

Nrf2/HO-1通路在有氧运动干预2型糖尿病大鼠骨骼肌氧化应激中的作用*

雷槟恺^{1,2} 李顺昌² 高德润² 柯志飞¹ 王瑞元¹ 苏全生^{2,3}

摘要

目的:观察有氧运动对2型糖尿病大鼠糖代谢、骨骼肌氧化应激和Nrf2、HO-1蛋白表达的影响,探讨Nrf2/HO-1通路在有氧运动干预2型糖尿病大鼠骨骼肌氧化应激中的作用。

方法:7周高脂高糖膳食联合一次小剂量腹腔注射链脲佐菌素,建立2型糖尿病大鼠模型。将普通饲料喂养大鼠随机分为空白对照组(C,n=8)和有氧运动对照组(CA,n=8);将造模成功的大鼠随机分为糖尿病组(D,n=8)和糖尿病有氧运动组(DA,n=8)。CA组和DA组大鼠进行20m/min、60min/d、5d/W的无负重跑台有氧运动,共运动8周。8周有氧运动后,检测各组大鼠体重、空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin,FINS)、糖耐量线下面积(area under the curve,AUC),计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-estimated insulin resistance index,HOMA-IRI);透射电镜观察骨骼肌超微结构改变;比色法检测骨骼肌超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量;Western Blot检测骨骼肌Nrf2、HO-1蛋白表达水平。

结果:与C组相比,D组大鼠FBG、AUC、HOMA-IRI和骨骼肌MDA含量均明显增加($P<0.01$),骨骼肌Nrf2蛋白表达也显著上升($P<0.05$);体重、FINS和骨骼肌SOD活性均明显降低($P<0.01$);骨骼肌超微结构出现异常,主要表现为线粒体损伤。8周有氧运动干预后,CA组大鼠骨骼肌Nrf2和HO-1蛋白表达水平较C组显著上升($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与D组相比,DA组大鼠体重、FINS、骨骼肌SOD活性、骨骼肌Nrf2和HO-1蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),FBG、AUC、HOMA-IRI和骨骼肌MDA含量均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),骨骼肌超微结构基本恢复正常,线粒体结构较为清晰,仅可见少量线粒体轻微肿胀。

结论:有氧运动可以缓解2型糖尿病大鼠糖代谢紊乱,且可能通过激活Nrf2/HO-1通路进而减轻2型糖尿病大鼠骨骼肌氧化应激和超微结构异常。

关键词 有氧运动; 2型糖尿病; 氧化应激; Nrf2/HO-1通路; 骨骼肌

中图分类号:R587.1, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-03-0289-07

The role of Nrf2/HO-1 pathway in aerobic exercise intervention on oxidative stress of skeletal muscle in type 2 diabetic rats/LEI Bingkai, LI Shunchang, GAO Derun, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(3): 289—295

Abstract

Objective: To observe the effects of aerobic exercise on glucose metabolism, oxidative stress and nuclear factor E2-related factor 2(Nrf2), heme oxygenase1(HO-1) protein expression in type 2 diabetic rats; to explore the role of Nrf2/HO-1 pathway in aerobic exercise intervention on skeletal muscle oxidative stress in type 2 diabetic rats.

Method: Seven weeks of high fat and high sugar diet combined with a small dose of STZ intraperitoneal injection was used to establish the model of type 2 diabetes mellitus rats. The rats were randomly divided into

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.03.001

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(31971104,31471133);中央高校基本科研业务费专项资金资助课题(校2020022,校2020025)

1 北京体育大学运动人体科学学院,北京市,100084; 2 成都体育学院运动医学与健康研究所; 3 通讯作者

第一作者简介:雷槟恺,男,博士研究生; 收稿日期:2020-12-16

blank control group(C,n=8) and control + aerobic exercise group(CA,n=8). The rats that were successfully induced to type 2 diabetes were divided into diabetes group (D, n=8) and diabetes+aerobic exercise group (DA, n=8). The rats in CA group and DA group were given aerobic exercise on treadmill without load at 20m/min, 60min/d and 5d/W for 8 weeks. After 8 weeks of aerobic exercise,the body weight, the fasting blood glucose (FBG),the fasting insulin(FINS) and the area under glucose tolerance(AUC) were measured. The insulin resistance index(HOMA-IRI) was also calculated. Transmission electron microscopy was used to observe the changes of skeletal muscle structure. Biochemical method was used to detect the SOD activity and MDA content of skeletal muscle. The expression levels of Nrf2 and HO-1 in skeletal muscle were detected by Western blot.

