺(Gln)补充对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠骨骼肌炎症因子核转录因子- κ B(NF- κ B)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、髓过氧化物酶(MPO)基因表达及空腹血糖(FBG)、血胰岛素(ISN)及胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的影响。方法:将雄性 Sprague-Dawley 大鼠 60 只(179.8 ± 19.2 g)随机分为健康对照组(C 组, 26 只)和糖尿病造模组(D 组, 34 只)。对照组普通饲料喂养, 糖尿病组高脂喂养。4 周后糖尿病组大鼠腹腔注射 35 mg/kg 链脲佐菌素诱导 T2DM。成模后两组进一步随机分为:安静组(CQ, DQ)、运动组(CE, DE)、Gln 组(CG, DG)、运动加 Gln 组(CEG, DEG)。运动组大鼠进行 6 周游泳运动。Gln 组改用含 2% (w/w) L-Gln 饲料喂养。腹主动脉取血测 FBG、ISN 及 GLP-1 水平, 腓肠肌测 NF- κ B、MPO 及 MCP-1 的 mRNA 的表达。结果:安静状态下 T2DM 大鼠(DQ)骨骼肌 NF- κ B、MCP-1 及 MPO 的 mRNA 表达量及血 FBG 值显著高于对照组(CQ), 血 ISN 和 GLP-1 水平明显低于对照组。6 周游泳运动(DE)或 Gln 补充(DG)可明显降低 T2DM 大鼠骨骼肌 NF- κ B、MCP-1 及 MPO 的 mRNA 表达和血 FBG 水平, 并增加 ISN 及 GLP-1 水平。6 周游泳运动联合 Gln 补充(DEG)时, 降低 T2DM 大鼠骨骼肌 NF- κ B mRNA 表达的效应显著高于单纯 Gln 补充组(DG), 但与单纯运动组(DE)相似; 对 MCP-1 mRNA 的抑制与单纯 Gln 补充组(DG)相似, 但明显高于单纯运动组(DE); 对 MPO mRNA 表达的影响与单纯运动组(DE)或单纯 Gln 补充组(DG)相似; 降低 FBG 水平、增加 GLP-1 的作用较单纯运动组(DE)或 Gln 补充组(DG)明显, 增加 ISN 的效应与单纯运动组(DE)或 Gln 补充组(DG)相似。结论:长期有氧运动或 Gln 补充明显抑制 T2DM 大鼠骨骼肌炎症因子 NF- κ B、MPO 及 MCP-1 的基因表达, 增加 GLP-1 及 ISN 的分泌量, 降低 FBG 值。当运动联合 Gln 补充时, 降低 T2DM 骨骼肌炎症因子产生、升高 GLP-1 及降低 FBG 的效应较运动或 Gln 单因素作用时明显, 对 ISN 分泌的影响与单纯运动或 Gln 补充相似。

关键词:2 型糖尿病; 运动; 谷氨酰胺; 胰高血糖素样肽-1; 炎症因子; 胰岛素; 鼠; 动物实验

Abstract: Objective: To investigate the effects of aerobic exercise or/and glutamine (Gln) supplement on expression of muscle nuclear factor- κ B (NF- κ B), myeloperoxidase (MPO) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA, as well as serum level of fasting blood-glucose (FBG), insulin (ISN) and of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Methods: Sixty male Sprague-Dawley (SD) rats (179.8 ± 19.2 g) were randomly divided into control group (C, n=26) and diabetic group (D, n=34). After 4 weeks of regular diet or high fat diet respectively, the rats in the diabetic group were injected intraperitoneally with streptozotocin (35 mg/kg) to induce the T2DM model, as soon as the model was induced, the rats in each group were further divided into 4 groups: quiet group (CQ, DQ), exercise group (CE, DE), Gln group (CG, DG), exercise plus Gln group (CEG, DEG). The rats in exercise groups performed swimming for 6 weeks, in Gln groups fed with 2% (w/w) L-Gln for 6 weeks. Abdominal aorta blood was harvested for testing FBG, ISN and GLP-1, gastrocnemius muscle for muscle NF- κ B, MPO and MCP-1 mRNA. Results: T2DM rats without exercise (DQ) had more expression of NF- κ B, MCP-1 and MPO mRNA, higher FBG and lower ISN and GLP-1 than control group (CQ). 6 weeks swimming (DE) or Gln supplement (DG) significantly reduced the expression of NF- κ B, MCP-1 and MPO mRNA and blood FBG level, and increased ISN and GLP-1 level. 6 weeks swimming combined with Gln supplement (DEG) significantly reduced the expression of NF- κ B mRNA more than Gln supplement (DG), but similar to exercise group (DE); the inhibition of MCP-1 mRNA expression was similar to Gln supplement (DG), but significantly higher than exercise group (DE); the effect of MPO mRNA expression was similar to exercise group (DE) or Gln supplement (DG); the reduction of FBG level and increase of GLP-1 effect was more than exercise group (DE) or Gln supplement (DG) obvious, the effect of increasing ISN was similar to exercise group (DE) or Gln supplement (DG). Conclusion: Long-term aerobic exercise or Gln supplement significantly inhibited the expression of NF- κ B, MPO and MCP-1 gene expression, increased GLP-1 and ISN secretion, reduced FBG value. When exercise combined with Gln supplement, the effect of reducing T2DM skeletal muscle inflammation factor production, increasing GLP-1 and reducing FBG was more than exercise or Gln single factor effect, the effect of ISN secretion was similar to exercise or Gln supplement.

