



p38 促分裂原活化的蛋白激酶信号调控铁死亡参与运动改善 2 型糖尿病小鼠非酒精性脂肪性肝病*

张宝文 李 颖 高 原 盛科研 王 志 寇现娟**

(武汉体育学院运动医学院, 运动训练监控湖北省重点实验室, 武汉 430079)

摘要 **目的** 从运动调控细胞铁死亡的角度, 探究 8 周跑台运动改善 2 型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM) 合并非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 小鼠肝细胞脂肪变性的分子机制。**方法** 选取 8 只 8 周龄健康 m/m 小鼠作为对照组 (Con), 32 只同周龄 db/db 小鼠被随机分为 db/db 组、db+Exe 组、db+SB203580 组及 db+Exe+SB203580 组, 每组 8 只。db+Exe 组、db+Exe+SB203580 组进行持续 8 周的中等强度跑台运动干预 (40 min/d, 5 d/周), db+SB203580 组及 db+Exe+SB203580 组进行 8 周的 p38 促分裂原活化的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 抑制剂 SB203580 腹腔注射处理 (5 mg/kg, 5 d/周), 实验期间每周定时检测小鼠体重及空腹血糖。8 周干预结束后, 油红 O 及苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法观察小鼠肝脏病理学改变状况, 相应的酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒测定血脂、肝功能、肝脏铁离子及氧化应激水平, 定量反转录 PCR (quantitative reverse transcriptase-mediated PCR, qRT-PCR) 测定脂肪合成及氧化应激相关 mRNA 转录水平, 免疫组织化学染色观察铁死亡相关蛋白质的表达水平, 蛋白质印迹 (Western blot, WB) 法检测肝组织中脂质合成及铁死亡相关蛋白质表达水平。**结果** 8 周跑台运动降低了 db/db 小鼠体重、血糖、肝指数及血脂水平, 改善其肝脏脂肪变性, 下调肝组织 Fe^{2+} 、MDA、MCP-1、IL-6、SREBF1、ACC1 表达水平, 并上调了 db/db 小鼠肝组织中 GSH 含量及铁死亡相关蛋白质 NRF2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平。运动联合 p38 MAPK 抑制剂干预显著下调 db/db 小鼠肝组织 ACC1、MCP-1、IL-6 的 mRNA 及 Fe^{2+} 、MDA 水平, 并上调 GSH 水平。然而, 与跑台运动组相比, 运动联合 p38 MAPK 抑制剂组小鼠肝组织内 Fe^{2+} 、MDA、MCP-1、SREBF1 表达显著上升, GSH 及铁死亡相关蛋白质表达水平显著下降。此外, 与单纯抑制剂组相比, 运动联合抑制剂干预组小鼠肝组织铁蓄积及脂质过氧化现象明显改善。**结论** 8 周跑台运动可能是通过 p38 MAPK 依赖途径抑制肝细胞铁死亡, 缓解肝细胞脂质过氧化及肝脏脂肪变性, 从而改善 T2DM 小鼠的 NAFLD。

关键词 跑台运动, 非酒精性脂肪性肝病, 铁死亡, p38 促分裂原活化的蛋白激酶, 糖尿病

中图分类号 R804.21, R575.5

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0024

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是全世界发病率最高的慢性肝病, 其主要病理特征为肝脏脂质的过度积累, 随着疾病进展可逐渐发展为非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌。2 型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM) 是由于患者体内胰岛素分泌不足或机体无法有效利用胰岛素导致的持续高血糖状态, 并引起全身相关代谢紊乱。流行病学调查及大量实验研究证据表明, T2DM 是 NAFLD 发生发展的重要危险因素, NAFLD 在 T2DM 患者中的发病率高达

55.48%, 其患病风险是普通人群的 2 倍^[1-2]。近年来, 随着社会经济的发展, 居民生活方式发生改变, 导致 T2DM 及 NAFLD 的患病率不断上升, 并呈现年轻化发展趋势, 给中国的社会经济及公共卫生事业带来了沉重的负担。因此, 深入探究 NAFLD 的分子机制, 探索治疗 NAFLD 的有效靶

* 国家自然科学基金 (81601228) 和教育部人文社会科学研究规划基金 (21YJA890014) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13627292193, E-mail: kouxianjuan@126.com

收稿日期: 2024-01-19, 接受日期: 2024-04-23

点,是目前亟需解决的重要难题。

NAFLD的发病机制复杂,包括脂肪变性、胰岛素抵抗、氧化应激、线粒体功能障碍等方面^[3],而目前越来越多的研究表明,铁死亡是NAFLD发生发展的一项重要机制。铁死亡是一种新发现的以铁依赖性、脂质过氧化为主要特征的非凋亡性细胞死亡方式,当细胞内铁离子过载将触发芬顿(Fenton)反应,诱发氧化应激反应及脂质过氧化物积累,从而导致细胞结构及功能被破坏。肝脏是铁储存与脂质代谢的重要器官,研究发现,在NAFLD的早期就存在肝脏铁超载及过氧化的现象,超过30%的NAFLD患者表现有高铁蛋白血症,而肝脏铁超载会加剧肝脏脂质代谢紊乱与肝损伤^[4-6],推动NAFLD的进一步恶化。Choi等^[7]研究证明,在甲硫氨酸胆碱缺乏(methionine and choline deficient, MCD)饲料喂养诱导的NASH小鼠模型中,抗氧化作用酶谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)及胱氨酸/谷氨酸转运蛋白溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)的表达异常下降,其肝组织中铁死亡标志物长链酰基辅酶A合成酶4的表达水平升高,血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)含量也随之升高。

大量研究已证实,有氧运动可以显著抑制肝脏脂质沉积、炎症及纤维化,是治疗NAFLD的有效方案。Fredrickson等^[8]研究表明,16周的高强度间歇运动及中等强度持续运动均可通过降低小鼠肝组织甘油三酯含量、炎症及纤维化水平,从而有效抑制肥胖小鼠NASH的进展。在高脂饮食(high fat diet, HFD)喂养诱导的NAFLD大鼠中,8周的游泳运动能够通过激活AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号抑制肝脏脂肪酸及甘油三酯的合成,同时减轻肝脏线粒体氧化应激水平,进而改善大鼠NAFLD^[9]。本研究团队前期的研究已经证明,跑台运动能够通过p38促分裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)依赖途径上调纤连蛋白III型结构域蛋白5(fibronectin type-III domain-containing protein 5, FNDC5),从而有效缓解T2DM小鼠NAFLD。MAPKs参与控制肝脏代谢的多种过程,包括葡萄糖代谢及脂质代谢^[10],应激状态下肝脏MAPKs被激活,将导致胰岛素功能及脂质代谢紊

乱。研究报道,与未患有NAFLD的受试者相比,NAFLD患者肝组织内MAPK12及MAPK13的mRNA转录水平和p38 δ 的蛋白质表达水平显著上升^[11];同时,MCD饲料喂养诱导的NAFLD小鼠中p38 MAPK表达异常上调,而通过尾静脉注射腺相关病毒(AAV9-shRNA-p38 γ)敲低p38 γ 能够减轻NAFLD小鼠的肝损伤及脂质堆积^[12],提示p38 MAPK信号参与并介导了NAFLD的病理改变。

研究已经证明,p38 MAPK信号能够通过多种途径调节细胞铁死亡^[13],但是运动能否通过p38 MAPK信号影响肝细胞铁死亡的发生参与改善糖尿病小鼠的NAFLD,尚未见报道。因此,本研究通过对T2DM合并NAFLD小鼠模型进行8周的跑台运动干预来观察有氧运动对NAFLD肝脏病理变化的影响。同时加入p38 MAPK抑制剂SB203580干预,检测肝脏氧化应激水平及铁死亡相关蛋白质的表达水平,从p38 MAPK-铁死亡的角度探讨运动改善NAFLD的分子机制,为NAFLD的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

8周龄雄性m/m小鼠及db/db小鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司,所有小鼠在SPF级环境中以常规条件(温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度40%~60%)饲养,适应性饲养1周后开始实验。将m/m小鼠作为正常对照组(Con, $n=8$),32只db/db小鼠被随机分为模型组(db/db, $n=8$)、跑台运动组(db+Exe, $n=8$)、p38 MAPK抑制剂组(db+SB203580, $n=8$)和跑台运动联合p38 MAPK抑制剂组(db+Exe+SB203580, $n=8$)。

1.2 干预方法

db+Exe组及db+Exe+SB203580组小鼠适应性运动1周后,进行正式运动干预,采取中等强度的有氧运动方案,跑台坡度为0 $^{\circ}$,以10 m/min的速度持续运动40 min/d,进行5 d/周干预。db+SB203580组及db+Exe+SB203580组同时按照5 mg/kg的剂量进行5 d/周的p38 MAPK抑制剂腹腔注射干预,运动干预在药物干预2 h后进行。持续干预8周,每周末称取小鼠体重,夜间禁食12 h后尾静脉采血,测定各组小鼠的空腹血糖值。本研究动物实验方案得到了武汉体育学院动物伦理委员会批准(批准号:0087-202010-1301)。

1.3 药物及试剂

p38 MAPK 抑制剂 (SB203580) 购于 MedChemExpress 公司; 甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein, HDL)、AST、ALT、微量还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、组织铁测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所; PrimeScript RT 反转录试剂盒购自日本 Takara 公司; 固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element binding transcription factor 1, SREBF1) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (acetyl-CoA-carboxylase1, ACC1) 兔/鼠单克隆抗体购于武汉 Proteintech 公司; Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)、p38 MAPK、血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 兔单克隆抗体购于美国 CST 公司; 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)、GPX4、SLC7A11 兔单克隆抗体购于上海 Abmart 公司。

1.4 血脂与肝损伤水平测定

实验结束后小鼠眼球取血, 血样室温静置 2 h 后, 3 000 r/min 离心 15 min, 重复 2 次, 取得上层血清。按照说明书操作, 分别测定并计算出小鼠血清中 TG、TC、LDL、HDL 含量及 AST、ALT 酶活性。

