

花卫成,付鹏宇,张纓,等. 运动经 FoxO1-脂噬通路缓解 ApoE^{-/-}小鼠高脂血症的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 808-815.

Hua WC, Fu PY, Zhang Y, et al. Exercise alleviates hyperlipidemia *via* the FoxO1-lipophagic signaling pathway in ApoE^{-/-} mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 808-815.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.013

运动经 FoxO1-脂噬通路缓解 ApoE^{-/-} 小鼠高脂血症的研究

花卫成^{1,2}, 付鹏宇³, 张纓², 王林佳², 倪震¹, 龚丽景^{1*}

(1. 北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室, 北京 100084; 2. 北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084; 3. 西北工业大学体育部, 西安 710072)

【摘要】 目的 脂噬是一种针对脂肪的选择性自噬,受 FoxO1 调控。运动作为调节脂代谢紊乱疾病的有效手段,其在高脂血症的作用是否与 FoxO1-脂噬过程有关,目前尚无报道。本研究通过两种运动方式干预高脂血症模型小鼠,检测脂肪组织中脂噬相关指标的变化,以探究运动缓解高脂血症的可能作用机制。**方法** 选取 C57BL/6J 小鼠作为野生对照组(WT 组);载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠构建高脂血症模型,分为安静对照组(CON 组)、中强度持续运动组(MICT 组)和高强度间歇运动组(HIIT 组),干预 6 周,检测各组小鼠血脂水平,HE 染色观察脂肪细胞形态,RT-qPCR 和 Western Blot 测试脂肪组织中 PI3K、Akt/p-Akt、FoxO1/p-FoxO1 和自噬相关指标(Beclin1、Atg7、LC3、p62、Rab7)的变化。**结果** (1)CON 组血浆 TG、TC 和 LDL-C 水平较 WT 组显著增加,运动各组较 CON 组 TG、TC 水平显著降低($P < 0.01$)。(2)HE 染色发现 CON 组较 WT 组同一视野下脂肪细胞数量增加($P < 0.01$)。(3)CON 组较 WT 组 FoxO1、Beclin1、Atg7、LC3 和 Rab7 mRNA 表达增加,PI3K、p-Akt/Akt、p-FoxO1/FoxO1 和 P62 表达量减少($P < 0.01$),Beclin1、Atg7、LC3、Rab7 蛋白含量增加($P < 0.01$);MICT 组和 HIIT 组较 CON 组 FoxO1、Beclin1、LC3、Atg7 和 Rab7 mRNA 表达降低,PI3K、p-Akt/Akt、p-FoxO1/FoxO1 和 p62 蛋白含量增加($P < 0.05$)或($P < 0.01$),Beclin1、Atg7、LC3、Rab7 蛋白含量降低($P < 0.05$)或($P < 0.01$)。**结论** 上述结果表明 MICT 和 HIIT 均可通过抑制脂肪细胞 FoxO1-脂噬通路调节血脂水平、改善高脂血症。

【关键词】 ApoE^{-/-}小鼠;脂噬;FoxO1;中强度持续运动;高强度间歇运动

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)06-0808-08

Exercise alleviates hyperlipidemia *via* the FoxO1-lipophagic signaling pathway in ApoE^{-/-} mice

HUA Weicheng^{1,2}, FU Pengyu³, ZHANG Ying², WANG Linjia², NI Zhen¹, GONG Lijing^{1*}

(1. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing 100084, China.

2. Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing 100084. 3. Sports Department of Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072)

Corresponding author: GONG Lijing. E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

【Abstract】 Objective Lipophagy is a type of selective autophagy that targets fat and is regulated by FoxO1. Exercise is an effective method to regulate lipid metabolism disorders. Whether the regulation of hyperlipidemia is mediated by the FoxO1-lipophagy pathway remains unreported. In this study, two types of exercise were used as interventions in

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金资助课题(校 2020057)。

Supported by Fundamental Research Funds for the Central Universities of China(U2020057)。

[作者简介] 花卫成(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:运动与脂肪代谢。Email: 2019210254@bsu.edu.cn

[通信作者] 龚丽景(1981—),女,副研究员,博士,研究方向:运动与脂肪代谢,低氧与胃肠道、骨骼肌萎缩。

Email: lijing.gong@bsu.edu.cn

hyperlipidemia model mice, and the changes in lipophagy-related indexes in adipose tissue were detected to explore the possible mechanism by which exercise alleviates hyperlipidemia. **Methods** C57BL/6J mice were selected as the wild-type control group (WT group). The hyperlipidemia model was constructed by apolipoprotein E gene knockout (ApoE^{-/-}), and mice were divided into three groups; the silent control group (CON group), moderate-intensity continuous training group (MICT group) and high-intensity intermittent training group (HIIT group). After 6 weeks of intervention, the blood lipid levels in each group were detected, and the morphology of adipocytes was observed by HE staining. The changes in PI3K, Akt/p-Akt, FoxO1/p-FoxO1 and autophagy-related indexes (Beclin1, Atg7, LC3, p62 and Rab7) in adipose tissue were measured by RT-qPCR and Western Blot. **Results** (1) Plasma TG, TC and LDL-C levels in the CON group were significantly increased compared with the WT group, and TG and TC levels in the exercise groups were significantly decreased compared with the CON group ($P < 0.01$). (2) HE staining showed that the number of adipocytes in the CON group were increased, compared with the WT group in the same field ($P < 0.01$). (3) Compared with the WT group, the mRNA expression levels of FoxO1, Beclin1, Atg7, LC3 and Rab7 were increased in the CON group, and the expression levels of PI3K, p-Akt/Akt, p-FoxO1/FoxO1 and P62 were decreased ($P < 0.01$). In addition, Beclin1, Atg7, LC3 and Rab7 protein contents were increased ($P < 0.01$). The mRNA levels of FoxO1, Beclin1, LC3, Atg7 and Rab7 in the MICT group and HIIT group were lower than those in the CON group, whereas the protein contents of PI3K, p-Akt/Akt, p-FoxO1/FoxO1 and p62 were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The protein contents of Beclin1, Atg7, LC3 and Rab7 were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** These results suggest that both MICT and HIIT alleviate hyperlipidemia by inhibiting of the FoxO1-lipophagic signaling pathway in adipocytes, thereby regulating lipid levels.

