

有氧运动和白藜芦醇对 II 型糖尿病大鼠肝脏 氧化应激及 NF- κ Bp65 的影响

曹 姣, 肖国强

(华南师范大学 体育科学学院, 广东 广州 510006)

摘 要: 为探讨有氧运动和白藜芦醇(Res)对 II 型糖尿病(T2DM)大鼠肝脏氧化应激及 NF- κ Bp65 的影响, 采用 5 周高糖高脂饮食加小剂量注射链脲佐菌素(STZ)(35 mg/kg)构建 T2DM 大鼠模型。将 40 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 分别为正常对照组(C 组)、T2DM 模型组(D 组)、“T2DM+运动”组(DE 组)、“T2DM+Res”组(DR 组)、“T2DM+运动+Res”组(DER 组), 每组 8 只。运动为不负重游泳训练, 每周 6 d, Res 采用灌胃方法按照 45 mg/(kg·d)进行, 每周 7 d, 7 周后检测大鼠空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)和肝脏 TG、TC、SOD、MDA、TNF- α 以及 SREBP1、SREBP2 和 NF- κ Bp65 核蛋白的表达。结果发现, 1)与 D 组比较, DE 组、DR 组和 DER 组大鼠 FINS、HOMA-IR 均显著下降($P<0.05$), FBG 呈降低趋势($P>0.05$), DER 组与 DE 组、DR 组比较, FBG、FINS 和 HOMA-IR 均进一步降低($P>0.05$); 2)与 D 组比较, DE 组、DR 组和 DER 组大鼠肝脏 SOD 活性显著升高($P<0.05$), 而 MDA 含量, 肝指数, 肝脏 TG、TC、nSREBP1、TNF- α 、NF- κ Bp65 核蛋白均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而 nSREBP2 呈降低趋势($P>0.05$), DER 组较 DE 组、DR 组比较, 上述指标均进一步降低。结果说明, 7 周有氧运动和 Res 均能改善 T2DM 大鼠肝脏氧化应激和炎症反应, 两者联合干预较单一效果更为显著, 其机制可能通过抑制肝脏 nSREBPs 从而减少肝脏的脂质沉积引起的氧化应激, 最终抑制 NF- κ Bp65 诱导的 TNF- α 的激活而实现。

关 键 词: 运动生物化学; 有氧运动; 白藜芦醇; II 型糖尿病; 肝脏; SREBP1 基因; NF- κ Bp65 基因; 大鼠

中图分类号: G804.7 文献标志码: A 文章编号: 1006-7116(2013)06-0138-07

Effects of aerobic exercise and resveratrol on oxidative stress and NF- κ Bp65 in the livers of type II diabetic rats

CAO Jiao, XIAO Guo-qiang

(School of Physical Education, South China Normal University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to probe into the effects of aerobic exercise and resveratrol (Res) on oxidative stress and NF- κ Bp65 in the livers of type II diabetic (T2DM) rats, the authors established a T2DM rat model by feeding the rats with high sugar and high fat food and injecting a small dose (35 mg/kg) of streptozotocin (STZ) into the rats for 5 weeks, divided 40 class SPF male SD rats randomly into 5 groups, namely, a normal control group (group C), a T2DM group (group D), a “T2DM+exercise” group (group DE), a “T2DM+Res” group (group DR), and a “T2DM+exercise+Res” group (group DER), each of which contained 8 rats. The exercise was unloaded swimming training, done 6 d a week; the Res was orally administrated at a rate of 45 mg/(kg·d), 7 d a week. 7 weeks later, the authors measured the rats' fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), and liver TG, TC, SOD, MDA and TNF- α , and the expression of nucleoproteins nSREBP1, nSREBP2 and NF- κ Bp65, and revealed the following findings: 1) comparing the rats in groups DE,

DR and DER with the rats in group D, FINS and HOMA-IR decreased significantly ($P < 0.05$), while FBG showed a trend of decreasing ($P > 0.05$); comparing the rats in group DER with the rats in groups DE and DR, FBG, FINS and HOMA-IR decreased further ($P > 0.05$); 2) comparing the rats in groups DE, DR and DER with the rats in group D, liver SOD activity increased significantly ($P < 0.05$), while MDA content, liver index, nucleoproteins TG, TC, nSREBP1, TNF- α and NF- κ Bp65 in the livers decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while SREBP2 showed a trend of decreasing ($P > 0.05$); comparing the rats in group DER with the rats in groups DE and DR, all the said indexes decreased further. The said findings indicated the followings: both 7-week aerobic exercise and Res can improve oxidative stress and inflammatory reaction in the livers of T2DM rats; aerobic exercise and Res combined intervention produced an effect more significant than the effect produced by aerobic exercise intervention or Res intervention alone, its mechanism may be realized by suppressing nSREBPs in the livers, thus reducing oxidative stress caused by lipid deposition in the livers, and ultimately suppressing the activation of TNF- α induced by NF- κ Bp65.