1.5 肝脏组织形态学染色

取小鼠肝组织于 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 切成厚度 5 μm 的薄片, 进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 显微镜下观察并

拍照, 分析肝组织病理学变化。另取固定后的肝脏, 脱水后制成 10 μm 冷冻切片, 进行油红 O 染色, 显微镜拍照, 分析肝组织脂质沉积状况。

1.6 免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 染色检测 GPX4、SLC7A11 阳性表达

取石蜡包埋肝组织, 切片脱蜡至水后, 使用抗原修复液进行抗原修复, 封闭后分别加入兔抗 GPX4 (1 : 100), 兔抗 SLC7A11 (1 : 100), 孵育过夜后加入二抗, 洗涤后二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 苏木精复染后封片, 在显微镜下拍照, 使用 Image-Pro Plus 软件计算阳性区域平均光密度值。

1.7 肝组织内铁离子水平的测量

称取适量小鼠肝脏组织, 按质量 (g) : 体积 (ml) 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 低温匀浆后, 2 500 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 按照组织铁测定试剂盒说明书操作, 用酶标仪 520 nm 处读取吸光度 (A) 值, 并计算各组小鼠肝脏中铁离子含量。

1.8 肝组织内谷胱甘肽、丙二醛含量的测定

取 10% 小鼠肝脏组织匀浆上清液, 按 GSH、MDA 测定试剂盒说明书操作, 分别用酶标仪 405 nm 及 532 nm 处读取 A 值, 并计算各组小鼠肝脏中 GSH 及 MDA 含量。

1.9 qRT-PCR 检测相关蛋白 mRNA 水平

使用 TRIzol 法提取肝组织总 RNA, 测定 RNA 浓度后按照反转录试剂盒说明书操作获得 cDNA 产物。使用 StepOne Plus 型荧光定量 PCR 仪通过 SYBR Green 染料法检测目的基因表达 (引物序列见表 1), 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算靶基因相对表达量。

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>SREBF1</i>	TGA CCC GGC TAT TCC GTG A	CTG GGC TGA GCA ATA CAG TTC
<i>ACC1</i>	CAT GAA CCA TCT CCG TTG GC	GAC CCA ATT ATG AAT CGG GAG TG
<i>MCP-1</i>	TTA AAA ACC TGG ATC GGA ACC AA	GCA TTA GCT TCA GAT TTA CGG GT
<i>IL-6</i>	TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC	TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC
<i>GAPDH</i>	GGT TGT CTC CTG CGA CTT CA	TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC

1.10 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白质的表达

称取适量肝组织, 匀浆、超声、离心后提取蛋

白质, BCA 法测定蛋白质浓度后定量。随后进行上样、电泳、转膜、封闭后, 4℃孵育相应一抗 (SREBF1、NRF2、GPX4、SLC7A11、Phospho-

p38 MAPK、p38 MAPK 抗体稀释比例 1 : 1 000; ACC1、 β -actin 抗体稀释比例 1 : 10 000) 过夜。次日洗涤后孵育对应二抗 (稀释比例 1 : 10 000) 90 min, 化学发光法显影条带, 采用 Image J 软件条带灰度值进行分析。

1.11 统计学方法

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差 ($mean\pm SD$) 表示, 采用 Prism Graphpad 9.0 软件对数据进行统计分析。组间采取单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 跑台运动对db/db小鼠体重及空腹血糖的影响

在实验期间, db/db 组小鼠体重与空腹血糖呈持续上升的趋势, 且显著高于 Con 组小鼠 ($P<0.0001$)。而 db+Exe 组小鼠体重从干预后第 5 周开始呈下降趋势, 且 8 周干预结束后其体重与空腹血糖水平明显低于 db/db 组 ($P<0.05$, $P<0.001$), 提示跑台运动能有效降低 db/db 小鼠的体重及空腹血糖水平 (图 1)。同时, 与 Con 组相比, db/db 组小鼠肝指数明显增加 ($P<0.0001$), 而与模型组相比, db+Exe 组小鼠肝指数显著降低 ($P<0.01$)。

2.2 跑台运动对db/db小鼠血脂及肝脏病理学的影响

血脂水平的变化反映脂肪肝的治疗效果, 因此对各组小鼠血清中 TG、TC、LDL、HDL 含量进行测定。结果显示 (图 2a, b), 与 Con 组相比, db/db 组小鼠血清中 TG、TC、LDL 表达水平升高 ($P<0.01$), 但是对于 HDL 没有明显影响 ($P>0.05$); 然而跑台运动可以明显降低 db/db 小鼠升高的 TG、TC、LDL 水平 ($P<0.01$)。AST 和 ALT 主要分布于肝细胞内, 当肝细胞受损时被释放入血, 因此临床上将血清内 AST 与 ALT 的含量作为肝损伤的重要外周血标志物。对小鼠血清中 AST 与 ALT 含量进行检测, 结果 (图 2c) 显示, 与 Con 组相比, db/db 组小鼠血清中 AST、ALT 酶活性明显升高 ($P<0.0001$), 而运动干预后 db+Exe 组小鼠 AST、ALT 酶活性明显降低 ($P<0.0001$)。上述结果提示, db/db 小鼠血脂异常升高且存在严重的肝细胞损伤, 而跑台运动可明显降低 db/db 小鼠血脂水平并缓解肝损伤。为了进一步评价运动对 NAFLD 的疗效, 对 db/db 小鼠的肝脏病理学进行检测。从外表看 (图 2d), Con 组小鼠肝脏表面光滑, 色泽暗红, 而 db/db 组小鼠肝脏体积明显增大, 整体颜色变黄, 有油腻感; 而运动干预后小鼠脂肪肝形态有所改善。HE

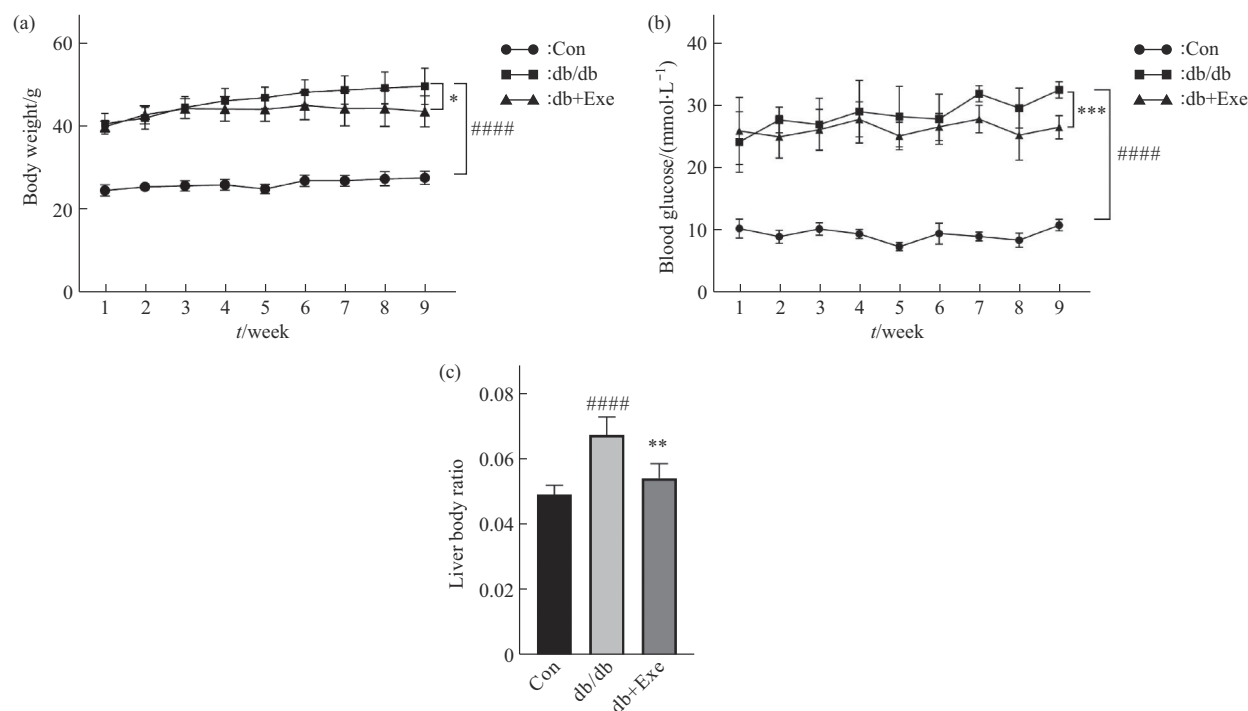


Fig. 1 Effect of treadmill exercise on body weight and blood glucose in db/db mice

(a) The 8-week body weight changes in each group of mice; (b) the 8-week blood glucose changes in each group of mice; (c) liver-to-body ratio of mice in each group. Data represent $mean\pm SD$. $n=8$. ##### $P<0.0001$ vs Con group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs db/db group.

