

# 跑台运动通过依赖p38MAPK信号通路上调FNDC5 改善db/db小鼠非酒精性脂肪性肝病

牛梦竹<sup>1</sup> 童诗逸<sup>1</sup> 寇现娟<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>武汉体育学院运动医学院, 武汉 430079; <sup>2</sup>运动训练监控湖北省重点实验室, 武汉 430079)

**摘要** 该文旨在探讨8周跑台运动改善II型糖尿病小鼠非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的作用及分子机制。将SPF级别的8周龄的雄性m/m小鼠作为阴性对照组(Con组), 8周龄的雄性db/db小鼠随机分为4组: II型糖尿病模型组(db组)、II型糖尿病跑台运动组(db+EX组)、II型糖尿病跑台运动联合p38MAPK抑制剂组(db+EX+SB203580组)、单纯p38MAPK抑制剂组(db+SB203580组), 每组各10只。腹腔注射p38MAPK抑制剂2 h后进行跑台运动干预, 每天运动干预40 min, 每周5天, 连续8周。通过小鼠体质量、血糖、肝体比、血脂以及HE、油红和Masson染色评价运动干预对NAFLD的干预效果。通过Western blot和qRT-PCR测定相关蛋白和mRNA表达水平。结果显示, 8周跑台运动可以明显减轻db/db小鼠体质量、血糖、肝体比值的增加, 降低小鼠血脂水平。运动干预减少了小鼠肝脏脂肪变性、胶原蛋白沉积及ACC1、SREBF1脂肪从头合成酶的表达水平。单纯p38MAPK抑制剂干预加重了肝脏脂肪变性和胶原蛋白的沉积, 而运动联合p38MAPK抑制剂不具有协同作用。与db模型组相比, 跑台运动上调了小鼠肝脏和肌肉中FNDC5的蛋白表达水平, 同时也增加了小鼠肝脏中FNDC5 mRNA表达水平。跑台运动还降低了db/db小鼠促凋亡蛋白BAX、Caspase8、Caspase9的表达水平, 增加了抗凋亡蛋白BCL2的表达水平。除此之外, 单纯p38MAPK抑制剂组不仅降低了db/db小鼠肝脏中磷酸化p38蛋白表达水平, 同时也降低了db/db小鼠肝脏和腓肠肌中FNDC5蛋白表达水平, 继而导致过度的细胞凋亡。运动联合p38MAPK抑制剂干预降低了磷酸化p38蛋白表达水平, 但对FNDC5和凋亡相关蛋白没有明显改变。以上结果表明, 8周跑台运动可有效缓解II型糖尿病小鼠NAFLD, 其机制可能是通过p38MAPK依赖途径上调FNDC5表达、降低肝脏纤维化、减轻小鼠肝细胞凋亡的。

**关键词** 跑台运动; 非酒精性脂肪性肝病; 纤维化; 凋亡; FNDC5

## Treadmill Exercise Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in db/db Mice by Up-Regulating FNDC5 through p38MAPK Signaling Pathway

NIU Mengzhu<sup>1</sup>, TONG Shiyi<sup>1</sup>, KOU Xianjuan<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Health Science, Wuhan Institute of Physical Education, Wuhan 430079, China;

<sup>2</sup>Hubei Provincial Key Laboratory of Sports Training Monitoring, Wuhan 430079, China)

**Abstract** The aim of this paper was to investigate the role and molecular mechanism of 8-week exercise in improving NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) in type II diabetic mice. Eight-week-old male m/m at SPF

收稿日期: 2022-10-04 接受日期: 2022-12-16

国家自然科学基金(批准号: 81601228)和教育部人文社会科学基金(批准号: 21YJA890014)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13627292193; E-mail: kouxianjuan@126.com

Received: October 4, 2022 Accepted: December 16, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81601228) and the Humanities and Social Sciences Foundation of the Ministry of Education (Grant No.21YJA890014)

\*Corresponding author. Tel: +86-13627292193, E-mail: kouxianjuan@126.com

level as control group (Con group), and eight-week-old male db/db mice at SPF level were randomly divided into four groups: type II diabetic model group (db group), type II diabetic exercise group (db+EX group), type II diabetic exercise combined with p38MAPK inhibitor group (db+EX+SB203580 group), and p38MAPK inhibitor group (db+SB203580 group), every group has 10 mice. Exercise intervention was performed 2 h after intraperitoneal injection of p38MAPK inhibitor, and the exercise intervention was performed for 40 minutes every day, 5 days every week for 8 weeks. The intervention effects of exercise intervention on NAFLD were evaluated by body weight, blood glucose, liver-to-body ratio, lipids, and HE, oil red and Masson staining in mice. The related protein and mRNA expression levels were determined by Western blot and qRT-PCR. The results showed that 8 weeks of exercising significantly reduced the increase in body weight, blood glucose, and liver-to-body ratio and decreased blood lipid levels in db/db mice. Exercise intervention reduced hepatic steatosis, collagen deposition and the expression levels of ACC1 and SREBF1 in mice. The p38MAPK inhibitor intervention exacerbated hepatic steatosis and collagen deposition, while exercise combined with p38 inhibitor did not have a synergistic effect. Exercise upregulated the protein expression levels of FNDC5 in mouse liver and muscle and also increased the *FNDC5* mRNA expression levels in mouse liver compared to the db model group. Exercise also decreased the expression of pro-apoptotic proteins BAX, Caspase8 and Caspase9 and increased the expression of anti-apoptotic protein BCL2 in db/db mice. In addition, the p38 inhibitor group decreased not only the expression of p-p38 protein in the liver of db/db mice, but also decreased the expression of FNDC5 protein in the liver and gastrocnemius muscle of db/db mice, which subsequently led to excessive apoptosis. Exercise combined with p38 inhibitor intervention reduced p-p38 protein expression, but did not significantly alter FNDC5 and apoptosis-related proteins. The above results suggest that 8 weeks of treadmill exercise can effectively alleviate NAFLD in type II diabetic mice, and the mechanism may be through the p38MAPK-dependent pathway to upregulate FNDC5 expression, reducing liver fibrosis, and attenuate apoptosis in mouse hepatocytes.

**Keywords** treadmill exercise; NAFLD; fibrosis; apoptosis; FNDC5

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是最常见的慢性肝病之一, 其患者约占全球人口的四分之一。其病理特征是肝脏脂质过度积累, 进而导致肝细胞损伤、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化和肝细胞肝癌。NAFLD 源于肝脏脂质代谢稳态失衡。近年来, 这一疾病的发病率逐渐上升, 并且呈年轻化态势发展。NAFLD 的发病因素受年龄、性别、饮食等多重因素影响, 最终引起肝脏代谢障碍。目前控制肝脏代谢失调的机制尚不完全清楚, 临床也缺少令人满意的药物。因此, 注重运动锻炼和控制饮食仍然是目前治疗 NAFLD 的主要方法<sup>[1]</sup>。II 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是 NAFLD 发展的一个重要危险因素, 它驱动肝损伤从单纯性脂肪变性发展为 NASH 和随后的肝纤维化。据统计 T2DM 患者中 NAFLD 的全球患病率为 55.5%, 而 T2DM 患者中 NASH 的患病率为 37.3%<sup>[2]</sup>。因此, 阐明 NAFLD 的发病机理以及探索有效的防治方法, 成

