·基础研究·

基于Nrf2/GPX4信号通路探讨电针抑制铁死亡改善运动性疲劳的作用机制

张世雯[1,2,3],刘 伟[4],谢琼生[5],邹丽娟[6],潘华山[6,7*]

1 广州中医药大学第二临床医学院,广东 广州 510120;
2 广州中医药大学科技创新中心,广东 广州 510006;
3 广东省中医院,广东 广州 510120;
4 广州中医药大学岭南医学研究中心,广东 广州 510405;
5 广东生态工程职业学院,广东 广州 510520;
6 广东食品药品职业学院,广东 广州 510520;
7 东莞广州中医药大学研究院,广东 东莞 523808
* 通信作者:潘华山,E-mail:phs681011@163.com

收稿日期:2025-11-21;接受日期:2026-03-08
基金项目:广东省自然科学基金面上项目(2024A1515012151);广东省教育厅项目(2025KTSCX303,2024KQNCX328)
DOI:10.3724/SP.J.1329.2026.10009

摘要 **目的** 基于核因子E2相关因子2(Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)信号通路探讨电针抑制铁死亡改善运动性疲劳(EIF)的作用机制。**方法** 选取SPF级雄性C57BL/6J小鼠40只,适应性饲养1周后采用随机数字表法将小鼠分为对照组、模型组、电针组和Nrf2抑制剂组,每组10只。除对照组外,其余3组构建EIF模型。对照组不给予任何处理;模型组仅造模处理;电针组每日力竭游泳运动后,间隔半小时给予电针干预,每次15 min,每日1次,连续干预4周;Nrf2抑制剂组每日力竭游泳运动后,立即给予Nrf2抑制剂组腹腔注射ML385(30 mg/kg),间隔半小时后进行电针干预,电针干预方法同电针组,连续干预4周。在实验周期结束次日(末次干预后24 h内),对各组进行终末力竭游泳测试;采用苏木素-伊红染色法观察骨骼肌组织形态;采用透射电子显微镜观察骨骼肌组织的超微结构;采用水溶性四唑盐-1(WST-1)法对骨骼肌组织中总超氧化物歧化酶(SOD)含量进行测定;采用比色法对骨骼肌组织中铁含量进行测定;采用比色法对血清中肌酸激酶(CK)含量进行测定;采用二氢乙啶(DHE)荧光染色法对骨骼肌组织活性氧(ROS)水平进行检测;采用Western blot对骨骼肌组织中Nrf2、GPX4和铁代谢相关蛋白铁蛋白重链1(Fth1)蛋白相对表达量进行检测。**结果** 与对照组比较,模型组、电针组和Nrf2抑制剂组末次力竭游泳时间均缩短($P<0.05$);与模型组比较,电针组末次力竭游泳时间延长($P<0.05$);与电针组比较,Nrf2抑制剂组末次力竭时间缩短($P<0.05$)。对照组肌纤维排列整齐紧密,肌束完整,横纹清晰并且无明显间隙;与对照组比较,模型组、电针组和Nrf2抑制剂组均出现了不同程度的肌纤维损伤,其中模型组肌间隙明显增宽,肌纤维大小不一且伴断裂,间质水肿明显;与模型组比较,电针组上述病理变化明显减轻,表现为肌间隙变窄,仅见少量肌纤维断裂,水肿减轻;与电针组比较,Nrf2抑制剂组病理变化加重,肌间隙增宽,肌纤维断裂及水肿更明显。对照组电镜下可见线粒体结构清晰完整,嵴排列致密整齐;与对照组比较,模型组可见肌肉线粒体肿胀,嵴断裂,伴空泡化或固缩;与模型组比较,电针组上述病理变化明显减轻,表现为结构基本完整,线粒体肿胀减轻,嵴断裂减少;与电针组比较,Nrf2抑制剂组肌肉线粒体损伤加重,肿胀、嵴断裂及空泡化或固缩更明显。与对照组比较,模型组、电针组和Nrf2抑制剂组骨骼肌中SOD含量均降低($P<0.05$),骨骼肌中铁含量和血清中

引用格式:张世雯,刘伟,谢琼生,等. 基于Nrf2/GPX4信号通路探讨电针抑制铁死亡改善运动性疲劳的作用机制[J]. 康复学报,2026,36(10):747-756.
ZHANG S W,LIU W,XIE Q S,et al. Mechanism underlying electroacupuncture-mediated inhibits of ferroptosis to alleviate exercise-induced fatigue through the Nrf2/GPX4 signaling pathway [J]. Rehabil Med,2026,36(10):747-756.
DOI:10.3724/SP.J.1329.2026.10009

