

· 基础研究 ·

运动训练对糖尿病大鼠骨骼肌神经
营养因子-3 水平的影响

李红卫 江钟立 沈振海 陆昀 吴亚文 陈玲

【摘要】目的 探讨运动训练对糖尿病大鼠骨骼肌神经营养因子-3 (NT-3) 水平的影响。方法 选取 12 周龄健康雄性 SD 大鼠 39 只, 分成糖尿病组 27 只和正常血糖组 12 只。糖尿病组建立糖尿病模型采用链脲霉素 (STZ, 55 mg/kg 体重) 注射诱导, 27 只大鼠中有 21 只造模成功。根据 2 组运动的情况, 将糖尿病组造模成功的 21 只大鼠再分成糖尿病运动 8 周组、糖尿病运动 4 周组和糖尿病对照组, 每组 7 只; 正常血糖组 12 只再分成正常运动 8 周组和正常对照组, 每组 6 只。糖尿病运动 8 周组、糖尿病运动 4 周组和正常运动 8 周组的大鼠均进行相应时长的游泳训练, 每日游泳训练 60 min, 每周训练 5 d。糖尿病对照组和正常对照组不参加游泳训练。5 组大鼠均于正常运动 8 周组最后 1 次训练后 24 h 内取标本, 运用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定大鼠股四头肌内 NT-3。5 组大鼠均于入组 1, 4, 8 周后采用肌电图诱发电位仪测定大鼠尾神经传导速度 (CNCV)。结果 糖尿病对照组大鼠股四头肌 NT-3 显著低于糖尿病运动 8 周组、正常运动 8 周组和正常对照组 ($P < 0.05$), 但与糖尿病运动 4 周组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。大鼠骨骼肌 NT-3 水平与 CNCV 呈显著正相关 ($r = 0.405, n = 28, P < 0.05$)。结论 运动训练引起的骨骼肌中 NT-3 水平升高可能是糖尿病神经病变改善的因素之一。

【关键词】运动; 糖尿病神经病变; 神经营养因子-3

The effects of swimming on neurotrophin-3 levels in the skeletal muscles of diabetic rats LI Hong-wei*, JIANG Zhong-li, SHEN Zhen-hai, LU Yun, WU Ya-wen, CHEN Ling. * Jiang Su Lake Taihu Cadres Sanatorium, Wuxi 214086, China

Corresponding author: JIANG Zhong-li, Email: jiangzhongli@hotmail.com

【Abstract】Objective To explore the effects of exercise on the levels of neurotrophin-3 (NT-3) in the skeletal muscles of streptozotocin-induced diabetic rats. Methods The rats were divided into an 8-week exercise group (A), a 4-week exercise group (B), a diabetes control group (C), an exercise group (D) in which no diabetes was induced, and a control group (E). The rat model of diabetes was induced in the rats of groups A, B and C by intra-abdominal injection of streptozotocin (STZ) at 55 mg/kg. The exercising rats were forced to swim for 60 minutes once daily, 5 days a week. The levels of NT-3 in skeletal muscles were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay. Caudal nerve conduction velocity (CNCV) in all of the rats was evaluated at the beginning, and after 4 and 8 weeks of swimming exercise. Results NT-3 levels in the skeletal muscles in group C were significantly lower than in groups A, D and E. There was no statistically significant difference in NT-3 levels between groups B and C. The NT-3 levels showed a significant positive correlation with CNCV at the 8th week. Conclusions The increase in NT-3 levels of skeletal muscles induced by exercise could contribute partially to the improvement of diabetic neuropathy.

【Key words】Exercise; Diabetic neuropathy; Neurotrophin-3

糖尿病神经病变 (diabetic neuropathy, DN) 是糖尿病最常见的并发症, 严重影响患者的生活质量。Balducci 等^[1] 2006 年首次研究发现, 长期有氧运动

可以预防 DN 的发生, 但是具体的机制尚不清楚。我们的前期研究也发现, 适当的运动训练可以预防和改善糖尿病大鼠尾神经传导速度 (caudal nerve conduction velocity, CNCV) 的降低^[2]。肌细胞可以分泌神经营养因子-3 (neurotrophin-3, NT-3), 发挥神经营养功能。有研究显示, 链脲霉素 (streptozocin, STZ) 诱导糖尿病动物肌细胞中 NT-3 蛋白水平降低, 从而导致神经元营养状况降低^[3-4]。糖尿病大鼠患病 2 周后接种含有 NT-3 序列的病毒载体可以预防糖尿病神经病变的进展, 而且给予 STZ 诱导的糖尿病大鼠

