

## 有氧运动与饮食干预对肥胖小鼠睾丸氧化应激的影响\*

吕红艳<sup>1,4</sup>, 李涛<sup>2</sup>, 刘姣<sup>3</sup>, 王萌<sup>4</sup>, 衣雪洁<sup>1△</sup>

(1. 沈阳体育学院运动与健康研究中心, 辽宁 沈阳 110102; 2. 沈阳体育学院实验室管理中心, 辽宁 沈阳 110102;  
3. 沈阳体育学院运动人体科学学院, 辽宁 沈阳 110102; 4. 辽宁师范大学体育学院, 大连 116029)

**【摘要】 目的:** 通过对肥胖小鼠施加有氧运动与饮食干预,探索运动与饮食干预对肥胖小鼠睾丸氧化应激和 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 通路中的作用。**方法:** 随机将 17 只 C57BL/6J 小鼠分为正常饮食组(ND), 37 只分为高脂饮食组(HFD), 高脂饮食脂肪占比 40%, 喂养 12 周后, HFD 组剔除 3 只肥胖抵抗小鼠, 其余 34 只肥胖造模成功; 随后将 ND 组分为正常饮食对照组(NC,  $n=8$ ), 正常饮食运动组(NE,  $n=9$ ), 肥胖高脂饮食对照组(OC,  $n=8$ ), 肥胖高脂饮食运动组(OE,  $n=9$ ), 肥胖正常饮食组(ONC,  $n=8$ ), 肥胖正常饮食运动组(ONE,  $n=9$ ), 各组继续饲养 8 周, 其中 NE、OE 和 ONE 组以速度 20 m/min, 60 min/d, 6 d/week, 进行 8 周跑台运动, 末次运动后 36~40 h 取血和睾丸组织, ELISA 检测血清睾酮和睾丸氧化应激(MDA、T-SOD、T-AOC)水平, RT-PCR 和 Western blot 检测睾丸 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平。**结果:** 与 NC 组比较, OC 组小鼠体脂参数、睾丸 MDA 和睾丸 p38MAPK-NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白水平明显升高( $P<0.01$ ), 睾丸 SOD、睾丸系数和血睾酮明显降低( $P<0.01$ ); NE 组小鼠体脂参数明显降低( $P<0.05$ ), 血清睾酮明显升高( $P<0.01$ )。与 OC 组比较, OE 组小鼠体脂参数、睾丸 MDA 和睾丸 p38MAPK-NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白水平明显降低( $P<0.05$  或  $0.01$ ), 睾丸 SOD 和血睾酮水平明显升高( $P<0.01$ ); ONC 组小鼠体脂参数、睾丸 MDA 和睾丸 p38MAPK-NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白水平明显降低( $P<0.01$ ), 睾丸 SOD 水平和睾丸系数明显升高( $P<0.05$ ); ONE 组小鼠体脂参数、睾丸 MDA 和睾丸 p38MAPK-NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白水平明显降低( $P<0.01$ ), 睾丸 SOD、睾丸系数和血睾酮水平明显升高( $P<0.01$ )。**结论:** 肥胖引起小鼠睾丸发生氧化应激, 上调睾丸 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平, 并降低血睾酮水平; 运动、饮食和运动×饮食干预均能通过降低体脂, 改善睾丸氧化应激, 下调睾丸 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平。

**【关键词】** 高脂饮食; 运动和饮食干预; 氧化应激; p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK); 核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B); 睾酮; 小鼠

**【中图分类号】** G804.2

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1000-6834(2024)01-080-007

**【DOI】** 10.12047/j.cjap.6315.2022.087

## Effects of aerobic exercise and dietary intervention on testicular oxidative stress in obese mice

LYU Hong-yan<sup>1,4</sup>, LI Tao<sup>2</sup>, LIU Jiao<sup>3</sup>, WANG Meng<sup>4</sup>, YI Xue-jie<sup>1△</sup>

(1. Exercise and Health Research Center, Shenyang Sport University, Shenyang 110102; 2. Laboratory Management Center of Shenyang Sport University, Shenyang 110102; 3. Sport Science College of Shenyang Sport University, Shenyang 110102; 4. Liaoning Normal University School of Physical Education, Dalian 116029, China)

