

◆运动医学◆

4 种运动三联征模型大鼠饮食紊乱、物质代谢调控机制比较研究

荆纯祥¹, 赵自明², 赖秋媛¹, 汶希¹, 焦润艺¹, 潘华山¹

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095

[摘要] 目的: 探讨持续递增负荷跑台运动和游泳力竭法复制运动三联症 (FAT) 大鼠模型, 及加用放血+环磷酰胺腹腔注射法复制气血亏虚证 FAT 大鼠模型饮食紊乱与物质代谢紊乱的调控机制。方法: SD 大鼠随机分为空白组 (正常饮食)、模型 1 组 (持续递增负荷跑台运动+限制饮食)、模型 2 组 (持续递增负荷跑台运动+限制饮食+放血+环磷酰胺)、模型 3 组 (持续递增力竭游泳+限制饮食)、模型 4 组 (持续递增力竭游泳+限制饮食+放血+环磷酰胺) 5 组, 检测造模前后大鼠体质量及 8 周后大鼠血浆三碘甲状腺原氨酸 (T3)、甲状腺素 (T4)、促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、皮质酮 (CORT) 和下丘脑食欲素 A 含量。结果: 与空白组比较, 模型 1~4 组大鼠 T3 含量和 CRH 含量变化不明显, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型 1~4 组大鼠造模后体质量较低, T4 含量显著性减少, 食欲素 A 含量显著性降低, ACTH 含量显著性增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型 1 组比较, 模型 2 组大鼠造模后体质量、ACTH 含量、T4 含量、CORT 含量均较低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 模型 3 组大鼠 T4 含量和 CORT 含量均较低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型 3 组比较, 模型 4 组大鼠造模后体质量、T4 含量、ACTH 含量、CORT 含量均较低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 持续递增负荷跑台运动和游泳力竭法均可复制 FAT 大鼠模型, 大鼠体质量增加缓慢、下丘脑-垂体-甲状腺 (HPT) 轴功能降低和下丘脑-垂体-肾上腺皮质 (HPA) 轴功能亢进; 与递增负荷训练模型 FAT 大鼠比较, 气血亏虚证 FAT 模型大鼠体质量增加更小、HPT 轴功能更低而 HPA 功能亢进不明显。

[关键词] 运动员三联征; 饮食紊乱; 气血亏虚证; 下丘脑-垂体-甲状腺轴 (HPT); 下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴 (HPA); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 01-0228-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.01.077

Comparison Study on Regulation Mechanism of Eating disorder and Material Metabolism in Four Kinds Model Rats with FAT

JING Chunxiang, ZHAO Ziming, LAI Qiuyuan, WEN Xi, JIAO Runyi, PAN Huashan

Abstract: Objective: To discuss regulation mechanism of eating disorder and material metabolism on copying model rats with Female athlete triad (FAT) by gradually increased treadmill exercise and swimming exhausting energy method, and copying model rats with Qi and blood deficiency syndrome merged FAT by bloodletting merged cyclophosphamide peritoneal injection. Methods: Selected SD rats into blank group (normal diet), model group 1 (gradually increased treadmill exercise+ diet limitation), model group 2 (gradually increased treadmill exercise+ diet limitation+ bloodletting+ cyclophosphamide), model group 3 (gradually increased exhausting swimming+ diet limitation), model group 4 (gradually increased exhausting swimming + diet limitation+ bloodletting+ cyclophosphamide). Detected body mass of rats before and after modeling, and plasma triiodothyronine (T3), thyroxine (T4), corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone (CORT), hypothalamus orexin A of rats after 8 weeks. Results: Compared with the blank group, content change of T3 and CRH was not obvious from model group 1 to group 4, there being no significant difference ($P > 0.05$); After modeling, body mass of rats were decreased, content of T4 and orexin A were obviously decreased from model group 1 to

[收稿日期] 2016-07-24

[项目基金] 广东省体育局科研项目 (GDSS2014204)

[作者简介] 荆纯祥 (1986-), 男, 讲师, 研究方向: 运动医学。

[通讯作者] 潘华山, E-mail: psh681011@163.com。

group 4, ACTH content was obviously increased, the difference being significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group 1, body mass, content of ACTH, T4 and CORT were decreased in model group 2 after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.01$); Content of T4 and CORT in model group 3 were lower ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with model group 3, body mass, content of ACTH and CORT in model group 4 were lower ($P < 0.01$). Conclusion: Model rat with FAT can be copied by gradually increased treadmill exercise and swimming exhausting energy method, body mass of rat increase slowly, hyperfunction of hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis appear. Compared with model rats with FAT and gradually increased load training, body mass gain in rats with FAT merged Qi and blood deficiency syndrome was more slightly, HPT axis was lower, but hyperfunction of HPA was not obvious.

