中国体育科技
2023年（第59卷）第2期
CHINA SPORT SCIENCE AND TECHNOLOGY
Vol.59, No.2, 25-34, 2023

文章编号：1002-9826（2023）02-0025-10
DOI：10. 16470/j. csst. 2021126

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[1]，李方晖[1,2*]，吴大帅[1]，谢　天[1]，王　静[1]，乔一波[1]

MA Song[1]，LI Fanghui[1,2*]，WU Dashuai[1]，XIE Tian[1]，WANG Jing[1]，QIAO Yibo[1]

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$p16^{-INK4a}$、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（IkBα）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$p16^{-INK4a}$、p-NF-κB和p-lkBα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、$p16^{-INK4a}$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-IkBα、p-JNK、p-NF-κB、p-p38MAPK、p-IkBα/p-IkBα、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$p16^{-INK4a}$（$r=0.94$，$P<0.01$）、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-IkBα/IkBα（$r=-0.89$，$P<0.01$）、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 $p16^{-INK4a}$, 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, IkBα, 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 $p16^{INK4a}$, p-NF-κB, and p-IkBα were observed by immunofluorescence. Results: Compared with the SED and MICT groups, the number of β-galactosidase staining positive adipocytes, and the protein and mRNA expression of IL-6, IL-1β, leptin, TNF-α, and $p16^{INK4a}$ 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-IkBα, p-JNK, p-NF-κB, p-p38MAPK, p-IkBα to p-IkBα ratio, p-JNK to JNK ratio, p-NF-κB to NF-κB 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-κB to NF-κB ratio was positively correlated with $p16^{INK4a}$ ($r=0.94$, $P<0.01$), IL-6 ($r=0.77$, $P<0.05$), IL-1β ($r=0.74$, $P<0.05$), TNF-α ($r=0.82$, $P<0.01$), and leptin ($r=0.92$, $P<0.01$), and p-AKT to AKT ratio was negatively correlated with p-IkBα to IkBα 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-κB to NF-κB 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-κB, 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性因子、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经之一（Yang et al.，2019）。

SASP的分泌过程依赖于核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）通路的活化，通过调控炎性因子基因转录过程，可以促进NF-κB表达（杨连伟，2019）。在衰老脂肪细胞中，IκB和NF-κB的磷酸化水平增加，导致NF-κB向核内转移，促进炎性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-κB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（Jaiset 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-κB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（moderate-intensity continuous training，MICT）后增龄大鼠脂肪组织炎性因子、衰老相关蛋白及p38MAPK、JNK、NF-κB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 ℃～23 ℃，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 ℃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（opti-mum cutting temperature compound）包埋后，于冷冻切片机切片（切片厚度为5 μm）并粘于载玻片上；使用β-半乳糖苷酶染色试剂盒（#9860，美国Cell Signaling公司）固定10 min，37 ℃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。

$p16^{-INK4a}$、p-NF-κB和p-lkBα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 μm。脱蜡前，将切片置于60 ℃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 μL（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 ul，4 ℃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 ℃孵育30 min后清洗。封片：滴加0.1 ug/mL DAPI（南京碧云天生物技术有限公司）染液后封片。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$2^{-\Delta\Delta Ct}$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序列表

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

名称	上游引物	下游引物
IL-1β基因	ACAGCAGCATCTCGACAAGAGC	CCACGGGCAAGACATAGGTAGC
IL-6基因	CGCAAGAGACTTCCAGCCAG	ACTGGTCTGTTGTGGGTGGT
瘦素基因	TGACCTGGAGAACCTGCGAGAC	TGTGGAGTAGAGCGAGGCTTCC
$p16^{-INK4a}$基因	TTCACCAAACGCCCCGAACAC	CAGGAGAGCTGCCACTTTGACG
p53基因	TGGGACGGGACAGCTTTGAGG	CTGGTGGGCAGTGCTCTCTTTG
TNF-α基因	GTGTCTGTGCCTCAGCCTCTTC	CCTCCTTGTTGGGACCGATC
MCP-1基因	CACCTGCTGCTACTCATTCACTG	CTTCTTTGGGACACCTGCTGCTG
脂联素基因	GAGACGCAGGTGTTCTTGGT	GGAACATTGGGGACAGTGAC
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 μg，加入500 μL RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂各10 μL，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：$p16^{-INK4a}$（23797R，Bioss公司）、p53（AF0879，Affinity公司）、IL-1β（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-κB（5662R，Bioss公司）、NF-κB（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-lkBα（3249R，Bioss公司）、lkBα（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，β-actin为内参蛋白。

