

有氧运动对高同型半胱氨酸血症载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响

钟兴明¹, 何榕², 尤少华¹, 王秀杰¹, 毛节明²

(1. 首都体育学院运动人体科学系, 北京市 100088; 2. 北京大学第三医院心内科, 北京市 100191)

[关键词] 有氧运动; 高同型半胱氨酸血症; 动脉粥样硬化; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠

[摘要] **目的** 观察有氧运动训练对高同型半胱氨酸血症(HHcy)小鼠血浆同型半胱氨酸水平(Hcy)的影响, 探讨有氧运动是否能够延缓 HHcy 致动脉粥样硬化。**方法** 6 周龄雌性载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠随机分为三组: 对照组、HHcy 组和 HHcy + 有氧运动组。饮用水中加入 Hcy 制作 HHcy 模型。HHcy + 有氧运动组在 1 周适应性训练后进行 8 周跑台训练(0°, 15 m/min, 60 min/d, 每周训练 5 天)。采用酶法检测血浆 Hcy 和血脂水平。主动脉根部切片, 油红 O 染色, 计算动脉粥样硬化斑块面积。**结果** HHcy 组血浆 Hcy 水平与对照组相比明显增高(20.88 ± 5.79 μmol/L 比 7.80 ± 1.10 μmol/L, $P=0.001$), HHcy + 有氧运动组血浆 Hcy 水平较 HHcy 组明显下降(14.01 ± 2.30 μmol/L 比 20.88 ± 5.79 μmol/L, $P=0.016$)。三组之间体重增长、饮水量及血浆总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯水平无显著性差异。与对照组相比, HHcy 组动脉粥样硬化斑块面积[(9.24 ± 9.02) × 10⁻⁴ mm² 比(15.55 ± 4.64) × 10⁻⁴ mm², $P=0.034$]及斑块负荷(12.20% ± 12.09% 比 19.86% ± 6.30%, $P=0.047$)明显增加, HHcy + 有氧运动组较 HHcy 组斑块面积[(15.55 ± 4.64) × 10⁻⁴ mm² 比(8.62 ± 7.55) × 10⁻⁴ mm², $P=0.024$]及斑块负荷(19.86% ± 6.30% 比 10.62% ± 9.06%, $P=0.021$)明显降低。**结论** 有氧运动可以降低 HHcy ApoE^{-/-} 小鼠血浆 Hcy 水平, 延缓动脉粥样硬化进展, 该作用独立于血脂水平的改变。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of Aerobic Exercise on Atherosclerosis Accelerated by Hyperhomocysteinemia in Apolipoprotein E^{-/-} Mice

ZHONG Xing-Ming¹, HE Rong², YOU Shao-Hua¹, WANG Xiu-Jie¹, and MAO Jie-Ming²

(1. Department of Sports Health Care and Rehabilitation, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100088, China; 2. Department of Cardiology, The Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China)

[KEY WORDS] Aerobic Exercise; Hyperhomocysteinemia; Atherosclerosis; Homocysteine; Apolipoprotein E^{-/-} Mice

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether aerobic exercise could decrease plasma homocysteine (Hcy) level and reduce atherosclerosis accelerated by hyperhomocysteinemia (HHcy) in ApoE^{-/-} mice. **Methods** Six-week-old female ApoE^{-/-} mice were assigned to three groups: control group, HHcy group and HHcy + exercise group. HHcy animal model was made by feeding a high Hcy chow. After 1 week of acclimatization, HHcy + exercise group was trained in a motorized rodent treadmill for 8 weeks (slope: 0°, speed: 15 m/min, 60 min/d, 5 d/wk). Plasma Hcy level and lipid levels were determined enzymatically by auto-biochemistry analysis system. Aortic roots were isolated for immunohistochemistry to compare the plaques' areas. **Results** Plasma Hcy levels in HHcy group were higher than control group, furthermore, the Hcy levels significantly decreased in HHcy + exercise group compared with HHcy group. There were not significant differences in body weight, daily drinking amount, plasma total cholesterol, LDLC, HDLC and triglyceride concentrations in the three groups. Compared with control group, atherosclerotic plaque area and plaque burden were increased in HHcy group. However, the plaque area and plaque burden in HHcy + exercise group were decreased when co-

