

УДК 577.24

НЕПРЕРЫВНАЯ УМЕРЕННАЯ ФИЗИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА УСИЛИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ FGF21 И KLB У МЫШЕЙ, СТРАДАЮЩИХ ОЖИРЕНИЕМ

© 2020 И. Сюн, Я. Чэнь, Я. Лю, Б. Чжан*

*Center of Sports and Health Research, Division of Sport Science and Physical Education,
Tsinghua University, Beijing, China; E-mail: bzhang@mail.tsinghua.edu.cn*

Поступила в редакцию 12.03.2020

После доработки 27.06.2020

Принята к публикации 27.06.2020

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) и белок β -Klotho (KLB) играют важную роль в предотвращении и лечении повышенного веса и ожирения. Однако не совсем ясны условия, при которых можно индуцировать экспрессию FGF21 и KLB в различных тканях. Поэтому было проведено изучение экспрессии FGF21 и KLB при двух формах физической нагрузки: непрерывная физическая нагрузка умеренной интенсивности (МІСТ) и физическая нагрузка высокой интенсивности с перерывами в упражнениях (НІТ) (это два популярных способа снизить вес тела). Мыши были случайным образом разбиты на три группы ($n = 8$ в каждой группе): группы с МІСТ, НІТ и сидячим образом жизни (SED). Чтобы вызвать у них ожирение, все мыши на протяжении 12 недель получали обогащенный жирами пищевой рацион (HFD). Физические упражнения выполнялись на моторизованной беговой дорожке в течение восьми недель, и в каждой группе животных по-прежнему соблюдалась особая диета. Показано, что как МІСТ, так и НІТ оказывают положительный эффект в плане снижения веса тела, индуцированного HFD, и снижения уровня белка FGF21 в сыворотке крови. НІТ может улучшить показатели веса тела и снизить уровень триглицеридов в сыворотке крови (TG), в то время как МІСТ был более эффективен в обеспечении экспрессии FGF21 и KLB в печени, бурой жировой ткани (BAT) и мышцах на уровне мРНК и белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: МІСТ, НІТ, FGF21, KLB, экспрессия.

DOI: 10.31857/S0320972520080096

ВВЕДЕНИЕ

Избыточный вес и ожирение являются основными причинами возникновения многих хронических заболеваний, таких как диабет, сердечно-сосудистые заболевания и рак. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 39% взрослых людей имеют избыточный вес и 13% страдают от ожирения. Кроме того, во всем мире более 18% детей и подростков имеют избыточный вес, и они подвержены ожирению [1]. В 2007 г. Американская ака-

демия спортивной медицины провозгласила концепцию «Физические упражнения – это лекарство», и рациональные физические упражнения как экономичный и эффективный способ управления весом и здоровьем стали фундаментальной мерой для предотвращения и лечения избыточного веса и ожирения [2]. Поэтому очень важно понимание физиологических механизмов и метаболизма при снижении веса тела, вызванном физическими нагрузками, чтобы разработать новые и более эффективные формы физических упражнений.

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) является ключевым фактором путей обмена липидов, который привлекает повышенное внимание на протяжении многих лет. Как член семейства белков FGF, FGF21 был впервые описан в 2000 г. [3], а в 2005 г. были установлены его функции [4]. Ранее было показано, что FGF21 обладает особой активностью в качестве гормона, регулирующего обмен глюкозы, жиров и энергии, в том числе окисление жирных кислот и глюконеогенез. Он вызывает понижение уровня жирных кислот и триглицеридов в сыворотке крови и печени, повышает чувствительность

Принятые сокращения: FGF21 (fibroblast growth factor 21) – фактор роста фибробластов 21; KLB белок (β -Klotho) ; FGFR, FGF – рецептор фактора роста фибробластов; МІСТ (moderate-intensity continuous training) – непрерывная физическая нагрузка умеренной интенсивности; НІТ (high-intensity interval training) – физическая нагрузка высокой интенсивности с перерывами; SED (sedentary lifestyle) – сидячий образ жизни; HFD (high-fat diet) – пищевой рацион, обогащенный жирами; TG (triglyceride) – триглицерид; BAT (brown adipose tissue) – бурая жировая ткань; eWAT (epididymal white adipose tissue) – белая жировая ткань придатков.

* Адресат для корреспонденции.

клеток к действию инсулина, расход энергии и способствует потере веса [5–8]. Демонстрируя различные функции, FGF21 экспрессируется в печени [3], поджелудочной железе [9], мозгу [10], сердце [11], бурой жировой ткани (BAT) [12], белой жировой ткани (WAT) [13] и скелетных мышцах [14]. Кроме того, чтобы попасть в клетку, FGF21 должен связаться с рецепторами FGF (FGFR). В этом случае, β -Klotho (KLB), как корецептор, может способствовать эффективному взаимодействию FGF21 и FGFR [15]. В некоторых работах было показано, что KLB также экспрессируется в различных тканях [16], и определение ткани, которая может служить мишенью для действия FGF21, вероятно, обуславливается тканевой экспрессией KLB [17]. Однако условия, которые влияют на экспрессию FGF21 и KLB в различных тканях, остаются до сих пор невыясненными.

В настоящей работе было проведено изучение экспрессии FGF21 и KLB при двух формах физических упражнений: непрерывные физические упражнения средней интенсивности (МИСТ) и физические упражнения высокой интенсивности с перерывами (НИПТ). Обе формы физических упражнений популярны среди тех, кто хочет похудеть. Это первая работа, посвященная влиянию форм физических упражнений на экспрессию FGF21 и KLB в различных тканях. После восьми недель физической нагрузки у мышей, страдающих от ожирения, была определена экспрессия FGF21 и KLB в различных тканях. Показано, что в случае страдающих от ожирения мышей, восемь недель в режиме МИСТ приводили к повышению экспрессии FGF21 и KLB в печени, BAT и мышцах в большей степени, чем восемь недель НИПТ. Это исследование продемонстрировало ранее непризнанный аспект экспрессии FGF21 и KLB у мышей, страдающих от ожирения, в результате физических упражнений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные и пищевой рацион. Мыши-самцы дикого типа породы C57BL/6 ($n = 24$) в возрасте 3-х недель были получены из Центра изучения лабораторных животных Университета Циньхуа (Китай). Мышей содержали в вентилируемых клетках при контролируемой температуре (22 ± 2 °C) и влажности ($50 \pm 5\%$) с 12-часовым режимом дня и ночи и свободным доступом к воде и пище. После завершения процесса адаптации в течение одной недели, мышей случайным образом делили на три группы ($n = 8$ в каждой группе): группы с МИСТ, НИПТ и

сидячим образом жизни (SED). Все мыши получали рацион, обогащенный жирами (HFD, 60% ккал в виде жира), и в результате в течение последующих 12 нед. у них развивалось ожирение. По окончании приема HFD в течение 12 нед. начинали использовать режимы физической нагрузки и, в то же время каждая группа животных продолжала получать все тот же обогащенный жирами пищевой рацион.

