



跑台运动对 *db/db* 小鼠心肌 PPAR α 信号通路的影响研究

Effect of Treadmill Running on PPAR α Pathway in the Cardiac Muscle of *db/db* Mice

孙易^{1,2}, 张怡^{1,2}, 丁树哲^{1,2*}

SUN Yi^{1,2}, ZHANG Yi^{1,2}, DING Shuzhe^{1,2*}

摘要:目的:探索12周跑台运动对 *db/db* 小鼠心肌代谢和胰岛素抵抗的作用,并分析 PPAR α 和 MG53 在其中的作用。方法:*db/db* 小鼠和 *m/m* 小鼠随机分配到 DC(*db/db* 对照)、DE(*db/db* 运动)、MC(*m/m* 对照)或 ME(*m/m* 运动)组,每组10只。MC和ME组小鼠维持安静的生活方式;ME和DE组小鼠进行为期12周的跑台运动。第1、2周,小鼠的运动速度、时间、频率分别为7.0~13.3 m/min、15~20 min、4次/周;13.3 m/min、30~45 min、6次/周。第3~12周,上述参数维持在13.3 m/min、1 h、6次/周。结果:1)4个实验组间心脏质量无显著差异。DC组ANF、BNF和 α -MHC的mRNA表达显著低于MC组, β -MHC表达高于MC组;DE组ANF和 α -MHC的mRNA表达显著高于DC组;2)DC组小鼠血清总胆固醇和甘油三酯含量显著高于MC组,DE组血清总胆固醇和甘油三酯含量显著低于DC组;3)DC组Cpt1b, Acadm, Acadvl, Acaa2和Pdk1的mRNA表达显著高于MC组,且在12周跑台运动后降低;4)DC组PPAR α 的蛋白表达及CD36、PGC-1 β 和Fabp3的mRNA表达显著高于MC组;DE组PPAR α 的蛋白表达及CD36的mRNA表达显著低于DC组;5)与MC组相比,DC组MG53的mRNA表达显著增加;与DC组相比,DE组MG53的mRNA表达显著降低。4个实验组间MG53的蛋白表达未见显著不同;6)DC组p- β -IR (Tyr1146)及p-AKT (Ser473)的蛋白表达显著低于MC组,p-IRS1 (Ser1101)蛋白表达高于MC组;DE组p- β -IR (Tyr1146)及p-AKT (Ser473)的蛋白表达显著高于DC组,p-IRS1 (Ser1101)的蛋白表达低于DC组。结论:12周跑台训练显著改善 *db/db* 小鼠胰岛素抵抗状态和心肌代谢紊乱,且 PPAR α 信号通路参与上述过程。

关键词:跑台运动;胰岛素抵抗;过氧化物酶体增殖物激活受体 α ;脂质代谢

Abstract: Objective: This study is to investigate the effect of 12-week treadmill running on myocardial metabolism and insulin resistance of *db/db* mice, as well as to explore the role of PPAR α and MG53. Methods: *db/db* mice and *m/m* mice were randomly assigned to DC group (*db/db* control), DE group (*db/db* exercise), MC group (*m/m* control) or ME group (*m/m* exercise), with 10 mice in each group. The mice of MC group and DC group remained sedentary lifestyle, while the mice of ME group and DE group were trained to run on the treadmill for 12 weeks. For the first and second week, the running velocity, duration and frequency of the mice were 7.0 to 13.3 m/min, 15 to 20 min, 4 times once a week and 13.3 m/min, 30 to 45 min and 6 times once a week. From the third week to the twelfth week, the above parameters were maintained at 13.3 m/min, 1 h and 6 times once a week. Results: 1) The heart weights were not significantly different among the four groups. The mRNA expressions of ANF, BNF and α -MHC were significantly lower in DC group than that in MC group. The expression of β -MHC was significantly higher in DC group than that in MC group. The mRNA expressions of ANF and α -MHC were significantly higher in DE group than that in DC group. 2) The serum levels of total cholesterol and triglycerides were significantly higher in DC group than that in MC group, and the serum levels of total cholesterol and triglycerides were lower in DE group than that in DC group. 3) The mRNA expressions of Cpt1b, Acadm, Acadvl, Acaa2 and Pdk1 were significantly higher in DC group than MC group, and those index were decreased after 12-week

基金项目:

国家自然科学基金项目(31600967);中央高校基本科研业务费专项资金;青少年健康评价与运动干预教育部重点实验室建设项目(11000-30190-513300/006)

第一作者简介:

孙易(1985-),女,副教授,博士,硕士研究生导师,主要研究方向为运动对肥胖和2型糖尿病的干预机制,E-mail: ysun@tyxx.ecnu.edu.cn.

*通信作者简介:

丁树哲(1963-),男,教授,博士,博士研究生导师,主要研究方向为线粒体运动适应与信号调控,E-mail: szding@tyxx.ecnu.edu.cn.

作者单位:

1. 华东师范大学“青少年健康评价与运动干预”教育部重点实验室,上海200241;
2. 华东师范大学体育与健康学院,上海200241

1. Key Laboratory of Adolescent Health Assessment and Exercise Intervention of Ministry of Education, East China Normal University, Shanghai 200241, China;
2. College of Physical Education and Health, East China Normal University, Shanghai 200241, China.

treadmill running. 4) The protein expression of PPAR α and the mRNA expressions of CD36, PGC-1 β and Fabp3 were significantly higher in DC group than that in MC group. The protein expression of PPAR α and the mRNA expression of CD36 were significantly lower in DE group than that in DC group. 5) Compared to MC group, the mRNA expression of MG53 was significantly increased in DC group. Compared to DC group, the mRNA expression of MG53 was significantly decreased in DE group. The protein expression of MG53 were not significantly different among the four groups. 6) The protein expression of p- β -IR (Tyr1146) and p-AKT (Ser473) were significantly lower in DC group than that in MC group. The protein expression of p-IRS1 (Ser1101) was significantly higher in DC group than that in MC group. The protein expression of p- β -IR (Tyr1146) and p-AKT (Ser473) were significantly higher in DE group than that in DC group. The protein expression of p-IRS1 (Ser1101) was significantly lower in DE group than that in DC group. Conclusions: The state of insulin resistance and alteration of myocardial substrate utilization in the cardiac muscle of *db/db* mice could be improved by 12-week treadmill training and PPAR α pathway was actively involved in the above process.