©《康复学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND 4.0协议 © *Rehabilitation Medicine*, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

CK含量均增加（$P<0.05$）；与模型组比较，电针组骨骼肌中SOD含量升高（$P<0.05$），骨骼肌中铁含量和血清中CK含量均下降（$P<0.05$）；与电针组比较，Nrf2抑制剂组骨骼肌中SOD含量降低（$P<0.05$），骨骼肌中铁含量和血清CK含量均增加（$P<0.05$）。与对照组比较，模型组、电针组和Nrf2抑制剂组骨骼肌中DHE平均荧光强度均更高（$P<0.05$）；与模型组比较，电针组骨骼肌中DHE平均荧光强度更低（$P<0.05$）；与电针组比较，Nrf2抑制剂组骨骼肌中DHE平均荧光强度更高（$P<0.05$）。与对照组比较，模型组、电针组和Nrf2抑制剂组Nrf2、GPX4和Fth1蛋白相对表达量均下降（$P<0.05$）；与模型组比较，电针组Nrf2、GPX4和Fth1蛋白相对表达量均上升（$P<0.05$）；与电针组比较，Nrf2抑制剂组Nrf2、GPX4和Fth1蛋白相对表达量均下降（$P<0.05$）。**结论**　电针能有效改善EIF，其机制可能与Nrf2/GPX4信号通路介导的铁死亡有关。

关键词　运动性疲劳；电针；Nrf2/GPX4信号通路；铁死亡；活性氧

随着全民健身热潮的兴起，运动锻炼已成为人们保持健康的重要手段。然而，在人们受益于运动锻炼的同时，一些问题也随之产生，其中运动性疲劳（exercise induced fatigue，EIF）已成为运动锻炼人群亟待解决的关键问题[1]。EIF是指由于机体长时间高强度的训练或运动超过其机体承受能力，导致机体出现生理机能暂时性降低的现象，表现为肌肉酸痛、僵硬、抽搐和颤抖等，运动表现能力下降，运动损伤风险增加[2-3]。当疲劳持续时间过长且未能得到积极有效处理，将会继发许多器质性疾病，如急性循环器官疾病（如脑血管疾病和心血管疾病）等，对机体造成严重不良影响[4]。

越来越多的证据表明，铁死亡在EIF的发生和发展中发挥着重要作用，并可能成为EIF的潜在治疗靶点[5-7]。铁死亡是一种以细胞内铁超载及脂质过氧化物累积为其显著特征且不同于细胞凋亡、自噬与其他形式死亡的独特细胞死亡方式[8]。核因子E2相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）是一种应激诱导转录因子，其转录激活与抗铁死亡有关。谷胱甘肽过氧化物酶4（glutathione peroxidase 4，GPX4）与铁蛋白重链1（ferritin heavy chain 1，Fth1）等铁死亡相关的酶和蛋白质均受Nrf2的转录调节[9]。其中，GPX4负责清除脂质过氧化物，而Fth1作为铁蛋白的主要亚基，负责将游离铁（Fe^{2+}）转化为无毒的储存铁（Fe^{3+}），从而限制芬顿反应的发生，且值得注意的是，线粒体呼吸链电子漏产生的超氧阴离子是活性氧（reactive oxygen species，ROS）的主要来源和初始形式，其经超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）歧化生成的过氧化氢可与Fe^{2+}发生芬顿反应，生成氧化性最强的羟自由基，从而将铁超载与ROS过量蓄积、脂质过氧化损伤紧密偶联[10]。据报道，激活Nrf2可通过上调靶基因GPX4和Fth1抑制铁死亡发生，减轻心肌损伤[11-12]。基于此，本研究通过为期4周的力竭游泳运动建立EIF小鼠模型，观察电针对EIF小鼠末次力竭游泳时间及骨骼肌病理损伤的改善作用，以及对骨骼肌Nrf2/GPX4信号通路及其介导的铁死亡相关指标的影响，并以Nrf2抑制剂ML385进行反向验证，探讨电针改善EIF的作用机制是否与激活Nrf2/GPX4信号通路、抑制铁死亡有关，以期为电针防治EIF提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