Протокол физических упражнений. Сначала мыши привыкали к беговой дорожке в течение 3 дней (каждый день по 15 мин). Затем их подвергали испытаниям на моторизованной беговой дорожке для мышей в течение 8 нед. (5 дней в неделю). Использовали две формы физических упражнений (МИСТ и НИПТ). Обе группы начинали с разминки при режиме 5 м/мин в течение 10 мин. В случае МИСТ тренировку на беговой дорожке проводили при 14 м/мин (50% интенсивности $VO_{2\text{макс}}$) в течение 45 мин. В случае НИПТ тренировка на беговой дорожке состояла из 10 забегов по 1 мин и упражнений высокой интенсивности (25 м/мин, 90% интенсивности $VO_{2\text{макс}}$), перемежающихся (2 мин) с упражнениями с умеренной интенсивностью (14 м/мин). Темпы движения во время прохождения НИПТ и МИСТ повышали постепенно от 25 до 27 м/мин и от 14 до 16 м/мин более 8 нед. соответственно. Определение максимальных значений поглощения O_2 проводили с помощью прибора TSE Systems Phenomaster (Университет Циньхуа) [18–20].

Забор крови и образцов тканей. После завершения процедуры физических упражнений мышшей оставляли без пищи в течение 12 ч и затем подвергали анестезии. Удаляли печень, белую жировую ткань придатков (eWAT), BAT, четырехглавую мышцу бедра, поджелудочную железу. Образцы крови собирали, и сыворотку крови получали путем центрифугирования в течение 15 мин при 3000 об/мин и 4 °C. Все образцы быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C для дальнейшего использования.

Определение параметров крови. Определение в сыворотке уровня триглицеридов (TG) производили на автоматическом анализаторе Kehua ZY KHB-1280 (Китай). Содержание FGF21 определяли с помощью набора mouse FGF21 ELISA kit (MM-44032M1, MEIMIAN).

Окрашивание гематоксилином и эозином (H и E). Кусочки eWAT вырезали, промывали охлажденным до температуры льда фосфатным солевым раствором (PBS) и фиксировали в 10%-ом формалине. После дегидрирования с помощью серии обработок спиртом и помещения в парафин полученные кусочки ткани окрашивали гематоксилином и эозином (H и E), чтобы их на-

блюдают на микроскопе Nikon Eclipse E100 (200×) и получить изображения с помощью Nikon DS-U3. Полученные изображения анализировали с помощью программы Image-Pro Plus 6.0 («Media Cybernetics, Inc.», США).

ПЦР в реальном времени. Препарат общей РНК получали в результате экстракции из замороженных тканей с помощью набора PureLink™ RNA Mini Kit («Thermo Fisher Scientific») и подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью набора Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific»). Количественную ПЦР проводили на приборе Step One Plus Real-Time PCR instrument («Applied Biosystems»). Праймеры представлены в таблице. Все образцы были проанализированы в трех экземплярах, и результаты были получены с использованием метода ΔΔCt.

Вестерн-блоттинг. Белки из замороженных тканей экстрагировали с помощью лизисного буфера RIPA (CW2334, «CWBio»). Концентрацию белка в белковых экстрактах определяли с помощью набора BCA Protein Assay Kit (CW0014S, «CWBio»). Все образцы белков анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Разделенные белки переносили на поливинилиденфлуоридные мембраны. Блоты инкубировали с разведенными соответствующими первыми антителами против FGF21 (ab171941, «Abcam», разведение 1 : 1000), KLB (ab233416, «Abcam», разведение 1 : 1000) или внутренним контролем, в качестве которого использовали β-актин («Proteintech», разведение 1 : 3000) после блокирования мембран 10%-ным обезжиренным молоком в течение 1 ч при 37 °C. Затем блоты инкубировали в течение 2 ч с конъюгированными с пероксидазой хрена козлиными антителами против кроличьих IgG («Proteintech»). Полосы белков выявляли с помощью системы визуализации Bio-Rad

ChemiDoc™ MP imaging system. Относительные количества измеряли с помощью программного пакета ImageJ.

Статистическая обработка данных. Все данные выражали в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего (S.E.M) и анализировали с помощью программы SPSS 25.0 для статистической обработки данных. Сравнение данных групп проводили с использованием программы ANOVA и последующего анализа наименьших различий значений. Значение $p < 0,05$ рассматривали как статистически достоверное.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метод НПТ показал лучший эффект в достижении снижения веса. Чтобы изучить влияние физических упражнений на снижение содержания жира, мышей линии C57BL/6 подвергали физической нагрузке в режиме МІСТ и НПТ. В сравнении с сидячим образом жизни (SED) как МІСТ, так и НПТ вызывали снижение веса тела после восьми недель упражнений. Кроме того, НПТ способствовал большей потере веса по сравнению с МІСТ (рис. 1, а). Также в каждой группе животных были проанализированы некоторые параметры крови. Было обнаружено, что режим НПТ в значительной степени снижал уровни триглицеридов (TG) сыворотки крови в сравнении с мышами, ведущими сидячий образ жизни (SED) (рис. 1, в). Что касается уровня FGF21, то полученные данные позволяют предположить, что у мышей, подвергшихся физическому нагрузкам обоих типов (МІСТ и НПТ), уровни этого фактора роста снижены по сравнению с мышами, ведущими сидячий образ жизни. Однако не было обнаружено статистически значимых различий в уровне сывороточного FGF21 у подвергшихся физическим нагрузкам мышей из обеих групп (МІСТ и НПТ) (рис. 1, с). Кроме того, у мышей, употреблявших HFD, повышался средний размер адипоцитов, который в результате физических нагрузок снова уменьшался. НПТ оказывал более выраженный эффект на сокращение объема адипоцитов в сравнении с режимом МІСТ (рис. 1, d, рис. 1, e). Следовательно, долгосрочный режим НПТ оказался более эффективным способом, чем МІСТ, для снижения содержания жира.

