·基础研究·

有氧和抗阻运动对糖尿病脂肪肝大鼠肝脏内质网应激的影响*

李军汉[1] 高德润[1] 江玲玲[1] 付 玉[1] 李顺昌[1] 苏全生[1]

摘要

目的:对比两种不同运动方式——有氧运动和抗阻运动对2型糖尿病(T2D)脂肪肝大鼠肝脏内质网应激(ERS)及其介导的细胞凋亡的影响。

方法:雄性SD大鼠随机分为对照组(CON,n=10)、模型组(T2D,n=10)、有氧运动组(T2D+AE,n=10)和抗阻运动组(T2D+RE,n=10)。对照组予普通饲料喂养,其余组予高糖高脂饲料喂养。7周后,T2D组、T2D+AE组和T2D+RE组给予腹腔内小剂量链脲佐菌素(STZ)注射1周,诱导T2D模型。T2D模型造模成功后,T2D+AE和T2D+RE组分别给予有氧运动和抗阻运动干预,连续8周。有氧运动方式为跑台训练:先适应性训练3天,速度15m/min,训练时间20min;以后逐渐增加训练速度和时间,直至速度达到20m/min,持续时间至60 min,每天训练1次,每周训练6天。抗阻运动方式为递增负荷爬梯训练,爬梯长1.0 m,负重装置固定于大鼠尾部,初始负荷为体重的50%,之后不断增加负荷,每3天进行1次。各组在最后一次训练结束48h后取材。HE和油红O染色检测肝脏病理形态,Western Blot检测内质网应激及其介导凋亡蛋白表达变化。

结果:与CON组比较,T2D组肝细胞脂肪变性和脂滴数量显著增加($P<0.01$),T2D+AE和T2D+RE组肝细胞脂肪变性和脂滴数量介于CON组和T2D组之间($P<0.05$);与CON组比较,T2D组大鼠肝脏ERS标志物GRP78及凋亡蛋白CHOP、JNK、Caspase 12表达增加(均$P<0.05$)。与T2D组比较,T2D+AE和T2D+RE组GRP78及凋亡蛋白CHOP、JNK、Caspase 12表达下降(均$P<0.05$)。与T2D+RE组比较,T2D+AE组GRP78表达显著降低($P<0.05$)。

结论:肝脏内质网应激及其介导细胞凋亡参与2型糖尿病脂肪肝形成。有氧运动和抗阻运动均能有效改善糖尿病脂肪肝,其机制与有氧运动和抗阻运动能显著降低肝脏内质网应激及其介导的细胞凋亡有关。

关键词 有氧运动;抗阻运动;脂肪肝;糖尿病;内质网应激;凋亡

中图分类号:R493,R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-01-0023-09

Effects of aerobic and resistance exercise on hepatic endoplasmic reticulum stress in diabetic rats combined with fatty liver diseases/LI Junhan, GAO Derun, JIANG Lingling, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(1): 23—31

Abstract

Objective: To compare the effect of aerobic and resistance exercise on hepatic endoplasmic reticulum stress and apoptosis in diabetic rats combined with fatty liver diseases.

Method: Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups: control group (CON), Type 2 diabetes group (T2D), aerobic exercise group (T2D+AE) and resistant exercise group (T2D+RE). Rats in CON group were fed with normal chow diet and the other rats were fed with high fat and high sucrose diet for 7 weeks. After that, rats feeding with high fat and fructose were injected with a single dose of streptozotocin to induce

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.01.005

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(31900846);成都体育学院运动医学与健康研究所/郑怀贤骨伤研究所项目(CX17B07);四川省科技厅应用基础研究项目(2019YJ0544)

1 成都体育学院运动医学与健康学院,四川省成都市,610041

第一作者简介:李军汉,女,副教授; 收稿日期:2019-08-15

Type 2 Diabetes (T2D) for one week. The rats in T2D+AE group performed treadmill exercise. The speed increased from 15m/min to 20m/min, and the time increased from 20 min to 60 min for 8 weeks. Training were performed once a day, 6 days per week. The rats in T2D+RE group were allowed to climb a 1.0 m vertical ladder with loads attached to their tails and the loads were progressively increased from 50% body weight. Sessions were performed one time per three days for 8 weeks. The rats were sacrificed after 48 hours when finishing the last training session. Hematoxylin and eosin (HE) staining and Oil Red O staining was used to observe the morphology of liver. Western Blot was used to detect the protein expression of endoplasmic reticulum stress.

Result: Hepatic lipid droplet density was elevated following the induction of T2D, but was decreased following both types of exercise training. In addition, the protein contents of hepatic ER stress marker GRP78 and downstream apoptotic pathways (CHOP, JNK and Caspase 12) were upregulated in diabetic rats. Both types of exercise training effectively reduced these markers with greater reduction of GRP78 in T2D+AE group in comparison to T2D+RE group.

Conclusion: Hepatic ER stress response and ER stress-induced apoptotic pathways are activated in an animal model of T2D. Both aerobic and resistance exercise training are effective in reducing ER stress and ER stress-induced apoptosis, which may contribute to mitigating NAFLD in rats with T2D.