Keywords: Female athlete triad (FAT); Eating disorder; Qi and blood deficiency syndrome; Hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis; Hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis; Animal experiment; Rat

1992 年美国运动医学界提出: 膳食紊乱、闭经、骨质疏松合称为“女运动员三联征”(female athlete triad, FAT), 其突出表现为各种形式的月经失调(AMI)、闭经、多发或复发性应力性骨折^[1]。2005 年 11 月国际奥委会一致通过了由医学委员会提出的关于防治 FAT 的提案。笔者拟采用跑台和力竭两种递增负荷训练方法复制 FAT 大鼠模型, 并在此基础上, 采用放血 + 环磷酰胺腹泻注射法复制气血亏虚证 FAT 大鼠模型, 通过对比四种模型大鼠饮食、甲状腺素、体重、肾上腺皮质激素含量的变化, 阐明 FAT 膳食紊乱机理, 为治疗 FAT 提供新的疾病和病证结合动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 10 周龄雌性 SD 大鼠 50 只, 平均体重质量 (200 ± 20)g。广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2013-0020, 动物合格证号: 44058000; 饲养于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级动物实验室, 实验动物环境合格证号: SCXK(粤)2013-0085。

1.2 实验药品与试剂 环磷酰胺(批号: H32020875), 江苏恒瑞医药股份有限公司产品; 三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)等 ELISA 试剂盒, 均为上海源叶生物科技有限公司产品; 食欲素 A ELISA 试剂盒, 美国 Phoenix 公司产品。操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3 主要仪器 ZH-PT 动物实验跑台机, 淮北正华生物仪器设备有限公司; THERMO 702 超低温冰箱, 美国 Thermo 公司; JJ3000 动物电子秤, G&G 公司产品; BS224S 电子天平, 德国 SARTORIUS 产品; TDL-5-A 型低速离心机, 上海飞鸽公司; 680 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 实验方法 将 50 只 SPF 级健康雌性 SD 大鼠随机分为空白组(正常饮食)、模型 1 组(持续递增负荷跑台运动 + 限制饮食)、模型 2 组(持续递增负荷跑台运动 + 限制饮食 + 放血 + 环磷酰胺)、模型 3 组(持续递增负荷力竭游泳 + 限制饮食)、模型 4 组(持续递增负荷力竭游泳 + 限制饮食 + 放血 + 环磷酰胺)5 组, 每组 10 只。①持续递增负荷跑台运动训练方法: 造模后第 2 周末跑台适应训练 3 天, 第 3~9 周参考文献[2]的

方法(稍作修改)进行递增负荷训练: 速度变化为 15、25、28、32、33、35、35 m/min, 持续时间变化为 40、40、43、45、53、56、63 min, 而坡度变化改为 2、5、10、10、5、8 和 10 度; ②限制饮食: 造模的前 2 周, 隔天禁食; ③放血及环磷酰胺给药: 造模的前 2 周, 第 4~13 天隔天尾部放血, 1 mL/次, 共 5 次, 第 5~13 天隔天交替腹腔注射 40 mg/kg、20 mg/kg 环磷酰胺; ④持续递增负荷力竭游泳^[2]: 采用无负重游泳, 静水深 60 cm, 水温(30 ± 1)°C。适应性游泳训练 3 天, 第 1 天游 30 min, 以后每天增加 10~15 min, 第 7 天增至 2 h, 第 14 天增至 3 h, 并持续此运动强度至 6 周末。力竭的标准: 造模后第 3~9 周大鼠游泳的协调动作消失, 水淹没鼻尖, 身体下沉, 至再次浮出水面的时间超过 10 s, 并连续 3 次者, 视为力竭。

