

·基础研究·

低氧复合运动对大鼠骨骼肌解偶联蛋白3表达及线粒体功能的影响*

薄 海¹ 张红英² 李海英¹ 张 勇^{3,4}

摘要

目的:观察单纯低氧及低氧复合运动对大鼠骨骼肌线粒体解偶联蛋白3(UCP3)表达的影响,并探讨其对线粒体能量转换和活性氧(ROS)生成的影响。

方法:30只健康雄性SD大鼠随机分为:常氧对照组(NC, n=10)、单纯低氧组(HC, n=10)和低氧复合运动训练组(HT, n=10)。低氧干预为常压低氧帐篷,模拟11.3%的氧浓度,运动干预为低氧帐篷内53% VO_{2max} 强度的跑台训练,1h/d。4周后测定线粒体呼吸功能、ATP合成酶活力、ROS生成速率、UCP3 mRNA和UCP3蛋白表达。

结果:HC与NC组比较,态3呼吸速率(ST3)、呼吸控制比(RCR)、磷氧比(ADP/O)、ATP合成酶活力、UCP3 mRNA和蛋白表达均显著降低($P<0.05-0.01$),ROS生成速率升高($P<0.05$)。HT与HC组比较,ST3、RCR、ADP/O、ATP合成酶活力、UCP3 mRNA和蛋白表达均显著升高($P<0.05-0.01$),ROS生成速率降低($P<0.05$)。

结论:低氧复合运动可上调骨骼肌线粒体UCP3表达,抑制ROS过度生成,并通过上调ATP合成酶活力,保持线粒体能量转换效率。

关键词 低氧;解偶联蛋白3;线粒体能量转换;活性氧;骨骼肌

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-01-0016-06

Effect of hypoxia combined exercise training on uncoupling protein 3 expression and mitochondrial function in skeletal muscles of rats/BO Hai, ZHANG Hongying, LI Haiying, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(1): 16—21

Abstract

Objective: To observe the effect of hypoxia alone and hypoxia combined with exercise training on mitochondrial energy transferring and reactive oxygen species (ROS) generation, and to identify roles of uncoupling protein 3 (UCP3) in skeletal muscles of rats.

Method: A total 30 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normoxia control group (NC, n=10), hypoxia control group (HC, n=10), and hypoxia combined exercise training group (HT, n=10). The hypoxia animals were subjected to hypoxia exposure in normobaric hypoxic tent simulating 11.3% oxygen concentration. The exercise training animals exercised on a motor-driven rodent treadmill in normobaric hypoxic tent for 1h/d, at an intensity of 53% VO_{2max} . After 4 weeks, mitochondrial respiration parameters, ATP synthetase activity, ROS generation rate, UCP3 mRNA and UCP3 protein expression were measured.

Result: Comparing with NC group, in HC group, state 3 respiratory rate(ST3), respiratory control ratio(RCR), ratio of ADD to oxygen(ADP/O), ATP synthetase activity, UCP3 mRNA and protein expression showed dramatic reduce

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.01.006

*基金项目:国家自然科学基金项目(30270638);武警医学院科研基金(WY2009-11)

1 天津武警后勤学院部队训练医学教研室,天津,300162; 2 北京武警总医院科训科; 3 天津体育学院运动生理学与运动医学重点实验室; 4 通讯作者

作者简介:薄海,男,在读博士,讲师; 收稿日期:2010-07-30

16 www.rehabi.com.cn

($P<0.05-0.01$). And H_2O_2 generation elevated significantly($P<0.05$). Comparing with HC group, in HT group, ST3, RCR, ADP/O, ATP synthetase activity, UCP3 mRNA and protein expression improved significantly($P<0.05-0.01$). And H_2O_2 generation decreased ($P<0.05$).

Conclusion: Hypoxia combined exercise training could markedly enhance mitochondrial UCP3 expression and ATP synthetase activity, which suppressed mitochondrial ROS generation and maintained mitochondrial energy transferring efficiency.