Author's address College of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu, Sichuan, 610041

Key word aerobic exercise; resistance exercise; fatty liver disease; diabetes; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)是指非酒精因素所致以肝脏脂肪变性为特征的临床综合征,其发病率在全球范围内日益增高,严重威胁人类健康。随着近年经济的快速发展,NAFLD已成为我国第二大肝脏疾病。2型糖尿病(type 2 diabetes,T2D)是NAFLD发生的危险因素[1]。糖尿病脂肪肝以糖尿病和肝脏结构功能异常并存为主要临床特征。由于糖尿病脂肪肝发病机制的复杂性,迄今为止,糖尿病脂肪肝仍没有十分可靠的治疗方案。目前糖尿病脂肪肝多以药物治疗为主,但药物疗法存在明显不良反应[2—3]。研究发现,运动可有效改善脂肪肝[4—6]。然而,运动治疗糖尿病脂肪肝的作用机制并不清楚。近年来,研究表明内质网应激介导了肥胖、T2D以及NAFLD等病变生理过程。研究报道[7—8],无论是NAFLD动物模型还是NAFLD患者,肝脏未折叠蛋白反应和内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)均显著增加,严重的ERS进一步诱导凋亡通路的激活。ERS及其介导的细胞凋亡在NAFLD的发生发展过程中起着重要作用[9]。然而,不同运动方式对糖尿病肝脏ERS及其介导的细胞凋亡的影响,目前少有文献报道。本研究采用7周高脂高糖喂养配合小剂量链脲佐菌素注射诱导2型糖尿病大鼠模型,并分别采用有氧或抗阻两种不同运动形式进行干预,探讨两种不同运动方式对糖尿病大鼠肝脏内质网应激及其介导的细胞凋亡的影响,以期为糖尿病脂肪肝的防治提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性6周龄Sprague-Dawley大鼠(SPF级)40只,体重160—180g,购于成都达硕实验动物有限公司,许可证编号:SCCD(川)2015—0001。SD大鼠在成都体育学院实验中心小动物房内分笼饲养,自由饮食饮水,室温18—22℃,相对湿度45%—55%,12h光照和12h熄灯模拟昼夜交替。

1.2 动物分组

所有大鼠适应性喂养3天后,按体重编号,随机分为对照组(CON),模型组(T2D),有氧运动组(T2D+AE)和抗阻运动组(T2D+RE),每组10只。对照组予普通饲料(25kJ/kg)喂养,其余组给予高脂高糖饲料(10%猪油,20%蔗糖、2%胆固醇、1%胆酸钠、67%基础饲料,41.4kJ/kg)喂养。此配方能量约40%来源于脂肪,44%来源于糖,16%来源于蛋白

质[10]。普通饲料和高脂高糖饲料均由成都达硕实验动物有限公司加工而成。喂养7周后,禁食12h,断尾取血并测空腹血糖。T2D、T2D+AE和T2D+RE组腹腔内注射新鲜配制的0.5% STZ,按照30mg/kg体重的剂量,每天注射一次。对照组腹腔注射等体积的柠檬酸钠缓冲液。注射1周后,尾部静脉取血测试非禁食血糖(NFBG),按2型糖尿病动物模型判断标准[11]:血糖高于16.7mmol/L者确定为糖尿病模型制作成功。30只糖尿病造模大鼠共成模24只,成模率80%。在参考以往文献报道的基础上[12],我们随机对糖尿病模型成功大鼠进行了肝脏病理检测,包括HE染色和油红O染色,发现糖尿病模型大鼠已具备非酒精性脂肪肝模型。实验第9周,T2D+AE组和T2D+RE组分别给予有氧运动和抗阻运动干预,直至第16周实验结束。

1.3 有氧运动方案

训练器械为小动物电动跑台。训练方案参考文献[13]改良而成,强度为大鼠中等有氧运动强度。大鼠先进行适应性训练,速度为10m/min,每天训练10min,连续适应性训练3天。正式训练第1周速度为15m/min,训练20min;然后逐渐增加强度1—2m/min,增加时间5—10min/d,直到达到最大速度20m/min,最大持续时间60min;整个训练过程跑台坡度均为0°;6天/周,共8周。所有实验大鼠没有出现不耐受情况。

1.4 抗阻运动方案

训练器械为自制小动物爬梯。爬梯1.0×0.18m,每级阶梯间隔2cm,85°。倾斜放置,顶部有一个小笼子供大鼠休息,负重装置固定于大鼠尾部。训练方案参考文献[14]进行。先将大鼠进行3天的适应性爬梯训练,初始负荷为大鼠体重的50%,然后每次递增负荷30g,直到大鼠完成8次爬梯训练或已无法完成整个爬梯高度。在刺激尾部的情况下连续3次仍不能完成爬梯训练则判定为失败。大鼠能够成功完成爬梯训练的最大负荷认为是该轮训练大鼠的最大负荷(1RM)。每周重新测试1RM。接下来的一轮训练先进行3次爬梯训练,负荷分别为前次最大负荷的50%,75%,90%和100%。如果大鼠能够完成这3次训练。在随后的爬梯训练中,每次递增负荷30g,直到大鼠完成8次爬梯训练或已无法完成整个爬梯高度,以确定新的最大负荷。抗阻训练每3天进行1次,共8周。

1.5 样本采集与处理

各组动物在最后一次训练结束48h后处死,处死前先禁食12h,用10%的水合氯醛(3.5ml/kg)溶液腹腔麻醉,新洁尔灭消毒皮肤,以腹部正中切口打开腹腔,腹主动脉取血。肉眼观察肝脏情况,迅速取出肝脏,置于4℃生理盐水中反复漂洗,以滤纸吸干水分后称肝湿重,计算肝指数,肝指数(%)=肝湿重/体重×100%。在肝左叶中部切取1cm×1cm×1cm,一部分放置于液氮中速冻,转入-80℃冰箱储存,用于Western Blot检测;取肝右叶一部分放入4%多聚甲醛固定,用于石蜡包埋和HE染色;另一部分固定包埋,用于冰冻切片和油红O染色。

