



# 高强度间歇训练对增龄大鼠脂肪组织衰老相关分泌表型的影响及其机制探讨

## Effects and Mechanisms of High-Intensity Intervals Training on Senescence-Associated Secretory Phenotype in Adipose Tissue of Aging Rats and Mechanisms

马松<sup>1</sup>, 李方晖<sup>1,2\*</sup>, 吴大帅<sup>1</sup>, 谢天<sup>1</sup>, 王静<sup>1</sup>, 乔一波<sup>1</sup>

MA Song<sup>1</sup>, LI Fanghui<sup>1,2\*</sup>, WU Dashuai<sup>1</sup>, XIE Tian<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, QIAO Yibo<sup>1</sup>

**摘要:**目的:探讨高强度间歇训练(HIIT)对增龄大鼠脂肪组织衰老相关分泌表型(SASP)的影响及机制。方法:将18月龄雌性大鼠分为安静对照组(SED)、持续性耐力组(MICT)和HIIT组,每组12只。HIIT组起始速度为15 m/min,时间为4 min;之后进行高强度训练,速度为25 m/min,运动1 min,依次交替9个循环。MICT组以17 m/min速度运动45 min,持续8个月。免疫组化观测内脏脂肪β-半乳糖苷酶,蛋白免疫印迹和RT-qPCR检测脂肪组织p16<sup>INK4a</sup>、p53、脂联素(Adiponectin)、瘦素(Leptin)、白介素-6(IL-6)、白介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达,蛋白免疫印迹检测核转录因子-κB(NF-κB)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)、蛋白激酶B(AKT)、核转录因子-κB抑制蛋白α(IκBα)和c-Jun N端激酶(JNK)总蛋白及其磷酸化水平,蛋白免疫荧光观察p16<sup>INK4a</sup>、p-NF-κB和p-IκBα蛋白含量。结果:与SED和MICT组相比,HIIT组β-半乳糖苷酶染色阳性脂肪细胞数( $P<0.05$ )及IL-6、IL-1β、瘦素、TNF-α、p16<sup>INK4a</sup>蛋白和mRNA表达显著降低( $P<0.01$ ),脂联素的蛋白( $P<0.05$ )和mRNA表达( $P<0.01$ )显著升高;HIIT和MICT组脂肪组织p53蛋白和mRNA表达均低于SED组( $P<0.01$ ),HIIT组p-IκBα、p-JNK、p-NF-κB、p-p38MAPK、p-IκBα/p-IκBα、p-JNK/JNK、p-NF-κB/NF-κB、p-p38MAPK/p38MAPK均低于SED和MICT组( $P<0.01$ ),HIIT组p-AKT和p-AKT/AKT高于SED和MICT组( $P<0.01$ )。相关性分析显示,p-NF-κB/NF-κB与p16<sup>INK4a</sup>( $r=0.94, P<0.01$ )、IL-6( $r=0.77, P<0.05$ )、IL-1β( $r=0.74, P<0.05$ )、TNF-α( $r=0.82, P<0.01$ )、瘦素( $r=0.92, P<0.01$ )呈正相关,p-AKT/AKT与p-IκBα/IκBα( $r=-0.89, P<0.01$ )、p-JNK/JNK( $r=-0.95, P<0.01$ )、p-p38MAPK/p38MAPK( $r=-0.90, P<0.01$ )和p-NF-κB/NF-κB( $r=-0.91, P<0.01$ )呈负相关。结论:HIIT比MICT能更有效地抑制内脏脂肪组织SASP分泌,该过程可能与AKT通路的激活及NF-κB、p38MAPK和JNK通路的抑制有关。

**关键词:**高强度间歇训练;增龄;脂肪组织;衰老相关分泌表型

**Abstract:** Objective: To investigate the effects and mechanism of high-intensive interval training (HIIT) on senescence-associated secretory phenotype (SASP) in adipose tissue of aging rats. Methods: 36 female Sprague Dawley rats at 18 months old were selected randomly and divided into three groups: Sedentary control (SED), moderate-intensity continuous training (MICT), and HIIT groups, 12 rats per group. HIIT started with a speed of 15 m/min and lasted for 4 min. After that, the high-intensity training speed was 25 m/min, and the time was 1 min. Then, 9 cycles were successively alternated. The MICT had a speed of 17 m/min and a time of 45 min. The exercise lasted for eight months. Immunohistochemistry was used to examine the contents of beta-galactosidase in visceral adipocytes. Expressions of p16<sup>INK4a</sup>, p53, adiponectin, leptin, interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in visceral adipose tissue was detected by Western Blot and RT-PCR. In addition, Western Blot was performed to detect the phosphorylation levels of NF-κB, p38MAPK, AKT, IκBα, and JNK. More-

**基金项目:**

国家自然科学基金项目(31971099);  
广东省省级科技计划项目  
(2015A020219015)

**第一作者简介:**

马松(1996-),男,在读硕士研究生,主要研究方向为运动与抗衰老,E-mail:1778810394@qq.com。

**\*通信作者简介:**

李方晖(1983-),男,教授,博士,博士研究生导师,主要研究方向为运动抗衰老机制,E-mail:12356@njnu.edu.cn。

**作者单位:**

1. 南京师范大学,江苏南京210023;
2. 肇庆学院,广东肇庆526061
1. Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;
2. Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China.

over, the protein contents of p16<sup>INK4a</sup>, p-NF- $\kappa$ B, and p-I $\kappa$ B $\alpha$  were observed by immunofluorescence. Results: Compared with the SED and MICT groups, the number of  $\beta$ -galactosidase staining positive adipocytes, and the protein and mRNA expression of IL-6, IL-1 $\beta$ , leptin, TNF- $\alpha$ , and p16<sup>INK4a</sup> in the HIIT group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression of adiponectin protein ( $P < 0.05$ ) and mRNA expression were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The expression of p53 protein and mRNA in HIIT and MICT group was lower than that in SED group ( $P < 0.01$ ). Western blot showed that the p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-JNK, p-NF- $\kappa$ B, p-p38MAPK, p-I $\kappa$ B $\alpha$  to p-I $\kappa$ B $\alpha$  ratio, p-JNK to JNK ratio, p-NF- $\kappa$ B to NF- $\kappa$ B ratio, and p-38MAPK to p38MAPK ratio in the HIIT group were lower than those in the SED and MICT groups ( $P < 0.01$ ), and the p-AKT and p-AKT to AKT ratio were higher than those in the SED and MICT groups ( $P < 0.01$ ). Pearson correlation analysis showed that p-NF- $\kappa$ B to NF- $\kappa$ B ratio was positively correlated with p16<sup>INK4a</sup> ( $r = 0.94, P < 0.01$ ), IL-6 ( $r = 0.77, P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$  ( $r = 0.74, P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  ( $r = 0.82, P < 0.01$ ), and leptin ( $r = 0.92, P < 0.01$ ), and p-AKT to AKT ratio was negatively correlated with p-I $\kappa$ B $\alpha$  to I $\kappa$ B $\alpha$  ratio ( $r = -0.89, P < 0.01$ ), p-JNK to JNK ratio ( $r = -0.95, P < 0.01$ ), p-p38MAPK to p38MAPK ratio ( $r = -0.90, P < 0.01$ ), and p-NF- $\kappa$ B to NF- $\kappa$ B ratio ( $r = -0.91, P < 0.01$ ). Conclusions: HIIT exhibited greater beneficial effects on inhibiting SASP secretion in visceral adipose tissue than MICT, and this process may be related to activation of AKT signaling pathway, and inhibition of NF- $\kappa$ B, JNK, and p38MAPK pathway.