**【ABSTRACT】 Objective:** Through aerobic exercise and diet intervention on obese mice, the effects of exercise and diet intervention on testicular oxidative stress and p38MAPK-NF- $\kappa$ B pathway were investigated in obese mice. **Methods:** Seventeen C57BL/6J mice were randomly divided into a normal diet group (ND), and 37 mice were divided into a high-fat diet group (HFD), the high-fat diet accounted for 40% of fat. After 12 weeks of feeding, 3 obesity-resistant mice were excluded from the HFD group, and the remaining 34 were successfully modeled. The mice in ND group were then divided into normal diet control group (NC,  $n=8$ ) and normal diet and exercise group (NE,  $n=9$ ). The mice in HFD group were divided into obese high-fat diet control group (OC,  $n=8$ ), obese high-fat diet and exercise group (OE,  $n=9$ ), obese normal diet group (ONC,  $n=8$ ), and obese normal diet and exercise group (ONE,  $n=9$ ). Each group continued to feed for 8 weeks, and the NE, OE and ONE groups performed treadmill exercise for 8 weeks at a speed of 20 m/min, 60 min/d, 6 d/week. Blood and testicular tissue samples were collected 36~40 h after the last exercise. Serum testosterone and testicular oxidative stress (MDA, T-SOD, T-AOC) levels were detected by ELISA, and testicular p38MAPK-NF- $\kappa$ B levels were detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** Compared with the NC group, the body fat parameters, testicular MDA and testicular p38MAPK-NF- $\kappa$ B mRNA and protein levels in the OC group were increased significantly ( $P<0.01$ ), while the levels of testicular SOD, testis coefficient and blood testosterone were decreased significantly ( $P<0.01$ ); the body fat parameters of the mice in the NE group were decreased significantly ( $P<0.05$ ), and the serum level of testosterone was increased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with the OC group, the body fat parameters, testicular MDA and testicular p38MAPK-NF- $\kappa$ B mRNA and protein levels were decreased significantly in the OE group ( $P<0.05$  or  $0.01$ ), and the testicular SOD and blood testosterone levels were increased signifi-

cantly ( $P < 0.01$ ); Body fat parameters, testicular MDA and testicular p38MAPK-NF- $\kappa$ B mRNA and protein levels were decreased significantly in ONC group ( $P < 0.01$ ), while testicular SOD level and testis coefficient were increased significantly ( $P < 0.05$ ); Body fat parameters, testicular MDA and testicular p38MAPK-NF- $\kappa$ B mRNA and protein levels of mice in ONE group were decreased significantly ( $P < 0.01$ ), while testicular SOD, testis coefficient and blood testosterone levels were increased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Obesity induces oxidative stress in the testis of mice, up-regulates the level of p38MAPK-NF- $\kappa$ B, and reduces the level of blood testosterone; exercise, diet and exercise \* diet interventions can reduce testicular oxidative stress and down-regulate testicular p38MAPK-NF- $\kappa$ B levels by reducing body fat.

**[KEY WORDS]** high-fat diet; exercise and dietary intervention; oxidative stress; p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK); nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B); testosterone; mice

肥胖已成为首要的公共卫生问题,并对男性生育能力产生负面影响,如引起精子浓度和活力降低<sup>[1]</sup>。睾酮作用于睾丸生精细胞促使精子产生,为精子的活动提供营养。研究报道肥胖男性睾酮水平低于同年龄段的正常男性,而体重减轻后睾酮水平得到恢复<sup>[2]</sup>,但肥胖引起低睾酮的原因尚不清楚。氧化应激(oxidative stress, OS)可以降低睾酮水平。当机体 OS 增加时,增加的活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导环氧化酶 2(cyclooxygenase 2, COX2)水平增加,COX2 将花生四烯酸(arachidonic acid, AA)转化为前列腺素,抑制急性调节蛋白(steroideogenic acute regulatory protein, StAR)表达,影响胆固醇的转运,降低睾酮水平<sup>[3]</sup>。我们前期研究发现,高脂饮食诱发小鼠肥胖会增加睾丸组织氧化应激,抑制睾酮合成酶,降低睾酮水平<sup>[4]</sup>,但其作用机制尚不清楚。p38MAPK 是丝/苏氨酸蛋白激酶家族成员。研究显示氧化应激会激活 p38MAPK 信号通路,使 p38MAPK 磷酸化,活化的 p38MAPK 激活核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)<sup>[5]</sup>,促使 NF- $\kappa$ B 调节下游基因的表达。离体实验表明 p38MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路与衰老过程中的 OS 和低睾酮水平有关<sup>[6]</sup>。然而,肥胖引起的氧化应激、p38MAPK-NF- $\kappa$ B 和睾酮的研究未见在体实验报道。

长期运动训练后,超重和肥胖青少年体重、BMI、血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)明显下降,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)明显升高<sup>[7]</sup>;动物实验研究显示,抗阻运动或热量限制均可以降低肥胖小鼠心肌氧化应激水平<sup>[8,9]</sup>;4 周运动训练结合饮食限制可以减少肥胖男性青少年的血清氧化应激水平<sup>[10]</sup>;此外,本课题组在前期的研究中发现,中等负荷运动可以增加肥胖小鼠的睾

酮水平<sup>[11]</sup>。因此,我们假设肥胖引起的 OS 可能通过激活 p38MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路,降低血清睾酮水平,有氧运动或饮食干预可能通过降低体脂逆转这一过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