МІСТ повышает экспрессию генов FGF21 и KLB в печени, бурой жировой ткани (BAT) и мышцах. FGF21 регулирует метаболизм липидов и обладает способностью предотвращать и лечить избыточный вес и ожирение [21]. KLB способен опосредовать биологическую функцию FGF21, выступая в качестве ко-рецептора [22]. Исходя

Последовательности праймеров для ПЦР

Ген	Последовательность 5'–3'
Актин	F: CGTTGACATCCGTAAGACC R: CTAGGAGCCAGAGCAGTAATC
FGF21	F: ACCTGGAGATCAGGGAGGAT R: CACCCAGGATTTGAATGACC
KLB	F: AAACAAGACCATCCCAGTGC R: AGAGGTCCAGTCCAGAGCAA

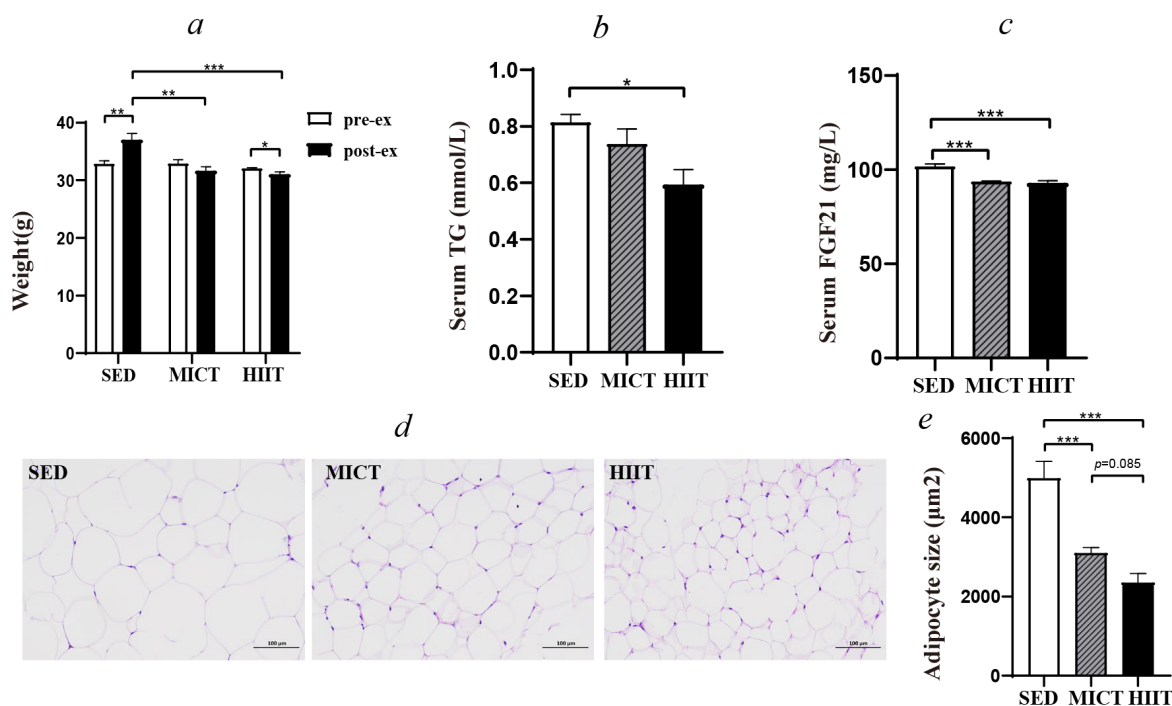


Рис. 1. Вес тела (a), уровни триглицеридов (b) и FGF21 (c) в сыворотке крови; изображение адипоцитов (d) и размер адипоцитов (e). За исключением веса тела, все остальные данные были получены после завершения упражнений (n = 6); данные представлены в виде среднего значения ± S.E.M., * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

из вышеизложенного, было изучено, может ли HIIT лучше повышать экспрессию FGF21 и KLB. Поэтому было проанализировано влияние MICT и HIIT на экспрессию мРНК FGF21 и KLB в различных тканях (печень, eWAT, BAT, мышцы и поджелудочная железа). Вопреки ожиданиям и большому удивлению MICT оказался более эффективен в повышении экспрессии FGF21 и KLB на уровне мРНК в печени, BAT и мышцах, и выявленные различия были значительными (рис. 2). Однако не было обнаружено заметной разницы между влиянием MICT и HIIT на eWAT и поджелудочную железу (результаты не представлены). Показано, что физическая нагрузка практически не влияла на экспрессию FGF21 и KLB в белой жировой ткани (WAT) и поджелудочной железе. Основываясь на этих результатах, была исследована экспрессия белков FGF21 и KLB в печени, BAT и мышцах.

MICT способствует экспрессии белков FGF21 и KLB. Как показано на рис. 3, a, не было обнаружено значительных различий в уровне белка FGF21 в печени, однако MICT в большей степени способствовал экспрессии белка KLB по сравнению с HIIT. В случае бурой жировой ткани (BAT) и мышц, было обнаружено, что MICT в основном способствовал экспрессии белка FGF21 и KLB (рис. 3, b и c). Эти данные почти в

полной мере соответствовали данным по экспрессии мРНК. В целом, MICT может в большей степени способствовать экспрессии FGF21 и KLB, чем HIIT.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В некоторых работах было показано, что FGF21, который участвует в регуляции гомеостаза глюкозы и липидов, связан с физической нагрузкой, а для взаимодействия с клетками-мишенями ему необходим белок KLB [23–25]. У человека исследования в основном затрагивали выявление изменений уровня циркулирующего FGF21 при резкой физической нагрузке или длительной умеренной физической нагрузке. При работе с мышами основное внимание было уделено изучению уровня FGF21 и KLB в различных тканях, а применяемые формы физической нагрузки включали острую физическую нагрузку, долгосрочный MICT или добровольное кручение колес. Долгосрочный HIIT представляет собой другую популярную форму физической нагрузки для снижения веса тела. Лишь в некоторых работах были изучены FGF21 или KLB. Настоящая работа является первой работой, в которой было изучено влияние долгосрочных MICT и HIIT на экспрессию FGF21-

KLB в различных тканях. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что в результате восьми недель прохождения МІСТ экспрессия FGF21 и KLB наиболее всего выражена в печени, бурой жировой ткани (BAT) и мышцах.