染色结果(图2e)显示, Con组小鼠肝组织形态结构正常, db/db组细胞体肿胀明显, 细胞核核明显偏移, 大部分细胞内可见气球样变, 并伴有大量大

小不一的脂肪空泡出现, 而运动干预后小鼠肝细胞形态结构明显改善。

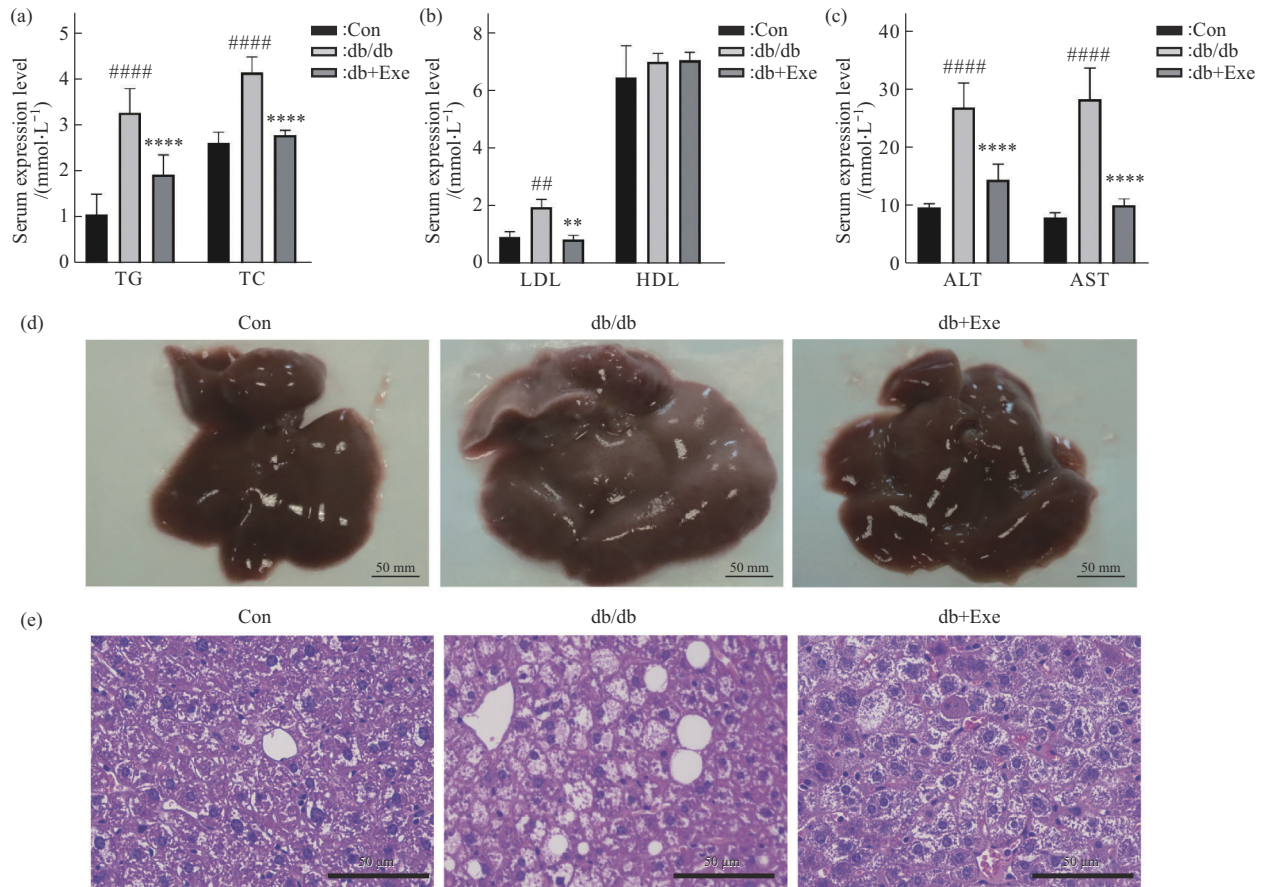


Fig. 2 Effect of treadmill exercise on blood lipid and liver pathology in db/db mice

(a, b) Serum expression levels of TG, TC, LDL and HDL in each group of mice; (c) serum expression levels of AST and ALT in each group of mice; (d) hepatic tissues of mice in each group. Data represent mean $\pm$ SD. $n=8$. ## $P<0.01$ vs Con group; #### $P<0.0001$ vs Con group; ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ vs db/db group.

2.3 跑台运动对NAFLD小鼠肝脏脂肪变性与炎症的影响

油红O染色结果(图3a, b)显示, Con组小鼠肝细胞结构正常, 无红色脂滴, db/db组出现大量红染脂滴, 体积大且数目多($P<0.001$), 提示db/db小鼠存在显著的肝细胞变性及脂质沉积, 而8周运动干预后, db+Exe组小鼠肝细胞脂肪变性明显轻于db/db组, 肝组织内红染脂滴所占面积明显减少($P<0.01$)。SREBF1是固醇通路上的关键转录因子, 可通过感受环境固醇的浓度来调控一系列重要脂质合成基因的表达; ACC1是脂肪生成过程中的限速酶, 其催化产物丙二酰辅酶A是脂质合成

的重要底物。因此, 通过对小鼠肝组织中SREBF1及ACC1的蛋白质表达与mRNA转录水平进行检测, 发现与形态学结果相一致。与Con组相比, db/db组SREBF1、ACC1的蛋白质及mRNA水平显著升高($P<0.0001$, $P<0.05$), 提示db/db小鼠肝脏脂质合成增多; 而跑台运动显著逆转了db/db小鼠SREBF1、ACC1的蛋白质及mRNA表达水平上升($P<0.0001$, $P<0.05$)。同时, qRT-PCR检测肝组织中单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)及炎症因子白介素-6(interleukin 6, IL-6)在mRNA水平的表达(图3c, d), 结果显示, db/db组小鼠的炎症因子水平

较Con组均显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 表明db/db小鼠肝脏发生炎症反应, 而db+Exe组中MCP-1

及IL-6的表达量较db/db组均明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

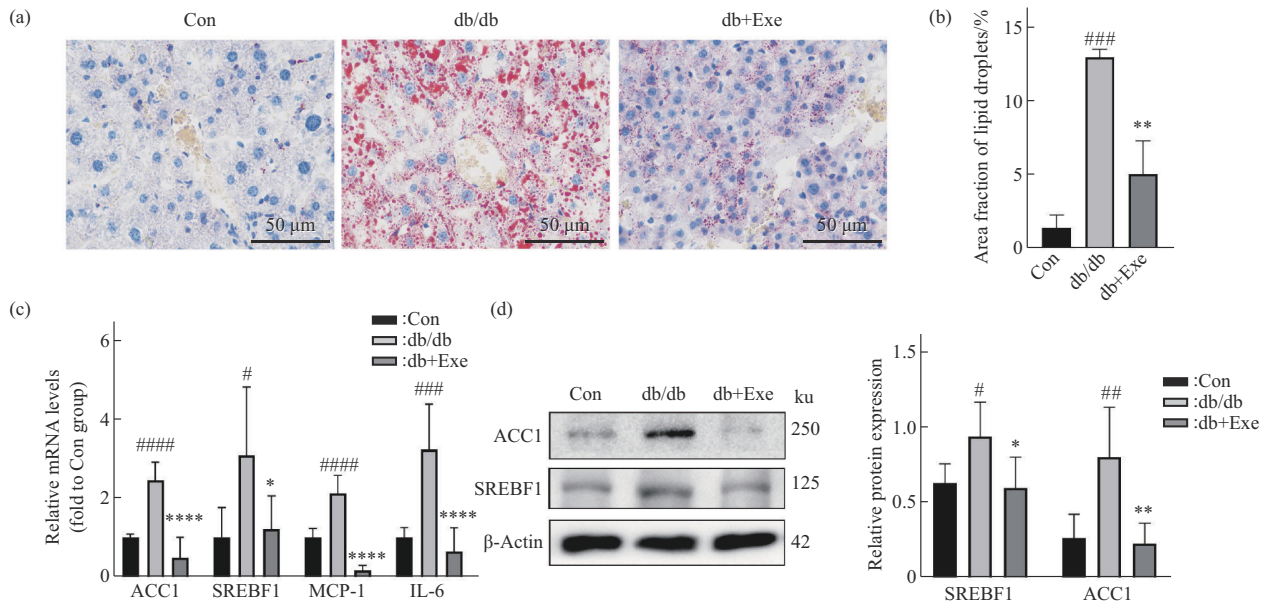


Fig. 3 Effect of treadmill exercise on hepatocyte steatosis and inflammation in the NAFLD mice

(a) Oil Red O staining of liver in each group of mice; (b) results of quantitative analysis of Oil Red O staining; (c) Relative mRNA levels of ACC1, SREBF1, MCP-1 and IL-6; (d) Western blotting images and analysis of ACC1 and SREBF1 from each group. Data represent mean $\pm$ SD. $n=8$. # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$, vs Con group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ vs db/db group.

2.4 跑台运动对NAFLD小鼠肝脏铁含量及脂质过氧化物的影响

肝脏内活性铁储备的增加通过芬顿反应加剧脂质过氧化反应, 从而促进NAFLD的发展, 因此对小鼠肝组织中二价铁离子、MDA及GSH的水平进行检测。结果(图4)显示, 与Con组相比, db/db组小鼠肝脏中亚铁离子含量、MDA水平明显增高 ($P<0.0001$), 而运动干预显著降低了db/db小鼠肝组织 Fe^{2+} 含量、MDA水平 ($P<0.0001$), 此外, 跑台运动逆转了db/db小鼠肝脏内GSH水平的下降 ($P<0.05$)。上述结果提示, 8周跑台干预可以明显降低NAFLD小鼠模型肝组织中铁蓄积与脂质过氧化水平。

2.5 跑台运动对NAFLD小鼠肝脏铁死亡相关蛋白表达的影响

NRF2/HO-1轴及SLC7A11/GPX4轴通过防止脂质过氧化负向调控细胞铁死亡, 通过IHC染色及Western blot对小鼠肝组织中NRF2、HO-1、SLC7A11和GPX4的蛋白质表达水平进行检测。结

果(图5)显示, 与Con组相比, db/db组小鼠肝脏内NRF2、HO-1、SLC7A11和GPX4的蛋白质表达水平明显降低 ($P<0.05$), 但8周跑台运动干预后其表达均显著升高 ($P<0.05$), 提示跑台运动能够激活db/db小鼠肝脏铁死亡相关蛋白质的表达。