54 只 C57BL/6J 雄性小鼠(年龄:4~5 周,体重 14~15 g),由北京维通利华实验动物技术有限公司供应,许可证号:SCXK(京)2016-0010。根据 1998 年中华人民共和国卫生部颁布的《实验动物管理条例》进行动物实验。所有实验研究均经沈阳体育学院实验动物伦理委员会批准。小鼠饲养环境:温度为(22±3)℃,湿度为 50%±10%,12:12 h 明暗周期,随意喂养食物和水。每个笼子不超过 5 只小鼠。

### 1.2 肥胖动物模型制备

适应性饲养 1 周后,随机将 17 只小鼠分为正常饮食组(ND),剩余 37 只小鼠分为高脂饮食组(HFD),饲料成分构成比详见表 1,由建民有限公司(中国沈阳)制作提供。喂养 12 周后,HFD 组剔除 3 只肥胖抵抗小鼠,其余 34 只小鼠的体重超过 ND 组小鼠平均体重的 120%,满足肥胖动物模型的标准<sup>[12]</sup>。

### 1.3 实验分组

肥胖建模成功后,ND 组小鼠随机分成正常饮食对照组(NC,  $n=8$ ),正常饮食运动组(NE,  $n=9$ ),两组小鼠体重没有显著性差异( $P > 0.05$ )。将 34 只符合肥胖造模标准的肥胖小鼠按照体重分层随机抽样的原则,分为肥胖高脂饮食对照组(OC,  $n=8$ ),肥胖高脂饮食运动组(OE,  $n=9$ ),肥胖正常饮食组(ONC,  $n=8$ ),肥胖正常饮食运动组(ONE,  $n=9$ ),四组小鼠体重没有显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 1.4 饮食干预方案

ONC 和 ONE 组饮食由高脂饮食转变为正常饮食饲养,通过改变饮食成份降低饮食的热量摄入,干预周期为 8 周;OC 和 OE 组的小鼠继续高脂喂养,

\*【基金项目】辽宁省科学技术计划项目资助(2019-ZD-0516)

【收稿日期】2022-04-27【修回日期】2022-08-13

△【通讯作者】Tel: 15940278868; E-mail: yixuejie8387@163.com

NC, NE 组继续正常饮食喂养。饲料成分构成比详见表 1。

**Tab. 1** Diet feed composition of mice during model establishment

Ingredients	ND group	HFD group
Sucrose(g/100 g)	34.1	34.1
Casein acid(g/100 g)	19.5	19.5
Canola oil(g/100 g)	6.0	-
Clarified butter(g/100 g)	-	21.0
Cellulose(g/100 g)	5.0	5.0
Wheat starch(g/100 g)	30.5	15.5
Minerals(g/100 g)	4.9	4.9
Digestible energy(MJ/kg)	16.1	19.4
Digestible energy from lipids(%)	21.0	40.0
Digestible energy form protein(%)	14.0	17.0

### 1.5 运动干预方案

采用跑台训练。正式训练前, NE, OE 和 ONE 组小鼠进行两周的适应性练习, 跑步机的运行速度和持续时间由 10 m/min, 20 min/d 逐渐增加到 20 m/min, 60 min/d。在正式训练期间, 跑步机的倾斜度设为 0, 最终的运动方案是 60 min/d, 速度 20 m/min, 6 d/week, 持续 8 周。跑台运动强度基于先前的报告<sup>[13]</sup>。

### 1.6 样本收集和和处理

NE, OE, ONE 组最后一次跑台训练结束后的 36~40 h 进行取材, 取材前所有组小鼠禁食 12 h。首先每只小鼠称重, 腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg 体重; 国药集团化学试剂有限公司, 中国上海) 进行麻醉, 小鼠眼眶取血, 分离血清, 将样品保存在-80℃ 冰箱以便血清睾酮实验; 然后快速分离睾丸并称重, 立即在液氮中冷冻, 然后保存在-80℃ 冰箱中用于氧化应激指标以及 p38MAPK 和 NF-κB 的 mRNA 和蛋白实验, 最后将睾丸、肾脏和肠系膜周围的脂肪组织称重为腹腔脂肪含量。

### 1.7 血清睾酮检测

通过酶联免疫吸附法(ELISA)测定小鼠血清中的睾酮含量。试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司(中国北京)。按照说明书的指示, 采用双抗体夹心法测定小鼠样品中睾酮水平, 使用酶标仪(Thermo fisher scientific, Multiskan GO 1510)在 450 nm 波长下测定吸光度值(OD 值), 绘制标准曲线计算小鼠样品中的睾酮含量。

