

· 基础研究 ·

有氧运动对高蛋白饮食大鼠血浆 Hcy、T-NOS 和 NO 含量的影响

杨波 罗芳 张钧

【摘要】目的 探讨有氧运动对高蛋白饮食大鼠血浆同型半胱氨酸(Hcy)、总一氧化氮合成酶(T-NOS)和一氧化氮(NO)含量的影响。**方法** 将雄性 Wistar 大鼠随机分为正常饮食对照组(对照组)、高蛋白饮食组(高蛋白组)和有氧运动+高蛋白饮食组(运动加高蛋白组)。对照组喂饲普通饲料,高蛋白组和运动加高蛋白组大鼠喂饲含 3% 蛋氨酸的高蛋白饲料,运动加高蛋白组大鼠每日同时进行 90 min 无负重游泳运动,每周 6 d,共 8 周。采用高效液相色谱法测定各组大鼠血浆 Hcy 含量,采用硝酸酶还原法测定大鼠血浆 NO 含量,采用比色法测定大鼠血浆 T-NOS 含量。**结果** 与对照组相比,高蛋白组血浆 Hcy 含量显著增高($P < 0.01$),达对照组的 2 倍以上,而 T-NOS 与 NO 含量均显著下降($P < 0.01$);与高蛋白组相比,运动加高蛋白组血浆 Hcy 含量显著下降($P < 0.05$),血浆 T-NOS、NO 含量显著提高($P < 0.05$),与对照组相比,上述各项指标差异无统计学意义。**结论** 高蛋白饮食可诱发大鼠高半胱氨酸血症,血浆 NO 和 T-NOS 含量显著下降;适宜的运动可以降低高蛋白饮食大鼠血浆 Hcy 水平,提高 T-NOS 和 NO 含量,预防高半胱氨酸血症。

【关键词】 同型半胱氨酸; 高半胱氨酸血症; 一氧化氮; 运动

Effects of aerobic exercise on the level of plasma homocysteine, total nitric oxide synthase and nitric oxide in rats fed a high methionine diet YANG Bo*, LUO Fang, ZHANG Jun. *Department of Preventive Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

【Abstract】Objective To observe the effects of aerobic exercise on the plasma content of homocysteine (Hcy), total nitric oxide synthase (T-NOS) and nitric oxide (NO) in rats fed a high methionine diet. **Methods** A total of 24 male Wistar rats were randomly divided into a normal diet (CR) group, a high methionine diet (MR) group and a high methionine diet plus swimming group (T + MR), and treated accordingly for 8 weeks. At the end of the treatment, all the animals were tested for plasma T-NOS, NO and homocysteine levels. **Results** Plasma homocysteine doubled, whereas T-NOS and NO levels in the MR group decreased significantly as compared with the CR group, suggesting that hyperhomocysteinemia was induced by the high methionine diet. Plasma homocysteine content decreased significantly in the T + CR group, but plasma T-NOS and NO increased significantly compared with the MR group. These indicators were not significantly different for the T + MR group from those of the CR group. **Conclusion** Adequate aerobic exercise can decrease the plasma level of homocysteine in rats fed a high methionine diet, and increase the plasma level of T-NOS and NO, helping prevent the development of hyperhomocysteinemia.

【Key words】 Homocysteine; Hyperhomocysteinemia; Nitric oxide; Aerobic exercise

同型半胱氨酸也称高半胱氨酸(homocysteine, Hcy),是体内蛋氨酸循环代谢形成的中间产物。大量临床研究表明,摄入过多含有蛋氨酸的食品会导致血浆 Hcy 含量升高,超过血浆正常值范围($5 \sim 15 \mu\text{mol/L}$),可能诱发高同型半胱氨酸血症^[1]。高半胱氨酸通过直接或间接作用导致血管内皮功能障碍,影响内皮依赖性舒张因子释放,并促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖,导致血管张力调节异常,从而影响动脉粥样硬化(atherosclerotic)等心血管

疾病的发生、发展和转归。适宜运动可以改善血管内皮分泌功能,调节 NO 的分泌与释放状态,从而发挥抗血管痉挛作用,降低心血管疾病的发病率。本研究以高蛋白饮食大鼠为实验对象,探讨适宜运动对血浆总一氧化氮合成酶(total nitric oxide synthetase, T-NOS)和一氧化氮(nitric oxide, NO)含量的影响,以期预防高半胱氨酸血症乃至动脉粥样硬化提供新的研究思路。

材料与方法

一、动物选择与分组

选用健康雄性 8 周龄 Wistar 大鼠 24 只,体重(155

作者单位:325035 温州,温州医学院环境与公共卫生学院预防医学系(杨波);浙江省宁波市妇女儿童医院儿科(罗芳);扬州大学运动医学研究所(张钧)

