

有氧运动通过脂联素/p38MAPK 延缓高脂膳食大鼠肝脏炎症

徐嘉宝,吴卫东

(郑州大学体育学院,郑州 450044)

摘要:[目的]观察有氧运动对高脂膳食大鼠肝脏炎症水平,血清脂联素和肝组织 AdipoR2, p38MAPK 及 TNF- α 蛋白表达的影响,探讨有氧运动延缓高脂膳食大鼠肝脏炎症的作用机制.[方法]SD 雄性大鼠 30 只随机分为正常组(N 组)、模型组(C 组)和运动组(E 组),N 组喂食基础饲料,C 组和 E 组均喂食高脂饲料,E 组大鼠进行 12 周游泳训练.12 周末处死大鼠,ELISA 法检测血清脂联素、血脂和肝功能;HE 染色观察各组大鼠肝组织病理变化;Western 印迹法检测各组大鼠肝组织 AdipoR2, p38MAPK 及 TNF- α 蛋白表达水平.[结果]与 N 组相比,C 组大鼠肝细胞可见脂肪弥漫性变性,炎症细胞浸润肝小叶和汇管区,肝板排列紊乱;血清 TC, TG, FFA, ALT, AST 水平及肝组织 p38MAPK, TNF- α 蛋白表达均显著升高,血清脂联素及肝组织 AdipoR2 蛋白水平显著降低.与 C 组相比,E 组大鼠肝细胞形态基本正常,肝小叶及汇管区内炎症细胞浸润较少,肝板排列较整齐;血清 TC, TG, FFA, ALT, AST 水平及肝组织 p38MAPK, TNF- α 蛋白表达均显著降低,血清脂联素及肝组织 AdipoR2 蛋白水平显著升高.[结论]有氧运动可通过提高高脂膳食大鼠血清脂联素及肝组织 AdipoR2 蛋白水平,抑制肝组织 p38MAPK, TNF- α 蛋白的过度表达,延缓肝脏炎症的发生、发展.

关键词:有氧运动;肝组织;脂联素;p38MAPK;TNF- α

中图分类号:R87

文献标志码:A

长期高脂膳食和久坐不动是导致肥胖、脂肪代谢异常、胰岛素抵抗及脂质过氧化等多种慢性病高发的重要原因.肝脏是脂肪代谢的主要器官,长期高脂膳食会导致未被氧化的脂质沉积在肝细胞,诱发肝细胞脂肪变性和慢性炎症.脂联素是一种主要由脂肪细胞分泌产生的细胞因子,具有改善胰岛素抵抗、调节糖脂代谢及抗炎等多种作用,低脂联素水平会促进肝细胞的坏死和肝纤维化的进程^[1].脂联素受体(AdipoR)包括脂联素受体 1(AdipoR1)和脂联素受体 2(AdipoR2),AdipoR2 主要在肝脏表达.脂联素与 AdipoR2 结合后可抑制 p38 丝裂原激活蛋白激酶(p38MAPK)的表达,而 p38MAPK 的过度表达是导致炎症发生、发展的重要因素,还会促进肿瘤坏死因子(TNF- α)表达^[1-2].长期有氧运动可增加机体脂肪消耗减少肝脏脂质沉积,也可通过影响不同细胞信号通路发挥抗炎作用,但其具体机制尚不完全清楚.本实验采用游泳训练的方法对高脂膳食大鼠进行干预,探讨有氧运动延缓高脂膳食大鼠肝脏慢性炎症发生、发展的分子机制,为应用有氧运动防治长期高脂膳食诱导的肝脏炎症提供数据支持.

1 材料与方法

1.1 动物和分组

30 只 6 周龄 SD 雄性大鼠,体质量(170 \pm 10) g.适应性饲养 1 周后将大鼠随机分为 3 组($n=10$):基础饲

收稿日期:2021-06-20;修回日期:2021-11-15.

基金项目:河南省科技攻关项目(202102310324);河南省高等学校重点科研项目(20A890014);郑州大学体育学院院管科研培育项目(2020A1001).

作者简介:徐嘉宝(1996-),女,河南项城人,郑州大学体育学院硕士研究生,研究方向为运动生理学,E-mail:1063283105@qq.com.

通信作者:吴卫东,E-mail:hwwd81@sina.com.

料对照组(N)、高脂饲料模型组(C)、高脂饲料+运动干预组(E),均喂养12周.基础饲料(能量密度为14.32 kJ/g)为国家标准啮齿类动物饲料,高脂饲料(能量密度为19.8 kJ/g)为基础饲料基础上添加质量分数分别为2%胆固醇,10%猪油,5%蔗糖,0.5%胆酸钠,0.2%丙硫氧嘧啶.