[收稿日期] 2011-10-11

[基金项目] 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM 200910029004)

[作者简介] 钟兴明, 硕士, 讲师, 研究方向为运动与心血管疾病, E-mail 为 zhong_xinming@126.com。通讯作者何榕, 博士, 副主任医师, 研究方向为心血管疾病基础与临床, E-mail 为 herong@medmail.com.cn。

mpared with HHcy group. **Conclusion** Aerobic exercise decreases plasma Hcy levels and reduces the development of atherosclerosis in HHcy ApoE^{-/-} mice, which does not depend on the decrease of cholesterol levels.

动脉粥样硬化是导致心脑血管病患病及死亡的主要因素之一。近年来的研究表明,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)是动脉粥样硬化发生和发展的独立危险因素^[1],炎症和氧化应激可能是 HHcy 致动脉粥样硬化的重要发病机制。有氧运动已被证明可以通过降低高血压、高血脂等动脉粥样硬化传统危险因素而延缓动脉粥样硬化的发展。然而,有氧运动是否能够延缓 HHcy 所致动脉粥样硬化目前仍然不清楚,运动对血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平的影响仍有争议。因此,本研究旨在观察有氧运动训练对 HHcy ApoE^{-/-}小鼠血浆 Hcy 水平的影响和小鼠动脉粥样硬化病变程度的变化,探讨有氧运动训练是否能够有效延缓 HHcy 致动脉粥样硬化。

1 材料和方法

1.1 材料

6 周龄雌性 ApoE^{-/-}小鼠,体重 16~18 g,由北京大学医学部实验动物科学部提供。Hcy 购自美国 Sigma 公司;酶法血浆脂质成分检测试剂购自北京中生北控生物有限公司;循环酶法 Hcy 检测试剂购自北京九强生物技术有限公司。自动跑台为中国杭州段式(BCPT-98),全自动生化分析仪(Olympus AU5400,日本),图像处理系统(IPP 5.0)。

1.2 HHcy 小鼠动物模型的建立

小鼠随机分为三组:对照组、HHcy 组和 HHcy + 有氧运动组,每组 8 只,分笼饲养于 22℃,12 h/12 h 光照/黑暗环境下。于每日 8 时定时定量投喂固体小鼠饲料和饮水,饮水中按 1.8 g/L 加入 Hcy^[2]。每周称重,并记录每天饮水量。动物实验操作遵照北京大学医学部实验动物使用规则。

1.3 有氧运动训练方案

HHcy + 有氧运动组在 1 周适应性跑台训练(第 1 天:0°,10 m/min × 10 min,逐渐递增至第 5 天:0°,14 m/min × 50 min)后开始正式跑台训练 8 周:速度 15 m/min,坡度 0°,60 min/d,每天 4-6PM 进行训练,每周训练 5 天,间隔 2 天。

1.4 血浆 Hcy 和脂质水平检测

肝素抗凝,4℃、1000 g 离心 10 min,取上层血浆。使用全自动生化分析仪进行检测。循环酶法测定 Hcy 浓度,胆固醇氧化酶法测定总胆固醇(TC),表面活性剂

清除法测定低密度脂蛋白胆固醇(LDLC),反应促进剂过氧化物酶法测定高密度脂蛋白胆固醇(HDL),甘油氧化酶法测定甘油三酯(TG)。

1.5 主动脉根部斑块定量分析

组织冰冻切片 OCT 包埋剂包埋的主动脉根部组织块制成 7 μm 厚的切片,从每只小鼠主动脉根部 3 个瓣膜均出现处开始取,每隔 70 μm 取一次,共取 6 片组织。然后油红 O 染色,用 IPP 5.0 软件对斑块面积进行定量分析,同时记录血管管腔面积。斑块负荷定义为斑块面积占血管管腔面积的百分比。以 6 片组织切片平均的斑块面积和斑块负荷代表该只小鼠主动脉粥样硬化程度。