Result: Compared with the C group, the FBG, AUC, HOMA-IRI and MDA content of skeletal muscle in the D group were significantly increased ($P<0.01$) and the Nrf2 expression level was also significantly increased ($P<0.05$). However, the body weight, FINS and SOD activity of skeletal muscle were significantly decreased ($P<0.01$), the ultrastructure of skeletal muscle was abnormal and showed mitochondrial damage. After 8 weeks of aerobic exercise intervention, the expression of Nrf2 and HO-1 protein in skeletal muscle of the CA group was significantly increased than those of the C group($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the D group, the body weight, Fins, SOD activity, Nrf2 and HO-1 protein expression levels in the DA group were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$); the FBG, AUC, HOMA-IRI, MDA content were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the ultrastructure of skeletal muscle and mitochondria was basically recovered. Occasionally,only a few mitochondria were slightly swollen.

Conclusion: Aerobic exercise can relieve glucose metabolism disorder and may alleviate oxidative stress and ultrastructure abnormality of skeletal muscle via activating Nrf2/HO-1 pathway in T2DM rats.

Author's address Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing, 100084

Key word aerobic exercise;type 2 diabetes mellitus;oxidative stress;Nrf2/HO-1 pathway;skeletal muscle

国际糖尿病联盟2015年报告显示,全球糖尿病患者数量正快速增长,预测到2040年全世界约10%的人口将成为糖尿病患者^[1]。其中,2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)约占糖尿病患者的90%以上。T2DM是一种以脂质代谢紊乱为主要特征的终身性代谢疾病,并发症众多。骨骼肌不仅为机体运动提供动力来源,对机体摄取和利用葡萄糖供能也具有不可替代的作用。随着T2DM病程的发展,持续高血糖会导致骨骼肌出现超微结构损伤、收缩力量下降、肌萎缩等现象,最终发展为糖尿病肌少症^[2-3];而骨骼肌的病理性改变又会造成骨骼肌对葡萄糖的利用能力和对胰岛素的敏感性降低,加剧胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和血糖升高,形成恶性循环^[4]。氧化应激与T2DM的发生和发展关系密切^[5]。氧化应激过度增强可使骨骼肌线粒体损伤,钙代谢障碍,诱发细胞凋亡,并且加剧活性氧(reactive oxygen species,ROS)过度堆积,加重骨骼肌IR和病变^[6-8]。核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2),是感知氧化应激和调节抗氧化反应的关键分子开关。在氧化应激状

态下,Nrf2被激活转位进入细胞核,调控下游血红素加氧酶1(heme oxygenase1, HO-1)等众多抗氧化蛋白的表达,抵御细胞氧化应激损伤,发挥细胞保护作用。运动是防治T2DM的有效手段,在改善脂质代谢紊乱的同时可以提高机体抗氧化能力,抑制氧化应激,改善骨骼肌IR和质量丢失^[9-10]。同时,运动还可以激活Nrf2相关信号通路,进而实现对抗氧化系统的调节。但是,有氧运动是否通过Nrf2/HO-1通路调控T2DM大鼠骨骼肌氧化应激,进而改善骨骼肌的结构和功能,目前尚不明确。本研究拟通过高脂高糖膳食联合小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)注射建立T2DM大鼠模型,观察8周有氧运动对T2DM大鼠糖代谢、骨骼肌超微结构、氧化应激水平和Nrf2、HO-1蛋白表达的影响,探讨有氧运动是否通过Nrf2/HO-1通路减轻T2DM大鼠骨骼肌氧化应激损伤,为运动防治T2DM的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和T2DM模型的建立

6周龄健康雄性SPF级SD大鼠60只,体重为160—180g,由成都达硕实验动物技术有限公司提供。分笼饲养,保持自由饮食饮水,室温(22±2)°C,相对湿度40%—60%,12h光照/12h熄灯模拟昼夜交替。