obviously decreased NF- κ B, MCP-1 and MPO mRNA and FBG level and increased ISN and GLP-1 in T2DM rats. Effect of swimming plus Gln supplement(DEG) showed more suppression on NF- κ B mRNA expression of T2DM than the sole Gln supplement (DG), and similar to the sole exercise (DE); on MCP-1 mRNA showed similar effects as sole Gln supplement (DG), but stronger than sole exercise (DE); on MPO mRNA showed similar effects as either sole exercise(DE) or sole Gln supplement (DG); on FBG and GLP-1 showed effects more than either sole exercise(DE) or sole Gln supplement(DG), on ISN showed similar effects as sole exercise(DE) or sole Gln supplement(DG). Conclusion: Chronic aerobic exercise or Gln supplement obviously reduced expression of NF- κ B, MPO and MCP-1 mRNA and FBG level, increased GLP-1 and ISN level of T2DM. Combination of swimming and Gln supplement showed stronger effects on decreasing inflammatory cytokines and FBG, increasing GLP-1 of T2DM than either sole swimming or sole Gln supplement, but on ISN the combination showed no more effects.

Key words: type 2 diabetes mellitus; exercise; glutamine; glucagon-like peptide 1; inflammatory cytokines; insulin

中图分类号: G804.7 文献标识码: A

糖尿病是继心脑血管疾病、肿瘤之后严重危害人类健康的第三大类疾病。胰岛素(Insulin, INS)抵抗和/或分泌缺陷是 2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)的基本病因。骨骼肌是 INS 作用的主要靶组织,其占人体重量的 40%~50%,正常情况下,75%以上的 INS 介导的糖代谢由骨骼肌完成^[30]。近年研究发现,骨骼肌的慢性炎症与 INS 抵抗和 T2DM 的发生密切相关^[30,33]。肥胖或糖尿病患者,骨骼肌通过旁分泌、自分泌及内分泌的效应产生肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)等多种炎症介质,引发骨骼肌慢性炎症反应。TNF- α 、NF- κ B 及 MCP-1 等介质通过直接或间接效应抑制 INS 信号通路,导致糖的转运和利用障碍^[25,30],后者又促进 INS 抵抗和 T2DM 病情发展,进一步加重骨骼肌的炎症程度,形成恶性循环。

谷氨酰胺(glutamine, Gln)是人体免疫细胞的主要能源底物,也是体内大多数细胞的能源物质,主要在骨骼肌合成并 95%以上储存在骨骼肌^[12,15,29]。作为谷胱甘肽(glutathione, GSH)的前体, Gln 补充可提高体内 GSH 含量,增加机体抗氧化能力,抑制 NF- κ B 的活性,降低活性氧的产生,降低中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)对组织的浸润^[15]。同时,补充 Gln 还可增加正常人、肥胖及 T2DM 患者循环中血清胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)的水平^[6]。GLP-1 是一种快速强力刺激餐后 INS 释放的肠道激素, GLP-1 刺激 INS 分泌的形式呈血糖依赖性^[5],并抑制胰高血糖素的分泌和胃的排空^[3,6],发挥降血糖效应。肥胖及 T2DM 患者体内 Gln 减少^[13,31]。

有氧运动是预防和治疗糖尿病的基础。运动在降低体脂的同时可改善骨骼肌质量,增加骨骼肌糖脂代谢的关键调节物葡萄糖转运体蛋白-4(Glucose transporter isoform

4, GLUT4)及过氧化物酶激活体 γ 共激活物-1(peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1, PGC-1)的表达,加速糖脂代谢;提高抗氧化酶黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)、GSH、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等的含量,增强抗氧化能力^[26];促进骨骼肌抗炎因子白介素 6(interleukin-6, IL-6)^[7,32]和 NF- κ B 抑制蛋白(protein inhibitor κ B, I κ B)的表达^[24], IL-6 强烈抑制 TNF- α 表达^[7,32], I κ B 抑制 NF- κ B 活性^[24],减轻骨骼肌炎症反应程度;增加 GLP-1 的分泌量^[11],降低血糖。运动量即运动强度乘运动时间对 T2DM 患者的治疗至关重要。大运动量可显著增加 INS 的敏感性,降低糖基化血红蛋白浓度,而低运动量无效^[20]。

鉴于以上情况,本研究设想给予 T2DM 大鼠长期有氧运动联合 Gln 补充,对改善骨骼肌慢性炎症状态、降低血糖、提高 GLP-1 及 INS 水平将起协同效应,而目前有关这方面的研究尚未见报道。因此,本研究拟定 T2DM 大鼠进行 6 周的无负重游泳运动,同时饲料中添加 2% Gln,探讨

收稿日期:2012-10-12; 修订日期:2012-11-26

基金项目:广东省科技计划项目基金资助(2009B060700063)、(2012B031600001);广东省自然科学基金资助项目(S2011010001160)。

作者简介:付德荣(1968-),女,河南信阳人,主治医师,博士,主要研究方向为体育运动与女性健康, E-mail: 845592214@qq.com;孙小华(1962-),男,山西大同人,研究员,博士,主要研究方向为运动损伤防护, E-mail: sunhouse33@126.com;刘承宜(1963-),男,四川大竹人,教授,博士,博士研究生导师,主要研究方向为功能内稳态的机制及其在体育科学、生物医学和激光医学中的应用, Tel: (020) 85213369, E-mail: liutcy@scau.edu.cn。

作者单位:1. 广东体育职业技术学院,广东 广州 510663;2. 华南师范大学,广东 广州 510006;3. 广州体育学院,广东 广州 510500

1. Guangdong Vocational Institute of Sport, Guangzhou 510663, China; 2. South China Normal University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangzhou Sport University, Guangzhou 510500, China.