± 5) g, 由中国科学院上海实验动物中心提供。习服饲养后, 随机分为正常饮食对照组(对照组)、高蛋白氨基酸饮食组(高蛋白氨基酸组)和有氧运动 + 高蛋白氨基酸饮食组(运动加高蛋白氨基酸组), 每组 8 只。

二、高半胱氨酸血症大鼠模型的建立

按照文献[2]介绍的方法建立高半胱氨酸血症大鼠模型, 其血浆 Hcy 浓度达到对照组 2 倍以上, 表明造模成功^[3]。高蛋白氨基酸组和运动加高蛋白氨基酸组大鼠喂饲含 3% 高蛋白氨基酸的饲料, 对照组给予正常饮食饮水, 共持续 8 周, 并分别记录各组大鼠日平均摄食总量。高蛋白氨基酸饲料由南京安立默实验动物饲料有限公司加工制作, L-蛋氨酸为上海斐雅科技发展有限公司产品, 批号为 20040210, 符合 AJ192 版产品质量标准的规定。饲料在制成颗粒以前, 将原料分为两部分, 一部分直接加工成普通饲料, 另一部分按 3% 的比例添加蛋氨酸, 制成颗粒饲料。

三、运动方法

适应性喂养 1 周后, 运动加高蛋白氨基酸组大鼠同时进行无负重游泳运动训练, 每周 6 d。第 1 天运动时间为 10 min, 以后每天递增 10 min, 至周末增至 60 min, 第 2 周每天递增 5 min, 至周末增至 90 min。以后维持此运动时间, 持续 8 周。

四、取样方法

运动加高蛋白氨基酸组大鼠最后 1 次游泳结束后, 各组禁食 24 h, 称重; 大鼠用 2% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 注入含 2% EDTA- Na_2 的无菌抗凝试管中, 并将其置于冰浴中预防溶血; 常规制备血浆, 抽取血浆保存于 -20°C 以下冰箱中, 待测。

五、测试方法

1. 大鼠日平均摄食总量: 于适应性喂养 1 周后, 各组大鼠给予等量的颗粒饲料 D1, 共 200 g, 次日清晨大鼠游泳训练结束后, 将该组剩余食物称重 (D2), 两次食量记录之差除以各组大鼠的只数即为大鼠日平均摄食总量 (D), 即 $D = (D1 - D2) / 8$ 。

2. 血浆 Hcy 的测定: 试剂盒由北京阜外心血管病医院中德分子医学中心提供。采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定, 参照 Huang 等^[4]介绍的方法, 取 240 μl 样品血浆, 加入 60 μl 乙酰半胱氨酸 (Fluka 公司提供, 美国) 和 30 μl 的 3-丁基磷 (Sigma 公司提供, 美国), 混匀后于 4°C 下水浴 30 min; 再加入 300 μl 预冷的高氯酸钠 0.6 mol/L, 充分混匀后静置 10 min; 以 $2\,000 \times g$ 离心 10 min, 取上清 50 μl , 加入 1.55 mol/L 的 NaOH 10 μl 和 0.125 mol/L 的硼酸缓冲溶液 125 μl (pH 值 9.5, 含 4 mmol/L 的 EDTA); 再加入 50 μl 的 S-DBF 1 mg/ml, 充分混匀后, 于 60°C 下水浴; 放置 1 h, 冷却

备用。测定仪器: HP1100 型 HPLC 测定仪, HP1046A 荧光探测器, C18 反相分析柱。检测条件: 激发波长为 390 nm, 发射波长为 470 nm; 每次上样 15 μl , 流动相为 0.08 mol/L, pH 值为 4.0 的醋酸缓冲溶液和 0.1% 的甲醇; 流速为 0.8 ml/min, 洗脱时间为 15 min。

3. 血浆 T-NOS 和 NO 含量的测定: 严格按试剂盒说明书进行操作, 分别采用硝酸酶还原法和比色法测定, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

六、统计学分析

实验结果均采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学分析应用 SPSS 11.0 版统计分析软件中成组设计多样本均数比较的方差分析, 两两比较采用 SNK- q 检验进行分析。

结 果

一、各组大鼠体重变化

实验后各组大鼠体重均有所增长, 运动加高蛋白氨基酸组和高蛋白氨基酸组大鼠体重均显著低于对照组, 运动加高蛋白氨基酸组大鼠体重显著低于高蛋白氨基酸组 (均 $P < 0.01$), 见表 1。表明高蛋白氨基酸饮食对大鼠体重的增长有明显的抑制作用; 游泳运动对高蛋白氨基酸饮食大鼠体重的增长有抑制作用。