1.6 统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素/双因素方差分析,组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。*P* < 0.05 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 饮水喂养对 ApoE^{-/-} 小鼠生长和饮水量的影响

ApoE^{-/-}小鼠平均饮水量为 3.48 mL/d,在对照组、HHcy 组与 HHcy + 有氧运动组之间无显著性差异(表 1)。各组 ApoE^{-/-}小鼠生长及营养状况正常,ApoE^{-/-}小鼠每周体重匀速增长,三组 ApoE^{-/-}小鼠间体重增长无显著性差异(图 1)。

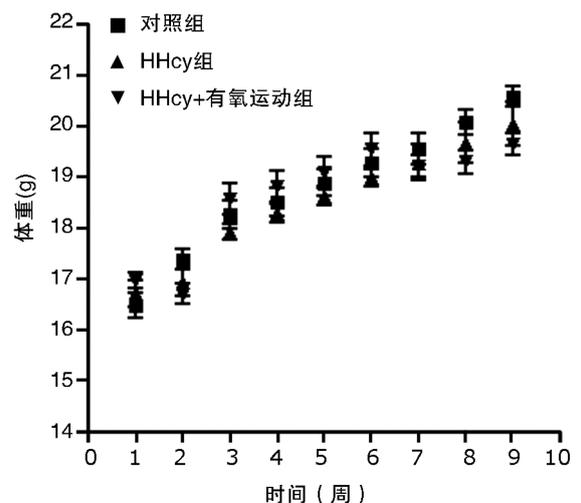


图 1. 三组 ApoE^{-/-} 小鼠体重曲线

Figure 1. Weight curves of ApoE^{-/-} mice

2.2 有氧运动对 HHcy ApoE^{-/-} 小鼠血浆 Hcy 和脂质水平的影响

HHcy 组小鼠血浆 Hcy 水平与对照组相比明显增高, HHcy + 有氧运动组血浆 Hcy 水平与 HHcy 组相比明显下降。对照组、HHcy 组与 HHcy + 有氧运动组 ApoE^{-/-} 小鼠血浆总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯水平无显著性差异(表 1)。

2.3 有氧运动对 HHcy ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的影响

HHcy 组小鼠动脉粥样硬化程度较对照组明显加重, 主动脉弓和大动脉分叉处尤其显著, 主动脉根部油红 O 染色阳性部分亦明显增大; 与 HHcy 组相比, HHcy + 有氧运动组小鼠动脉粥样硬化程度明显降低, 主动脉根部油红 O 染色阳性部分明显缩小

(图 2)。与对照组相比, HHcy 组斑块面积及斑块负荷明显增加, HHcy + 有氧运动组较 HHcy 组斑块面积及斑块负荷明显降低(图 3)。

表 1. 三组 ApoE^{-/-} 小鼠血浆 Hcy 和血脂水平

Table 1. Plasma Hcy and lipid levels in ApoE^{-/-} mice

项目	对照组	HHcy 组	HHcy + 有氧运动组
饮水量 (mL/d)	3.42 ± 2.00	3.22 ± 1.64	3.53 ± 2.07
Hcy (μmol/L)	7.80 ± 1.10	20.88 ± 5.79 ^a	14.01 ± 2.30 ^b
TC (mmol/L)	9.34 ± 1.40	10.62 ± 0.91	10.23 ± 0.68
LDLC (mmol/L)	1.40 ± 0.21	1.70 ± 0.34	1.77 ± 0.21
HDL (mmol/L)	0.43 ± 0.13	0.40 ± 0.06	0.55 ± 0.15
TG (mmol/L)	1.01 ± 0.28	1.03 ± 0.33	1.01 ± 0.18