Keywords: treadmill exercise; insulin resistance; PPAR α ; fat metabolism

中图分类号: G804.2 **文献标识码:** A

糖尿病是目前世界上最常见的慢性疾病之一。糖尿病心血管并发症是导致糖尿病患者死亡的主要原因,且其发病机理在于代谢失调和胰岛素抵抗的共同作用(杨宗璐等,2021;Young et al.,2002)。心肌细胞具有很高的能量需求,其中大部分是通过脂肪酸氧化获得的,其余30%来自于葡萄糖和乳酸代谢(Neely et al.,1972)。然而,对于糖尿病患者来说,葡萄糖摄取、糖酵解和丙酮酸氧化等过程受到抑制,脂肪代谢活动上调,从而产生心肌脂变、过量ROS生成和心肌细胞死亡等问题。已有研究认为,作为决定脂肪酸氧化能力的重要代谢因子(Bugger et al.,2014),过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α ,PPAR α)可能通过激活脂肪酸摄取和 β 氧化相关基因调控糖尿病心肌代谢(Finck et al.,2002;Lee et al.,2017)。有证据表明,PPAR α ^{-/-}小鼠不易发生糖尿病诱导的心脏肥大,而心脏特异性PPAR α 过表达的糖尿病小鼠则表现出心肌细胞脂质堆积(Finck et al.,2003;蔡欢等,2016)。此外,miR-30c及GLP-1(gluca-gon-like peptide-1,胰高血糖素样肽-1)也被认为通过PPAR α 信号通路参与改善糖尿病心肌病(Wu et al.,2018;Yin et al.,2019)。运动训练一直被认为是干预糖尿病温和、有效的手段,能通过阻碍ROS堆积、改善线粒体功能、抑制心肌凋亡通路、改善心肌纤维化等途径改善糖尿病心脏病变和心功能,并促进心肌代谢由脂肪酸氧化向葡萄糖供能转化(Delfan et al.,2020;Seo et al.,2019;Wang et al.,2020)。然而,目前鲜见探索PPAR α 在运动缓解糖尿病心肌代谢失调中作用的研究,且糖尿病和运动干预对PPAR α 表达的影响也尚存争议,考虑这可能与采用的动物模型和运动训练强度不同有关(陈国庆等,2014;张崇林等,2018;Lee et al.,2010)。

除代谢失调外,胰岛素抵抗是导致糖尿病心肌病变发生的另一重要原因,其中,MG53表达上调可能是导致糖尿病心肌胰岛素抵抗的因素之一(齐洁等,2016;Liu

et al.,2015)。MG53是一种TRIM家族蛋白,在骨骼肌和心肌中特异性表达。基于转基因动物模型(MG53^{Tr}及MG53^{-/-})的研究显示,作为一种E3泛素连接酶,MG53可能通过诱导胰岛素受体(insulin receptor,IR)和胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1,IRS1)降解促进胰岛素抵抗(Song et al.,2013)。除介导胰岛素抵抗外,MG53还被认为抑制糖代谢相关基因表达,上调脂代谢相关基因,且上述过程是通过上调PPAR α 及其靶基因实现的(Hu et al.,2018;Liu et al.,2015)。然而,在自然生理病理条件下,MG53是否参与各组织胰岛素抵抗尚未定论。有研究显示,肥胖及2型糖尿病患者及模式鼠中可见血清MG53水平升高,且采用单克隆抗体中和血MG53能提高*db/db*小鼠胰岛素敏感性(Wu et al.,2019)。

*db/db*小鼠是一种应用广泛的自发性2型糖尿病模型。*db/db*小鼠的心脏在10~14周龄时即出现心肌代谢改变、收缩功能减弱等特性,因此适宜用于糖尿病心血管病变相关研究。基于此,本研究探索12周跑台训练对*db/db*小鼠心肌代谢和胰岛素抵抗的作用,并分析PPAR α 和MG53在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20只SPF级6周龄雄性*db/db*(BSK.Cg-Dock7m+/+Leprdb/JNju)小鼠和20只*m/m*(C57BLKS/JNju)小鼠,购于南京大学模式动物研究所。*db/db*小鼠和*m/m*小鼠系通过杂合子*db/m*小鼠交配繁殖获得。在后代的3种表型中,黑色肥胖者为*db/db*小鼠,具有2型糖尿病的典型特征,灰色瘦小者为*m/m*小鼠,常用作对照鼠,小鼠均经过基因型鉴定。小鼠分笼饲养,环境温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,空气湿度(50 \pm 10)%,12h/12h昼夜节律,自由摄食饮水。适应性喂养1周后,小鼠随机分为4组:*db/db*对照组(DC, $n=10$),*db/db*运动组(DE, $n=10$),*m/m*对照组(MC, $n=10$)和*m/m*

运动组(ME, $n=10$)。测量并记录各组小鼠体质量和空腹血糖值。

1.2 跑台运动干预方案

跑台运动干预方案以已有研究为基础(Broderick et al., 2017; Sennott et al., 2008):第1周,小鼠以 7.0~13.3 m/min 的速度运动 15~20 min,一周4次。第2周,小鼠以 13.3 m/min 的速度运动 30~45 min,一周6次,周日休息。第3~12周,上述运动速度和频率维持不变,每日连续运动 1 h,周日休息。小鼠运动训练时间为 20:00—21:00。在第12周,再次测量各组小鼠体质量和空腹血糖值。

1.3 腹腔胰岛素耐量(IPITT)实验

末次运动结束 12 h 后,每组随机选取 5 只小鼠进行 IPITT 实验。小鼠禁食 4 h,从尾部静脉取血测空腹血糖值(ACCU-CHEK 血糖测试仪)。腹腔内注射胰岛素(2 U/kg)后 30、60、90、120 min 分别取血并测量血糖值。

1.4 组织获取

IPITT 实验结束当天,小鼠过夜禁食。每组随机抽取

3 只小鼠进行胰岛素刺激。采用异戊烷(4%~5%)吸入对小鼠进行麻醉,随后腹腔注射 5 U/kg 胰岛素,10 min 后取心脏。其余小鼠经眼眶取血后采用颈部脱臼法处死,取心脏,冲洗、称重,迅速装入已标记的冻存管中,立即置于液氮中速冻,后转存至 -80 °C 冰箱保存待测。

1.5 血清生化检测

采用 IPITT 实验中所取血液,4 °C 下 1 100 g 离心 15 min 获得血清。采用试剂盒检测血清甘油三酯(A110-1,南京建成)和总胆固醇(A111-1,南京建成)含量。

1.6 RNA 提取和 Real-Time PCR

根据 TRIzol (Invitrogen) 方法从 30 mg 冻存心肌组织提取总 RNA。采用分光光度法测量 RNA 的浓度和纯度。引物(表 1)根据 NCBI 和 PrimerBank 设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。利用 TOYOBO FSQ-101 试剂盒从总 RNA 反转录合成 cDNA。采用 ABI StepOne 实时荧光定量 PCR 仪检测相关基因的 mRNA 表达量, β -actin 为内参。数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。