**Keywords:** high-intensity intervals training; aging; adipose; senescence-associated secretory phenotype

**中图分类号:** G804.2 **文献标识码:** A

脂肪组织是机体重要的内分泌器官(Kershaw et al., 2004)。在增龄性衰老过程中,脂肪组织分布、结构和功能将发生变化,衰老脂肪细胞可大量分泌由炎症因子、脂肪因子等一系列细胞因子组成的衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)(郭慧宁等, 2016; 殷双丽等, 2018; Coppé et al., 2010)。已有研究证实,衰老脂肪细胞释放 SASP 可加快机体衰老进程(Tam et al., 2020),其与衰老相关疾病的发生及发展密不可分(Zhu et al., 2019)。因此,调控脂肪组织 SASP 释放是延缓机体衰老的重要途径之一(Yang et al., 2019)。

SASP 的分泌过程依赖于核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)通路的活化,通过调控炎症因子基因转录过程,可以促进 NF- $\kappa$ B 表达(杨连伟, 2019)。在衰老脂肪细胞中, I $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B 的磷酸化水平增加,导致 NF- $\kappa$ B 向核内转移,促进炎症因子转录并导致慢性低度炎症(Saltiel et al., 2017)。p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)可改变 NF- $\kappa$ B 磷酸化水平,进而影响衰老细胞 SASP 的分泌(Alspach et al., 2014; Kaminska, 2005)。研究发现, c-Jun N 端激酶(JNK)和蛋白激酶 B(AKT)通路的相互拮抗,可以改变脂肪组织炎症因子的表达(Jaisset et al., 2017; Kumar et al., 2019)。

近年,高强度间歇训练(high-intensity interval training, HIIT)已成为抗衰老领域的研究热点(刘阳等, 2018)。与有氧和抗阻训练相比, HIIT 能更有效地降低老龄个体的体脂百分比,抑制肥胖小鼠脂肪组织 SASP 释放(孙磊等, 2018; Robinson et al., 2017; Wang et al., 2017)。然而, HIIT 是否能抑制衰老脂肪组织 SASP 分泌? 是否与脂肪细胞 p38MAPK、JNK、NF- $\kappa$ B 和 AKT 通路的改变有关? 基于此,本研究通过研究 8 个月 HIIT 和持续耐力训练(moder-

ate-intensity continuous training, MICT)后增龄大鼠脂肪组织炎症因子、衰老相关蛋白及 p38MAPK、JNK、NF- $\kappa$ B 和 AKT 蛋白磷酸化表达的改变,探究 HIIT 对衰老脂肪组织 SASP 分泌及其调控机制的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验动物依据《实验动物管理条例》执行,通过南京师范大学动物实验中心伦理委员会批准(IACUU-1903006)。选用 36 只约 18 月龄清洁级 Sprague-Dawley (SD) 雌性大鼠,由广东省医学动物实验中心[动物许可证号: SCXK(粤)2018-0002]提供。所有大鼠采用自由摄食,广东省医学动物实验中心提供国家标准啮齿类动物常规饲料(56.8% 碳水化合物、22.5% 蛋白质、3.5% 脂质和 17.2% 其他营养素)。饲料供给量根据体质量增长而增加,每周更换垫料 2~3 次,温度为 20 °C~23 °C,相对湿度为 50%~70%,自然光照,笼内保持通风干燥。

### 1.2 动物分组及运动方案

将 18 月龄大鼠分为 3 组: 安静对照(SED)组、MICT 和 HIIT 组,每组 12 只。在实验过程中, SED 组有 2 只大鼠眼部细菌感染, MICT 组 4 只大鼠被剔除(2 只外因死亡, 2 只严重爪部感染), HIIT 组 6 只大鼠被剔除(2 只不配合训练, 4 只尾爪部严重感染)。

动物实验所用跑台(型号: FD000043)购置于广州飞迪生物科技有限公司。适应性训练后进行正式训练,周一至周五 18:30—22:00 训练,共 8 个月。采用呼气分析运动试验对大鼠进行最大摄氧量(maximal oxygen uptake,  $\dot{V}O_{2max}$ )测定(孙磊等, 2018)。训练运动方案参照 Heiskanen 等

(2016)的研究。正式训练前后,分别以速度 10 m/min(强度为 30%~40%  $\dot{V}O_{2max}$ )进行跑台 1 min 热身和放松。HIIT 组起始速度为 15 m/min(45%~55%  $\dot{V}O_{2max}$ ),时间为 4 min,之后进行高强度运动,速度为 25 m/min(强度 85%~95%  $\dot{V}O_{2max}$ ),运动 1 min,交替 9 个循环;MICT 组以 17 m/min(运动强度为 75%~80%  $\dot{V}O_{2max}$ )运动。运动组运动总时间均为 45 min,坡度为 0°(孙磊等,2018)。为避免干扰,SED 组置于同一环境。

### 1.3 取材

本实验中肾周脂肪垫取材的具体步骤:所有大鼠终次训练结束后 48 h,按照 4 mL/kg 剂量静脉注射 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血后断颈处死。迅速取肾周脂肪,一部分分装于冻存管密封投入液氮后速冻,用锡纸包裹分装于 -80 °C 冰箱保存,用于 RT-qPCR 和蛋白免疫印迹实验;另一部分脱水固定后用于蛋白免疫荧光实验。

### 1.4 免疫组织化学和免疫荧光染色

免疫组织化学具体步骤:新鲜组织取材,样本经 10% 多聚甲醛固定 24 h,用 OCT 包埋剂(optimum cutting temperature compound)包埋后,于冷冻切片机制片(切片厚度为 5  $\mu$ m)并粘于载玻片上;使用  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(#9860,美国 Cell Signaling 公司)固定 10 min,37 °C 染色溶液孵育 24 h。荧光显微镜(BX50, Olympus 公司)20 倍物镜随机视野拍摄。

p16<sup>INK4a</sup>、p-NF- $\kappa$ B 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  免疫荧光染色步骤:新鲜脂肪组织取材,10% 多聚甲醛固定 24 h 后,经乙醇梯度

脱水,石蜡包埋。使用半自动旋转式切片机切片,切片厚 4  $\mu$ m。脱蜡前,将切片置于 60 °C 恒温箱(Thermo 公司,美国)中烘烤 60 min。组织切片脱蜡:切片用二甲苯浸泡 2 次,每次 10 min 后脱蜡。分别于无水乙醇中浸泡 5 min、95% 乙醇中浸泡 5 min、85% 乙醇中浸泡 5 min、70% 乙醇中浸泡 5 min 后水化。PBS 浸洗。抗原修复:将放有切片的染色架放入孵育盒中,高温修复,冷却后 PBS 浸洗。封闭:滴加即用型山羊血清 50~100  $\mu$ L (AR0009,武汉博士德生物工程有限公司),室温封闭 20 min。一抗反应:在玻片上滴加相应一抗抗体 50~100  $\mu$ l,4 °C 过夜,室温放置 20~30 min 后 PBS 浸洗。二抗反应:在玻片上滴加二抗,37 °C 孵育 30 min 后清洗。封片:滴加 0.1  $\mu$ g/mL DAPI(南京碧云天生物技术有限公司)染色后封片。观察:激光共聚焦(A1R/A1,日本 Nikon 公司)观察组织细胞蛋白的表达情况,取 3~4 个高表达区域拍照保存。