【Keywords】 ApoE^{-/-} mice; lipophagy; FoxO1; moderate-intensity continuous exercise; high-intensity intermittent exercise

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高脂血症(hyperlipidemia, HL)是一种发病率逐年升高的全球性慢性疾病,参与动脉粥样硬化、II型糖尿病和非酒精性脂肪肝等疾病的发生发展,临床特征表现为血液中脂质和脂蛋白含量升高^[1-2]。富甘油三酯的脂蛋白(TG-rich lipoproteins, TGRLs)负责将血液中的甘油三酯和胆固醇转运到血浆和其他组织,而载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)是TGRLs的重要组成部分^[3]。ApoE与脂质形成脂蛋白复合体来转运脂质,并且可以作为细胞表面脂蛋白受体的配体,介导脂质转运至组织细胞,ApoE缺乏会导致血液中TGRLs转运受阻,是诱发HL的关键因素^[4]。ApoE基因缺陷(ApoE^{-/-})小鼠3月龄左右自发产生高脂血症,而高脂饮食会进一步加重病情,是构建高脂血症的常用模型^[5]。

脂肪组织是调节能量代谢和糖脂代谢的中心^[6]。发生在脂肪细胞中的选择性自噬——脂噬,是一种新近发现的可以选择性识别脂质并将其降解的调节脂代谢稳态的生理过程。该过程能够选择性地动员脂滴中的脂质,经历启动和成核、自噬体的形成、自噬体与溶酶体融合和自噬溶酶体降解的步骤调节脂质代谢^[7]。在自噬启动阶段,肌球蛋白样Bcl-2结合蛋白(coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein 1, Beclin1)发挥重要作用^[8];选择性自噬接头蛋白1(sequestosome 1, SQSTM1/p62)能

将微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)招募到脂滴上,促进自噬体形成^[9];LC3被自噬相关蛋白7(autophagy related protein 7, Atg7)脂化,形成LC3 II,从而闭合自噬体^[10];在晚期自噬体的物质运输以及溶酶体的生物发生过程,Ras相关蛋白7(ras-related GTP-binding protein 7, Rab7)参与其中,并促进溶酶体和自噬体相互作用^[7]。自噬上游的磷酸肌醇3激酶/蛋白激酶B/叉头样转录因子O1(phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B/forkhead box of transcription factors O1, PI3K/Akt/FoxO1)信号通路是其重要调控通路。在脂肪组织中大量表达的FoxO1,属于Fox转录因子家族成员之一,是许多自噬基因(如Beclin1和LC3)的重要调控因子^[11],能促进自噬相关基因的转录,形成FoxO1-脂噬通路。经磷酸化修饰的FoxO1会与细胞核中的14-3-3蛋白结合并移出细胞核,降低其转录活性,使自噬水平下调^[12]。PI3K的激活会导致Akt磷酸化,并使下游的FoxO1磷酸化^[13]。

规律的运动训练具有降低血脂的功效已得到广泛证实^[14]。中等强度持续运动(moderate intensity continuous training, MICT)和高强度间歇运动(high-intensity intermittent training, HIIT)是目前在大众体育中广泛采用的两种健身方式^[15-16]。脂

代谢受到脂肪组织自噬水平的影响, FoxO1 又是调控自噬的重要转录因子。MICT 和 HIIT 发挥改善高脂血症的作用是否与 FoxO1-脂噬途径有关, 目前尚未见报道。因此, 本研究拟通过对比 MICT 和 HIIT 对高脂饮食饲喂的 ApoE 敲除小鼠脂肪组织 FoxO1-脂噬通路相关蛋白表达的影响, 探讨运动预防高脂血症的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 9 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 体重 (25.17 ± 0.35) g; 35 只 9 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J ApoE^{-/-}小鼠, 体重 (25.32 ± 0.85) g; 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。所有 ApoE^{-/-}小鼠均饲喂含 21% (w/w) 脂肪和 1.5% (w/w) 胆固醇的高脂饲料(北京科澳协力饲料有限公司, 中国); 野生型小鼠喂食含 4% ~ 5% (w/w) 脂肪的标准维持饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司, 中国)。所有小鼠饲养于北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0033】, 温度 22℃, 湿度 50% ~ 70%, 昼夜 12 h/12 h, 可自由进食和饮水, 在实验室适应 1 周后开始正式训练干预。本研究经北京体育大学运动科学实验伦理委员会批准(审批号 2019100A)。