普通饲料适应性喂养1周后,将大鼠随机分为预对照组(pC组;n=24)和预模型组(pD组;n=36),两组大鼠体重无显著性差异($P>0.05$)。pC组普通饲料喂养,pD组高糖高脂饲料喂养(饲料配方为:10%猪油,20%蔗糖、2%胆固醇、1%胆酸钠、67%普通饲料;成都达硕实验动物技术有限公司加工)。第8周,尾静脉取血检测各组大鼠FBG和FINS,并计算HOMA-IRI;完成测试后对pD组大鼠施以小剂量链脲佐菌素(STZ,30mg/kg)腹腔注射,pC组大鼠于相同时间腹腔注射相同剂量枸橼酸缓冲液,72h后尾静脉取血检测非禁食血糖。7周高脂高糖饲料喂养后,pD组大鼠FBG(5.022±0.513 vs 6.973±1.040, $P<0.05$)、FINS(18.953±1.841 vs 35.169±4.633, $P<0.01$)、HOMA-IRI(4.234±0.411 vs 10.891±1.311, $P<0.01$)均显著升高,出现明显的IR。以IR基础上非禁食血糖≥16.7mmol/L为标准,判断糖尿病模型造模成功^[1],共有26只大鼠造模成功,造模成功率为72.2%。之后,对大鼠进行再次分组,将pC组大鼠随机分为空白对照组(C组)和有氧运动对照组(CA组),每组8只;将pD组中造模成功的大鼠随机分为糖尿病组(D组)和有氧运动对照组(DA组),每组8只。C组和CA组继续普通饲料喂养,D组和DA组继续高糖高脂饲料喂养。

1.2 主要仪器和试剂

小动物跑台(中国杭州段氏制作公司),5424R低温高速离心机(德国Eppendorf公司),电子天平(Mettler Toledo公司),稳豪型血糖仪(Johnson公司),酶标仪(美国Bio-Rad公司),AU5800全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司),H600IV透射电镜(日本日立公司),垂直电泳系统(美国GE公司),TE22电转槽(美国GE公司),凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),超低温冰箱(海尔公司)。

链脲佐菌素(美国Sigma公司),细胞裂解液、BCA试剂盒(康为世纪生物科技有限公司),ECL发光液(美国Vigorous公司),水合氯醛、柠檬酸、柠檬酸钠(四川生工科技有限公司),胰岛素试剂盒(美国

Millipore公司),丙二醛测试盒、SOD试剂盒(南京建成生物科技有限公司),Nrf2、HO-1一抗(美国Abcam),GAPDH一抗(美国Santa Cruz),二抗(中杉金桥生物科技有限公司)。

1.3 运动方案

有氧运动方案参照Bedford^[12]运动模型,大鼠进行跑台运动。正式训练前CA组和DA组大鼠进行3天适应性跑台训练后,以20m/min(60%—70% VO_{2max})、60min/d、5d/W进行训练干预,运动共干预8周。

1.4 样本的采集与指标测试

为消除最后一次运动干预的即时效应,取材于最后一次运动干预72h后完成;各组大鼠在取材前,禁食12h,尾静脉取血检测FBG并进行糖耐量试验。大鼠称重后,腹腔注射10%水合氯醛(3.5ml/kg,i.p.)进行麻醉。腹主动脉取血后,迅速分离两侧比目鱼肌,去除两侧肌腱和结缔组织,切取部分比目鱼肌肌腹为(3×2×1)mm³左右的小块,迅速投入4°C预冷的3%戊二醛溶液中固定,将其余比目鱼肌切成小块,放入超低温冰箱中保存,待测。

血液指标测试:尾静脉取血后,使用血糖仪检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG);糖耐量试验按照2g/kg体重,腹腔注射20%葡萄糖溶液,分别测定注射前、注射后30min、60min、120min四个时相的血糖值,计算糖耐量线下面积(area under the curve, AUC);将尾静脉或腹主动脉取出的血,严格按照试剂盒说明,使用酶联免疫吸附法测试空腹胰岛素(fasting insulin, FINS);计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-estimated insulin resistance index, HOMA-IRI),计算公式为:

$$\text{HOMA-IRI} = \text{FINS}(\text{mU/L}) \times \text{FBG}(\text{mmol/L}) / 22.5$$

透射电镜观察比目鱼肌超微结构改变:将戊二醛中固定的骨骼肌投入1%四氧化锇进行再固定,使用丙酮进行梯度脱水并包埋骨骼肌样品,对半薄切片光学定位后行超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,透射电镜观察骨骼肌超微结构变化。