1.6 肝脏病理形态检测

HE染色方法:肝组织甲醛固定后常规石蜡包埋,5mm厚连续切片,HE染色,光学显微镜下观察肝组织形态学改变。依据最新文献[15]对肝细胞脂肪变所占面积进行评分,其评分标准如下:含脂肪滴肝细胞散在、稀少,0分;含脂肪滴肝细胞≤1/4,1分;含脂肪滴肝细胞≤1/2,2分;含脂肪滴肝细胞≤3/4,3分;肝组织几乎被脂滴所代替,其面积>3/4,4分。

油红O染色方法:肝脏冰冻切片(5μm厚度)用于脂质染色。脂滴为红色,每张切片在200倍光镜显微镜下随机取5个视野,采用Image-Pro plus 6.0图像分析系统进行半定量分析,计算每个视野下红色脂滴光密度,每张切片5个视野下红色脂滴光密度相加后取平均值,用每组平均光密度表示红色脂滴的多少,单位以AIOD.μm^2表示。

1.7 血液生化指标测试

实验动物禁食12h后,尾部静脉取血用美国强生稳豪倍易型血糖仪和强生稳豪倍易型血糖试纸即刻读数测空腹血糖水平;以2g/kg浓度腹腔注射20%葡萄糖溶液,分别测定注射前及注射后30min、60min、120min时间点的血糖值,做出变化曲线并计算线下面积(area under the curve,AUC);放射免疫法测定血清胰岛素水平(FINS)。

胰岛素抵抗指数(HOMA-IRI)=空腹胰岛素水平(FINS)(IU/ml)×空腹血糖水平(FBG)(mmol/L)/22.5。

大鼠腹主动脉采血后,将装有1ml全血的

1.5ml EP管放入离心机中，1500r/min，4℃离心20min，收集上清，用全自动生化分析仪(ci16200)酶比色法测定甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白、高密度脂蛋白的含量。

1.8 Western Blot法测内质网应激相关蛋白表达

将50mg的冰冻肝组织置于匀浆器中，用组织裂解液裂解30min后，12000r/min，4℃离心30min，取上清，BCA法测定总蛋白含量。取组织匀浆采用10% SDS-PAGE电泳分离蛋白，4℃电转印至PVDF膜，5%脱脂奶粉封闭1h，洗膜3次，每次10min。分别用兔单抗GRP78（1∶1000，abcam公司）、兔单抗CHOP（1∶4000，abcam公司）、兔多抗Caspase12（1∶2000，abcam公司）、兔单抗JNK（1∶1000，abcam公司）和兔单抗β-actin（1∶1000，abcam公司）室温孵育1h后，4℃过夜，TBST洗膜3次，每次10min，分别加入相应的HRP结合的羊抗兔IgG（1∶2000，abcam公司）室温孵育1h，TBST洗膜3次，每次10min，加入ECL发光液，1min后于暗室内进行胶片曝光、显影、定影、晾干。β-actin作为内参，并用Image J图像分析软件进行分析，蛋白表达量用光密度比值（OD ratio）表示，蛋白表达量用“目的蛋白/β-actin”计算。

1.9 统计学分析

所有数据用SPSS统计软件22.0进行统计分析，测得数据用均数±标准差表示。各组间比较采用单因素方差分析。在方差齐性的情况下用LSD法进行后效检验，方差不齐的情况下用Tamhane法进行后效检验。以$P<0.05$认定具有显著性差异，$P<0.01$认定具有非常显著性差异。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏病理形态变化

HE染色结果显示（×200），见图1A：CON组所有大鼠肝细胞呈放射状排列，肝小叶结构清晰，细胞质内少量脂肪性变；T2D组所有大鼠肝细胞排列紊乱，体积较正常增加，肝窦扩张和淤血，肝细胞脂肪变性显著，胞浆内充满大量脂肪空泡；T2D+AE组和T2D+RE组肝细胞脂肪变性程度位于CON组和T2D组之间。肝细胞脂性变积分结果显示（见图1B）：与CON组比较，其余各组肝细胞脂肪变程度积分明显升高（$P<0.01$），与T2D组比较，T2D+AE组和T2D+RE组肝细胞脂肪变程度积分显著降低（$P<0.05$）。

油红O染色结果显示(×200)（图2A）：CON组肝细胞未见明显脂滴；T2D组肝细胞胞浆内橘红色脂滴数量增多，大小不一；T2D+AE组和T2D+RE组肝细胞胞浆内可见少量橘红色脂滴，脂滴数量在CON组和T2D组之间。油红O脂滴光密度值结果显示（图2B）：与CON组比较，其余各组油红O脂滴光密度值明显升高（$P<0.01$）；与T2D组比较，两运动干预组油红O脂滴光密度值降低（$P<0.05$）。