Key words: sports biochemistry; aerobic exercise; resveratrol; type II diabetes; liver; gene SREBP1; gene NF- κ Bp65; rat

当前, 糖尿病已成为全世界危害人类健康的严重性疾病之一, 其中 II 型糖尿病(T2DM)占到该人群的 90%^[1]。T2DM 是以高血糖和胰岛素抵抗(IR)为主要特征的一种代谢综合征, 常伴随有脂代谢异常如脂质异位沉积^[2], 特别是沉积在肝脏、骨骼肌引起氧化应激和 IR 等, 氧化应激和炎症参与 IR 和肥胖相关的代谢紊乱, 可通过引起一系列变化导致糖尿病并发症的发生发展^[3]。SREBPs(包括 SREBP1 和 SREBP2)是一组螺旋-环螺旋亮氨酸拉链转录因子家族, 在代谢率较强器官中高表达, 调控胆固醇和脂肪酸代谢的相关酶基因, 在脂肪生成、胰岛素敏感性和脂肪酸稳态中扮演非常重要作用的角色^[4]。NF- κ B 为启动炎症反应的重要转录因子, 研究发现, 选择性敲除高脂饮食大鼠肝脏 NF- κ B 能抑制脂质介导的 IR, 提示 NF- κ B 在其中起重要作用, 可能作为防治 IR 相关疾病的靶标^[5]。

规律运动作为一种非药理学治疗手段^[6], 具有的多效功能能显著改善 T2DM 大鼠高血糖、氧化应激、IR 和代谢综合征等^[1], 但能否通过 SREBPs、NF- κ Bp65 改善肝脏氧化应激和炎症尚不清楚。白藜芦醇(Res)属于芳香植物营养素中的一种多酚类化合物, 具有抗氧化^[7]、抗炎^[8]和抗细胞凋亡等, 能较好改善 IR^[9]和 T2DM 的氧化应激状态^[7], 然而对 T2DM 肝脏的具体作用机制尚不明确。并且将有氧运动和白藜芦醇联合作为一种新型的干预手段, 是否对 T2DM 有更好的作用? 尚未被研究。因此, 本研究通过开展 7 周游泳训练及 Res 干预, 探讨有氧运动和 Res 对 T2DM 肝脏的作用机制及联合作用效应, 旨在为防治 T2DM 及其并发症提供一定的实验依据和理论基础, 为临床治疗提供新的研究思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠(购自广州中医药大学实验动物中心), 体重(180 \pm 20) g。正常大鼠以普通饲料(购自广州中医药大学实验动物中心)喂养, T2DM 造模组大鼠以高糖高脂饲料喂养。高糖高脂饲料配方: 20% 蔗糖, 10% 猪油, 5% 蛋黄粉, 0.2% 胆酸钠, 64.8% (均为质量比)。基础饲料由广州花都东信华实验动物养殖场配制。

1.2 T2DM 模型大鼠造模

大鼠经高糖高脂饲料喂养 5 周后按 35 mg/kg 腹腔注射链脲佐菌素(STZ), STZ 现配现用, 配好的 STZ 在避光条件下 30 min 内完成注射。注射 3 d 和 7 d 后, 尾静脉取血测试随机血糖浓度, 血糖浓度均 ≥ 16.7 mmol/L 为成模大鼠。

1.3 实验分组

将 40 只健康 SPF 级雄性 SD 大鼠分为正常对照组(C 组, 8 只)、II 型糖尿病组(D 组, 8 只)、“II 型糖尿病+运动”组(DE 组, 8 只)、“II 型糖尿病+Res”组(DR 组, 8 只)、“II 型糖尿病+运动+Res”组(DER 组, 8 只)。

1.4 运动训练方案

运动组大鼠进行为期 7 周不负重游泳训练, 1 周的适应性训练后(10 min/d)进行正式训练, 训练时间为第 1 周 30 min/d, 第 2 周 45 min/d, 第 3~7 周 60 min/d, 每周训练 6 d。游泳在白色大水桶中进行, 每桶 4 只动物, 水深 60 cm。

1.5 Res 灌胃处理

Res 溶于双蒸水中制成(6 mg/mL)悬浊液。采用灌胃的方法按照 45 mg/(kg \cdot d)对大鼠进行干预, 灌胃组大鼠灌胃每周 7 d。对照组大鼠灌以双蒸水。

