

# 有氧运动加螺旋藻补充对 2 型糖尿病大鼠肾脏 TLR4/ NF- $\kappa$ B-p65 的表达及炎症因子的影响

朱洪竹\*, 朱梅菊, 曾志刚, 丁孝民, 伍人乐

井冈山大学体育学院, 吉安 343009

**摘要:** 本文旨在研究有氧运动加螺旋藻补充对 2 型糖尿病大鼠肾脏 TLR4/NF- $\kappa$ B-p65 的表达及炎症因子的影响, 以 TLR4/NF- $\kappa$ B-p65 炎症信号通路为靶点探讨运动加螺旋藻补充改善 2 型糖尿病大鼠肾脏损伤的可能机制。采用 4 周高脂饲料喂养和低剂量 STZ 腹腔注射的方法建立 2 型糖尿病大鼠实验模型, 成模后将大鼠随机分为糖尿病安静对照组 (DM)、糖尿病运动组 (DE)、糖尿病 + 螺旋藻组 (DS)、糖尿病运动 + 螺旋藻组 (DES), 另设正常安静对照组 (NC)。运动方式采用 8 周的无负重游泳训练。实验末, 测随机血糖、微量白蛋白、肾脏测 TNF- $\alpha$ 、TLR4 和 NF- $\kappa$ B-p65 蛋白表达, 并采用光镜观察肾脏微细结构的改变。结果表明: (1) 光镜下可见 DE 组、DS 组和 DES 组大鼠肾小球毛细血管袢面积增加; 肾小管扩张、上皮细胞空洞变性、细胞聚集增加和炎症细胞稍浸润等病理变化均较 DM 组有所改善。(2) DE 组、DS 组和 DES 组大鼠的血糖浓度、尿微量白蛋白含量均较 DM 组降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与 DES 组比较, DE 组和 DS 组的血糖浓度、尿微量白蛋白含量均升高明显 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。 (3) DE 组、DS 组和 DES 组大鼠肾脏 TNF- $\alpha$ 、TLR4 和 NF- $\kappa$ B-p65 蛋白表达均明显降低, 与 DM 组比较, 差异均呈显著性 ( $P < 0.01$ ); 与 DES 组比较, DE 组和 DS 组的肾脏 TNF- $\alpha$ 、TLR4 和 NF- $\kappa$ B-p65 蛋白表达明显增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。因此, 有氧运动、螺旋藻及两者联合使用有降低 2 型糖尿病大鼠血糖, 改善肾功能, 减轻肾脏损害的功效, 但两者联合使用效果要好于单独使用, 其机制可能与有氧运动联合螺旋藻降低 TLR4/NF- $\kappa$ B-p65 信号蛋白表达发挥抗炎作用的效果要好于单纯的有氧运动或螺旋藻使用。

**关键词:** 2 型糖尿病; 游泳运动; 螺旋藻; 肾脏损伤; TLR4/NF- $\kappa$ B-p65

中图分类号: R131

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.007

## Effects of Aerobic Exercise plus Spirulina Supplement on the Expression of TLR4/ NF- $\kappa$ B-p65 and Inflammatory Factor in Kidney Tissue of Type 2 Diabetes Rats

ZHU Hong-zhu\*, ZHU Mei-ju, ZENG Zhi-gang, DING Xiao-min, WU Ren-le

School of PE & Sports Science, Jinggangshan University, Jian 343009, China

**Abstract:** To investigate the effects and possible mechanism of aerobic exercise and spirulina supplement on the protein expression of TLR4/NF- $\kappa$ B-p65 as a target of improving renal injury and inflammatory factor in kidney tissue of type 2 diabetic rats. The model of type 2 diabetic rats was established through SD rats fed high-fat diet for four weeks together with intraperitoneal infecting a low dose of STZ. The model rats were randomly divided into diabetic control group (DM) and diabetic exercise group (DE) with intervention of swimming training for eight weeks, and diabetic plus spirulina group (DS) and diabetic exercise plus spirulina group (DES), additionally provided normal control group (NC) without any intervention. The blood glucose concentrations and the excretion of 24 h microalbuminuria (UAE) were examined, and the expressions of TNF- $\alpha$ , TLR4 and NF- $\kappa$ B-p65 in the renal cortex and glomerular microstructure changes were observed by light microscope after the experiment end. The results indicated that group DM had pathological changes of glomerular capillary loop increased and dilation of renal tubule and its epithelial cell epithelial and degeneration. In addition,

cell aggregation increased and infiltration of inflammatory cells, while the above glomerular injury improved significantly in groups of DE, DS and DES with exercise and spirulina supplement through light microscope. Compared with group DM, the concentrations of blood glu-

收稿日期: 2016-11-04 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 国家自然科学基金 (31360255); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ150770); 井冈山大学自然科学研究项目 (JZB1313)

\* 通信作者 E-mail: 2911106632@qq.com

cose and 24h UAE in the intervention groups decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and that improved significantly after two interventions than the single intervention. Compared with group DM, the expressions of NF- $\kappa$ B-p65 and TNF- $\alpha$ , TLR4 significantly decreased in group DE of the renal cortex ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and that improved significantly after two interventions than the single interventions. Therefore, exercise and/or spirulina supplement can improve blood glucose and renal function, and decrease renal injury for type 2 diabetes. Combination of swimming and spirulina supplement showed stronger effects on protein expression of TLR4/NF- $\kappa$ B-p65 signal which had anti-inflammatory effect than either sole swimming or sole spirulina supplement.