免疫印迹法检测比目鱼肌Nrf2和HO-1的蛋白表达水平:取比目鱼肌100mg,剪碎后加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂匀浆,离心,采用BCA法测定蛋白浓度。配置SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白(10%分离胶和4%浓缩胶),电泳后采用湿转法将蛋白转

至PVDF膜上()恒流300mA,100min),封闭后加入Nrf2、HO-1(1:1000)一抗,4℃孵育过夜;加入1:10000稀释的二抗室温孵育1h,加入ECL化学发光液,使用凝胶成像系统显像。用Quantity one 4.6.2软件对目的蛋白质进行光密度相对定量分析。目的蛋白相对表达量的算法为:目的条带灰度值/同一标本内参条带灰度值。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测:将比目鱼肌匀浆后,严格按照试剂盒要求检测各组大鼠比目鱼肌SOD活性和MDA含量。

1.5 统计学分析

所有实验数据用SPSS22.0软件进行统计处理,数据以均值±标准差表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时用LSD检验,方差不齐性时用

Tamhane's T2法进行分析。定义 $P < 0.05$ 为显著性差异水平。

2 结果

2.1 各组大鼠体重和糖代谢相关指标的比较

由表1可知,与C组相比,D组大鼠FBG、HOMA-IRI和AUC均显著上升($P < 0.01$),体重和FINS显著下降($P < 0.01$);与D组大鼠相比,DA组FBG、HOMA-IRI和AUC值均显著下降($P < 0.01$),体重和FINS均显著上升($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠骨骼肌超微结构变化

C组和CA组(图1—2)大鼠骨骼肌肌纤维排列整齐,线粒体结构清晰完整,线粒体较为均匀分布在肌纤维Z线两侧和肌膜下;D组(图3)大鼠骨骼肌纤维排列基本规律,但可见线粒体分布不均,结构模糊

表1 各组大鼠体重和糖代谢相关指标的变化

($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	FBG(mmol/L)	FINS(mU/L)	HOMA-IRI	AUC
C组	646.671±17.220	4.521±0.752	17.343±2.351	3.433±0.291	752.103±106.391
D组	436.668±35.022 ^②	19.720±6.621 ^②	12.828±3.517 ^②	11.254±1.224 ^②	3105.377±384.653 ^②
CA组	597.833±34.561	3.732±0.850	18.055±4.190	2.961±0.780	822.629±185.270
DA组	501.673±26.234 ^③	9.024±1.033 ^④	15.019±1.894 ^③	6.014±1.173 ^④	1759.503±174.921 ^④

注:与C组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$;与D组比较,③ $P < 0.05$,④ $P < 0.01$ 。C组:空白对照组;CA组:有氧运动对照组;D组:糖尿病组;DA组:有氧运动对照组

不清,肌纤维间线粒体出现类似片段化现象,肌膜下线粒体明显肿胀,出现基质空泡化,线粒体嵴不清晰;DA组(图4)大鼠骨骼肌肌丝完整,线粒体结构基本正常,线粒体膜结构和嵴结构较为清晰,可见少量线粒体变圆和轻微肿胀。

2.3 各组大鼠骨骼肌SOD活性和MDA含量比较

由表2可知,与C组相比,D大鼠骨骼肌SOD活性显著下降($P < 0.01$),MDA含量显著上升($P < 0.01$);与D组相比,DA组大鼠骨骼肌SOD活性显著上升($P < 0.01$),MDA含量显著下降($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠骨骼肌Nrf2、HO-1蛋白表达水平比较

由表3和图5可知,与C组相比,CA组Nrf2和HO-1蛋白表达均显著升高($P < 0.01$; $P < 0.05$),D组Nrf2蛋白表达显著升高($P < 0.05$),HO-1蛋白表达虽有上升趋势,但无统计学差异($P > 0.05$);与D组相比,DA组Nrf2和HO-1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。