1.5 标本采集与指标检测 于造模前和造模 8 周末大鼠称重后, 3% 浓度的戊巴比妥钠 1 mL/kg 腹腔注射麻醉, 断头处死各组大鼠, 取外周血, 加抗凝剂后, 分离血浆, 测血浆甲状腺素 T3、T4、CRH、ACTH、CORT 含量; 取全脑, 冰台上分离下丘脑, 制备 10% 组织匀浆, -80°C 冰箱保存, 用于测下丘脑食欲素 A 含量。

1.6 统计学方法 实验数据采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间均值的比较采用单因素方差 F 检验, 若方差齐组间均值两两比较采用 S-N-K 检验, 若方差不齐时, 改用 Dunnett T 检验

2 结果

2.1 各组大鼠造模前后体质量变化结果比较 见表 1。与空白组比较, 模型 1~4 组大鼠造模后体质量均较低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型 1 组比较, 模型 2 组大鼠造模后体质量较低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型 3 组比较, 模型 4 组大鼠造模后体质量较低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与造模前比较, 造模后各组大鼠体质量均显著性增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠造模后物质能量代谢调控激素结果比较 见表 2。与空白组比较, 模型 1~4 组大鼠 T3 含量变化不明显, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空白组比较, 模型 1~4 组大鼠

T4 含量均显著性减少, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型 1 组比较, 模型 2、3 组大鼠 T4 含量有显著性降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与模型 3 组比较, 模型 4 组大鼠 T4 含量有显著性降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与空白组比较, 模型 1~4 组大鼠食欲素 A 含量均显著性降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠造模前后体质量变化结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	造模前(g)	造模后(g)
空白组	199.3± 16.5	379.5± 22.2 ^④
模型 1 组	197.5± 13.7	348.7± 21.0 ^{①④}
模型 2 组	194.3± 14.9	311.1± 15.1 ^{①②④}
模型 3 组	192.0± 13.9	333.9± 16.2 ^{①④}
模型 4 组	204.2± 13.9	305.9± 13.5 ^{①③④}

与空白组比较, ① $P < 0.01$; 与模型 1 组比较, ② $P < 0.01$; 与模型 3 组比较, ③ $P < 0.01$; 与同组造模前比较, ④ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠造模后物质能量代谢调控激素结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	T3(ng/mL)	T4(ng/mL)	食欲素 A(pg/mg)
空白组	0.924± 0.072	104.44± 8.95	15.95± 1.94
模型 1 组	0.869± 0.128	92.61± 6.86 ^①	12.45± 1.55 ^①
模型 2 组	0.786± 0.106	75.20± 11.21 ^{②③}	10.48± 1.95 ^②
模型 3 组	0.812± 0.057	90.05± 10.43 ^{①③}	11.39± 1.22 ^②
模型 4 组	0.732± 0.022	70.59± 10.18 ^{②④}	9.20± 0.37 ^②

与空白组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与模型 1 组比较, ③ $P < 0.01$; 与模型 3 组比较, ④ $P < 0.01$

2.3 各组大鼠造模后调控激素结果比较 见表 3。

表 3 各组大鼠造模后调控激素结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	CRH(pg/mL)	ACTH(ng/mL)	CORT(ng/mL)
空白组	8.17± 0.88	1.94± 0.24	53.02± 5.84
模型 1 组	8.84± 0.63	2.68± 0.24 ^②	73.39± 4.22 ^②
模型 2 组	8.46± 0.88	2.27± 0.19 ^{①③}	61.06± 3.15 ^{①④}
模型 3 组	8.62± 0.75	2.65± 0.26 ^②	67.14± 3.48 ^{②③}
模型 4 组	8.35± 0.76	2.32± 0.36 ^{①⑤}	60.91± 6.49 ^{①⑤}

与空白组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与模型 1 组比较, ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$; 与模型 3 组比较, ⑤ $P < 0.05$

与空白组比较, 模型 1~4 组大鼠 CRH 含量变化不明显, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与空白组比较, 模型 1~4 组大鼠 ACTH 含量均显著性增加, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型 1 组比较, 模型 2 组大鼠 ACTH 含量显著性降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型 3 组比较, 模型 4 组大鼠 ACTH 含量显著性降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型 1~4 组大鼠 CORT 含量均显著性增加,

差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型 1 组比较, 模型 2、3 组大鼠 CORT 含量均有显著性降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型 3 组比较, 模型 4 组大鼠 CORT 含量显著性降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