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.04.001

基金项目: 江苏省重点学科江苏省人民医院康复医学开放课题 (KF200921)

作者单位: 214086 无锡, 江苏省太湖干部疗养院 (李红卫、沈振海、陆昀); 南京医科大学第一附属医院康复医学科 (李红卫、江钟立); 山西医科大学第一附属医院 (吴亚文); 南京医科大学生理学系 (陈玲)

通信作者: 江钟立, Email: jiangzhongli@hotmail.com

NT-3 治疗时运动和感觉神经传导速度都会出现改善^[5],提示 NT-3 可能对糖尿病神经病变起到重要的治疗作用。骨骼肌细胞可以分泌包括 NT-3 在内的多种神经营养因子,而且运动训练可以增加正常大鼠神经营养因子的分泌^[6-7]。然而运动训练能否增加糖尿病大鼠骨骼肌 NT-3 的分泌来预防 DN 的发展,目前尚不清楚。

材料与方法

一、动物

12 周龄雄性健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 39 只,体重 250 ~ 300 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供[许可证号:SCXK(沪)2003-0003],饲养于南京医科大学实验动物中心,常规饲料和饮水,室温(20 ± 2)℃,相对湿度 65% ~ 70%,每日 12 h 照明(8:00-20:00)/12 h 黑暗(20:00-8:00)周期循环。常规大鼠颗粒饲料喂养,自由饮水。将 39 只 SD 大鼠分为正常血糖组 12 只和糖尿病组 27 只。为避免环境改变产生的影响,所有大鼠适应性喂养 1 周后进入实验。所有实验过程遵循南京医科大学动物管理委员会规定。

二、糖尿病大鼠模型的建立和分组

适应性喂养 1 周后,糖尿病组大鼠均参照 Ying 等^[6]的方法建立糖尿病大鼠模型:将链脲霉素(streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司)按照 55 mg/ml 剂量溶于 0.01 M 的枸橼酸缓冲液中(pH = 4.4 ~ 4.6)。SD 大鼠空腹 12 h 后按 55 mg/kg 体重于腹腔注射 STZ 1 次,1 周后进行剪尾取血,采用 Surestep Plus 血糖仪(美国 Lifescan 公司)检测大鼠血糖,血糖 > 16.7 mmol/L 者确定为糖尿病大鼠。正常血糖组大鼠分别于相同的时间注射同剂量的枸橼酸溶液。造模结束后,糖尿病组达标的大鼠有 21 只(成功率为 77.8%,剔除未达标大鼠),根据运动情况再分成糖尿病对照组、糖尿病运动 4 周组和糖尿病运动 8 周组,每组 7 只;同时将正常血糖组 12 只大鼠再分成正常对照组和正常运动 8 周组,每组 6 只。

三、实验方法

正常运动 8 周组、糖尿病运动 4 周组和糖尿病运动 8 周组均采用前期研究中的训练方案^[2],将大鼠置于水深 50 cm、水温 35 ℃ 左右的桶中进行无负荷自由泳运动,每日训练 60 min,每周训练 5 d。糖尿病运动 8 周组和正常运动 8 周组于造模成功后即刻开始游泳训练,连续训练 8 周,糖尿病运动 4 周组于造模成功后喂养 4 周,从第 5 周开始游泳训练,连续训练 4 周。糖尿病对照组和正常对照组不参加训练,定时将鼠笼置于运动时的桶旁,摒除环境噪音的影响。5 组大鼠在

实验过程中均于造模成功 1,4,8 周后采用肌电图诱发电位仪测定大鼠 CNCV,大鼠 CNCV 的测定结果已在前期研究中报道^[2]。

四、标本采集及处理

正常运动 8 周组、糖尿病运动 4 周组和糖尿病运动 8 周组大鼠在第 8 周最后 1 次训练后 24 h 内取标本,糖尿病对照组和正常对照组也在相同的时间取标本。所有大鼠均于腹腔内注射 1.5% 戊巴比妥(40 mg/kg 体重)将大鼠麻醉,麻醉后取股四头肌,用冰冻剪刀剪取长约 1 cm 的股四头肌肌组织,置于预冷的冻存管内,立即将冻存管置于液氮内,然后将装有标本的冻存管转入 -80 ℃ 低温冰箱保存。