有氧运动及 Gln 补充联合作用时对 T2DM 大鼠 空腹血糖 (fasting blood-glucose FBG)、INS、GLP-1 及骨骼肌炎症因子 NF-κB、MPO 及 MCP-1 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠 60 只(广州中医药大学实验中心提供),179.8±19.2 g,3~4 只/笼,在温度 23℃±2℃、湿度 50%±5%、明暗周期各 12 h(8:30~20:30 光照)的动物房内饲养。

1.2 实验方案

所有大鼠 1 周适应性饲养后随机分为健康对照组(C 组,26 只,212.8±10.9 g)和糖尿病造模组(D 组,34 只,220.4±25.6 g),两组大鼠体重差异无显著性。C 组给予普通饲料(标准啮齿类动物饲料)饲养,D 组给予高脂膳食

(猪油 10%,蛋黄粉 8%,蔗糖 20%,胆酸钠 0.1%,基础饲料 61.9%)。饲养 4 周后 D 组大鼠一次性腹腔注射 35 mg/kg 链脲佐菌素(streptozotocin STZ, sigma),72 h 后尾静脉取血测大鼠 FBG 值,血糖≥16.7 mmol/L 为 T2DM 成模标准,血糖≤16.7 mmol/L 再补充 15 mg/kg 腹腔注射,3 日后 4 只未成模大鼠剔除。

造模成功后两组大鼠再进一步随机分为:安静组(CQ,DQ)、运动组(CE,DE)、Gln 组(CG,DG)、运动加 Gln 组(CEG,DEG)(表 1)。运动组大鼠进行游泳运动(水温 30℃±2℃),第 1 周前 3 日 15 min/次,后 3 日 30 min/次,第 2 周前 3 日 45 min/次,后 3 日 60 min/次,第 3~6 周 60 min/次,6 次/周。运动过程中如有疲劳现象(数秒内未迅速浮上水面),即刻拿出休息 5~10 min,恢复后再继续完成训练时间。Gln 组大鼠饲料添加 2%(w/w)的 L-Gln。

表 1 本研究大鼠分组一览表
Table 1 Groups of Animals

	运动方式 training	饲料 food	n number
健康安静组(CQ)	不运动	普通饲料	6 只
健康 Gln 组(CG)	不运动	普通饲料+2%Gln	6 只
健康运动组(CE)	6 周游泳运动	普通饲料	7 只
健康运动+Gln 组(CEG)	6 周游泳运动	普通饲料+2%Gln	7 只
糖尿病安静组(DQ)	不运动	高脂饲料	7 只
糖尿病 Gln 组(DG)	不运动	高脂饲料+2%Gln	7 只
糖尿病运动组(DE)	6 周游泳运动	高脂饲料	8 只
糖尿病运动+Gln 组(DEG)	6 周游泳运动	高脂饲料+2%Gln	8 只

1.3 取材

第 6 周训练结束 48 h 后对所有大鼠进行取材。训练过程中大鼠溺水死亡 3 只,疾病死亡 2 只(DE 组 1 只,肠腔多发肿瘤;DEG 组 1 只,颈部脓肿。考虑为糖尿病免疫低下所致),自然死亡 1 只(CEG 组,未见任何异常)。取材前大鼠禁食 12 h,禁水 4 h。10%水合氯醛腹腔注射麻醉后腹主动脉取血,分离血清后-80℃保存。迅速剥离双侧腓肠肌内侧头,取中 1/3 段,剔除表层筋膜及与之相连的浅层肌肉,然后入液氮备用。

1.4 检测指标

1.4.1 血液指标

FBG 采用 Super GLUCOTM 血糖仪测定;INS 及 GLP-1 采用酶联免疫法测定(试剂盒购自上海蓝基生物科技有限公司 ShangHai BlueGene Biotech CO.,LTD)。

1.4.2 基因表达

采用实时定量 PCR(real-time PCR)检测骨骼肌 NF-κB、MPO 及 MCP-1 mRNA 的表达。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。目的基因 NF-κB:Forward primer CTC AAG AAC AGC AAG GCA AGC AC,Reverse primer AGA GGT GTC GTC CCA TCG TTA GG G。目的基因 MPO:

Forward primer CCC ATC CAC CAT GCT TTA TTA G,Reverse primer ACA ACA CTG GCA TCA CTA CCG T。目的基因 MCP-1:Forward primer ATG CAG TTA ATG CCC CAC TC,Reverse primer TTC CTT ATT GGG GTC AG CAC。内参基因 18S rRNA:Forward primer CAT TCG AAC GTC TGC CCT ATC A,Reverse primer GGG TCG GGA GTG GGT AAT TTG。