### 1.5 RNA 提取和定量 RT-qPCR

取肾周脂肪加入 Trizol,经充分研磨后提取总 RNA,超微量分光光度计(OneDrop@OD-1000)测定总 RNA 浓度。使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行 mRNA 逆转录,ChamQ SYBR qPCR Master Mix 进行 mRNA 定量。具体操作步骤皆参照试剂盒说明书执行(ABI Step One Plus,ABI 公司,美国)。GAPDH 为内参,测试结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算相对定量。根据 NCBI 数据库中的基因序列设计相关引物序列(表 1),引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 相关基因上下游引物列表

Table 1 Sequence List of the Upstream and Downstream Primers of Related Genes

名称	上游引物	下游引物
IL-1 $\beta$ 基因	ACAGCAGCATCTCGACAAGAGC	CCACGGGCAAGACATAGGTAGC
IL-6 基因	CGCAAGAGACTTCCAGCCAG	ACTGGTCTGTTGTGGGTGGT
瘦素基因	TGACCTGGAGAACCTGCGAGAC	TGTGGAGTAGAGCGAGGCTTCC
p16 <sup>INK4a</sup> 基因	TTCACCAAACGCCCGAACAC	CAGGAGAGCTGCCACTTTGACG
p53 基因	TGGGACGGGACAGCTTTGAGG	CTGGTGGGCGAGTCTCTCTTTG
TNF- $\alpha$ 基因	GTGTCTGTGCCTCAGCCTCTTC	CCTCTTGTGGGACCGCATC
MCP-1 基因	CACCTGCTGCTACTCATTCACTG	CTTCTTTGGGACACCTGCTGCTG
脂联素基因	GAGACGCAGGTGTCTTTGGT	GGAACATTGGGACAGTGAC
GAPDH 基因	TGCCGCCTGGAGAAACCTGC	TGAGAGCAATGCCAGCCCCA

### 1.6 蛋白提取和免疫印迹检测

取大鼠肾周脂肪 50  $\mu$ g,加入 500  $\mu$ L RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂各 10  $\mu$ L,在高速组织研磨仪中研磨 2 min 后离心,吸取中间层,超声 30 s,离心取上清加入上样缓冲液,沸水煮 5 min。10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,转印至 PVDF 膜。在 PBS 中加 0.1% Tween-20,5% 的脱脂奶粉封闭,随后抗体孵育:p16<sup>INK4a</sup>(23797R, Bioss 公司)、p53(AF0879, Affinity 公司)、IL-1 $\beta$ (20448R, Bioss 公司)、IL-6(4539R, Bioss 公司)、

瘦素(0409R, Bioss 公司)、脂联素(0471R, Bioss 公司)、p-NF- $\kappa$ B(5662R, Bioss 公司)、NF- $\kappa$ B(0465R, Bioss 公司)、p-AKT(10996R, Bioss 公司)、AKT(0115R, Bioss 公司)、p-p38 MAPK(18672R, Bioss 公司)、p38MAPK(0637R, Bioss 公司)、JNK(2592R, Bioss 公司)、p-JNK(1640R, Bioss 公司)、p-I $\kappa$ B $\alpha$ (3249R, Bioss 公司)、I $\kappa$ B $\alpha$ (1287R, Bioss 公司),稀释比均为 1:1 000。二抗为羊抗兔 IgG 抗体,稀释比 1:10 000,暗室发光成像。Image J 软件读取条带灰度值, $\beta$ -actin 为内参蛋白。



相对表达量为目的蛋白灰度/ $\beta$ -actin 灰度。

### 1.7 统计分析

数据结果用平均值 $\pm$ 标准差表示。通过单因素方差分析验证组间统计学差异,采用 Tukey 多重比较检验, $P < 0.05$  表示具有显著性意义, $P < 0.01$  表示具有极显著性意义。分析及作图使用 GraphPad Prism 8.2。

## 2 结果

### 2.1 高强度间歇运动对脂肪细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶的影响

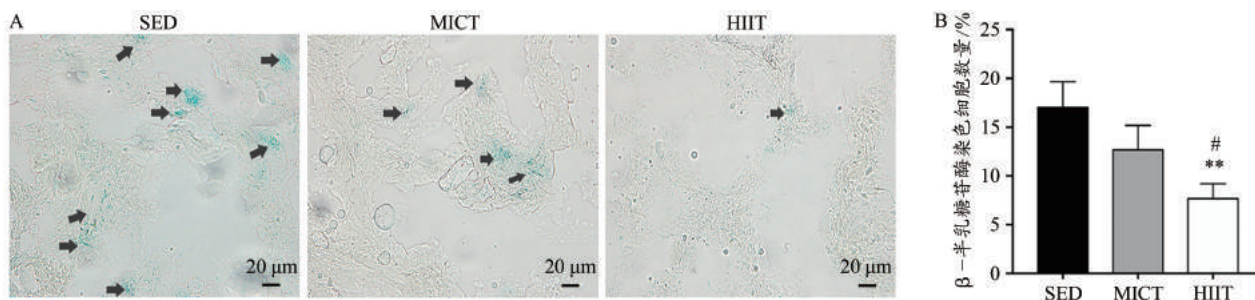


图1 脂肪组织 $\beta$ -半乳糖苷酶表达水平

Figure 1.  $\beta$ -galactosidase Content in Adipose Tissue

注:SED组与MICT和HIIT组相比,\*\*表示 $P < 0.01$ ;MICT与HIIT组相比,#表示 $P < 0.05$ ;下同。箭头所指处为 $\beta$ -半乳糖苷酶染色显色较高处。

### 2.2 HIIT对脂肪细胞衰老表型相关蛋白表达的影响

免疫荧光染色(图2A)显示,DAPI染色细胞核呈蓝色,蛋白标记呈绿色,HIIT组p16<sup>INK4a</sup>荧光显色较弱,MICT组无明显变化。相对荧光强度分析表明(图2B),与SED和MICT组比较,HIIT组p16<sup>INK4a</sup>荧光强度及蛋白表达极显著降低( $P < 0.01$ )。

RT-qPCR结果(图2C)表明,与SED组比较,HIIT和MICT组的p53 mRNA表达极显著降低( $P < 0.01$ ),MICT组p16<sup>INK4a</sup> mRNA表达显著升高( $P < 0.05$ );与SED和MICT组比较,HIIT组p16<sup>INK4a</sup> mRNA表达极显著降低( $P < 0.01$ )。

免疫印迹检测结果(图2D)表明,与SED和MICT组比较,HIIT组p16<sup>INK4a</sup>蛋白表达极显著降低( $P < 0.01$ );与SED组比较,HIIT和MICT组p53蛋白表达皆显著降低( $P < 0.05$ )。

### 2.3 HIIT对增龄大鼠脂肪组织炎症因子表达的影响

RT-qPCR结果(图3A)表明,与SED组比较,HIIT和MICT组的IL-6、IL-1 $\beta$ 、MCP-1、TNF- $\alpha$ 和瘦素 mRNA 表达显著降低( $P < 0.01$ );相较于SED和MICT组,HIIT组脂联素 mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ )。