2.2 各组大鼠体重与肝指数变化

实验前后分别将大鼠称重，各组大鼠体重变化如下：与实验前比较，各组体重明显增加（见图3A）；实验结束时，T2D组较CON组体重显著下降，T2D+AE和T2D+RE组较T2D组体重增加，均具显著性差异（$P<0.05$）（图3B），提示有氧运动和抗阻运动能有效延缓糖尿病所致大鼠体重下降。两运动组组间比较无显著差异（$P>0.05$）。此外，肝湿重和肝指数结果显示（见图3C和D）：与CON组比较，T2D组肝湿重和肝指数增加（$P<0.05$）；与T2D组比较，T2D+AE组、T2D+RE组肝湿重和肝指数下降（$P<0.05$）；两运动组组间比较无显著性差异（$P>0.05$）。

2.3 各组大鼠血液生化指标变化

各组大鼠血液生化指标变化显示（表1），与CON组比较，T2D组TG、LDL、VLDL和CHOL含量，以及空腹血糖、胰岛素浓度、葡萄糖AUC和HOMA-IR均显著升高（$P<0.05$），提示本实验成功建立糖尿病模型。有氧运动和抗阻运动均显著降低空腹血糖和胰岛素浓度、血糖变化线下面积（AUC）和胰岛素抵抗指数（HOMA-IRI）（$P<0.05$）。此外，与T2D组相比，两运动组血清TG、LDL、VLDL、CHOL浓度均显著下降（$P<0.05$）。

2.4 各组大鼠内质网应激及其介导凋亡蛋白表达

各组大鼠内质网应激蛋白变化如下：与CON组比较，T2D组肝脏GRP78蛋白表达显著上调8倍（图4A，$P<0.05$），有氧运动和抗阻运动干预后，GRP78蛋白表达分别下调1倍和2倍（图4A，$P<0.05$）。有趣的是，与T2D+RE组相比，T2D+AE组GRP78蛋白含量下降幅度更大（图4A，$P<0.05$）。此外，与CON组相比，T2D组肝脏凋亡信号分子CHOP、JNK、Cas-

pase12蛋白表达明显升高(图4B—D,$P<0.05$)。经有氧运动和抗阻运动干预后,CHOP、JNK、Caspase12蛋白表达虽高于CON组,但较T2D组显著下降(图4B—D,$P<0.05$)。

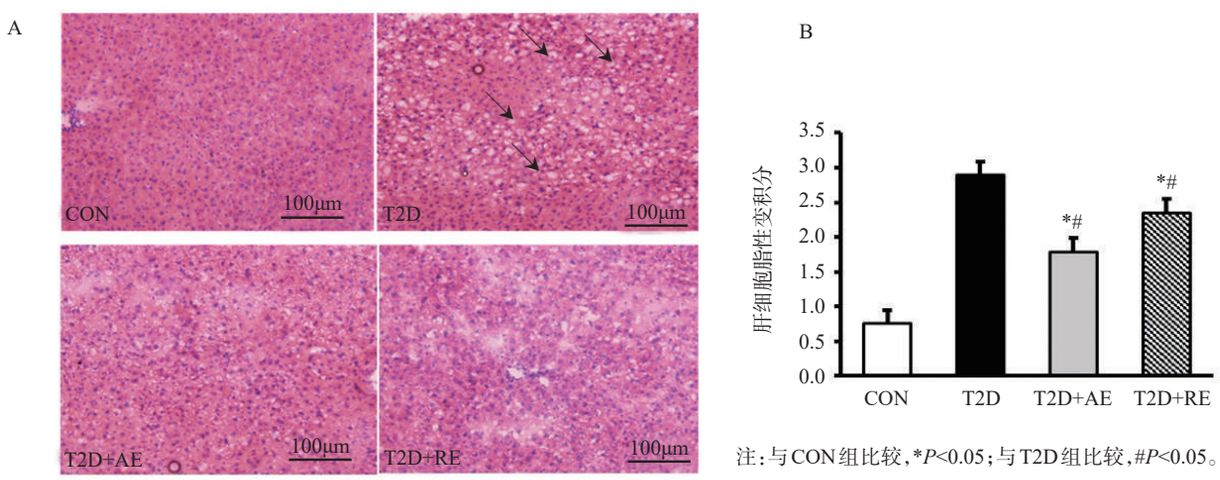
3 讨论

3.1 糖尿病与脂肪肝

糖尿病与脂肪肝存在密切的联系。2型糖尿病是脂肪肝发生的独立危险因素,2型糖尿病人群是脂肪肝的高发人群。NAFLD在2型糖尿病中的患病率显著增加[16]。临床研究[17]发现,50%—70%的糖尿病患者伴有脂肪肝。此外,40%—50%的脂肪肝患者伴有不同程度的糖耐量异常,脂肪肝增加糖尿病及其并发症的发生风险,脂肪肝患者6年内约20%可发展为糖尿病[18]。由此可见,糖尿病与脂肪肝相互影响,并形成恶性循环。糖尿病和脂肪肝两种常见疾病的共存往往会导致更严重的非酒精性脂肪性肝炎(NASH),并发展为肝硬化,最终导致肝功能衰竭[19]。