RNA 抽提:1)50 mg 骨骼肌中加入预冷的 1 ml Trizol reagent,充分匀浆。2)冰上静置 5 min,加入 0.2 ml 氯仿,剧烈震荡 15 sec,冰上放置 10 min。3)4℃ 12 000 g 离心 15 min。4)上清液转移 1.5 mlEP 管中,加入 0.5 ml 异丙醇,混匀,室温静置 10 min。5)4℃ 12 000 g 离心 10 min。6)弃上清,加入 1 ml 75%乙醇溶液(DEPC 水配制)洗涤沉淀。7)4℃ 7500 g 离心 5 min。8)弃去乙醇,室温干燥 15 min,加入 30 μL DEPC 处理水溶解。

cDNA 第一链合成:1)取总 RNA 1μg,按反转录试剂盒(Takara PrimeScriptTM RT reagent Kit)操作指南依次加入 5xPrimeScriptTM Buffer 2 μL,PrimeScriptTM RT Enzyme MixI 0.5 μL,Oligo dT Primer (50 μM) 0.5 μL,Random 6 mers (100 μM) 0.5 μL,RNase Free dH₂O 补足 10 μL。2)

反应条件:37℃ 15 min,85℃ 5 min。cDNA 产物-80℃保存。

PCR 扩增:按荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II)操作指南配制 PCR 反应液,总体系为 25 μL;SYBR® Premix Ex Taq™ II (2x)12.5 μL,PCR Forward Primer (10 μM) 1 μL,PCR Reverse Primer (10 μM) 1 μL,cDNA 1 μL,补 ddH₂O 至 25 μL。

PCR 循环条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 10 sec;60℃ 退火 20 sec;72℃ 延伸 15 sec;共 35~38 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。

1.5 统计学分析

所有实验数据用 SPSS 17.0 软件进行处理。数据用均数±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。资料先用固定模型多因素方差分析检查高脂饮食、Gln 补充与运动之间的主效应及三者间的交互影响。如有交互影响则分别在固定单因素或双因素水平后用独立样本 *t* 检验检查另一因素的效应;如有主效应但无交互影响则进一步用单因素方差分析组间差异。差异具显著性水平 $P < 0.05$,差异具非常显著性水平 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 大鼠 FBG、GLP-1 及 INS 的变化

2.1.1 大鼠 FBG 的变化

高脂膳食、运动及谷氨酰胺补充对大鼠 FBG 均有明显影响作用,且高脂膳食与 Gln 补充、高脂与运动间存在交互影响。长期高脂喂养的 DQ 组大鼠 FBG 值显著高于普通饲料喂养 CQ 组大鼠。长期游泳运动可明显降低 CE 组

和 DE 组大鼠的 FBG。长期 Gln 补充显著降低 DG 组大鼠 FBG 值,但对 CG 组大鼠 FBG 影响不明显。运动联合 Gln 补充时,可显著降低 DEG 组大鼠 FBG 值,并较单纯运动(DE 组)或 Gln 补充(DG 组)时明显,但对 CEG 组大鼠 FBG 影响不明显(表 2)。

2.1.2 大鼠血 GLP-1 的变化

高脂膳食、运动及谷氨酰胺对大鼠血清 GLP-1 均有明显影响作用,且相互间有明显交互影响。高脂喂养的 DQ 组大鼠血清 GLP-1 水平显著低于普通饲料喂养的 CQ 组大鼠。长期游泳运动明显增加 DE 组大鼠 GLP-1 浓度,对 CE 组大鼠 GLP-1 影响不明显。长期 Gln 补充明显增加 DG 组大鼠 GLP-1 水平,对 CG 组大鼠 GLP-1 无明显影响作用。当运动联合 Gln 补充时,可显著增加 CEG 组和 DEG 组大鼠的 GLP-1 水平,对 DEG 组大鼠的影响较单纯运动(DE 组)或 Gln 补充(DG 组)时显著,对 CEG 组大鼠的影响较单纯 Gln 补充(CG 组)时显著,与单纯运动(CE 组)时比较差异不明显(表 2)。

2.1.3 大鼠血 INS 水平的变化

有氧运动、Gln 补充及高脂膳食对大鼠空腹 INS 均有明显影响作用,但三者间无明显交互影响。DQ 组大鼠空腹 INS 水平显著低于 CQ、CE、CG 及 CEG 组大鼠。长期游泳运动明显升高 DE 组和 CE 组大鼠的 INS 水平。长期 Gln 补充显著升高 DG 组大鼠 INS 水平,对 CG 组大鼠影响不明显。运动联合 Gln 补充时,显著增加 DEG 组大鼠的 INS 水平(显著高于 DQ 组),与单纯运动(DE 组)或 Gln 补充(DG 组)比较有进一步增加的趋势,但差异不显著。二者联合对正常组 CEG 组大鼠 INS 水平的影响不明显(表 2)。

表 2 本研究 6 周游泳运动及 Gln 补充对大鼠血 INS、GLP-1 及 FBG 的影响一览表

Table 2 Effects of 6 Weeks Swimming and Glutamine Supplement on Blood INS、GLP-1 and FBG of Rats