1.1.2 主要试剂与仪器

脂肪固定液(G1119, Servicebio, 中国), RNA Store 样品保存液(DP408, TianGen, 中国), 血脂检测试剂盒(A111-1-1, A110-1-1, A113-1-1, A112-1-1; 南京建成, 中国), 定量 PCR 相关试剂(MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 9767, PrimeScriptTM Master Mix RR036A, SYBR Premix Ex Taq II RR820A; TaKaRa, 日本), RIPA 裂解液(P0013B, 碧云天, 中国), 蛋白酶/磷酸酶抑制剂(04693159001, 04906837001, Roche, 瑞士), BCA 试剂盒(PierceTM BCA Protein Assay Kit 23227, Thermo Fisher Scientific, 美国), Bolt LDS Sample Buffer(B0007, Novex, 美国), Bolt Reducing Agent(B0009, Novex, 美国), MES Running Buffer(B0002, Invitrogen, 美国), 4% ~ 12% Bis-Tris 梯度胶(NW04125, Invitrogen, 美国), iBlot 2 NC Regular Stacks(1B23001, Invitrogen, 美国), PI3K 抗体(Proteintech, 21890-1-AP), Akt 抗体(Abcam,

ab8805), Phospho-Akt 抗体(Cell Signaling Tech, 4060), FoxO1 抗体(Abcam, ab52857), Phospho-FoxO1 抗体(Abcam, ab131339), Beclin1 抗体(Proteintech, ab207612), Atg7 抗体(Proteintech, ab133528), LC3 抗体(Proteintech, 14600-1-AP), p62 抗体(Proteintech, ab109012), Rab7 抗体(Proteintech, ab137029), α -Tubulin(Proteintech, 66031-1-IG), Goat anti-Rabbit 抗体(LI-COR, 926-68071), Goat anti-Mouse 抗体(LI-COR 926-32210)。

动物跑台(LF8710MAP, Panlab, 美国), 酶标仪(BioTek Synergy H1, Bio Tek, 美国), 显微图象分析系统(DMI4000B, Leica, 德国), 超微量分光光度计(Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7500, Thermo Fisher Scientific, 美国), 蛋白转印仪(iBlot 2, Thermo Fisher Scientific, 美国), 双色红外荧光成像系统(Odyssey CLX, LI-COR, 美国)。

1.2 方法

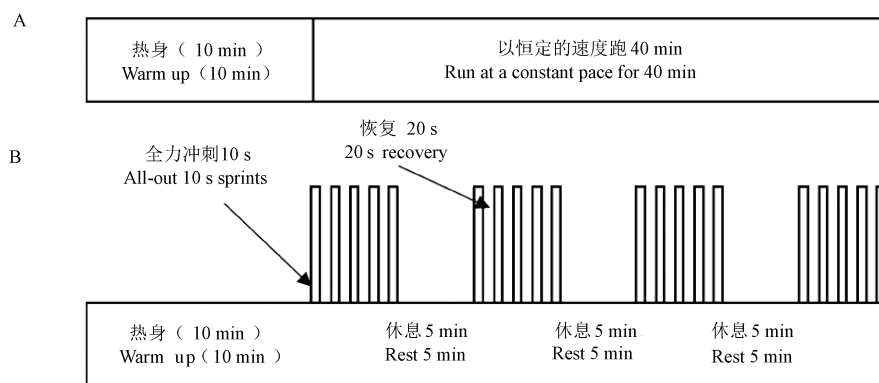
1.2.1 动物分组及实验干预

10 只 C57BL/6J 小鼠作为野生对照组(WT 组)。5 只 ApoE^{-/-}小鼠用于最大速度测试以制定训练方案, 其余 30 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为 3 组: ApoE^{-/-}安静对照组(CON 组)、ApoE^{-/-}中强度持续运动组(MICT 组)和 ApoE^{-/-}高强度间歇运动组(HIIT 组)。每组 10 只。

训练开始前用 5 只 ApoE^{-/-}小鼠进行最大速度测试, 根据测试结果制定训练方案。测试方案为 8 cm/s 速度热身 10 min, 之后每 3 min 增加跑速 2 cm/s, 直到力竭, 力竭时的速度为最大速度, 力竭判断标准为连续在电网上停留 3 s 或者电击次数达到 100 次^[16]。最大速度的测试结果为 (45 ± 4) cm/s。

HIIT 组和 MICT 组在开始前 4 d 进行适应性训练(每天在跑步机上跑 10 min, 速度逐渐增加, 分别为 10、12、14 和 16 cm/s)。从 10 周龄开始训练 6 周, WT 组和 CON 组不运动, MICT 组和 HIIT 组每周一、三、五上午 10:00 训练。如图 1, MICT 组在 10 min 热身($5 \text{ cm/s} \times 5 \text{ min} + 10 \text{ cm/s} \times 5 \text{ min}$)后进行 40 min 匀速跑, 速度为 40% 最大跑速(18 cm/s); HIIT 组在 10 min 热身($8 \text{ cm/s} \times 5 \text{ min} + 15 \text{ cm/s} \times 5 \text{ min}$)后进行四组 $5 \times 10 \text{ s}$ 的短跑, 间歇 20 s, 组间休息 5 min, 速度为 100% 最大跑速(45 cm/s)^[17]。

1.2.2 取材



注:A:MICT 组训练方案;B:HIIT 组训练方案。

图 1 MICT 组和 HIIT 组训练计划

Note. A. Training program of MICT group. B. Training program of HIIT group.