为亟需解决的重要课题。

研究表明, 运动训练能显著降低肝内脂肪的含量, 并且降低 NAFLD 患者血清中丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 的水平<sup>[3]</sup>。在高脂 (high-fat diet, HFD) 诱导的 NAFLD 小鼠模型中, 运动训练显著降低了肝脂肪变性和肝纤维化程度, 除此之外, 运动还可以将脂肪组织的极化从 M1 表型转变为 M2 表型<sup>[4-5]</sup>。已有研究证实运动小鼠的循环 Irisin 水平和肌肉 Irisin 表达水平显著增加, 表明 Irisin 可以介导运动对 NAFLD 的影响。体外研究表明, Irisin 可改善棕榈酸 (palmitic acid, PA) 刺激的小鼠正常肝细胞 (AML12) 的脂质代谢、纤维化和炎症<sup>[4]</sup>。Irisin 于 2012 年被发现, 是一种糖基化蛋白激素, 由纤维连接蛋白 III 型结构域包含蛋白 5 (fibronectin type III domain containing 5, FNDC5) 的蛋白水解切割形成, Irisin 存在于小鼠和人血浆中, 运动训练可以诱导人类肌肉中 *FNDC5* 基因的表达, 产生 Irisin, 它可以将白色脂肪转化为棕色脂肪, 从而增强代

代谢耦<sup>[6-7]</sup>。近年来, Irisin的研究已得到学者的广泛关注。研究表明, 在12周HFD喂养的肥胖小鼠模型中, FNDC5通过AMPK/mTOR介导的自噬和脂肪酸氧化增强从头脂肪生成从而减少肝脏脂质堆积, 而慢病毒载体介导的FNDC5过表达可防止肝脏脂肪变性、高脂血症和自噬受损<sup>[8]</sup>。ZHANG等<sup>[9]</sup>从原代大鼠脂肪细胞培养中发现, Irisin上调了棕色脂肪生热能力的调节因子的表达, 其机制可能是Irisin通过激活p38MAPK和ERK信号通路来刺激棕色脂肪特异性基因的表达。运动被认为是防治NAFLD的有效方法之一。但是运动是否通过依赖p38MAPK途径上调Irisin来改善NAFLD尚不明确。因此阐明运动诱导的Irisin在改善NAFLD过程中的分子机制具有重要意义。瘦素受体缺陷小鼠(db/db)小鼠是现阶段应用较为广泛的NAFLD动物模型, 因其体内的瘦素受体(leptin receptor, LepR)突变导致出现自发性肥胖、高血糖症、高脂血症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗和典型的肝脏脂肪变性等<sup>[10-12]</sup>。因此, 本研究采用db/db小鼠模型, 进行8周的有氧跑台运动干预, 同时, 采用跑台运动联合p38MAPK抑制剂(SB203580)来探讨运动是否通过p38MAPK信号途径上调FNDC5改善db/db小鼠NAFLD的具体机制, 为NAFLD治疗提供一定的理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组

8周龄的雄性m/m小鼠, 体质量 $23\pm 2$  g, db/db小鼠体质量 $39\pm 2$  g, 购于常州卡文斯实验动物有限公司, 许可证号为SCXK(苏)2016-0010。小鼠适应性饲养1周后, 将8周龄的雄性m/m小鼠作为阴性对照组(Con组,  $n=10$ ), 将40只8周龄db/db小鼠随机分为模型对照组(db组,  $n=10$ )、跑台运动组(db+EX组,  $n=10$ )、跑台运动联合p38MAPK抑制剂组(db+EX+SB203580组,  $n=10$ )、p38MAPK抑制剂组(db+SB203580组,  $n=10$ ), 实验期间均以普通饲料喂养。普通饲料均由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供。所有动物护理和实验程序均按照中国实验动物福利立法进行, 并经武汉体育动物伦理委员会批准(伦理审查批准号: 0087-202010-1301)。

### 1.2 运动和给药方案

对db+EX、db+EX+SB203580组进行跑台运动干预, 研究采取8周中等强度持续运动(moderate

intensity continuous training, MICT)方案, 且运动方案参照前人已经发表的运动方案, 其安全性、科学性和可行性都得到广泛验证<sup>[13]</sup>。跑台坡度 $0^\circ$ , 每次先以5 m/min的速度运动5 min, 再以10 m/min的速度运动30 min, 最后以5 m/min的速度运动5 min后停止训练, 每天有氧运动的合计时间为40 min, 每周干预5天, 持续运动8周; p38MAPK抑制剂按照5 mg/kg的剂量进行腹腔注射干预, 每周干预5天, 腹腔注射2 h后进行跑台运动干预, 持续腹腔注射8周。

### 1.3 实验药物与主要抗体

P38MAPK抑制剂(SB203580)购自MedChem Express公司;  $\beta$ -actin、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔/抗鼠购自Affinity公司; GAPDH、BCL2、CollagenI、ACC1、SREBF1购自Proteintech公司;  $\alpha$ -SMA、FNDC5购自Cell Signaling Technology公司; Caspase8、BAX购自Servicebio公司; Caspase9购自ELK Biotechnology公司。

### 1.4 实验动物取材

8周干预结束后, 禁食测血糖, 次日取材, 摘眼球取血, 分离血清备用摘取肝脏后, 称重, 切取部分肝脏于多聚甲醛固定。其余液氮冻存后转 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

### 1.5 生化检测指标及方法

实验期间, 每周固定时间检测小鼠体质量和空腹血糖。实验结束时, 眼球取血液静置2 h后离心后取适量血清, 按试剂盒提供的方法测定小鼠血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的表达水平。肝体比: 称量肝质量与体质量, 计算肝/体比值。

### 1.6 HE染色和油红染色

将小鼠肝脏组织固定于4%的多聚甲醛溶液浸泡过夜, 用刀片切取肝脏相同部位, 石蜡切片厚度约为 $5\ \mu\text{m}$ , 随后进行梯度乙醇脱水, 然后置于二甲苯中透明。以二甲苯替换出组织块的中酒精, 将已透明的组织块置于已溶化的石蜡中, 放入溶蜡箱保温( $37^\circ\text{C}$ )。待石蜡完全浸入组织块后进行包埋, 冷却凝固成块, 制备石蜡切片, 在显微镜下观察各组小鼠肝脏病理形态学。

### 1.7 Masson染色

用4%的多聚甲醛固定小鼠肝脏组织, 石蜡切片厚

表1 各基因引物序列  
Table 1 Primer sequences for each gene

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
Forward primer for GAPDH	GGT TGT CTC CTG CGA CTT CA
Reverse primer for GAPDH	TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC
Forward primer for Irisin	AGG TGC TGA TCA TTG TTG TGG T
Reverse primer for Irisin	CCT TGT TGT TAT TGG GCT CGT

度约5  $\mu\text{m}$ , 各组肝组织切片、脱蜡、苏木素染色、分化, Masson液中浸染5 min后水洗, 亮绿液染色1 min, 脱水, 经过二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察各组小鼠肝脏组织病理形态学。

### 1.8 实时荧光定量qRT-PCR

用UNIQ-10柱式Trizol总RNA提取试剂盒提取小鼠肝脏组织总RNA[试剂盒由生工生物工程(上海)股份有限公司提供], 经过RNA电泳检测, 按照相应步骤在定量PCR仪[StepOne Plus型荧光定量PCR仪(ABI, Foster, CA, USA)]获得反转录cDNA产物。之后进行荧光定量PCR检测, 以检测Irisin基因相对定量表达(引物序列见表1), 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算Irisin相对表达量。