表1 Real-Time PCR 中靶基因的引物序列

Table 1 Primer Sequences of Targeting Gene in Real-Time PCR

基因	下游引物序列	下游引物序列
MG53	TAATGGGACTCCTCTCCAGG	AGCACCGTACAGTCTTCTC
PPAR- α	TTCACGATGCTGTCCTCCTT	GCCGATCTCCACAGCAAATT
Cpt1b	CTTCTTGCTGGTGTGGTCC	GGCTCCCCACAAACAAGATG
Acadm	GCAGAAATGGCGATGAAGGT	CCCTCATCAGCTTCTCCACA
Acadv1	TTCCAGATAGAAGCCGCCAT	TGTCCATACAGCCTTGCGA
Acaa2	AGAAGGCCCTGGATCTTGAC	CTCCAATGCAAGCTGATCCC
Pdk1	GCTAGGCGGCTTTGTGATTT	GTGACGTGAACCTGAATCGG
Pdk2	ACACATTGGCAGCATCGATC	GGTGGGAAGGGACATAGACC
CD36	GCCTCCTTCCACCTTTTGT	ATTCTGGAGGGGTGATGCAA
PGC-1 β	ATGCTGGCCTTGTCACAAAG	CTTGGTGTCTGGCTTGAAGG
Fabp3	TCATCGAGAAGAACGGGGAT	TCCCATCAACTAGCTCCCTA
β -actin	CCCCTGAACCTAAGGCCA	CGGACTCATCGTACTCCTGC
ANF	GGAGGAGAAGATGCCGGTAG	GAGGGCAGATCTATCGGAGG
BNF	GAGGTCACTCCTATCCTCTGG	GCCATTTCCTCCGACTTTTCTC
α -MCH	TATGGGCTGGCTGAAAAGA	AGCCTTCTTCTTGCCCTCT
β -MCH	TACTCTGACCAAGGCCAAGG	GCTGCTTGTCATTCTCCAGG
Actc1	GTGCCAGGATGTGTGACGA	CTGTCCCATACCCACCATGAC
Myl2	ATCGACAAGAATGACCTAAGGGA	ATTTTTCACGTTCACTCGTCTC
Itga5	CTTCTCCGTGGAGTTTTACCG	GCTGTCAAATTGAATGGTGGTG
Caspase-3	ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT	TTGCTCCCATGTATGGTCTTTAC

1.7 蛋白定量

取 30 mg 心肌组织,冰上剪碎,于裂解液中匀浆。4 °C 下 12 000 g 离心 20 min,取上清液,BCA 法测量蛋白浓度后变性。采用 10% 分离胶电泳,蛋白转至 PVDF 膜。4 °C 下一抗(表 2)孵育过夜,洗膜后室温下二抗避光孵育 2 h。显影后采用 Alpha FC2 凝胶成像系统扫膜并进行灰度值分析, β -actin 为内参。

1.8 数据统计分析

实验结果以平均值 \pm 标准误表示,统计软件为 IBM SPSS Statistics 23,绘图软件为 Graphpad prism 7。组间差异采用双因素方差分析检验;糖尿病模型和跑台运动两个干预因素间存在交互作用时,采用简单效应分析(least significant difference, LSD)检测一个自变量在另一个自变量各水平上的差异。小鼠体质量和空腹血糖在干预前后

的差异采用重复测量双因素方差分析进行检验。采用线性回归对PPAR α 蛋白表达与Cpt1b、Acadm、Acadv1、Acaa2和Pdk1的mRNA表达间的相关性进行检验,并计算相关系数(R)和 P 。 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 研究结果

2.1 糖尿病和跑台运动对心脏质量、血清指标和IPITT的影响

4个实验组间小鼠心脏质量无显著差异(图1)。MC、ME、DC和DE组小鼠血清胆固醇变异系数(coefficient of variation, CV)值分别为8%、13%、25%和22%;MC、ME、DC和DE组小鼠血清甘油三酯CV值分别为13%、22%、13%和18%。尽管个别CV值较高,但总体符合小鼠血清指标的离散特征。经双因素方差分析检验发现,与MC组相比,DC组小鼠血清总胆固醇和甘油三酯含量显著升高;与DC组相比,DE组小鼠血清总胆固醇和甘油三酯含量显著降低。IPITT测试中,DC组的曲线下面积(AUC)

比MC组显著增加,DE组比DC组显著降低。上述结果表明,糖尿病导致小鼠血脂含量增加,胰岛素耐量降低,且12周跑台运动干预对上述变化有明显改善作用。

表2 抗体信息

抗体名称	抗体号码(来源)
MG53	22151-1-AP (Proteintech)
β -IR	3025 (Cell signaling)
p- β -IR (Tyr1146)	3021 (Cell signaling)
IRS1	2382 (Cell signaling)
p-IRS1 (Ser1101)	2385 (Cell signaling)
AKT	4691 (Cell signaling)
p-AKT (Ser473)	4060 (Cell signaling)
PPAR α	WL00978 (Wanleibio)
GLUT4	2213 (Cell signaling)
β -actin	T0022 (Affinity)
Rabbit IgG	ARG65668 (Arigo)
Mouse IgG	ARG65350 (Arigo)