1.2 运动方案

E组大鼠在每周一至周五上午进行无负重游泳训练,周六、日休息,持续训练1~2周,水温控制在(32±2)℃.大鼠第1天游泳30 min,后每天递增10 min,递增到50 min后维持到第1周末,第2周每天游泳60 min,第3周每天游泳70 min,第4周每天游泳80 min,第5周后每天游泳90 min,直到实验结束^[3].

1.3 取材与指标检测

第12周末游泳训练结束后48 h,所有大鼠处死取材,取材前禁食12 h.血清指标测定:双抗夹心酶联免疫(ABC-ELISA)方法测定血清脂联素含量,全自动生化分析仪测定血清总胆固醇(Total Cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、自由脂肪酸(Free fatty acid, FFA)、谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)和谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT).肝组织病理学检测:大鼠肝组织采用体积分数4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,肝组织连续切片,厚度5 μm.苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察肝组织病理学改变,并参考文献[4]进行炎症活动度评分.

肝组织 AdipoR2, p38MAPK 及 TNF-α 蛋白测定:Western blot 方法测定蛋白水平,取肝组织50 mg 匀浆,匀浆后4℃,12 000 r/min 离心5 min,取上清液.标定蛋白浓度上样,利用质量分数为15%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将目的蛋白转置于封闭缓冲液(质量分数为5%的脱脂奶粉)封闭,Tris 缓冲盐溶液-Tween20(TBST)5 min 冲洗1次,共冲洗3次,然后加一抗($V_{-抗} : V_{封闭液} = 1 : 1\ 000$)4℃封闭过夜.次日早上用TBST冲洗,每次10 min,共冲洗3次,加碱性磷酸酶标记的二抗孵育,NBT/BCIP 显色,采用Quantity One 图像分析软件对各条带的灰度值进行分析.以蛋白的灰度值和β-Actin 的比值表示该蛋白表达水平.

1.4 统计学分析

所有实验数据以均数±标准差表示,统计处理采用SPSS13.0 统计软件进行分析.同一指标不同组间采用单因素方差(one-way ANOVA)分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有非常显著性差异.

2 结果

2.1 大鼠体质量、肝脏湿质量和摄入总热量

与N组比较,C组大鼠体质量、肝脏湿质量及摄入总热量均显著升高($P < 0.01$).与C组比较,E组大鼠摄入总热量无显著性变化,但E组大鼠体质量及肝脏湿质量显著降低($P < 0.01$)(表1).

表1 大鼠体质量、肝脏湿质量和摄入总热量比较

Tab. 1 Comparison of body weight, liver wet weight and total calorie intake of rats

组别	大鼠体质量/g	肝脏湿质量/g	摄入总热量/kJ
N	419.87±19.52	8.92±1.31	28 554.66±1 337.71
C	505.81±40.89**	18.09±3.83**	35 195.98±1 154.67**
E	451.55±24.73**	13.47±2.01**	36 065.63±789.03

注:** $P < 0.01$.

2.2 大鼠肝功能及血脂检测

与N组比较,C组大鼠血清FFA,TC,TG,ALT,AST水平均显著升高($P < 0.01$).与C组比较,E组大鼠血清FFA,TC,TG,ALT,AST水平均显著降低($P < 0.01$)(表2).

2.3 肝组织病理学观察

HE染色结果显示,N组大鼠肝组织学特征、细胞形态均正常,肝细胞索排列整齐,肝窦正常,肝细胞核结构正常,胞质丰富,无明显病变.C组大鼠肝组织可见脂肪弥漫性变性,肝索排列紊乱,肝板排列不整齐,肝细胞肿胀,胞质内出现大量空泡,炎症细胞浸润肝小叶、汇管区.E组大鼠肝组织病变较C组有所延缓,肝组

织形态基本保持正常,肝细胞脂肪变性及肝小叶内、汇管区炎症均有不同程度减轻(图 1)。与 N 组比较,C 组大鼠肝脏炎症活动度评分显著增加($P < 0.01$)。与 C 组比较,E 组大鼠肝脏炎症活动度评分显著降低($P < 0.01$)(表 3)。