2.6 抑制p38 MAPK信号对运动改善db/db小鼠NAFLD的影响

p38 MAPK信号在NAFLD的发病机制中发挥重要作用, 为了探究p38 MAPK信号对NAFLD小鼠肝脏脂肪变性的影响, 使用SB203580抑制小鼠体内p38 MAPK信号, Western blot检测p-p38及p38 MAPK的蛋白质表达水平。结果(图6a)显示跑台运动干预、单纯p38 MAPK抑制剂干预及运动联合抑制剂干预均显著降低了p38 MAPK在Thr180/Tyr182位点的磷酸化水平 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$), 但与单纯运动或单纯抑制剂干预相比, 运动联合抑制剂干预并未进一步降低p-p38/p38 MAPK的比值 ($P>0.05$)。同时, 对各组小鼠肝脏形态变化及脂质合成蛋白表达水平进行检测,

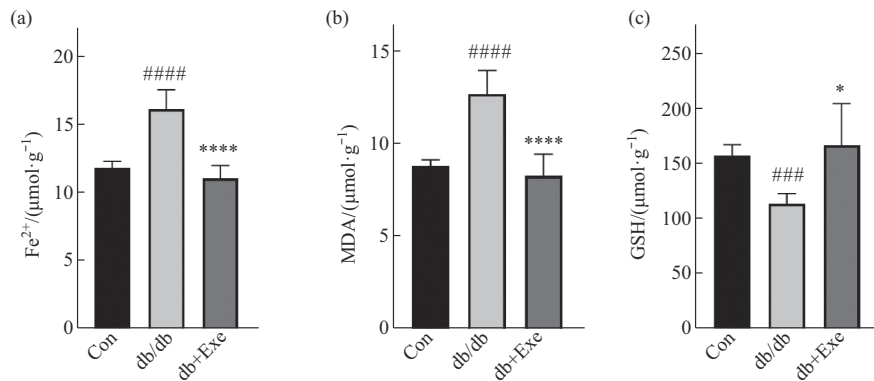


Fig. 4 Effects of treadmill exercise on iron accumulation and lipid peroxidation of liver in NAFLD mice

(a) The expression levels of Fe^{2+} in live of mice; (b) the MDA level detected in liver; (c) the GSH level detected in liver. Data represent mean $\pm$ SD. $n=8$. ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$ vs Con group; * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ vs db/db group.

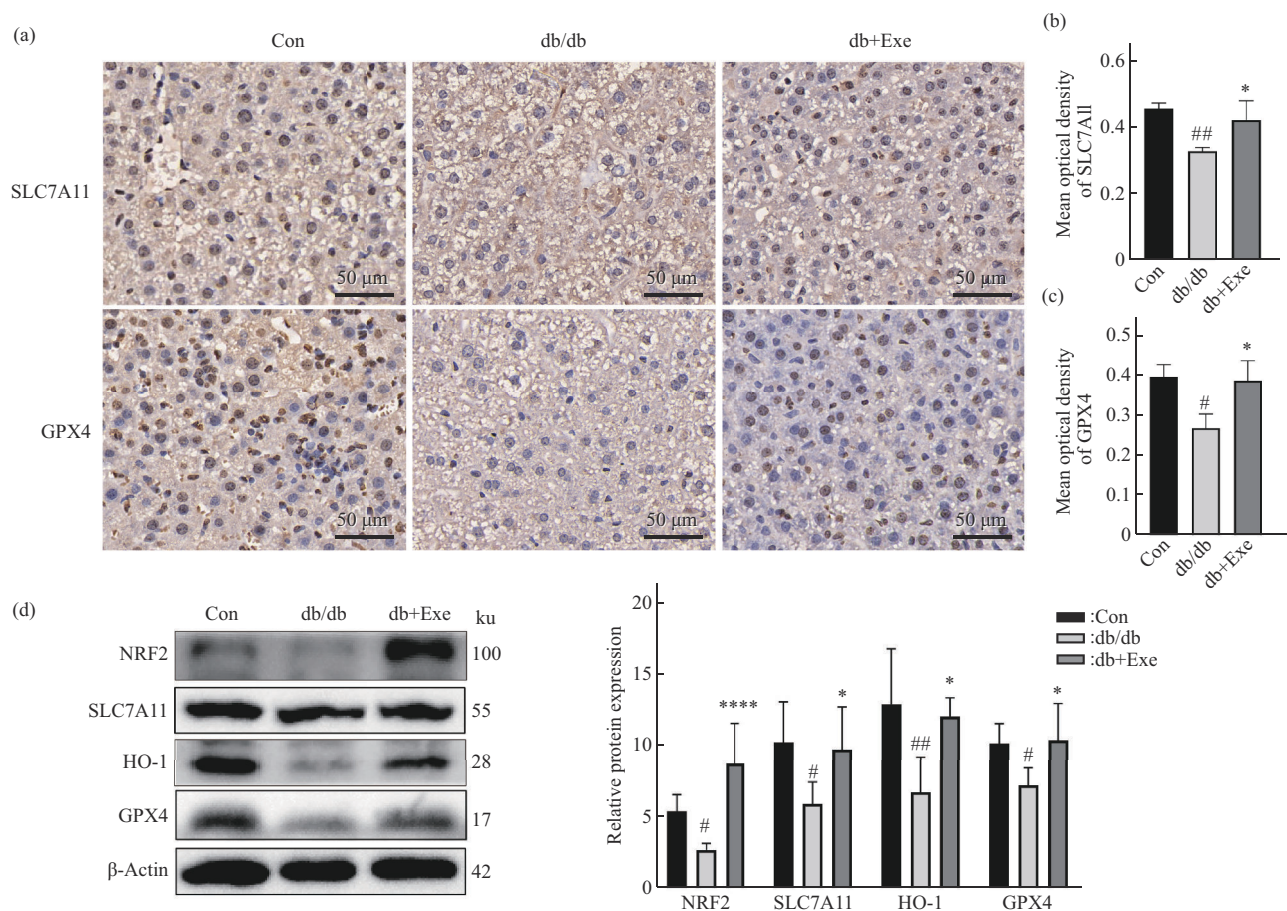


Fig. 5 Effects of treadmill exercise on ferroptosis related proteins of NAFLD mice

(a) IHC staining for SLC7A11 and GPX4 of hepatic tissues; (b) the mean optical density of SLC7A11; (c) the mean optical density of GPX4; (d) Western blotting images and analysis of NRF2, SLC7A11, HO-1 and GPX4 from each group. Data represent mean $\pm$ SD. $n=8$. # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Con group; * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ vs db/db group.

HE与油红O染色结果(图6d, e)显示,单纯抑制剂干预或运动联合抑制剂干预组的小鼠肝脏结构形态均明显受损,并伴有不同程度的脂质沉积,且单纯抑制剂干预组病理改变更加显著。与运动组相比,运动联合抑制剂组小鼠肝脏红染脂滴所占面积明显增多($P<0.05$)。脂质合成蛋白的结果(图6b, c)显示,单纯抑制剂组小鼠肝脏ACC1及SREBF1蛋白及mRNA水平较db/db组具有上升趋势($P>0.05$),运动联合抑制剂干预组小鼠肝组织ACC1、MCP-1、IL-6的mRNA水平较db/db组显著下降($P<0.05$),脂质合成蛋白的表达有下降趋势,

但无统计学差异,同时联合干预组SREBF1蛋白、ACC1蛋白及mRNA水平较单纯抑制剂组显著降低($P<0.01$)。对小鼠肝组织中MCP-1和IL-6的mRNA转录水平进行检测发现,单纯运动与运动联合p38 MAPK抑制剂干预均能显著降低db/db小鼠肝组织中炎症因子的转录水平($P<0.05$)。但与运动组相比,联合干预进一步提高了MCP-1转录水平($P<0.01$)。以上结果提示,抑制p38 MAPK信号部分逆转了跑台运动对NAFLD小鼠肝脏脂肪变性炎症反应的改善作用。