Figure 1 Schematic diagram of training program for MICT group and HIIT group

在训练干预结束 48 h 后取材,称重,麻醉,心脏穿刺取血,离心取血浆(4℃,3000 rpm,15 min),液氮速冻,-80℃保存。取附睾白色脂肪组织(epididymal WAT,eWAT),分成3份,一份存于固定液中,用于制备石蜡切片;一份存于 RNA 保存液中,4℃放置1 d后-80℃保存;一份液氮速冻,-80℃保存,用于 Western Blot 测试。

1.2.3 血液指标测试

按照试剂盒说明书检测血浆甘油三酯、总胆固醇(total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)含量。

1.2.4 脂肪组织形态学测试

脂肪组织经固定液固定后,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,显微图像分析系统观察,拍照,Image-pro Plus 6.0 软件统计组织细胞横截面积。

1.2.5 脂肪组织 mRNA 相对含量测试

引物序列由 Primerbank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>) 网站查询获得,见表 1,引物由 GENEWIZ 公司合成。称取 80 mg 附睾白色脂肪组织,按照试剂盒说明提取总 RNA,超微量分光光度计检测总 RNA 浓度,逆转录操作获取 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 扩增。以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因/内参基因的相对表达量。

1.2.6 脂肪组织蛋白相对含量测试

称取 80 mg 附睾白色脂肪组织,加入 500 μ L RIPA 裂解液,组织破碎机破碎细胞,分离出总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后制备蛋白样品。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,用蛋白转印仪将蛋白转印到 NC 膜

上,室温封闭液封闭 1 h 后孵育一抗(4℃,12 h),TBST 洗去未结合的一抗(3 $\times$ 10 min),室温孵育二抗 1 h,TBST 洗去未结合的二抗(3 $\times$ 10 min),TBS 洗涤(2 $\times$ 5 min),滤纸吸干后双色红外荧光成像系统曝光,Image Studio 软件进行相对定量分析。抗体信息见 1.1.2。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

引物 Primers	序列 Sequences	长度(bp) Size(bp)
Foxo1	F:5'-CCCAGGCCGGAGTTTAACC-3' R:5'-GTTGCTCATAAAGTCGGTGCT-3'	132
Beclin1	F:5'-ATGGAGGGGTCTAAGCGGTC-3' R:5'-TCCTCTCCTGAGTTAGCCTCT-3'	197
Atg7	F:5'-GTTCCGCCCTTTAATAGTGC-3' R:5'-TGAACCTCAACGTCAAGCGG-3'	161
LC3	F:5'-TTATAGAGCGATACAAGGGGAG-3' R:5'-CGCCGTCTGATTATCTTGATGAG-3'	109
Rab7	F:5'-AAGCCACAATAGGACGGAC-3' R:5'-AGACTGGAACCGTCTTGACC-3'	104
β -actin	F:5'-GGCTGTATTCCCTCCATCG-3' R:5'-CCAGTTGTAACAATGCCATGT-3'	154

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 25.0 软件分析,所有数据符合正态分布,结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。WT 组和 CON 组间采用独立样本 t 检验,CON 组、MICT 组和 HIIT 组间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 运动降低 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平

6 周干预结束后,WT 组小鼠体重为(28.55 $\pm$ 1.44) g,CON 组为(30.34 $\pm$ 1.50) g,MICT 组

(30.53 ± 0.36)g, HIIT 组为(29.63 ± 0.56)g, 各組间无显著性差异。血液指标结果表明, CON 组 TG、TC 和 LDL-C 均显著高于 WT 组($P < 0.01$), MICT

组和 HIIT 组 TG 和 TC 水平显著低于 CON 组($P < 0.01$), MICT 组 HDL-C 显著高于 CON 组和 HIIT 组($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 小鼠血浆 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Results of TC, TG, HDL-C and LDL-C in mice plasma($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	甘油三酯 (mmol/L) TG (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L) TC (mmol/L)	高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) HDL-C (mmol/L)	低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) LDL-C (mmol/L)
WT 组 WT group	0.53 ± 0.03	4.95 ± 0.16	2.88 ± 0.28	0.46 ± 0.16
CON 组 CON group	$7.52 \pm 1.48^{**}$	$32.48 \pm 4.14^{**}$	$2.93 \pm 1.11^{\#}$	$7.98 \pm 1.57^{**}$
MICT 组 MICT group	$5.32 \pm 0.45^{##}$	$25.00 \pm 1.36^{##}$	$4.76 \pm 2.01^{\#}$	7.30 ± 2.25
HIIT 组 HIIT group	$5.83 \pm 0.68^{##}$	$24.15 \pm 3.07^{##}$	$3.01 \pm 0.97^{\&}$	7.33 ± 1.30

注: 与 WT 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 CON 组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与 MICT 组相比, $^{\&}P < 0.05$, $^{\&\&}P < 0.01$ 。(下同)

Note. Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with CON group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$. Compared with MICT group, $^{\&}P < 0.05$, $^{\&\&}P < 0.01$. (The same in the following figures)