表 1 各组大鼠实验前、后体重及日平均摄食量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	体重 (g)		日平均摄食总量 (g/d)
		实验前	实验后	
对照组	8	152.5 $\pm$ 3.9	348.2 $\pm$ 9.5	20.39 $\pm$ 2.34
高蛋白氨基酸组	8	153.4 $\pm$ 2.9	268.9 $\pm$ 10.1 ^a	19.07 $\pm$ 3.15
运动加高蛋白氨基酸组	8	152.4 $\pm$ 4.7	240.0 $\pm$ 11.3 ^{ab}	19.34 $\pm$ 3.86

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与高蛋白氨基酸组相比, ^b $P < 0.01$

二、各组大鼠日平均摄食总量比较

单因素方差分析表明, 各组大鼠饲养期间日平均摄食总量差异无统计学意义 ($F = 2.140$, $P = 0.122$), 对照组大鼠日平均摄食总量略高于高蛋白氨基酸组和运动加高蛋白氨基酸组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

三、各组大鼠血浆 Hcy、T-NOS 和 NO 含量比较

由表 2 可知, 各组血浆 Hcy 含量差异有统计学意义。与对照组相比, 高蛋白氨基酸组大鼠血浆 Hcy 含量显著升高 ($P < 0.05$), 达对照组的 2 倍以上。与高蛋白氨基酸组相比, 运动加高蛋白氨基酸组血浆 Hcy 显著下降 ($P < 0.05$), 且与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

与对照组相比, 高蛋白氨基酸组大鼠血浆 T-NOS 含量显著降低 ($P < 0.01$), NO 含量也显著下降 ($P < 0.05$); 与高蛋白氨基酸组相比, 运动加高蛋白氨基酸组大鼠血浆 T-NOS 含量和 NO 含量均显著升高 ($P < 0.05$), 且

与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠血浆 Hcy 含量、T-NOS 和 NO 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	T-NOS (U/L)	NO ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	8	8.67 $\pm$ 1.881	7.31 $\pm$ 0.399	60.12 $\pm$ 5.747
高蛋氨酸组	8	23.02 $\pm$ 3.912 ^a	5.31 $\pm$ 0.700 ^b	45.24 $\pm$ 5.087 ^a
运动加高蛋氨酸组	8	11.40 $\pm$ 2.199 ^c	6.35 $\pm$ 0.702 ^c	55.68 $\pm$ 6.805 ^c

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与高蛋氨酸组相比,^c $P < 0.05$

讨 论

一、有氧运动对高蛋氨酸饮食大鼠血浆 Hcy 含量的影响

目前,大量研究表明,血浆 Hcy 水平升高是导致动脉粥样硬化发生的一个独立危险因素。Hcy 是蛋氨酸代谢的中间产物,Morita 等^[3]报道,大鼠经过 8 周含 0.3% 蛋氨酸的饲料喂养后,血浆 Hcy 水平达对照组的 2 倍,从而诱发高半胱氨酸血症。本实验选用雄性健康 Wistar 大鼠,以含 3% 蛋氨酸饲料喂养 8 周后,结果显示,高蛋氨酸组大鼠血浆 Hcy 含量达(23.02 $\pm$ 3.912) $\mu\text{mol/L}$,超过对照组的 2 倍以上,表明高蛋氨酸饮食可诱发大鼠高半胱氨酸血症,与上述研究报道一致。运动作为能有效预防动脉粥样硬化的手段之一,已在实践中广泛应用。而运动与高半胱氨酸的关系国内报道较少。Konig 等^[5]发现,中低强度训练的百米运动员血浆 Hcy 水平显著下降,且叶酸水平无显著降低;Vincent 等^[6]也报道了采用低强度的抗阻力量训练可以降低 60 ~ 80 岁的老年人血浆 Hcy 含量。本实验结果表明,适宜的运动可以预防由于蛋氨酸摄入过量而引起的血浆 Hcy 水平升高,这可能与增强 Hcy 代谢有关。