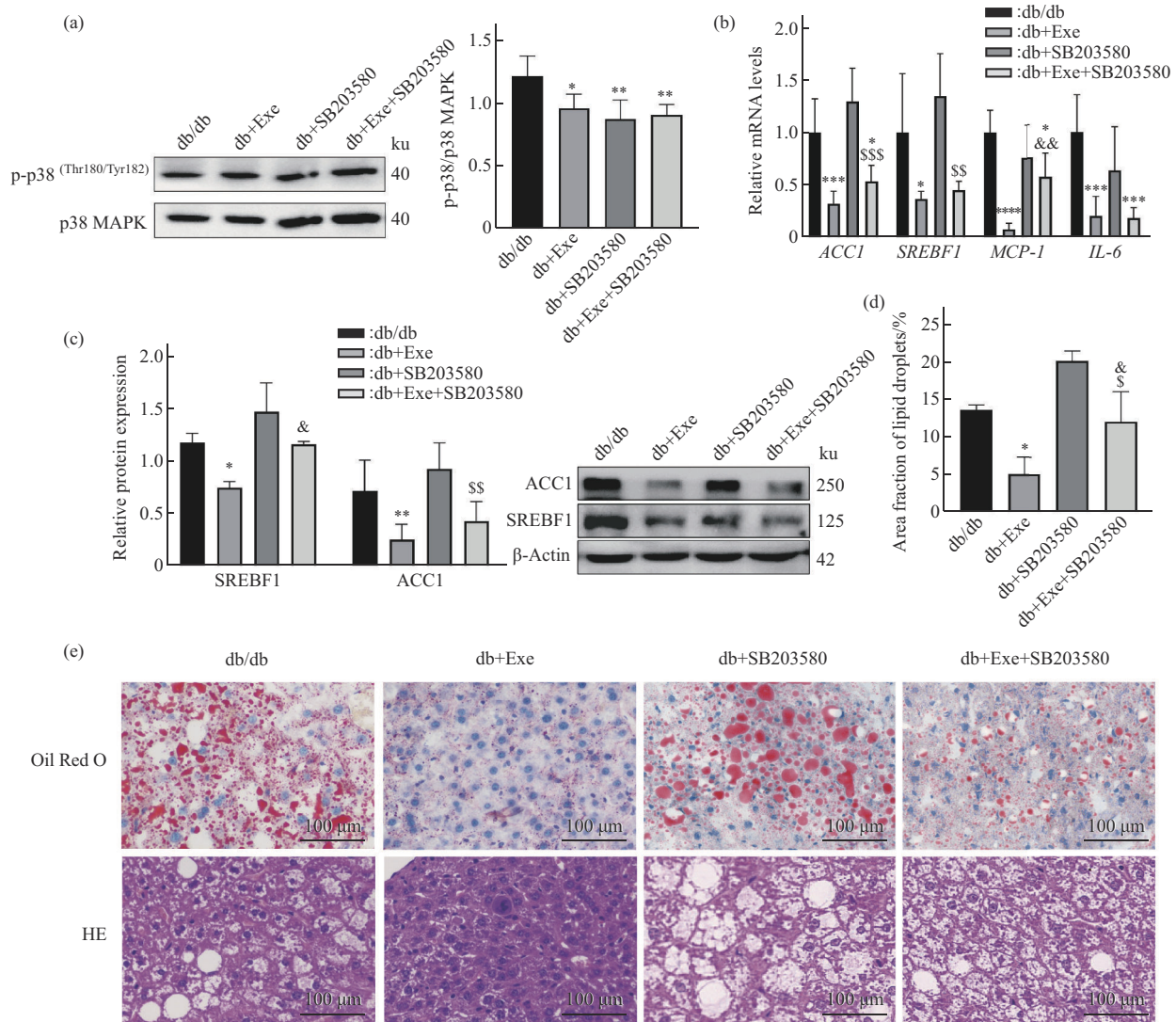


Fig. 6 The effect of inhibiting p38 MAPK signal on the improvement of NAFLD by exercise

(a) Western blot images and analysis of p-p38 MAPK^(Thr180/Tyr182) and p38 MAPK from each group; (b) relative mRNA levels of ACC1, SREBF1, MCP-1 and IL-6; (c) Western blotting images and analysis of ACC1 and SREBF1 from each group; (d) results of quantitative analysis of Oil Red O staining; (e) Oil Red O and HE staining of liver in each group of mice. Data represent mean±SD. $n=8$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs db/db group; & $P<0.05$, && $P<0.01$ vs db+Exe group; § $P<0.05$, §§ $P<0.01$, §§§ $P<0.001$ vs db+SB203580 group.

2.7 抑制p38 MAPK信号对运动调控NAFLD小鼠肝细胞铁死亡的影响

为了探究运动是否通过p38 MAPK 信号调控铁死亡对NAFLD发挥保护作用, 对各组小鼠肝脏铁离子含量、脂质过氧化及铁死亡相关蛋白质表达水平进行检测。结果(图7a~c)显示, 单纯运动与运动联合抑制剂干预均能显著下调db/db小鼠肝组织中铁离子、MDA 含量 ($P<0.01$), 上调GSH 表达水平 ($P<0.001$), 但与db+Exe组相比, 运动联合p38 MAPK 抑制剂干预显著上调小鼠肝组织中铁离子、MDA 含量 ($P<0.05$, $P<0.0001$), 并下调

GSH 表达 ($P<0.0001$), 提示p38 MAPK 抑制剂干预逆转了跑台运动对肝脏铁沉积和脂质过氧化的改善作用。同时, 通过Western blot 检测铁死亡相关通路蛋白的表达, 结果(图7d~e)显示, 与db+Exe组相比, db+Exe+SB203580 组小鼠NRF2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白含量显著降低 ($P<0.05$)。综上所述, 跑台运动能够缓解db/db小鼠肝细胞铁死亡, 而p38 MAPK 抑制剂干预部分逆转了运动对铁死亡的缓解效应, 提示跑台运动依赖p38 MAPK 信号抑制db/db小鼠肝细胞铁死亡。

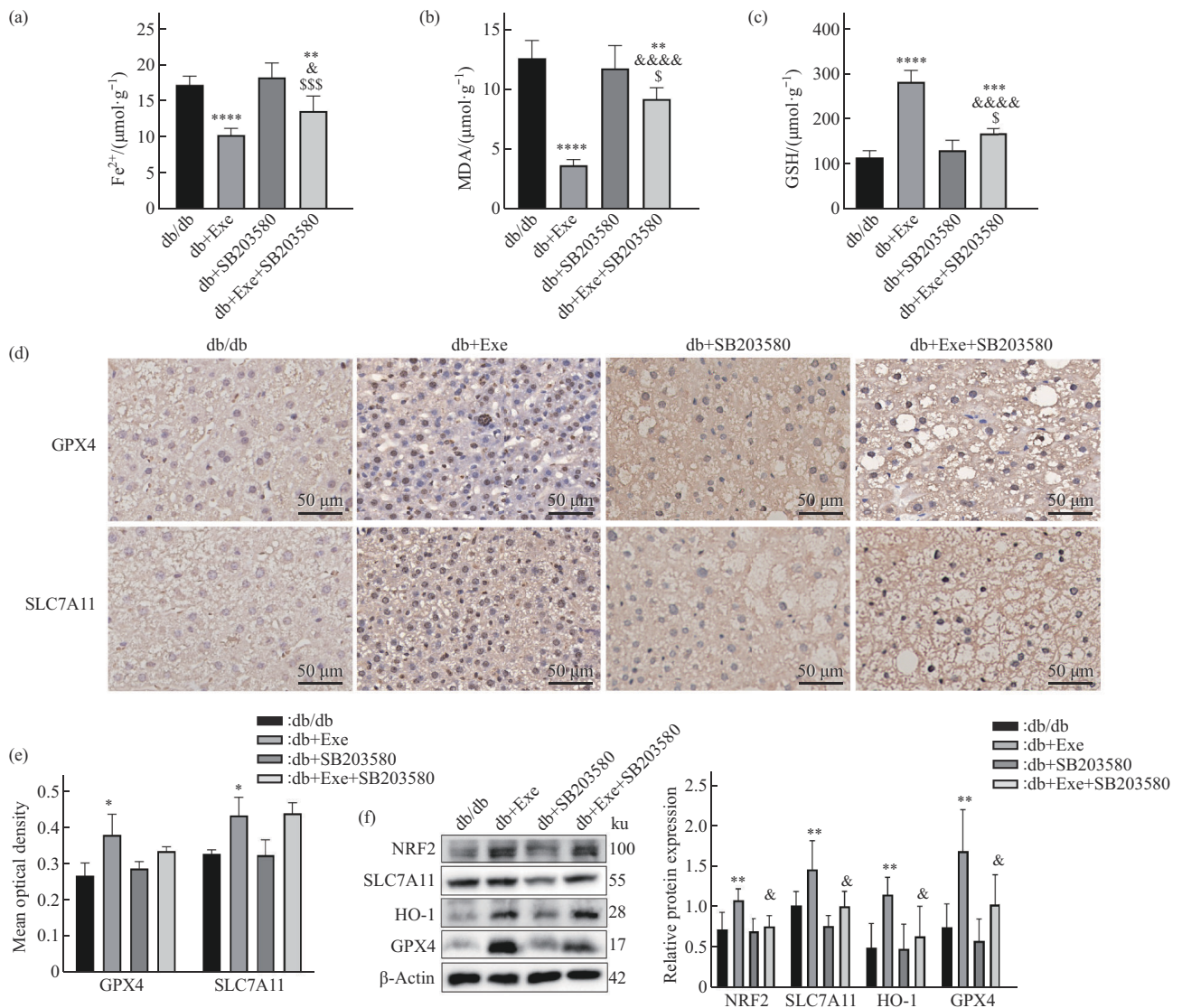


Fig. 7 Effect of inhibiting p38 MAPK signaling on ferroptosis in liver of NAFLD mice

(a) The expression levels of Fe^{2+} in liver of mice; (b) the MDA level detected in liver; (c) the GSH level detected in liver; (d, e) IHC detection of SLC7A11 and GPX4 protein level in liver of mice; (f) Western blotting images and analysis of NRF2, SLC7A11, HO-1 and GPX4 from each group. Data represent mean $\pm$ SD. $n=8$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs db/db group; & $P<0.05$, &&&& $P<0.0001$ vs db+Exe group; \$\$\$ $P<0.001$ vs db+SB203580 group.

3 讨 论

肥胖、胰岛素抵抗、T2DM是NAFLD发生的重要危险因素,其中T2DM与NAFLD的发展密切相关。db/db小鼠是瘦素基因缺陷导致的先天肥胖T2DM小鼠,具有肥胖、高血糖、胰岛素抵抗等特征,并在16周龄时发生显著的肝细胞脂肪变性^[14-15],是研究NAFLD的遗传动物模型。本研究对db/db小鼠体重及空腹血糖进行定期检测,发现db/db小鼠体重及空腹血糖在实验期间持续保持较高水平,且与m/m小鼠相比具有显著差异,此外,通过肝脏组织形态学染色、脂质合成相关蛋白及mRNA转录水平的检测,验证了db/db小鼠的肝脏存在明显的脂肪变性,表明本研究中T2DM合并NAFLD动物模型成立。NAFLD不仅会增加肝硬化、肝癌等肝脏不良结局的风险,也增加了肝外肿瘤、心血管疾病及代谢综合征的发病率^[16],目前尚未研制出NAFLD的治疗药物,减重及运动锻炼的生活方式干预仍是改善NAFLD的主要推荐措施。研究表明,持续15周的跑台运动缓解了HFD喂养诱导的NAFLD小鼠的肥胖、高脂血症和高血糖,并改善了其肝脏脂质沉积与肝损伤^[17]。来自临床研究的证据同样表明,40~60 min/次、3次/周、持续24周的有氧运动可有效改善轻、中、重度NAFLD患者的脂代谢水平及肝功能状态^[18]。与上述结果类似,在本实验中,持续8周的跑台运动干预后,db/db小鼠的体重与空腹血糖明显下降,血清中TG、TC、LDL含量与AST、ALT酶活性显著降低,肝脏中脂滴数量与体积明显减少,脂质合成蛋白SREBF1、ACC1及炎症因子MCP-1、IL-6的表达水平下降,表明8周跑台运动能够有效改善db/db小鼠的肝损伤及脂肪变性。与db/db小鼠相比,p38 MAPK抑制剂联合运动干预组小鼠ACC1、IL-6、MCP-1的mRNA水平同样显著下降;然而,与db+Exe组相比,db+Exe+SB203580组小鼠肝脏炎症因子表达显著增高,脂质合成蛋白表达有上升趋势,提示抑制p38 MAPK信号部分逆转了跑台运动对NAFLD的保护效应。但与db+SB203580组相比,db+Exe+SB203580组小鼠SREBF1蛋白、ACC1蛋白及mRNA水平显著降低,提示在抑制p38 MAPK信号后,运动仍能够对NAFLD发挥一定的改善作用,其原因可能与运动改善NAFLD存在多靶点有关。有关NAFLD的研究发现,在运动发挥保护效应的过程中起作用的通路并不单一,已