### 1.8 睾丸组织氧化应激指标的测定

制备 10% 的睾丸组织匀浆液并离心, 取得上清液测定氧化应激指标。按照南京建城生物工程研究所(中国南京)试剂盒要求, 测定丙二醛(MDA, TBA method)和总超氧化物歧化酶(T-SOD, hydroxylamine

method); 按照上海酶联生物科技有限公司(中国上海)试剂盒要求, 测定总抗氧化能力(T-AOC, ABTS method)。

### 1.9 Real-time PCR(RT-PCR)检测 mRNA 表达

采用 Trizol 法提取睾丸的总 RNA, 验证其纯度后, 使用 qPCR Master Mix 试剂盒(Promega, Madison, WI, USA)反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行扩增。表 1 列出目的基因的引物序列。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各目的基因的表达水平。所有引物均由生工生物工程股份有限公司(中国上海)设计和合成。

**Tab. 2** Primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	5' TCAAGAAGGTG-GTGAAGAC 3'	5' TGGGAGTTGCTGT-GAAGTC 3'
p38MAPK	5' CTATGGCTCG-GTGTGTGCT 3'	5' GACGCAACTCTCGG-TAGGTC 3'
NF-κB	5' GACCTGGAG-CAAGCCATTAG 3'	5' CACTGTCCACCTG-GAAGCAGA 3'

p38MAPK: p38 mitogen activated protein kinase; NF-κB: Nuclear factor kappa B

### 1.10 Western blot 检测蛋白表达

小鼠睾丸去被膜称重, 使用 RIPA 裂解液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 中国北京)破碎组织, 以 12 000 r/min, 4℃ 离心 20 min 提取睾丸蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 样品蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 湿转至 PVDF 膜(Gene, USA)上, 经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 洗脱后与一抗(1:1 000, Abclonal, 中国武汉)和 GAPDH 抗体(1:10 000, Abclonal, 中国武汉)4℃ 孵育过夜。洗膜后与 HRP 标记的二抗(1:10 000, Abclonal, 中国武汉)室温孵育 1 h, 洗膜后以 ECL 法显示, 以 GAPDH 为内参, 采用图像分析软件计算相对表达量。

### 1.11 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8.0 统计分析并作图。数据用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。各组组间比较采用单因素方差(ANOVA)分析。

## 2 结果

### 2.1 饮食、运动干预对小鼠体重、腹腔脂肪含量和脂体比的影响

高脂饮食喂养 20 周后, 与 NC 组小鼠相比, OC 组小鼠体重、腹腔脂肪含量和脂体比明显增加( $P<0.01$ ), NE 组小鼠体重、腹腔脂肪含量和脂体比明显下降( $P<0.05$ ); 8 周干预后, 与 OC 组相比, OE 组、ONC 组和 ONE 组小鼠体重、腹腔脂肪含量和脂

体比明显下降( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其中 ONC 组各指标比 OE 组下降明显, ONE 组各指标比 ONC 组下降更明显(表 3)。

**Tab. 3** Changes of body weight, abdominal fat masses and abdominal fat mass to body weight ratios of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Group	Body weight (g)	Abdominal fat masses (g)	Abdominal fat mass to body weight ratios (%)
NC	25.48±1.05	0.48±0.15	1.88±0.58
NE	22.93±1.34*	0.21±0.01*	0.92±0.08*
OC	35.80±2.76**	1.88±0.15**	5.28±0.63**
OE	30.51±1.85#	0.78±0.14##	2.57±0.53##
ONC	28.25±1.63##	0.70±0.13##	2.49±0.42##
ONE	26.81±1.43##	0.37±0.11##	1.39±0.38##

NC: Normal diet control group; NE: Normal diet and exercise group; OC: Obese high-fat diet control group; OE: Obese high-fat diet exercise group; ONC: Obese normal diet group; ONE: Obese normal diet exercise group

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs OC group

### 2.2 饮食、运动干预对小鼠睾丸重量、睾丸系数和血清睾酮的影响

高脂饮食喂养 20 周后, 各组小鼠的睾丸重量无明显差异( $P > 0.05$ ); 与 NC 组小鼠相比, OC 组小鼠睾丸系数和血清睾酮水平明显下降( $P < 0.01$ ), NE 组小鼠的睾丸系数无明显差异( $P > 0.05$ ), 血清睾酮明显升高( $P < 0.01$ ); 8 周干预后, 与 OC 组相比, OE 组睾丸系数无明显差异( $P > 0.05$ ), 血清睾酮明显升高( $P < 0.01$ ); ONC 组睾丸系数明显升高( $P < 0.01$ ), 血清睾酮无明显变化( $P > 0.05$ ); ONE 组睾丸系数和睾酮均明显升高( $P < 0.01$ , 表 4)。