五、酶联免疫吸附测定法测定

由于实验过程中大鼠的死亡,最终采用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定的骨骼肌标本数量为糖尿病对照组和糖尿病运动 8 周组各 5 个,糖尿病运动 4 周组,正常对照组和正常运动 8 周组各为 6 个。

1. 组织提取液制备:使用细胞裂解液(KGP601, 081024)提取组织蛋白。4 ℃ 下取骨骼肌组织,使用微量测量仪(岛津 SHIMADZU, 日本)称取组织重量。将组织剪碎置于冰冷玻璃匀浆器中,按照每 100 mg 组织加入 1 ml 预冷的裂解液(含有蛋白酶抑制剂和 PMSF),冰水孵育 15 min,玻璃匀浆器上下手动匀浆 15 次,将所有组织移入 1 ml 规格离心管,采用高速冷冻离心机(DL-45RC-L, 上海)离心(4 ℃, 10 000 × g, 5 min)。取上清至新的预冷的离心管中,即为蛋白提取物。分装保存于 -70 ℃ 冰箱中。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(BCA Protein Assay Kit)测定蛋白提取物中蛋白浓度。

2. NT-3 浓度测定:用 ELISA 法测定各组大鼠骨骼肌中 NT-3(Rat Neurotrophin 3, NT-3 ELISA kit, NO. E0106r, USCN Life Science & Technology Company, USA)的表达量。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加入全效裂解液 100 μl,样品孔加入 100 μl 待测样品液,标准孔 100 μl 标准品。37 ℃ 120 min 后,弃去液体,不用洗涤,每孔加入 100 μl 检测溶液 A 工作液 37 ℃ 60 min。用缓冲液洗涤,每孔洗 5 次,每次 2 ~ 3 min。每次洗涤时,轻拍底板以倒空每孔。弃去液体,每孔加入 100 μl 检测溶液 B 工作液 37 ℃ 60 min。用缓冲液洗涤(程序同前)。包被一抗和二抗之后,加入底物溶液(每孔 90 μl, 37 ℃ 避光显色),30 min 内肉眼可见标准孔前 3 ~ 4 孔出现明显梯度兰色,后 3 ~ 4 孔梯度不明显。每孔加入终止液终止反应(50 μl),此时兰色变成黄色。采用酶标仪(128c-400, clinibio 公司),波长 450 nm 测定每孔吸光度(标准孔吸光值 N,

样品孔吸光值 Y)。通过绘制标准曲线计算每孔 NT-3 的含量。

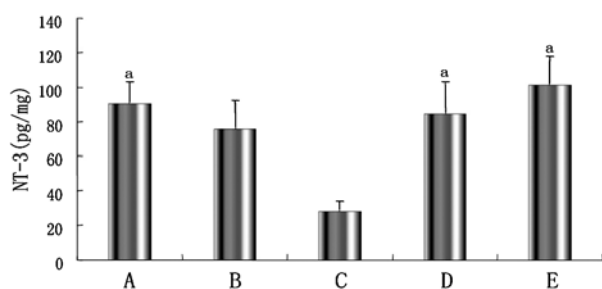
六、统计学分析

用 SPSS 13.0 版统计软件进行数据分析, 各组数据采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 方差齐时采用 LSD 法进行两两比较, 方差不齐时采用 Tamhane's 法两两比较。 $P < 0.05$ 表示有差异有统计学意义。由于各组数据均为定量资料并符合正态分布, 相关性分析采用 Pearson 相关。

结 果

一、不同运动干预时间对糖尿病大鼠骨骼肌 NT-3 水平的影响

图 1 可见, 糖尿病对照组大鼠骨骼肌 NT-3 显著下降, 与糖尿病运动 8 周组、正常对照组和正常运动 8 周组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。糖尿病运动 4 周组大鼠骨骼肌 NT-3 的水平较糖尿病对照组有明显增高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。糖尿病运动 8 周组、正常对照组和正常运动 8 周组 3 组间大鼠骨骼肌 NT-3 的水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: A 为糖尿病运动 8 周组, B 为糖尿病运动 4 周组, C 为糖尿病对照组, D 为正常对照组, E 为正常运动 8 周组。与 C 比较, $^a P < 0.05$

图 1 各组大鼠骨骼肌 NT-3 水平

二、大鼠骨骼肌 NT-3 水平与 CNCV 的相关性

图 2 可见, 5 组实验大鼠 NT-3 的水平与 8 周时各组大鼠 CNCV 呈显著相关, $r = 0.405$, $n = 28$, $P < 0.05$ 。