	空腹血糖 FBG(mmol/L)	胰高血糖素样肽-1 GLP-1(ng/ml)	胰岛素 INS (ng/ml)
CQ 组(n=6)	7.32±1.03	0.79±0.07	1.89±0.19
CG 组(n=6)	7.55±1.87	0.79±0.03	2.12±0.33
CE 组(n=6)	7.13±1.28 [#]	0.88±0.08	2.25±0.49 [#]
CEG 组(n=6)	7.91±2.52	1.08±0.28 ^{#*}	2.20±0.30
DQ 组(n=6)	22.91±1.03 [#]	0.62±0.11 [#]	1.42±0.10 ^{#**★★*}
DG 组(n=6)	20.11±1.39 ^{△△*}	1.28±0.28 ^{△△*}	1.73±0.15 ^{★★*}
DE 组(n=6)	18.48±1.25 ^{△△*}	1.32±0.16 ^{★★△△}	1.74±0.13 ^{★★*}
DEG 组(n=6)	16.71±1.20 ^{△△◇☆☆*}	1.78±0.14 ^{△△◇◇☆☆*}	1.97±0.17 ^{△△}

注:与 CQ 组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与 CG 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 CE 组比较,[★] $P < 0.05$,^{★★} $P < 0.01$;与 CEG 组比较,[※] $P < 0.05$,^{※※} $P < 0.01$;与 DQ 组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与 DG 组比较,[☆] $P < 0.05$,^{☆☆} $P < 0.01$;与 DE 组比较,[◇] $P < 0.05$,^{◇◇} $P < 0.01$ 。

2.2 大鼠骨骼肌 NF-κB、MPO 及 MCP-1 mRNA 的表达

2.2.1 大鼠骨骼肌 NF-κB mRNA 的表达

长期高脂喂养的 T2DM 组大鼠骨骼肌 NF-κB mRNA 的表达显著高于正常组大鼠。长期游泳运动对 DE 组大鼠和 CE 组大鼠骨骼肌 NF-κB mRNA 表达均呈明显抑制效应。长期 Gln 补充显著抑制 DG 组大鼠 NF-κB mRNA 的表

达,对 CG 组无明显影响。运动联合 Gln 补充降低 DEG 组大鼠骨骼肌 NF-κB mRNA 表达的效应显著高于单纯 Gln 补充(DG 组)的作用,但与单纯运动(DE 组)比较差异不显著。二者联合对 CEG 组大鼠骨骼肌 NF-κB mRNA 表达的影响与单纯运动(CE 组)或单纯 Gln 补充(CG 组)比较无差异。单纯运动(CE 组和 DE 组)与单纯 Gln 补充(CG 组

和 DG 组)比较,对大鼠骨骼肌 NF-κB mRNA 的表达影响无明显差异(表 3)。

2.2.2 大鼠骨骼肌 MPO mRNA 的表达

运动、Gln 补充及高脂膳食对大鼠骨骼肌 MPO mRNA 的表达均有显著影响作用,且三者间存在交互影响。高脂喂养的 DQ 组大鼠骨骼肌 MPO mRNA 的表达显著高于正常喂养的 CQ 组大鼠。长期有氧运动或 Gln 补充均可明显降低 T2DM 大鼠(DE 组与 DG 组)及正常大鼠(CE 组和 CG 组)骨骼肌 MPO mRNA 的表达量,运动联合 Gln 补充对 CEG 组和 DEG 组大鼠 MPO mRNA 表达的影响与单纯运动(CE 组和 DE 组)或单纯 Gln 补充(CG 组和 DE 组)时相似(表 3)。

2.2.3 大鼠骨骼肌 MCP-1 mRNA 的表达

运动、Gln 补充及高脂膳食对大鼠骨骼肌 MCP-1 mRNA 的表达均有显著影响作用,且运动与 Gln 补充、Gln 补充与高脂膳食间存在交互影响。长期高脂喂养的 DQ 组大鼠骨骼肌 MCP-1 mRNA 的表达显著高于正常喂养的 EQ 组大鼠。有氧运动或 Gln 补充均可明显降低 T2DM (DE 组和 DG 组)及正常大鼠(CE 组和 DE 组)骨骼肌 MCP-1 mRNA 的表达量,运动联合 Gln 补充对 DEG 组大鼠 MCP-1 mRNA 表达的影响与单纯 Gln 补充(DG 组)相似,但明显高于单纯运动(DE 组)的影响,对 CEG 组的影响与单纯运动(CE 组)或 Gln 补充(CG 组)的效果相似(表 3)。

表 3 本研究 6 周游泳运动及 Gln 补充对大鼠骨骼肌 NF-κB、MCP-1 及 MPO 基本表达的影响一览表

Table 3 Effects of 6 Weeks Swimming and Glutamine Supplement on NF-κB, MCP-1 and MPO mRNA Expression of Rats Muscle

	核转录因子-κB/内参 18 s NF-κB /18s mRNA	单核细胞趋化蛋白-1/内参 18 s MCP-1 /18 s mRNA	髓过氧化物酶/内参 18 s MPO /18s mRNA
CQ 组(n=6)	1	1	1
CG 组(n=6)	0.52±0.27	0.28±0.06 [#]	0.43±0.26 [#]
CE 组(n=6)	0.21±0.09 [#]	0.32±0.08 [#]	0.54±0.28 [#]
CEG 组(n=6)	0.19±0.08 [#]	0.52±0.13 [#]	0.53±0.29
DQ 组(n=6)	3.26±1.05 ^{#★★***}	6.41±1.34 ^{#★★}	5.78±0.88 [#]
DG 组(n=6)	2.44±0.78 ^{#★★**△**}	2.40±0.84 ^{△△***★}	1.11±0.40 ^{△△**}
DE 组(n=6)	1.93±0.48 ^{#★★**△△**}	5.84±1.32 ^{#★★△△}	2.25±0.59 ^{△△★★}
DEG 组(n=6)	1.47±0.57 ^{★***△△☆☆}	3.01±0.75 ^{△△◇◇***★}	1.57±1.74 ^{**}