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 HHcy 组相比。

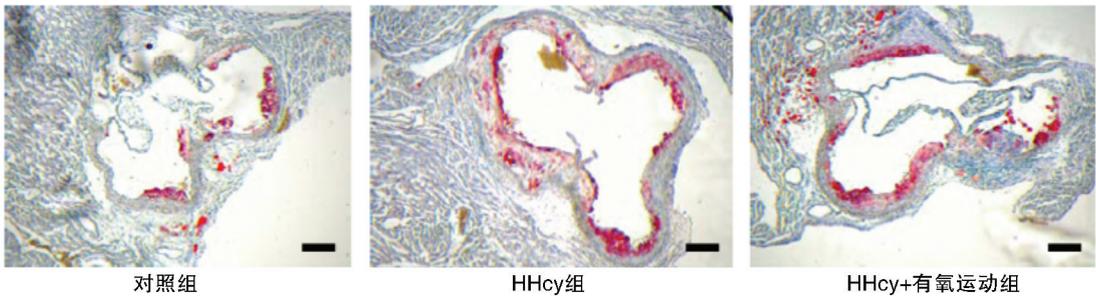


图 2. 三组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉根部粥样硬化程度

Figure 2. Aortic roots atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice

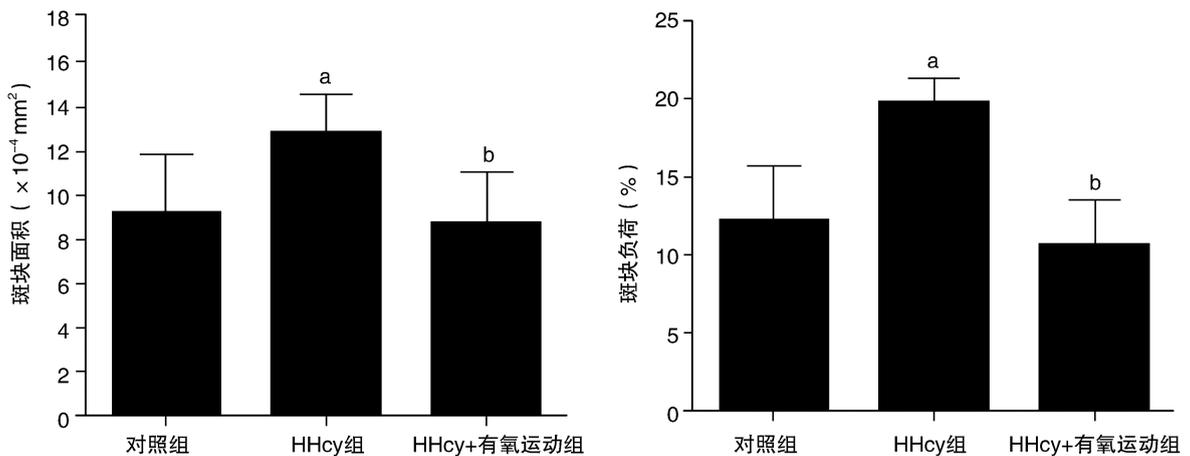


图 3. 三组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉根部斑块面积及斑块负荷

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 HHcy 组相比。

Figure 3. Atherosclerotic plaque areas and plaque burdens in ApoE^{-/-} mice

3 讨论

本研究通过对 HHcy ApoE^{-/-} 小鼠进行 8 周有氧运动训练, 观察有氧运动对 HHcy 小鼠血浆 Hcy

水平及动脉粥样硬化程度的影响。结果发现有氧运动可以降低 HHcy 小鼠血浆 Hcy 水平, 但是对血脂水平无影响; 有氧运动可以减轻 HHcy 小鼠动脉粥样硬化程度。这些结果表明有氧运动可以延缓