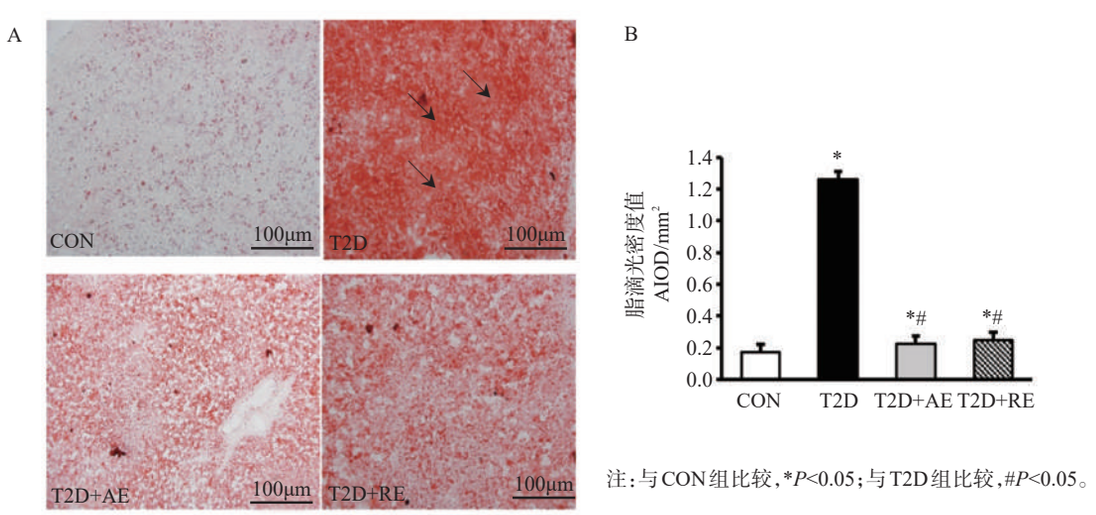
研究表明[20—21],长期高脂膳食联合低剂量STZ

图1 各组大鼠肝脏HE染色变化 (×200)



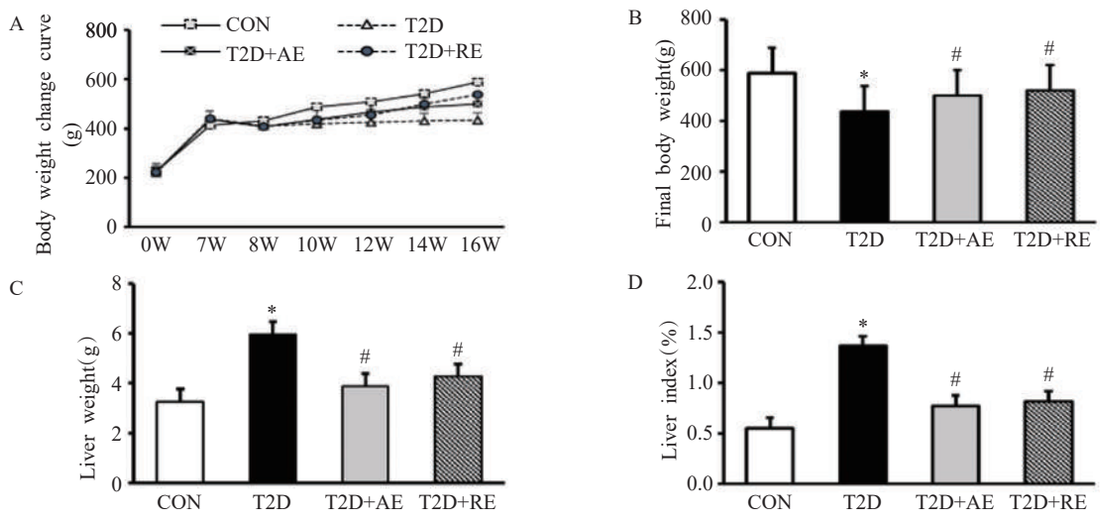
注:与CON组比较,*$P<0.05$;与T2D组比较,#$P<0.05$。

图2 各组大鼠肝脏油红O染色变化 (×200)