2.2 ApoE^{-/-}小鼠脂肪细胞横截面积减小

6 周干预结束后, 各組小鼠 eWAT 脂肪细胞 HE 染色图片如图 2A 所示。野生型小鼠脂肪细胞横截面积明显大于 ApoE^{-/-}小鼠。CON 组脂肪细胞横截面积(1631.08 ± 375.96) μm^2 与 WT 组(2847.48 ± 556.59) μm^2 相比显著降低($P < 0.05$), MICT 组(1789.69 ± 451.40) μm^2 和 HIIT 组(1872.79 ± 402.86) μm^2 与 CON 组相比无显著性差异, 见图 2B。

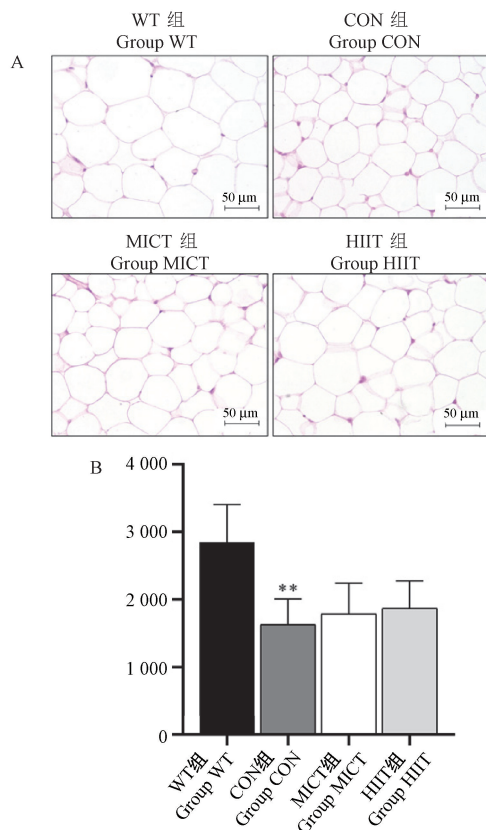


图 2 MICT 和 HIIT 对小鼠附睾脂肪组织细胞横截面积的影响

Figure 2 Effects of MICT and HIIT on adipocyte cross-sectional area of eWAT in mice

2.3 运动下调 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织 FoxO1-自噬相关基因的 mRNA 表达

6 周干预结束后, 各組小鼠 eWAT 实时荧光定量 PCR 结果如图 3 所示。CON 组较 WT 组 FoxO1、Beclin1、LC3、Atg7 和 Rab7 mRNA 相对表达水平显著升高($P < 0.01$)。MICT 组和 HIIT 组 FoxO1、Beclin1、LC3、Atg7 和 Rab7 mRNA 相对表达水平较 CON 组显著下降($P < 0.05$)或($P < 0.01$)。HIIT 组 Beclin1 mRNA 相对表达水平较 MICT 组显著升高($P < 0.05$)。

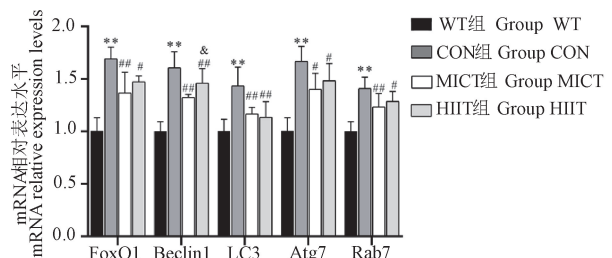


图 3 MICT 和 HIIT 对小鼠附睾脂肪组织 FoxO1-自噬相关基因 mRNA 表达的影响

Figure 3 Effects of MICT and HIIT on mRNA relative expression levels of FoxO1-Autophagy-associated proteins from eWAT in mice

2.4 运动激活 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织 PI3K/Akt/FoxO1 通路并促进自噬

6 周干预结束后, CON 组较 WT 组 PI3K、p-Akt 和 p-FoxO1 蛋白相对表达水平显著下降($P < 0.01$), p-Akt/Akt 和 p-FoxO1/FoxO1 显著下降($P < 0.01$); MICT 组和 HIIT 组较 CON 组 PI3K、p-Akt 水平以及 p-Akt/Akt 和 p-FoxO1/FoxO1 显著上升($P < 0.01$), Foxo1 水平显著下降($P < 0.01$); HIIT 组较 CON 组 Akt 水平显著下降($P < 0.01$), 较 MICT 组 PI3K、Akt、p-Akt、FoxO1 和 p-FoxO1 蛋白相对表达

水平显著下降($P < 0.01$)或($P < 0.05$), p-Akt/Akt 比值显著上升($P < 0.05$), 见图 4A, 4B。

自噬相关蛋白表达情况如图 4C, 4D 所示, CON 组较 WT 组 Beclin1、Atg7、LC3 II/I 和 Rab7 显著上升($P < 0.01$), p62 水平显著下降($P < 0.05$); MICT

组和 HIIT 组较 CON 组 Beclin1、Atg7、LC3 II/I 和 Rab7 水平显著下降($P < 0.01$), MICT 组和 HIIT 组较 CON 组 p62 水平显著上升($P < 0.01$)或($P < 0.05$); HIIT 组较 MICT 组 Beclin1、Atg7、LC3 II/I 和 Rab7 水平显著下降($P < 0.01$)或($P < 0.05$)。