### 1.9 免疫印迹

称取50 mg小鼠肝脏组织和腓肠肌提取蛋白, 使用BCA法测浓度, 将蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳, 并转膜至PVDF膜上, 再将其置于5%的脱脂奶粉室温封闭1 h。孵一抗(稀释比例均为1:1 000) 4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日洗涤后, 室温条件孵二抗(稀释比例为1:10 000)。孵育完成后, 将漂洗后的PVDF膜置于曝光仪中, 滴加化学发光液(A:B=1:1), 曝光并保存结果。

### 1.10 实验数据统计

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差表示, 结果用Prism Graphpad 9.0软件进行分析, 采用单因素方差分析(Analysis of variance, ANOVA)进行组间比较, 组间显著水平为 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.000 1$ 、 $P<0.000 01$ 。

## 2 结果

### 2.1 跑台运动改善NAFLD血脂水平、肝损伤和肝脏脂肪变性

2.1.1 运动改善NAFLD小鼠血糖、血脂水平 血脂含量的变化是作为治疗脂肪肝疗效的评价标准。

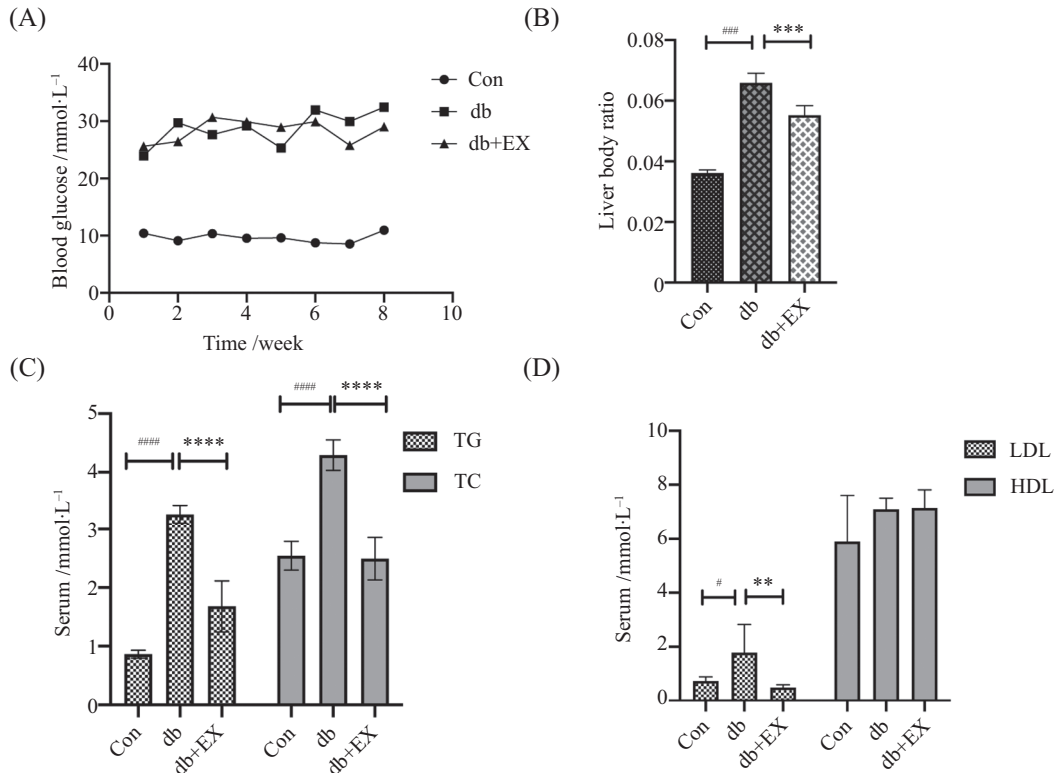
如图1所示: 与对照组相比, db/db模型组小鼠血糖、肝指数和小鼠血清中TG、TC、LDL表达水平升高( $P<0.05$ ,  $P<0.000 1$ ), HDL变化不明显; 然而, 与db模型组相比, 跑台运动组小鼠血糖和血清中的TG、TC、LDL水平明显下降。

2.1.2 运动改善高糖诱导的肝损伤 肝脏受到损伤时, ALT和AST会从细胞内渗出, 释放至血液中, 血清中ALT和AST含量的变化, 在一定程度上能够反映肝细胞损伤的程度。与对照组相比, db模型组小鼠血清ALT、AST含量明显升高( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), 提示模型组小鼠肝脏严重受损; 然而, 与模型组相比, 跑台运动能够降低db/db小鼠血清中的ALT、AST含量( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )(图2)。

2.1.3 跑台运动减轻db/db小鼠肝脏脂肪变性 肝脏HE和油红染色结果显示, 对照组的小鼠肝组织结构正常。模型组小鼠的肝脏颜色变黄、体积变大、表面油腻, 肝细胞内可见红染的脂滴, 数量多、体积大, 并且小鼠肝细胞肿胀和脂肪变性, 肝内广泛分布脂滴空泡, 部分肝细胞内可见气球样变及少量炎性小体、肝细胞核明显发生偏移; Masson染色结果显示, db模型组中小鼠肝脏有明显的纤维化和胶原沉积。而经过运动干预后小鼠的肝脏脂肪变性细胞减少、肝脏脂肪含量降低、体积明显减少, 并且小鼠肝脏中的胶原沉积明显减少(图3)。

### 2.2 跑台运动联合p38MAPK抑制剂加重db/db小鼠肝脏纤维化和肝脏脂肪变性

p38MAPK信号通路在Irisin诱导棕色脂肪细胞的出现中发挥重要作用, 为了检测p38信号对小鼠肝脏纤维化和脂肪变性的影响, 接下来我们检测了不同组中相关蛋白的表达水平。 $\alpha$ -SMA是肝星状细胞重要的功能标志, 肝星状细胞活化可以引起大量细胞外基质I型胶原(CollagenI)、II型胶原、III型胶原、IV型胶原沉积, 参与了肝纤维化的发生和发展。如图4B所示, 与形态学研究相一致, Western blot检测结果显

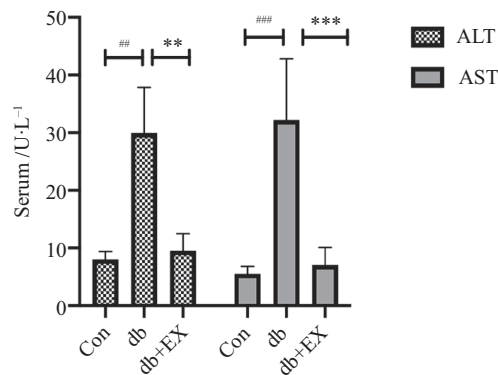


A: 各组小鼠8周血糖变化; B: 各组小鼠肝体比; C: 各组小鼠血清中TG、TC表达水平; D: 各组小鼠肝体比各组小鼠血清中LDL、HDL表达水平。  
 $n=5$ ; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ , #### $P<0.0001$ , 与Con组比较; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , 与db组比较。

A: 8-week blood glucose changes in each group of mice; B: liver-to-body ratio in each group of mice; C: serum expression levels of TG and TC in each group of mice; D: liver-to-body ratio in each group of mice; serum expression levels of LDL and HDL in each group of mice.  $n=5$ ; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ , #### $P<0.0001$  compared with the Con group; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  compared with the db group.