**Key words:** type 2 diabetes; exercise training; renal injury; TLR4/NF- $\kappa$ B-p65; spirulina

最近研究表明, 糖尿病肾病是一种慢性的低度炎症性疾病。炎症机制在糖尿病肾病等微血管并发症的发生发展中起着关键作用<sup>[1]</sup>。TLR4 是发现最早, 研究最多的 TLR 受体, 其主要配体为 LPS, 其信号通路激活后能启动 MCP-1、TNF- $\alpha$  等炎症因子的转录和合成, 与炎症因子的产生密切相关<sup>[2]</sup>。研究又知, TLR 受体(一般为 TLR4)与配体结合后, 激活其信号传导级联反应, 活化核因子- $\kappa$ B (nucleus factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B), 进而促进机体释放 IL-8、TNF- $\alpha$  等炎症因子<sup>[3]</sup>。Kawai T<sup>[4]</sup> 研究认为, TLR4 是通过 MyD88 依赖性通路来激活 NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B 又进一步激活下游 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等多种炎症基因的转录。而这些炎症细胞因子是造成肾小球基底膜通透性增高, 蛋白尿的排出<sup>[3]</sup>, 肾脏损伤加重的重要因子。前人研究已证实, 8 周有氧游泳运动能降低 2 型糖尿病大鼠的血清 TNF- $\alpha$ 、CRP 的含量, 大鼠炎症状态明显改善<sup>[5]</sup>。又前期研究已知, 有氧游泳运动可降低 2 型糖尿病大鼠蛋白尿的排泄, 改善肾功能, 保护受损肾脏<sup>[6]</sup>。但有氧运动的肾保护作用是否能通过对 TLR4/NF- $\kappa$ B-p65 炎症信号的调节来减弱其下游 TNF- $\alpha$  对肾脏引起的炎症损伤? 目前尚不明确。大量研究表明, 螺旋藻具有降糖降脂调脂等多种药理作用。关于有氧运动及联合应用螺旋藻对 TLR4/NF- $\kappa$ B-p65 炎症信号通路影响的研究尚无。本文在前期研究的基础上, 采用高脂饲料 4 周喂养加注射低剂量链脲佐菌素 (STZ) 方法制备 2 型糖尿病大鼠实验模型, 通过检测大鼠血糖、肾功能、TNF- $\alpha$ 、TLR4 和 NF- $\kappa$ B-p65 蛋白表达, 以 TLR4/NF- $\kappa$ B-p65 炎症信号通路为靶点, 探讨有氧运动和螺旋藻及两者联合使用改善 2 型糖尿病大鼠肾脏损伤的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物造模与分组

选取 SPF 雄性 SD 大鼠 70 只, 5 周龄, 体质量

$160 \pm 20$  g, 由中国科学院上海实验动物中心湖南斯莱克景达实验动物公司提供实验动物, 许可证号: SCXK(湘)2009~0004。模型的建立参照 Reed 等<sup>[7]</sup>方法进行改良。适应性喂养 3 d 后, 随机分为正常安静对照组 (NC 组,  $180.21 \pm 12.8$  g, 10 只) 和造模组 ( $189.21 \pm 20.12$  g, 60 只) 2 组。两组大鼠体重无显著性差异。NC 组大鼠继续饲喂普通饲料, 造模组改喂高脂膳食 (普通饲料 63.5%、蔗糖 20%、猪油 10%、蛋黄粉 5%、胆固醇 1%、胆酸盐 0.5%)。4 周后, 造模组大鼠一次性腹腔注射  $35$  mg/kg·bw STZ, 以制备 2 型糖尿病大鼠实验模型。72h 后, 尾静脉采血测试血糖, 以随机血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 入选暂成模标准。续续观察 1 周后, 再测血糖, 随机血糖仍  $\geq 16.7$  mmol/L 为 2 型糖尿病建模成功。未成模大鼠共 12 只剔除。成模大鼠 48 只随机分为糖尿病安静对照组 (DM, 12 只)、糖尿病 + 运动组 (DE, 12 只)、糖尿病 + 螺旋藻组 (DS, 12 只) 和糖尿病运动 + 螺旋藻组 (DES, 12 只)。

### 1.2 螺旋藻灌胃处理

螺旋藻临用前溶于生理盐水制成混悬液, 采用灌胃的方式, 剂量选择参照文献<sup>[8]</sup>按每天  $300$  mg/kg·bw 给药, 给药体积  $2$  mL/kg, 每周 7 d, 1 次/d, 连续 8 周。对照组灌胃同等体积生理盐水。

### 1.3 动物训练方案

游泳训练方案参照 Ploug 等<sup>[9]</sup>报道的方法, DE 组大鼠第 1 周和第 2 周分别以  $30$  min/d,  $45$  min/d,  $5$  d/周的强度训练, 之后逐渐增加至  $60$  min/d, 每周训练 6 d, 中间休息 1 d, 连续训练 8 周。水温保持在  $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 水深  $50$  cm。

### 1.4 主要试剂

螺旋藻胶囊: 深绿色粉末, 由云南施普瑞生物公司提供, 国药准字: Z53020227。免抗鼠 TNF- $\alpha$ 、TLR4、NF- $\kappa$ B-p65 均为多克隆抗体, 购于北京利德曼生化技术有限公司; 大鼠尿微量白蛋白 (UAE) ELISA Kit 购自美国 ABR 公司。

### 1.5 实验取材与指标检测

#### 1.5.1 实验取材

模型建立8周游泳运动干预停止36h后,代谢笼收集24h尿液,记录尿量,从中取2mL,测24hUAE排出量。腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠,暴露心脏,心脏采血,经左心室插管冷生理盐水充分灌洗肾脏,取新鲜肾皮质,一半置10%甲醛固定溶液中固定,作肾脏病理学和免疫组化检测;一半置液氮中速冻后转移到-80℃超低温冰箱保存,待作免疫印迹法检测。