图1 空白对照组组大鼠骨骼肌超微结构

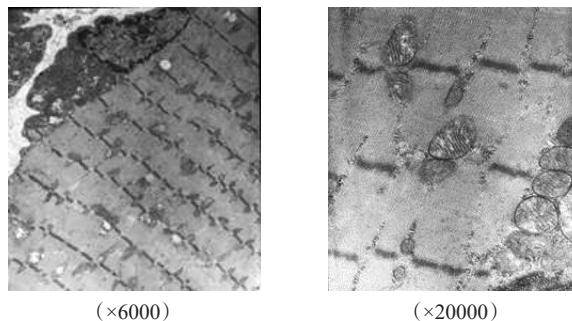


图2 有氧运动对照组组大鼠骨骼肌超微结构

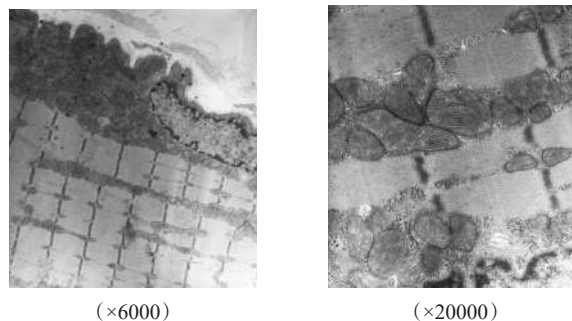


表2 各组大鼠骨骼肌SOD活性和MDA含量的变化

 $(\bar{x} \pm s)$

测试指标	C组	D组	CA组	DA组
SOD(U/mg prot)	126.955±6.552	69.540±2.746 ^②	128.136±7.745	101.159±5.306 ^④
MDA(nmol/mg prot)	7.037±0.802	17.073±1.615 ^②	7.567±0.275	13.260±1.398 ^③

注:与C组比较,① $P<0.05$,② $P<0.01$;与D组比较,③ $P<0.05$,④ $P<0.01$ 。C组:空白对照组;CA组:有氧运动对照组;D组:糖尿病组;DA组:有氧运动对照组

表3 各组大鼠骨骼肌Nrf2、HO-1蛋白表达变化 $(\bar{x} \pm s)$

测试指标	C组	D组	CA组	DA组
Nrf2	0.133±0.053	0.283±0.070 ^①	0.358±0.059 ^②	0.411±0.023 ^③
HO-1	0.565±0.116	0.648±0.095	0.863±0.111 ^①	0.889±0.121 ^③

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

图3 糖尿病组大鼠骨骼肌超微结构

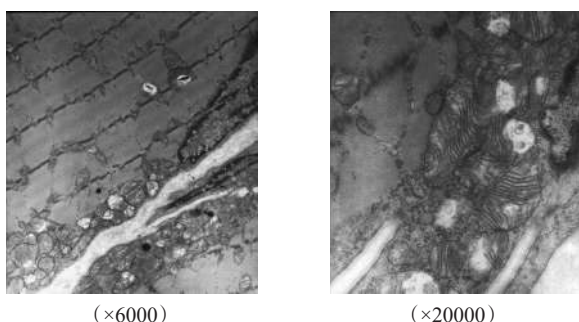
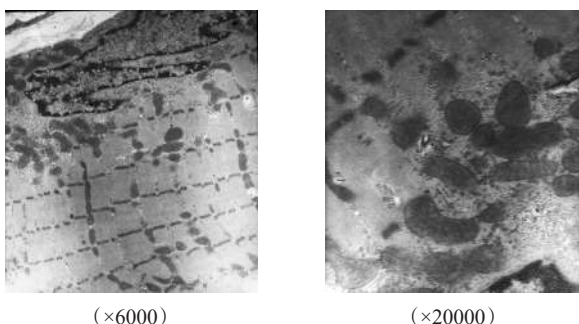


图4 糖尿病有氧运动组大鼠骨骼肌超微结构



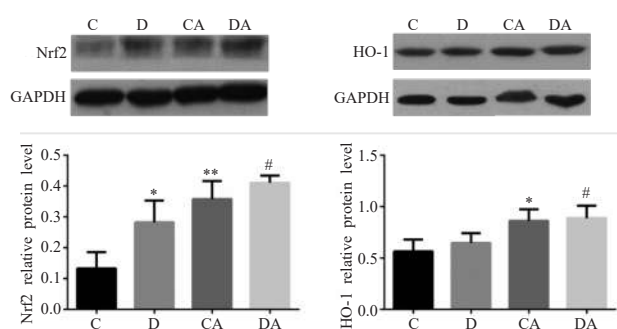
3 讨论

随着社会的不断发展,便利的生活方式下催生静坐少动人群不断增加,加之能量过量摄入,这使得慢性病患者,尤其是T2DM患者大幅增加。T2DM是一种以长期慢性高血糖为特征的代谢疾病,其主要发病基础为胰岛细胞功能障碍所致的胰岛素分泌缺陷和外周组织胰岛素抵抗。作为胰岛细胞分泌的降血糖激素,胰岛素对调节机体血糖动态平衡具有不可替代的作用。当机体胰岛素分泌缺陷或者骨骼