国际运动医学界认为, FAT 的核心和起始端是饮食紊乱, 关键在于能量失衡^[1]。长期过量运动, 能量消耗大于摄入、过分控制体质量、长期偏食或食用低脂肪类食物, 造成体质量过轻; 过量摄入能量物质则可增强脂肪细胞合成代谢, 将多余的能量物质转化为脂肪储存在体内, 增加体质量, 因此体质量一定程度上反映身体增长发育、能量储存等综合状况。递增负荷训练导致大鼠机体的能量摄入减少, 可减轻体重或减小体重增加幅度^[4]。本研究结果表明, 造模后各组大鼠体重较空白组均有显著性减少, 提示存在饮食紊乱, 还存在性激素分泌紊乱和骨降解增强(另文详述), 与 FAT 上述表现相符, 提示四种 FAT 模型均复制成功。

研究表明, 下丘脑功能改变可能是导致长期能量摄入缺乏或能量过度消耗所致能量负平衡的始动原因。下丘脑是调节食欲的主要部位, 食欲素是调节食欲的主要激素之一, 其中食欲素 A 是下丘脑合成的调节食欲、稳定血糖和平衡能量代谢重要的神经肽, 其表达受睡眠、营养状况、环境、性别等因素的影响^[5]。目前国内外对 FAT 与食欲素关系的研究较少。有研究证实, 长期低血糖伴有禁食可以损伤下丘脑外侧区, 影响下丘脑外侧区中某些区域的神经元功能^[6]。本研究跑台和游泳运动大鼠血浆食欲素 A 水平降低, 推测其原因可能与饮食限制、营养缺乏损伤下丘脑外侧区内食欲素神经元, 减少食欲素 A 的分泌有关, 从而导致运动性疲劳综合征。

研究表明, 递增负荷运动可致动物周期抑制大鼠下丘脑 - 垂体 - 甲状腺轴(HPT)功能下降、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺皮质轴(HPA)功能亢进^[7]。HPT 是急性应激反应的神经内分泌轴, 甲状腺激素 T3、T4 受 HPT 的调控, 是反映甲状腺功能、细胞可利用能量和基础代谢率的重要指标^[8-9]。应激时下丘脑促甲状腺激素释放激素(TRH)合成与分泌障碍所致 T3、T4 降低可维持机体低代谢率, 是机体自我保护的一种反应^[10]。月经正常的非运动员、月经正常的运动员和运动性闭经的运动员 T3、T4 水平逐渐降低, 运动性闭经运动员基础代谢率比月经正常运动员降低^[11-12]。T3、T4 使肝、肾、心、骨骼等组织代谢降低, 有利于节省能量, 减少消耗, 使能量的摄取和消耗趋于平衡, 从而保护机体^[13]。本研究结果表明, 饮食限制将导致两种 FAT 大鼠能量负平衡, 大鼠体重增加缓慢, 继发 HPT 轴抑制, T3、T4 分泌减少, 从而导致运动性闭经和骨质疏松。

运动作为一种应激源导致大鼠植物性神经功能紊乱, 交感神经兴奋、迷走神经抑制, 激活下丘脑肾上腺中促肾上腺皮质激素(CRH)神经元, 活化 HPA 轴, 通过释放 CRH, 促进 ACTH 的分泌, 直接刺激肾上腺皮质增生、增加肾上腺皮质

CORT 的合成；高强度运动使能量代谢增加、糖元分解和脂肪酸分解加快，反馈性增加 CORT 含量^[4]。运动状态下 CORT 直接抑制促性腺激素释放激素(GnRH)细胞的分泌，影响 LH 的合成释放及卵巢合成雌激素与孕酮，引发运动性闭经^[5]。本研究结果表明，造模后四个模型组 ACTH 和 CORT 较对照组均有显著性增高，表明持续递增负荷跑台运动和力竭游泳运动均可导致 HPA 轴的过度激活，而 CORT 可加速蛋白质、脂肪、肝糖原分解，导致体重增加缓慢、能量负平衡和闭经；且模型 1 组 CORT 升高比模型 3 组更大，说明递增负荷跑台运动量较游泳力竭运动量更大，运动所致机体的应激状态更重，与文献^[6]报道相符。