相对表达量为目的蛋白灰度/β-actin灰度。

1.7　统计分析

数据结果用平均值±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β-半乳糖苷酶的影响

各组大鼠脂肪细胞β-半乳糖苷酶含量变化显示：脂肪细胞β-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β-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β-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β-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）。

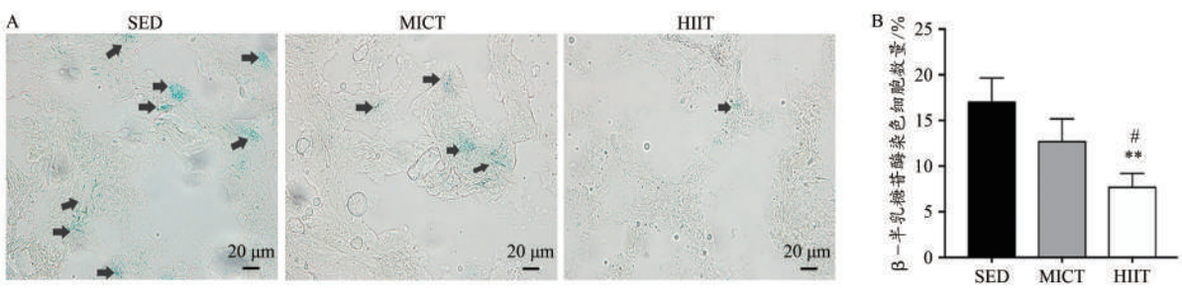

图1　脂肪组织β-半乳糖苷酶表达水平

Figure 1.　β-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β-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$p16^{INK4a}$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$p16^{INK4a}$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$p16^{INK4a}$ mRNA表达显著升高（$P<0.05$）；与SED和MICT组比较，HIIT组$p16^{INK4a}$ 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$p16^{INK4a}$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性因子表达的影响

RT-qPCR结果（图3A）表明，与SED组比较，HIIT和MICT组的IL-6、IL-1β、MCP-1、TNF-α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-1β、MCP-1和TNF-α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（$P<0.01$）。

2.4　HIIT和MICT对脂肪组织NF-κB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-IkBα蛋白显色较弱；与SED组相比，HIIT和MICT组p-NF-κB蛋白荧光显色较弱。与MICT和SED组比较（图4B），HIIT组p-IkBα、p-NF-κB蛋白荧光强度极显著降低（$P<0.01$）；与SED组比较，MICT组p-NF-κB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-κB/NF-κB、p-NF-κB、p-IkBα/IkBα、p-IkBα极显著降低（$P<0.01$）；与MICT组比较，HIIT组p-NF-κB/NF-κB、p-IkBα/IkBα、p-IkBα极显著降低（$P<0.01$），p-NF-κB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（$P<0.01$）；与SED组比较，MICT组p-AKT蛋白表达、p-AKT/AKT极显著升高（$P<0.01$）。