Author's address Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin, 300162

Key word hypoxia; uncoupling protein 3; mitochondrial energy transferring; reactive oxygen; skeletal muscle

低氧(hypoxia)是指当细胞的氧供应不足或利用氧障碍时,导致细胞的代谢、功能和形态结构发生异常变化的病理过程。常见于阻塞性肺疾病、心力衰竭、贫血等临床疾病,亦见于在高原等低氧环境中生活的人群。其中低氧可导致骨骼肌氧化应激水平升高、能量代谢异常、蛋白质降解加速等,表现为骨骼肌萎缩和工作能力下降,严重影响机体生存质量^[1]。研究证实,低氧复合运动可通过增加骨骼肌毛细血管密度、促进肌组织糖、脂代谢能力、上调肌红蛋白表达等途径提高骨骼肌低氧抵抗力^[2]。这提示低氧复合运动可有效提高低氧症患者骨骼肌工作能力,探讨其分子机制对于科学指导运动康复及开发靶向明确的药物具有重要意义。

线粒体通过氧化磷酸化产生细胞90%以上能量,也是内源性活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生的主要部位。研究表明,严重低氧可造成线粒体超微结构损伤及钙离子代谢紊乱^[3]。解偶联蛋白是位于线粒体内膜介导质子漏的转运蛋白家族,其分布及生理功能具有组织特异性。骨骼肌中只有解偶联蛋白3(uncoupling protein 3, UCP3)表达,基本不参加机体产热调控,而是通过介导多种阴离子跨膜转运调控线粒体质子跨内膜途径及能量转换方式^[4]。本研究拟观察慢性低氧及低氧复合运动对骨骼肌线粒体UCP3表达的影响,并探讨其在线粒体能量转化及ROS生成中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠30只,体重(242 ± 15)g,由军事医学科学院实验动物中心提供。常规饲养,饲养环境温度20—25℃,湿度65%—75%。

1.2 动物分组及运动方式

大鼠随机分为3组,每组10只,即常氧对照组(NC组)、单纯低氧组(HC组)、低氧复合运动训练组(HT组)。HC组和HT组置于常压低氧帐篷(Hypoxic System公司),模拟海拔5000m环境,氧浓度为11.3%,持续4周,动物每日清晨返回常氧环境1h,换食水,打扫卫生。HT组大鼠在放置于低氧帐篷中的小动物跑台中运动,采用Bedford^[5]据鼠体重/摄氧量回归方程确定运动模式,即 $5^\circ, 15\text{m/min}$ (相当于53% $VO_{2\text{max}}$),每日1次,每次1h,每周5次,共4周。该低氧复合运动模型已被证明可显著提高低氧状态下大鼠骨骼肌强直收缩最大张力及疲劳发生时间^[6]。HC组大鼠每日置于静止跑台1h。NC组大鼠低氧帐篷外饲养。各组大鼠均在末次低氧暴露后即刻断头处死,迅速分离双侧腓肠肌,左侧于-80℃冻存备用,右侧提取线粒体。

1.3 骨骼肌线粒体制备

肌组织剔除脂肪及结缔组织、剪碎,加100ml介质(0.12M KCl, 20mM Hepes, 5mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, pH 7.4),电动匀浆器匀浆,上下3次,1200转/min。600g离心10min,纱布过滤取上清。上清液于4℃ 17000g离心10min。沉淀悬浮于20ml介质中,7000g离心10min。沉淀悬浮于1ml介质中。考马斯亮蓝法测定蛋白样品浓度^[7]。

1.4 线粒体呼吸功能测定

采用Clark氧电极测定密闭反应体系中氧含量变化速率,以测定线粒体呼吸速率^[8]。反应体系3ml,25℃恒温,80转/min速度搅拌。与测试等体积的氧饱和水校准氧饱和曲线。反应体系中加入3mg线粒体蛋白。加入底物0.1mmol/L苹果酸和1mmol/L谷氨酸启动态4呼吸。平稳后加入200nmol ADP启动态3呼吸。ADP耗尽后回归态4呼吸。选取耗氧曲线典型区域计算态3(state 3, ST3)和态4