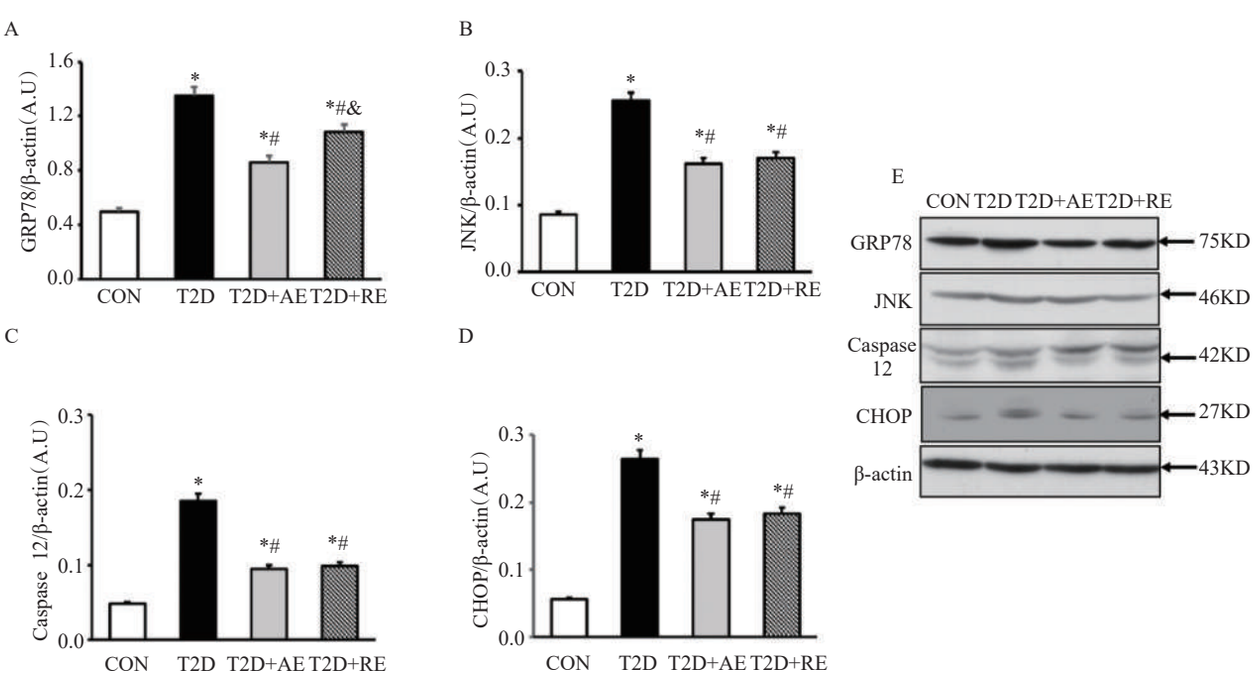
注:与CON组比较,*$P<0.05$;与T2D组比较,#$P<0.05$。

图3　各组大鼠体重和肝湿重变化



注：与CON组比较，*P<0.05；与T2D组比较，#P<0.05

图4　各组大鼠肝脏内质网应激及其介导凋亡蛋白表达变化



注：与CON组比较，*P<0.05；与T2D组比较，#P<0.05；与T2D+AE组比较，&P<0.05

注射液可诱导胰岛素抵抗，导致胰岛素分泌功能受损。本研究采用7周高脂膳食联合1周低剂量STZ(30mg/kg)注射诱导T2D模型。研究结果显示：与CON组比较，T2D组以及空腹血糖、胰岛素浓度、葡萄糖AUC和HOMA-IR均显著升高（P<0.05），提示本实验成功建立糖尿病模型；并且，T2D组TG、LDL、VLDL和CHOL含量、肝湿重、肝细胞肝脂肪变性和脂滴含量较CON组显著增加，提示当T2D合并NAFLD时，有更严重的糖、脂代谢紊乱、肝功能受损、肝脏脂肪变，存在着更显著的肝脏病变。这与

表1 各组大鼠血液生化变化 （$\bar{x}\pm s$，n=20）

组别	CON	T2D	T2D+AE	T2D+RE
TG(mmol/l)	0.44±0.19	7.88±0.09①	1.87±0.22①②	3.99±0.18①②
CHOL(mmol/l)	1.87±0.55	11.13±3.24①	2.50±0.78②	4.60±1.49②
HDL(mmol/l)	1.36±0.29	1.27±0.84	1.25±0.23	1.02±0.48
LDL(mmol/l)	0.28±0.15	5.09±1.72①	0.85±0.34②	2.98±1.71②
VLDL(mmol/l)	0.20±0.09	3.42±1.42①	0.43±0.14②	0.47±0.23②
FBG（mmol/L）	4.52±0.75	19.72±6.62①	9.02±5.03②	6.70±1.37②
FINS（mU/L）	17.34±2.35	12.83±3.52①	15.01±1.89②	17.53±2.21②
HOMA-IRI	3.43±0.29	11.25±1.22①	6.01±1.17②	5.20±1.48②
AUC	751.50±106.39	3105.38±384.65①	1759.50±374.92①②	1601.63±512.92①②

注：与CON组比较，①$P<0.05$；与T2D组比较，②$P<0.05$

以往研究结果报道一致[22]。

3.2 内质网应激在糖尿病脂肪肝中的作用

内质网是蛋白质合成、折叠、运输以及储存钙的主要场所，对各种刺激极为敏感。正常生理状态下，ER腔内的分子伴侣GRP78与ER膜上的3个跨膜蛋白PERK、ATF6、IRE-1结合，使其处于非活化状态。当机体功能紊乱时，ER稳态失衡，大量未折叠蛋白聚集，GRP78与未折叠蛋白质结合（未折叠蛋白反应，UPR），与PERK、ATF6、IRE-1解离，解离后的PERK、ATF6和IRE-1都将被激活，从而发生ERS应激[23]。而严重或持续的ERS也可激活下游的凋亡信号分子，使促生存转为促凋亡，诱导细胞凋亡。目前已知的ERS介导细胞凋亡途径主要有3种[24]：①PERK/eIF-2a-CHOP途径；②IRE-1/JNK途径；③Caspase-12途径。近年来，研究表明ERS介导了肥胖、T2D以及NAFLD等病理生理过程。研究报道[7—8]，无论是NAFLD动物模型还是NAFLD患者，肝脏未折叠蛋白反应和内质网应激均显著增加，严重的ERS进一步诱导凋亡通路的激活。ERS及其介导凋亡在NAFLD的发生发展过程中起着重要作用[9]。

鉴于ERS在NAFLD发生发展中的重要性，我们检测了2型糖尿病脂肪肝大鼠肝脏ERS的重要调节因子GRP78。GRP78是一种与葡萄糖相关的蛋白质，常被看作是ERS反应的标志[25]。我们发现GRP78在2型糖尿病大鼠脂肪肝中表达上调，提示ERS在NAFLD条件下被激活。这一发现与以往研究报道一致[26]。为了进一步研究T2D条件下脂肪肝ERS增加的后果，我们检测了T2D大鼠肝脏组织的凋亡情况。研究结果显示：T2D组肝脏ERS水平的升高与凋亡信号分子的升高有关。与CON组比较，T2D组肝脏凋亡信号分子CHOP、JNK、Caspase12蛋白表达明显升高。提示ERS发生于2型糖尿病动物的脂肪肝，当ERS延长或加重时，会导致细胞凋亡和死亡。肝组织中凋亡信号的激活表明，在这些2型糖尿病大鼠中可能发生了更严重的脂肪肝疾病，如非酒精性脂肪肝炎（NASH）。