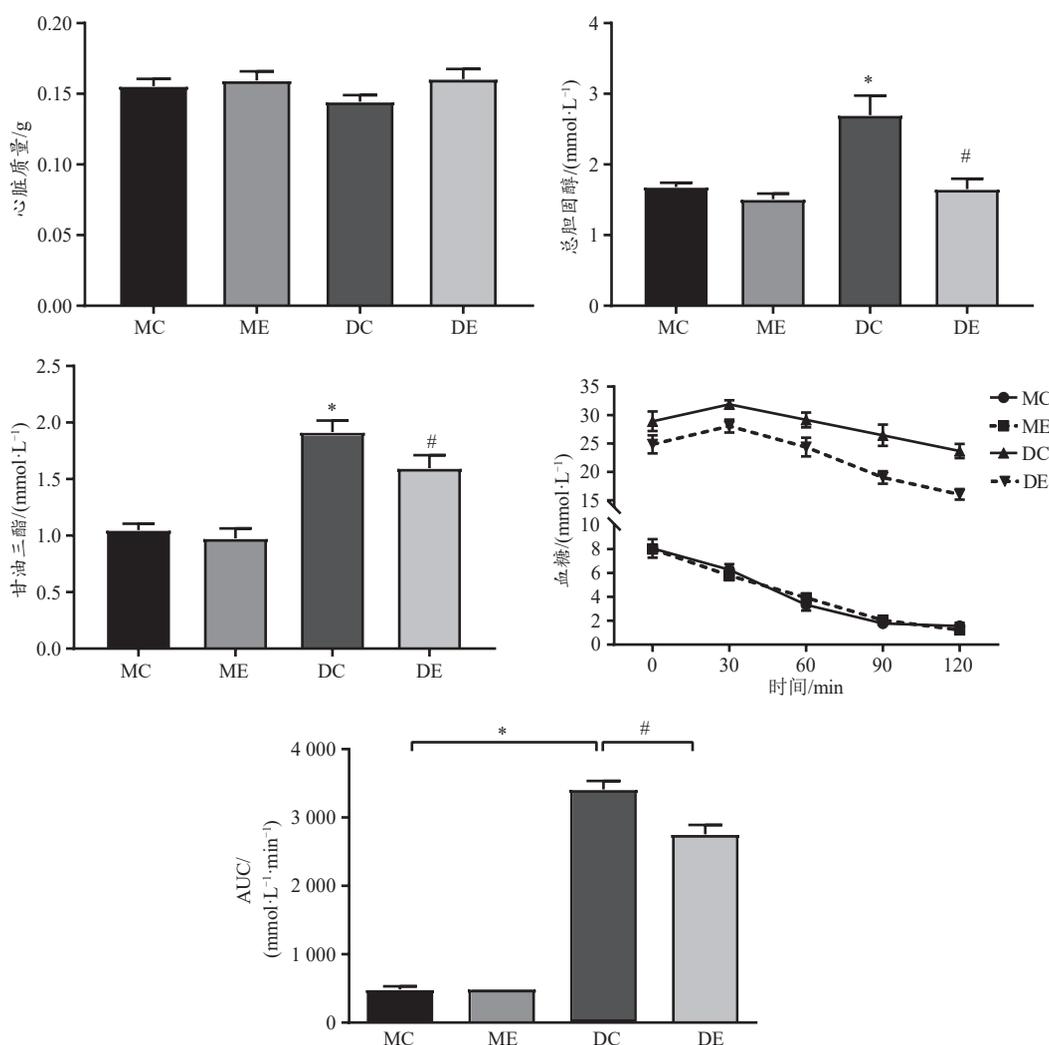


图1 小鼠基本特征示意图

Figure 1. Basic Characteristics of the Mice

注:与MC相比,*表示 $P < 0.05$;与DC组相比,#表示 $P < 0.05$;下同。

2.2 各组小鼠体质量与空腹血糖的变化

本研究分别在运动干预前(适应性喂养期)和运动干预的最后一周测量各组小鼠的体质量和空腹血糖值。结果显示(图2),运动干预前,与MC组相比,DC组的体质量和空腹血糖均显著升高。运动干预后,与MC组相比,DC组的体质量和空腹血糖均显著升高;与DC组相比,DE组的空腹血糖显著降低。与运动干预前相比,运动干预后各组小鼠体质量均显著增长,DC组和DE组空腹血糖显著升高。

2.3 糖尿病和跑台运动对心功能相关基因 mRNA 表达的影响

本研究检测了 ANF、BNF、 α -MHC、 β -MHC、Actc1、Myl2、Itga5 和 Caspase-3 共 8 种心功能相关指标的基因表达。结果显示,与 MC 组相比,DC 组 ANF 和 BNF 的 mRNA 表达显著降低,且跑台运动显著改善 *db/db* 小鼠的 ANF 表达(图3)。与 MC 组相比,DC 组 α -MHC 和 β -MHC 的 mRNA 表达呈相反的变化,其中, α -MHC 表达降低, β -MHC 表达升高;跑台运动显著增加 *db/db* 小鼠的 α -MHC 表达。与 MC 组相比,DC 组小鼠心肌 Actc1 的 mRNA 表达呈下降的趋势($P=0.051$),且跑台运动对正常鼠和糖尿病鼠的

Actc1 表达分别有降低和升高的作用。4 个实验组间未见 Myl2、Itga5 和 Caspase-3 的 mRNA 表达有显著差异。

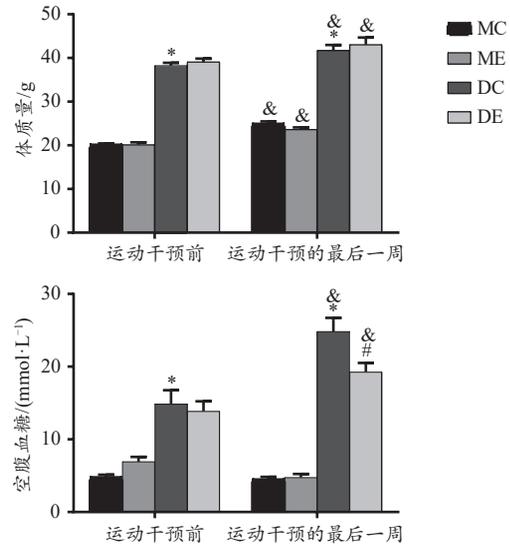


图2 运动干预前后,小鼠体质量与空腹血糖变化示意图

Figure 2. Changes of Body Weights and Fasting Blood Glucose of Mice Pre and Post Exercise Intervention

注:与运动干预前相比,&表示 $P<0.05$ 。

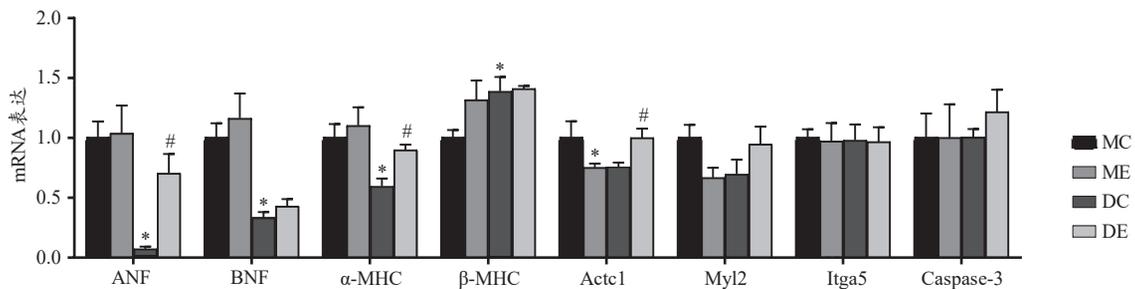


图3 糖尿病和跑台运动对心功能相关基因 mRNA 的影响

Figure 3. Effects of Diabetes and Treadmill Running on mRNA Expression of Genes Related to Cardiac Function

2.4 糖尿病和跑台运动对脂肪和糖代谢以及 PPAR α 信号通路的影响

本研究检测了 PPAR α 的蛋白表达,以及脂肪代谢相关酶(Cpt1b、Acadm、Acadv1 和 Acaa2),糖代谢相关酶(Pdk1、Pdk2)和 PPAR α 信号通路关键分子的 mRNA 表达水平。结果显示,与 MC 组相比,DC 组心肌 Cpt1b、Acadm、Acadv1 和 Acaa2 的 mRNA 表达均显著升高;与 DC 组相比,DE 组心肌中上述指标的表达显著降低(图4)。与 MC 组相比,DC 组 Pdk1 的 mRNA 表达显著升高;与 DC 组相比,DE 组 Pdk1 的 mRNA 表达显著降低。PPAR α 是脂肪代谢的关键调节因子。与 MC 组相比,DC 组 PPAR α 的蛋白水平显著升高;与 DC 组相比,DE 组 PPAR α 的蛋白水平显著降低。与 MC 组相比,DC 组 CD36、PGC-1 β 和 Fabp3 的 mRNA 水平显著升高;与 DC 组相比,DE 组 CD36 的 mRNA 表达显著降低。

2.5 PPAR α 与 Cpt1b、Acaa2 和 Acadv1 之间的相关性分析

本研究对 PPAR α 的蛋白表达与 Cpt1b、Acadm、Acadv1、Acaa2 和 Pdk1 的 mRNA 表达间进行了相关性分析。结果显示,PPAR α 与 Acadm($P=0.55$)和 Pdk1($P=0.20$)间不存在线性相关;PPAR α 与 Acaa2($P=0.049$, $R=0.43$)和 Acadv1($P=0.034$, $R=0.50$)间呈正相关;PPAR α 与 Cpt1b 间存在相关的趋势($P=0.072$, $R=0.40$);图5)。

2.6 糖尿病和跑台运动对 MG53 的 mRNA 和蛋白表达水平影响

本研究检测了 MG53 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示,与 MC 组相比,DC 组 MG53 的 mRNA 表达水平显著升高;与 DC 组相比,DE 组 MG53 的 mRNA 表达显著降低(图6)。然而,4 个实验组间 MG53 的蛋白表达未见显著差异。

2.7 糖尿病和跑台运动对心肌胰岛素抵抗的影响

本研究检测了胰岛素信号通路中 β -IR、IRS1 和 AKT 的总蛋白,以及急性胰岛素刺激下磷酸化蛋白表达水平。结果显示,4 个实验组间 β -IR、IRS1 和 AKT 的总蛋白表达