1.6 标本采集与处理

7 周游泳训练和 Res 给药干预, 停止干预 36 h 后(避免急性运动效应)禁食 12 h, 尾静脉取血检测空腹

血糖(FBG)和空腹胰岛素(FINS)。之后宰杀大鼠,利用质量分数为 10%水合氯醛(3.5~4.0 mL/kg)进行麻醉后,5 min 后宰杀大鼠,取肝脏称重并测定肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)、甘油三脂(TG)、总胆固醇(TC),另取少部分组织置于液氮罐中保存待测肝脏中的 TNF- α 蛋白及 SREBP1、SREBP2、NF- κ Bp65 核蛋白。

1.7 检测指标及方法

1)FBG 采用 JPS-5 怡成血糖仪测定;FINS 采用 ELISA 法测定;肝重采用电子天平测定;SOD、MDA、TG、TC 均采用南京建成生物有限公司提供试剂盒测定;TNF- α 、nSREBP1、nSREBP2、NF- κ Bp65 核蛋白测定(北京博奥森生物技术有限公司提供 TNF- α 、NF- κ Bp65、SREBP1、SREBP2 多克隆抗体)均参照李树基的 Western-blot 测试方法^[10]。

2)胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)计算方法:

$$\text{HOMA-IR} = \text{FBG} \times \text{FINS} / 22.5.$$

1.8 统计学方法

各组数据通过 Excel2003 和 SPSS16.0 软件包进行统计学分析。实验数据均以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各处理组间数据比较采用双因素方差分析和两样本 T 检验,显著性水平为 $P < 0.05$,非常显著性水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 各组大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR 的变化

如表 1 所示, D 组(T2DM 组)与 C 组(正常对照组)比较,FBG、HOMA-IR 非常显著升高($P < 0.01$, $P < 0.01$),FINS 显著升高($P < 0.05$)。与 D 组比较,DE 组、DR 组 FINS、HOMA-IR 显著下降($P < 0.05$),DER 组与 D 组比较,FINS 非常显著降低($P < 0.01$),而 HOMA-IR 显著降低($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 FBG、FINS 和 HOMA-IR ($\bar{x} \pm s$) 的变化

组别	n/只	c(FBG)/(mmol · L ⁻¹)	ρ (FINS)/(ng · mL ⁻¹)	HOMA-IR
C	8	5.83 \pm 0.46	1.20 \pm 0.17	0.357 \pm 0.052
D	8	7.25 \pm 0.88 ²⁾	1.54 \pm 0.09 ¹⁾	0.517 \pm 0.076 ²⁾
DE	8	6.24 \pm 0.62	1.29 \pm 0.20 ³⁾	0.382 \pm 0.056 ³⁾
DR	8	6.60 \pm 0.28	1.25 \pm 0.42 ³⁾	0.398 \pm 0.025 ³⁾
DER	8	6.40 \pm 0.30	1.13 \pm 0.07 ⁴⁾	0.367 \pm 0.039 ³⁾

与 C 组比较, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; 与 D 组比较, 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$

2.2 各组大鼠肝脏氧化应激水平的变化

如表 2 所示,与 C 组比较, D 组大鼠肝脏 MDA 质量摩尔浓度显著升高($P < 0.05$),而 SOD 活性显著下降($P < 0.05$);与 D 组比较,DE 组、DR 组和 DER 组大鼠肝脏 MDA 质量摩尔浓度显著下降($P < 0.05$),SOD 活性显著升高($P < 0.05$),与 DER 组比较,DE 组 MDA 质量摩尔浓度非常显著升高($P < 0.01$),而 DR 组显著升高($P < 0.05$),DE 组、DR 组和 DER 组 SOD 活性 3 组之间无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肝脏 MDA 表达、SOD 活性 ($\bar{x} \pm s$) 的变化

组别	n/只	b(MDA)/(nmol · mg ⁻¹)	SOD 活性/(U · mg ⁻¹)
C	8	18.96 \pm 0.60	506.13 \pm 35.12
D	8	30.24 \pm 1.07 ¹⁾	438.95 \pm 32.26 ¹⁾
DE	8	24.71 \pm 0.13 ²⁾⁴⁾	477.62 \pm 30.56 ²⁾
DR	8	23.41 \pm 1.91 ²⁾³⁾	439.39 \pm 26.64 ²⁾
DER	8	19.29 \pm 0.79 ²⁾	501.01 \pm 29.61 ²⁾

与 C 组比较, 1) $P < 0.05$; 与 D 组比较, 2) $P < 0.05$; 与 DER 组比较, 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$