肌、肝脏、脂肪等组织对胰岛素敏感性降低,发生IR时,会导致血糖稳态被打破,机体血糖急剧上升。运动是防治T2DM的重要非医疗手段,在众多运动疗法中,有氧运动形式多样,应用最为广泛。大量研究表明,运动可以明显改善T2DM所致糖代谢紊乱^[13]。长期有规律的有氧运动可以增强骨骼肌胰岛素敏感性,上调骨骼肌GLUT4的表达并促进其转位,增强骨骼肌对糖的利用,改善IR^[14-15]。本研究中,糖尿病大鼠FBG水平、HOMA-IRI和AUC较安静组大鼠均显著上升,而FINS水平显著下降。提示,T2DM大鼠出现了明显的糖代谢障碍,发生了明显的IR,且高脂高糖联合腹腔注射STZ建立T2DM大鼠模型成功。Li等^[11]对T2DM大鼠进行8周有氧运动干预后,大鼠糖脂代谢紊乱显著改善,而本研究采用了相同的中等强度有氧运动方案干预T2DM大鼠后,T2DM大鼠糖代谢紊乱和IR得到明显减轻。大量研究表明,超重或肥胖与T2DM的发生关系密切,是IR发生的重要诱因;随着T2DM病程的延续和加重,会导致T2DM患者体重明显下降^[16]。本研究在造模前各组大鼠体重无差异,高脂高糖饲料喂养后,pD组大鼠体重较pC组明显升高;成模后,D组大鼠体重较C组显著降低。这与T2DM临床特征具有一致性,再次验证本研究模型建立成功。

骨骼肌是外周胰岛素最为敏感的靶组织。在T2DM病程发展过程中,骨骼肌结构和功能会出现明显改变。对T2DM患者进行肌肉活检后发现骨骼肌明显萎缩,骨骼肌超微结构出现溶解性损伤等结构异常现象,线粒体损伤严重^[17-18]。动物实验也表明,在糖尿病的不同时期,骨骼肌结构会出现病理性改变,并伴有明显的肌萎缩,主要表现为肌丝排列紊乱,纤维化和线粒体结构损伤,且随着病程的延长不断加重^[19]。本研究通过透射电镜观察骨骼肌超微结构发现,D组大鼠骨骼肌结构出现病理性变化,主要表现为线粒体明显肿胀,基质空泡化,嵴结构不清晰等损伤现象;这些结果与现有文献报道相似,但病变

图5 各组大鼠骨骼肌 Nrf2、HO-1 蛋白表达变化



注:与C组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与D组比较,# $P<0.05$ 。

程度较轻,这可能与造模方法和病程长短有关。经过8周有氧运动干预后,CA组大鼠骨骼肌结构正常,DA组大鼠骨骼肌结构基本恢复正常,仅可见少量线粒体变圆和轻微肿胀。这提示,8周有氧运动不会造成骨骼肌超微结构损伤且对T2DM所致骨骼肌超微结构异常有较为明显的缓解。

在T2DM及其众多并发症中均存在明显的氧化应激^[20]。在T2DM持续高血糖刺激下,通过线粒体电子传递链可生成大量的ROS,ROS作用于胰岛细胞,导致胰岛细胞损伤甚至凋亡,影响胰岛素的产生和分泌^[21]。另一方面,ROS可能通过影响骨骼肌线粒体功能稳态、促进骨骼肌收缩蛋白降解、抑制骨骼肌GLUT4的表达和转位,诱导IR的发生,加重T2DM骨骼肌病变^[22-24]。本研究通过检测骨骼肌氧化应激的生物标志物SOD活性和MDA的含量来反映骨骼肌氧化应激水平,与C组相比,D组大鼠SOD活性明显下降,MDA含量显著上升。结合本研究中对大鼠骨骼肌超微结构的观察,提示T2DM状态下,骨骼肌存在明显的氧化应激,而氧化应激可能是造成T2DM大鼠骨骼肌线粒体结构损伤的机制之一。氧化应激在T2DM的发生发展中扮演关键角色,因此,抗氧化对改善T2DM及其并发症意义重大。Nrf2是氧化应激的关键调节分子,近年来受到广泛关注。生理状态下,Nrf2被Keap1锚定,保持其转录低活性;但在细胞受到氧化应激刺激时,Nrf2与Keap1解离,转位进入细胞核,并与细胞核内抗氧化反应元件ARE结合,启动对下游HO-1、SOD、NQO1等抗氧化蛋白的转录^[25]。HO-1是血红素分解的限速酶,HO-1及其酶解产物在机体抗氧化反应中发挥重