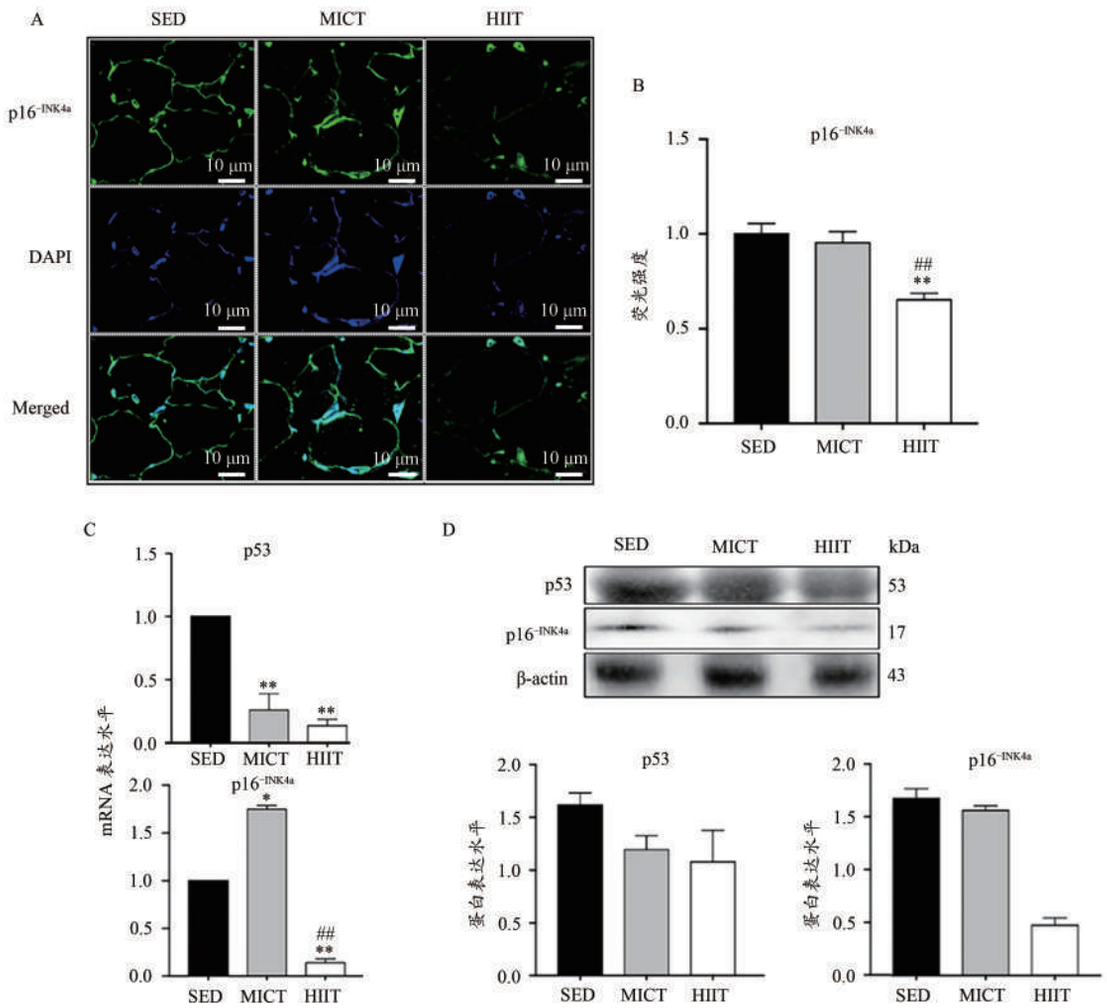

图2　脂肪组织衰老相关标示物表达

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。

2.6　相关性分析

脂肪组织p16^{-INK4a}与IL-6（r=0.74，$P<0.05$）、IL-1β（r=0.72，$P<0.05$）、TNF-α（r=0.89，$P<0.01$）、瘦素（r=0.98，$P<0.01$）、p-NF-κB/NF-κB（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-IkBα/IkBα（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-κB/NF-κB与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，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-1β（r=0.90，$P<0.01$）、TNF-α（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-1β（r=0.78，$P<0.05$）、TNF-α（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-IkBα/IkBα与IL-6（r=0.79，$P<0.05$）、IL-1β（r=0.82，$P<0.01$）、TNF-α（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-IkBα/IkBα（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（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性反应等过程，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β-半乳糖苷酶活性增加、p53和p16^{-INK4a}蛋白表达上调（Schafer et al.，2016）。