图1 各组小鼠血糖、血清中血脂表达水平和肝体比

Fig.1 Expression level of blood glucose, blood lipid in serum and liver body ratio of mice in different groups



$n=5$ ; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ ; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

图2 各组小鼠血清中ALT和AST的含量

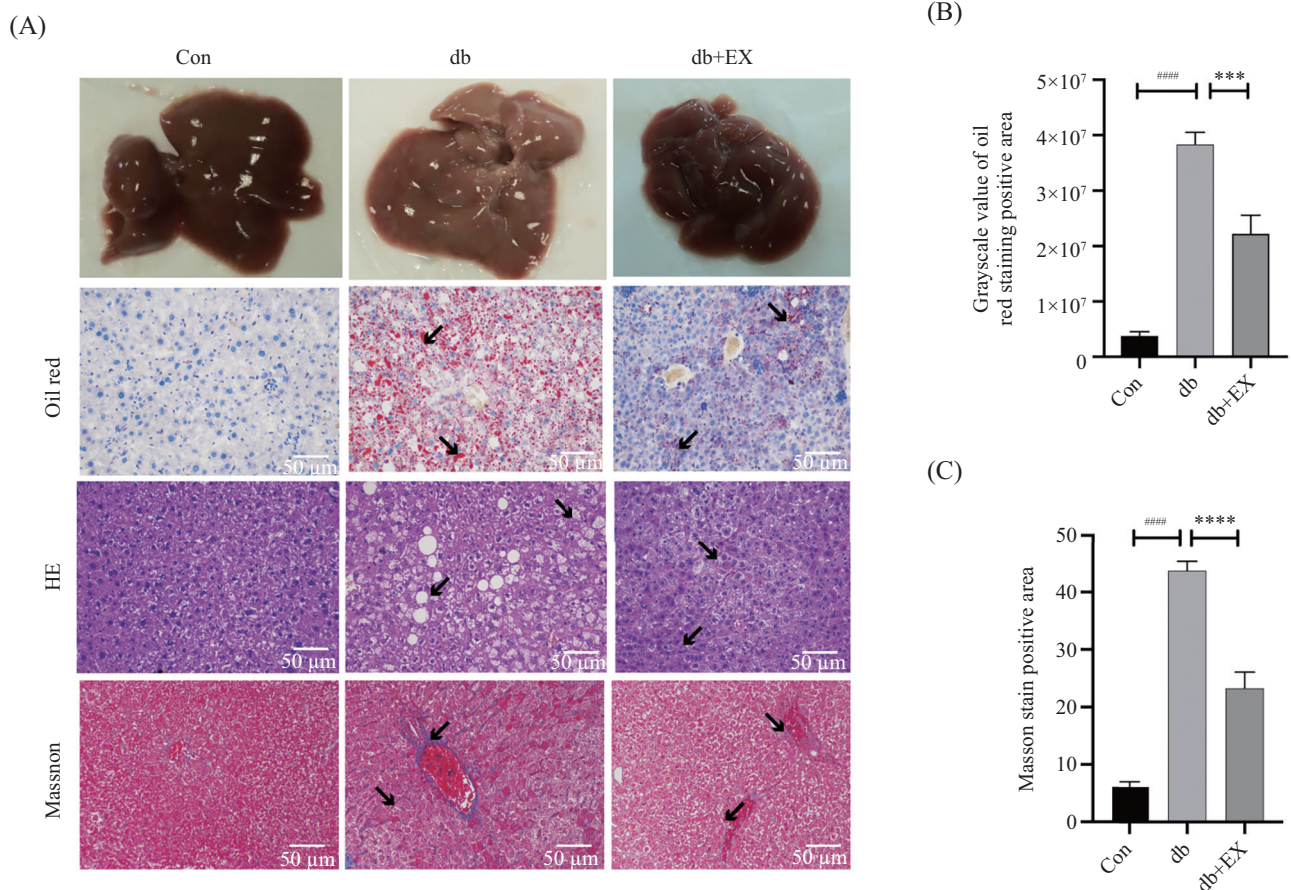
Fig.2 Contents of ALT and AST in the serum of different groups mice

示,与模型组相比,跑台运动干预不但降低了CollagenI和 $\alpha$ -SMA的蛋白表达水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),而且还减少脂肪从头合成的关键蛋白ACC1和SREBF1的表达水平( $P<0.001$ ,  $P<0.0001$ ),然而,单纯p38MAPK抑制剂干预增加了CollagenI( $P<0.05$ )、ACC1( $P<0.0001$ )、SREBF1( $P<0.0001$ )和 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平,运动联

合p38MAPK抑制剂组CollagenI、 $\alpha$ -SMA、ACC1和SREBF1蛋白表达差异无统计学意义。以上结果提示,抑制p38信号逆转了跑台运动对肝纤维化和脂肪变性的保护作用。

### 2.3 跑台运动依赖p38信号上调Irisin

为了进一步阐明跑台运动是否通过依赖p38信



A: 各组小鼠病理学染色变化; B: 油红O染色量化分析结果; C: Masson染色量化分析结果。n=3; ##### $P < 0.0001$ , 与Con组比较; \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , 与db组比较。

A: pathological staining changes in each group of mice; B: results of quantitative analysis of Oil Red O staining; C: results of quantitative analysis of Masson staining. n=3; ##### $P < 0.0001$  compared with the Con group; \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  compared with the db group.

图3 各组小鼠肝脏的形态学变化

Fig.3 Morphological changes of liver in different groups of mice

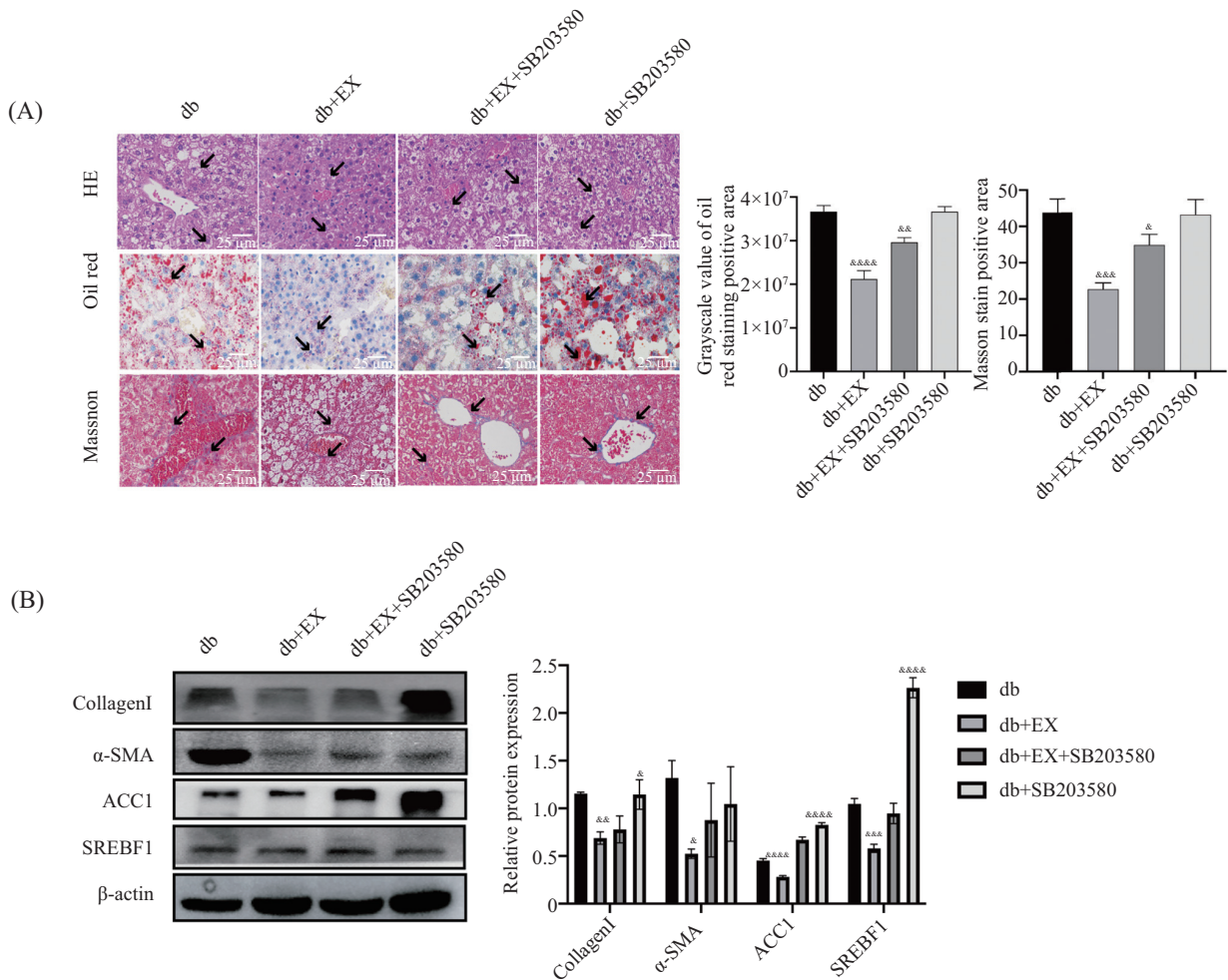
号诱导的Irisin来发挥保护作用,我们检测了跑台运动干预对p-p38和Irisin的影响。与模型组相比,跑台运动干预降低了db/db小鼠肝脏中p-p38蛋白表达水平( $P < 0.0001$ ),同时逆转了肝脏和腓肠肌中FNDC5蛋白表达水平的降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。除此之外,单纯p38MAPK抑制剂组小鼠肝脏中p-p38表达水平也降低( $P < 0.0001$ ),FNDC5蛋白有下降趋势,腓肠肌中FNDC5蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ );运动联合p38MAPK抑制剂干预也降低了p-p38蛋白表达水平( $P < 0.001$ ),但是对小鼠肝脏和肌肉中FNDC5表达没有显著影响。以上结果提示三种干预方式均可抑制db/db小鼠肝脏中p38MAPK通路的激活,但是运动联合p38MAPK抑制剂效果并没有达到一定的协同作用。