**Tab. 4** Changes of testis weight, testis coefficient and serum testosterone of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Group	Testis weight (g)	Testis coefficient (%)	Serum testosterone (ng/ml)
NC	0.22±0.01	0.85±0.05	10.62±0.53
NE	0.21±0.01	0.92±0.05	12.93±0.13**
OC	0.23±0.01	0.64±0.04**	7.79±0.52**
OE	0.22±0.01	0.71±0.07	10.75±0.43##
ONC	0.22±0.01	0.77±0.05##	8.07±0.44
ONE	0.22±0.02	0.81±0.09##	10.55±0.45##

NC: Normal diet control group; NE: Normal diet and exercise group; OC: Obese high-fat diet control group; OE: Obese high-fat diet exercise group; ONC: Obese normal diet group; ONE: Obese normal diet exercise group

\*\* $P < 0.01$  vs NC group; ## $P < 0.01$  vs OC group

### 2.3 饮食、运动干预对小鼠睾丸组织氧化应激的影响

高脂饮食喂养 20 周后, 各组小鼠睾丸 T-AOC 无明显差异( $P > 0.05$ ), 与 NC 组小鼠相比, OC 组小鼠睾丸中 MDA 明显增加( $P < 0.01$ ), SOD 明显下降( $P < 0.01$ ), NE 组小鼠 MDA 和 SOD 均无明显差异( $P > 0.05$ ); 8 周干预后, 与 OC 组相比, OE 组、ONC 组和 ONE 组 MDA 均明显下降( $P < 0.01$ ), SOD 均明显升高( $P < 0.01$ ), 其中 ONE 组 MDA 下降最多, OE 组下降次之, ONC 组下降最少, OE 组 SOD 升高最多, ONE 组升高次之, ONC 组升高最少(表 5)。

**Tab. 5** Changes of oxidative stress in testis of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Group	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)	T-AOC (U/mg prot)
NC	6.70±0.74	29.65±2.28	16.16±1.11
NE	7.49±0.96	31.89±2.30	17.81±1.79
OC	15.68±1.19**	21.75±2.34**	15.87±0.84
OE	11.44±0.81##	35.71±2.53##	15.16±1.93
ONC	12.48±1.39##	27.56±2.20##	14.92±1.67
ONE	9.41±1.14##	28.28±2.30##	14.96±2.03

NC: Normal diet control group; NE: Normal diet and exercise group; OC: Obese high-fat diet control group; OE: Obese high-fat diet exercise group; ONC: Obese normal diet group; ONE: Obese normal diet exercise group

\*\* $P < 0.01$  vs NC group; ## $P < 0.01$  vs OC group

### 2.4 饮食、运动干预对小鼠睾丸组织 p38MAPK, NF-κB mRNA 水平的影响

高脂饮食喂养 20 周后, 与 NC 组小鼠相比, OC 组小鼠睾丸中 p38MAPK 和 NF-κB 的 mRNA 水平明显增加( $P < 0.01$ ), NE 组小鼠睾丸中 p38MAPK 和 NF-κB 的 mRNA 水平无明显差异( $P > 0.05$ ); 8 周干预后, 与 OC 组相比, OE 组、ONC 组和 ONE 组小鼠睾丸中 p38MAPK 和 NF-κB 的 mRNA 水平均明显下降( $P < 0.01$ ), 其中 ONC 组下调 p38MAPK 和 NF-κB 的 mRNA 水平低于 OE 组, ONE 组下调 p38MAPK 和 NF-κB 的 mRNA 水平低于 ONC 组(表 6)。

### 2.5 饮食、运动干预对小鼠睾丸组织 p38MAPK、Phosphorylated p38MAPK, NF-κB 蛋白水平的影响

高脂饮食喂养 20 周后, 与 NC 组相比, OC 组睾丸中 p38MAPK, P-p38MAPK 和 NF-κB 的蛋白表达明显增加( $P < 0.01$ ), NE 组小鼠睾丸中 p38MAPK, P-p38MAPK 和 NF-κB 的蛋白表达无明显差异( $P > 0.05$ ); 8 周干预后, 与 OC 组相比, OE 组、ONC 组和 ONE 组小鼠睾丸中 p38MAPK, P-p38MAPK 和 NF-

$\kappa$ B 的蛋白表达均明显下降 ( $P < 0.01$ ), 其中 ONE 组各指标均比 OE 和 ONC 组下调更明显 (表 7, 图 1)。

**Tab. 6** Changes of p38MAPK and NF- $\kappa$ B mRNA levels in testis tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Group	p38MAPK	NF- $\kappa$ B
NC	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
NE	1.17 $\pm$ 0.27	1.12 $\pm$ 0.33
OC	1.65 $\pm$ 0.19**	1.89 $\pm$ 0.17**
OE	0.87 $\pm$ 0.23##	0.78 $\pm$ 0.23##
ONC	1.11 $\pm$ 0.22##	1.12 $\pm$ 0.30##
ONE	1.17 $\pm$ 0.20##	1.16 $\pm$ 0.26##