有结果证明,Notch、JAK2/STAT、AMPK等信号在运动改善NAFLD的过程中占有重要地位^[19],此外,骨骼肌收缩过程中诱导释放的鸢尾素、白介素等肌肉因子与肝脏因子胰岛素样生长因子1同样在控制肝脏脂代谢中发挥关键作用^[20]。因此推测,虽然抑制p38 MAPK信号在一定程度上削弱了运动对NAFLD的改善效应,但同时运动可以通过其他作用机制继续发挥保护作用。

NAFLD的发病机制及进展过程复杂,胰岛素抵抗、脂肪组织功能障碍、氧化应激、铁超载、饮食、遗传等因素均参与NAFLD的疾病进展,其中,氧化应激已被证实NAFLD的发病机制中占据关键地位^[21]。董建等^[22]在游离脂肪酸棕榈酸和油酸诱导的体外脂肪化肝细胞模型中发现,使用具有抗氧化作用的化合物丹参素异丙酯能够显著减少活性氧的生成,通过缓解肝细胞氧化应激抑制其脂肪变性。非酒精性单纯性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)是NAFLD病程的起点,发生脂肪变性的肝细胞受氧化应激等打击后引起剧烈的炎症反应,从而进一步发展为NASH,但NAFLD病理过程中肝细胞死亡方式丰富多样,涉及细胞凋亡、焦亡、自噬等,NAFL启动炎症反应的触发因素尚不清晰。然而,目前有越来越多的证据表明,铁死亡可能是驱动NAFLD病程的潜在因素。铁死亡是以铁依赖与脂质过氧化为特征的一种细胞程序性死亡方式,区别于凋亡、焦亡等经典的死亡方式,细胞内铁离子的聚集及氧化还原反应失衡导致的脂质活性氧堆积是细胞发生铁死亡的关键特征^[23]。肝脏是铁储存、转运与代谢的主要器官,当肝组织内游离的亚铁离子(Fe^{2+})增多时,将通过催化 H_2O_2 产生有毒的羟基自由基($\cdot\text{OH}$),进而促进氧化应激的发生,这种反应被称为芬顿反应。来自临床研究的证据表明,肝脏中铁代谢异常与NAFLD以及NASH的发病率密切相关^[24],血清铁蛋白的增高可作为预测NAFLD向炎症或纤维化发展的独立指标^[25]。Gao等^[26]发现,在NASH小鼠中铁超载导致肝星状细胞纤维化的激活,而铁螯合剂DFO能够明显降低肝组织内胶原纤维含量及纤维化相关基因的表达。肝细胞铁死亡已被证实发生在NAFLD的早期阶段,抑制铁死亡可以缓解肝细胞损伤及炎症反应,Tsurusaki等^[27]研究发现,使用铁死亡抑制剂能够保护NASH小鼠肝细胞免受损伤,而坏死性凋亡抑制剂并未发挥同样的保护作用。另一项研究发现,铁死亡诱导剂RSL3加剧了

MCD 饲料喂养诱导的 NASH 小鼠肝脏内的脂质堆积与炎症反应, 与之相反的是, 使用铁死亡抑制剂 Lip-1 能够显著改善 NASH 小鼠肝脏的病理改变^[28]。以上研究结果提示, 准确靶向铁死亡可能是治疗 NAFLD 的有效措施。与上述研究结果类似, 本研究通过相关检测发现 T2DM 合并 NAFLD 小鼠模型中肝组织内 Fe^{2+} 及脂质过氧化产物 MDA 水平异常升高, 而抗氧化系统关键底物 GSH 含量降低, 提示 db/db 小鼠的肝脏组织存在铁过载与脂质过氧化物堆积, 肝细胞可能发生铁死亡, 而 8 周跑台运动干预显著降低了小鼠肝组织内 Fe^{2+} 、MDA 含量, 上调了 GSH 的表达。以上证据表明, T2DM 合并 NAFLD 小鼠体内存在肝细胞铁死亡的现象, 铁死亡可能推动 NAFLD 的发病进展, 而运动能够有效抑制铁死亡的进程, 提示跑台运动可能是通过抑制肝细胞铁死亡发挥对 NAFLD 的保护作用。

脂质过氧化是细胞铁死亡的一项主要特征, 抗氧化/氧化系统的功能失衡是导致过氧化物堆积的关键原因, 受多条信号通路的调节。其中, NRF2/HO-1 信号通路通过抑制细胞氧化应激及脂质堆积, 维护氧化-抗氧化轴平衡, 在 NAFLD 的进展过程中发挥重要作用^[29]。NRF2 是抗氧化反应的关键转录因子, 受到刺激后与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1) 解离, 由细胞质易位入细胞核内, 与抗氧化反应元件 (anti-oxidative response element, ARE) 的启动子结合, 启动下游因子 HO-1 的转录与翻译, 促进 Fe^{2+} 、CO、胆绿素的生成, 逆转 NAFLD 的发展进程。同时, NRF2/HO-1 通路还能够通过抑制还原型辅酶 II、醌氧化还原酶 1 等一系列抗氧化应答基因的转录来清除堆积的氧化产物, 缓解细胞氧化应激损伤^[30]。Fang 等^[31] 通过 HFD 喂养建立 NASH 大鼠模型证实, 滇黄芩中的黄酮类成分可激活 KEAP1/NRF2/HO-1 通路来改善肝脏氧化应激, 从而减轻大鼠肝损伤及炎症浸润。除 HO-1 外, NRF2 还可通过促进下游抗氧化转录靶标 SLC7A11、GPX4 的表达发挥抗氧化作用。SLC7A11 位于细胞膜上, 与 SLC3A2 共同构成位于细胞膜上的胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白, 以 1:1 的比例将细胞外的胱氨酸及细胞内的谷氨酸进行转移, 转入细胞内的胱氨酸被还原为半胱氨酸后参与 GSH 的合成。GSH 作为 GPX4 的关键辅助因子, 在 GPX4 清除脂质过氧化物的过程中必不可缺。GPX4 是一种细胞

内抗氧化酶, 能够将细胞内有毒的脂质过氧化物还原为无毒的脂质醇, 同时将 GSH 氧化为氧化型谷胱甘肽, 从而抑制细胞内氧化应激水平^[32]。SLC7A11/GPX4 信号通路是细胞内源性抗氧化系统的关键通路, 激活 SLC7A11/GPX4 信号通路可抑制铁死亡, 改善大鼠实验性肝损伤^[33]。文献表明, 在 HFD 喂养诱导的小鼠中, 14 周的递增负荷跑台运动通过激活 NRF2/GPX4 通路抑制心肌细胞铁死亡, 从而缓解心肌线粒体过氧化导致的心肌损伤^[34]。Liu 等^[35] 研究发现, 脑缺血再灌注大鼠脑组织中 NRF2、SLC7A11 及 GPX4 的蛋白质表达水平下降, 而持续 14 周的跑台运动干预通过上调 NRF2/SLC7A11/GPX4 信号通路相关蛋白质的表达水平发挥神经保护作用, 改善大鼠脑缺血再灌注损伤。与上述研究结果类似, 本研究发现, T2DM 合并 NAFLD 小鼠模型中调控铁死亡的抗氧化系统关键蛋白 NRF2、HO-1、SLC7A11、GPX4 的表达水平显著下降, 但 8 周跑台运动干预逆转了 NRF2、HO-1、SLC7A11、GPX4 表达水平的变化, 提示跑台运动可能是通过激活 NRF2/HO-1 及 SLC7A11/GPX4 信号通路抑制铁死亡发挥对 NAFLD 的保护作用。

上述结果表明, 铁死亡是介导跑台运动改善糖尿病小鼠 NAFLD 的关键靶点, 但其具体分子机制尚不清晰。有文献表明, 高铁刺激可以促进 p38 MAPK 磷酸化, 从而激活这一 MAPK 相关通路, 调控成骨细胞铁死亡^[36], 提示 p38 MAPK 可能是调控铁死亡的信号靶点。MAPK 是一组在细胞生长、分化、凋亡和氧化应激反应调控中起关键作用的信号分子, 其家族主要包括 5 个成员, 包括细胞外信号调节激酶 1/2、c-Jun 氨基端激酶、p38 MAPK、ERK 3/4 以及 ERK5。其中, p38 MAPK 的亚家族包括 4 种亚型 (p38 α 、p38 β 、p38 γ 、p38 δ), 在各种组织中的具有不同的表达模式。研究证明, 肝脏 p38 MAPK 的磷酸化诱导脂肪组织输入肝组织的脂肪酸增多, 引起肝脏脂质沉积及胰岛素抵抗, 从而促进 NAFLD 的病程进展^[37]。Darlyuk-Saadon 等^[38] 在肝脏过表达 p38 α 的转基因小鼠体内发现, p38 α 的过表达伴随着血清 TG 的升高以及肝脏脂质沉积。González-Terán 等^[11] 通过肝脏活检发现, NAFLD 患者肝组织内 p38 γ 与 p38 δ 的 mRNA 转录水平异常升高, 且在 MCD 饲料喂养诱导的 NAFLD 小鼠模型中观察到了类似的现象, 然而特异性敲除小鼠体内 p38 γ 及 p38 δ 后其肝脏脂肪变性明显减轻。