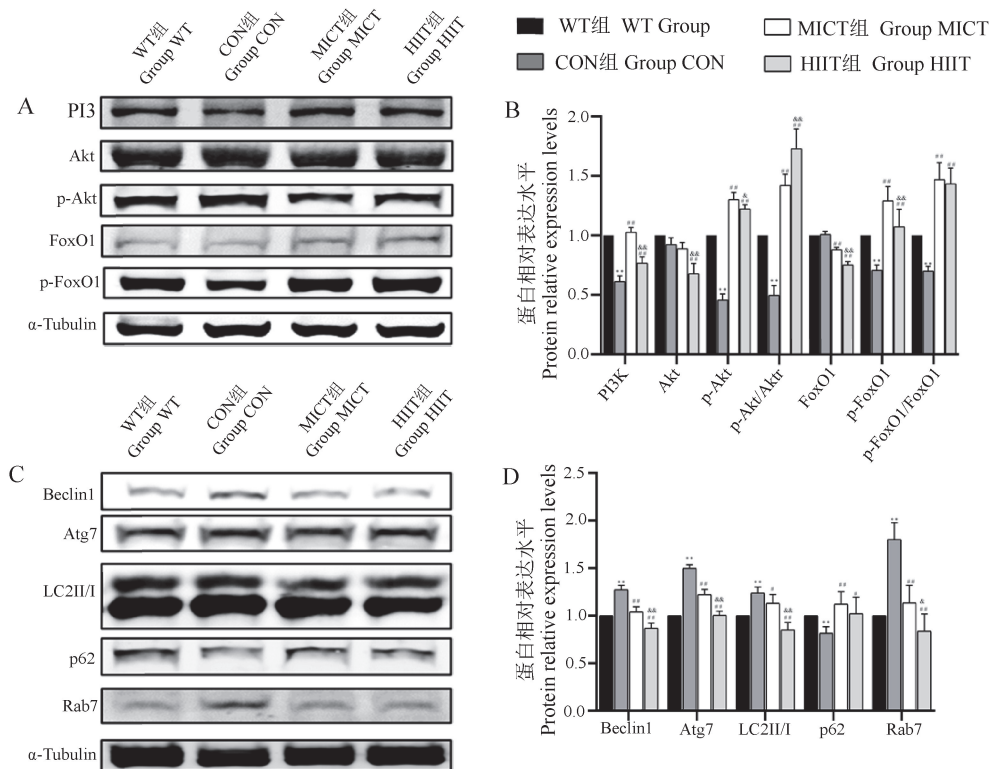


图 4 MICT 和 HIIT 对小鼠附睾脂肪组织蛋白相对表达水平的影响

Figure 4 Effects of MICT and HIIT on protein relative expression levels of eWAT in WT mice and ApoE^{-/-} mice

3 讨论

ApoE^{-/-}小鼠会从 3 ~ 4 月龄开始自发产生高脂血症和动脉粥样硬化, 高脂肪饮食会进一步加剧和加速病情^[18]。本研究中 10 周龄 ApoE^{-/-}小鼠在饲喂高脂饲料 6 周后脂肪细胞横截面积变小, 同时血浆 TG、TC 和 LDL-C 水平升高, 这是由于 ApoE^{-/-}小鼠血液中脂蛋白, 如乳糜微粒(chylomicrons, CM)和极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)转运受阻, 难以运输到脂肪组织积累所致^[19]。

此外脂肪组织分解增加也会使 ApoE^{-/-}小鼠血脂升高^[20-21], 而脂噬过程可通过自噬溶酶体途径对脂肪组织中的脂滴进行选择降解^[22]。ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织处于炎症浸润状态, 诱发机体慢性炎症状态^[23], 白细胞介素-6(interleukin, IL-6)等炎症因子的表达会激活信号传导与转录激活因子(signal

transducer and activator of transcription 3, STAT3), 进而上调 FoxO1 的表达^[24], FoxO1 是介导自噬的关键核转录因子^[25]。此外 ApoE 缺失时 PI3K/Akt 信号通路受到抑制^[26], 进而降低 FoxO1 磷酸化水平。本研究 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织中 p-FoxO1/FoxO1 比值下降, 说明细胞核中 FoxO1 比例增加, 发挥转录作用, 导致下游自噬相关基因表达上调, 诱导 ApoE^{-/-}小鼠脂肪细胞面积减小, 血脂水平显著上升, 形成高脂血症^[27]。

MICT 是运动强度低、训练时间长的有氧运动, 其对有高脂血症和动脉粥样硬化倾向的 ApoE^{-/-}小鼠有预防作用。研究发现, 规律的跑台或游泳训练能够降低 ApoE^{-/-}小鼠血脂^[28], 减轻内质网应激介导的内皮功能障碍^[29], 缓解肝细胞胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病等症^[30]。而 HIIT 的特点是在短时间的高强度运动中穿插低强度运动或休息, 以减少训练时间并提供较大的生理刺激, 已被证明有