表 2 大鼠肝功能及血脂比较

Tab. 2 Comparison of liver function and blood lipid in rats

组别	FFA/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	TC/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	TG/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	ALT/ $(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	AST/ $(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$
N	46.76 \pm 10.11	1.36 \pm 0.27	0.71 \pm 0.22	35.14 \pm 8.78	64.59 \pm 14.27
C	72.53 \pm 16.81**	4.23 \pm 1.12**	1.56 \pm 0.63**	67.08 \pm 23.68**	151.77 \pm 30.54**
E	58.19 \pm 17.08**	2.18 \pm 0.8**	1.23 \pm 0.41**	40.12 \pm 9.65**	71.83 \pm 21.78**

注:**代表 $P < 0.01$ 。

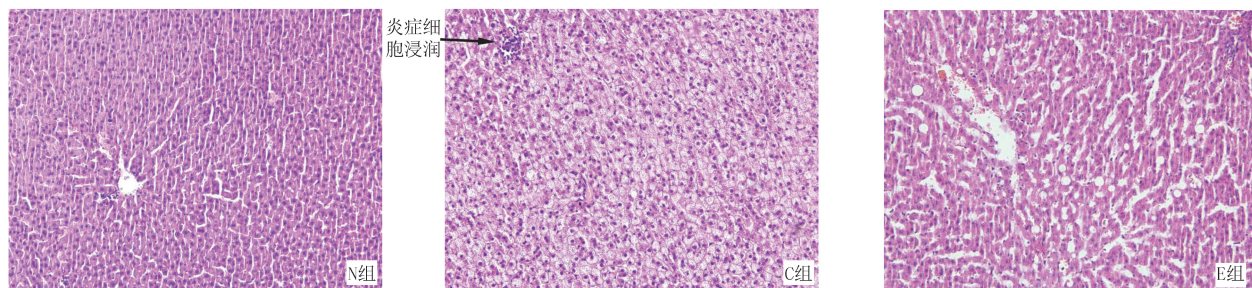


图1 为大鼠肝组织切片(HE×200)

Fig.1 Light microscopy for liver tissue from rats(HE×200)

2.4 血清脂联素水平和肝组织 AdipoR2, p38MAPK 及 TNF- α 蛋白表达

与 N 组比较,C 组大鼠血清脂联素水平显著降低($P < 0.01$),肝组织 AdipoR2 表达降低,p38MAPK, TNF- α 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与 C 组比较,E 组大鼠血清脂联素水平显著升高($P < 0.01$),肝组织 AdipoR2 表达增加,p38MAPK, TNF- α 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)(表 4、图 2)。

表 3 大鼠肝脏炎症活动度评分

Tab. 3 Rat liver inflammation activity score

组别	炎症活动度评分
N	0.69 \pm 0.45
C	6.76 \pm 2.54**
E	4.37 \pm 0.87**

注:** $P < 0.01$ 。

表 4 血清脂联素和肝组织 AdipoR2, p38MAPK, TNF- α 蛋白表达变化Tab. 4 Changes of Serum adiponectin and liver AdipoR2, p38MAPK, TNF- α protein expression

组别	脂联素/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	AdipoR2	p38MAPK	TNF- α
N	0.93 \pm 0.19	1.10 \pm 0.25	0.61 \pm 0.12	0.32 \pm 0.09
C	0.51 \pm 0.11**	0.53 \pm 0.17**	1.27 \pm 0.23**	1.33 \pm 0.24**
E	0.80 \pm 0.12**	0.90 \pm 0.18**	0.99 \pm 0.19**	0.91 \pm 0.16**

注:**代表 $P < 0.01$ 。

3 讨论

长期慢性炎症是非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)发生、发展的一个重要原因,非酒精性脂肪肝是一种以慢性弥漫性大泡型肝细胞脂肪变和脂质蓄积为主的代谢综合征^[5-6],大量研究认为其主要与脂质代谢异常、胰岛素抵抗、游离脂肪酸增多等多种因素有关^[7]。机体脂质代谢处于动态平衡,该平衡一旦被打破,出现脂质代谢异常,脂质异位沉积于肝脏而导致肝脏长期慢性炎症。本研究发现大鼠经过 12 周高脂膳食喂养,体质量和肝质量均呈现增加趋势,提示长期高脂膳食的摄入导致机体脂肪储存及肝

脏脂质蓄积增多.同时高脂膳食组大鼠血清脂联素水平降低,血清 TC, TG, FFA 显著升高,肝脏炎症活动度评分增加,提示长期高脂膳食导致了大鼠血清脂联素和血脂水平异常,诱发了大鼠肝脏炎症.有氧运动可提升大鼠血清脂联素水平,降低血清 TC, TG, FFA 含量,有效延缓高脂膳食大鼠肝脏炎症的发生、发展.