3.3 有氧和抗阻运动对糖尿病脂肪肝大鼠肝脏内质网应激的影响

运动被广泛证明可有效改善脂肪肝的病情[5]。有关运动对ERS及其介导细胞凋亡的影响，目前文献报道结论不一。研究报道，4周高强度运动有效降低肝脏脂肪含量[27]。NAFLD患者1周跑步机上运动可有效减少肝细胞凋亡[28]。8周有氧运动降低大鼠ERS蛋白及其诱导的促凋亡蛋白表达[29]。另有研究报道，运动对大鼠ERS蛋白表达没有影响，这可能与该研究中运动量较低（5天/周，6周）有关[30]。以上结果提示，运动能否有效降低ERS，减少细胞凋亡，可能与其运动量多少和运动强度大小有关。在T2D模型下，ERS及其介导细胞凋亡在糖尿病脂肪肝发生发展中的作用，目前少有文献报道。本研究结果显示，8周有氧或抗阻运动均能有效改善2型糖尿病脂肪肝。运动不仅减缓NAFLD肝细胞脂肪变性，还显著降低糖尿病大鼠肝脏ERS、减少细胞凋亡，提示运动可能通过降低ERS及其介导的细胞凋亡，从而达到改善糖尿病脂肪肝的作用，与以往文献报道一致[27]。说明即使T2D和NAFLD同时存在，运动依然是治疗NAFLD的有效方法，其机制与运动降低ERS蛋白表达，减少细胞凋亡有关。

运动疗法作为经济、简单的治疗方式受到越来越多患者的认可。有氧运动对心肺功能的要求较高，一些不适宜进行有氧运动的人群，抗阻运动则成

为更好的选择[31]。抗阻运动可降低NAFLD患者肝脏脂肪含量，改善肝功能状态，与有氧运动作用相似[32—33]。目前，直接比较有氧运动和抗阻运动对NAFLD影响的研究很少。有研究发现[32]，有氧运动和抗阻运动均能显著降低T2D个体的肝脏脂肪含量，同时改善了个体胰岛素敏感性、减少了血脂含量。与我们的研究结果一致。本研究还发现，在降低T2D大鼠肝脏脂肪含量和减少ERS介导的细胞凋亡方面，抗阻运动与有氧运动具有同样的效果。然而，在降低ERS调节因子GRP78蛋白表达方面，有氧运动较抗阻运动作用更显著。我们推测，这种差异的产生，可能是两种运动的总能量消耗不同，因为抗阻运动通常比有氧运动的能量消耗更低[34]。研究报道[35]，脂肪肝具有良好的运动敏感性。即通过运动能有效改善肝脏脂肪变性状况，但不同运动干预脂肪肝人群的靶向作用有所区别。有氧运动在减少体质量上效果显著，抗阻运动表现在增大肌肉力量和质量。研究显示[36]，随着肌肉质量的增加，总脂肪量和躯干脂肪量出现减少。抗阻运动延缓脂肪肝的发生发展，其机制可能与抗阻运动改善改善胰岛素敏感性而导致肝脏游离脂肪酸减少有关[37]。

3.4 研究局限性

本研究中，只测量了肝脏ERS过程的关键标志物，未能更全面地评估肝脏ERS途径和UPR反应，未能确定可能导致NAFLD发展或运动防治NAFLD的基因靶点；另外，在确定“糖尿病脂肪肝模型是否成功”时，主要依据肝脏病理学这一“金标准”进行判断，未能对模型成功时的糖脂代谢变化等辅助指标进行检测；本研究也疏忽了运动对肝功能影响的指标检测。

4 结论

在糖尿病动物模型中，肝脏ERS和及其介导的细胞凋亡参与脂肪肝的发生发展。有氧运动和抗阻运动都能有效减轻糖尿病大鼠脂肪肝的发生，这可能与有氧运动和抗阻运动均能有效降低肝脏ERS，减少肝细胞凋亡有关。

参考文献

[1] Mikolasevic I, Milic S, Turk WT, et al. Nonalcoholic fatty liver disease-A multisystem disease?[J]. World J Gastroentero, 2016, 22(43): 9488—9505.

[2] 张亚杰，靳爽，姜宁，等. 塞来昔布对2型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病相关的胰岛素抵抗的影响[J]. 中国医科大学学报，2016，45(1)：39—44.

[3] 杜玉茗，张雷，郭宇，等. 利拉鲁肽对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝的防治作用[J]. 中国老年学杂志，2017，37(21)：5282—5284.

[4] Rector RS, Thyfault JP. Does physical inactivity cause nonalcoholic fatty liver disease?[J]. J Appl Physiol (1985), 2011, 111(6): 1828—1835.

[5] Linden MA, Sheldon RD, Meers GM, et al. Aerobic exercise training in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease related fibrosis[J]. J Physiol, 2016, 594(18): 5271—5284.

[6] Takahashi A, Abe K, Usami K, et al. Simple resistance exercise helps patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Int J Sports Med, 2015, 36(10): 848—852.