(state 4, ST4)呼吸速率、呼吸控制比(respiratory control ratio, RCR)及磷氧比(ratio of ADD to oxygen, ADP/O)。

1.5 线粒体ROS生成速率测定

3ml反应测定介质中加入1mg线粒体蛋白和5nmolDCFH-DA,加入苹果酸0.1mmol/L和谷氨酸1mmol/L启动呼吸。避光37℃水浴15min。水浴后立即于荧光分光光度计下连续扫描10min(激发波长499nm,发射波长521nm)^[9]。

1.6 线粒体ATP合成酶活性测定

采用荧光素酶发光法^[7]。反应温度为25℃,0.5ml反应体系中加入0.05mg线粒体蛋白,底物0.1mmol/L苹果酸和1mmol/L谷氨酸,10nmol荧光素酶。记录本底荧光强度,加入4μM ADP启动反应,记录荧光强度。

1.7 实时荧光定量PCR法(RT-PCR)检测骨骼肌UCP3 mRNA表达

用Trizol Reagent试剂盒提取骨骼肌总RNA,通过0.8%的琼脂糖电泳和紫外分光光度计确定总RNA完整性和纯度。严格按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应。UCP3和内参基因β-actin引物参照文献^[8],由北京博雅生物有限公司合成:

UCP3上游引物5'-GGAGCCATGGCAGTGACCTGT-3',

下游引物5'-TGTGATGTTGGGCAAGTCCC-3',

产物179 bp;

β-actin上游引物

5'-TGCTGGGTATGGGTCAGAAGGACTC-3',

下游引物5'-CATGGCTGGGCTGTGAAGGTCTCA-3',
产物664 bp。

RT-PCR条件:预变性94℃/4min,变性94℃/30s,退火58℃/30s,延伸72℃/45s,循环30次,终末延伸72℃/7min。反应体系根据SYBR-Premix试剂盒说明书配制。计算UCP3 mRNA对β-actin的相对表达量:目的基因表达量/β-actin表达量=2^(Ct 目的基因-Ct β-actin)。

1.8 Western blot法检测线粒体UCP3蛋白表达量

以细胞色素氧化酶IV(COXIV)为内参。将提取线粒体加入2×SDS上样缓冲液,100℃加热5min,冰浴冷却。取10μg蛋白质样品行SDS-PAGE电泳,电转移至PVDF膜,兔抗鼠UCP3抗体(1:1000)4℃孵

育过夜,PBS漂洗3次。再以羊抗兔HRP-IgG抗体室温孵育1h,充分漂洗后,使用ECL试剂盒发光显影,与X光片曝光10min。显影、定影后扫描定量各条带的灰度值。以NC组条带灰度值为100%,其他两组条带与NC组的比值,即为其相对表达量(%)。

1.9 统计学分析

计量资料以均数±标准差表示,所有数据应用SPSS 13.0软件进行分析,均数的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 低氧及低氧复合运动对骨骼肌线粒体呼吸功能、ATP合成活力及ROS生成速率的影响

与NC组比较,HC和HT组ST3、RCR及线粒体ATP合成酶活力显著降低($P<0.05-0.01$),H₂O₂生成速率显著升高($P<0.05$),HC组ADP/O显著降低($P<0.05$);HT组与HC组比较,ST3、RCR、ADP/O及线粒体ATP合成酶活力显著升高($P<0.05$),H₂O₂生成速率显著降低($P<0.05$);各组间ST4差异均无显著性意义(表1,图1)。

表1 各组骨骼肌线粒体呼吸功能变化
(nmol O₂/min·mg pro)

组别	NC组	HC组	HT组
态3呼吸速率(ST3)	76.94±9.01	47.79±6.94 ^②	61.21±7.82 ^{①③}
态4呼吸速率(ST4)	11.70±1.52	12.01±2.05	11.87±2.30
呼吸控制比(RCR)	6.65±0.95	3.96±0.51 ^②	5.14±0.92 ^{①③}