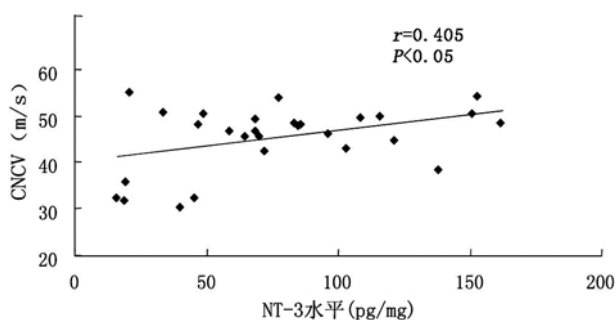


图 2 CNCV 与骨骼肌 NT-3 表达水平相关

讨 论

NT-3 在中枢神经系统的可塑性及神经肌肉再生过程中发挥着重要作用。有研究报道骨骼肌细胞可以分泌包括 NT-3 在内的多种神经营养因子, 并且运动训练可以改变正常大鼠骨骼肌 NT-3 mRNA 及其络氨酸激酶-C 受体的水平, 而且运动训练可以增加正常大鼠脊髓神经营养因子含量^[6-7]。STZ-诱导的糖尿病动物肌细胞中 NT-3 及其 mRNA 水平降低, 从而导致神经元营养状况降低^[3-4]。本研究也发现糖尿病 8 周后, 骨骼肌中 NT-3 水平低于正常大鼠, 说明糖尿病大鼠骨骼肌 NT-3 表达水平下降。

我们前期的研究发现, STZ 诱导的糖尿病大鼠 4 周时 CNCV 下降, 糖尿病运动组大鼠 CNCV 高于糖尿病其它各组, 8 周时糖尿病运动 4 周组大鼠 CNCV 也出现升高, 这说明适当的运动训练可以预防和改善大鼠尾神经传导速度的降低, 而且发现对已发生的 DN 有治疗作用^[2]。本研究发现, 糖尿病大鼠运动 8 周骨骼肌中 NT-3 的表达量高于糖尿病对照组, 而且 CNCV 与 NT-3 之间存在显著相关, 这说明运动训练使糖尿病大鼠骨骼肌分泌的 NT-3 增加可能是 CNCV 改善的原因之一。

外源性 NT-3 替代疗法也已经有研究在尝试。在半乳糖饲养的高血糖大鼠模型中, 全身性给予 NT-3 治疗可以预防感觉神经功能和结构的异常改变, 但是对较粗的运动神经没有作用^[6]。与之不同的是, 当 STZ 诱导的糖尿病大鼠给予 NT-3 治疗时较粗的运动和感觉神经传导速度都会出现改善, 而且糖尿病大鼠患病 2 周后接种含有 NT-3 序列的病毒载体可以预防糖尿病神经病变的进展, 持续时间至少 6 个月^[5]。这些都说明外源性给予 NT-3 可能对糖尿病神经病变起到长期的治疗作用, 胰岛素缺乏的糖尿病患者给予 NT-3 同样可以对其神经病变起到治疗作用。本研究显示, 糖尿病 8 周运动组大鼠骨骼 NT-3 水平高于糖尿病对照组, 与正常对照组大鼠差异无统计学意义, 提示运动训练可以增加内源性糖尿病大鼠骨骼肌 NT-3 的分泌, 恢复到正常水平。这种内源性骨骼肌分泌的 NT-3 增加对 DPN 起到一定的治疗作用。

肌细胞可以表达 NT-3, 与 NT-3 结合的络氨酸激酶受体出现在角质化细胞、运动神经元和直径较大的感觉神经元, 这些感觉神经元与本体感觉和触觉有关^[8], 因此 NT-3 受体表达范围较局限。本研究发现, CNCV 与 NT-3 之间存在中等程度相关性, 从另一个方面说明, 运动训练使糖尿病大鼠 CNCV 的改善可能还有其它因素参与。糖尿病 4 周运动组大鼠在糖尿病造模成功后未予任何干预 4 周, 此时 CNCV 已出现了减

慢的改变,第 5 周开始才实施运动训练方案持续 4 周,与糖尿病组大鼠相比 NT-3 水平虽然出现了增高的趋势,但差异并无统计学意义,提示运动干预时期和持续时间对 NT-3 的分泌有较大的影响。在疾病早期实施运动治疗并长期坚持有利于内源性 NT-3 的产生,可以预防和治疗糖尿病周围神经病变的发生和发展。