无显著差异(图7)。与MC组相比,DC组胰岛素刺激下β-IR和AKT的磷酸化水平显著降低,IRS1的磷酸化水平显著升高;与DC组相比,DE组胰岛素刺激下β-IR和AKT

的磷酸化水平显著升高,IRS1的磷酸化水平显著降低。MC组与DC组间GLUT4蛋白表达未见显著差异;与DC组相比,DE组的GLUT4蛋白水平显著增加。

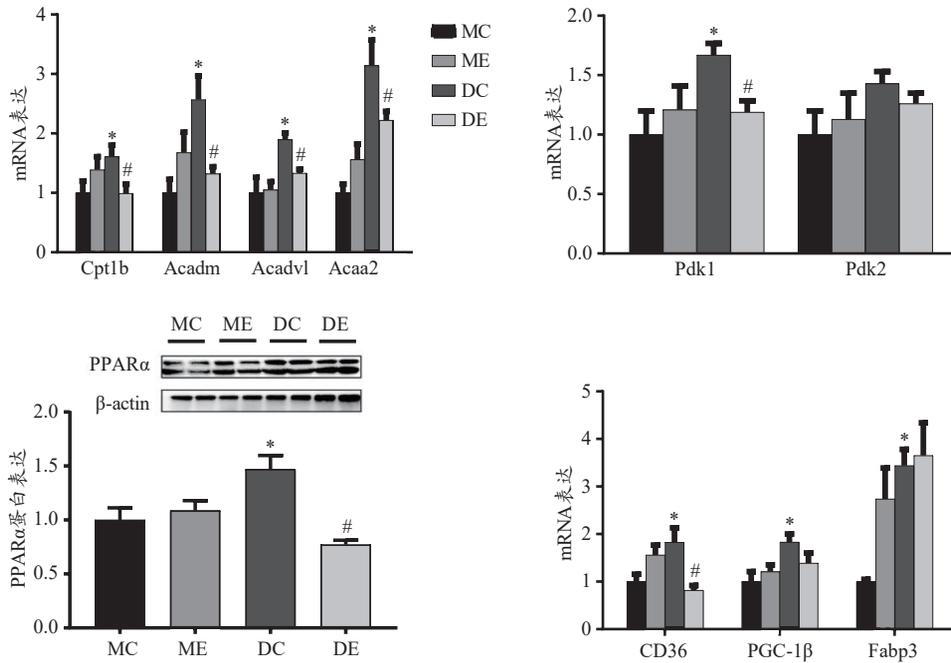


图4 糖尿病和跑台运动对脂肪和糖代谢以及PPARα信号通路影响示意图

Figure 4. Effects of Diabetes and Treadmill Running on Metabolism of Fat and Glucose and PPARα Signaling Pathway

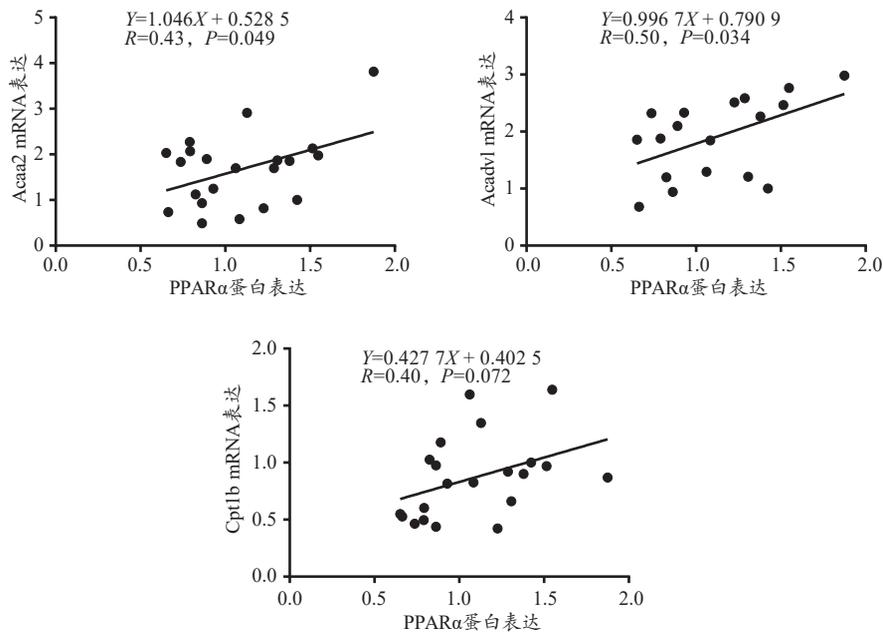


图5 PPARα与Acaa2、Acadvl和Cpt1b间的相关性分析

Figure 5. Correlation Analysis among PPARα and Acaa2 and Acadvl and Cpt1b

3 讨论

心肌底物代谢异常和胰岛素抵抗是糖尿病小鼠心脏的显著病理特征,然而致其发生的分子机制并不完全明确,PPARα和MG53在上述过程中的作用也有待进一步探

索。本研究中,通过对db/db和m/m小鼠实施12周跑台运动干预,PPARα参与糖尿病小鼠心肌脂肪代谢异常和跑台运动对脂代谢的改善作用。而与预期不同,在当前实验背景下,MG53没有参与糖尿病心肌胰岛素抵抗。