[7] Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis[J]. Endocrinology, 2006, 147(2): 943—951.

[8] Puri P, Mirshahi F, Cheung O, et al. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2008, 134(2): 568—576.

[9] Drapkina OM, Deeva TA, Ivashkin VT. Evaluation of endothelial function and estimation of the degree of apoptosis in patients with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease[J]. Ter Arkh, 2015, 87(5): 76—83.

[10] Epp RA, Susser SE, Morissette MP, et al. Exercise training prevents the development of cardiac dysfunction in the low-dose strepotozotocin diabetic rats fed a high-fat diet[J]. Can J Physiol Phamacol, 2013, 91(1): 80—9.

[11] 税晓平，曹艳霞，李顺昌，等. 不同运动对糖尿病大鼠周围神经结构功能的影响及机制[J]. 中国运动医学杂志，2018，37(10)：857—864.

[12] 张亚杰，靳爽，姜宁，等. 塞来昔布对2型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病相关的胰岛素抵抗的影响[J]. 中国医科大学学报， 2016，45(1)：39.

[13] Mcdonald MW, Murray MR, Grise KN, et al. The glucoregulatory response to high-intensity aerobic exercise following training in rats with insulin-treated type 1 diabetes mellitus[J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2016, 41(6): 631—639.

[14] Hornberger TJ, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat[J]. Can J Appl Physiol, 2004, 29

(1):16—31.

[15] 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2010，19(6):483—487.

[16] Milic S，Stimac D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis：epidemiology，pathogenesis，clinical presentation and treatment[J]. Dig Dis，2012，30(2):158—162.

[17] Le P，Chaitoff A，Rothberg MB，et al. Population-based trends in prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in U.S. adults with type 2 diabetes[J]. Clin Gastroenterol Hepatol，2018，25(3):188—202.

[18] Goedeke L，Perry RJ，Shulman GI. Emerging pharmacological targets for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease，insulin resistance，and type 2 diabetes[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol，2019，59:65—87.

[19] Mota M，Banini BA，Cazanave SC，et al. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Metabolism，2016，65(8):1049—1061.

[20] Zhang M，Lv XY，Li J，et al. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model[J]. Exp Diabetes Res，2008:704045.

[21] Wang Y，Campbell T，Perry B，et al. Hypoglycemic and insulin-sensitizing effects of berberine in high-fat diet- and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Metabolism，2011，60(2):298—305.

[22] Ye JH，Chao J，Chang ML，et al. Pentoxifylline ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in hyperglycaemic and dyslipidaemic mice by upregulating fatty acid beta-oxidation[J]. Sci Rep，2016，6:33102.

[23] Soeda J，Cordero P，Li J，et al. Hepatic rhythmicity of endoplasmic reticulum stress is disrupted in perinatal and adult mice models of high-fat diet-induced obesity[J]. Int J Food Sci Nutr，2017，68(4):455—466.

[24] 张媛，丁树哲. 运动性骨骼肌内质网应激与线粒体功能调控[J]. 中国体育科技，2017，53(4):91—96.

[25] 程莉娟，成细华，喻嵘，等. 内质网应激相关基因在2型糖尿病合并脂肪肝小鼠肝脏中的表达变化[J]. 中国老年学杂志，2015，35(2):415—418.

[26] Gonzalez-Rodriguez A，Mayoral R，Agra N，et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD[J]. Cell Death Dis，2014，5:e1179.

[27] Winn NC，Liu Y，Rector RS，et al. Energy-matched moderate and high intensity exercise training improves nonalcoholic fatty liver disease risk independent of changes in body mass or abdominal adiposity - A randomized trial[J]. Metabolism，2018，78(11):128—140.

[28] Fealy CE，Haus JM，Solomon TP，et al. Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Appl Physiol (1985)，2012，113(1):1—6.

[29] da Luz G，Frederico MJ，da Silva S，et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats[J]. Eur J Appl Physiol，2011，111(9):2015—2023.

[30] Deldicque L，Cani PD，Delzenne NM，et al. Endurance training in mice increases the unfolded protein response induced by a high-fat diet[J]. J Physiol Biochem，2013，69(2):215—225.

[31] 杨星雅，李鹏飞，房国梁，等. 有氧和抗阻运动对大鼠白色脂肪棕色化的作用[J]. 体育科学，2017，37(6):69—74.

[32] Zelber-Sagi S，Buch A，Yeshua H，et al. Effect of resistance training on non-alcoholic fatty-liver disease a randomized-clinical trial[J]. World J Gastroenterol，2014，20(15):4382—4392.

[33] Bacchi E，Negri C，Targher G，et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial)[J]. Hepatology，2013，58(4):1287—1295.

[34] Hashida R，Kawaguchi T，Bekki M，et al. Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease：A systematic review[J]. J Hepatol，2017，66(1):142—152.

[35] 付洋洋，孟美美，荣宁，等. 有氧运动与抗阻运动对非酒精性脂肪肝患者影响效果研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版)，2018，38(4):528—532.

[36] Zelbersagi S，Buch A，Yeshua H，et al. Effect of resistance training on non-alcoholic fatty liver disease a randomized-clinical trial[J]. World J Uastroenterol，2014，20(15):4382—4392.

[37] 甄志平，罗超，李湘平，等. 运动干预非酒精性脂肪肝病的研究进展[J]. 中国预防医学杂志，2019，20(1):73—76.