与NC组比较:① $P<0.05$;② $P<0.01$;HT组与HC组比较:③ $P<0.05$

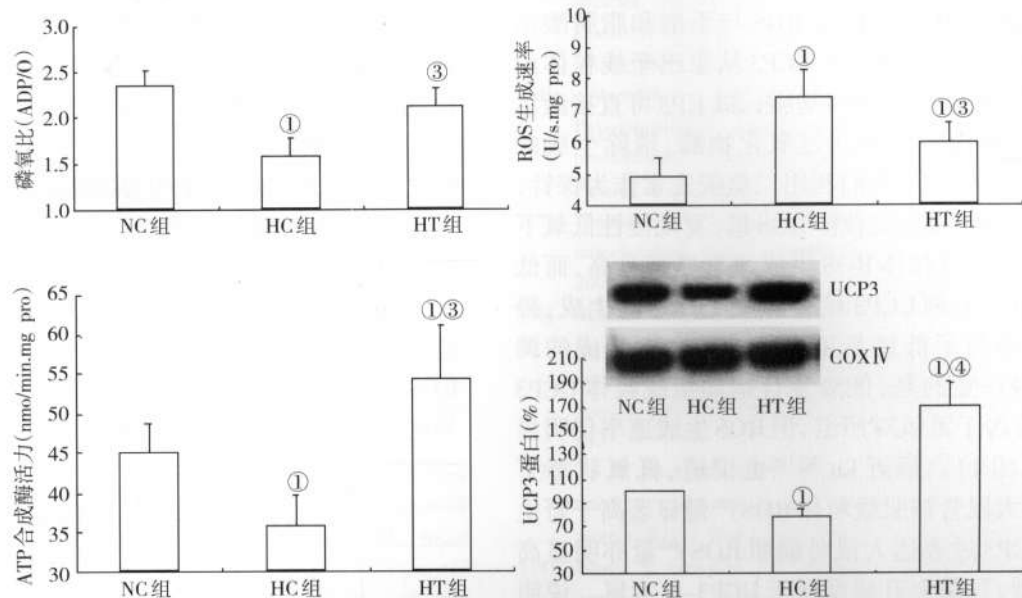
2.2 低氧及低氧复合运动对骨骼肌UCP3 mRNA表达的影响

与NC组比较,HC组骨骼肌UCP3 mRNA显著降低了21.36%(3.37±0.46Vs.2.65±0.53, $P<0.05$);HT组骨骼肌UCP3 mRNA显著升高了151.34%(3.37±0.46Vs.8.47±1.02, $P<0.01$);HT组与HC组比较,骨骼肌UCP3 mRNA显著升高($P<0.01$)。

2.3 低氧及低氧复合运动对骨骼肌线粒体UCP3蛋白表达的影响

与NC组比较,HC组线粒体UCP3蛋白显著降低($P<0.05$),HT组线粒体UCP3蛋白显著升高($P<0.01$)。HT组与HC组比较,线粒体UCP3蛋白显著升高($P<0.01$)(见图1)。

图1 各组骨骼肌线粒体ADP/O、ATP合成活力、ROS生成速率及UCP3蛋白变化



与NC组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;HT组与HC组比较:③ $P < 0.05$;④ $P < 0.01$