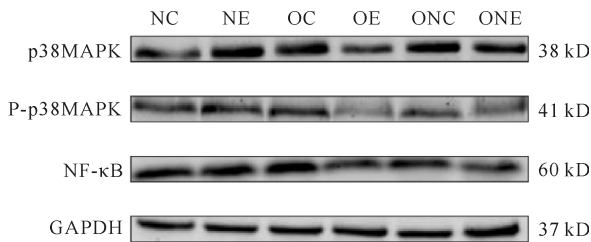
NC: Normal diet control group; NE: Normal diet and exercise group; OC: Obese high-fat diet control group; OE: Obese high-fat diet exercise group; ONC: Obese normal diet group; ONE: Obese normal diet exercise group

\*\* $P < 0.01$  vs NC group; ## $P < 0.01$  vs OC group

**Tab. 7** Changes of p38MAPK, Phosphorylated p38MAPK and NF- $\kappa$ B protein levels in testis tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Group	p38MAPK	Phosphorylated p38MAPK	NF- $\kappa$ B
NC	2.51 $\pm$ 0.56	1.15 $\pm$ 0.27	0.48 $\pm$ 0.18
NE	2.65 $\pm$ 0.75	1.26 $\pm$ 0.21	0.68 $\pm$ 0.19
OC	4.93 $\pm$ 0.24**	2.29 $\pm$ 0.15**	1.53 $\pm$ 0.23**
OE	2.16 $\pm$ 1.13##	1.47 $\pm$ 0.11##	0.54 $\pm$ 0.15##
ONC	2.27 $\pm$ 1.40##	1.18 $\pm$ 0.19##	0.59 $\pm$ 0.17##
ONE	2.15 $\pm$ 0.96##	1.42 $\pm$ 0.15##	0.48 $\pm$ 0.13##

\*\* $P < 0.01$  vs NC group; ## $P < 0.01$  vs OC group



**Fig. 1** Protein bands of p38MAPK-NF- $\kappa$ B signaling pathway in mice testis

NC: Normal diet control group; NE: Normal diet and exercise group; OC: Obese high-fat diet control group; OE: Obese high-fat diet exercise group; ONC: Obese normal diet group; ONE: Obese normal diet exercise group

### 3 讨论

本文实验结果表明, 高脂饮食诱发的肥胖引起睾丸氧化平衡系统失衡, 伴随 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平增加, 引起血清低睾酮现象; 肥胖状态下, 通过运动和正常饮食降低体脂, 缓解氧化应激, 下调 p38MAPK-NF- $\kappa$ B, 逆转血清低睾酮症状。

睾酮是评估男性生殖系统的重要激素, 与男性

脂肪量密切相关<sup>[14]</sup>。我们研究表明 20 周高脂饮食, 小鼠体重和腹腔脂肪含量明显增加, 小鼠睾丸重量无差异, 但睾丸系数和血清睾酮下降, 说明高脂饮食没有引起睾丸形态和功能与体重同步增加, 进而引起睾丸的结构和功能出现相对不足。由于睾丸组织细胞分裂和线粒体呼吸非常活跃, 所以其耗氧量非常高, 同时睾丸组织中不饱和脂肪酸含量较高, 在高氧耗的条件下易产生活性氧, 发生氧化应激。我们研究发现高脂饮食引起小鼠睾丸氧化应激增强, 抗氧化能力下降, 提示脂肪积累与氧化应激密切相关, 这可能对睾丸组织造成一定损伤。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族是介导细胞反应的重要信号通路, 其中 p38MAPK 是主要亚型之一, 可以被游离脂肪酸和氧化应激等炎症细胞因子激活。NF- $\kappa$ B 在哺乳动物慢性炎症和氧化应激中发挥重要作用。活化的 p38MAPK 可通过磷酸化修饰激活 NF- $\kappa$ B。有研究显示 8 周大强度游泳训练可以激活大鼠脾脏中 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路, 致使炎症反应加剧<sup>[15]</sup>; 一次性急性力竭运动可以激活大鼠心肌中 p38MAPK 信号通路, 活化 NF- $\kappa$ B, 上调 COX-2 表达, 引发过度炎症反应<sup>[16]</sup>, 抑制 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 可降低小鼠肺组织中氧化应激水平<sup>[17]</sup>。本课题组先前的研究发现, 雄性小鼠肥胖诱发氧化应激, 增加促炎因子水平, 降低睾酮合成酶水平<sup>[4]</sup>, 但作用机制并不清楚; 在本研究中发现, 高脂小鼠睾丸氧化应激状态下, p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平升高, 伴随血睾酮和睾丸系数下降。