选取SPF级雄性C57BL/6J小鼠40只，体质量18～22 g，6～8周龄，购自广东维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号：SCXK（粤）2022-0063]。小鼠饲养于广州中医药大学SPF级动物实验中心[实验动物使用许可证号：SYXK（粤）2023-0342]，饲养环境严格控制：室温（23±2）℃，相对湿度（50±5）%，光照周期为12 h明/12 h暗。小鼠分笼饲养，5只/笼，自由摄食标准啮齿类动物饲料和饮水。适应性饲养1周后进入实验程序。动物实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会审批（审批号：20250522008）。

1.2　主要实验仪器与试剂

1.2.1　主要实验仪器　电针治疗仪（型号：BT701-IB）购自上海华谊医用仪器有限公司；多功能酶标仪（型号：SpectraMax i3X）购自美谷分子仪器公司；倒置荧光显微镜（型号：Eclipse Ti-SR）、荧光成像系统（型号：DS-U3）均购自尼康仪器（上海）有限公司；透射电子显微镜（型号：HT7800）购自日立高新技术公司；化学发光凝胶成像系统（型号：OI 600）购自广州光仪生物科技有限公司；气体麻醉仪（型号：VMR）购自美国Matrix公司。

1.2.2 主要实验试剂 Nrf2抑制剂ML385（货号：HY-100523）购自MedChemExpress公司；SOD检测试剂盒（货号：A001-3-2）、组织铁测定试剂盒（货号：A039-2-1）、肌酸激酶（creatinekinase，CK）测定试剂盒（货号：A032-1-1）均购自南京建成生物工程研究所；二氢乙啶（dihydroethidium，DHE）ROS检测试剂盒（货号：S0063）购自碧云天生物技术有限公司；兔源Nrf2一抗（货号：16396-1-AP）、兔源GPX4一抗（货号：30388-1-AP）均购自Proteintech公司；兔源Fth1一抗（货号：4393S）购自Cell Signaling Technology公司；兔源GAPDH一抗（货号：AP0063）购自Biogot公司；山羊抗兔二抗（货号：IHB0011）购自Bayjoint公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组 采用随机数字表法将小鼠分为对照组、模型组、电针组和Nrf2抑制剂组，每组10只。

1.3.2 实验动物模型制备 采用力竭游泳运动诱导法建立EIF模型，参考前期研究并结合文献进行优化[13-15]。造模前对所有小鼠进行3 d游泳预训练，剔除游泳时间偏差过大或过小的小鼠。除对照组外，其余3组尾部负重5%体质量的铅丝，置于水温（25±0.5）℃、水深20～25 cm的水箱中每日游泳至力竭并记录力竭游泳时间，持续4周，游泳时以玻璃棒搅动水流避免贴壁漂浮。力竭判定标准为游泳协调性丧失，连续3次未能主动浮出水面或上浮时间＜10 s，捞出后无法完成翻正反射，即视为力竭，提示EIF模型制备成功。

1.3.3 干预方法

1.3.3.1 对照组和模型组 对照组不给予任何处理，模型组仅造模处理。

1.3.3.2 电针组 每日力竭游泳运动后，间隔半小时给予电针干预。气体麻醉仪麻醉，参照《小鼠常用针灸穴位》[16]取穴足三里（ST36）、三阴交（SP6）和脾俞（BL20），局部消毒后针刺双侧穴位，足三里、三阴交直刺深度3～5 mm，脾俞斜刺3～5 mm，连接电针仪，足三里、三阴交、脾俞接负极相应附点接正极，取疏波，频率2 Hz，强度以小鼠穴区局部肌肉轻微震颤为度（约0.5 mA），每次15 min，每日1次，连续干预4周。

1.3.3.3 Nrf2抑制剂组 每日力竭游泳运动后，立即给予Nrf2抑制剂组腹腔注射ML385（30 mg/kg），间隔半小时后进行电针干预，电针干预方法同“1.3.3.2”所述，连续干预4周。

1.3.4 取材方案 实验结束后，小鼠禁食12 h，采用3%戊巴比妥钠腹腔注射（45 mg/kg）进行麻醉，摘眼球取血，脱臼处死。全血常温静置2 h后，4 ℃离心15 min，转速设定3 000 r/min，收集血清于-20 ℃冰箱备用。小鼠处死后，剪取部分骨骼肌组织以4%多聚甲醛固定，部分骨骼肌组织分块放于冻存管，液氮速冻后于-80 ℃冰箱保存。对于透射电子显微镜所用组织，麻醉处死小鼠后1～3 min取新鲜组织块，立即投入装有电镜固定液的培养皿内，剪刀剪成1 mm×1 mm×1 mm小组织块，马上转移并浸入预冷电镜固定液中用于后续检测。