3 讨论

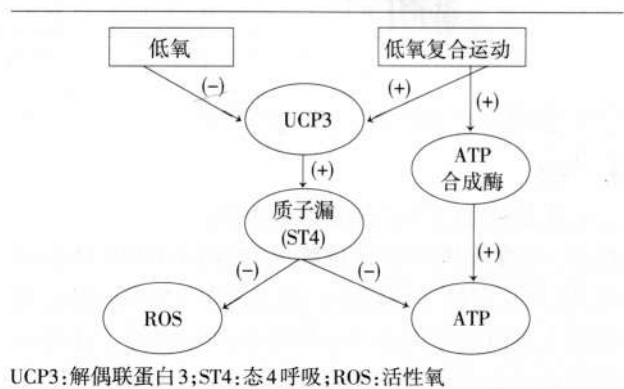
线粒体UCP3是由细胞核编码,在胞浆中转录、翻译,由线粒体跨膜转位酶复合体(TOM和TIM)介导,转入并定位于线粒体内膜发挥其生物学效应,其调控主要包括基因表达调控和翻译后调控。多种环境因素可影响骨骼肌线粒体UCP3的表达,如缺氧/缺血、运动、低温等^[10]。我们前期研究发现,急性低氧($<4h$)上调线粒体UCP3蛋白水平主要为翻译后调控,即急性低氧诱导产生的ROS启动了骨骼肌胞浆中“UCP3蛋白库”,使UCP3蛋白快速进入线粒体并装载于内膜,反馈性抑制ROS生成^[8,11]。本研究中,与常氧对照组比较,4周低氧后骨骼肌线粒体UCP3 mRNA及蛋白表达均显著降低,而4周低氧复合运动后UCP3 mRNA及蛋白表达均明显升高。这提示,慢性低氧及低氧复合运动对UCP3的调控发生在基因表达调控和翻译后调控两个层面。与本研究结果一致的是,邓红等^[12]报道,间歇性低氧复合运动可上调肥胖大鼠骨骼肌UCP3蛋白表达。Gosker等^[13]研究表明,8周跑台训练使以低氧血症为主要表现的慢性阻塞性肺病患者骨骼肌UCP3蛋白明显升高。我们前期研究表明,6周耐力运动预适应反而

降低了UCP3对急性低氧的应答幅度^[8]。这提示单纯运动与低氧复合运动对UCP3的调控信号通路及生物学效应并不一致。研究证明,肾上腺素能受体活化可通过腺苷酸环化酶-环磷酸腺苷(cAMP)途径提高UCP3表达^[10]。Moradkhan等^[14]在睡眠呼吸暂停综合征患者中发现,慢性低氧显著降低骨骼肌组织肾上腺素能受体表达水平,提示这可能是慢性低氧抑制UCP3基因表达的机制之一。研究表明,低浓度ROS可上调TOM和TIM表达,而高浓度ROS则破坏TOM和TIM结构,抑制其蛋白转运活性^[15]。本研究中慢性低氧组线粒体ROS产生速率显著升高,而低氧复合运动组ROS产生速率虽然仍高于常氧对照组,但已明显低于单纯低氧组。这提示ROS对线粒体蛋白转运系统的调控参与了慢性低氧及低氧复合运动中UCP3蛋白的翻译后调控。此外,本研究采用的耐力训练模型已被证明可明显增加线粒体生物合成,而新生线粒体与“衰老”线粒体比较,UCP3等核编码蛋白线粒体转运及内膜装配效率亦更高^[16]。上调线粒体UCP3表达可提高骨骼肌对缺血/缺氧的耐受性,一般认为与其抗氧化效应相关。UCP3执行抗氧化功能的分子机制尚不清楚,目前较