图2 Western blot检测肝脏AdipoR2, p38MAPK, TNF-α 蛋白表达

Fig.2 Western blot detection liver AdipoR2, p38MAPK, TNF-α protein expression

研究发现非酒精性脂肪肝患者血清脂联素水平显著低于正常人^[8-9],说明脂联素与非酒精性脂肪肝的发病密切相关,它可能在由肥胖发展为非酒精性脂肪肝的过程中发挥着重要作用.脂联素一方面可增强脂肪酸转运、脂肪氧化和能量释放,降低血液中 TG 和 FFA 的浓度^[10],另一方面在改善高脂膳食大鼠肝脏炎症方面具有重要作用^[11].血清 ALT, AST 是肝细胞损害的金标准,它们的变化与肝脏炎症程度呈显著正相关,其水平的降低可以间接反映肝组织炎症的改善^[12].本研究发现,高脂膳食组大鼠肝板排列紊乱,炎症细胞浸润肝小叶,汇管区出现炎症,运动组大鼠肝脏炎症明显减轻;同时,运动组大鼠血清 ALT, AST 的水平显著低于高脂膳食组大鼠,血清脂联素水平显著升高,提示有氧运动显著改善了大鼠肝功能,血清脂联素可能发挥了抑制肝脏炎症的作用.

p38MAPK 最初是由小鼠肝脏细胞分离纯化出的一个酪氨酸磷酸化蛋白激酶,主要功能是参与炎症反应、细胞凋亡、细胞分化以及细胞周期等.脂联素作为脂肪细胞分泌的一种内源性生物活性蛋白质,它可以改善非酒精性脂肪肝患者的血脂紊乱,延缓肝细胞坏死和肝脏纤维化的进程,同时脂联素还具有抗炎作用.在脂肪细胞中,脂联素通过激活 p38MAPK 在胰岛素抵抗中发挥着作用^[13].虽然在应激反应中 p38MAPK 信号通路对机体有保护性作用,但 p38MAPK 的过度激活可能会使致炎因子大量分泌而导致机体的炎症.本研究发现 C 组大鼠肝组织 p38MAPK 蛋白表达及血清 ALT, AST 水平显著高于 N 组,提示 p38MAPK 在高脂膳食大鼠肝脏炎症发生、发展过程中发挥了重要作用.p38MAPK 的过度表达是导致炎症发生、发展的重要因素之一,此时它主要的生物学作用是产生和激活促炎因子加重炎症反应^[14].p38MAPK 蛋白的过度表达会促进 TNF-α 蛋白的表达^[15],持续高水平的 TNF-α 蛋白表达不仅会导致肝组织的长期慢性炎症,同时还会使肝脏摄取、合成脂质超过其氧化、分解能力,发生肝脏脂肪化,从而加重肝组织脂代谢紊乱,由此提示高脂饮食诱导的大鼠肝脏炎症可能与 p38MAPK 的过度激活有关.运动组大鼠肝组织 p38MAPK, TNF-α 蛋白表达显著低于高脂膳食组大鼠,同时血清 ALT, AST 较 C 组大鼠明显降低,血清脂联素水平及肝组织 AdipoR2 较高脂膳食组大鼠显著升高,提示有氧运动可能通过提高大鼠血清脂联素含量及肝组织 AdipoR2 表达,抑制了肝组织 p38MAPK 蛋白的过度表达,减少了炎症细胞因子 TNF-α 的释放,最终延缓了肝组织细胞的炎症损伤.因此 p38MAPK 可能是有氧运动通过提高血清脂联素水平延缓非酒精性脂肪肝发生、发展的有效靶点之一.综上所述,有氧运动可使高脂膳食大鼠血清脂联素水平升高,增强肝组织 AdipoR2 表达,抑制 p38MAPK, TNF-α 蛋白的过度表达,从而改善高脂膳食大鼠的生化指标,延缓肝组织炎症的发生、发展.

参 考 文 献

- [1] FANG H, JUDD R L. Adiponectin regulation and function[J]. *Comprehensive Physiology*, 2018, 8(3): 1031-1063.
- [2] HOU X X, CHEN G J, HOSSINI A M, et al. Aryl hydrocarbon receptor modulates the expression of TNF-α and IL-8 in human sebocytes via the MyD88-p65NF-κB/p38MAPK signaling pathways[J]. *Journal of Innate Immunity*, 2019, 11(1): 41-51.
- [3] 焦广发, 张海峰, 高峰, 等. 12 周游泳运动对高脂饮食大鼠脂肪组织 UCP2 mRNA 和 TNF-α 的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2009, 28(3): 281-285.
- [4] JIAO G F, ZHANG H F, GAO F, et al. Effect of 12-week swimming on the UCP2 mRNA and TNF-α in visceral adipose tissue of rats fed with high fat diet[J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*, 2009, 28(3): 281-285.