Печень является основным источником циркулирующего в крови белка FGF21 [26], и физические упражнения вносят вклад в повышение уровня FGF21 в печени и сыворотке крови у здоровых людей и мышей [27]. Однако

как у людей, так и у мышей с метаболическими заболеваниями, такими как ожирение, диабет и неалкогольное жировое поражение печени, наблюдается повышение уровня циркулирующего белка FGF21 по сравнению со здоровыми индивидами, и это может приводить к возникновению резистентности к действию FGF21 [28–30]. Вероятно, это связано с тем, что при метаболических заболеваниях происходит нарушение экспрессии KLB в тканях-мишенях и

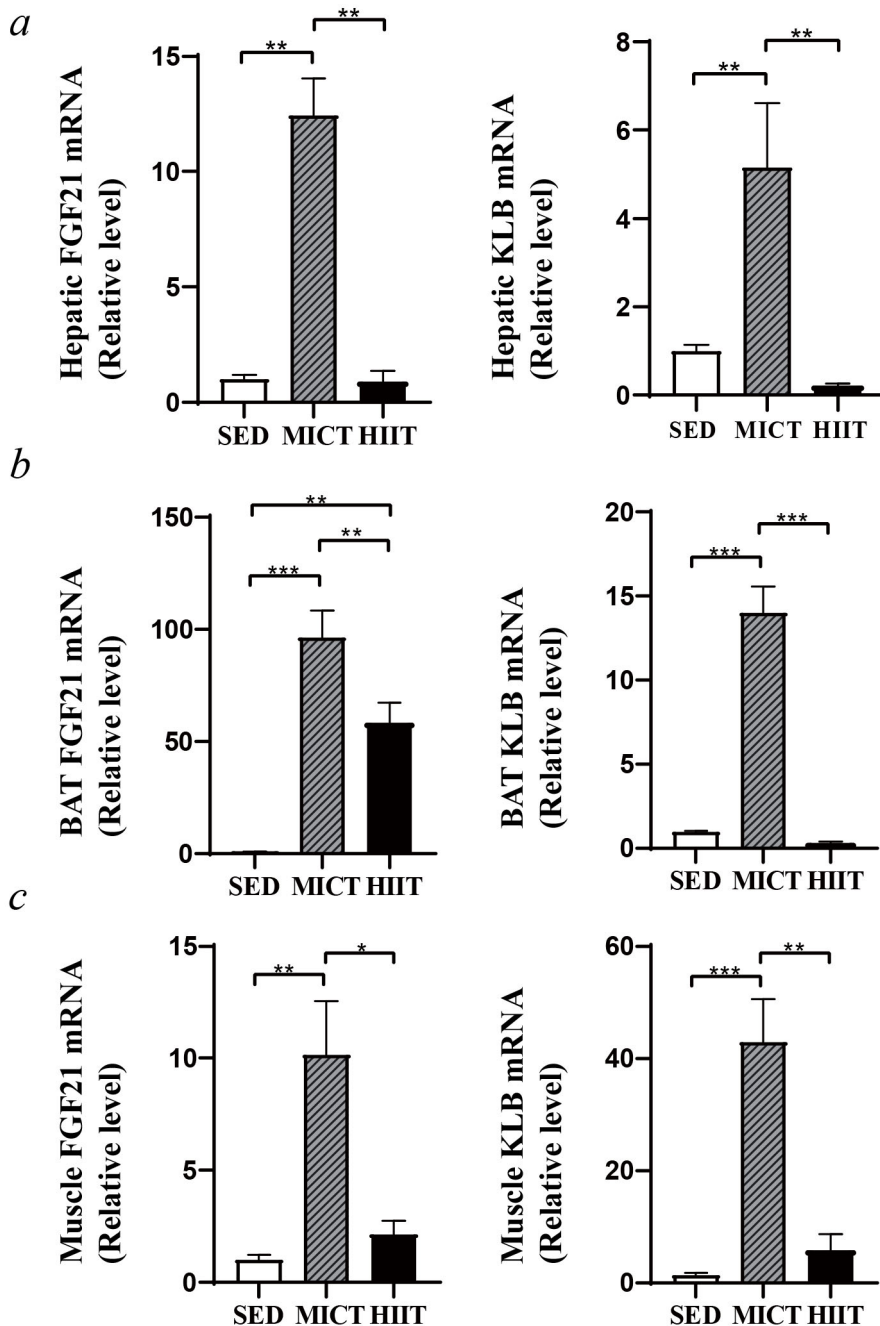


Рис. 2. Уровни экспрессии мРНК FGF21 и KLB в печени (a), BAT (b) и мышцах (c) (n = 4–6); результаты представлены в виде среднего значения ± S.E.M., * p < 0,05, p < 0,01, *** p < 0,001