免疫印迹检测结果(图3D~图3H)表明,与SED组比较,HIIT( $P < 0.01$ )和MICT( $P < 0.05$ )组的脂联素蛋白(图3H)表达显著升高,HIIT和MICT组的IL-6、IL-1 $\beta$ 、MCP-1和TNF- $\alpha$ 蛋白(图3B~图3G)表达极显著降低( $P < 0.01$ );与SED和MICT组比较,HIIT组脂联素蛋白(图3H)表达极显著升高( $P < 0.01$ ),瘦素蛋白(图3F)表达极显著降低( $P < 0.01$ )。

各组大鼠脂肪细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶含量变化显示:脂肪细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的脂肪细胞呈现蓝色细颗粒;与SED组相比,HIIT组脂肪组织中 $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的脂肪细胞数明显减少(图1A);与SED( $P < 0.01$ )和MICT组( $P < 0.05$ )相比,HIIT组 $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的脂肪细胞数分别呈极显著性和显著性降低,MICT组 $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的脂肪细胞数与SED组相比有下降趋势,但无统计学意义( $P > 0.05$ ;图1A,图1B)。

### 2.4 HIIT和MICT对脂肪组织NF- $\kappa$ B通路的影响

免疫荧光染色(图4A)显示,与SED和MICT组相比,HIIT组荧光标记p-I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白显色较弱;与SED组相比,HIIT和MICT组p-NF- $\kappa$ B蛋白荧光显色较弱。与MICT和SED组比较(图4B),HIIT组p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-NF- $\kappa$ B蛋白荧光强度极显著降低( $P < 0.01$ );与SED组比较,MICT组p-NF- $\kappa$ B荧光强度显著降低( $P < 0.05$ )。

免疫印迹检测结果表明(图4C~图4D),与SED组比较,HIIT组脂肪组织p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 极显著降低( $P < 0.01$ );与MICT组比较,HIIT组p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 极显著降低( $P < 0.01$ ),p-NF- $\kappa$ B显著降低( $P < 0.05$ )。

### 2.5 HIIT对脂肪组织p38MAPK、JNK和AKT信号途径的影响

脂肪组织炎症相关通路相关蛋白表达的改变(图5)表明,HIIT组p-p38MAPK蛋白表达和p-p38MAPK/p38MAPK显著低于SED组( $P < 0.01$ )和MICT组( $P < 0.05$ );MICT组p-p38MAPK蛋白表达和p-p38MAPK/p38MAPK相较于SED组极显著降低( $P < 0.01$ ;图5A~图5C)。

与SED和MICT组比较(图5A,图5D~图5E),HIIT组p-JNK蛋白表达和p-JNK/JNK比值极显著降低( $P < 0.01$ );与SED组比较,MICT组p-JNK蛋白表达( $P < 0.01$ )和p-JNK/JNK( $P < 0.05$ )显著降低。

与SED和MICT组比较(图5A,图5F~图5G),HIIT组p-AKT蛋白表达、p-AKT/AKT极显著升高( $P < 0.01$ );

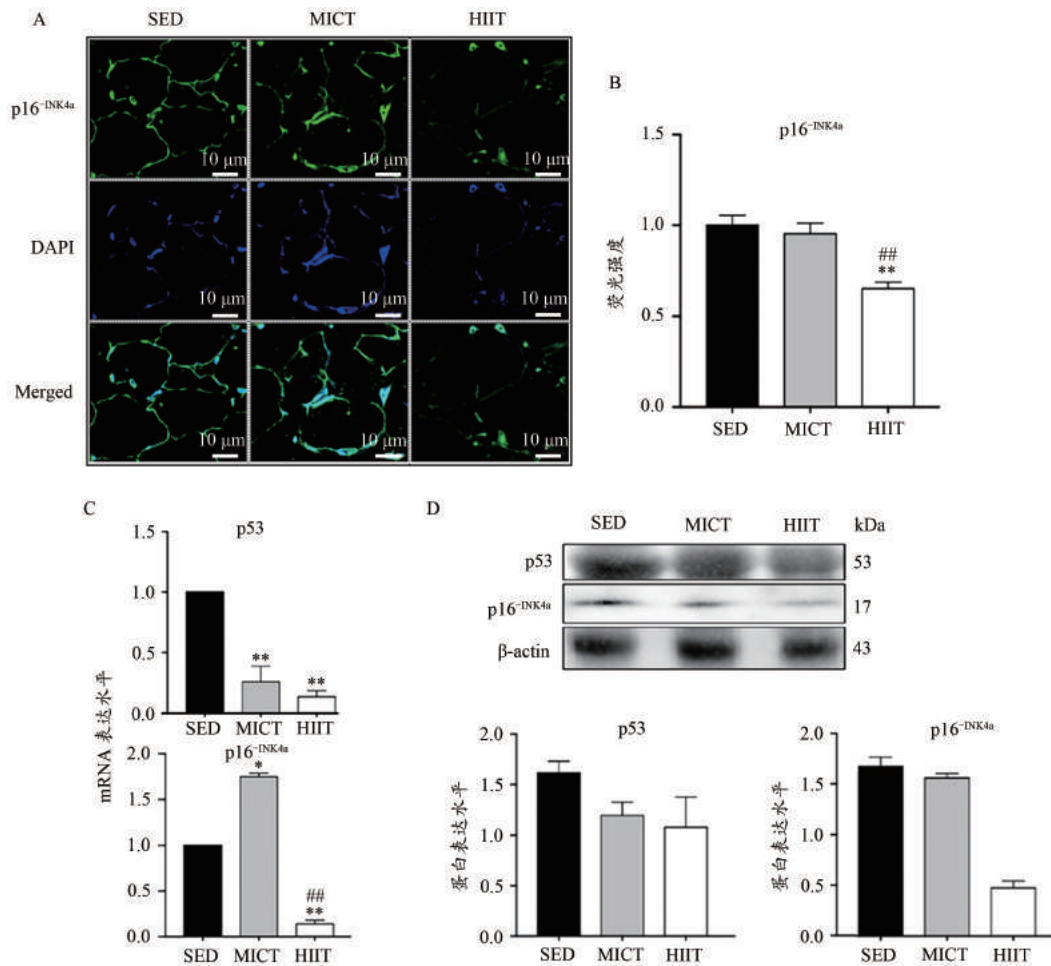


图2 脂肪组织衰老相关标示物表达

Figure 2. Expression of Adipose Tissue Senescence Markers

注:SED组与MICT和HIIT组相比,\*表示 $P < 0.05$ ;MICT与HIIT组相比,##表示 $P < 0.01$ ;下同。

与SED组比较,MICT组p-AKT蛋白表达、p-AKT/AKT极显著升高( $P < 0.01$ )。

### 2.6 相关性分析

脂肪组织p16<sup>INK4a</sup>与IL-6( $r=0.74, P < 0.05$ )、IL-1 $\beta$ ( $r=0.72, P < 0.05$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.89, P < 0.01$ )、瘦素( $r=0.98, P < 0.01$ )、p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B( $r=0.94, P < 0.01$ )、p-p38MAPK/p38MAPK( $r=0.78, P < 0.05$ )、p-JNK/JNK( $r=0.97, P < 0.01$ )、p-IkBa/IkBa( $r=0.87, P < 0.01$ )呈正相关,与脂联素( $r=-0.98, P < 0.01$ )、p-AKT/AKT( $r=-0.93, P < 0.01$ )呈负相关(图6)。