二、有氧运动对高蛋氨酸饮食大鼠 T-NOS 和 NO 含量的影响

研究发现,将牛主动脉内皮细胞暴露于 Hcy 生理浓度下约 15 min,可刺激 NO 的释放;提高 Hcy 至病理浓度并延长暴露时间,则 NO 的生成明显下降^[7]。Lee 等^[8]对兔喂养含 0.3% 蛋氨酸的饮食 8 周,发现兔血浆 Hcy 水平从(6.5 $\pm$ 0.4) mmol/L 上升到(26.2 $\pm$ 2.5) mmol/L,脑血管内皮细胞 T-NOS 表达明显下降,NO 分泌减少。本实验结果显示,与对照组相比,高蛋氨酸组大鼠血浆 T-NOS 和 NO 含量均显著下降,提示 Hcy 水平异常升高可能引起 T-NOS 活性下降,导致内皮源性 NO 生成下降和大量灭活,其原因可能是由于 Hcy 水平异常升高,其巯基自氧化过程中所释放的大量活性氧自由基引起 NOS 活性下降,并可同时与 NO 结合生成过氧亚硝酸盐(OONO⁻),导致 NO 的生成和

释放缺陷^[9],造成 NO 的生物利用度下降,从而诱发血管痉挛和舒张功能下降。

大量研究表明,适宜的运动训练能影响机体 NO 的生成和释放^[10],提高 NOS 活性,增加其基因表达水平,进一步增强内源性 NO 的生成能力。Maeda 等^[11]研究发现,8 名健康男性受试者进行为期 8 周的有氧运动训练后,血清 NO 含量显著增加;Hayward 等^[12]将大鼠分为安静对照组和运动训练组,经 6 周跑台运动训练后,取各组大鼠主动脉弓部置于 2 mol/L 的 Hcy 溶液中孵育 120 min,发现运动组大鼠主动脉弓内皮细胞 NOS 活性明显增强,其表达也明显高于对照组,提示适宜的运动训练可以提高内皮 NOS 的活性,促进 NOS 蛋白的表达,增加高半胱氨酸血症状态下内皮源性 NO 的合成。本研究结果显示,运动加高蛋氨酸组大鼠血浆 T-NOS 和 NO 含量均显著高于高蛋氨酸组($P < 0.05$),且与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);表明适宜运动可以改善因血浆 Hcy 水平升高导致的 T-NOS 活力下降和 NO 分泌失衡,为预防高半胱氨酸血症所致的内皮 NO 分泌功能障碍提供了理论依据。

综上所述,长期中等负荷的运动可以降低高蛋氨酸饮食大鼠血浆 Hcy 水平,提高血浆 T-NOS 含量,促进内皮 NO 的合成与释放,预防高半胱氨酸血症。

参 考 文 献

- [1] Armando D, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood*, 1997, 90:1-11.
- [2] 蔡东联, 陈小莉. 高蛋氨酸饮食对大鼠生长及氨基酸代谢的影响. *中国临床营养杂志*, 2002, 10:248-251.
- [3] Morita H, Kurihara H, Yoshida S, et al. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Circulation*, 2001, 103:133-139.
- [4] Huang QQ, Hui RT, Zhang CL. Application of HPLC for determination of homocysteine level in plasma. *Int J Med*, 1999, 3:50-52.
- [5] Konig 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. *Ann Nutr Metab*, 2003, 47:114-118.
- [6] Vincent KR, Braith RW, Bottiglieri T, et al. Homocysteine and lipoprotein levels following resistance training in older adults. *Prev Cardiol*, 2003, 6:197-203.
- [7] Kiowski W, Linder L, Stoschitzky B, et al. Diminished vascular response to inhibition of endothelium derived nitric oxide and enhanced vasoconstriction to exogenously administered endothelin-1 in clinically healthy smokers. *Circulation*, 1994, 90:27-34.
- [8] Lee H, Kim HJ, Kim J, et al. Effects of dietary folic acid supplementation on cerebrovascular endothelial dysfunction in rats with induced hyperhomocysteinemia. *Brain Res*, 2004, 996:139-147.
- [9] Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest*, 1996, 98:5-7.

- [10] Jungersten L, Ambring A, Wall B, et al. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol*, 1997, 82:706-704.
- [11] Maeda S, Miyauchi T, Kakiyama T, et al. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1, and nitric oxide, in healthy young humans. *Life Sci*, 2001, 69:1005-1016.
- [12] Hayward R, Ruangthai R, Karnilaw P, et al. Attenuation of homocysteine-induced endothelial dysfunction by exercise training. *Pathophysiology*, 2003, 9:207-214.