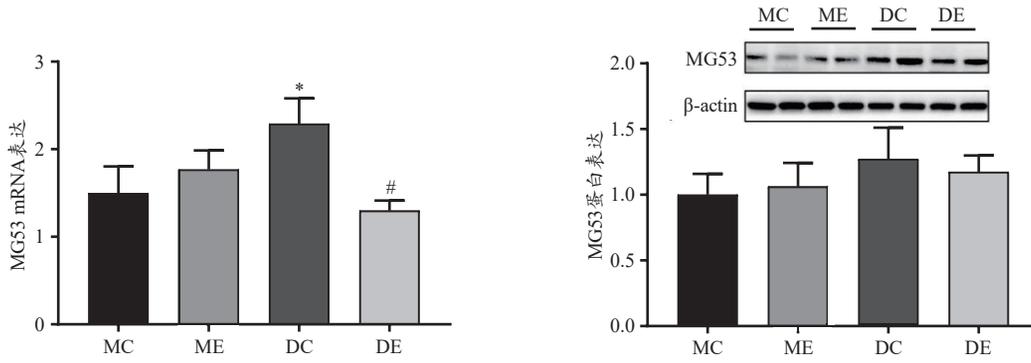


图6 糖尿病和跑台运动对MG53表达影响示意图

Figure 6. Effects of Diabetes and Treadmill Running on the Expression of MG53

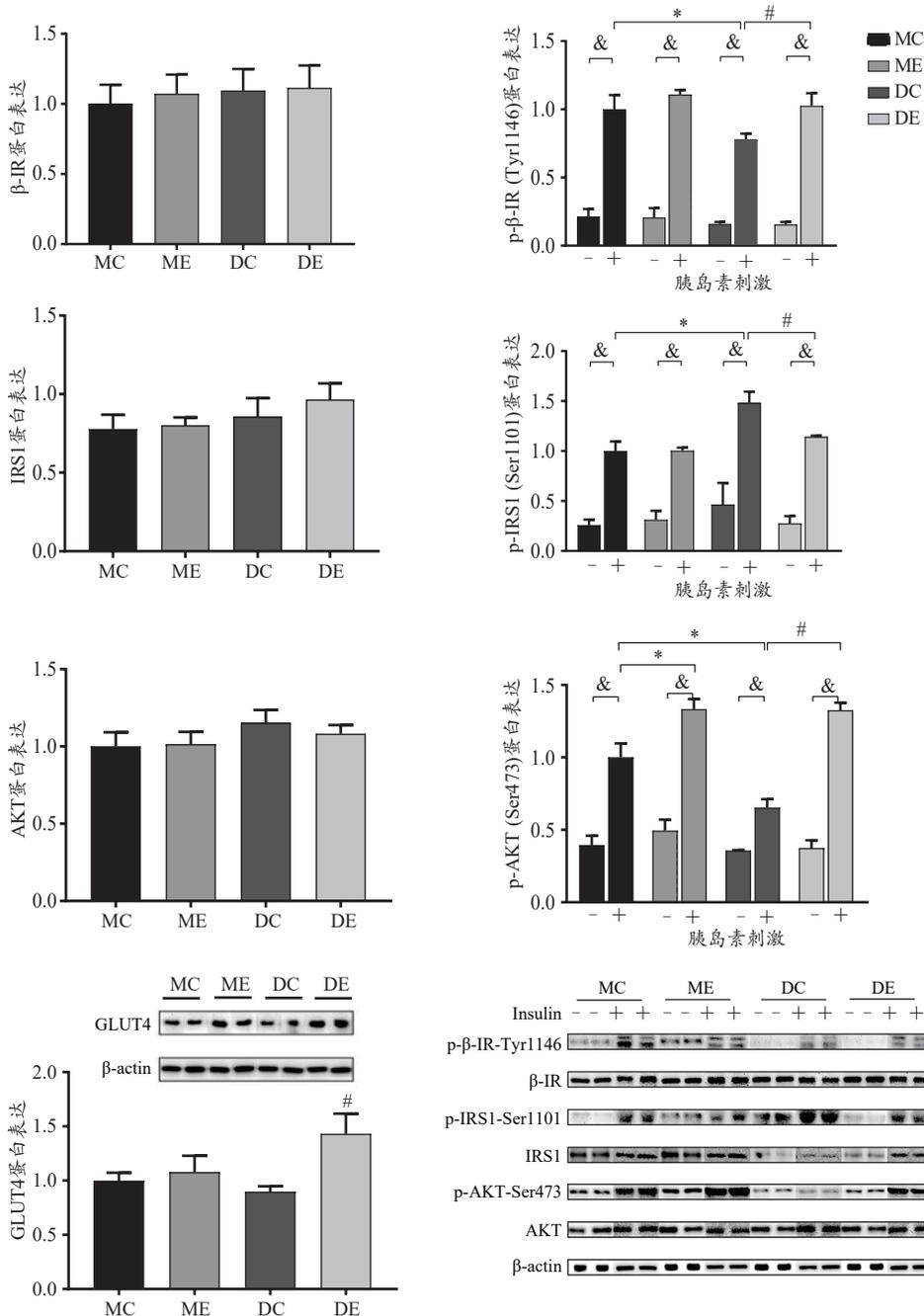


图7 糖尿病和跑台运动对心肌胰岛素抵抗影响示意图

Figure 7. Effects of Diabetes and Treadmill Running on Cardiac Insulin Resistance

注:与无胰岛素刺激相比,&表示 $P < 0.05$ 。

一般认为,心脏肥大、糖尿病心肌病以及心力衰竭等疾病或病理状态往往伴随着心脏收缩、舒张功能的变化,同时,若干相关基因也表现出转录异常(如 α -MHC和 β -MHC)。 α -MHC基因表达下调和 β -MHC基因表达上调与心肌收缩功能受到抑制有关(齐洁等,2021;Chang et al., 2011; Lasheras et al., 2016; Plante et al., 2015)。本实验中,可见 db/db 小鼠心肌 α -MHC和 β -MHC的mRNA表达分别降低和升高,此外,跑台运动显著缓解了糖尿病所致的 α -MHC转录下调。上述结果表明, db/db 小鼠心肌收缩功能可能受损,且跑台运动对其有缓解作用。此外,本研究还检测了ANF和BNF的mRNA表达情况。ANF和BNF是心肌细胞产生的激素,对体外培养的心肌细胞具有抗肥大作用(Gutkowska et al., 2009; Woods, 2004)。本研究中, db/db 小鼠心肌ANF和BNF的mRNA表达显著降低,且跑台运动改善糖尿病小鼠ANF的mRNA表达。然而,本研究并未对上述指标的蛋白表达进行检测,且对小鼠心脏质量进行测量发现,4个实验组间未见显著差异,因此尚不能判断 db/db 小鼠是否存在心肌肥大。最后,本研究还检测了Actc1的表达水平。Actc1是编码 α -心肌肌动蛋白的基因,与心脏收缩活动有关。研究显示, db/db 小鼠心肌Actc1的mRNA表达有下降的趋势($P=0.051$),且跑台运动显著上调 db/db 小鼠的Actc1表达,这表明跑台运动可能使 db/db 小鼠心肌收缩加强,该结果也与已有证据相吻合(Cox et al., 2013)。然而,跑台运动下调了对照鼠心肌Actc1的表达,目前对此尚无合理解释。心功能相关基因表达的检测结果表明,本研究中 db/db 小鼠的心功能与2型糖尿病的病程发展相吻合,且跑台训练对其有改善作用。然而,本研究的不足之处在于,没有采用超声心动图对小鼠的心功能进行直接测定,因此,上述基因表达结果只能作为间接证据,支持跑台训练对糖尿病小鼠心功能的正面影响。

有研究表明,糖尿病小鼠存在系统性糖、脂代谢异常,且运动干预能改善甚至逆转上述变化(刘军等,2020)。本研究中, db/db 小鼠血清总胆固醇和甘油三酯含量显著增加,且跑台运动显著降低上述指标。其次, db/db 小鼠IPITT结果的AUC与对照鼠相比显著升高,且在12周跑台训练后显著降低。此外, db/db 小鼠的空腹血糖水平也在运动干预后显著降低。上述结果证实了 db/db 小鼠存在系统性糖、脂代谢异常,且有氧运动干预可显著缓解 db/db 鼠机体糖、脂代谢紊乱,并改善其胰岛素抵抗状态。

除了系统代谢异常外,糖尿病患者心肌的糖、脂代谢也发生紊乱,表现为几乎完全倚赖脂肪酸氧化以供能(田阁等,2018)。本研究检测了小鼠心肌中脂肪氧化相关酶的mRNA表达,发现 db/db 小鼠心肌Cpt1b、Acadm、Acadvl和Acaa2的mRNA表达上调,且12周跑台运动显著抑制Cpt1b、Acadm、Acadvl和Acaa2的表达。上述结果表明,