p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B与IL-6( $r=0.77, P < 0.05$ )、IL-1 $\beta$ ( $r=0.74, P < 0.05$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.82, P < 0.01$ )、瘦素( $r=0.92, P < 0.01$ )呈正相关,与脂联素( $r=-0.89, P < 0.01$ )呈负相关; p-p38MAPK/p38MAPK与IL-6( $r=0.95, P < 0.01$ )、IL-1 $\beta$ ( $r=0.90, P < 0.01$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.94, P < 0.01$ )、瘦素( $r=0.83, P < 0.01$ )呈正相关,与脂联素( $r=-0.80, P < 0.01$ )呈负相关; p-JNK/JNK与IL-6( $r=0.80, P < 0.01$ )、IL-1 $\beta$ ( $r=0.78, P < 0.05$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.95, P < 0.01$ )、瘦素( $r=0.98, P < 0.01$ )呈正相关,与脂联素( $r=-0.98, P < 0.01$ )呈负相关; p-IkBa/

IkBa与IL-6( $r=0.79, P < 0.05$ )、IL-1 $\beta$ ( $r=0.82, P < 0.01$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.95, P < 0.01$ )、瘦素( $r=0.88, P < 0.01$ )呈正相关,与脂联素( $r=-0.93, P < 0.01$ )呈负相关; p-AKT/AKT与p-IkBa/IkBa( $r=-0.89, P < 0.01$ )、p-JNK/JNK( $r=-0.95, P < 0.01$ )、p-p38MAPK/p38MAPK( $r=-0.90, P < 0.01$ )和p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B( $r=-0.91, P < 0.01$ )呈负相关(图6)。

### 3 讨论

脂肪组织是人体重要的组织结构之一,参与机体能量代谢和系统炎症反应等过程,其分泌的细胞因子和活性多肽可通过多种形式作用于其他组织器官或自身(Tam et al., 2020)。在增龄过程中,脂肪重新分布,肾周脂肪垫作为内脏脂肪的重要组成部分,其促炎性细胞因子分泌比皮下脂肪更为显著(Li et al., 2018)。衰老相关的脂肪组织异位分布、结构和功能改变可诱导机体异常和疾病(Camell et al., 2019)。研究发现,衰老脂肪细胞SASP的分泌明显增加,且表征脂肪细胞老化的 $\beta$ -半乳糖苷酶活性增加、p53和p16<sup>INK4a</sup>蛋白表达上调(Schafer et al., 2016)。