#### 1.5.2 指标检测

##### 1.5.2.1 肾脏光镜标本的制备

固定好的组织经常规梯度脱水与透明、包埋与切片。切片按常规方法制作光镜标本。切片经脱蜡、染核、分色、蓝化、染胞核、梯度脱水、透明、封片、镜检。采用CK40-F2000型光学显微镜,观察肾小球大小和结构、肾小管和肾间质等形态和结构。

##### 1.5.2.2 血糖和24hUAE测定

血糖采用生化法;24hUAE采用酶联免疫法(ELISA法)。

##### 1.5.2.3 NF-κB-p65免疫组织化学检测

采用Envision免疫组织化学染色测定NF-κB-p65蛋白表达。参照试剂盒说明书进行操作。(NF-

κB-p65一抗工作浓度:1:500)。用CK40-F2000型光学显微镜观察染色结果。NF-κB-p65蛋白采用Image-Pro Plus 生物学图像分析软件观察其阳性表达,以胞质内出现淡黄色、黄色、黄褐色颗粒视为阳性,测定NF-κB-p65的IOD值和AREA,计算MOD,即MOD=IOD值/AREA,其值越大表示NF-κB-p65阳性产物表达越强。

##### 1.5.2.4 TNF-α、TLR4指标Western-blotting检测

TNF-α、TLR4 Western-blotting检测步骤:BCA法定量蛋白,每组取100ug总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将目的蛋白转移至PVDF膜上,10%脱脂奶粉室温震荡封闭2.0h,加入特异性一抗孵育过夜,洗膜、显色、定影。

### 1.6 数据处理

实验数据采用均数±标准差(Mean±SD)表示,用SPSS Statistics16.0统计软件对实验结果进行方差分析和两样本均数T检验,P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 各组大鼠血糖浓度和24hUAE含量的变化

如表1和表2可知,干预前,DM、DE、DS和DES组四组大鼠的血糖和24h尿微量白蛋白(24h

表1 各组大鼠血糖浓度的变化(mmol/L,N=7)

Table 1 Variations of blood glucose concentrations in five groups(mmol/L,N=7)

	NC	DM	DE	DS	DES
干预前(0周)Before intervention	6.68±0.57	17.39±2.52**	17.60±2.57**	17.48±2.01**	17.98±2.41**
干预第2周 Intervention after the 2 <sup>th</sup> week	6.59±0.62	21.30±2.15 <sup>++</sup>	22.37±1.14 <sup>++</sup>	22.92±1.30 <sup>++</sup>	22.45±1.57 <sup>++</sup>
干预第4周 Intervention after the 4 <sup>th</sup> week	6.74±0.75	22.09±2.42 <sup>++</sup>	22.11±1.64 <sup>++</sup>	22.18±2.51 <sup>++</sup>	22.09±1.95 <sup>++</sup>
干预第6周 Intervention after the 6 <sup>th</sup> week	6.52±0.74	23.02±2.82 <sup>++</sup>	21.98±1.98 <sup>++</sup>	22.00±2.51 <sup>++</sup>	21.01±2.25 <sup>++</sup>
干预第8周 Intervention after the 8 <sup>th</sup> week	6.61±0.45	23.94±2.05 <sup>++</sup>	21.02±2.02 <sup>++§</sup>	21.18±2.79 <sup>++§△</sup>	19.15±2.27 <sup>++§§</sup>

注:与NC组干预前比较,\*\*P<0.01;与NC组对应时间点比较,<sup>++</sup>P<0.01;与DM组对应时间点比较,<sup>§</sup>P<0.05,<sup>§§</sup>P<0.01;与DES组对应时间点比较,<sup>△</sup>P<0.05,<sup>△△</sup>P<0.01。表2与此相同。

Note:compared with before intervention of Group NC,\*\*P<0.01;compared with the corresponding time point of Group NC,<sup>++</sup>P<0.01;compare with the corresponding time point of Group DM,<sup>§</sup>P<0.05,<sup>§§</sup>P<0.01;compared with the corresponding time point of Group DES,<sup>△</sup>P<0.05,<sup>△△</sup>P<0.01. Same as table 2.

表2 各组大鼠24hUAE排出量的变化(mg/24h,N=8)

Table 2 Variations of 24h microalbuminuria excretion in five groups(mg/24h,N=8)

	NC	DM	DE	DS	DES
干预前(0周)Before intervention	9.62±1.32	35.11±2.61**	35.15±3.18**	36.01±2.58**	34.90±4.59**
干预第2周 Intervention after the 2 <sup>th</sup> week	9.21±1.14	45.27±2.14 <sup>++</sup>	45.42±2.35 <sup>++</sup>	45.15±6.88 <sup>++</sup>	46.00±5.25 <sup>++</sup>
干预第4周 Intervention after the 4 <sup>th</sup> week	9.51±1.23	46.45±5.02 <sup>++</sup>	44.81±4.57 <sup>++</sup>	45.00±7.63 <sup>++</sup>	43.28±6.56 <sup>++</sup>
干预第6周 Intervention after the 6 <sup>th</sup> week	10.05±1.00	47.52±4.23 <sup>++</sup>	44.02±3.21 <sup>++</sup>	44.92±6.58 <sup>++</sup>	42.86±7.95 <sup>++</sup>
干预第8周 Intervention after the 8 <sup>th</sup> week	9.74±1.56	49.28±3.48 <sup>++</sup>	42.17±4.58 <sup>++§§△△</sup>	43.19±7.05 <sup>++§§△△</sup>	38.45±5.41 <sup>++§§</sup>