2.3 各组大鼠肝脏脂质各指标的变化

1)各组大鼠肝指数及 TG、TC 的变化。

如表 3 所示,与 C 组比较, D 组肝指数、肝脏 TG、TC 均非常显著升高($P < 0.01$),与 D 组比较,DE 组、DR 组和 DER 组肝指数、肝脏 TG、TC 均显著下降($P < 0.05$),而 DE 组和 DR 组较 DER 组表现为显著升高($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠肝指数及 TG、TC ($\bar{x} \pm s$) 的变化

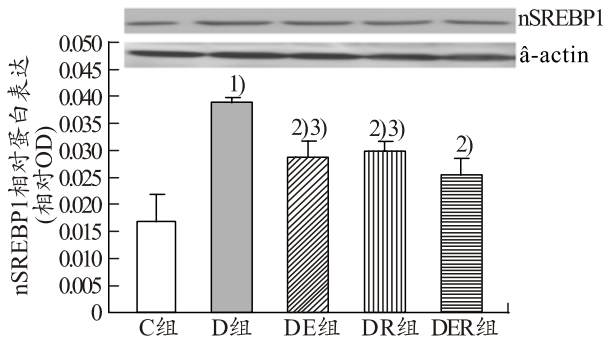
组别	n/只	肝指数/%	w(肝脏 TG)/(mg · g ⁻¹)	w(肝脏 TC)/(mg · g ⁻¹)
C	8	2.26 \pm 0.00	13.32 \pm 0.32	3.21 \pm 0.14
D	8	5.07 \pm 0.01 ¹⁾	32.66 \pm 0.56 ¹⁾	7.58 \pm 2.10 ¹⁾
DE	8	3.23 \pm 0.01 ²⁾³⁾	25.76 \pm 0.55 ²⁾³⁾	5.54 \pm 1.56 ²⁾³⁾
DR	8	3.32 \pm 0.01 ²⁾³⁾	24.91 \pm 0.13 ²⁾³⁾	5.12 \pm 2.64 ²⁾³⁾
DER	8	3.01 \pm 0.00 ²⁾	18.56 \pm 0.41 ²⁾	4.10 \pm 1.23 ²⁾

与 C 组比较, 1) $P < 0.01$; 与 D 组比较, 2) $P < 0.05$; 与 DER 组比较, 3) $P < 0.05$

2)各组大鼠肝脏 SREBPs(SREBP1 和 SREBP2)核蛋白(nSREBPs)的表达。

由图 1 可知,与 C 组比较, D 组肝脏中 nSREBP1 的表达显著升高($P < 0.05$),与 D 组比较,DE 组、DR 组、DER 组肝脏 nSREBP1 的表达显著降低($P < 0.05$),与 DER 组比较,DE 组、DR 组肝脏中 nSREBP1 表达显著升高($P < 0.05$)。

由图 2 可知, 与 C 组比较, D 组肝脏 nSREBP2 表达升高, 无显著性差异($P>0.05$); 与 D 组比较, DE 组、DR 组、DER 组肝脏中 nSREBP2 表达逐步呈降低趋势($P>0.05$)。



与 C 组比较, 1) $P<0.05$; 与 D 组比较, 2) $P<0.05$; 与 DER 组比较, 3) $P<0.05$

图 1 不同组别大鼠肝脏中 nSREBP1 的表达

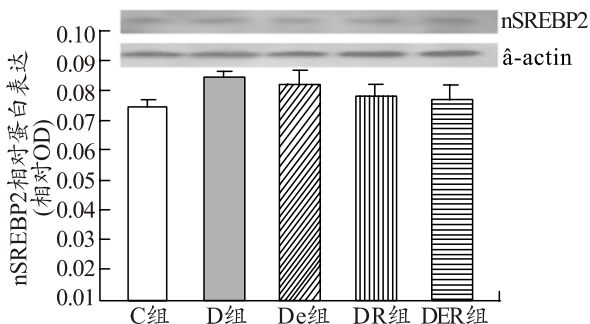
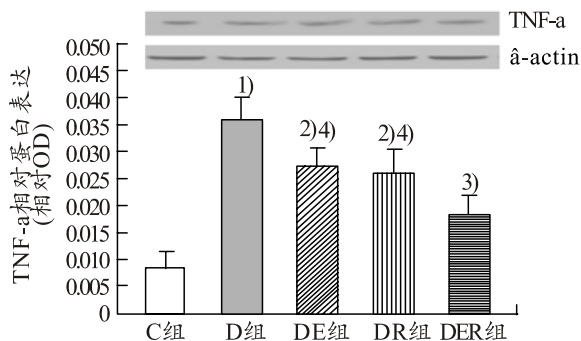