注:与 CQ 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与 CG 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 CE 组比较, ★ $P<0.05$, ★★ $P<0.05$; 与 CEG 组比较, ※ $P<0.05$, ※※ $P<0.01$; 与 DQ 组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$; 与 DG 组比较, ☆ $P<0.05$, ☆☆ $P<0.01$; 与 DE 组比较, ◇ $P<0.05$, ◇◇ $P<0.01$ 。

3 分析与讨论

高脂喂养诱导大鼠肥胖后再给予小剂量 STZ 注射是 T2DM 造模的常用方法^[2,23]。本实验成膜后的大鼠血糖显著升高,多饮多食多尿现象明显,符合 T2DM 特点。6 周的实验干预后,T2DM 安静组大鼠骨骼肌 NF-κB、MCP-1 及 MPO 的 mRNA 表达量显著高于安静对照组,说明本实验 T2DM 大鼠存在明显的骨骼肌炎症情况,与 Wei 等^[30]和 Zeyda 等^[33]的研究显示。慢性炎症是胰岛素抵抗及 T2DM 发病的关键因素^[30,33]。NF-κB 是炎症通路的主要调节因子,NF-κB 的激活在骨骼肌 INS 抵抗中起重要作用^[24,25]。正常情况下,NF-κB 与 IκB 结合位于胞浆。细胞因子、活性氧、高血糖以及脂肪酸等可激活 IκB 激酶(IκB kinase,IKK),IKK 磷酸化 IκB,磷酸化的 IκB 继续被泛素化,最后通过蛋白水解酶降解,NF-κB 被释放转位进入胞核。在胞核中 NF-κB 控制炎症因子 TNF-α、MCP-1、IL-1 等的转录水平,并磷酸化 INS 受体底物-1(insulin receptor substrate-1,IRS-1)而抑制 INS 信号通路和介导炎症蛋白表达^[25]。趋化因子 MCP-1 广泛存在于不同类型的细胞中,多种刺激可促进 MCP-1 的表达增加^[16]。T2DM 患者骨骼肌 MCP-1 显著增加^[16,30],本实验显示了相似的结果。MCP-1 趋化大量巨细胞进入骨骼肌和脂肪细胞中,诱导骨

骼肌和脂肪组织的慢性炎症^[27,30]。骨骼肌对 MCP-1 高度敏感,少量的 MCP-1 即可抑制 INS 信号通路和减少骨骼肌对糖的摄取。因此,MCP-1 被认为是引起 INS 抵抗的骨骼肌和脂肪组织交叉对话联系的关键分子^[21,30]。释放入血的 MCP-1 浓度则与糖基化血红蛋白密切正相关^[17]。MPO 由多核性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils,PMN)分泌并促进 PMN 迁移进入靶部位^[9]。MPO 可利用氯化物和过氧化氢产生有抗菌作用的次氯酸(hypochlorous acid,HOCl),即 MPO-H₂O₂-Cl⁻系统,这在正常机体的免疫防御中起重要作用。病理情况下,持续激活的 MPO-H₂O₂系统将引起组织损伤,HOCl 引起靶组织的硝化、卤化和氧化反应,引发和加重炎症病变^[10]。阻断 MPO 的活化位点、抑制氯化物的形成、使用氧化抑制剂和裂解次氯酸阻止炎症复合物的形成和播撒已被作为新的方法用于相关疾病的治疗^[10]。本实验中 T2DM 大鼠 FBG 明显增加,而 ISN 显著降低,说明升高的 NF-κB mRNA 和 MCP-1 mRNA 对大鼠 ISN 的分泌产生了明显的抑制,而 MPO 的增加可能进一步加重骨骼肌的炎症损伤,造成恶性循环。

规律运动是预防和治疗 T2DM 的关键^[1,7,24]。本实验显示,6 周的游泳运动明显降低了 T2DM 大鼠骨骼肌 NF-κB、MCP-1 及 MPO 的基因表达,增加了 ISN 水平,降低了

FBG 值。Golbidi 等^[7]及 Sriwijitkamol 等^[24]报道,运动可明显增加抗炎因子 IL-6 的表达,IL-6 抑制炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的产生,并刺激抗炎因子 IL-10 和 IL-1ra 的分泌;增加 I κ B 表达,抑制 NF- κ B 的活化^[24];并可通过升高的肾上腺素直接抑制 TNF- α 的反应^[7]。有氧运动还可显著降低 MCP-1 的表达^[14,22,28],减少机体感染后 MCP-1 的上升幅度^[22],降低癌症大鼠体内 MCP-1 的含量,且降低的程度与肿瘤减少程度呈正相关^[14]。骨骼肌炎症状态的改善提高了 T2DM 大鼠骨骼肌对 ISN 的敏感性,同时增加了 ISN 分泌,加强了骨骼肌脂代谢的能力^[7],降低了 FBG 值,有利于 T2DM 病情的改善。6 周游泳运动对正常大鼠骨骼肌 NF- κ B、MCP-1 及 MPO 的表达亦有明显的抑制效应,并降低了其 FBG,提高了 ISN 水平,这正是长期有氧运动不仅是 T2DM 治疗的必要手段,也是预防代谢类疾病及其他疾病发生的最佳行为方式^[1,23]。6 周游泳运动增加了 T2DM 大鼠的 GLP-1 水平,但对正常大鼠无影响,说明运动调节 GLP-1 与 GLP-1 刺激 INS 分泌的糖依赖形式相一致,对失稳态水平的 GLP-1 有明显调节作用,而对正常稳态的 GLP-1 无明显影响,这提高了运动降血糖的安全性。