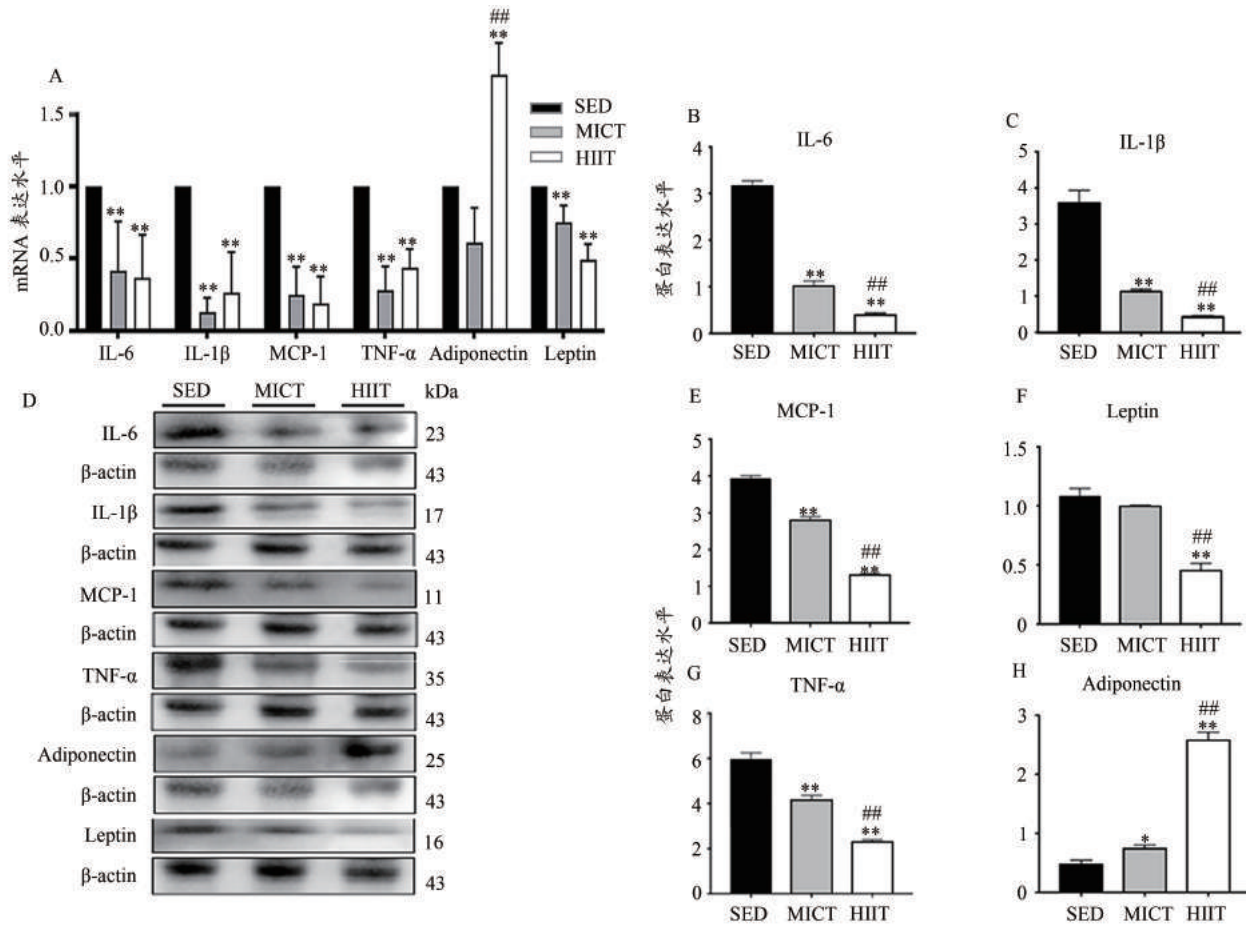


图3 脂肪组织炎症因子蛋白和mRNA表达改变

Figure 3. Adipose Tissue Inflammation Markers Protein and Gene Expression

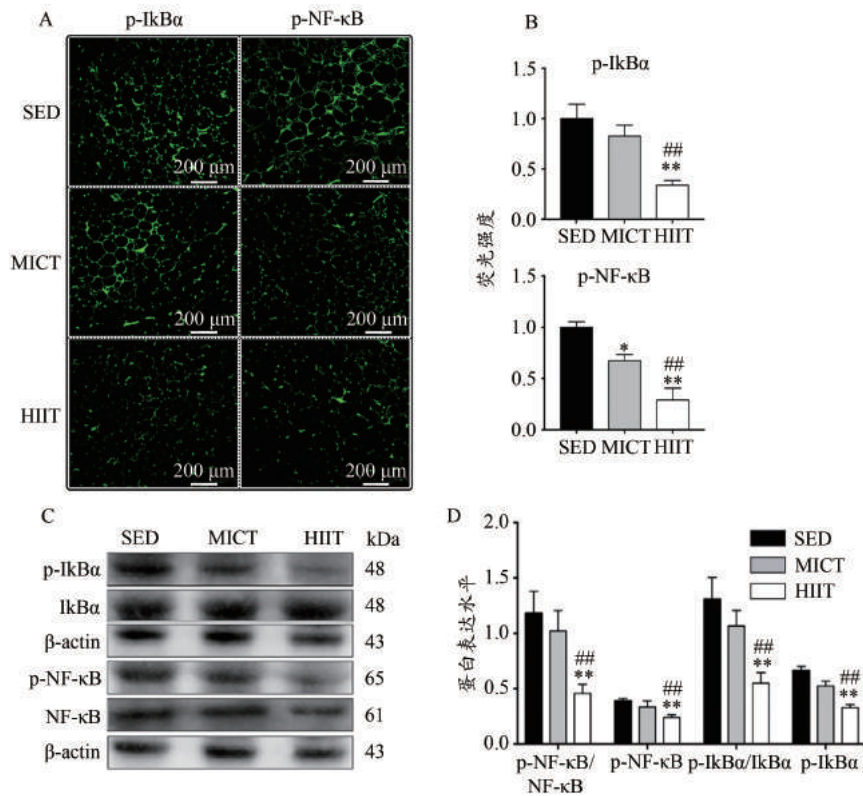


图4 NF-κB通路标示物表达的改变

Figure 4. Changes NF-κB in Signaling Expression



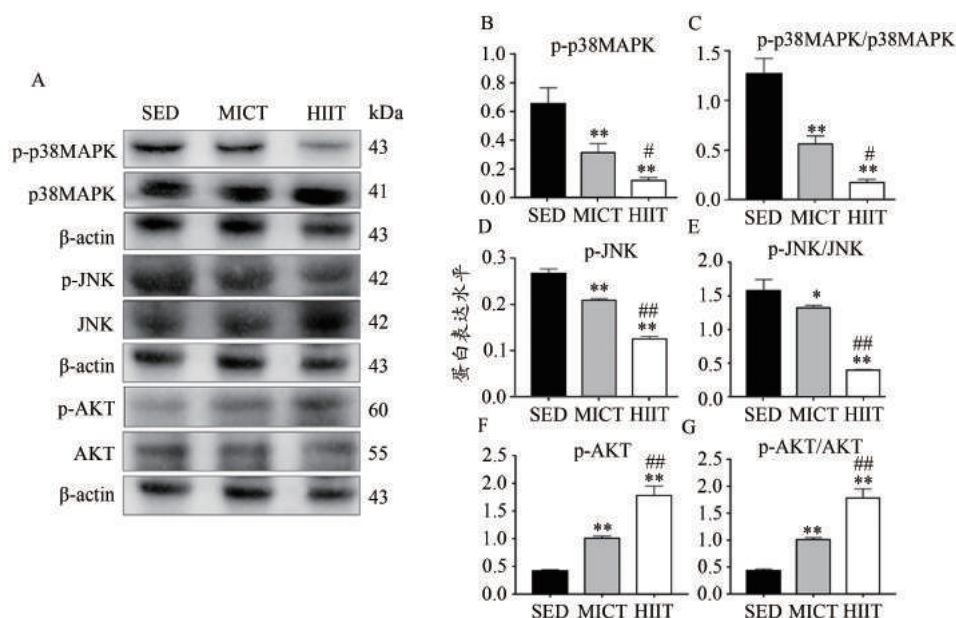


图5 p38MAPK、JNK和AKT信号的变化  
Figure 5. Changes in the JNK, p38MAPK, and AKT

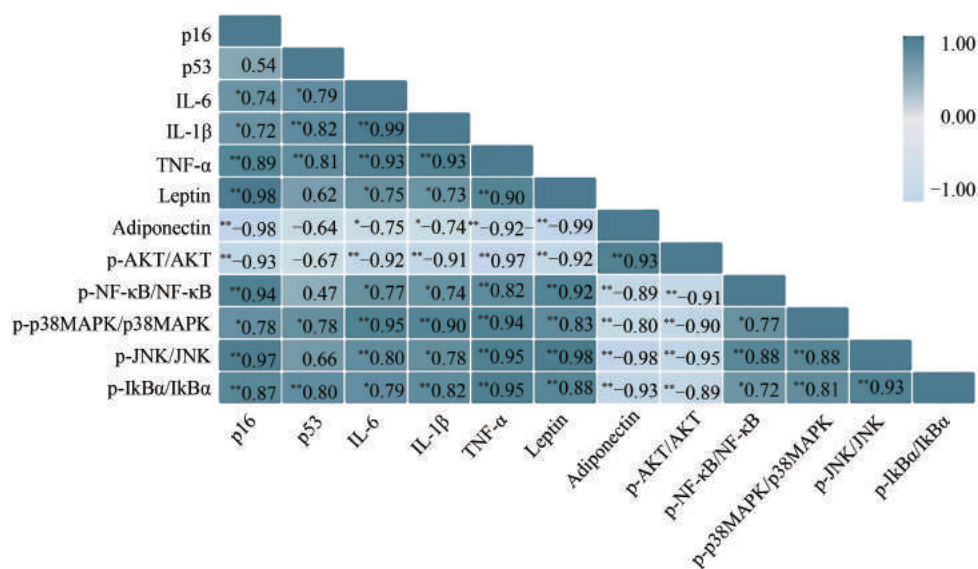


图6 各参数之间 Pearson 相关性分析热图  
Figure 6. Heatmap Analysis of Pearson Correlation Among Parameters

注:各个参数 Pearson 相关系数  $r$  在热图方格中显示。

运动可减少高脂喂养肥胖大鼠和增龄大鼠脂肪组织中β-半乳糖苷酶染色的细胞阳性数目,同时抑制p53和p16<sup>INK4a</sup> mRNA和蛋白表达,延缓脂肪细胞的老化进程(Jang et al., 2016; Schafer et al., 2016)。Baker等(2008)研究发现,p16<sup>INK4a</sup>信号其诱导细胞老化的效应强于p53信号。本研究表明,相较于MICT组,HIIT对衰老脂肪细胞p16<sup>INK4a</sup> mRNA和蛋白表达的抑制作用更强(图1~图2);同时,HIIT组大鼠脂肪细胞β-半乳糖苷酶染色的细胞阳性数目明显低于MICT组。提示,HIIT延缓增龄导致脂肪细胞老化的作用优于传统MICT,该作用可能与p16<sup>INK4a</sup>信号下调有关。

在衰老进程中,机体逐步出现慢性低度系统性炎症反应(炎性衰老)(Chen et al., 2019)。白介素-1β(IL-1β)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)可诱导下游促炎因子分泌;白介素-10(IL-10)可对抗免疫细胞活化,减弱炎症反应(Baker et al., 2012)。脂肪细胞因子-脂联素抑制炎症因子表达,另一脂肪细胞因子-瘦素则具有促炎效应(Iikuni et al., 2008; Ouchi et al., 2007)。研究发现,HIIT可降低增龄大鼠血清炎症标志物和白介素-6(IL-6)/IL-10,并上调血清IL-10和脂联素含量(Sun et al., 2020)。本研究检测增龄大鼠在8个月HIIT干预后脂肪组织IL-6、IL-1β、TNF-α、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、瘦素和脂联素表达发生