UAE)均较 NC 组均非常显著升高 ( $P < 0.01$ )。与 NC 组相比,随着时间的延长,DM 组大鼠各时间点的血糖和 24 h UAE 均逐渐增高 ( $P < 0.01$ )。运动和螺旋藻补充 6 周后,各组大鼠的血糖均有所降低,第 8 周降低更为明显,与 DM 组同周相比,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );其中运动联合螺旋藻组 (DES 组) 更能显著降低糖尿病大鼠的血糖水平,并与 DS 组相比,差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。自第 4 周开始,DE、DS 和 DES 各组的 24 h UAE 排出量有所降低,第 8 周降低更为明显,与 DM 组同周相比,差异亦有统计学意义 ( $P < 0.01$ );其中 DES 组影

响 24 h UAE 的效果尤为明显,且与 DE 组和 DS 组相比,差异亦有显著性 ( $P < 0.01$ );DE 组血糖和 24 h UAE 值均低于 DS 组,两者比较均无明显差异。

## 2.2 光镜下肾脏微观结构的变化

正常安静对照组 (NC 组,图 1A) 在光镜下可见肾小球体积无明显增大,大小正常,结构清楚。与 NC 相比,糖尿病模型组 (DM,图 1B、C) 可见肾小球细胞核增多,肾小囊囊腔增大,毛细血管襻面积增加;肾小管扩张,上皮细胞空泡变性,炎症细胞浸润等病理现象。有氧运动和螺旋藻补充各组上述病理症状有一定改善 (图 1D ~ F)。

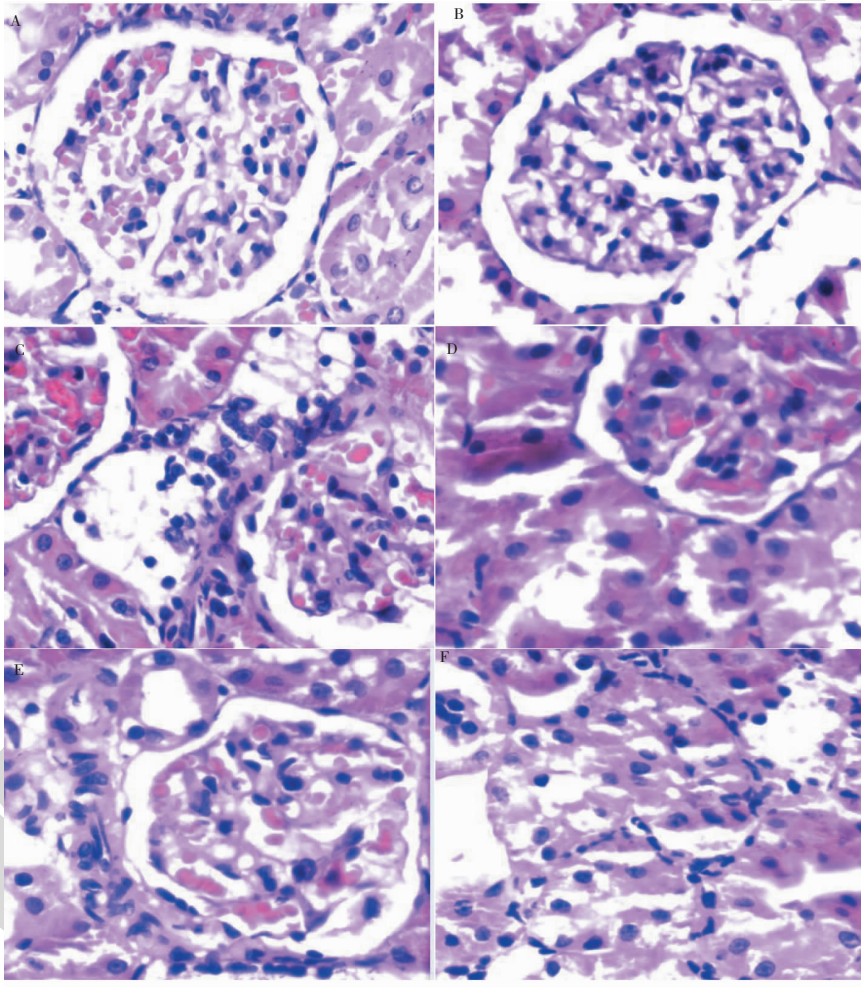


图 1 正常安静对照组 (NC 组, A)、糖尿病安静对照组 (DM 组, B、C)、糖尿病运动组 (DE 组, D)、糖尿病 + 螺旋藻 (DS 组, E) 和糖尿病运动 + 螺旋藻组 (DES 组, F) 大鼠肾组织 HE 染色 ( $\times 400$ )

Fig. 1 HE staining of renal tissue of normal control group (NC group, A), diabetic control group (DM group, B, C), diabetic exercise group (DE group, D), diabetic plus spirulina group (DS group, E) and diabetic exercise plus spirulina group (DES group, F) ( $\times 400$ )

## 2.3 各组大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B-p65 免疫组化检测结果

免疫组化染色结果显示 (图 2), NC 组 (图 2A) 正常肾脏细胞 NF- $\kappa$ B-p65 表达最弱, 阳性细胞着色

浅。DM 组、DE 组和 DS 组的 NF- $\kappa$ B-p65 表达较 NC 组增多 (均  $P < 0.01$ )。DE 组、DS 组和 DES 组大鼠的肾组织细胞 NF- $\kappa$ B-p65 的表达均较 DM 组明显降