良好的减脂效果^[31]。但 HIIT 运动对 ApoE^{-/-}小鼠的影响研究不多见。本研究结果显示 HIIT 对 ApoE^{-/-}小鼠血脂有改善作用,降低了血浆 TG 和 TC 含量,与 MICT 结果一致;此外,MICT 还提高血浆 HDL-C 含量。两种运动使小鼠脂肪组织细胞横截面积有所增大,提示运动可促使血脂进入脂肪组织细胞储存,并降低 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织细胞脂解作用^[21]。

ApoE 基因缺失也是引起 II 型糖尿病的原因之一,II 型糖尿病会导致脂肪组织 PI3K/Akt 信号通路出现损伤,而运动可以上调 PI3K/Akt 信号通路,改善糖尿病大鼠糖脂代谢^[32-33]。虽然运动对脂噬的影响报道较少,但外源刺激如针刺可促进 PI3K 和 p-Akt 表达,降低海马自噬水平^[34]。Akt 磷酸化激活后可进一步磷酸化 FoxO1 的丝氨酸 256 位点 (S256) 并降低 FoxO1 结合目标 DNA 的能力^[35]。本研究中,MICT 和 HIIT 均可上调 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织中 PI3K 的表达,促进 Akt 磷酸化,增加 FoxO1 磷酸化水平和 p-FoxO1/FoxO1 比值,以抑制自噬相关基因和蛋白的表达^[35]。Beclin1 是 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶 (class III phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K III) 复合物的组成部分,在自噬启动阶段调节自噬相关蛋白如 LC3 的分布,而 Beclin1 和 LC3 又受到 FoxO1 的直接调控^[36]。本研究中,小鼠 MICT 和 HIIT 后脂肪组织中 Beclin1、Atg7 和 Rab7 mRNA 和蛋白表达水平下降,LC3 mRNA 表达水平及 LC3 II/I 比值下降,说明本研究的运动方式抑制了脂肪组织自噬。随着自噬水平下调,包含 Atg7、LC3 以及其他自噬相关蛋白表达的减少,延缓了自噬体膜的延伸;Rab7 随着自噬体形成附着在自噬体表面,介导自噬体与溶酶体结合形成成熟的自噬溶酶体,其含量的减少可能影响脂肪组织中自噬溶酶体的成熟^[37-38];接头蛋白 p62 在脂噬中负责将 LC3 招募到脂滴上,并随着待降解物质进入自噬溶酶体,随着自噬溶酶体的降解而降解^[39],本研究两种运动后脂肪组织 p62 蛋白表达水平上升,也说明了脂噬水平的下调^[40]。上述结果提示两种运动方式皆可通过促进 FoxO1 磷酸化以抑制 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织自噬,促进脂肪细胞代谢,降低血浆中 TG 和 TC 含量,改善高脂血症状。

综上所述,ApoE 基因缺失所致的高脂血症可激活脂噬水平;6 周 HIIT 和 MICT 均可通过激活 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织 PI3K/Akt 通路,促进 FoxO1

磷酸化,抑制脂噬,降低血脂水平,缓解高脂血症。

参 考 文 献 (References)

- [1] Pan X, Bradfield CA, Hussain MM. Global and hepatocyte-specific ablation of Bmal1 induces hyperlipidaemia and enhances atherosclerosis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13011.
- [2] Sfyr P, Matsakas A. Crossroads between peripheral atherosclerosis, western-type diet and skeletal muscle pathophysiology: emphasis on apolipoprotein E deficiency and peripheral arterial disease [J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 42.
- [3] Wang J, Perrard XD, Perrard JL, et al. ApoE and the role of very low density lipoproteins in adipose tissue inflammation [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 223(2): 342-349.
- [4] Gill PK, Dron JS, Berberich AJ, et al. Combined hyperlipidemia is genetically similar to isolated hypertriglyceridemia [J]. *J Clin Lipidol*, 2021, 15(1): 79-87.
- [5] 赵培, 谭鹤, 彭克楠, 等. 细颗粒物 PM_{2.5} 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响及机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 33-39.
Zhao P, Tan H, Peng KN, et al. Influence and mechanisms of fine particulates PM_{2.5} on atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 33-39.
- [6] Ferhat M, Funai K, Boudina S. Autophagy in adipose tissue physiology and pathophysiology [J]. *Antioxid redox signal*, 2019, 31(6): 487-501.
- [7] Schulze RJ, Sathyanarayan A, Mashek DG. Breaking fat: the regulation and mechanisms of lipophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(10): 1178-1187.
- [8] Cairó M, Villarroya J. The role of autophagy in brown and beige adipose tissue plasticity [J]. *J Physiol Biochem*, 2020, 76(2): 213-226.
- [9] Wang L, Zhou J, Yan S, et al. Ethanol-triggered lipophagy requires SQSTM1 in AML12 hepatic cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12307.
- [10] Wang X, Wu R, Lil Y, et al. m⁶A mRNA methylation controls autophagy and adipogenesis by targeting Atg5 and Atg7 [J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1221-1235.
- [11] Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, et al. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(10): e861.
- [12] Lettieri-Barbato D, Ioannilli L, Aquilano K, et al. FoxO1 localizes to mitochondria of adipose tissue and is affected by nutrient stress [J]. *Metabolism*, 2019, 95: 84-92.
- [13] Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(11): 1938-1945.
- [14] He N, Ye H. Exercise and hyperlipidemia [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1228: 79-90.
- [15] Miguet M, Fearnbach NS, Metz L, et al. Effect of HIIT versus MICT on body composition and energy intake in dietary restrained and unrestrained adolescents with obesity [J]. *Appl Physiol Nutr*