1.4 观察指标

1.4.1 末次力竭游泳时间计算 在实验周期结束次日（末次干预后24 h内），对各组进行终末力竭游泳测试。使用高精度秒表（精度0.01 s）记录从小鼠入水瞬间至达到力竭标准的时间，作为末次力竭游泳时间。

1.4.2 骨骼肌组织形态观察 采用苏木素-伊红染色法观察骨骼肌组织形态。取4%多聚甲醛固定的骨骼肌，修剪横断面为3 mm×3 mm、厚约2 mm的组织块，脱水、透明、浸蜡、包埋，随后在切片机上连续常规切片，固定于载玻片上，经乙醇、二甲苯浸泡脱蜡后浸泡于苏木素染液2 min，蒸馏水冲洗1 min，盐酸乙醇分化5 s，氨水返蓝15 s，后蒸馏水冲洗1 min，伊红染液2 min；蒸馏水冲洗1 min，乙醇分化，后用二甲苯透明并以树胶封片，最后用光学显微镜观察骨骼肌组织形态变化，采集图像并分析。

1.4.3 骨骼肌组织的超微结构观察 采用透射电子显微镜观察骨骼肌组织的超微结构。将组织分割为1 mm×1 mm×1 mm小块，置于预冷的（4 ℃）4%戊二醛溶液固定24 h，采用PBS缓冲液漂洗后，使用1%四氧化锇进行后固定2 h。样本经系列漂洗，梯度乙醇脱水，环氧树脂渗透包埋制备超薄切片。切片分别经4%醋酸铀和0.4%柠檬酸铅溶液进行重金属双重电子染色，置于透射电子显微镜下完成超微结构观察及图像采集。

1.4.4 水溶性四唑盐-1法检测骨骼肌组织中SOD含量 采用水溶性四唑盐-1（water soluble tetrazolium salt-1，WST-1）法对骨骼肌组织中SOD含量进行测定。称取适量冻存骨骼肌组织块，放入含研磨珠的离心管中，以1∶9的重量（g）与体积（mL）比加入预冷的0.01 mol/L PBS（pH值7.4）充分混匀。离心管

置于KZ-Ⅲ-FP高速低温组织研磨仪中，设定研磨参数：频率60 Hz，运行60 s，间歇10 s，循环6次，直至组织充分裂解。离心后提取上清，使用BCA方法测定蛋白浓度，严格按照SOD生化检测试剂盒指南执行，酶标仪检测450 nm处吸光度值，计算各组骨骼肌组织中SOD含量。

1.4.5 比色法检测骨骼肌组织铁含量 采用比色法对骨骼肌组织中铁含量进行测定。骨骼肌组织均质后使用BCA方法测定蛋白浓度，之后严格按照组织铁生化检测试剂盒说明书步骤操作，酶标仪检测520 nm处吸光度值，计算各组骨骼肌组织中铁含量。

1.4.6 比色法检测血清中CK含量 采用比色法对血清中CK含量进行测定。-20 ℃冰箱取血清，严格按照CK生化检测试剂盒说明书步骤操作，酶标仪检测660 nm处吸光度值，计算各组血清中CK含量。

1.4.7 DHE荧光染色法检测骨骼肌组织ROS水平 采用DHE荧光染色法对骨骼肌组织ROS水平进行检测。取新鲜骨骼肌组织制成冰冻切片。在37 ℃条件下，将切片与10 μmol/L的DHE溶液进行避光孵育30 min，PBS避光洗涤3次后，滴加DAPI染液室温避光孵育10 min复染细胞核，再次PBS避光洗涤3次，滴加抗荧光淬灭封片剂封片。利用ImageJ软件对观察到的荧光信号强度进行分析，并计算得到平均荧光强度值。

1.4.8 Western blot检测骨骼肌组织中Nrf2、GPX4、Fth1蛋白相对表达量 采用Western blot对骨骼肌组织中Nrf2、GPX4、Fth1蛋白相对表达量进行检测。全程均在冰上操作，每组随机抽选3只小鼠，剪取20 mg小鼠骨骼肌组织，加入RIPA裂解液，裂解后取上清，利用BCA法检测蛋白浓度。加5×十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶上样缓冲液及纯水并混匀，后于95 ℃ 10 min条件下使其充分变性。上样、电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭。封闭结束后，分别加入对应一抗，Nrf2（1∶10 000）一抗、Fth1（1∶10 000）及GAPDH（1∶10 000）一抗4 ℃过夜孵育；GPX4（1∶1 000）一抗室温1.5 h孵育。回收一抗，用TBST洗膜3次，每次10 min。加入二抗（1∶1 000）室温孵育1.5 h，滴加适量显影液后于成像仪中曝光拍摄，最后用ImageJ软件分析统计蛋白条带数据。