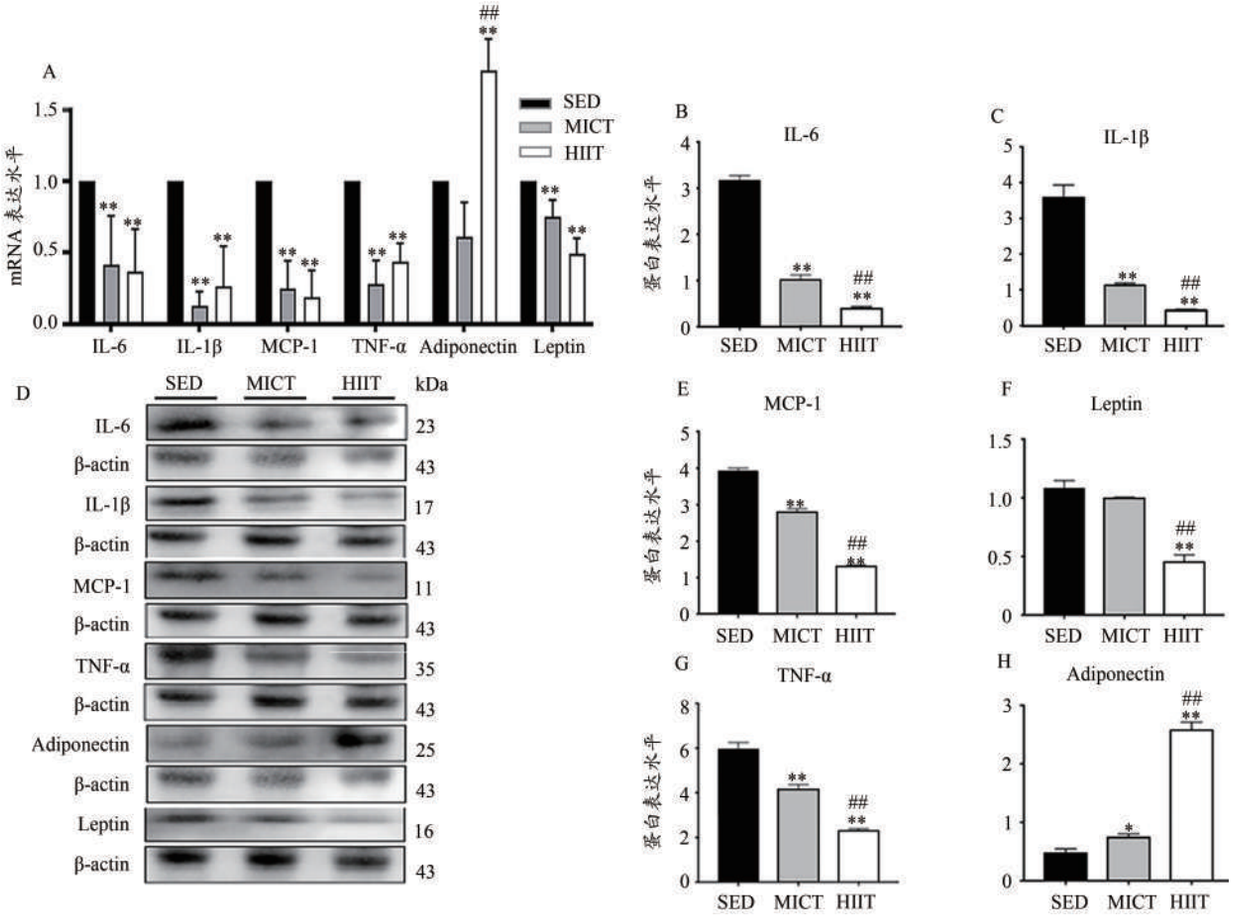

图3　脂肪组织炎性因子蛋白和mRNA表达改变

Figure 3.　Adipose Tissue Inflammation Makers Protein and Gene Expression

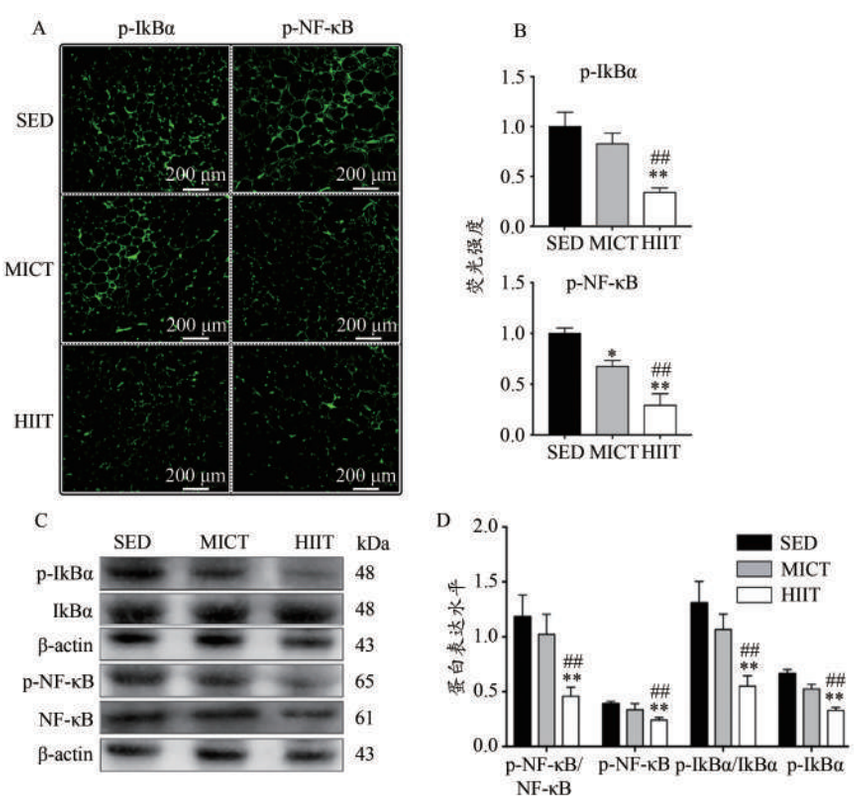

图4　NF-κB通路标示物表达的改变

Figure 4.　Changes NF-κB in Signaling Expression

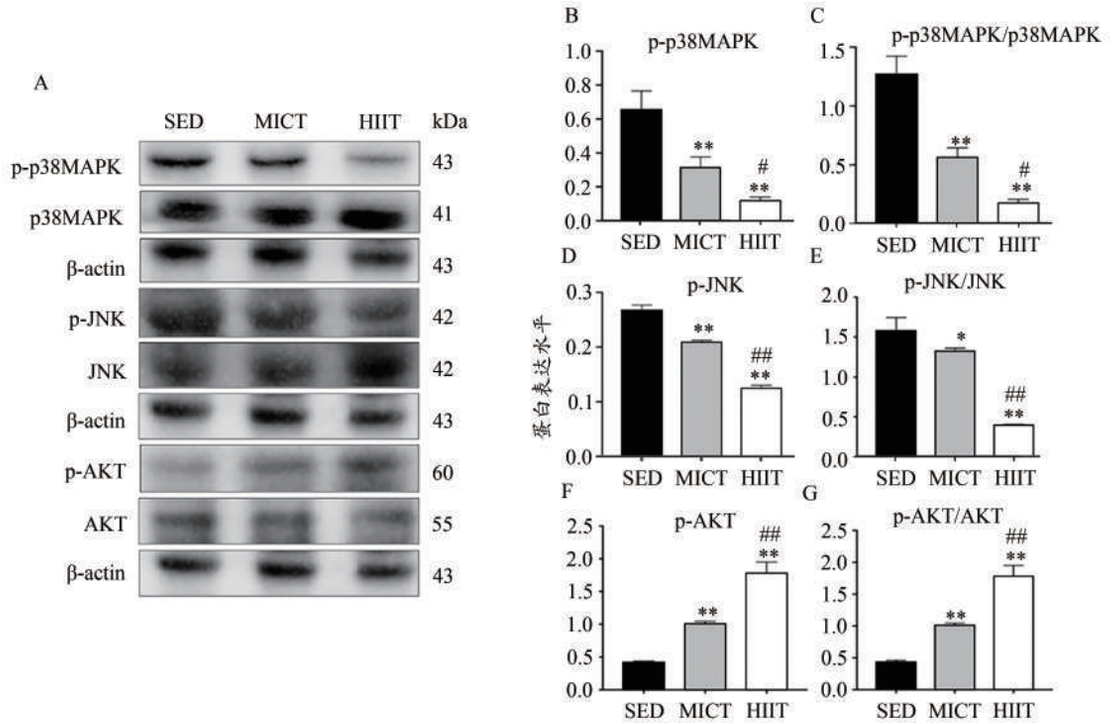

图5　p38MAPK、JNK和AKT信号的改变