- Metab, 2020, 45(4): 437-45.
- [16] Groussard C, Maillard F, Vazeille E, et al. Tissue-specific oxidative stress modulation by exercise: a comparison between MICT and HIIT in an obese rat model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1965364.
- [17] Lavier J, Beaumann M, Ménétrey S, et al. Supramaximal intensity hypoxic exercise and vascular function assessment in mice [J]. *J Vis Exp*, 2019, 145: 2-9.
- [18] Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, et al. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse [J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19(1): 22.
- [19] Wang J, Perrard XD, Perrard JL, et al. ApoE and the role of very low density lipoproteins in adipose tissue inflammation [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 223(2): 342-349.
- [20] Dong M, Yang XY, Lim S, et al. Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 118-129.
- [21] Sui WH, Li HS, Yang YL, et al. Bladder drug mirabegron exacerbates atherosclerosis through activation of brown fat-mediated lipolysis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(22): 10937-10942.
- [22] Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(5): 741-756.
- [23] Pereira SS, Teixeira LG, Aguilar EC, et al. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice fed high fat diet [J]. *Anim Sci J*, 2012, 83(7): 549-555.
- [24] You L, Wang Z, Li H, et al. The role of STAT3 in autophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 729-739.
- [25] Li KQ, Deng Y, Deng GM, et al. High cholesterol induces apoptosis and autophagy through the ROS-activated AKT/FOXO1 pathway in tendon-derived stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 131.
- [26] Shen L, Wang QH, Tso P, et al. Apolipoprotein E reduces food intake via PI3K/Akt signaling pathway in the hypothalamus [J]. *Physiol Behav*, 2011, 105(1): 124-128.
- [27] Liu L, Zheng LD, Zou P, et al. FoxO1 antagonist suppresses autophagy and lipid droplet growth in adipocytes [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(15): 2033-2041.
- [28] Jakic B, Carlsson M, Buszko M, et al. The effects of endurance exercise and diet on atherosclerosis in young and aged ApoE^{-/-} and wild-type mice [J]. *Gerontology*, 2019, 65(1): 45-56.
- [29] Hong JY, Kim K, Park E, et al. Exercise ameliorates endoplasmic reticulum stress-mediated vascular dysfunction in mesenteric arteries in atherosclerosis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7938.
- [30] Zheng F, Cai Y. Concurrent exercise improves insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease by upregulating PPAR- γ and genes involved in the beta-oxidation of fatty acids in ApoE-KO mice fed a high-fat diet [J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1): 6.
- [31] Su L, Fu J, Sun S, et al. Effects of HIIT and MICT on cardiovascular risk factors in adults with overweight and/or obesity: A meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210644.
- [32] 衣雪洁, 孙玉霞, 姚婷婷, 等. 急、慢性运动对 2 型糖尿病大鼠脂肪 PI3K/AKT/GLUT4 通路的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(1): 12-16.
- Yi XJ, Sun YX, Yao TT, et al. Effects of acute and chronic exercise on fat PI3K/AKT/GLUT4 signal pathway in type 2 diabetic rats [J]. *Chin J appl physiol*, 2020, 36(1): 12-16.
- [33] 贾杰, 付鹏宇, 朱镛鑫, 等. 低氧经 mTOR/4E-BP1 和 FOXO1/ATROGIN-1 通路影响骨骼肌蛋白质积累 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(3): 300-309.
- Jia J, Fu PY, Zhu RX, et al. Hypoxia affects skeletal muscle protein accumulation via mTOR/4E-BP1 and FoxO1 /Atrogin-1 pathways [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2020, 36(3): 300-309.
- [34] 孙培养, 李佩芳, 王涛, 等. “通督调神”针刺对脑卒中后抑郁大鼠海马 PI3K/Akt/mTOR 通路及自噬相关蛋白的影响 [J]. *中国针灸*, 2020, 40(11): 1205-1210.
- Sun PY, Li PF, Wang T, et al. Effect of Tongdu Tiaoshen acupuncture on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and autophagy-related proteins of hippocampus in rats with post-stroke depression [J]. *Chin Acup Moxib*, 2020, 40(11): 1205-1210.
- [35] Zhang X, Gan L, Pan H, et al. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45276-45284.
- [36] Margolis LM, Berryman CE, Murphy NE, et al. PI3K-AKT-FOXO1 pathway targeted by skeletal muscle microRNA to suppress proteolytic gene expression in response to carbohydrate intake during aerobic exercise [J]. *Physiol Rep*, 2018, 6(23): e13931.
- [37] Huang W, Cheng C, Shan WS, et al. Knockdown of SGK1 alleviates the IL-1 β -induced chondrocyte anabolic and catabolic imbalance by activating FoxO1-mediated autophagy in human chondrocytes [J]. *FEBS J*, 2020, 287(1): 94-107.
- [38] Ferhat M, Funai K, Boudina S. Autophagy in adipose tissue physiology and pathophysiology [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31: 487-501.
- [39] Yang L, Ding Y, Chen Y, et al. The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(7): 1245-1253.
- [40] Zhang Z, Yao Z, Chen Y, et al. Lipophagy and liver disease: New perspectives to better understanding and therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 339-348.