为了检测运动诱导肌肉中FNDC5的增加是否和肝脏的分泌有关,我们还检测了小鼠肝脏中

FNDC5 mRNA的转录水平,结果表明四组小鼠中的Irisin转录水平没有明显差异。与模型组相比,运动干预有上调FNDC5 mRNA表达水平的趋势,单纯p38MAPK抑制剂干预有下调FNDC5 mRNA表达水平的趋势,运动联合p38MAPK抑制剂组有进一步降低FNDC5 mRNA表达的趋势。上述数据表明,跑台运动干预可能主要是在翻译阶段对肌肉中的Irisin进行调控,且运动诱导的Irisin依赖p38信号。

#### 2.4 跑台运动减轻db/db小鼠肝细胞凋亡

肝细胞凋亡在NAFLD发生发展中发挥重要作用。与模型组相比,运动干预降低了促凋亡蛋白BAX、Caspase8、Caspase9的表达水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ),增加抗凋亡蛋白BCL2的表达水平( $P < 0.0001$ )。单纯p38MAPK抑制剂干预增加了BAX、Caspase8、Caspase9的表达水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ),BCL2蛋白表达水平无明显差异;



A: 各组小鼠肝脏病理学改变; B: 各组小鼠肝脏中 CollagenI、 $\alpha$ -SMA、SREBF1、ACC1 蛋白表达情况。n=3; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001, 与db组比较。

A: pathological changes in the liver of mice in each group; B: CollagenI,  $\alpha$ -SMA, SREBF1, ACC1 protein expression in the liver of mice in each group. n=3; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001 compared with db group.

图4 各组小鼠肝脏病理学改变和CollagenI、 $\alpha$ -SMA、SREBF1、ACC1蛋白的表达

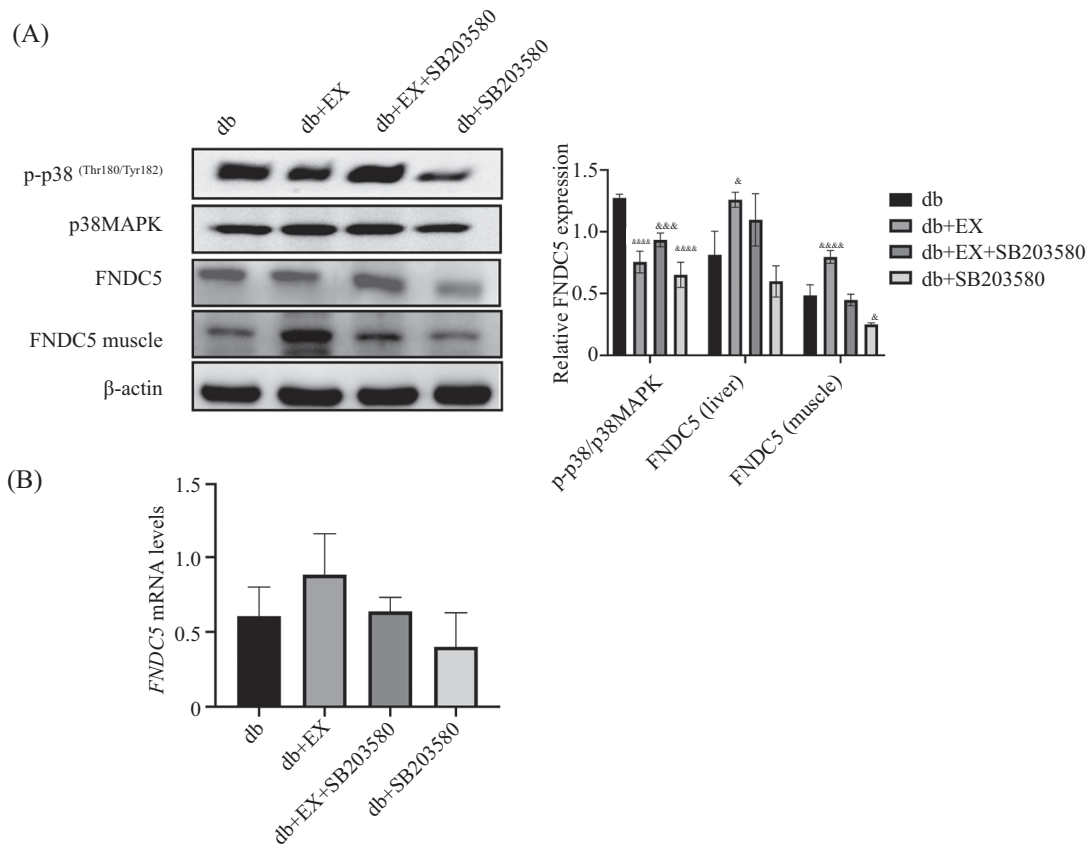
Fig.4 Pathological changes and protein level of CollagenI,  $\alpha$ -SMA, SREBF1 and ACC1 in different groups of mice