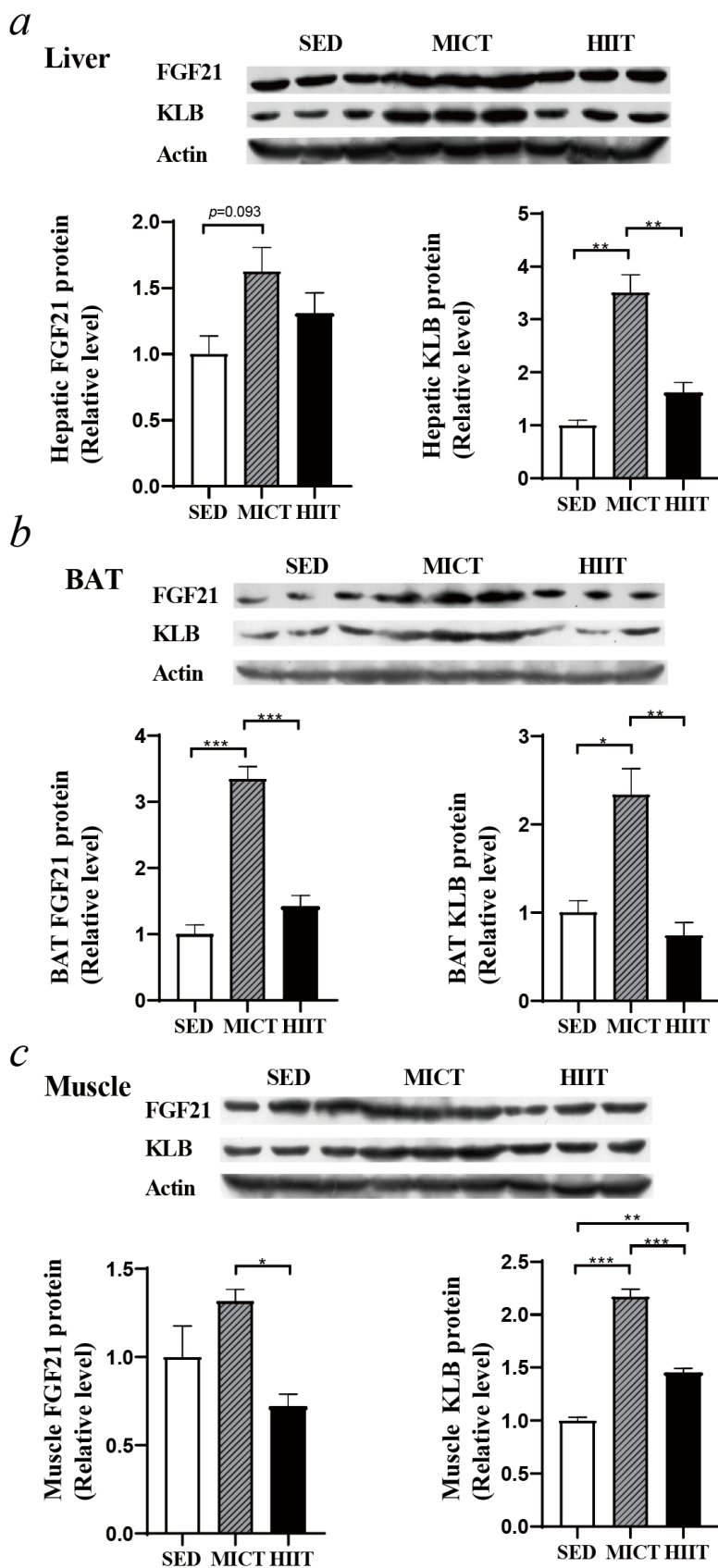


Рис. 3. Уровни экспрессии FGF21 и KLB в печени (a), BAT (b) и мышцах (c) ($n = 3$); результаты представлены в виде среднего значения \pm S.E.M.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

ослабление чувствительности к действию FGF21, образуемому в печени [31, 32]. Показано, что МІСТ в значительной степени повышает экспрессию KLB в печени, мышцах и ВАТ, что может содействовать проникновению в клетки циркулирующих молекул FGF21 и снижению уровня FGF21 в сыворотке крови. Предполагается, что может быть направлено движение FGF21 из печени через кровь к клеткам-мишеням, и восемь недель МІСТ может способствовать более лучшему прохождению по этому пути образующегося в печени белка FGF21 по сравнению с НІПТ. Это возможный механизм, с помощью которого физические упражнения понижают устойчивость клеток к действию FGF21, вызванную ожирением. Ранее было показано, что физическая нагрузка может индуцировать синтез в печени FGF21 через ATF4/PPAR α -опосредованный путь, соотношение глюкозагон/инсулин и уровни свободных жирных кислот (FFA) [33, 34]. На самом деле имеются противоречивые данные о влиянии долгосрочной физической нагрузки на печеночный и циркулирующий FGF21 у людей или мышей с метаболическими расстройствами. В случае уровня циркулирующего белка, в отдельных работах [35, 36] было показано, что физическая нагрузка может понижать уровень сывороточного FGF21, в то время как в других работах этот факт не нашел подтверждения [37, 38]. В случае печени в одних работах было показано, что физические упражнения могут способствовать повышению экспрессии FGF21 [39], но это не было подтверждено в других работах [40, 41]. Следует особо отметить, что есть некоторые методологические проблемы. Во-первых, мыши получали HFD и подвергались физическим нагрузкам в течение различного периода времени. Во-вторых, в этих работах были использованы различные формы физических упражнений, и есть различия в продолжительности их использования. Наконец, экспрессия FGF21 может также меняться в зависимости от условий питания и циркадных ритмов [42]. В целом, общепризнанно, что длительная физическая нагрузка, безусловно, влияет на уровни FGF21 в печени и т.д., однако механизм этого явления не ясен.

Бурая жировая ткань (ВАТ) функционирует как ткань, вырабатывающая тепло, и как секретирующий орган [43]. В предыдущих работах было показано, что холод может приводить к увеличению выхода FGF21 из бурой жировой ткани и экономии расхода энергии организмом. Физическая нагрузка может вызывать активацию ВАТ через PGC1 α -FGF21-UCP1, однако роль физической нагрузки в высвобождении

FGF21 из бурой жировой ткани не была установлена [44, 45].

Настоящая работа является первым исследованием, в котором было обнаружено, что продолжительная умеренная физическая нагрузка (МІСТ) может повышать экспрессию FGF21 и KLB непосредственно в бурой жировой ткани. Также показано, что долгосрочная НІПТ может повышать экспрессию белка FGF21 (но не KLB) в ВАТ, и влияние НІПТ на образующийся в ВАТ белок FGF21 было слабее, чем влияние МІСТ. Недавно было также показано, что FGF21 может индуцировать снижение веса тела через центрально-опосредованный и независимый от бурой жировой ткани механизм [46]. Это может стимулировать интерес к метаболизму бурой жировой ткани. Чтобы определить терапевтический потенциал бурой жировой ткани как мишени для действия лекарств и бороться с ожирением, в будущих исследованиях возможно совместное изучение механизма действия FGF21, образующегося в бурой жировой ткани, и физической нагрузки.