要作用,且HO-1受到Nrf2蛋白的调控^[26]。有研究报道,异补骨脂查尔酮通过激活C2C12细胞Nrf2/HO-1通路,调控氧化应激,抑制肌细胞损伤^[27]。可见,Nrf2/HO-1通路在机体抗氧化反应和改善氧化应激中具有重要作用。本研究发现,糖尿病大鼠骨骼肌Nrf2蛋白表达显著上升,HO-1蛋白无明显变化。结合本研究对SOD活性和MDA含量的研究,提示,在T2DM早期,骨骼肌Nrf2/HO-1通路并未被完全激活;Nrf2蛋白虽然出现代偿性表达增高,但不足以改善T2DM的氧化应激状态。

不同的运动形式、运动强度和运动持续时间对机体氧化应激与抗氧化反应具有不同的效应。长期有氧运动可以通过提高氧化酶和抗氧化酶的活性,使骨骼肌和心血管系统产生良好的适应性反应。有研究显示,T2DM模型鼠在有氧运动干预后,糖代谢基本恢复正常,IR得到改善,腓肠肌SOD活性显著增高,MDA含量下降,改善氧化应激^[28-29]。运动能激活Nrf2信号通路,上调Nrf2蛋白表达和转录活性,提升骨骼肌线粒体的功能稳态,增强下游抗氧化酶活性,缓解骨骼肌氧化应激损伤,对机体产生良性适应^[30-32]。有研究报道,有氧运动能通过Nrf2途径上调肝脏HO-1蛋白表达水平,进而增强肝脏抗氧化能力^[33]。本研究显示,T2DM大鼠在有氧运动干预后,骨骼肌SOD活性显著上升,MDA含量显著下降。提示,有氧运动可以降低T2DM大鼠骨骼肌氧化应激。与D组相比,8周有氧运动干预后,DA组骨骼肌Nrf2和HO-1蛋白表达水平显著上调;另外,CA组大鼠骨骼肌Nrf2和HO-1蛋白表达较C组显著升高。这说明有氧运动能激活Nrf2/HO-1通路,且有氧运动可能通过Nrf2/HO-1通路缓解T2DM大鼠骨骼肌氧化应激。

综上所述,本研究通过高脂高糖膳食联合一次小剂量STZ注射,成功建立了T2DM大鼠模型。长时间有氧运动对T2DM大鼠糖代谢紊乱有明显的缓解作用;同时,有氧运动可以减轻T2DM大鼠骨骼肌超微结构病理性改变和氧化应激,这可能是有氧运动激活骨骼肌Nrf2/HO-1信号通路所致。

参考文献

- [1] 国际糖尿病联盟主编.糖尿病概览[M].第7版.布鲁塞尔:国际糖尿病联盟(IDF),2015,47—60.