长期有氧训练能有效逆转糖尿病胰岛素抵抗所致的脂肪酸代谢紊乱。在脂肪氧化供能增加的同时,糖尿病心肌中葡萄糖代谢也受到抑制。事实上,基于人类被试的研究显示,细胞内脂质浓度与胰岛素敏感性呈负相关(Krs-sak et al., 1999)。脂肪酸氧化增加会激活PDK,随后磷酸化并抑制PDH(曾芳桂,2017;Lee et al., 2017)。本研究中,可见 db/db 小鼠心肌Pdk1的mRNA表达显著增加,这可能由脂肪酸氧化增多所致;跑台运动可显著下调Pdk1的mRNA表达,表明运动训练对心肌糖代谢紊乱的保护作用。此外,本研究还探索了心肌GLUT4的变化,这是对心肌葡萄糖摄取能力的直观反映。一般认为,运动对心肌代谢的保护作用部分是通过GLUT4的上调实现的(许瀚等,2020;Lehnen et al., 2010; Schaun et al., 2017)。本研究中,12周跑台训练诱导 db/db 小鼠心肌GLUT4的蛋白水平上调。然而,对照组小鼠心肌GLUT4的表达并未因运动发生变化,且这与以往的发现相一致(Osborn et al., 1997)。对上述结果的分析认为,这可能是由于对照组小鼠的GLUT4水平已经处于正常范围,因此不会因运动训练而进一步上调。此外,还有一种可能的原因——由于对照组小鼠的运动能力较高,因此同样的运动刺激不足以诱导其心肌GLUT4水平发生变化。

2型糖尿病动物模型往往表现为心肌脂肪酸摄取、氧化增加,一般认为这主要是由血清脂肪酸、甘油三酯水平升高,以及PPAR α 活动增强所致(Bugger et al., 2014)。PPARs是核脂质激活受体,调控脂质代谢通路的诸多基因(Francis et al., 2003)。在PPARs的3种亚型中,PPAR α 在肝脏、心脏和骨骼肌中高度表达,并通过转录调控脂肪酸代谢相关酶调节脂质和能量稳态。目前,PPAR α 在肥胖、高脂膳食(high-fat diet, HFD)等引起的肝脏病变(如非酒精性脂肪肝)中的作用已得到证实,然而鲜见其在心脏中的作用研究。此外,尽管基于转基因模型的研究认为PPAR α 过表达可模拟糖尿病心肌病变(Finck et al., 2003),然而也有证据显示,有些研究中糖尿病大鼠心肌可见PPAR α 表达升高(Lee et al., 2010)。上述矛盾结果的产生可能与模式鼠所处的糖尿病阶段不同有关。Saunders等(2008)认为,糖尿病早期可见心肌PPAR α 表达上调,所致的脂肪酸氧化增强有利于维持心肌能量代谢。然而,在糖尿病晚期,心肌细胞对脂肪酸的过量摄取导致PPAR α 表达下调,同时PPAR- γ 表达上调,从而导致心肌细胞脂毒性加重。本研究发现,19周龄 db/db 小鼠心肌PPAR α 表达显著上调。此外,在对PPAR α 靶基因[FAT、CD36、FABP和肌肉CPT1等]的表达水平做进一步检测发现,此阶段 db/db 小鼠心肌CD36、PGC-1 β 和Fabp3的mRNA表达均显著上调,且12周跑台训练能降低 db/db 小鼠PPAR α 和CD36的表达,这表明PPAR α 信号通路参与运动训练对 db/db 小鼠心肌代谢紊乱的改善作用。此外,相关性分析的结果

也佐证了 PPAR α 对脂质代谢的正调控作用。

作为导致糖尿病心肌病变的另一重要因素,胰岛素信号通路受损在本研究中也表现明显,其中, *db/db* 小鼠心肌 AKT 磷酸化受到抑制。此外,12 周跑台训练显著改善了 p- β -IR、p-IRS1 和 p-AKT 的表达,表明有氧训练保护并改善糖尿病心肌受损的胰岛素信号通路。在调控胰岛素信号通路的一系列因子中, MG53 是近年备受关注。已有证据显示, MG53 参与一系列生理、病理过程,包括心肌和骨骼肌膜修复、心肌缺血预适应以及调控胰岛素敏感性等(Zhang et al., 2016)。然而,在体环境中 MG53 是否参与介导胰岛素抵抗尚存争议。Song 等(2013)认为, *db/db* 小鼠骨骼肌中可见 MG53 表达上调,而 Yi 等(2013)认为 *db/db* 小鼠 MG53 表达与对照组未存在显著差别,对 *ob/ob* 小鼠及 2 型糖尿病患者的骨骼肌样本进行检验,也未发现其 MG53 的蛋白表达与各自对照组间存在显著差异。此外,尽管目前鲜见探索运动对 MG53 影响的研究,但总体证据支持运动干预下调胰岛素抵抗骨骼肌中 MG53 的表达。例如,8 周游泳运动能通过下调大鼠 MG53 的 mRNA 和蛋白表达分别改善 HFD 及 2 型糖尿病引起的骨骼肌胰岛素抵抗(唐艳婕等, 2014; Qi et al., 2016)。尽管如此,运动干预如何影响胰岛素抵抗心肌的 MG53 表达尚无定论。本研究发现, *db/db* 小鼠心肌 MG53 的 mRNA 表达显著增加,且 12 周运动干预能逆转此变化。然而,无论是糖尿病还是运动干预均未影响 MG53 的蛋白水平。结合本研究中糖尿病和跑台运动对胰岛素抵抗的显著影响得出:在当前的实验设定下, MG53 未参与运动训练对 *db/db* 小鼠心肌胰岛素抵抗的改善作用。

综上所述,12 周跑台运动能显著改善 *db/db* 小鼠心肌底物代谢紊乱和胰岛素抵抗状态,且 PPAR α 信号通路在糖尿病心肌糖、脂代谢异常中具有重要作用。

参考文献:

- 蔡欢,何玉秀,2016. 运动对 PPARs 及糖尿病心肌病糖代谢和脂肪代谢紊乱的影响[J]. 中国运动医学杂志,35(11):1056-1060.
- 曾芳桂,2017. 运动时骨骼肌糖、脂肪氧化的交互作用及机制[J]. 武汉体育学院学报,51(10):76-81.
- 陈国庆,汪贵明,杨月琴,等,2014. 有氧运动对糖尿病大鼠心肌 PPAR α 及脂质代谢相关基因表达的影响[J]. 四川解剖学杂志,22(4):5-9.
- 刘军,赵康,马艳,等,2020. 维生素 D 联合有氧运动通过调控肝脏 PI3K/Akt 信号通路改善 *db/db* 小鼠胰岛素抵抗[J]. 西安体育学院学报,37(6):742-749.
- 齐洁,傅建,张钧,2016. TRIM72 在运动改善胰岛素信号途径 PI3-K/Akt 中的作用[J]. 北京体育大学学报,39(5):45-51.
- 齐洁,张波,蒋丽,等,2021. 游泳运动对细胞自噬轴诱导生理性心肌肥大形成的影响[J]. 天津体育学院学报,36(3):347-353.
- 唐艳婕,贺仕刚,秦旭平,2014. 游泳训练通过降低 MG53 表达改善 II 型糖尿病大鼠骨骼肌糖代谢[J]. 西安体育学院学报,31(2):220-224.