在本研究中正常运动组大鼠 NT-3 水平与正常对照组没有出现差异。Cuppini 等^[9]发现,运动可以增加正常大鼠骨骼肌脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平,但他们的运动方式为持续 5 d 的主动转轮(running wheel)。Ying 等^[6]的研究发现大鼠持续 3 d 和 7 d 的主动转笼运动,运动大鼠 3 d 后出现骨骼肌 NT-3 mRNA 的升高,7 d 后恢复正常,而骨骼肌 NT-3 蛋白水平在运动 3 d 和 7 d 时与对照组相比均没有出现差异,这与我们的研究结果相似。说明运动训练可能只会影响正常大鼠骨骼肌 NT-3 mRNA 的表达水平,而对其蛋白水平的影响有待进一步的探讨。

本研究发现,运动训练可以提高糖尿病大鼠骨骼肌 NT-3 的表达量,而且与大鼠 CNCV 之间存在相关关系。提示运动训练引起的糖尿病大鼠骨骼肌 NT-3 水平升高可能是糖尿病大鼠 CNCV 改善作用的部分原因。

参 考 文 献

[1] Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, et al. Exercise training can modify

the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications*, 2006, 20: 216-223.

- [2] 李红卫,江钟立,吴亚文,等. 运动训练对糖尿病大鼠尾神经传导速度的影响. *中国康复医学杂志*, 2009, 24: 412-415.
- [3] Calcutt NA, Jolivald CG, Fernyhough P. Growth factors as therapeutics for diabetic neuropathy. *Current Drug Targets*, 2008, 9: 47-59.
- [4] Christianson JA, Ryals JM, Johnson MS. Neurotrophic modulation of myelinated cutaneous innervation and mechanical sensory loss in diabetic mice. *Neuroscience*, 2007, 145: 303-313.
- [5] Chattopadhyay M, Mata M, Goss J, et al. Prolonged preservation of nerve function in diabetic neuropathy in mice by herpes simplex virus-mediated gene transfer. *Diabetologia*, 2007, 50: 1550-1558.
- [6] Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, et al. Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Res*, 2003, 987: 93-99.
- [7] Twiss JL, Chang JH, Schanen NC. Pathophysiological Mechanisms for Actions of the Neurotrophins. *J Neurosci Brain Pathol*, 2006, 4: 320-332.
- [8] Bruns MB, Miller MW. Functional nerve growth factor and trkA autocrine/paracrine circuits in adult rat cortex are revealed by episodic ethanol exposure and withdrawal. *J Neurochem*, 2006, 100: 1155-1168.
- [9] Cuppini R, Sartini S, Agostini D, et al. BDNF expression in rat skeletal muscle after acute or repeated exercise. *Arch Ital Biol*, 2007, 145: 99-110.

(修回日期: 2010-02-12)

(本文编辑: 阮仕衡)

· 消息 ·

《神经损伤与功能重建》杂志 2010 年征订启事

《神经损伤与功能重建》杂志是中华人民共和国教育部主管,华中科技大学同济医学院主办的国家级神经科学专业学术性期刊(双月刊),2006 年入选为中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、被中国核心期刊(遴选)数据库收录,2007 年 6 月被收录为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。本刊还被万方数据、中国知网、重庆维普等数据库收录。此外,本刊从 2008 年起与国际知名杂志《Glia》合作,开辟“Glia 优秀论文推荐”专栏。本刊紧跟国际神经科学发展趋势,对神经系统疾病的基础与临床研究热点予以实时追踪、报道,内容新颖、报道及时,突出科学性、创新性和实用性,注重神经科学基础研究与临床研究的紧密结合,使基础研究的每一项重大进展都蕴涵了广阔的应用前景,而临床上重要防治对策的提出和实施又无不依仗对神经病学的发生、发展与转归的深入研究。

《神经损伤与功能重建》杂志为双月刊,大 16 开,76 页,单月 25 日出版,每期定价 10 元,全年定价 60 元。刊号 CN42-1759/R, ISSN1001-117X。邮发代号: 38-47, 欢迎在各邮局订阅,漏订者可汇款至武汉市解放大道 1095 号同济医院内《神经损伤与功能重建》编辑部补订,编辑部地址: 武汉市解放大道 1095 号同济医院内,邮编: 430030, 电话(传真): 027-83662639, E-mail: sjsscj@tjh.tjmu.edu.cn。