HHcy 所致动脉粥样硬化进展,该作用独立于血脂水平的改变。

近年来,国内外大规模临床试验及动物基础研究证实 HHcy 是致动脉粥样硬化的新的独立危险因素^[3]。一些不存在高血压、高脂血症、糖尿病、吸烟等传统危险因素的冠心病患者中 HHcy 患者占很大比例,尤其年轻患者更为显著。因此 HHcy 越来越受到人们的关注,如何防治 HHcy 引起的动脉粥样硬化也成为了当前国内外研究的热点和新的方向。动物研究结果发现叶酸、维生素 B12 和 B6 对 HHcy 所致动脉硬化可能具有预防作用。但愈来愈多的临床研究证明小剂量叶酸虽然可以降低血浆 Hcy 浓度,但对预防动脉粥样硬化进展和并发症没有太大作用^[4,6]。本研究结果发现长期有氧运动不仅可以降低 HHcy 小鼠血浆 Hcy 水平,而且可以降低 HHcy 小鼠动脉粥样硬化程度,为运动防治 HHcy 致动脉粥样硬化的发生和发展提供了实验基础。

本研究结果显示长期、适量的有氧运动可以降低 HHcy 小鼠血浆 Hcy 水平。回顾既往研究发现运动与血浆 Hcy 水平的关系一直存在争议。Herrmann 等^[7]发现急性耐力运动后血浆 Hcy 水平具有不同程度的增加,其变化与运动项目、运动周期、运动强度有密切关系。Konig 等^[8]研究发现急性高强度运动训练可以使血浆 Hcy 水平升高,而低强度运动训练对血浆 Hcy 水平影响不显著。Okura 等^[9]研究 20 周规律性有氧运动对血浆 Hcy 的影响,发现 HHcy 组人群血浆 Hcy 水平明显降低。这些结果表明不同的运动强度和运动方案对血浆 Hcy 水平有不同的影响。运动引发 Hcy 水平改变的具体机制目前仍然不完全清楚^[10]。运动过程中肌酸发生磷酸化从而给肌肉收缩提供能量,因此在高强度急性运动时机体需要合成大量的肌酸^[11],消耗大量甲基,从而促进了 S-腺苷-蛋氨酸向 Hcy 的转换,这可能是高强度急性运动时运动员血浆 Hcy 水平升高的原因之一。同时,运动生理学研究也显示运动过程中体内产生频繁的蛋白质转换以满足肌体的需要^[12],这些蛋白质转换过程既可以使 Hcy 水平升高,也可以降低其浓度。中等强度运动即可使血浆蛋氨酸水平下降,从而促进了蛋氨酸的内源性合成,当叶酸及维生素 B12 供应充足时可使 Hcy 蓄积减少,浓度降低。根据既往研究结果^[13,14],本研究中采用了适量的有氧运动方案,运动训练中监测小鼠的生长和心脏结构,结果发现运动组和非运动组小鼠生长发育情况及心脏结构无显著差异,但是运动组小鼠血浆 Hcy 水平下降。这些结果提示长期规律的有氧