Figure 5.　Changes in the JNK、p38MAPK，and AKT

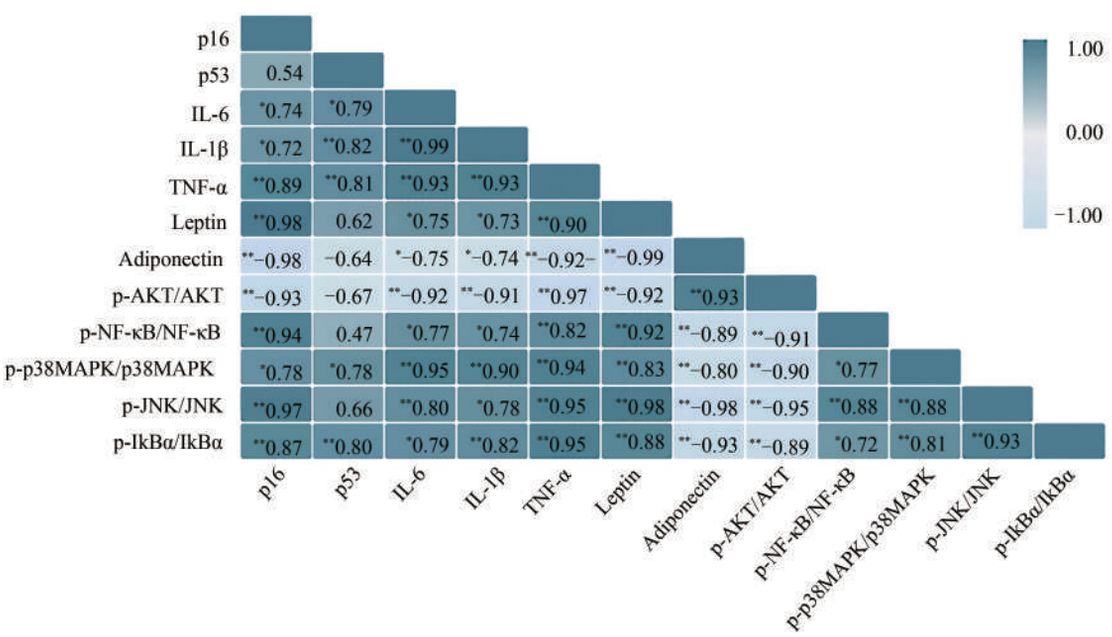

图6　各参数之间Pearson相关性分析热图

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$p16^{INK4a}$ 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，$p16^{INK4a}$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$p16^{INK4a}$ 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$p16^{INK4a}$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-脂联素抑制炎性因子表达，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性标志物和白介素-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性因子mRNA和蛋白表达，但蛋白免疫印迹表明HIIT对上述炎性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性信号有关（图7）。