但也有研究提出, p38 MAPK 的磷酸化能够抑制 *FAS*、*SREBF-1c* 等脂质合成基因及 *SREBF-1c* 关键启动因子 *PGC-1 β* 基因的表达, 阻碍脂肪从头合成途径从而减少肝脂质合成^[39]。本研究检测了小鼠肝组织 p38 MAPK 信号在 Thr180/Tyr182 位点的磷酸化水平, 发现 db/db 小鼠肝组织内 p38 MAPK 磷酸化信号异常激活, 跑台运动、单纯 p38 MAPK 抑制剂干预及跑台运动联合 p38 MAPK 干预均能显著抑制 db/db 小鼠肝脏中 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平, 但跑台运动联合 p38 MAPK 抑制剂干预并未发挥叠加效应, p38 MAPK 蛋白的磷酸化水平并未进一步下降, 这与本研究团队前期的研究结果相一致^[40]。我们推测其原因可能是 p38 MAPK 的磷酸化信号已经被跑台运动抑制, 使用 SB203580 后无法进一步降低其磷酸化水平。

研究证据表明, 高铁刺激可以促进 p38 信号磷酸化, 同时 p38 MAPK 信号在维持氧化/抗氧化平衡中发挥重要的调控作用, 这可能是 p38 MAPK 信号调控细胞铁死亡的潜在靶点^[13]。Li 等^[41] 在体外研究中发现, 穿心莲内酯通过激活 p38 MAPK 信号抑制 NRF2/HO-1 信号通路, 继而诱导多发性骨髓瘤细胞铁死亡, 而使用 p38 MAPK 抑制剂削弱了穿心莲内酯对肿瘤细胞铁死亡的促进作用。与其结果相似, 本研究检测了 SB203580 处理对各组小鼠肝脏铁死亡的影响, 结果表明, 与单纯运动组相比, 运动联合 p38 MAPK 抑制剂组小鼠肝脏内铁离子含量、脂质过氧化水平反而上升, NRF2、HO-1、SLC7A11 及 GPX4 的蛋白质表达水平下降, 提示跑台运动可能是通过 p38 MAPK 信号依赖途径抑制 NAFLD 小鼠肝细胞铁死亡。而 Ye 等^[42] 研究发现, 使用 SB203580 或铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 均能够阻断癫痫大鼠海马中 p38 MAPK 的激活, 从而恢复其突触蛋白的表达。本研究的发现与以上研究的结果不同, 加入 p38 MAPK 抑制剂没有抑制铁死亡反而加剧了 db/db 小鼠肝细胞铁死亡, 我们分析这可能与铁死亡在不同疾病模型中的作用机制有关, 其具体功能的探索需要在接下来的实验中进一步完善。

综合上述研究结果, 本研究发现, T2DM 合并 NAFLD 小鼠存在肝细胞脂肪变性及肝脏炎症, 8 周跑台运动可以缓解其肝脏脂肪堆积。然而加入 p38 MAPK 抑制剂会部分逆转运动对 NAFLD 的保护效应, 其原因可能是抑制 p38 MAPK 信号后 NRF2-HO-1 及 SLC7A11/GPX4 通路受到抑制, 继

而导致细胞铁死亡加剧。

4 结 论

本研究采用 db/db 小鼠为研究模型, 证实了 8 周跑台运动能够改善 T2DM 合并 NAFLD 小鼠肝功能损伤、炎症以及肝细胞脂肪变性等, 其保护机制可能是通过 p38 MAPK 信号依赖途径激活 NRF2/HO-1 及 SLC7A11/GPX4 信号通路, 进而抑制肝细胞铁死亡, 缓解肝脏脂肪变性及炎症反应。

参 考 文 献

- [1] Younossi Z M. Non-alcoholic fatty liver disease-a global public health perspective. *J Hepatol*, 2019, **70**(3): 531-544
- [2] Younossi Z M, Golabi P, de Avila L, *et al*. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*, 2019, **71**(4): 793-801
- [3] Allameh A, Niayesh-Mehr R, Aliarab A, *et al*. Oxidative stress in liver pathophysiology and disease. *Antioxidants (Basel)*, 2023, **12**(9): 1653
- [4] Rametta R, Fracanzani A L, Fargion S, *et al*. Dysmetabolic hyperferritinemia and dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS): two related conditions or different entities?. *Curr Pharm Des*, 2020, **26**(10): 1025-1035
- [5] Tsuchiya H, Ebata Y, Sakabe T, *et al*. High-fat, high-fructose diet induces hepatic iron overload via a hepcidin-independent mechanism prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance in mice. *Metabolism*, 2013, **62**(1): 62-69
- [6] Zhang L, Dai X, Wang L, *et al*. Iron overload accelerated lipid metabolism disorder and liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Front Nutr*, 2022, **9**: 961892
- [7] Choi J, Choi H, Chung J. Icarin supplementation suppresses the markers of ferroptosis and attenuates the progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice fed a methionine choline-deficient diet. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(15): 12510
- [8] Fredrickson G, Barrow F, Dietsche K, *et al*. Exercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH. *Mol Metab*, 2021, **53**: 101270
- [9] Bai Y, Li T, Liu J, *et al*. Aerobic exercise and vitamin E improve high-fat diet-induced NAFLD in rats by regulating the AMPK pathway and oxidative stress. *Eur J Nutr*, 2023, **62**(6): 2621-2632
- [10] Manieri E, Sabio G. Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance. *J Mol Endocrinol*, 2015, **55**(2): R11-R22
- [11] González-Terán B, Matesanz N, Nikolic I, *et al*. p38 γ and p38 δ reprogram liver metabolism by modulating neutrophil infiltration. *EMBO J*, 2016, **35**(5): 536-552
- [12] Yao Y, Luo Z P, Li H W, *et al*. P38 γ modulates the lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by regulating the JAK-STAT signaling pathway. *FASEB J*, 2023, **37**(1): e22716
- [13] Wang X, Tan X, Zhang J, *et al*. The emerging roles of MAPK-AMPK in ferroptosis regulatory network. *Cell Commun Signal*,