气血两虚指气血同时亏损，气虚常因饮食失调、年老体弱、久病、过度运动或体力活动、失血(月经过多)所致；血虚多由劳倦、失血过多，或久病阴血虚耗，或饮食不足、脾胃功能失常，血液生化乏源，或瘀血阻滞新血不生等所致。力竭运动可致气虚；限食、运动力竭、游泳劳倦、失血(放血)和环磷酸胺是复制血虚动物模型常用方法和药物^[7]。放血可在限制饮食基础上加重营养缺乏和能量负平衡，环磷酸胺有细胞毒性和氧化应激损伤作用，导致食欲不振、消化功能损害，心脏、生殖、皮肤、肝、肾毒性(细胞损伤)，加重递增运动负荷大鼠饮食紊乱，更有可能导致肌体应激反应障碍——HPT 功能抑制和 HPA 轴活化障碍，将模型 1 组与模型 2 组，模型 3 组与模型 4 组进行比较，发现模型 2 和模型 4 组气血亏虚型 FAT 大鼠运动体重增加幅度更小，T4、ACTH 和 CORT 的分泌较少，上述表现可能为气血亏虚证 FAT 大鼠模型特征性病变。

[参考文献]

- [1] 王文瑾, 郑陆, 王蕴红, 等. “女运动员三联征”的研究现状及进展[J]. 首都体育学院学报, 2009, 21(1): 60-62.
- [2] 王人卫, 檀志宗, 李国平, 等. 递增负荷训练诱导的动情周期抑制大鼠甲状腺超微结构与功能变化的研究[J]. 体育科学, 2005, 25(10): 59-63.
- [3] 蔡明明, 王蕴红, 张冰, 等. 六味地黄汤抗大鼠运动性疲劳实验研究[J]. 中国运动医学杂志, 2007, 26(1): 56-59.
- [4] 李擎, 王人卫, 柯小剑, 等. 高能量饮食对运动性动情周期抑制大鼠血清 FSH、LH 和下丘脑 NPY mRNA 水平的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28(4): 407-410.
- [5] 洪云川. 食欲素 A 与慢性阻塞性肺疾病[J]. 医学信息, 2015(20): 349-350.
- [6] Cai XJ, Evans ML, Lister CA, et al. Hypoglycemia

activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract[J]. Diabetes, 2001, 50(1): 105-112.

- [7] 洪润肖. 补糖干预对动情周期抑制大鼠 HPT 轴及 HPA 轴结构和功能的影响[D]. 上海: 上海体育学院, 2011.
- [8] Williams NI, Helmreich DL, Parfitt DB, et al. Evidence for a causal role of low energy availability in the induction of menstrual cycle disturbances during strenuous exercise training [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(11): 5184-5193.
- [9] 赵晓慧, 侯平. 大鼠衰老与血浆中 T3、T4、TSH 含量变化相关性随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2015(7): 131-133.
- [10] 罗晓红, 郭文静, 许瑞元, 等. 模拟不同海拔低氧对大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴及肺组织 VEGF 和 HIF-1 表达的影响[J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(8): 864-868.
- [11] 张洪海, 钱风雷, 王晨. 运动与甲状腺激素反应研究进展[J]. 体育科研, 2008, 29(2): 57-61.
- [12] Hirschberg, Angelica L, Rickenlund, et al. Effects of Oral Contraceptives on Diurnal Profiles of Insulin and IGFBP-1 in Endurance Athletes with Menstrual Disturbances [J]. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2004, 36(5): S280-S281.
- [13] 黄成虎, 王有涛, 朱大菊, 等. 糖尿病患者血清中甲状腺激素水平变化的意义[J]. 郟阳医学院学报, 2008, 27(4): 342-343.
- [14] 娄春善, 曹建民, 郭娴, 等. 牛蒡子对运动训练大鼠睾酮及相关激素含量和抗运动疲劳能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 153-157.
- [15] 檀志宗, 王人卫, 黄雅君, 等. 递增负荷训练诱导的动情周期抑制大鼠肾上腺结构与功能变化[J]. 中国运动医学杂志, 2006, 25(3): 276-281.
- [16] 李宁川, 金其贵. 不同方式的力竭运动对大鼠细胞免疫机能的影响[J]. 广州体育学院学报, 2000, 20(2): 47-50.
- [17] 朱映黎, 王林元, 王景霞, 等. 芍药内酯苷对环磷酸胺致血虚小鼠的补血作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1892-1896.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)