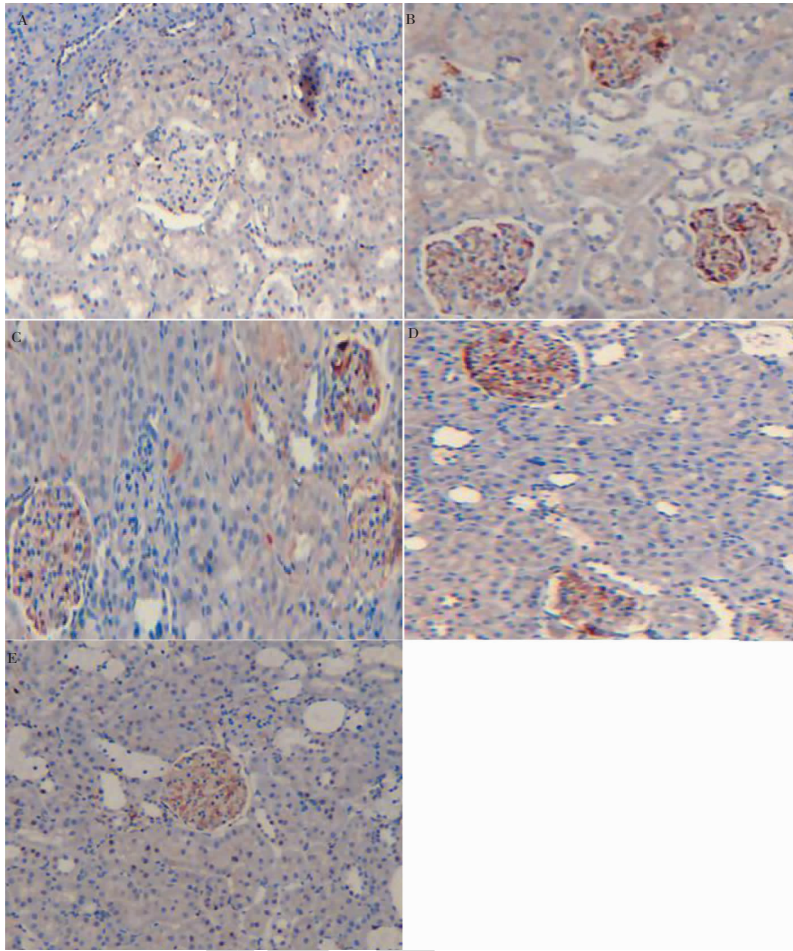


图2 正常安静对照组(NC组,A)、糖尿病安静对照组(DM组,B)、糖尿病运动组(DE组,C)、糖尿病+螺旋藻组(DS组,D)和糖尿病运动+螺旋藻组(DES组,E)大鼠肾组织NF-κB-p65免疫组化染色检测( $\times 100$ )

Fig. 2 NF-κB-p65 immunohistochemical staining of renal tissue of normal control group(NC group, A), diabetic control group(DM group, B), diabetic exercise group( DE group, C), diabetic plus spirulina group( DS group, D) and diabetic exercise plus spirulina group( DES group, E) ( $\times 100$ )

表3 各组大鼠肾组织NF-κB-p65的平均光密度值的变化(N=6, Mean  $\pm$  SD)

Table 3 Variations of NF-κB-p65 average staining intensity in renal cortex in five groups(N=6, Mean  $\pm$  SD)

组别 Group	NF-κB-p65		
	IOD	AREA	MOD
NC组 Group NC	111.02 $\pm$ 13.27	812.15 $\pm$ 2.54	0.14 $\pm$ 0.007
DM组 Group DM	336.25 $\pm$ 34.21	800.56 $\pm$ 4.59	0.42 $\pm$ 0.060 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup>
DE组 Group DE	195.25 $\pm$ 24.05	781.24 $\pm$ 3.71	0.25 $\pm$ 0.045 <sup><math>\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta^*</math></sup>
DS组 Group DS	208.56 $\pm$ 25.61	796.48 $\pm$ 10.82	0.26 $\pm$ 0.049 <sup><math>\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta^*</math></sup>
DES组 Group DES	174.88 $\pm$ 20.75	996.67 $\pm$ 25.15	0.18 $\pm$ 0.050 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup>

注:与NC组比较, <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ ;与DM组比较, <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ , <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ ;与DES组比较, <sup>$*$</sup>  $P < 0.05$ , <sup>$**$</sup>  $P < 0.01$ 。下图同。

Note: compared with NC,  <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ ; compared with DM,  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ ,  <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ ; compared with DES,  <sup>$*$</sup>  $P < 0.05$ ,  <sup>$**$</sup>  $P < 0.01$ . Same as below.

低( $P < 0.01$ ),其中DES组降低最为突出,与DE和DS组比较,差异有显著性( $P < 0.05$ ),但较NC组无明显统计学意义( $P > 0.05$ )。DS组大鼠的NF-κB-

p65表达量稍高于DE组,组间未见明显统计学差异( $P > 0.05$ ),但两者与DES组相比,差异均呈显著性( $P < 0.05$ )。

## 2.4 各组大鼠肾组织 TLR4、TNF- $\alpha$ Western-blotting 检测结果

如图 3 和图 4 所示,与 NC 组相比,DM 大鼠肾皮质 TNF- $\alpha$  和 TLR4 的蛋白水平明显增加,其差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。游泳运动和螺旋藻补充 8 周后,各组大鼠肾皮质的 TNF- $\alpha$  和 TLR4 的蛋白表达水平较 DM 组均显著降低( $P < 0.01$ );其中 DES 组的效果尤为明显,且分别与 DE 组和 DS 组比较,差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );DE 组大鼠的 TLR4 的蛋白水平高于 DS 组,其 TNF- $\alpha$  蛋白水平稍低于 DS 组,但组间均未见明显统计学差异( $P > 0.05$ )。