改变。本研究显示,尽管2组运动方式均能抑制脂肪组织炎症因子 mRNA 和蛋白表达,但蛋白免疫印迹表明 HIIT 对上述炎症因子蛋白抑制效应强于 MICT 组(图3)。HIIT 抑制了脂肪组织瘦素 mRNA 和蛋白表达,也促进了脂联素 mRNA 和蛋白表达(图 3B)。结合相关性分析推测(图6),HIIT 可能通过促进脂联素的蛋白表达、抑制瘦素的蛋白表达来下调脂肪组织 SASP 的释放,且 HIIT 对 SASP 促炎因子蛋白表达的抑制作用优于 MICT,这可能与 HIIT 调控脂肪组织脂联素和瘦素介导的炎症信号有关。

有研究表明,有氧运动可通过抑制大鼠脂肪、骨骼肌、肝脏组织 NF-κB 通路来下调 IL-6 和 MCP-1 表达,延缓高脂饮食或年龄相关的机体细胞衰老(Luz et al., 2011; Medeiros et al., 2014)。本研究也证实,HIIT 能抑制衰老大鼠脂肪组织 NF-κB 通路活化(图4、图6),可推测 HIIT 抑制衰老脂肪组织 SASP 中的炎症因子表达可能与 NF-κB 信号通路下调有关(图3、图6)。但与高脂饮食诱导肥胖大鼠的脂肪组织不同,本研究在增龄大鼠脂肪组织中并未发现 MICT 能抑制脂肪细胞 NF-κB 通路(图4)。由此推测,在本实验模型中,MICT 可能并非通过抑制 NF-κB 通路来下调衰老脂肪组织 SASP 的炎症因子分泌。

MAPKs 通路主要包括 JNK、p38MAPK 及细胞外信号调节蛋白激酶介导的信号通路,介导细胞多个生理过程(许纲等,2004)。已有研究证实,高脂饮食能上调大鼠内脏脂肪 JNK 磷酸化水平,JNK 和 p38MAPK 通路的活化进

一步激活 IκBα 磷酸化,促使 NF-κB 核移位,从而加速下游促炎因子的表达和脂肪细胞老化(Abbasnejad et al., 2019; Medeiros et al., 2014)。Alspach 等(2014)通过下调 p38MAPK 降低 NF-κB 磷酸化水平,进而抑制衰老成纤维细胞 SASP 分泌。Wang 等(2017)研究发现,HIIT 和 MICT 均可降低肥胖大鼠脂肪组织 JNK 磷酸化,抑制脂肪组织 TNF-α 和 IL-1β 蛋白表达。本研究显示,与 MICT 相比,HIIT 对衰老脂肪组织 JNK 和 p38MAPK 信号通路的抑制效应更为明显(图5)。可推测,HIIT 可能通过抑制衰老脂肪组织 JNK 和 p38MAPK 信号通路来下调 NF-κB 通路,进而下调其下游炎症因子的表达(图3~图5)。

有研究表明,通过激活 AKT 通路能抑制 JNK 通路,阻止 NF-κB 核移位,进而抑制衰老脂肪组织 SASP 的释放(Cerezo et al., 2017; Kumar et al., 2019)。但也有研究报道,肥胖老年大鼠脂肪组织 AKT 磷酸化水平降低(Caperuto et al., 2006)。有氧运动能上调衰老脂肪组织 AKT 的磷酸化水平和 p-AKT/AKT,并降低 NF-κB 活性(Kang et al., 2016; Touati et al., 2011)。本研究发现,与图5中显示的 p38MAPK 和 JNK 通路的变化趋势相反,HIIT 通过上调衰老脂肪组织 p-AKT 表达水平和 p-AKT/AKT 来激活 AKT 信号通路,且 HIIT 对 AKT 通路的激活效应强于 MICT 组。推测,HIIT 可能通过激活 AKT 通路来拮抗 p38MAPK 和 JNK 通路(图6),从而抑制 NF-κB 通路介导的炎症因子转录过程。图7显示 HIIT 与 MICT 抑制衰老脂肪组织 SASP 的可能机制。

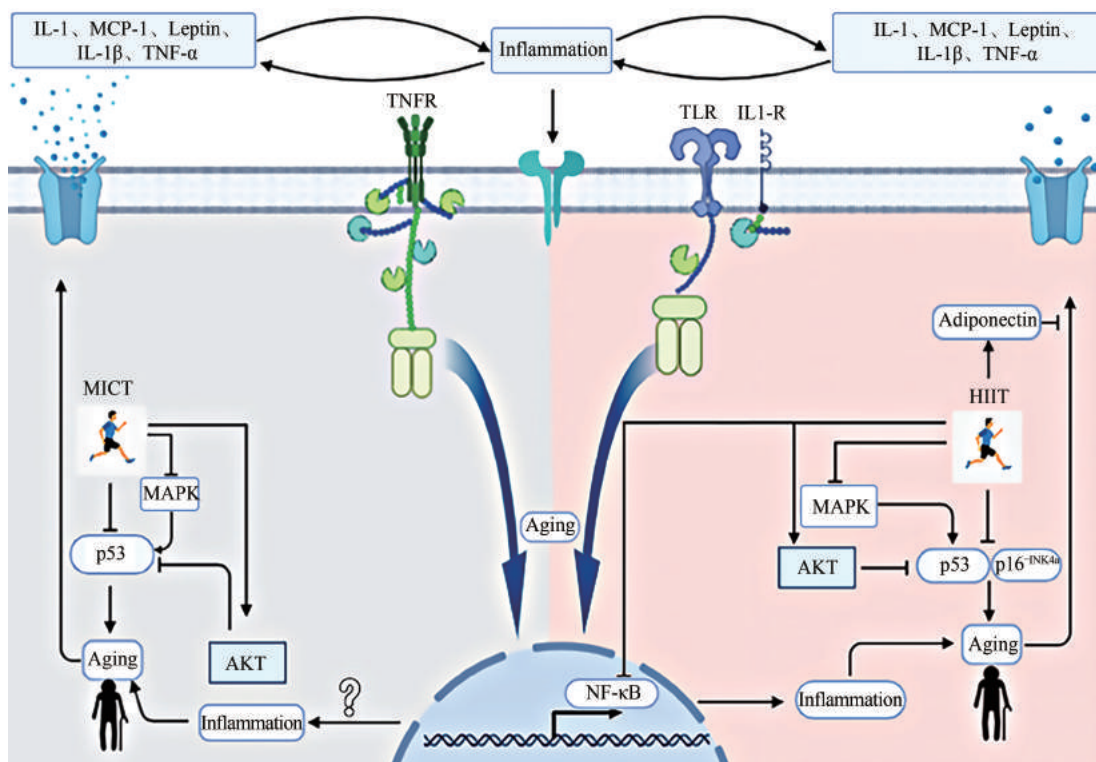


图7 HIIT与MICT抑制脂肪组织衰老相关分泌表型可能机制

Figure 7. Possible Mechanism of HIIT and MICT Inhibiting SASP in Aging Adipose Tissue