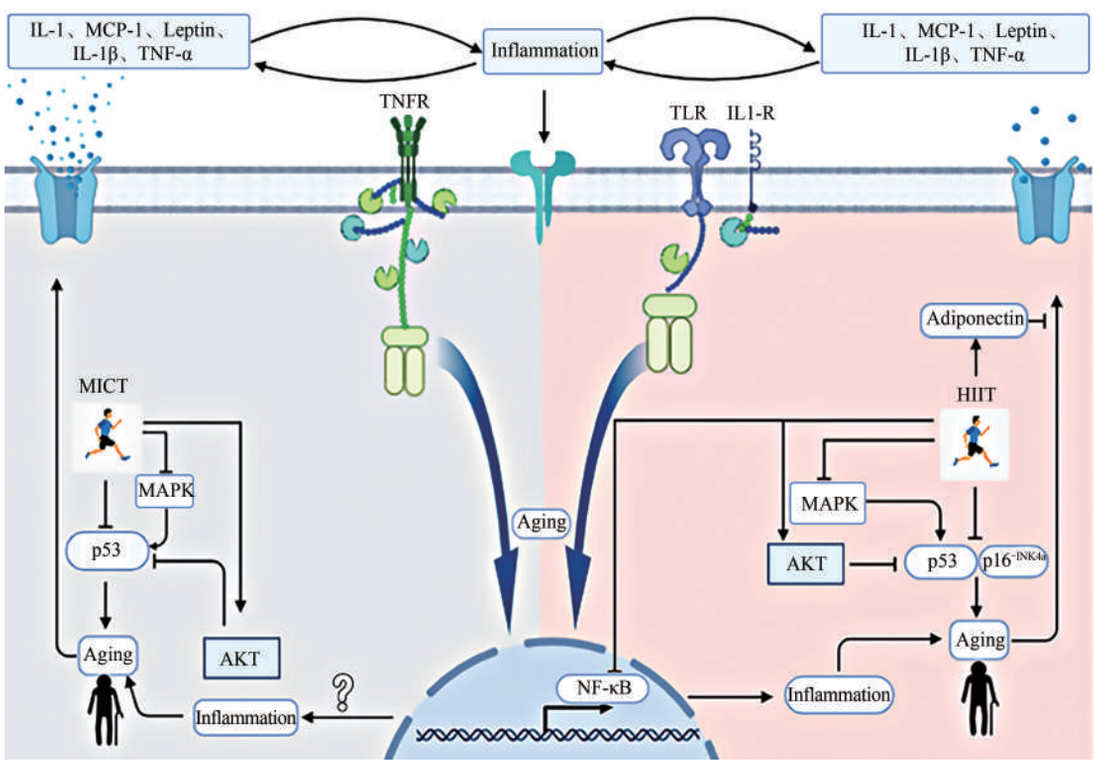

图7　HIIT与MICT抑制脂肪组织衰老相关分泌表型可能机制

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

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中的炎性因子表达可能与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的炎性因子分泌。

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IkBα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，进而下调其下游炎性因子的表达（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通路介导的炎性因子转录过程。

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-κB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-κB，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.

IIKUNI 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 hippo campal 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.

SCHAFER 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：2023-01-12； 编辑：尹航）

欢迎订阅2023年《中国体育科技》

《中国体育科技》(月刊)96页/期，国际流行大16开，胶版印刷，国内定价25.00元/期，300.00元/套。

订阅办法：

1. 通过国家体育总局体育科学研究所科技书刊部订购，汇款方式：

(1)邮局汇款：100061 北京市东城区体育馆路11号国家体育总局体育科学研究所科技书刊部 刘婵收(请在汇款单“附言”中注明订阅杂志的名称、期号和订购数量)

(2)银行汇款：户名：国家体育总局体育科学研究所，开户行：中国工商银行北京体育馆路支行，账号：0200008109088090158(注明：订阅人姓名，订阅杂志的名称、期号和订购数量)

2. 各地邮局均可订阅：

《中国体育科技》(月刊)邮发代号：82-684

3. 联系电话：010-87182591 E-mail：bjb@ciss.cn