为接受的观点有如下几种:①UCP3通过温和解偶联(mild uncoupling)轻度降低线粒体膜电位($\Delta\Psi$),减少 $\Delta\Psi$ 依赖性ROS产生;②ROS与不饱和脂肪酸结合为过氧羟化脂肪酸,由UCP3从泵出至线粒体内外膜间隙,质子化后返回基质;③UCP3可直接激活线粒体基质内谷胱甘肽过氧化物酶,清除生成的ROS^[10]。本研究中,我们利用二氯荧光素作为探针,记录单位时间溢出线粒体ROS量,发现慢性低氧下调UCP3伴随线粒体ROS生成速率显著升高,而低氧复合运动上调UCP3显著抑制了ROS的生成,提示UCP3参与了低氧及复合运动中ROS生成的调节。值得注意的是,低氧复合运动组线粒体UCP3水平显著高于常氧对照组,但ROS生成速率仍明显升高(见图1)。最近Lu等^[17]也报道,低氧状态下UCP3-/-大鼠骨骼肌线粒体ROS产量显著高于野生型,但UCP3过表达大鼠骨骼肌ROS产量亦明显高于野生型,只是上升幅度低于UCP3-/-大鼠。说明UCP3不仅参与了ROS调节,还具有其他生物学效应。本研究中,慢性低氧导致所有测定的骨骼肌线粒体力能学参数异常。ST3降低可能由于氧化还原酶的损伤和/或还原当量供给的减少。研究表明,低氧可造成线粒体呼吸链复合体I的损伤并抑制其活性^[18]。本研究中,慢性低氧亦造成线粒体ATP合成酶活力降低,这些都与ST3降低相关。ST4并未伴随ST3降低,这提示,虽然组织低氧导致线粒体绝对氧供减少,但“质子漏”增加导致ST4所占比例反而增加,导致线粒体“无效氧耗”增加。因而,反映线粒体氧化磷酸化偶联程度的RCR和反映氧化磷酸化效率的ADP/O均明显降低。我们前期证明,急性低氧时骨骼肌UCP3显著上调,抑制ROS快速生成,但这是以牺牲线粒体能量转换效率为代价的^[8]。因而,慢性低氧抑制UCP3表达可能是线粒体维持能量转换效率的一种自我调控机制,但这反而引起ROS生成增加,导致膜蛋白或脂质氧化损伤,进一步增加了“质子漏”并降低线粒体能量转换效率,因而UCP3下调可能是低氧损伤的机制之一。本研究中,与单纯低氧组比较,低氧复合运动组ST3和RCR均明显增加。我们前期证实,低氧复合运动可提高大鼠肺的换气效率及动脉血氧分压^[19]。黄庆愿等^[20]也发现低氧复合运动可增加骨骼肌毛细血管密度,提高组

织氧分压,因而线粒体氧气及还原当量供应均增加。此外,运动训练诱导线粒体生物合成亦对受损的线粒体蛋白具有修复作用,因而,线粒体ST3呼吸速率明显增加。ST4仍无明显变化,但UCP3表达增加,说明线粒体内膜损伤造成的“质子漏”份额减少。我们还发现,低氧复合运动显著上调线粒体UCP3同时,ADP/O并未明显降低,而ATP合成酶活性明显升高。我们前期证明,线粒体膜电位降低10%,ATP/ADP将减少10倍,而ATP合成酶活性增加30%即可恢复能量供应^[7]。因而,我们认为,UCP3通过增加“质子漏”降低线粒体内膜电压力并抑制ROS生成,而ATP合成酶活性提高可代偿UCP3介导的“无效氧耗”,维持线粒体能量转换效率(图2)。

图2 低氧及低氧复合运动中UCP3参与ATP和ROS生成调控的模型



总之,低氧复合运动可上调UCP3表达,上调线粒体ATP合成酶活性,可提高线粒体能量转换效率,抑制活性氧产生,从而增加骨骼肌对低氧的抵抗力。为将运动训练作为临床治疗慢性阻塞性肺疾病、心力衰竭、贫血等缺氧性疾病的辅助手段提供了理论依据。

参考文献

- [1] Lundby C, Calbet JA, Robach P. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(22):3615—3623.
- [2] Hoppeler H, Klossner S, Vogt M. Training in hypoxia and its effects on skeletal muscle tissue[J]. Scand J Med Sci Sports, 2008, 18 (Suppl 1):38—49.
- [3] 李海英,赵娟,佟长青,等.间歇性低氧及游泳运动对大鼠右心室线粒体超微结构的影响[J].中国康复医学杂志,2010,25(7):643—645.