Gln 是人体最丰富的游离 α -氨基酸,占血浆游离氨基酸的 20%,其每天以 80 g 的速度快速更新^[29]。创伤、感染、手术等应激情况及高分解代谢疾病状态下,体内 Gln 被快速动用,血液和组织中 Gln 迅速下降甚至耗竭,机体抗氧化能力及细胞免疫能力下降,肠粘膜受损,骨骼肌蛋白分解增加,临床愈后情况与细胞外 Gln 浓度直接相关。外援性补充 Gln 后可明显逆转上述情况,改善病情,降低死亡率,因此 Gln 被广泛用于临床多种疾病的治疗^[4,12,15]。T2DM 患者 Gln 明显减少^[13]。给予 T2DM 患者 Gln 补充不仅可提高机体的抗氧化能力,而且显著增加 GLP-1 的水平,增加 INS 浓度,降低餐后早期高血糖的发生率^[6,19]。目前,使用 GLP-1 类似物或激动剂提高 GLP-1 的分泌量已成为 T2DM 患者最安全有效的治疗方法^[5,8]。本实验显示,6 周 Gln 补充可降低 T2DM 大鼠 MPO、NF- κ B 及 MCP-1 的 mRNA 表达,抑制正常大鼠 MPO、MCP-1 的 mRNA 表达,但对正常大鼠 NF- κ B mRNA 的表达无明显影响,说明 Gln 补充可明显抑制中性粒细胞和巨噬细胞对骨骼肌的浸润,减少 T2DM 大鼠骨骼肌的炎症性损伤,提高正常大鼠骨骼肌的抗炎能力,这个过程在没有影响 NF- κ B 的情况下同样有效。Gln 补充显著增加 T2DM 组大鼠 GLP-1 及 INS 水平,降低其 FBG 值,但对正常大鼠的影响均不明显,说明长期饮食中添加 Gln 可明显改善 T2DM 大鼠血糖调节的内稳态失衡情况,而不影响正常状态下的血糖调节,因此 Gln 的补充既有效又安全。

有氧运动联合 Gln 补充对 T2DM 大鼠骨骼肌炎症因子及其 FBG、ISN 及 GLP-1 的影响是否有协同效应,目前,

据我们所查尚未见报道。本实验显示,6 周的游泳联合 Gln 补充(DEG 组)抑制 T2DM 大鼠 NF- κ B mRNA 表达的效应显著高于单纯 Gln 补充(DG 组),但与单纯运动(DE 组)相似,对 MCP-1 mRNA 的抑制与单纯 Gln 补充(DG 组)相似,但明显高于单纯运动(DE 组)的效应,对 MPO mRNA 表达的影响与单纯运动(DE 组)或单纯 Gln 补充(DG 组)时相似,降低大鼠 FBG、增加 GLP-1 作用较单纯运动(DE 组)或 Gln 补充(DG 组)时明显,增加 ISN 的效应与单纯运动(DE 组)或 Gln 补充(DG 组)相似。因此,二者的联合效应优于运动或 Gln 补充单因素作用时的效应。这可能与 T2DM 机体降低的 Gln 水平^[13]得到了补充,并随运动时骨骼肌血流量的增加,骨骼肌获取了更多的能源底物,增加了抗氧化物质的合成,且 Gln 补充促进更多的 GLP-1 的合成有关。

4 小结

骨骼肌的慢性炎症与 INS 抵抗和 T2DM 发病密切相关。抑制骨骼肌炎症、提高机体对 INS 的敏感性是近年来治疗 T2DM 的新途径。运动和饮食干预是治疗 T2DM 的最基本方式。本实验显示长期有氧运动或 Gln 补充可显著降低 T2DM 大鼠骨骼肌炎症因子 MPO、NF- κ B 及 MCP-1 的 mRNA 表达,提高 GLP-1 及 INS 的水平,降低 FBG,当二者联合作用时,对 T2DM 大鼠的效应较单纯运动或 Gln 补充时明显。因此,建议 T2DM 患者要长期坚持规律的有氧运动,并注意饮食中 Gln 的补充。

参考文献:

- [1] 常翠青. 2 型糖尿病患者的个体化运动处方[J]. 中国医学科学学报, 2011, 33(3): 248-252.
- [2] 梁海霞, 原海燕, 李焕德, 等. 高脂喂养联合低剂量链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠模型稳定性观察[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 551-555.
- [3] BERLIE H, HURREN K M, PINELLI N R. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists as add-on therapy to basal insulin in patients with type 2 diabetes: a systematic review[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2012, 5: 165-174.
- [4] BOELEN S P G, NIJVELDT R J, HOUDIK A P, *et al.* Glutamine alimentation in catabolic state[J]. J Nutr, 2001, 131(9 Suppl): 2569S-2577S.
- [5] DEFRONZO R A, ABDUL-GHANI M. Type 2 diabetes can be prevented with early pharmacological intervention[J]. Diabetes Care, 2011, 34 Suppl2: S202-209.
- [6] GREENFIELD J R, FAROOQI I S, KEOGH J M, *et al.* Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(1): 106-113.
- [7] GOLBIDI S, MESDAGHINIA A, LAHER I. Exercise in the metabolic syndrome[J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, Article

- ID349710;1-13.
- [8] HANSEN K B, VILSBØLL T, KNOP F K. Incretin mimetics: a novel therapeutic option for patients with type 2 diabetes-a review[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2010, 3: 155-163.
 - [9] KLINKE A, NUSSBAUM C, KUBALA L, *et al*. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces[J]. *Blood*, 2011, 117(4): 1350-1358.
 - [10] MALLE E, FURTMÜLLER P G, SATTTLER W, *et al*. Myeloperoxidase: a target for new drug development [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(6): 838-854.
 - [11] MARTINS C, MORGAN L M, BLOOM S R, *et al*. Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite[J]. *J Endocrinol*, 2007, 193(2): 251-258.
 - [12] MATÉS J M, PÉREZ-GÓMEZ C, NÚÑEZ DE CASTRO I, *et al*. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(5): 439-458.
 - [13] MENGE B A, SCHRADER H, RITTER P R, *et al*. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes[J]. *Regul Pept*, 2010, 160(1-3): 75-80.
 - [14] MURPHY E A, DAVIS J M, BARRILLEAUX T L, *et al*. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice[J]. *Cytokine*, 2011, 55(2): 274-279.
 - [15] OLIVEIRA G P, DIAS C M, PELOSI P, *et al*. Understanding the mechanisms of glutamine action in critically ill patients[J]. *An Acad Bras Cienc*, 2010, 82(2): 417-430.
 - [16] PANEE J. Monocyte Chemoattractant Protein 1(MCP-1) in obesity and diabetes [J]. *Cytokine*, 2012, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22766373>.
 - [17] PAPATHEODOROU K, PAPANAS N, PAPAZOGLU D, *et al*. Monocyte chemoattractant protein 1 is correlated with glycemic control and peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome[J]. *Angiology*, 2012, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492254>.
 - [18] QIU S H, SUN Z L, CAI X, *et al*. Improving patients' adherence to physical activity in diabetes mellitus: a review[J]. *Diabetes Metab J*, 2012, 36(1): 1-5.
 - [19] SAMOCHA-BONET D, WONG O, SYNNOTT E L, *et al*. Glutamine reduces postprandial glycemia and augments the glucagon-like peptide-1 response in type 2 diabetes patients[J]. *J Nutr*, 2011, 141(7): 1233-1238.
 - [20] SEGERSTRÖM A B, GLANS F, ERIKSSON K F, *et al*. Impact of exercise intensity and duration on insulin sensitivity in women with T2D[J]. *Eur J Intern Med*, 2010, 21(5): 404-408.
 - [21] SELL H, DIETZE-SCHROEDER D, KAISER U, *et al*. Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(5): 2458-2467.
 - [22] SIM Y J, YU S, YOON K J, *et al*. Chronic exercise reduces illness severity, decreases viral load, and results in greater anti-inflammatory effects than acute exercise during influenza infection[J]. *J Infect Dis*, 2009, 200(9): 1434-1442.
 - [23] SRINIVASAN K, VISWANAD B, ASRAT L, *et al*. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(4): 313-320.
 - [24] SRIWIJITKAMOL A, CHRIST-ROBERTS C, BERRIA R, *et al*. Reduced skeletal muscle inhibitor of kappaB beta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training [J]. *Diabetes*, 2006; 55(3): 760-767.
 - [25] TANTIWONG P, SHANMUGASUNDARAM K, MONROY A, *et al*. NF- κ B activity in muscle from obese and type 2 diabetic subjects under basal and exercise-stimulated conditions [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(5): E794-801.
 - [26] TONG T K, LIN H, LIPPI G, *et al*. Serum oxidant and antioxidant status in adolescents undergoing professional endurance sports training [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, Article ID 741239: 1-7.
 - [27] VARMA V, YAO-BORENGASSER A, RASOULI N, *et al*. Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(6): E1300-1310.
 - [28] VIEIRA V J, VALENTINE R J, WILUND K R, *et al*. Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice[J]. *Cytokine*, 2009, 46(3): 339-345.
 - [29] WATFORD M. Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation[J]. *J Nutr*, 2008, 138(10): 2003S-2007S.
 - [30] WEI Y, CHEN K, WHALEY-CONNELL A T, *et al*. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(3): R673-680.
 - [31] WIJEKOON E P, SKINNER C, BROSNAN M E, *et al*. Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2004, 82(7): 506-514.
 - [32] ZANCHI N E, ALMEIDA F N, LIRA F S, *et al*. Renewed avenues through exercise muscle contractility and inflammatory status[J]. *Sci World J*, 2012, Article ID 584205: 1-7.
 - [33] ZEYDA M, STULNIG T M. Obesity, inflammation, and insulin resistance-a mini-review[J]. *Gerontol*, 2009, 55(4): 379-386.