与跑台运动组相比, 运动联合p38MAPK抑制剂对凋亡相关蛋白表达无明显影响。

### 3 分析与讨论

T2DM与肝脏代谢密切相关, 可与NAFLD伴随或先后发生, NAFLD是以非酒精因素导致的、以肝细胞脂质蓄积为主要特征的病理综合征, 临床表现为肝内甘油三酯积聚造成肝细胞坏死性炎症, 长时间炎症则导致肝纤维化/肝硬化甚至肝癌<sup>[14-16]</sup>。db/db小鼠具有暴饮暴食、肥胖和胰岛素抵抗等特点, 并在正常饮食条件下自发发展为肝脂肪变性, 容易发生肝纤维化, db/db小鼠肝脏在16周龄时就出现严重损害, 主要表现为肝细胞脂肪变性、炎细胞浸润等, 属于NAFLD的遗传动物模型<sup>[17-19]</sup>。已经有研究

证实db/db小鼠模型中糖脂代谢紊乱, 胰岛素耐量实验(ITT)结果显示, 与db模型组相比, 跑台运动干预组ITT实验中的血糖及其曲线下面积有下降趋势, 口服糖耐量实验(OGTT)显示, db模型组小鼠OGTT血糖及其曲线下面积有增高趋势, 跑台干预组血糖下降速率上升, 提示运动可以改善db/db小鼠糖代谢<sup>[20]</sup>。与之前结果一致, 在本研究中, 我们发现17周龄的db/db小鼠肝脏可见明显的脂质堆积、轻度炎症浸润, 提示成功地建立了NAFLD动物模型。文献表明, 每次持续20~60 min的有氧和无氧运动, 每周练习4~7天, 持续至少6个月可以改善肝脏NASH患者的组织病理学和肝损伤<sup>[21]</sup>。另有来自临床的24例NAFLD患者肝活检研究结果表明, 每周进行3到5次有氧运动, 持续干预12周后发现运动组的患者肝脏纤维化和肝

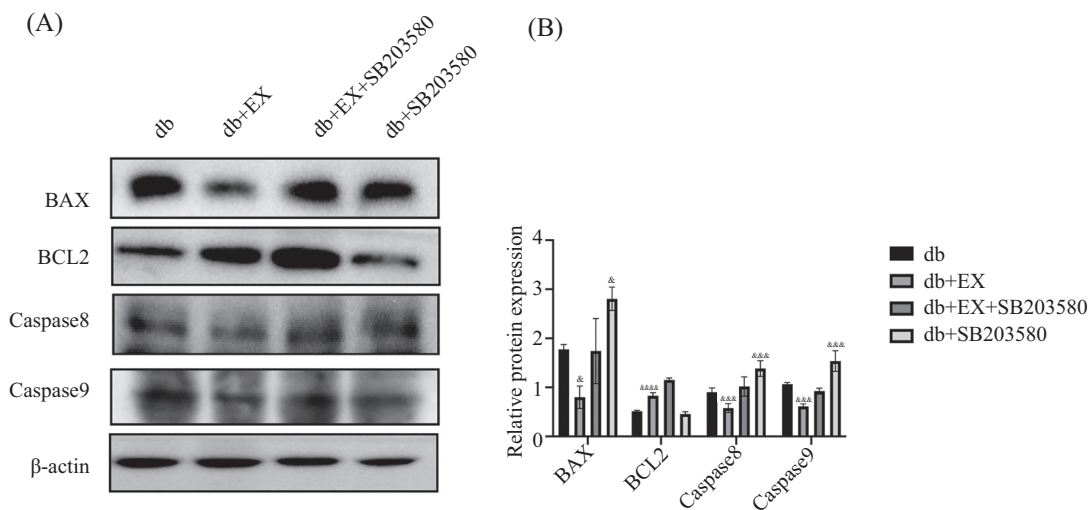


A: 各组小鼠 p-p38、FNDC5 蛋白表达; B: 各组小鼠 FNDC5 mRNA 表达水平。n=3; \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001, 与 db 组比较。

A: p-p38 and FNDC5 protein expression in mice of each group; B: FNDC5 mRNA expression level in mice of each group. n=3; \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001 compared with db group.

图5 各组小鼠 p-p38、FNDC5 蛋白和 FNDC5 mRNA 的表达

Fig.5 Expression of p-p38, FNDC5 protein and FNDC5 mRNA in different groups of mice



A: 各组小鼠肝脏中 BAX、BCL2、Caspase8、Caspase9 蛋白表达; B: 各组小鼠蛋白相对表达量柱状图。n=3; \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001, 与 db 组比较。

A: protein expression of BAX, BCL2, Caspase8, Caspase9 in the liver of mice in each group; B: histogram of relative protein expression in mice in each group. n=3; \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001 compared with db group.

图6 各组小鼠肝脏中 BAX、BCL2、Caspase8、Caspase9 蛋白表达

Fig.6 BAX, BCL2, Caspase8 and Caspase9 protein expression in different groups of mice



脏脂肪变性显著减少<sup>[22]</sup>。乙酰辅酶A羧化酶(acetyl CoA carboxylase, ACC)是调控丙二酰辅酶A转化为乙酰辅酶A的关键酶, 丙二酰辅酶A是脂肪酸代谢的关键调控因子, 控制着脂肪从头生成和脂肪酸氧化之间的平衡<sup>[23]</sup>。已有研究证实肝定向变构抑制ACC可显著降低肝脏丙二酰辅酶A水平和肝脏甘油三酯水平, 同时治疗(21天)也显著降低了高脂肪蔗糖饮食诱导的大鼠肝脏脂肪变性<sup>[24]</sup>。SREBF1是肝细胞中TG合成的关键调节转录因子, SREBF1的失调可以激活脂肪生成基因并且诱导TG含量增加<sup>[25]</sup>。肝纤维化是由各种因素引起的慢性肝损伤, 如非酒精性脂肪性肝炎、NAFLD, 肝星状细胞的激活(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化发生的中心环节, 激活的HSC和肌成纤维样细胞大量合成细胞外基质(extra cellular matrix, ECM), 如CollagenI、II型胶原、III型胶原、IV型胶原等, 从而导致胶原蛋白在内的细胞外基质蛋白积累和纤维性瘢痕形成, 促进肝纤维化和肝硬化<sup>[26-27]</sup>。我们的结果显示, 17周的db/db小鼠出现明显的肝功能损伤、脂滴增加、肝脏脂肪变性、纤维化和胶原沉积, 跑台运动持续干预8周可降低db/db小鼠肝脏中ACC1、SREBF1、 $\alpha$ -SMA、CollagenI蛋白表达、减轻肝脏脂肪变性和纤维化, 而加入p38MAPK抑制剂后进一步增加了ACC1和CollagenI沉积蛋白表达, 提示抑制p38信号可能会加重db/db小鼠肝脏脂肪变性和纤维化。

FNDC5是一种含有209个氨基酸残基的I型膜蛋白, 研究表明PGC-1 $\alpha$ 和运动可上调FNDC5的表达, FNDC5被蛋白质水解, 产生Irisin。Irisin是一种小分子多肽激素, 由骨骼肌分泌, 随运动而增加, 含111个氨基酸, FNDC5诱导皮下脂肪细胞褐变并介导运动对新陈代谢的有益影响, 作用于白色脂肪细胞, 诱导广泛的棕色脂肪样发育<sup>[6]</sup>。自被发现以来, Irisin一直对代谢性疾病, 包括肥胖、2型糖尿病、脂质代谢和心脏病、红细胞疾病、NAFLD、多囊卵巢综合征和代谢性骨疾病等有积极作用<sup>[28]</sup>。研究表明, 运动可以通过增加血液中Irisin的水平, 导致小鼠能量消耗增加, 从而改善肥胖和葡萄糖稳态<sup>[6]</sup>。XIONG等<sup>[29]</sup>发现在高脂饮食诱导的肥胖(diet-induced obesity, DIO)小鼠模型中, 重组Irisin降低了DIO小鼠的体质量和全身脂肪质量, 还能降低血糖、胰岛素和血脂水平, 并且可能逆转肝脏脂肪变性。在HFD诱导的肥胖小鼠模型中, FNDC5过表达或持续皮下注射Irisin可降