图 2 不同组别大鼠肝脏中 nSREBP2 的表达

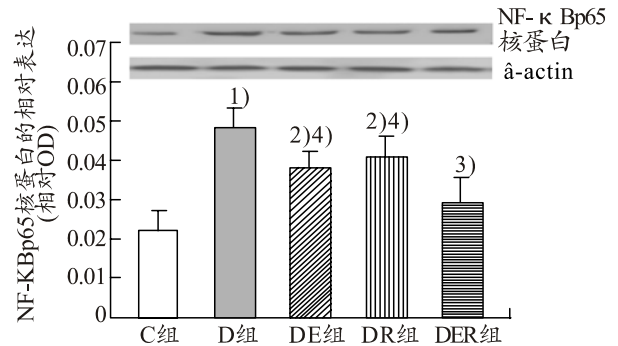
2.4 各组大鼠肝脏炎症反应水平(TNF- α)、NF- κ Bp65 核蛋白表达的变化

由图 3、图 4 可知, 与 C 组比较, D 组肝脏中 TNF- α 、NF- κ Bp65 核蛋白表达非常显著升高($P<0.01$, $P<0.01$), 与 D 组比较, DE 组、DR 组、DER 组肝脏中 TNF- α 、NF- κ Bp65 核蛋白表达均显著降低($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$), 与 DER 组比较, DE 组、DR 组肝脏中 TNF- α 、NF- κ Bp65 核蛋白表达均显著升高($P<0.05$, $P<0.05$)。



与 C 组比较, 1) $P<0.01$; 与 D 组比较, 2) $P<0.05$, 3) $P<0.01$; 与 DER 组比较, 4) $P<0.05$

图 3 不同组别大鼠肝脏中 TNF- α 的表达



与 C 组比较, 1) $P<0.01$; 与 D 组比较, 2) $P<0.05$, 3) $P<0.01$; 与 DER 组比较, 4) $P<0.05$

图 4 不同组别大鼠肝脏中 NF- κ Bp65 核蛋白的表达

3 讨论

本实验结果显示, 7 周有氧运动或 Res 能显著降低 T2DM 大鼠血清 FINS 和 HOMA-IR, 与相关研究结果相一致^[11], 而运动和 Res 联合干预与单一干预比较能进一步降低 T2DM 血清 FINS 和 HOMA-IR, 尽管无显著性差异($P>0.05$)。

氧化应激是糖尿病及其并发症共同的发病机制。然而在 T2DM 中, 肝脏由于代谢紊乱和肝脏 IR, 成为遭受应激的最主要器官。氧化应激与 IR 之间存在紧密联系^[12]。TNF- α 也能直接或间接介导 IR 状态^[13]。因此, 本研究就 T2DM 肝脏氧化应激和炎症之间的分子联系, 探讨有氧运动和 Res 对 T2DM 大鼠肝脏氧化应激和炎症影响及可能的作用机制。

3.1 有氧运动和 Res 对 T2DM 大鼠肝脏氧化应激的影响

肝脏中脂质过氧化物反映脂质过氧化程度, 可以用 MDA 质量摩尔浓度变化来表示。研究表明, 经高脂饮食后, 大鼠肝脏氧化应激增加, 所引起的氧化损伤是 IR 和代谢综合症的发病原因^[14]。氧化应激过程中产生的活性氧(ROS)可通过激活各种应激敏感性细胞内信号通路, 包括 NF- κ B、p38MAPK、JNK/SAPK、PKC 和多元醇通路间接损伤细胞。文献表明, 在实验性糖尿病大鼠肝脏中脂质过氧化产物水平升高^[15]。我们的研究结果显示, T2DM 大鼠肝脏中 MDA 质量摩尔浓度显著升高, 而 SOD 活性显著下降, 表明 T2DM 大鼠肝脏氧化应激加强。经过 7 周有氧运动后, T2DM 大鼠 MDA 质量摩尔浓度显著下降, 而 SOD 活性显著升高, 与相关研究结果相一致^[16]。Res 能改善 T2DM 大鼠的氧化应激^[7], 我们的研究结果进一步表明, 7 周 Res 干预能显著改善 T2DM 大鼠肝脏的氧化应激, 此外, 经 7 周有氧运动联合 Res 较单一干预, 其肝脏中 MDA 水平进一步下降($P<0.01$, $P<0.05$), 且 SOD 活性呈升高趋势, 表明肝脏氧化应激得到更好的改善。