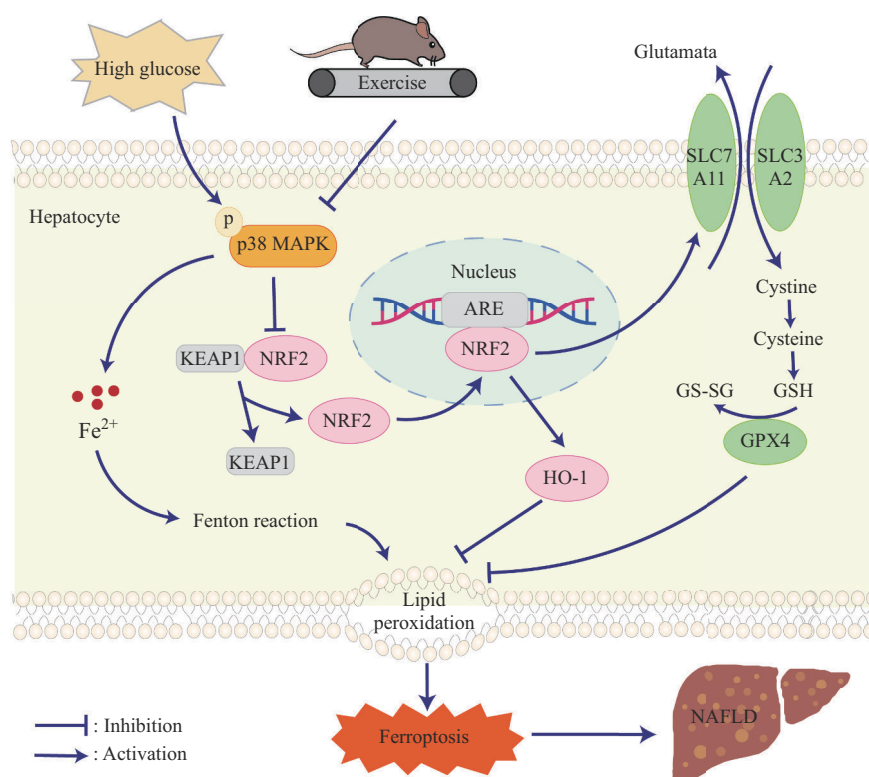
- 2023, **21**(1): 200
- [14] Denk H, Abuja P M, Zatloukal K. Animal models of NAFLD from the pathologist's point of view. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, **1865**(5): 929-942
- [15] Lau J K C, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol*, 2017, **241**(1): 36-44
- [16] Adams L A, Anstee Q M, Tilg H, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut*, 2017, **66**(6): 1138-1153
- [17] Yang Y, Li X, Liu Z, *et al.* Moderate treadmill exercise alleviates NAFLD by regulating the biogenesis and autophagy of lipid droplet. *Nutrients*, 2022, **14**(22): 4910
- [18] 李华斌, 孙萍, 陈瑛, 等. 八段锦对非酒精性脂肪肝的干预研究. *成都体育学院学报*, 2018, **44**(5): 79-83, 90
Li H B, Sun P, Chen Y, *et al.* *J Chengdu Sport Univ*, 2018, **44**(5): 79-83, 90
- [19] 廖春旺, 胡雪峰, 刘祖辉. 运动调控 JAK2/STAT 信号通路治疗非酒精性脂肪性肝病机制的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2023, **45**(6): 918-928
Liao C W, Hu X F, Liu Z H. *Chin J Cell Biol*, 2023, **45**(6): 918-928
- [20] 袁馨梦, 项梦奇, 孙雯, 等. 骨骼肌-肝脏轴在运动干预非酒精性脂肪性肝病中的作用机制研究进展. *中国运动医学杂志*, 2023, **42**(10): 807-817
Yuan X M, Xiang M Q, Sun W, *et al.* *Chin J Phys Med*, 2023, **42**(10): 807-817
- [21] Mooli R G R, Mukhi D, Ramakrishnan S K. Oxidative stress and redox signaling in the pathophysiology of liver diseases. *Compr Physiol*, 2022, **12**(2): 3167-3192
- [22] 董健, 张豫川, 苏强, 等. 丹参素异丙酯对肝细胞脂肪过度蓄积的改善作用及其机制. *中国药理学通报*, 2023, **39**(8): 1541-1547
Dong J, Zhang Y C, Su Q, *et al.* *Chin Pharmacol Bull*, 2023, **39**(8): 1541-1547
- [23] 赵悄雅, 常恒瑞, 常彦忠. 细胞铁死亡的形态学特征及相关疾病治疗. *生物化学与生物物理进展*, 2023, **50**(6): 1286-1295
Zhao Q Y, Chang H R, Chang Y Z. *Prog Biochem Biophys*, 2023, **50**(6): 1286-1295
- [24] Britton L, Bridle K, Reiling J, *et al.* Hepatic iron concentration correlates with insulin sensitivity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Commun*, 2018, **2**(6): 644-653
- [25] Valenti L, Corradini E, Adams L A, *et al.* Consensus Statement on the definition and classification of metabolic hyperferritinaemia. *Nat Rev Endocrinol*, 2023, **19**(5): 299-310
- [26] Gao H, Jin Z, Bandyopadhyay G, *et al.* Aberrant iron distribution via hepatocyte-stellate cell axis drives liver lipogenesis and fibrosis. *Cell Metab*, 2022, **34**(8): 1201-1213.e5
- [27] Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, *et al.* Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(6): 449
- [28] Qi J, Kim J W, Zhou Z, *et al.* Ferroptosis affects the progression of nonalcoholic steatohepatitis via the modulation of lipid peroxidation-mediated cell death in mice. *Am J Pathol*, 2020, **190**(1): 68-81
- [29] 袁志强, 姚婷婷, 李涛, 等. Nrf2 调控的铁死亡途径在非酒精性脂肪性肝病防治中的作用机制. *生物化学与生物物理进展*, 2023, **50**(8): 1882-1893
Yun Z Q, Yao T T, Li T, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2023, **50**(8): 1882-1893
- [30] Li D, Yuan X, Dong S, *et al.* Heme oxygenase-1 prevents non-alcoholic steatohepatitis through modulating mitochondrial quality control. *Acta Physiol*, 2023, **237**(3): e13918
- [31] Fang Q L, Qiao X, Yin X Q, *et al.* Flavonoids from *Scutellaria amoena* C. H. Wright alleviate mitochondrial dysfunction and regulate oxidative stress via Keap1/Nrf2/HO-1 axis in rats with high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Biomed Pharmacother*, 2023, **158**: 114160
- [32] Liu Y, Wan Y, Jiang Y, *et al.* GPX4: The hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, **1878**(3): 188890
- [33] 贾琛琛, 岳蓉, 曾楚华, 等. 蛇菰多糖通过 SLC7A11/GPX4 通路减轻细胞铁死亡改善大鼠实验性肝损伤. *药学报*, 2023, **58**(9): 2694-2699
Jia C C, Yue R, Zeng C H, *et al.* *Acta Pharm Sin*, 2023, **58**(9): 2694-2699
- [34] 王海涛, 杨雯茜, 刘玉倩. 有氧运动对高脂膳食小鼠心肌损伤中 Nrf2/GPX4/Ferroptosis 通路的作用. *中国应用生理学杂志*, 2022, **38**(2): 143-148
Wang H T, Yang W Q, Liu Y Q. *Chin J Appl Physiol*, 2022, **38**(2): 143-148
- [35] Liu T, Cui Y, Dong S, *et al.* Treadmill training reduces cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis through activation of SLC7A11/GPX4. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, **2022**: 8693664
- [36] 赵恒伍, 王文娟, 陈胜武. 铁超载通过 ASK1-p38 通路介导的铁死亡途径抑制成骨细胞功能. *中国医科大学学报*, 2021, **50**(6): 530-534
Zhao H W, Wang W J, Chen S W. *J China Med Univ*, 2021, **50**(6): 530-534
- [37] Liu W, Sun C, Yan Y, *et al.* Hepatic P38 activation modulates systemic metabolism through Fgf21-mediated interorgan communication. *Diabetes*, 2022, **71**(1): 60-72
- [38] Darlyuk-Saadon I, Bai C, Heng C K M, *et al.* Active p38 α causes macrovesicular fatty liver in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(14): e2018069118
- [39] Xiong Y, Collins Q F, An J, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis. *J Biol Chem*, 2007, **282**(7): 4975-4982
- [40] 牛梦竹, 童诗逸, 寇现娟. 跑步运动通过依赖 p38MAPK 信号通路上调 FNDC5 改善 db/db 小鼠非酒精性脂肪性肝病. *中国细胞生物学学报*, 2023, **45**(1): 15-25
Niu M Z, Tong S Y, Kou X J. *Chin J Cell Biol*, 2023, **45**(1): 15-25
- [41] Li W, Fu H, Fang L, *et al.* Andrographolide induced ferroptosis in multiple myeloma cells by regulating the P38/Nrf2/HO-1 pathway. *Arch Biochem Biophys*, 2023, **742**: 109622
- [42] Ye Q, Zeng C, Luo C, *et al.* Ferrostatin-1 mitigates cognitive impairment of epileptic rats by inhibiting P38 MAPK activation. *Epilepsy Behav*, 2020, **103**(Pt A): 106670-106683

Exercise Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in T2DM Mice by Inhibiting Ferroptosis Through p38 MAPK Signaling Pathway*

ZHANG Bao-Wen, LI Ying, GAO Yuan, SHENG Ke-Yan, WANG Zhi, KOU Xian-Juan**

(Hubei Key Laboratory of Exercise Training and Monitoring, College of Sports Medicine, Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To explore the mechanism of treadmill exercise against type 2 diabetes mellitus (T2DM) with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on the regulator effects of exercise on ferroptosis. **Methods** Eight 8-week-old male m/m mice were used as control group (Con, $n=8$), and db/db mice of the matched age were randomly divided into T2DM model group (db/db, $n=8$), exercise group (db+Exe, $n=8$), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor group (db+SB203580, $n=8$) and exercise combined with p38 MAPK inhibitor group (db+Exe+SB203580, $n=8$). After one-week adaptive feeding, the mice in the db+Exe group and db+Exe+SB203580 group underwent moderate intensity treadmill exercise for 40 min/d, 5 d/week

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81601228) and Ministry of Education Humanities and Social Sciences Research Planning Fund (21YJA890014).

** Corresponding author.

Tel: 86-13627292193, E-mail: kouxianjuan@126.com

Received: January 19, 2024 Accepted: April 23, 2024

lasting 8 weeks. The db+SB203580 group and db+Exe+SB203580 group were treated with SB203580 (a specific inhibitor of p38 MAPK) with a dose of 5 mg/kg, 5 d/week for 8 weeks. And the exercise intervention was performed 2 h later after the intraperitoneal injection of SB203580. The body weight and fasting blood glucose of mice were measured regularly every week during the experiment. After 24 h of the last intervention, the mice were weighted, the liver tissues were taken, weighted and the liver index was calculated. The pathological changes of liver were determined by Oil Red O and hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of blood lipids, liver function, Fe^{2+} and oxidative stress markers of liver were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The related mRNA expression levels of lipogenesis and inflammation were evaluated by quantitative reverse transcriptase-mediated PCR (qRT-PCR). The related protein expression levels of lipogenesis and ferroptosis in liver were determined by immunohistochemical (IHC) staining and Western blot. **Results** The body weight, fasting blood glucose, liver index, blood lipid and transaminase levels in the db/db group were significantly increased compared with the Con group. HE and Oil Red O staining showed severe lipid accumulation and ballooning change in the liver of db/db mice. Biochemical tests showed that Fe^{2+} and MDA level of liver constitution homogenate increased, while GSH level decreased significantly. The results of qRT-PCR showed that the mRNA levels of MCP-1, IL-6, SREBF1 and ACC1 in liver tissue of db/db mice were all significantly increased. Western blot results showed that the expression levels of SREBF1, ACC1 increased, ferroptosis relative proteins were significantly decreased. The 8 weeks of exercise significantly reduced the rise in body weight, blood glucose, liver index and blood lipid levels in db/db mice. Exercise intervention also alleviated hepatic steatosis and reduced the expression levels of Fe^{2+} , MDA, MCP-1, IL-6, ACC1 and SREBF1, upregulated the expression levels of GSH, NRF2, HO-1, SLC7A11 and GPX4 in liver tissue of db/db mice. The intervention of exercise combined with SB203580 significantly down-regulated the mRNA expression levels of ACC1, MCP-1, IL-6, reduced the levels of Fe^{2+} and MDA, and up-regulated the level of GSH in db/db mice. Compared with the db+Exe group, the expression of Fe^{2+} , MDA, MCP-1, and SREBF1 in the liver of the db+Exe+SB203580 group mice significantly increased, while the expression level of GSH and expression levels of ferroptosis relative proteins also significantly decreased. In addition, compared with db+SB203580 group, the iron accumulation and lipid peroxidation in the liver of db+Exe+SB203580 group were significantly improved. **Conclusion** The 8-week treadmill exercise can effectively alleviate liver injury and steatosis, and its mechanism may be related to the inhibition of hepatocyte ferroptosis through p38 MAPK signal.

Key words treadmill exercise, NAFLD, ferroptosis, p38 MAPK, diabetes mellitus

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0024