低肥胖小鼠血循环中胆固醇、甘油三酯以及游离脂肪酸水平, 这些结果表明, FNDC5/Irisin可改善肥胖小鼠的糖/脂代谢紊乱和胰岛素抵抗<sup>[30]</sup>。已有研究证实, 在胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)小鼠模型中, 长期高脂饮食干预可导致小鼠肝脏和血清中FNDC5和Irisin水平下降, 然而8周的有氧运动干预可以显著增加肝脏和血清中FNDC5和Irisin表达水平, 提示运动干预可能通过激活FNDC5/Irisin, 进而促进肝脏组织中Akt蛋白磷酸化激活和FoxO1磷酸化使其蛋白失活, 进而改善肝功能<sup>[31]</sup>。在小鼠AML12肝细胞和原代肝细胞中, Irisin可以通过抑制脂肪生成的两种主要调节因子(肝脏X受体- $\alpha$ 、SREBP-1)阻止棕榈酸诱导的肝细胞内脂质蓄积<sup>[32]</sup>。另一项研究表明, Irisin通过p38MAPK-PGC-1 $\alpha$ 途径增加小鼠成肌细胞C2C12对葡萄糖的摄取, 改善线粒体功能, 从而减轻胰岛素抵抗<sup>[33]</sup>。ZHANG等<sup>[9]</sup>发现, 在原代脂肪细胞和小鼠胚胎成纤维细胞3T3-L1来源的脂肪细胞中, Irisin可以通过p38MAPK和ERK通路诱导棕色脂肪细胞的出现, 从而潜在地预防肥胖和相关的II型糖尿病。研究证实, 注射携带人FNDC5 cDNA的腺病毒可增加血清Irisin, 抑制肝糖异生酶和脂肪生成酶, 降低肥胖小鼠肝脏甘油三酯的水平, 但是胆固醇水平没有显著变化。FNDC5/Irisin是组成型雄甾烷受体的直接转录靶标, 肝脏释放的Irisin作为旁分泌/自分泌因子通过5'-磷酸腺苷(AMP)激活的蛋白激酶途径抑制脂肪生成和糖异生, 通过腺病毒载体过表达Irisin可改善遗传诱导的肥胖小鼠的肝脂肪变性和胰岛素抵抗<sup>[34]</sup>。临床研究数据显示, Irisin对于NAFLD的作用也存在不一致性, 这种差异可能部分归因于人群(种族、年龄、性别、BMI、样本量)和方法差异(主要用于诊断NAFLD的方法), 很大程度上也是受限于大部分研究都是横断面的研究, 需要对这种差异组织学证实的NAFLD进行队列研究<sup>[28]</sup>。我们的数据显示, 在db/db小鼠肝脏中p38MAPK信号是异常激活的, 而跑台运动干预、p38MAPK抑制剂干预和运动联合p38MAPK抑制剂均可以抑制p38MAPK的磷酸化。除此之外, db/db小鼠肝脏和肌肉中FNDC5蛋白表达水平也降低, 同时肝脏中FNDC5 mRNA表达水平也呈现下降趋势, 而8周的跑台运动不仅可以增加肌肉中FNDC5的蛋白表达水平, 而且也增加肝脏中FNDC5蛋白水平。有意思的是, p38MAPK抑制剂处理部分逆转了db/db小鼠肝脏和腓肠肌中FNDC5

蛋白表达水平升高,而运动联合p38MAPK抑制剂对抑制p38信号并没有出现叠加效应。我们推测这可能是跑台运动干预已经抑制了p38的过度磷酸化,而再加入p38MAPK抑制剂对抑制p38信号不再具有协同效应。除此之外,db/db小鼠肝脏中FNDC5 mRNA也呈现下降趋势,表明跑台运动可能通过依赖p38MAPK途径上调FNDC5减轻NAFLD。在本研究中,我们发现运动干预诱导肌肉中的Irisin上升更加明显,我们推测跑台运动诱导的肌肉中Irisin也可能分泌到肝脏中发挥作用,但是具体的途径需要进一步深入研究。

细胞凋亡是NAFLD中脂肪性肝炎的早期事件,在6周高脂饮食诱导的肝脏脂肪变性小鼠模型中,原代肝细胞用35 mmol/L葡萄糖孵育12 h后导致细胞活力显著降低,细胞凋亡增加,表现为促凋亡因子BAX表达水平升高,而抗凋亡因子BCL-2和BCL-xL的表达下降<sup>[35]</sup>。在NAFLD的进程中,BCL-2的表达降低,破坏了BAX和BCL2之间的平衡,导致BAX相对过表达,最终导致肝脏发生过度的细胞凋亡。研究发现,过表达Irisin可增加小鼠C2C12成肌细胞的增殖,降低未分化成肌细胞对高糖刺激的敏感性,抑制细胞凋亡,且通过细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal regulated kinase1/2, ERK1/2)磷酸化的增强,促进胰岛素刺激的葡萄糖摄取<sup>[36]</sup>。此外,研究发现在体外(大鼠胰岛细胞瘤细胞,INS-1细胞)和体内(T2DM大鼠模型)实验中,Irisin可以促进INS-1细胞的增殖,其机制是通过ERK和p38MAPK信号通路调节Bad、BAX、BCL-2和BCL-xL的表达,并改善胰腺β细胞的表达,从而保护细胞免受高糖诱导的细胞凋亡<sup>[37]</sup>。p38MAPK信号通路作为MAPK家族的重要组成部分,已被证明通过激活BAX易位、增强Caspase-3活化、提高c-myc表达和磷酸化p53水平来调节细胞凋亡<sup>[38-39]</sup>。李翰等<sup>[40]</sup>研究发现,游泳训练可以改善糖尿病大鼠神经元形态结构,可能与其减少BAX、Caspase-3表达水平,增加BCL2表达水平,降低海马细胞凋亡率,以维持细胞形态结构完整性与功能性有关。在本研究中,我们发现糖尿病高糖状态下导致小鼠肝脏凋亡增加,8周跑台运动可以减少糖尿病小鼠肝细胞凋亡。另外,加入p38MAPK抑制剂会增加促凋亡BAX、Caspase8和Caspase9的蛋白表达水平,提示抑制p38信号可能会进一步加重糖尿病小鼠肝脏中的细胞凋亡,原因可能是抑制p38信

号会减少FNDC5表达水平,继而肝细胞出现过度的细胞凋亡。当然,我们的研究也存在一定的不足,跑台运动是否会对雌性NAFLD小鼠产生类似的影响值得进一步研究。

综上所述,8周跑台运动可有效缓解II型糖尿病小鼠NAFLD,其机制可能与跑台运动通过p38MAPK依赖途径上调FNDC5、降低肝脏纤维化、抑制小鼠肝细胞凋亡有关。