脂质的过度堆积导致线粒体中脂肪酸 β 氧化不充分, ROS生成增多, 脂质过氧化物产生增多, 导致氧化应激。SREBPs是膜结合转录因子, 控制胆固醇和脂肪酸代谢相关酶基因的表达, 调节脂肪生成、胰岛素敏感性和脂肪酸稳态。SREBP家族包括SREBP1(SREBP1a、SERBP1c)和SREBP2。前者在代谢活性较强器官中高表达, 如肝脏、脂肪组织和骨骼肌, 调节脂质代谢及胰岛素^[4], 后者参与合成TC, 同时可调节血脂, 影响动脉粥样硬化血管^[17]。

目前关于运动对DM大鼠肝脏SERBP的影响仅徐国琴^[18]有相关研究, 该项研究表明, 运动训练能降低DM大鼠肝脏中SREBP表达。至于SREBP哪一种亚型起作用或是否两者共同作用尚不清楚。本实验在此基础上进一步研究, 结果显示, 有氧运动干预后T2DM大鼠肝指数、肝脏TG、TC均显著下降($P<0.05$), 控制脂质生成的转录因子nSREBP1水平显著下降, 而nSREBP2呈下降趋势, 提示有氧运动能显著降低肝脏的脂质沉积, 其机制可能通过作用于nSREBP1。Res作为SIRT1的一种强激活剂, 可增加SIRT1、AMPK的活性^[19], 抑制SREBP1及PGC-1 α 活性, 抑制慢性酒精性脂肪肝脂肪变性^[20]。Res也能通过抑制脂肪变性细胞SREBP1的表达及活性改善脂肪变性^[21]。我们的研究结果显示, Res可通过抑制T2DM大鼠肝脏中SREBP1激活减少肝脏的脂质沉积, 而有氧运动和白藜芦醇联合干预较单一干预进一步降低肝脏中TG、TC, 可能部分通过降低T2DM大鼠肝脏SREBP1活性(减少nSREBP1), 改善肝脏脂质沉积引起的氧化应激。其原因可能与联合干预能更好改善肝脏的内质网应激有关。本实验中, 经干预后, T2DM大鼠肝脏中作为调控TC的调节因子SREBP2活性未出现显著变化, 而TC呈现显著降低, 其具体原因有待进一步研究。

3.2 有氧运动和Res对肝脏炎症状态的影响

研究发现, 有氧运动可降低高脂饮食诱导的IR大鼠、NAFLD大鼠、T2DM大鼠^[22]肝脏中TNF- α 的表达, 改善肝脏炎症状态。我们的研究结果显示, 7周游泳训练后, T2DM大鼠肝脏中TNF- α 水平显著降低, 与前人研究结果相一致。在炎性相关性疾病的机制研究中, 研究学者目前已发现多条炎症信号转导通路, 包括SIRT1/PGC-1 α 通路、NF- κ B通路、AMPK通路、PI3K/PKB/eNOS通路等, 其中NF- κ B通路为细胞内极为重要的炎症信号转导通路。Arkan MC等^[5]研究发现, 大鼠选择性敲除肝脏NF- κ B能抑制脂质诱导的IR, 提示NF- κ B在其中起重要作用, 可能作为防治IR相关疾病的靶标。NF- κ B是由多肽链p50和p65 2亚基形成的二聚物。包括p50同源二聚物、p65同源

二聚物、p50和p65异源二聚物, 细胞内主要发挥作用的是其异源二聚体形式。未受应激情况下, NF- κ B以无活性的化合物形式存在于胞浆中, 一旦受到TNF- α 、白细胞介素-6(IL-6)等炎症因子刺激, NF- κ B便被激活转位至细胞核内, 促使机体分泌更多炎症因子, 加剧炎症反应^[23]。研究已发现DM肝脏中NF- κ B被激活^[24]。本实验中结果显示, T2DM肝脏NF- κ Bp65核蛋白显著增加, 此外我们的实验还发现, 经过7周运动后, 不仅T2DM大鼠肝脏中TNF- α 水平降低, 而且NF- κ Bp65核蛋白减少, 表明7周有氧运动可能通过抑制NF- κ Bp65活性, 降低TNF- α 改善肝脏炎症。