Мышечные клетки могут секретировать FGF21 в качестве миокина, что впервые было обнаружено в 2008 г. [47, 48]. Как правило, миокины непосредственно связаны с физической нагрузкой, так как мышцы являются основным двигательным органом. Однако недавние исследования поставили под сомнение, индуцирует ли физическая нагрузка экспрессию FGF21 в мышцах [33, 34], поскольку сохранение соотношения глюкозагон/инсулин приводит к блокировке индукции синтеза FGF21. Это предполагает возможную роль печени, а не мышц, в секреции FGF21 во время физических упражнений. И наоборот, полученные результаты показывают, что продолжительная умеренная физическая нагрузка может усиливать в значительной степени экспрессию FGF21 и KLB в мышцах мышей, страдающих от ожирения. Мы предполагаем, что наши результаты могут отличаться по нескольким причинам. Во-первых, митохондриальная дисфункция или резистентность к инсулину, вызванная аномальным метаболизмом жиров у мышей, страдающих от ожирения, могут способствовать экспрессии FGF21 в мышцах [49, 50]. Во-вторых, продолжительность физической нагрузки или тип упражнения могут оказывать влияние. Поэтому необходимо в будущих исследованиях совместно использовать долгосрочную МІСТ и мышей, нокаутированных по специфичному для мышц гену *FGF21*, в различных метаболических условиях и изучить фактическое влияние МІСТ на экспрессию FGF21 и KLB и физиологические последствия этих изменений.

Таким образом, в данной работе было проведено сравнение двух наиболее популярных форм физических упражнений и определение экспрессии FGF21-KLB. Было показано, что у мышей, страдающих от ожирения, в целом, наблюдается более сильный ответ в виде повышения экспрессии FGF21 и KLB в печени, ВАТ и мышцах в результате прохождения ими МІСТ по сравнению с НІТ. Между тем, к сожалению, нам не удалось полностью объяснить специфический механизм повышения экспрессии FGF21 и KLB, так как мы обнаружили лишь изменения уровня экспрессии после МІСТ или НІТ. Мы предполагаем, что различные формы расхода энергии между МІСТ и НІТ могут играть роль в экспрессии FGF21 и KLB. В недавно опубликованной работе FGF21 прошел клинические испытания в качестве лекарства для лечения метаболических заболеваний [51], однако его связь с физическими упражнениями не была установлена. Полученные результаты могут привлечь внимание к понятию, что «физичес-

кие упражнения – это лекарство» и способствовать появлению новых идей, касающихся профилактики и лечения различных метаболических заболеваний. Кроме того, следует рассмотреть многие другие формы физических упражнений, такие как длительная тренировка с отягощением и непрерывная физическая нагрузка высокой интенсивности.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования Китайской Народной Республики (грант 20194180050).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с протоколом, утвержденным Институциональным комитетом по уходу и использованию лабораторных животных (IACUC) – Institutional Animal Care and Use Committee) Университета Циньхуа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wang, H., Qiang, L., and Farmer, S. R. (2008) Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 188-200, doi: 10.1128/Mcb.00992-07.
- Lobelo, F., Stoutenberg, M., and Hutber, A. (2014) The exercise is medicine global health initiative: a 2014 update, *Brit. J. Sport Med.*, **48**, 1627-1668, doi: 10.1136/bjsports-2013-093080.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **1492**, 203-206.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., Sandusky, G. E., Hammond, L. J., Moyers, J. S., Owens, R. A., Gromada, J., Brozinick, J. T., Hawkins, E. D., Wroblewski, V. J., Li, D. S., Mehrbod, F., Jaskunas, S. R., and Shanafelt, A. B. (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator, *J. Clin. Invest.*, **115**, 1627-1635, doi: 10.1172/Jci23606.
- Kharitonov, A., and Shanafelt, A. B. (2008) Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases, *BioDrugs*, **22**, 37-44, doi: 10.2165/00063030-200822010-00004.
- Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., Moller, D. E., and Kharitonov, A. (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice, *Endocrinology*, **149**, 6018-6027, doi: 10.1210/en.2008-0816.
- Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y. Y., Hager, T., Patel, J., Ge, H. F., Weiszmann, J., Lu, S. C., Graham, M., Busby, J., Hecht, R., Li, Y. S., Li, Y., Lindberg, R., and Veniant, M. M. (2009) Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models-association with liver and adipose tissue effects, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, 1105-1114, doi: 10.1152/ajpendo.00348.2009.
- Fazeli, P. K., Lun, M., Kim, S. M., Bredella, M. A., Wright, S., Zhang, Y., Lee, H., Catana, C., Klibanski, A., Patwari, P., and Steinhauser, M. L. (2015) FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans, *J. Clin. Invest.*, **125**, 4601-4611, doi: 10.1172/Jci83349.
- Wente, W., Efanov, A. M., Brenner, M., Kharitonov, A., Koester, A., Sandusky, G. E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H., and Gromada, J. (2006) Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways, *Diabetes*, **55**, 2470-2478, doi: 10.2337/db05-1435.
- Bookout, A. L., de Groot, M. H., Owen, B. M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H. L., Ding, X., Elmquist, J. K., Takahashi, J. S., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2013) FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system, *Nat. Med.*, **19**, 1147-1152, doi: 10.1038/nm.3249.
- Zhang, C., Huang, Z., Gu, J., Yan, X., Lu, X., Zhou, S., Wang, S., Shao, M., Zhang, F., Cheng, P., Feng, W., Tan, Y., and Li, X. (2015) Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway, *Diabetologia*, **58**, 1937-1948, doi: 10.1007/s00125-015-3630-8.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011) Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue, *J. Biol. Chem.*, **286**, 12983-12990, doi: 10.1074/jbc.M110.215889.
- Fisher, F. M., Adams, A., Antonellis, P., Kharitonov, A., Flier, J., and Maratos-Flier, E. (2009) Genetic and diet induced obesity are associated with FGF21 resistance in adipose tissue and liver, *Obesity*, **17**, 68-68.
- Mashili, F. L., Austin, R. L., Deshmukh, A. S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J. R., Chibalin, A. V., Moller, D. E., Kharitonov, A., and Krook, A. (2011) Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal