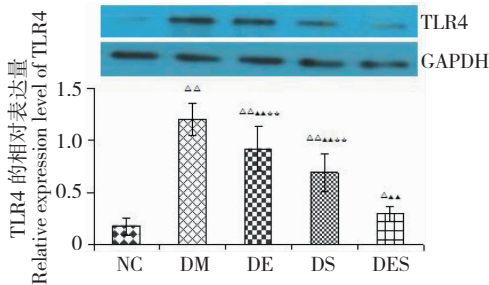


图 3 各组大鼠肾组织 TLR4 蛋白相对表达量的变化

Fig. 3 Variations of the relative protein expression of TLR4 in the renal tissues of five groups

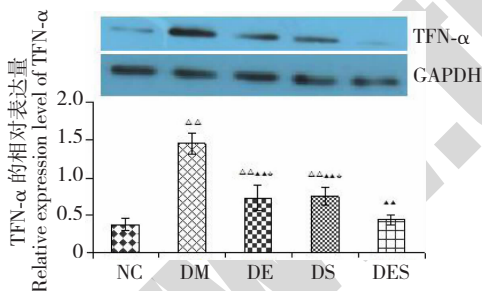


图 4 各组大鼠肾组织 TNF- $\alpha$  蛋白相对表达量的变化

Fig. 4 Variations of the relative protein expression of TNF- $\alpha$  in the renal tissues of five groups

## 3 分析与讨论

### 3.1 有氧运动和螺旋藻补充对 2 型糖尿病大鼠血糖、微量蛋白尿及肾脏微细结构的影响

本研究用高脂喂养配合低剂量 STZ 注射诱导建立 2 型糖尿病实验动物模型,成模大鼠除出现血糖显著升高,多饮多食多尿等 2 型糖尿病特点外,在成模后第 2 周干预前,糖尿病安静对照组 (DM 组) 和有氧运动和螺旋藻干预的各组大鼠,其 24 h 微量蛋白尿 (Urinary albumin excretion, UAE) 的排泄量较

正常安静对照组 (NC 组) 显著升高,其差异具有统计学意义。这表明,本研究复制的 2 型糖尿病模型大鼠肾功能在实验干预前已经明显受损,达到了 2 型糖尿病肾损伤早期的临床诊断标准<sup>[10]</sup>。从表 1 和表 2 实验结果发现,随着时间的延长,DM 组血糖浓度逐渐增加,UAE 的排泄量也相继出现增高,而其肾功能也相继降低明显,对糖尿病肾脏的损害也逐步加重,与前期研究报道相似<sup>[6]</sup>。同时光镜下的 DM 组大鼠可见肾小球细胞核增多,肾小囊囊腔增大,毛细血管襻面积增加;肾小管扩张,上皮细胞空泡变性,炎症细胞稍浸润等病理现象。这进一步从形态学方面佐证了本实验模型大鼠有 2 型糖尿病并发肾脏早期损伤的现象出现。先前研究显示<sup>[6]</sup> 有氧运动能降低 2 型糖尿病大鼠血糖,减少其蛋白尿的排泄。已往研究也表明<sup>[11]</sup> 螺旋藻具有降糖调脂、抗氧化、抗炎症等多重功效。有氧运动与螺旋藻有相似的降糖脂、抗氧化、减少炎症反应的功效。那么有氧运动与螺旋藻同时作用对 2 型糖尿病大鼠肾脏损伤的影响是否具有协同作用? 其作用机制是什么? 目前尚不清楚。本研究首次发现,8 周的有氧运动联合螺旋藻补充组 (DES 组) 大鼠的血糖明显低于单独的螺旋藻补充组 (DS 组),且其 24 h UAE 的排泄也明显低于单独的有氧运动组 (DE 组) 和 DS 组,结合肾脏病理检测结果,提示有氧运动联合螺旋藻除能有效降低血糖外,还能改善 2 型糖尿病大鼠肾功能和肾脏病理损伤,且联合使用的效果要优于单独使用,二者具有叠加效应。

### 3.2 有氧运动和螺旋藻补充对 2 型糖尿病大鼠肾脏 TLR4、NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$ 表达的影响

最近认为<sup>[12]</sup>,Toll-4 样受体在肾脏如内皮细胞、系膜细胞、足细胞、小管上皮细胞等固有细胞中也有大量表达。Toll-4 样受体 (TLR4) 的表达与肾脏炎症细胞浸润高度相关,TLR 通路可能介导糖尿病时肾脏的炎症浸润,而炎症机制是最近认为的在糖尿病并发肾病等微血管并发症的演变过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。我们的研究也证明了这一点。模型 DM 组大鼠出现肾小球细胞核增多,肾小囊囊腔增大;肾小管扩张,上皮细胞空泡变性,炎症细胞浸润等病理现象;同时从图 3 我们可知 DM 组大鼠肾脏 TLR4 蛋白表达明显高于正常 NC 组大鼠。这提示,本研究制作的 2 型糖尿病模型大鼠肾脏的炎症损伤可能与 TLR4 蛋白的表达上调有关<sup>[13]</sup>。研究发现<sup>[14]</sup>,运动对诸如糖尿病肝病、动脉粥样硬化等慢性代谢性疾病的改善作用,可能是因为运动能够减少 TLR4 的