### 参考文献 (References)

- [1] YANG J, FERNANDE-GALILEA M, MARTINEZ-FERNANDEZ L, et al. Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: effects of omega-3 fatty acid supplementation [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): 872.
- [2] YOUNOSSEI Z M, GOLABI P, DE AVILA L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 793-801.
- [3] FARZANEGI P, DANA A, EBRAHIMPOOR Z, et al. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): roles of oxidative stress and inflammation [J]. *Eur J Sport Sci*, 2019, 19(7): 994-1003.
- [4] ZHU W, SAHAR N E, JAVAID H M A, et al. Exercise-induced Irisin decreases inflammation and improves NAFLD by competitive binding with MD2 [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3306.
- [5] KAWANISHI N, YANO H, YOKOGAWA Y, et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice [J]. *Exerc Immunol Rev*, 2010, 16: 105-18.
- [6] BOSTROM P, WU J, JEDRYCHOWSKI M P, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 463-8.
- [7] TIMMONS J A, BAAR K, DAVIDSEN P K, et al. Is Irisin a human exercise gene [J]? *Nature*, 2012, doi: 10.1038/nature11364.
- [8] LIU T Y, XIONG X Q, REN X S, et al. FNDC5 alleviates hepatosteatosis by restoring AMPK/mTOR-mediated autophagy, fatty acid oxidation, and lipogenesis in mice [J]. *Diabetes*, 2016, 65(11): 3262-75.
- [9] ZHANG Y, LI R, MENG Y, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling [J]. *Diabetes*, 2014, 63(2): 514-25.
- [10] GUIBAUD A, HOWSAM M, NIQUET-LERIDON C, et al. The LepR(db/db) mice model for studying glycation in the context of diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2019, 35(2): e3103.
- [11] FAITA F, DI LASCIO N, ROSSI C, et al. Ultrasonographic characterization of the db/db mouse: an animal model of metabolic abnormalities [J]. *J Diabetes Res*, 2018, doi: 10.1155/2018/4561309. eCollection 2018.
- [12] ANSTEE Q M, GOLDIN R D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research [J]. *Int J Exp Pathol*, 2006, 87(1): 1-16.
- [13] FREDRICKSON G, BARROW F, DIETSCH K, et al. Ex-

- ercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH [J]. *Mol Metab*, 2021, doi: 10.1016/j.molmet.2021.101270.
- [14] XU Y, HU S, JADHAV K, et al. Hepatocytic activating transcription factor 3 protects against steatohepatitis via hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  [J]. *Diabetes*, 2021, 70(11): 2506-17.
- [15] TANASE D M, GOSAV E M, COSTEA C F, et al. The intricate relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM), insulin Resistance (IR), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *J Diabetes Res*, 2020, doi: 10.1155/2020/3920196.eCollection 2020.
- [16] 于文雪, 孙禹欣, 金莉莉, 等. NAFLD的发病机制与新型治疗药物研发[J]. *中国细胞生物学学报*(YU W X, SUN Y X, JIN L L, et al. Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease and development of new therapeutic drugs [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2020, 42(3): 499-506.
- [17] SAHAI A, MALLADI P, PAN X, et al. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(5): G1035-43.
- [18] JAHN D, KIRCHER S, HERMANN S H M, et al. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(5): 943-53.
- [19] 康佳丽, 梁伟时, 孟徐兵, 等. 自发性2型糖尿病db/db小鼠肝病理损伤特点[J]. *中国比较医学杂志*(KANG J L, LIANG W S, MENG X B, et al. Pathological characteristics of liver injury in spontaneous type 2 diabetic db/db mice [J]. *Chines Journal of Comparative Medicine*), 2018, 28(11): 27-30,47.
- [20] 石新宇. 有氧运动联合维生素D对db/db小鼠肝脏NF- $\kappa$ B炎症及抗氧化酶的影响研究[J]. *体育科技文献通报*(SHI X Y. Effects of aerobic exercise combined with vitamin D on liver NF- $\kappa$ B inflammation and antioxidant enzymes in db/db mice [J]. *Bulletin of Sport Science and Technology*), 2022, 30(3): 262-8.
- [21] ECKARD C, COLE R, LOCKWOOD J, et al. Prospective histopathologic evaluation of lifestyle modification in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized trial [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2013, 6(4): 249-59.
- [22] OGORMAN P, NAIMIMOHASSES S, MONAGHAN A, et al. Improvement in histological endpoints of MAFLD following a 12-week aerobic exercise intervention [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2020, 52(8): 1387-98.
- [23] SUMIDA Y, YONEDA M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH [J]. *J Gastroenterol*, 2018, 53(3): 362-76.
- [24] GOEDEKE L, BATES J, VATNER D F, et al. Acetyl-coA carboxylase inhibition reverses NAFLD and hepatic insulin resistance but promotes hypertriglyceridemia in rodents [J]. *Hepatology*, 2018, 68(6): 2197-211.
- [25] HORTON J D, SHIMOMURA I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10(2): 143-50.
- [26] AYDIN M M, AKCAI K C. Liver fibrosis [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2018, 29(1): 14-21.
- [27] KUMAR S, DUAN Q, WU R, et al. Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, doi: 10.1016/j.addr.2021.113869.
- [28] POLYZOS S A, ANASTASILAKKIS A D, EFSTATHIOU Z A, et al. Irisin in metabolic diseases [J]. *Endocrine*, 2018, 59(2): 260-74.
- [29] NIRANJAN S B, BELWALKAR S V, TAMBE S, et al. Recombinant Irisin induces weight loss in high fat DIO mice through increase in energy consumption and thermogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(2): 422-9.
- [30] XIONG X Q, CHEN D, SUN H J, et al. FNDC5 overexpression and Irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(9): 1867-75.
- [31] 牟川, 陈庆果. 有氧运动抑制胰岛素抵抗小鼠肝脏糖异生及FNDC5/Irisin调控研究[J]. *西安体育学院学报*(MOU C, CHEN Q G. Inhibition of aerobic exercise on liver gluconeogenesis in insulin resistant mice and the regulation of FNDC5/Irisin [J]. *Journal of Xi'an Physical Education University*), 2022, 39(3): 345-54.
- [32] PARK M J, KIM D I, CHOI J H, et al. New role of Irisin in hepatocytes: the protective effect of hepatic steatosis *in vitro* [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(9): 1831-9.
- [33] YE X, SHEN Y, NI C, et al. Irisin reverses insulin resistance in C2C12 cells via the p38-MAPK-PGC-1 $\alpha$  pathway [J]. *Peptides*, 2019, doi: 10.1016/j.peptides.2019.170120.
- [34] MO L, SHEN J, LIU Q, et al. Irisin is regulated by CAR in liver and is a mediator of hepatic glucose and lipid metabolism [J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(5): 533-42.
- [35] JIANG X, TANG X, ZHANG P, et al. Cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(2): 135-44.
- [36] YANO N, ZHANG L, WEI D, et al. Irisin counteracts high glucose and fatty acid-induced cytotoxicity by preserving the AMPK-insulin receptor signaling axis in C2C12 myoblasts [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 318(5): E791-e805.
- [37] LIU S, DU F, LI X, et al. Effects and underlying mechanisms of Irisin on the proliferation and apoptosis of pancreatic  $\beta$  cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175498.
- [38] ZHANG J K, DING M J, LIU H, et al. Regulator of G-protein signaling 14 protects the liver from ischemia-reperfusion injury by suppressing TGF- $\beta$ -activated kinase 1 activation [J]. *Hepatology*, 2022, 75(2): 338-52.
- [39] LAMY E, HERZ C, LUTZ-BONENGL S, et al. The MAPK pathway signals telomerase modulation in response to isothiocyanate-induced DNA damage of human liver cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53240.
- [40] 李翰, 王松涛, 常芸. 有氧运动和白藜芦醇对糖尿病大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. *中国体育科技*(LI H, WANG S T, CHANG Y. The effects of aerobic exercise and oral resveratrol on hippocampal neuron apoptosis in diabetic rats [J]. *China Sport Science and Technology*), 2018, 54(5): 77-87,122.