- 田阁,徐昕,李国平,2018. 运动通过 AMPK 信号通路改善高脂诱导的 II 型糖尿病小鼠心肌糖脂代谢[J]. 体育科学,38(1):49-54,78.
- 许瀚,尹毅,赵燕,2020. 运动干预对成人代谢综合征患者心血管危险因素影响的 Meta 分析[J]. 中国体育科技,56(5):59-70.
- 杨宗璐,柯亨羽,2021. 糖尿病并发心血管疾病的研究进展[J]. 中国老年保健医学,19(1):92-94,98.
- 张崇林,王前进,刘绍生,等,2018. 有氧运动对代谢综合征大鼠氧化应激及心肌 PPAR α 表达的影响[J]. 卫生研究,47(5):789-793,797.
- BRODERICK T L, JANKOWSKI M, GUTKOWSKA J, 2017. The effects of exercise training and caloric restriction on the cardiac oxytocin natriuretic peptide system in the diabetic mouse[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 10: 27-36.
- BUGGER H, ABEL E D, 2014. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetologia, 57(4): 660-671.
- CHANG L, KIRIAZIS H, GAO X M, et al., 2011. Cardiac genes show contextual SWI/SNF interactions with distinguishable gene activities[J]. Epigenetics, 6(6): 760-768.
- COX E J, MARSH S A, 2013. Exercise and diabetes have opposite effects on the assembly and O-GlcNAc modification of the mSin3A/HDAC1/2 complex in the heart [J]. Cardiovasc Diabetol, doi: 10.1186/1475-2840-12-101.
- DELPHAN M, DELPHAN M, KORDI M R, et al., 2020. High intensity interval training improves diabetic cardiomyopathy via miR-1 dependent suppression of cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats[J]. J Diabetes Metab Disord, 19(1): 145-152.
- FINCK B N, HAN X, COURTOIS M, et al., 2003. A critical role for PPAR α -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(3): 1226-1231.
- FINCK B N, LEHMAN J J, LEONE T C, et al., 2002. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus[J]. J Clin Invest, 109(1): 121-130.
- FRANCIS G A, ANNICOTTE J S, AUWERX J, 2003. PPAR- α effects on the heart and other vascular tissues[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 285(1): H1-9.
- GUTKOWSKA J, BRODERICK T L, BOGDAN D, et al., 2009. Downregulation of oxytocin and natriuretic peptides in diabetes: Possible implications in cardiomyopathy[J]. J Physiol, 587 (Pt 19): 4725-4736.
- HU X, XIAO R P, 2018. MG53 and disordered metabolism in striated muscle[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 1864(5 Pt B): 1984-1990.
- KRSSAK M, FALK P K, DRESNER A, et al., 1999. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: A 1H NMR spectroscopy study[J]. Diabetologia, 42(1): 113-116.
- LASHERAS J, VILA M, ZAMORA M, et al., 2016. Gene expression profiling in hearts of diabetic mice uncovers a potential role of estrogen-related receptor gamma in diabetic cardiomyopathy[J]. Mol Cell Endocrinol, 430: 77-88.
- LEE T I, KAO Y H, CHEN Y C, et al., 2010. Oxidative stress and inflammation modulate peroxisome proliferator-activated receptors with regional discrepancy in diabetic heart[J]. Eur J Clin Invest, 40(8): 692-699.

- LEE T W, BAI K J, LEE T I, et al., 2017. PPARs modulate cardiac metabolism and mitochondrial function in diabetes[J]. *J Biomed Sci*, doi: 10.1186/s12929-016-0309-5.
- LEHNEN A M, LEGUISAMO N M, PINTO G H, et al., 2010. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: A phenomenon unrelated to GLUT4 expression[J]. *Cardiovasc Diabetol*, doi: 10.1186/1475-2840-9-67.
- LIU F, SONG R, FENG Y, et al., 2015. Upregulation of MG53 induces diabetic cardiomyopathy through transcriptional activation of peroxisome proliferation-activated receptor alpha[J]. *Circulation*, 131(9): 795-804.
- NEELY J R, ROVETTO M J, ORAM J F, 1972. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 15(3): 289-329.
- OSBORN B A, DAAR J T, LADDAGA R A, et al., 1997. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart[J]. *J Appl Physiol* (1985), 82(3): 828-834.
- PLANTE E, MENAOUAR A, DANALACHE B A, et al., 2015. Oxytocin treatment prevents the cardiomyopathy observed in obese diabetic male *db/db* mice[J]. *Endocrinology*, 156(4): 1416-1428.
- QI J, YANG B, REN C, et al., 2016. Swimming exercise alleviated insulin resistance by regulating tripartite motif family protein 72 expression and AKT signal pathway in sprague-dawley rats fed with high-fat diet[J]. *J Diabetes Res*, doi: 10.1155/2016/1564386.
- SAUNDERS J, MATHEWKUTTY S, DRAZNER M H, et al., 2008. Cardiomyopathy in type 2 diabetes: Update on pathophysiological mechanisms[J]. *Herz*, 33(3): 184-190.
- SCHAUN M I, MARSCHNER R A, PERES T R, et al., 2017. Aerobic training prior to myocardial infarction increases cardiac GLUT4 and partially preserves heart function in spontaneously hypertensive rats[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 42(3): 334-337.
- SENNOTT J, MORRISSEY J, STANDLEY P R, et al., 2008. Treadmill exercise training fails to reverse defects in glucose, insulin and muscle GLUT4 content in the *db/db* mouse model of diabetes[J]. *Pathophysiology*, 15(3): 173-179.
- SEO D Y, KO J R, JANG J E, et al., 2019. Exercise as a potential therapeutic target for diabetic cardiomyopathy: Insight into the underlying mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, doi: 10.3390/ijms20246284.
- SONG R, PENG W, ZHANG Y, et al., 2013. Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders[J]. *Nature*, 494(7437): 375-379.
- WANG S Y, ZHU S, WU J, et al., 2020. Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy [J]. *J Mol Med (Berl)*, 98(2): 245-261.
- WOODS R L, 2004. Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: A brief review[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31(11): 791-794.
- WU H K, ZHANG Y, CAO C M, et al., 2019. Glucose-sensitive myokine/cardiokine MG53 regulates systemic insulin response and metabolic homeostasis[J]. *Circulation*, 139(7): 901-914.
- WU L, WANG K, WANG W, et al., 2018. Glucagon-like peptide-1 ameliorates cardiac lipotoxicity in diabetic cardiomyopathy via the PPARalpha pathway[J]. *Aging Cell*, doi: 10.1111/ace1.12763.
- YI J S, PARK J S, HAM Y M, et al., 2013. MG53-induced IRS-1 ubiquitination negatively regulates skeletal myogenesis and insulin signalling[J]. *Nat Commun*, doi: 10.1038/ncomms3354.
- YIN Z, ZHAO Y, HE M, et al., 2019. MiR-30c/PGC-1beta protects against diabetic cardiomyopathy via PPARalpha[J]. *Cardiovasc Diabetol*, doi: 10.1186/s12933-019-0811-7.
- YOUNG M E, MCNULTY P, TAEGTMEYER H, 2002. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: Potential mechanisms[J]. *Circulation*, 105(15): 1861-1870.
- ZHANG Y, WU H K, LV F X, et al., 2016. MG53 is a double-edged sword for human diseases[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 68(4): 505-516.

(收稿日期:2019-11-05; 修订日期:2022-02-22; 编辑:尹航)