- muscle: implications for type 2 diabetes and obesity, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **27**, 286-297, doi: 10.1002/dmrr.1177.
15. Kharitonov, A., Dunbar, J. D., Bina, H. A., Bright, S., Moyers, J. S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S. F., Knierman, M. D., Hale, J. E., Coskun, T., and Shanafelt, A. B. (2008) FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho, *J. Cell. Physiol.*, **215**, 1-7, doi: 10.1002/jcp.21357.
 16. Petryszak, R., Keays, M., Tang, Y. A., Fonseca, N. A., Barrera, E., Burdett, T., Fullgrabe, A., Fuentes, A. M., Jupp, S., Koskinen, S., Mannion, O., Huerta, L., Megy, K., Snow, C., Williams, E., Barzine, M., Hastings, E., Weisser, H., Wright, J., Jaiswal, P., Huber, W., Choudhary, J., Parkinson, H. E., and Brazma, A. (2016) Expression atlas update – an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 746-752, doi: 10.1093/nar/gkv1045.
 17. Diaz-Delfin, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C., and Villarroya, F. (2012) TNF-alpha represses beta-Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway, *Endocrinology*, **153**, 4238-4245, doi: 10.1210/en.2012-1193.
 18. Wisløff, U., Helgerud, J., Kemi, O. J., and Ellingsen, *Ø. (2001) Intensity-controlled treadmill running in rats: VO2 max and cardiac hypertrophy, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **280**, 1301-1310, doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1301.
 19. Petot, H., Meilland, R., Le Moyec, L., Mille-Hamard, L., and Billat, V. L. (2012) A new incremental test for VO2 max accurate measurement by increasing VO2 max plateau duration, allowing the investigation of its limiting factors, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **112**, 2267-2276, doi: 10.1007/s00421-011-2196-5.
 20. Ayachi, M., Niel, R., Momken, I., Billat, V. L., and Mille-Hamard, L. (2016) Validation of a ramp running protocol for determination of the true VO2 max in mice, *Front Physiol.*, **7**, 372, doi: 10.3389/fphys.2016.00372.
 21. Geng, L., Liao, B., Jin, L., Huang, Z., Triggler, C. R., Ding, H., Zhang, J., Huang, Y., Lin, Z., and Xu, A. (2019) Exercise alleviates obesity-induced metabolic dysfunction via enhancing FGF21 sensitivity in adipose tissues, *Cell Rep.*, **26**, 2738-2752, doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.014.
 22. Somm, E., Henry, H., Bruce, S. J., Aeby, S., Rosikiewicz, M., Sykiotis, G. P., Asrih, M., Jornayvaz, F. R., Denechaud, P. D., Albrecht, U., Mohammadi, M., Dwyer, A., Aciermo, J. S., Jr., Schoonjans, K., Fajas, L., Greub, G., and Pitteloud, N. (2017) beta-Klotho deficiency protects against obesity through a crosstalk between liver, microbiota, and brown adipose tissue, *JCI Insight*, **2**, doi: 10.1172/jci.insight.91809.
 23. Tezze, C., Romanello, V., and Sandri, M. (2019) FGF21 as modulator of metabolism in health and disease, *Front. Physiol.*, **10**, 419, doi: 10.3389/fphys.2019.00419.
 24. Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabe de Angelis, M., and Haring, H. U. (2017) Fibroblast growth factor 21-metabolic role in mice and men, *Endocr. Rev.*, **38**, 468-488, doi: 10.1210/er.2017-00016.
 25. Fisher, F. M., and Maratos-Flier, E. (2016) Understanding the physiology of FGF21, *Annu. Rev. Physiol.*, **78**, 223-241, doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105339.
 26. Markan, K. R., Naber, M. C., Ameka, M. K., Andereg, M. D., Mangelsdorf, D. J., Klierer, S. A., Mohammadi, M., and Potthoff, M. J. (2014) Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding, *Diabetes*, **63**, 4057-4063, doi: 10.2337/db14-0595.
 27. Kim, K. H., Kim, S. H., Min, Y. K., Yang, H. M., Lee, J. B., and Lee, M. S. (2013) Acute exercise induces FGF21 expression in mice and in healthy humans, *PLoS One*, **8**, e63517, doi: 10.1371/journal.pone.0063517.
 28. Dushay, J., Chui, P. C., Gopalakrishnan, G. S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F. M., Badman, M. K., Martinez-Chantar, M. L., and Maratos-Flier, E. (2010) Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, **139**, 456-463, doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.054.
 29. Yilmaz, Y., Eren, F., Yonal, O., Kurt, R., Aktas, B., Celikel, C. A., Ozdogan, O., Imeryuz, N., Kalayci, C., and Avsar, E. (2010) Increased serum FGF21 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Eur. J. Clin. Invest.*, **40**, 887-892, doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02338.x.
 30. Chavez, A. O., Molina-Carrion, M., Abdul-Ghani, M. A., Folli, F., Defronzo, R. A., and Tripathy, D. (2009) Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance, *Diabetes Care*, **32**, 1542-1546, doi: 10.2337/dc09-0684.
 31. Ji, F., Liu, Y., Hao, J. G., Wang, L. P., Dai, M. J., Shen, G. F., and Yan, X. B. (2019) KLB gene polymorphism is associated with obesity and non-alcoholic fatty liver disease in the Han Chinese, *Aging (Albany NY)*, **11**, doi: 10.18632/aging.102293.
 32. Samms, R. J., Cheng, C. C., Kharitonov, A., Gimeno, R. E., and Adams, A. C. (2016) Overexpression of beta-klotho in adipose tissue sensitizes male mice to endogenous FGF21 and provides protection from diet-induced obesity, *Endocrinology*, **157**, 1467-1480, doi: 10.1210/en.2015-1722.
 33. Hansen, J. S., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Hoene, M., Drescher, A., Weigert, C., Pedersen, B. K., and Plomgaard, P. (2015) Glucagon-to-insulin ratio is pivotal for splanchnic regulation of FGF-21 in humans, *Mol. Metab.*, **4**, 551-560, doi: 10.1016/j.molmet.2015.06.001.
 34. Hansen, J. S., Pedersen, B. K., Xu, G., Lehmann, R., Weigert, C., and Plomgaard, P. (2016) Exercise-induced secretion of FGF21 and Follistatin are blocked by pancreatic clamp and impaired in type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **101**, 2816-2825, doi: 10.1210/jc.2016-1681.
 35. Taniguchi, H., Tanisawa, K., Sun, X., Kubo, T., and Higuchi, M. (2016) Endurance exercise reduces hepatic fat content and serum fibroblast growth factor 21 levels in elderly men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **101**, 191-198, doi: 10.1210/jc.2015-3308.
 36. Yang, S. J., Hong, H. C., Choi, H. Y., Yoo, H. J., Cho, G. J., Hwang, T. G., Baik, S. H., Choi, D. S., Kim, S. M., and Choi, K. M. (2011) Effects of a three-month combined exercise programme on fibroblast growth factor 21 and fetuin-A levels and arterial stiffness in obese women, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **75**, 464-469, doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04078.x.
 37. Andersen, T. R., Schmidt, J. F., Thomassen, M., Hornstrup, T., Frandsen, U., Randers, M. B., and Bangsbo, J. (2014) A preliminary study: effects of football training on glucose control, body composition, and performance in men with type 2 diabetes, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **24**, 43-56, doi: 10.1111/sms.12259.
 38. Besse-Patin, A., Montastier, E., Vinel, C., Castan-Laurell, I., Louche, K., Dray, C., and Valet, P. (2014) Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine, *Int. J. Obesity*, **38**, 707-713, doi: 10.1038/ijo.2013.158.
 39. Berglund, E. D., Lustig, D. G., Baheza, R. A., Hasenour, C. M., Lee-Young, R. S., Donahue, E. P., and Wasserman, D. H. (2011) Hepatic glucagon action is essential for exercise-induced reversal of mouse fatty liver, *Diabetes*, **60**, 2720-2729, doi: 10.2337/db11-0455.
 40. Loyd, C., Magrisso, I. J., Haas, M., Balusu, S., Krishna, R., Itoh, N., and Habegger, K. M. (2016) Fibroblast growth