运动和饮食干预是减轻体重的有效方法。运动会引起机体产生自由基, 但不同的运动方式或强度, 会使机体产生不同的应答反应。有研究显示, 8 周力竭游泳运动会增加大鼠睾丸 ROS 水平, 降低抗氧化酶活性, 抑制 StAR 水平, 补充抗氧化剂后, 可逆转力竭游泳运动引起的睾丸类固醇生成障碍<sup>[18]</sup>。然而, 低到中等强度的长期运动训练通过增加抗氧化能力, 促进机体 ROS 介导的适应性反应<sup>[19]</sup>, 维持氧化-抗氧化平衡。本研究显示, 正常运动组 8 周跑步训练后, 氧化-抗氧化系统以及 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平无差异; 但肥胖运动组 SOD 活性增加, MDA 和 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平下降, 血睾酮增加; 同样的中等负荷运动对正常和肥胖小鼠的影响并不相同, 这可能是正常小鼠处于氧化-抗氧化的平衡状态, 中等负荷运动并没有打破这一平衡, 为此没有通过 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 通路影响血清睾酮水平; 但对于肥胖小鼠, 中等负荷运动有效缓解氧化应激, 抑制

p38MAPK-NF- $\kappa$ B 通路的过度激活对睾丸的损伤,因此提升血清睾酮水平。

饮食调整在降低氧化应激中具有正向作用<sup>[20]</sup>。本研究中高脂后再正常饮食饲养缓解氧化应激,降低 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平,此外,我们发现饮食缓解氧化应激的能力低于运动干预,因此我们推测氧化应激-p38MAPK-NF- $\kappa$ B-血清睾酮之间可能存在剂量依赖关系。为了最大限度地发挥运动的有益作用,我们设计了运动 $\times$ 正常饮食的联合干预方式。研究显示,联合干预缓解氧化应激,下调 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平,提高血清睾酮水平,但并没有比单一的运动或正常饮食更具有显著的效果,这可能是前期高脂饮食引起的氧化损伤程度较重,运动和正常饮食联合干预没有完全逆转这种损伤,因此未能达到协同作用的最佳效果。此外,肥胖状态下,单一的运动和饮食干预并没有显示出哪种干预手段更具有优势,这可能是不同干预手段作用的分子靶点不同,但两种干预手段均通过提升抗氧化途径,实现对 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 路径的调节,改善血清睾酮水平。

综上所述,这项研究的结果表明,长期中等负荷的有氧运动干预改善正常组小鼠的体脂参数和血睾酮水平,改善高脂引发的肥胖小鼠的睾丸氧化应激,下调 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平,提高血睾酮;肥胖状态下的正常饮食改善睾丸氧化应激,下调 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平,上调睾丸系数;肥胖状态下的有氧运动 $\times$ 正常饮食改善睾丸氧化应激,下调 p38MAPK-NF- $\kappa$ B 水平,上调血睾酮和睾丸系数。

## 【参考文献】

- [1] Lainez NM, Coss D. Obesity, Neuroinflammation, and reproductive function [J]. *Endocrinology*, 2019, 160(11): 2719-2736.
- [2] Yeap BB, Wu FCW. Clinical practice update on testosterone therapy for male hypogonadism: Contrasting perspectives to optimize care [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2019, 90(1): 56-65.
- [3] Wang Y, Chen F, Ye L, et al. Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors [J]. *Reproduction*, 2017, 154(4): R111-R122.
- [4] Yi X, Tang D, Cao S, et al. Effect of different exercise loads on testicular oxidative stress and reproductive function in obese male mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3071658.
- [5] Zhao W, Ma L, Cai C, et al. Caffeine inhibits NLRP3 inflammasome activation by suppressing MAPK/NF- $\kappa$ B and A2aR signaling in LPS-induced THP-1 macrophages [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(8): 1571-1581.
- [6] Zhao Y, Liu X, Qu Y, et al. The roles of p38 MAPK $\rightarrow$ COX2 and NF- $\kappa$ B $\rightarrow$ COX2 signal pathways in age-related testosterone reduction [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10556.
- [7] Roh HT, Cho SY, So WY. Effects of regular taekwondo intervention on oxidative stress biomarkers and myokines in overweight and obese adolescents [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(7): 2505.
- [8] Eftting PS, Brescianini SMS, Sorato HR, et al. Resistance exercise modulates oxidative stress parameters and TNF-alpha content in the heart of mice with diet-induced obesity [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2019, 112(5): 545-552.
- [9] Waldman M, Cohen K, Yadin D, et al. Regulation of diabetic cardiomyopathy by caloric restriction is mediated by intracellular signaling pathways involving 'SIRT1 and PGC-1alpha' [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1): 111.
- [10] Li C, Feng F, Xiong X, et al. Exercise coupled with dietary restriction reduces oxidative stress in male adolescents with obesity [J]. *J Sports Sci*, 2017, 35(7): 663-668.
- [11] Yi X, Gao H, Chen D, et al. Effects of obesity and exercise on testicular leptin signal transduction and testosterone biosynthesis in male mice [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2017, 312(4): R501-R510.
- [12] Chandler PC, Viana JB, Oswald KD, et al. Feeding response to melanocortin agonist predicts preference for and obesity from a high-fat diet [J]. *Physiol Behav*, 2005, 85(2): 221-230.
- [13] Chen D, Cao S, Chang B, et al. Increasing hypothalamic nucleobindin 2 levels and decreasing hypothalamic inflammation in obese male mice via diet and exercise alleviate obesity-associated hypogonadism [J]. *Neuropeptides*, 2019, 74: 34-43.
- [14] Sebo ZL, Rodeheffer MS. Testosterone metabolites differentially regulate obesogenesis and fat distribution [J]. *Mol Metab*, 2021, 44: 101141.
- [15] 王品, 曹建民, 胡戈, 等. 姜黄素对过度训练大鼠脾脏炎症反应的调控作用及其机制 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(3): 281-286.
- [16] 郑妩媚, 初海平, 王燕, 等. 力竭运动后不同时相大鼠心肌 p-p38MAPK、NF- $\kappa$ B、COX-2 表达的动态变化 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(1): 88-91.
- [17] Li T, Wu YN, Wang H, et al. Dap1 improves inflammation, oxidative stress and autophagy in LPS-induced acute lung injury via p38MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Mol Immunol*, 2020, 120: 13-22.