细胞水平研究表明, Res能抑制TNF- α 诱导的NF- κ B激活^[8]。动物实验研究表明, Res能显著降低高脂饮食肾脏^[25]和T2DM大鼠胰腺^[26]中NF- κ Bp65的表达及活性。然而对T2DM肝脏的研究尚未见到。我们的研究结果显示, Res能显著降低T2DM大鼠肝脏中的NF- κ Bp65的激活, 同时下游TNF- α 的水平也显著降低。表明, 在体条件下, Res可通过抑制NF- κ Bp65的活性, 降低TNF- α 的水平, 改善肝脏炎症反应。而7周有氧运动和Res联合干预后, T2DM大鼠肝脏中细胞核NF- κ Bp65水平较单一干预进一步降低, 同时TNF- α 出现同样的变化趋势, 表明联合干预较单一干预对T2DM大鼠肝脏炎症效果更为显著, 其机制可能是通过抑制NF- κ Bp65, 最终抑制TNF- α 的表达而实现。

事实上, ROS诱导的氧化应激是NF- κ B的激活子, 在经外源性H₂O₂处理的细胞研究、促使内源性H₂O₂升高的动物研究中均得到证实。Lee YC等^[27]研究也发现, 使用抗氧化剂L-2-氧硫杂唑啉-4-羧酸(半胱氨酸前体物质)能引起NF- κ B转位至细胞核总量及下游的调节因子如黏附分子、趋化因子和细胞因子表达显著降低, 提示抗氧化剂在控制NF- κ B转位和转录中均发挥重要作用。目前研究已发现, ROS能激活细胞内多条信号通路如NIK^[28]、MAPKs^[29]、PI3K/AKT^[30]、TGF- β 1激活NF- κ B, 经磷酸化修饰作用增加下游TNF- α 的表达。

TNF- α 是一种内源性炎症介导子, 参与免疫反应, 在炎症反应中发挥重要作用。TNF- α 主要通过与其细胞表面受体肿瘤坏死因子受体1(TNFR-1)结合发挥作用。经TNF- α 结合的受体复合物可进一步募集肿瘤坏死因子相关死亡结构域(TRADD)、TRAF-2和RIP-1, 激活MAPK、I κ B激酶(IKK)和NADPH氧化酶等信号激酶^[31]。其中IKK-NF- κ B为细胞内经典的炎症信号通路, 当细胞内TNF- α 表达升高, 可使I κ B α Ser³²和Ser³⁶发生磷酸化降解, 促使NF- κ Bp65被释放, 转位

至细胞核经修饰后与不同靶基因结合, 增加相应炎症基因的表达。近年来研究已发现, NF- κ B/RelA 存在的可被磷酸化位点包括 PKAc 和 MSK-1 磷酸化 Ser²⁷⁶, 蛋白激酶 c 磷酸化 Ser³¹¹, IKK β 磷酸化 Ser⁵³⁶。而 Mohammad Jamaluddin 等最新研究显示, 阻断 ROS 信号通路可抑制 TNF- α 介导的 NF- κ B/RelA Ser²⁷⁶ 磷酸化, 而向细胞核转位的 NF- κ B 的含量保持不变, 此外依赖于 ROS 且磷酸化 RelA Ser²⁷⁶ 的激酶 PKAc 的活性显著降低, 提示 ROS 信号通路并不影响 IKK-NF- κ B 转位过程, 但对于 PKAc 激酶磷酸化 NF- κ B/RelASer²⁷⁶ 过程中却起着必要的作用^[32]。

由此可见, 氧化应激通路和炎症通路彼此之间存在相互作用, 结合本研究结果可以得知, 有氧运动和 Res 能改善 T2DM 大鼠肝脏的氧化应激和炎症反应, 可能通过减少因 nSREBPs 引起的脂质沉积, 降低肝脏氧化应激, 抑制 NF- κ Bp65 活性和转录, 减少 TNF- α 水平最终改善肝脏炎症状态, 其中两者联合较单一干预效果更为显著。此外, NF- κ Bp65 通路上游存在非常重要的调节因子 SIRT1, SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖的组蛋白脱乙酰化酶, 在限热和 Res 条件下能显著被激活, 对机体发挥多种有利效应^[19]。细胞水平相关研究表明, Res 能通过降低 3T3-L1 脂肪细胞中 NF- κ B 的活性抑制 TNF- α 诱导的 MCP-1 启动子的活性^[33]。肝脏特异性的敲除 SIRT1 基因能导致高脂饮食大鼠脂肪酸代谢紊乱, 引起肝脏脂肪变性和炎症^[34], 由此推测, 作为细胞内一重要的能量平衡调节因子 SIRT1, 可能参与 7 周有氧运动和 Res 干预后 T2DM 大鼠肝脏氧化应激和炎症改善过程, 调节 NF- κ Bp65 介导的 TNF- α , 对此还有待我们进一步研究。

参考文献:

[1] Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, et al. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2011, 10: 12.

[2] Yki-Järvinen H. Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *Dig Dis*, 2010, 28(1): 203-209.