- [4] Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS, et al. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797(6—7):785—791.
- [5] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. *J Appl Physiol*, 1979, 47(6):1278—1283.
- [6] Tarricone E, Scapin C, Vitadello M, et al. Cellular distribution of Hsp70 expression in rat skeletal muscles. Effects of moderate exercise training and chronic hypoxia[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2008, 13(4):483—495.
- [7] Bo H, Jiang N, Ma G, et al. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(7):1373—1381.
- [8] 薄海,王义和,李海英,等.耐力训练抑制急性低氧时骨骼肌线粒体生物能学变化:ROS和UCP3的作用[J].*生理学报*,2008,60(6):767—776.
- [9] Jiang N, Zhang G, Bo H, et al. Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(2):138—145.
- [10] Azzu V, Brand MD. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(5):298—307.
- [11] 屈金亭,薄海,姜宁,等.“解偶联蛋白库”参与急性运动中骨骼肌线粒体解偶联蛋白3的迅速表达[J].*中国运动医学杂志*,2007, (6):657—662.
- [12] 邓红,徐晓阳,林文弢,等.间歇性低氧运动对大鼠骨骼肌线粒体解偶联蛋白3(UCP3)表达的影响[J].*体育科学*,2007,(7):59—63.
- [13] Gosker HR, Schrauwen P, Broekhuizen R, et al. Exercise training restores uncoupling protein-3 content in limb muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(5):E976—981.
- [14] Moradkhan R, Spitnale B, McQuillan P, et al. Hypoxia-induced vasodilation and effects of regional phenolamine in awake patients with sleep apnea[J]. *J Appl Physiol*, 2010, 108(5):1234—1240.
- [15] Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, et al. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms[J]. *Cell*, 2009, 138(4):628—644.
- [16] Radak Z, Atalay M, Jakus J, et al. Exercise improves import of 8-oxoguanine DNA glycosylase into the mitochondrial matrix of skeletal muscle and enhances the relative activity[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(2):238—243.
- [17] Lu Z, Sack MN. ATF-1 is a hypoxia-responsive transcriptional activator of skeletal muscle mitochondrial-uncoupling protein 3[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(34):23410—23418.
- [18] Giusti S, Converso DP, Poderoso JJ, et al. Hypoxia induces complex I inhibition and ultrastructural damage by increasing mitochondrial nitric oxide in developing CNS[J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 27(1):123—131.
- [19] 刘静,薄海,李雪华,等.低氧联合运动对大鼠肺血管重构的保护作用及结缔组织生长因子表达的影响[J].*中国康复医学杂志*, 2009,24(7):593—596,574.
- [20] 黄庆愿,蔡明春,刘福玉,等.缺氧及缺氧复合运动对大鼠骨骼肌组织氧分压的影响[J].*高原医学杂志*,2009,19(3):25.

(上接第15页)

- [4] 马国栋,高颀.耐力运动对高脂膳食诱导的脂肪肝小鼠UCP2与Mn-SOD表达及与脂肪肝关系的研究[J].*北京体育大学学报*, 2007, 30(12):1645—1648.
- [5] Shah PK, Nilsson J, Kaul S, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 1998, 97(8):780—785.
- [6] Fernando P, Bonen A, Hoffman-Goetz L. Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1993,71(10—11):854—857.
- [7] Silvestri E, de Lange P, Moreno M, et al. Fenofibrate activates the biochemical pathways and the de novo expression of genes related to lipid handling and uncoupling protein-3 functions in liver of normal rats[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006,1757(5—6):486—495.
- [8] Cortez-Pinto H, Machado MV. Uncoupling proteins and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2009,50(5):857—860.
- [9] Baffy G. Uncoupling protein-2 and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Front Biosci*, 2005,10:2082—2096.
- [10] Baffy G, Zhang CY, Glickman JN, et al. Obesity-related fatty liver is unchanged in mice deficient for mitochondrial uncoupling protein 2[J]. *Hepatology*, 2002,35(4):753—761.
- [11] St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, et al. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain[J]. *J Biol Chem*, 2002,277(47):44784—44790.
- [12] Oliveira CP, da Costa Gayotto LC, Tatai C, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet[J]. *J Cell Mol Med*, 2002,6(3):399—406.