(收稿日期:2007-12-29)

(本文编辑:吴倩)

· 短篇论著 ·

面肌运动功能训练治疗周围性面神经麻痹的疗效观察

张永红

周围性面神经麻痹在临床中较为常见,针对急性期(即发病 2 周以内)面神经麻痹患者的治疗尤为重要,如患者治疗不及时或不彻底将有可能遗留后遗症。我科于 2002 年至 2006 年期间对发病 2 周以内的周围性面神经麻痹患者进行面肌运动功能训练和药物联合治疗,取得满意疗效。现报道如下。

一、资料与方法

共选取 2002 年至 2006 年期间在我院治疗的周围性面神经麻痹患者 125 例,其病程均在 2 周以内,男 71 例,女 54 例;年龄 4~72 岁,平均 (51.45 ± 13.22) 岁;均为单侧发病。将其随机分为治疗组(63 例)和对照组(62 例)。治疗组男 36 例,女 27 例;年龄 4~72 岁,平均 (51.27 ± 14.01) 岁;轻度患者 19 例,中度患者 43 例,重度患者 1 例;病程 1~2 周,平均 (7 ± 5) d。对照组男 35 例,女 27 例;年龄 9~70 岁,平均 (50.45 ± 13.96) 岁;轻度患者 17 例,中度患者 43 例,重度患者 2 例;病程 1~2 周,平均 (8 ± 6) d。2 组患者一般情况及病情经统计学分析,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

对照组患者单纯给予药物泼尼松口服治疗,每天口服 2 次,20 mg/次,3 d 后减量,改为 10 mg/次,口服药物时间持续 1 周;同时肌注维生素 B₁,每次 100 mg,每天 1 次;肌注维生素 B₁₂ 1 000 μg/次,每周 1 次,共持续肌注 3 个月。

治疗组患者在上述药物治疗基础上,同时进行面肌运动功能训练。面肌运动功能训练根据患者面神经损伤区域及程度,重点对患者额、眼周、鼻、口周 4 个部位面肌运动功能进行训练,具体训练动作包括抬眉、蹙眉、蹙鼻、闭眼、露齿、提口角、鼓腮、吹口哨等,并嘱患者用患侧牙齿嚼口香糖。如患者不能主动进行上述运动,则可用手指辅助其进行训练。上述各项训练每次练习 10 遍以上,每次训练持续 30 min,每天训练 3~4 次。

疗效评定标准:痊愈——患者面肌运动功能正常;显效——面肌运动功能大部分恢复,面肌不运动时面部外观正常,眼睑能闭合,鼻唇沟略浅,发笑时口角略歪;好转——面肌运动功能部分恢复,面部不对称较明显,但较治疗前减轻;无效——面肌运动功能无明显变化^[1]。

统计学分析:采用 χ^2 检验对 2 组患者临床疗效进行比较。

二、结果

2 组患者分别于治疗 3 个月后进行疗效评定,发现治疗组痊愈 61 例,显效 2 例,治愈率为 96.83%;对照组痊愈 49 例,显效 11 例,好转 2 例,治愈率为 79.03%。2 组患者治愈率经统计学分析,发现组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),即治疗组患者临床疗效明显优于对照组。

三、讨论

周围性面神经麻痹的主要病理特征是面神经水肿,急性期治疗主要以控制炎症水肿、改善局部血液循环、减轻神经受压等措施为主^[2,3],患者一般经 1 个疗程激素治疗后,多能取得显著短期效果。但如只给予单纯激素治疗,往往急性期过后,很多患者面肌功能仍得不到完全恢复,如在进行面部运动时,可发现双侧面肌仍有差异,患侧运动功能稍差等。故针对急性期周围性面神经麻痹的治疗非常重要,决定着患者将来的恢复情况。周围性面神经麻痹患者最迫切的治疗目标是如何尽快恢复瘫痪面肌主动运动功能,因此临床治疗不但需要用药物控制患部炎症、水肿,还要针对患者面肌运动功能给予相应训练,以防止面肌萎缩,促进面神经功能恢复,减少并发症发生^[4]。本研究治疗组患者在药物治疗基础上给予面肌运动功能训练,发现其临床疗效明显优于对照组($P < 0.05$),表明药物联合面肌运动功能训练在治疗周围性面神经麻痹方面具有协同功效,促使疗效进一步提高,其中药物治疗能控制患部炎症水肿,而面肌运动功能训练能改善局部血液循环,为受损神经功能恢复创造有利条件,可维持肌肉营养供应,预防和减轻面肌萎缩,促进肌肉力量及运动功能尽快恢复^[1]。

参 考 文 献

- [1] 郭绮云,葛兆希. 综合疗法治疗周围性面神经麻痹. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:629-630.
- [2] 邱蔚六,主编. 口腔颌面外科学. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:364.
- [3] 李浩范,马美子. 综合康复治疗周围性面神经麻痹 234 例. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:76.
- [4] 施晓健,俞光岩,杨朝晖. 功能训练治疗创伤性面神经损伤临床观察. *中华理疗杂志*, 2000, 21:300-333.

(修回日期:2008-02-12)

(本文编辑:易浩)