[3] Sohet F M, Neyrinck A M, Pachikian B D, et al. Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(11): 1391-1400.

[4] Sewter C, Berger D, Considine R V, et al. Human

obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor- α [J]. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1035-1041.

[5] Arkan M C, Hevener A L, Greten F R, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance[J]. *Nat Med*, 2005, 11(2): 191-198.

[6] Teixeira de Lemos E, Pinto R, Oliveira J, et al. Differential effects of acute (Extenuating) and chronic(Training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus[J]. *Mediators Inflamm*, 2011; 2011: 253061.

[7] Yun J M, Chien A, Jialal I, et al. Resveratrol up-regulates SIRT1 and inhibits cellular oxidative stress in the diabetic milieu:mechanistic insights[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 7(23): 699-705.

[8] Csiszar A, Smith K, Labinsky N, et al. Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(4): H1694-1699.

[9] Sun C, Zhang F, Ge X, et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B[J]. *Cell Metab*, 2007, 6(4): 307-319.

[10] 李树基. BK 通路在氧葡萄糖剥夺诱导海马神经元死亡中的作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2009.

[11] Pold R, Jensen L S, Jessen N, et al. Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats[J]. *Diabetes*, 2005, 54(4): 928-934.

[12] Mahmoud A M, Ashour M B, Abdel-Moneim A, et al. Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats[J]. *J Diabetes Complications*, 2012, 26(6): 483-90.

[13] Ryden M, Dicker A, van Harmelen V, et al. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(2): 1085-1091.

[14] Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity[J]. *Metabolism*, 2008, 57(8): 1071-7.

[15] Youssef W, McCullough A J. Diabetes mellitus, obesity, and hepatic steatosis[J]. *Semin Gastrointest Dis*,

- 2002, 13(1): 17-30.
- [16] 林文骏, 陈景岗. 有氧运动及芦荟对糖尿病大鼠肝脏抗氧化酶活性的影响[J]. 广州体育学院学报, 2005, 25(6): 49-51.
- [17] Yamabe N, Kim H Y, Kang K S, et al. Effect of Chinese prescription Kangen-karyu on lipid metabolism in type 2 diabetic db/db mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129(3): 299-305.
- [18] 徐国琴. 不同强度运动对糖尿病大鼠内质网应激的影响及其作用机制研究[D]. 北京: 北京体育大学, 2008.
- [19] Hu Y, Liu J, Wang J, et al. The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2011, 51(2): 250-256.
- [20] Ajmo J M, Liang X, Rogers C Q, et al. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(4): G833-842.
- [21] Wang G L, Fu Y C, Xu W C, et al. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(3): 644-649.
- [22] 林文骏, 李品芳, 翁锡全. 不同强度有氧运动对糖尿病大鼠肝脏炎症状态的影响[J]. 体育学刊, 2011, 18(3): 136-139.
- [23] Shoelson S E, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity-and diet-induced insulin resistance[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27(3): S49-52.
- [24] Bi Y, Sun W P, Chen X, et al. Effect of early insulin therapy on nuclear factor kappaB and cytokine gene expressions in the liver and skeletal muscle of high-fat diet, streptozotocin-treated diabetic rats[J]. *Acta Diabetol*, 2008, 45(3): 167-178.
- [25] 丁洪成, 夏文芳, 陈璐. 白藜芦醇对高脂喂养大鼠肾脏的保护作用[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(16): 2429-2432.
- [26] 赵赛. 白藜芦醇对2型糖尿病大鼠胰岛细胞保护作用及其机制的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.
- [27] Lee Y C, Lee K S, Park S J, et al. Blockade of airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma by a prodrug of cysteine, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid[J]. *FASEB J*, 2004, 18(15): 1917-9.
- [28] Lee I T, Yang C M. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(5): 581-590.
- [29] Liu C M, Sun Y Z, Sun J M, et al. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(10): 1693-1703.
- [30] Li Q, Engelhardt J F. Interleukin-1 beta induction of NF kappa B is partially regulated by H₂O₂-mediated activation of NF kappa b-inducing kinase[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(3): 1495-1505.
- [31] Hsu H, Shu H B, Pan M G, et al. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways[J]. *Cell*, 1996, 84(2): 299-308.
- [32] Jamaluddin M, Wang S, Boldogh I, et al. TNF- α -induced NF- κ B/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway[J]. *Cellular Signalling*, 2007, 19(7): 1419-1433.
- [33] Csiszar A, Smith K, Labinsky N, et al. Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(4): H1694-1699.
- [34] Purushotham A, Schug T T, Xu Q, et al. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation[J]. *Cell Metab*, 2009, 9(4): 327-338.