运动可以降低 HHcy 小鼠血浆 Hcy 水平,运动过程中动态监测运动强度,指导运动方案至关重要。

此外,本研究结果还发现有氧运动可以减少 HHcy ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化斑块面积和斑块负荷,而对 HHcy ApoE^{-/-}小鼠的血脂水平无影响。高胆固醇血症是动脉粥样硬化的传统危险因素,既往研究证实有氧运动可以降低血脂水平^[15],然而本研究中有氧运动减轻 HHcy ApoE^{-/-}小鼠主动动脉粥样硬化斑块,却没有改变 HHcy ApoE^{-/-}小鼠的血浆胆固醇水平,表明有氧运动降低 HHcy ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化程度的作用独立于血脂水平的改变。与我们的研究结果相似,Okabe 等^[16]和 Ramachandran^[14]等的研究也发现运动可以改善高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠和 LDLr^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化程度,但对血浆胆固醇水平无影响,其原因可能与基因敲除小鼠血脂水平主要受内源性因素影响有关。既往的研究揭示 HHcy 促进动脉粥样硬化发生发展的机制与其增加炎症性细胞因子和趋化因子表达、损伤血管内皮功能和扰乱凝血/抗凝平衡等有关^[17-19]。研究提示有氧运动可以提高机体的抗氧化能力,减少氧自由基的生成,促进机体氧化还原平衡,减轻 Hcy 诱导的氧化应激和内皮功能损伤^[20],这可能是有氧运动延缓 HHcy 致动脉粥样硬化进展的机制之一,更深入的机制还需要进一步研究证实。

总之,长期规律有氧运动可以降低 HHcy 小鼠血浆 Hcy 水平,延缓动脉粥样硬化进展,该作用独立于血脂的改变。这些结果为运动防治动脉粥样硬化发生和发展提供了新的理论和实验基础,为进一步合理推广到临床康复应用提供了依据。

[参考文献]

- [1] Mangoni AA, Jackson SH. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects[J]. Am J Med, 2002, 112: 556-565.
- [2] Dai J, Li W, Chang L, et al. Role of redox factor-1 in hyperhomocysteinemia-accelerated atherosclerosis [J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41: 1 566-577.
- [3] Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis[J]. JAMA, 2002, 288: 2 015-022.
- [4] Cacciapuoti F. Hyperhomocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases? Pathogenetic and therapeutical uncertainties[J]. J Thromb Thrombolysis, 2011, 32: 82-88.
- [5] The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 In-

- investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354: 1 567-577.
- [6] Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2004, 291: 565-575.
- [7] Herrmann M, Schorr H, Obeid R, et al. Homocysteine increases during endurance exercise[J]. *J Clin Chem Lab Med*, 2003, 41: 1 518-524.
- [8] König D, Bisse E, Deibert P, et al. Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men; interactions with plasma folate and vitamin B12[J]. *J Ann Nutr Metab*, 2003, 47: 114-118.
- [9] Okura T, Rankinen T, Gagnon J, et al. Effect of regular exercise on homocysteine concentrations; the HERITAGE Family Study [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2006, 98: 394-401.
- [10] 钟兴明, 何榕. 运动、高同型半胱氨酸血症与动脉粥样硬化[J]. *中国康复医学杂志*, 2011, 26: 888-892.
- [11] McMahon S, Jenkins D. Factors affecting the rate of phosphocreatine resynthesis following intense exercise [J]. *Sports Med*, 2002, 32: 761-784.
- [12] Gibala MJ. Regulation of skeletal muscle amino acid metabolism during exercise [J]. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2001, 11: 87-108.
- [13] Lee Y, Cho J, Kim M, et al. Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2006, 97: 216-224.
- [14] Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant N, et al. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice[J]. *Atherosclerosis*, 2005, 178: 33-38.
- [15] Herzberg GR. Aerobic exercise, lipoproteins, and cardiovascular disease: benefits and possible risks[J]. *Can J Appl Physiol*, 2004, 29: 800-807.
- [16] Okabe TA, Shimada K, Hattori M, et al. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 74: 537-545.
- [17] Wang G, Woo CW, Sung FL, et al. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia; role of chemokine and adhesion molecules[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 1 777-783.
- [18] 孔炜, 王宪. 免疫炎症反应与动脉粥样硬化-高同型半胱氨酸血症促进动脉粥样硬化早期发病的免疫炎症机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15: 525-526.
- [19] Postea O, Krotz F, Henger A, et al. Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 508-513.
- [20] Hayward R, Ruangthai R, Karnilaw P, et al. Attenuation of homocysteine-induced endothelial dysfunction by exercise training[J]. *Pathophysiology*, 2003, 9: 207-214.

(此文编辑 文玉珊)