- [2] Fung FY, Koh YLE, Malhotra R, et al. Prevalence of and factors associated with sarcopenia among multiethnic ambulatory older Asians with type 2 diabetes mellitus in a primary care setting[J]. *BMC Geriatr*, 2019, 19(1):122.
- [3] Anagnostis P, Gkekas NK, Achilla C, et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with increased risk of sarcopenia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 107:453—463.
- [4] Koo BK, Roh E, Yang YS, et al. Difference between old and young adults in contribution of β -cell function and sarcopenia in developing diabetes mellitus[J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7(2):233—240.
- [5] Bitar MS, Al-Mulla F. ROS constitute a convergencenexus in the development of IGF1 resistance and impaired wound healing in a rat model of type 2 diabetes[J]. *Dis Model Mech*, 2012, 5(3):375—388.
- [6] Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: Role of mitochondria and other ROS sources[J]. *J Endocrinol*, 2017, 233(1):15—42.
- [7] Kwak HJ, Choi HE, Cheon HG. 5-LO inhibition ameliorates palmitic acid-induced ER stress, oxidative stress and insulin resistance via AMPK activation in murine myotubes[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):5025.
- [8] Gan Z, Fu T, Kelly DP, et al. Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases[J]. *Cell Res*, 2018, 28(10):969—980.
- [9] Yarbeygi H, Atkin SL, Simental-Mendía, Luis E, et al. Molecular mechanisms by which aerobic exercise induces insulin sensitivity[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11):1—8.
- [10] Konopka AR, Asante A, Lanza IR, et al. Defects in mitochondrial efficiency and H_2O_2 emissions in obese women are restored to a lean phenotype with aerobic exercise training[J]. *Diabetes*, 2015, 64(6):2104—2115.
- [11] Li S, Liang M, Gao D, et al. Changes in titin and collagen modulate effects of aerobic and resistance exercise on diabetic cardiac function[J]. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 2019, 12:404—414.
- [12] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental & Exercise Physiology*, 1979, 47(6):1278—1283.
- [13] Bohm A, Weigert C, Staiger H, et al. Exercise and diabetes: relevance and causes for response variability[J]. *Endocrine*, 2016, 51(3):390—401.
- [14] Philippe M, Krusmann PJ, Mersa L, et al. Acute effects of concentric and eccentric exercise on glucose metabolism and interleukin-6 concentration in healthy males[J]. *Biol Sport*, 2016, 33(2):153—158.
- [15] Catoire M, Kersten S. The search for exercise factors in humans[J]. *FASEB J*, 2015, 29(5):1615—1628.
- [16] 朱宇, 霍丽丽, 王芳, 等. 体重与2型糖尿病病程的关系[J]. *中国糖尿病杂志*, 2008, 16(3):166—168.
- [17] 张宏, 白景文, 于德民, 等. 糖尿病性肌病的超微病理结构及可能机理[J]. *中国糖尿病杂志*, 2002, 10(6):326—329.
- [18] 高前进, 柏海平, 王彦伟. 有氧运动对糖尿病大鼠自噬性肌萎缩的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2016, 31(7):739—745.
- [19] 朱莉莉. 代综方改善db-db糖尿病小鼠胰岛素抵抗的机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.
- [20] Bathina S, Srinivas N, Das UN. Streptozotocin produces oxidative stress, inflammation and decreases BDNF concentrations to induce apoptosis of RIN5F cells and type 2 diabetes mellitus in Wistar rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2):406—413.
- [21] Nguyen MN, Kiriazis H, Gao XM, et al. Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis[J]. *Comprehensive Physiology*, 2017, 7(3):1009—1049.
- [22] Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(5):993—999.
- [23] Bonnard C, Durand A, Peyrol S, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice[J]. *J Clinical Investig*, 2008, 118(2):789—800.
- [24] Ferretti R, Moura EG, Dos Santos VC, et al. High-fat diet suppresses the positive effect of creatine supplementation on skeletal muscle function by reducing protein expression of IGF-PI3K-AKT-mTOR pathway[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10):e0199728.
- [25] Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(3): 1169—1203.
- [26] Haines D, Lekli I, Teissier P, et al. Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 204(4):487—501.
- [27] Hur J, Kim M, Choi SY, et al. Isobavachalcone attenuates myotube atrophy induced by TNF- α through muscle atrophy F-box signaling and the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 cascade[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(2):403—411.
- [28] Archer AE, Von Schulze AT, Geiger PC. Exercise, heat shock proteins and insulin resistance[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2018, 373(1738):20160529.
- [29] 王小娟, 李建华, 边仁秀. 有氧运动对2型糖尿病大鼠腓肠肌氧化应激及MAPKs信号通路的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2012, 31(9):800—805.
- [30] Horie M, Warabi E, Komine S, et al. Cytoprotective role of Nrf2 in electrical pulse stimulated C2C12 myotube[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12):e0144835.
- [31] 王林佳, 于晶晶, 张纓. 运动、Nrf2与骨骼肌线粒体[J]. *中国运动医学杂志*, 2020, 39(5):390—393.
- [32] Crilly MJ, Tryon LD, Erlich AT, et al. The role of Nrf2 in skeletal muscle contractile and mitochondrial function[J]. *J Appl Physiol*, 2016, 121(3):730—740.
- [33] 李国峰, 许思毛. 运动经PKC-Nrf2途径调节肝HO-1表达及抗氧化能力的研究[J]. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 35(1):113—118.