- factor 21 is required for beneficial effects of exercise during chronic high-fat feeding, *J. Appl. Physiol.*, **121**, 687-698, doi: 10.1152/jappphysiol.00456.2016.
41. Fletcher, J. A., Linden, M. A., Sheldon, R. D., Meers, G. M., Morris, E. M., Butterfield, A., and Rector, R. S. (2016) Fibroblast growth factor 21 and exercise-induced hepatic mitochondrial adaptations, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **310**, 832-843, doi: 10.1152/ajpgi.00355.2015.
 42. Yu, H., Xia, F., Lam, K. S., Wang, Y., Bao, Y., Zhang, J., and Xu, A. (2011) Circadian rhythm of circulating fibroblast growth factor 21 is related to diurnal changes in fatty acids in humans, *Clin. Chem.*, **57**, 691-700, doi: 10.1373/clinchem.2010.155184.
 43. Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., and Giral, M. (2017) Brown adipose tissue as a secretory organ, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 26-35, doi: 10.1038/nrendo.2016.136.
 44. Sanchez-Delgado, G., Martinez-Tellez, B., Olza, J., Aguilera, C. M., Gil, A., and Ruiz, J. R. (2015) Role of exercise in the activation of brown adipose tissue, *Ann. Nutr. Metab.*, **67**, 21-32, doi: 10.1159/000437173.
 45. Peres Valgas da Silva, C., Hernandez-Saavedra, D., White, J. D., and Stanford, K. I. (2019) Cold and exercise: therapeutic tools to activate brown adipose tissue and combat obesity, *Biology (Basel)*, **8**, doi: 10.3390/biology8010009.
 46. BonDurant, L. D., Ameka, M., Naber, M. C., Markan, K. R., Idiga, S. O., Acevedo, M. R., and Potthoff, M. J. (2017) FGF21 regulates metabolism through adipose-dependent and-independent mechanisms, *Cell Metab.*, **25**, 935-944, doi: 10.1016/j.cmet.2017.03.005.
 47. Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008) FGF21 is an Akt-regulated myokine, *FEBS Lett.*, **582**, 3805-3810, doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.021.
 48. Izumiya, Y., Hopkins, T., Morris, C., Sato, K., Zeng, L., Viereck, J., Hamilton, J. A., Ouchi, N., LeBrasseur, N. K., and Walsh, K. (2008) Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice, *Cell Metab.*, **7**, 159-172, doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.003.
 49. Kim, K. H., Jeong, Y. T., Oh, H., Kim, S. H., Cho, J. M., Kim, Y. N., Kim, S. S., Kim, D. H., Hur, K. Y., Kim, H. K., Ko, T., Han, J., Kim, H. L., Kim, J., Back, S. H., Komatsu, M., Chen, H. C., Chan, D. C., Konishi, M., Itoh, N., Choi, C. S., and Lee, M. S. (2013) Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine, *Nat. Med.*, **19**, 83-92, doi: 10.1038/nm.3014.
 50. Lindegaard, B., Hvid, T., Grondahl, T., Frosig, C., Gerstoft, J., Hojman, P., and Pedersen, B. K. (2013) Expression of fibroblast growth factor-21 in muscle is associated with lipodystrophy, insulin resistance and lipid disturbances in patients with HIV, *PLoS One*, **8**, e55632, doi: 10.1371/journal.pone.0055632.
 51. Verzijl, C. R. C., Van De Peppel, I. P., Struik, D., and Jonker, J. W. (2020) Pegbelfermin (BMS-986036): an investigational PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **29**, 125-133, doi: 10.1080/13543784.2020.1708898.

MODERATE-INTENSITY CONTINUOUS TRAINING IMPROVES FGF21 AND KLB EXPRESSION IN OBESE MICE

Yingzhe Xiong, Yan Chen, Yao Liu, and Bing Zhang*

Center of Sports and Health Research, Division of Sport Science and Physical Education, Tsinghua University, Beijing, China; E-mail: bzhang@mail.tsinghua.edu.cn

Received March 12, 2020

Revised June 27, 2020

Accepted June 27, 2020

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) and β -Klotho (KLB) play an important role in preventing and treating overweight and obesity. However, it is unclear what conditions promote FGF21 and KLB expression in different tissues. Therefore, we studied the FGF21 and KLB expression related to two forms of exercise: moderate-intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT) (two popular ways in weight loss). Mice were randomly divided into three groups ($n = 8$ per group): MICT, HIIT, and sedentary lifestyle (SED). All mice were fed a high-fat diet (HFD) for 12 weeks to induce obesity. The exercise was performed on a motorized treadmill for another eight weeks and the diet continued in each group. We found that both MICT and HIIT had positive effects on the loss of HFD-induced body weight and serum FGF21 levels. HIIT can better decrease body weight and serum triglyceride (TG) levels, while MICT was more effective at promoting FGF21 and KLB expression in the liver, brown adipose tissue (BAT), and muscle at the mRNA and protein levels.

Keywords: MICT, HIIT, FGF21, KLB, expression