表达,减少 TLR4 信号途径的激活,而起到抗炎的功效。TLR4 的调节有望成为延缓糖尿病肾病的一个新的靶标<sup>[15]</sup>。前面研究已阐明,8 周有氧游泳运动能减少 2 型糖尿病肾脏损伤,但目前尚不清楚运动的肾保护作用是否通过其对 TLR4 的调节来实现。本研究结果表明,运动干预的 DE 大鼠肾脏 TLR4 蛋白表达水平明显降低,表明运动对糖尿病大鼠肾脏损伤的改善可能与下调 TLR4 蛋白水平有关。目前少见有氧运动与 2 型糖尿病肾脏损伤和 TLR4 之间的关系研究。但 TLR4 在运动抗 2 型糖尿病肾脏损伤中具体是如何参与炎症的,尚不完全清楚。黄红丽<sup>[16]</sup> 研究认为,TLR4 表达的增加可能是妊娠期糖尿病(GDM)发病的重要环节,TLR4 可能通过介导 TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子参与了 GDM 的病理生理改变和促进疾病的发生与发展。TLR4 的配体通过与 TLR4 结合,启动下游因子的级联反应,激活核因子 NF- $\kappa$ B 转位,调控下游炎症介质如 TNF- $\alpha$  等的表达来介导胰岛素抵抗(IR),导致肾脏损伤<sup>[16]</sup>。李从青<sup>[17]</sup> 研究进一步表明,是 LPS-TLR4-NF- $\kappa$ B 通路介导了 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等炎症因子的大量释放,参与了 GDM 的发病机制。本研究结果显示,2 型糖尿病大鼠肾脏 TLR4 和 NF- $\kappa$ B-p65(NF- $\kappa$ B 的活性形式)表达水平均呈高表达,同时炎症因子 TNF- $\alpha$  表达也增加,再结合模型大鼠肾脏的病理结果和 UAE 的排泄,可以说明 TLR4 的高表达,激活了 TLR4 信号,通过增加 NF- $\kappa$ B-p65 的表达,来调节 TNF- $\alpha$  细胞因子的表达,而作用于肾脏固有细胞<sup>[18]</sup>;TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 及 TNF- $\alpha$  炎症因子有可能参与了本研究模型大鼠的肾脏炎症损伤。而糖尿病的慢性高血糖可能是这一通路激活的触发器<sup>[15]</sup>。

规律运动是预防和治疗 2 型糖尿病及并发症的关键。国内付德荣等研究认为<sup>[19]</sup>,6 周游泳运动在明显降低了 2 型糖尿病大鼠血糖的同时,其骨骼肌 NF- $\kappa$ B、MCP-1 及 MPO 的基因表达也明显下调,骨骼肌炎症损伤明显减轻。Golbidi 等<sup>[20]</sup> 报道,运动可以通过增加 1 $\kappa$ B 表达抑制 NF- $\kappa$ B 表达,而抑制 NF- $\kappa$ B 活化又可能间接抑制 TNF- $\alpha$  的促炎反应。我们实验也进一步发现,8 周游泳运动干预后,糖尿病大鼠血糖下降明显,而在肾脏 TLR4 与 NF- $\kappa$ B-p65 表达明显降低的同时,TNF- $\alpha$  表达水平也降低,UAE 排出量明显减少,肾脏病理损伤有所改善。以上提示有氧运动有可能通过抑制糖尿病状态下高血糖激活的 TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 通路,抑制炎症因子 TNF- $\alpha$  表达而作用于肾脏固有细胞,改善肾脏病理损伤,从

而减少蛋白尿的排泄,最终减轻对糖尿病肾脏的炎症损伤。TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 通路及炎症因子 TNF- $\alpha$  有可能是运动的新的肾保护作用靶点,具体机制尚有待进一步探讨。这在有关 TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 和 TNF- $\alpha$  与有氧游泳运动抗糖尿病肾脏损伤的实验中尚未见有报道。

目前已知,螺旋藻具有抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳、免疫调节和保护心血管机能等功效。近来发现其具有降糖作用<sup>[21]</sup>。螺旋藻可通过调节糖脂代谢对糖尿病、心血管疾病及一些炎症相关疾病有一定疗效<sup>[22]</sup>。有关螺旋藻抗糖尿病肾损伤的研究报道尚无。本研究发现,8 周的螺旋藻补充显著减少了 2 型糖尿病大鼠 UAE 排出量及肾脏结构损伤,降低其血糖水平,这说明螺旋藻对本实验模型大鼠肾脏损伤有一定的改善。同时实验还发现,螺旋藻也显著降低了 2 型糖尿病大鼠肾脏 TLR4 与 NF- $\kappa$ B-p65 表达及炎症因子 TNF- $\alpha$  水平,提示 8 周的螺旋藻补充对 2 型糖尿病大鼠肾损伤的改善有可能是其通过刺激  $\beta$  胰岛细胞释放胰岛素降低血糖<sup>[21 23]</sup> 来抑制大鼠肾脏 TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 表达及 TNF- $\alpha$  炎症因子水平实现。具体原因尚待进一步探讨。

有氧运动和螺旋藻联合对 2 型糖尿病大鼠肾脏 TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 通路及炎症因子 TNF- $\alpha$  水平的影响如何?是否具有协同效应?目前的研究尚未明确。本研究进一步显示,DES 组抑制 2 型糖尿病大鼠肾脏 TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 蛋白表达的效应明显高于 DE 组或 DS 组;对 TNF- $\alpha$  炎症因子水平的影响,DES 组较 DE 组或 DS 组亦明显,表明有氧运动与螺旋藻的联合使用效应要优于有氧运动或螺旋藻单一因素使用的效应。结合表 1、表 2 和图 1 肾脏病理损伤的改善,我们推测有氧运动联合螺旋藻对血糖的调节可能出现作用效果的叠加,最终通过其下调 TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 蛋白表达并减弱 TNF- $\alpha$  引起的炎症效应,从而减少蛋白尿的排出,减轻 2 型糖尿病大鼠肾脏早期损伤。具体原因有待进一步研究。