- [4] 王泰龄,刘霞,周元平,等.慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案[J].中华肝脏病杂志,1998(4):195-197.
WANG T L, LIU X, ZHOU Y P, et al. A semiquantitative scoring system for assessment of hepatic inflammation and fibrosis in chronic viral hepatitis[J]. Chinese Journal of Hepatology, 1998(4): 195-197.
- [5] PASCHOS P, PALETAS K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome[J]. Hippokratia, 2009, 13(1): 9-19.
- [6] KANWAR P, KOWDLEY K V. The metabolic syndrome and its influence on nonalcoholic steatohepatitis[J]. Clinics in Liver Disease, 2016, 20(2): 225-243.
- [7] ACHARI A, JAIN S. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(6): 1321-1338.
- [8] DECLERCQ V, DEON B, MCLEOD R S. Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1851(9): 1123-1133.
- [9] NAGARAJU G P, ALIYA S, ALESE O B. Role of adiponectin in obesity related gastrointestinal carcinogenesis[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015, 26(1): 83-93.
- [10] DING Y S, LI S G, MA R L, et al. Association of homeostasis model assessment of insulin resistance, adiponectin, and low-grade inflammation with the course of the metabolic syndrome[J]. Clinical Biochemistry, 2015, 48(7/8): 503-507.
- [11] YOUNOSSI Z, TACKE F, ARRESE M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology, 2019, 69(6): 2672-2682.
- [12] BUECHLER C, HABERL E, REIN-FISCHBOECK L, et al. Adipokines in liver cirrhosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(7): 1392-1418.
- [13] MAEDA N, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y, et al. Adiponectin, a unique adipocyte-derived factor beyond hormones[J]. Atherosclerosis, 2020, 292: 1-9.
- [14] LI T, WU Y N, WANG H, et al. Dap1 improves inflammation, oxidative stress and autophagy in LPS-induced acute lung injury via p38MAPK/NF- κ B signaling pathway[J]. Molecular Immunology, 2020, 120: 13-22.
- [15] NIE N N, BAI C, SONG S N, et al. Bifidobacterium plays a protective role in TNF- α -induced inflammatory response in Caco-2 cell through NF- κ B and p38MAPK pathways[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2020, 464(1/2): 83-91.

Aerobic exercise retarded liver inflammation by adiponectin /p38MAPK in rats with high fat diet

Xu Jiabao, Wu Weidong

(Physical Education College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: [Objective] To observe the effects of aerobic exercise on the liver inflammation level, serum adiponectin, liver tissue AdipoR2, p38MAPK and TNF- α protein expression in high-fat diet rats, and to explore the mechanism of aerobic exercise on delaying liver inflammation in high-fat diet rats. [Method] Thirty SD male rats were randomly divided into normal group (group N), model group (group C) and exercise group (group E). Group N was fed on basic diet, and group C and E were fed on high-fat diet. The rats in group E received swimming training for 12 weeks. Rats were sacrificed at the end of the 12th week, and serum adiponectin, blood lipids and liver function were detected by ELISA, the pathological changes in liver tissues of rats in each group were observed by HE staining, AdipoR2, p38MAPK and TNF- α protein expression in liver tissues of rats in each group were detected by Western blotting level. [Result] Compared with group N, rats in group C showed that diffuse fatty degeneration of liver cells, inflammatory cells infiltrated liver lobules and portal area, liver plate arrangement disorder, serum TC, TG, FFA, ALT, AST levels and the expression of p38MAPK and TNF- α protein in liver tissue were significantly increased, and the levels of serum adiponectin and AdipoR2 protein in liver tissue were significantly decreased. Compared with group C, rats in group E showed that the morphology of hepatocytes was basically normal, with less inflammatory cell infiltration in liver lobules and portal areas, and liver plates were arranged more neatly, serum TC, TG, FFA, ALT, AST levels and the expression of p38MAPK and TNF- α protein in liver tissue were significantly reduced, and the levels of serum adiponectin and AdipoR2 protein in liver tissue were significantly increased. [Conclusion] Aerobic exercise can increase the levels of serum adiponectin and AdipoR2 protein in liver tissue, inhibit the over-expression of p38MAPK and TNF- α protein in liver tissue, and delay the occurrence and development of liver inflammation of rats with high-fat diet.

Keywords: aerobic exercise; hepatic; adiponectin; p38MAPK; TNF- α

[责任编辑 刘洋 杨浦]