- (2): 195-205.
- [5] Wang L, Zhang F, Cui JY, *et al.* CAFs enhance paclitaxel resistance by inducing EMT through the IL6/JAK2/STAT3 pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5): 2081-2090.
- [6] Wu C, Cao H, Zhou H, *et al.* Research progress on the antitumor effects of Rhein; Literature review[J]. *Anti-cancer Agents Med Chem*, 2017, 17(12): 1624-1632.
- [7] Wang A, Jiang H, Liu Y, *et al.* Rhein induces liver cancer cells apoptosis *via* activating ROS-dependent JNK/Jun/Caspase-3 signaling pathway[J]. *J Cancer*, 2020, 11(2): 500-507.
- [8] Li T, Si W, Zhu J, *et al.* Emodin reverses 5-Fu resistance in human colorectal cancer *via* downregulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 1851-1861.
- [9] Peng S, Wang J, Lu C, *et al.* Emodin enhances cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer through Pgp downregulation[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(3): 230-238.
- [10] Ngoi NYL, Choong C, Lee J, *et al.* Targeting mitochondrial apoptosis to overcome treatment resistance in cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(3): 574-603.
- [11] Zheng Z, Zuo Z, Zhu P, *et al.* A study on the expression of apoptotic molecules related to death receptor and endoplasmic reticulum pathways in the jejunum of AFB1-intoxicated chickens[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(52): 89655-89664.
- [12] Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395-417.
- [13] 胡施炜, 楼恩哲, 王 瑜, 等. 大黄酸通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路促进 DLBCL 细胞 OCI-LY8 凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(11): 1974-1980.
- [14] Yuan K, Ye J, Liu Z, *et al.* Complement C3 overexpression activates jak2/stat3 pathway and correlates with gastric cancer progression[J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 9-24.
- [15] Xiao G, Du J, Wu H, *et al.* Differential inhibition of Sox10 functions by notch-Hes pathway[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(4): 653-662.
- [16] Qian B, Yao Z, Yang Y, *et al.* Downregulation of SD-CBP inhibits cell proliferation and induces apoptosis by regulating PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric carcinoma[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(1): 240-247.
- [17] 王 瑜, 何施燕, 朱若婷, 等. 紫草素对肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的影响及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(4): 415-418.
- [18] 徐兴军, 李珊珊, 刘 畅, 等. 川楝素诱导人胃癌 MGC-803 细胞凋亡及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(3): 262-265.
- [19] 刘志刚, 孔祥雨, 陈 曦, 等. 丹参酮 IIA 对人宫颈鳞癌细胞 SIHa 增殖及凋亡的影响[J]. *毒理学杂志*, 2018, 32(1): 58-60.

(上接第 85 页)

- [18] Jana K, Dutta A, Chakraborty P, *et al.* Alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine protects intensive swimming exercise-mediated germ-cell depletion, pro-oxidant generation, and alteration of steroidogenesis in rat testis [J]. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(9): 833-850.
- [19] de Sousa CV, Sales MM, Rosa TS, *et al.* The antioxidant effect of exercise: A systematic review and meta-analysis [J]. *Sports Med*, 2017, 47(2): 277-293.
- [20] Aleksandrova K, Koelman L, Rodrigues CE. Dietary patterns and biomarkers of oxidative stress and inflammation: A systematic review of observational and intervention studies [J]. *Redox Biol*, 2021, 42: 101869.