## 4 结论

在本实验条件下,8 周有氧游泳运动或螺旋藻补充可以较好的改善 2 型糖尿病大鼠血糖,提高其肾功能,并减轻大鼠肾脏早期损伤。原因可能与有氧运动或螺旋藻补充能抑制高糖环境下表达上调的 TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 通路及促炎因子 TNF- $\alpha$  表达有关,且两者联合使用时较单一因素使用时明显,具有协同增效作用。建议 2 型糖尿病患者要进行长期系

统的有氧运动,同时注意膳食中螺旋藻的补充。有效控制血糖的基础上,TLR4-NF- $\kappa$ B-p65 及 TNF- $\alpha$  有望成为有氧运动和螺旋藻改善 2 型糖尿病肾损伤的关键作用靶标。

#### 参考文献

- Tuttle KR. Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 1537-1538.
- Zhao BS(赵保胜), Liu HB(刘宏斌), Ma YY(马悦颖), et al. The effect of Guizhi decoction-containing serum on toll-like receptor 3, 4 and its downstream signal transduction pathway in mouse macrophages cell. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med* (中药药理与临床), 2007, 23(3): 1-4.
- Shen PX(申鹏霄), Wang js(王建生). Effect of ramipril on expression of TLR4, NF- $\kappa$ B and IL-8 in rats with adriamycin nephropathy. Zhengzhou: Zhengzhou University (郑州大学). MSc. 2010.
- Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappa B by Toll-like receptors. *J Trend Mol Med*, 2007, 13: 460-469.
- Bai HP(柏海平), Gao QJ(高前进). The effect of swimming exercise on inflammation and oxidative stress status in type 2 diabetic rats. *Chin J Rehabilitation Med* (中国康复医学杂志), 2013, 28: 708-713.
- Zhu HZ(朱洪竹), Xiao GQ(肖国强), Zhu MJ(朱梅菊), et al. Aerobic swimming exercise can improve renal function for type 2 diabetes rats through downregulating the activity of notch-1 signaling. *J Tianjin Univ Sport* (天津体育学院学报), 2014, 29: 1-5.
- Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat fed, streptozotocin treated rat. *Metabolism*, 2000, 49: 1390-1394.
- Wang SQ(王书全), Li L(李丽). Study on anti-fatigue effect of polysaccharide from *Spirulina platensis*. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2013, 34: 328-334.
- Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen D, et al. Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1990, 259: 778-786.
- Wu Y(吴燕). Diagnostic and therapeutic criteria for diabetic nephropathy. *Chin J Nephrol Dialysis Transplant* (肾脏病与透析肾移植杂志), 2004, 13: 463-465.
- Chu WL, Lim YW, Radhakrishnan AK, et al. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10: 53.
- Eleftheriadis T, Pissas G, Liakopoulos V, et al. Toll-like receptors and their role in renal pathologies. *Inflam Allergy-Drug Targets*, 2012, 11: 464-477.
- Leemans JO, Stokman G, Claessen N, et al. Renal-associated TLR2 mediates isonemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2894-2903.
- Lancaster GI, Febbraio MA. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. *Trends Immunol*, 2014, 35: 262-269.
- Li FL(李芳林), Qin ZH(钦卓辉), Qiu SH(邱少宏), et al. Expression of Toll-like receptor 4 in the kidney of diabetic rats. *Chin J Diabetes* (中国糖尿病杂志), 2013, 21: 939-942.
- Huang HL(黄红丽), Jiang YH(姜艳华), Xie Q(谢琴). Expression and its significance of TLR4 and TNF- $\alpha$  in gestational diabetes mellitus. *China Med Engineer* (中国医学工程), 2013, 23(4): 20-22.
- Li CQ(李从青), Yao J(姚洁), Liu CM(刘长明), et al. Effects of lipopolysaccharide on the expression of TLR4 mRNA and NF- $\kappa$ B mRNA of mononuclear cells in GDM patients. *Acta Univ Med Anhui* (安徽医科大学学报), 2011, 46: 254-257.
- Wei ZL(危正南), Li T(李涛), Zhang QH(张庆红), et al. The levels of MIF, TLR4 and TNF- $\alpha$  in patients with diabetic nephropathy and clinical significance. *Chin J Diffic Compl Cas* (疑难病杂志), 2016, 15: 165-168.
- Fu DR(付德荣), Sun XH(孙小华), Liu CY(刘承宜), et al. Effect of aerobic exercise plus glutamine supplement on expression of muscle NF- $\kappa$ B, MPO and MCP-1 Mrna of type 2 diabetes. *Sports Sci* (体育科学), 2012, 32(13): 55-61.
- Golbidi S, Mesdaghinia A, Laher I. Exercise in the metabolic syndrome. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 18: 349710.
- Zhou L(周岚). Advances studies on polysaccharides from *Spirulina platensis* and polysaccharides contained selenium in suppressing cancer and enhancing immune function. *Med Inf* (医学信息), 2008, 21: 429-431.
- Deng RT, Chow TJ. Hypolipidemic, antioxidant and anti-inflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovasc Ther*, 2010, 28(4): e33-e45.
- Muthuraman P, Senthilkumar R, Srikumar K. Alterations in beta-islets of Langerhans in alloxan-induced diabetic rats by marine *Spirulina platensis*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2009, 24: 1253-1256.