#### 4 结论

相比中等强度持续训练,高强度间歇训练能够更显著地抑制内脏脂肪细胞衰老相关分泌表型的分泌,该过程可能与脂肪组织 p38MAPK、JNK 和 NF- $\kappa$ B 通路的抑制和 AKT 通路的激活有关。

#### 参考文献:

- 郭慧宁,凌霜,刘俊,等,2016.衰老相关分泌表型的研究进展[J].中国药理学通报,32(11):1505-1509.
- 刘阳,梅佳顺,何玉秀,2018.高强度间歇训练通过不同部位HSL磷酸化差异性激活减少内脏脂肪积累的机制研究[J].体育科学,38(9):56-64.
- 孙磊,李方晖,2018.长期高强度间歇训练对增龄大鼠骨骼肌脂联素/AMPK信号途径和细胞自噬的影响[J].体育科学,38(11):50-59.
- 许纲,丁树哲,2004.骨骼肌丝裂原活化蛋白激酶信号级联与运动[J].中国运动医学杂志,(5):577-583.
- 杨连伟,2019.左卡尼汀改善大鼠脂肪组织衰老相关分泌表型及机制的研究[D].济南:山东大学.
- 殷双丽,孙丽,李悦,2018.脂肪组织衰老机制及治疗研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,32(8):829-832.
- ABBASNEJAD Z, NASSERI B, ZARDOOZ H, et al., 2019. Time-course study of high fat diet induced alterations in spatial memory, hippocampal JNK, P38, ERK and AKT activity [J]. *Metab Brain Dis*, 34(2):659-673.
- ALSPACH E, FLANAGAN K C, LUO X, et al., 2014. p38MAPK plays a crucial role in stromal-mediated tumorigenesis [J]. *Cancer Discov*, 4(6):716-729.
- BAKER D J, JIN F, DEURSEN J M V, 2008. The yin and yang of the Cdkn2a locus in senescence and aging [J]. *Cell Cycle*, 7(18):2795-2802.
- BAKER R G, HAYDEN M S, GHOSH S, 2012. NF- $\kappa$ B, inflammation and metabolic disease [J]. *Cell Metab*, 13(1):11-22.
- CAMELL C D, GÜNTHER P, LEE A, et al., 2019. Aging induces an Nlrp3 inflammasome-dependent expansion of adipose b cells that impairs metabolic homeostasis [J]. *Cell Metab*, 30(6):1024-1039.
- CAPERUTO L C, ANHE G F, AMANSO A M, et al., 2006. Distinct regulation of irs proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats [J]. *Endocrine*, 29(3):391-398.
- COPPÉ J P, DESPREZ P Y, KRTOLICA A, et al., 2010. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression [J]. *Annu Rev Pathol*, 5:99-118.
- CEREZO D, RUIZ-ALCARAZ A J, LENCINA-GUARDIOLA M, et al., 2017. Attenuated JNK signaling in multidrug-resistant leukemic cells. Dual role of MAPK in cell survival [J]. *Cell Signal*, 30:162-170.
- CHEN Q, CAI J, LI X, et al., 2019. Progranulin promotes regeneration of inflammatory periodontal bone defect in rats via anti-inflammation, osteoclastogenic inhibition, and osteogenic promotion [J]. *Inflammation*, 42(1):221-234.
- HEISKANEN M A, LESKINEN T, HEINONEN I H A, et al., 2016. Right ventricular metabolic adaptations to high-intensity interval and moderate-intensity continuous training in healthy middle-aged men [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 311(3):H667-675.
- IHKUNI N, LAM Q L K, LU L, et al., 2008. Leptin and inflammation [J]. *Curr Immunol Rev*, 4(2):70-79.
- JAIS A, BRÜNING J C, 2017. Hypothalamic inflammation in obesity

- and metabolic disease [J]. *J Clin Invest*, 127(1):24-32.
- JANG Y, KWON I, COSIO-LIMA L, et al., 2016. Endurance exercise prevents metabolic distress-induced senescence in the hippocampus [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 51(10):2012-2024.
- KAMINSKA B, 2005. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy: From molecular mechanisms to therapeutic benefits [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1754(1-2):253-262.
- KANG E B, KOO J H, JANG Y C, et al., 2016. Neuroprotective effects of endurance exercise against high-fat diet-induced hippocampal neuroinflammation [J]. *J Neuroendocrinol*, 28(5):10.1111.
- KERSHAW E E, FLIER J S, 2004. Adipose tissue as an endocrine organ [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6):2548-56.
- KUMAR R, SHARMA A, KUMARI A, et al., 2019. Epigallocatechin gallate suppresses premature senescence of preadipocytes by inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway and induces senescent cell death by regulation of Bax/Bcl-2 pathway [J]. *Biogerontology*, 20:171-189.
- LUZ G D, FREDERICO M J S, SILVA S D, et al., 2011. Endurance exercise training ameliorates insulinresistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats [J]. *Eur J Appl Physiol*, 111:2015-2023.
- LI F H, SUN L, ZHU M, et al., 2018. Beneficial alterations in body composition, physical performance, oxidative stress, inflammatory markers, and adipocytokines induced by long-term high-intensity interval training in an aged rat model [J]. *Exp Gerontol*, 113:150-162.
- MEDEIROS M C, FRASNELLI S C T, BASTOS A D S, et al., 2014. Modulation of cell proliferation, survival and gene expression by RAGE and TLR signaling in cells of the innate and adaptive immune response: Role of p38 MAPK and NF-KB [J]. *J Appl Oral Sci*, 22(3):185-193.
- OUCHI N, WALSH K, 2007. Adiponectin as an anti-inflammatory factor [J]. *Clin Chim Acta*, 380(1-2):24-30.
- ROBINSON M M, DASARI S, KONOPKA A R, et al., 2017. Enhanced protein translation underlies improved metabolic and physical adaptations to different exercise training modes in young and old humans [J]. *Cell Metab*, 25(3):581-592.
- SALTIEL A R, OLEFSKY J M, 2017. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease [J]. *J Clin Invest*, 127(1):1-4.
- SCHAFFER M J, WHITE T A, EVANS G, et al., 2016. Exercise prevents diet-induced cellular senescence in adipose tissue [J]. *Diabetes*, 65(6):1606-1615.
- SUN L, LI F H, LI T, et al., 2020. Effects of high-intensity interval training on adipose tissue lipolysis, inflammation, and metabolomics in aged rats [J]. *Pflugers Arch*, 472(2):245-258.
- TAM B T, MORAIS J A, SANTOSA S, 2020. Obesity and ageing: Two sides of the same coin [J]. *Obes Rev*, 21(4):e12991.
- TOUATI S, MEZIRI F, DEVAUX S, et al., 2011. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 43(3):398-407.
- WANG N, LIU Y, MA Y, et al., 2017. High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice [J]. *Life Sci*, 191:122-131.
- YANG L W, SONG M, LI Y L, et al., 2019. L-Carnitine inhibits the senescence-associated secretory phenotype of aging adipose tissue by JNK/p53 Pathway [J]. *Biogerontology*, 20(2):203-211.
- ZHU P, ZHANG C, GAO Y, et al., 2019. The transcription factor Slug represses p16-INK4a and regulates murine muscle stem cell aging [J]. *Nat Commun*, 10(1):2568.
- (收稿日期:2020-10-15; 修订日期:2022-07-22; 编辑:尹航)