1.5 统计学方法

采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。计量资料服从正态分布，数据用（$\bar{x}\pm s$）表示；多组间比较采用单因素方差分析，组间差异具有统计学意义时进一步进行事后两两比较：方差齐时两两比较采用LSD-t检验，方差不齐时两两比较采用Dunnett′s T3检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4组末次力竭游泳时间比较

与对照组比较，模型组、电针组和Nrf2抑制剂组末次力竭游泳时间均缩短（$P<0.05$）；与模型组比较，电针组末次力竭游泳时间延长（$P<0.05$）；与电针组比较，Nrf2抑制剂组末次力竭时间缩短（$P<0.05$）。见表1。

表1 4组末次力竭游泳时间比较（$\bar{x}\pm s$） s

Table 1 Comparison of the final exhaustive swimming time in four groups（$\bar{x}\pm s$） s

组别	n	末次力竭游泳时间
对照组	10	50.40±2.20
模型组	10	19.01±1.53[1)]
电针组	10	30.63±2.64[1)2)]
Nrf2抑制剂组	10	21.23±1.99[1)3)]

注：与对照组比较，1）$P<0.05$；与模型组比较，2）$P<0.05$；与电针组比较，3）$P<0.05$。

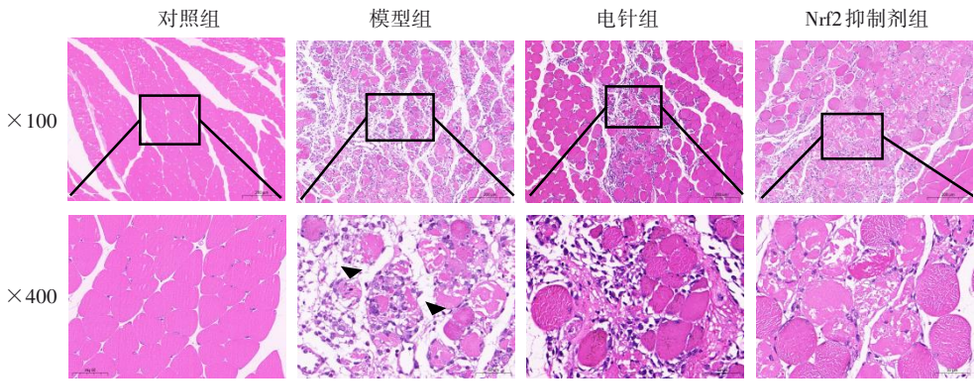
Note: compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the electroacupuncture group, 3) $P<0.05$.

2.2 4组骨骼肌组织形态比较

对照组肌纤维排列整齐紧密，肌束完整，横纹清晰并且无明显间隙；与对照组比较，模型组、电针组和Nrf2抑制剂组均出现了不同程度的肌纤维损伤，其中模型组肌间隙明显增宽，肌纤维大小不一且伴断裂，间质水肿明显；与模型组比较，电针组上述病理变化明显减轻，表现为肌间隙变窄，仅见少量肌纤维断裂，水肿减轻；与电针组比较，Nrf2抑制剂组病理变化加重，肌间隙增宽，肌纤维断裂及水肿更明显。见图1。

2.3 4组骨骼肌组织超微结构比较

对照组电镜下可见线粒体结构清晰完整，嵴排列致密整齐；与对照组比较，模型组可见肌肉线粒体肿胀，嵴断裂，伴空泡化或固缩；与模型组比较，电针组上述病理变化明显减轻，表现为结构基本完整，线粒体肿胀减轻，嵴断裂减少；与电针组比较，Nrf2抑制剂组肌肉线粒体损伤加重，肿胀、嵴断裂及空泡化或固缩更明显。见图2。



注：黑色箭头标示肌纤维肿胀、断裂处。

Note: black arrows indicate areas of myofiber swelling and disruption.

图1　4组骨骼肌组织形态比较

Figure 1　Comparison of histomorphology of skeletal muscle tissue in four groups

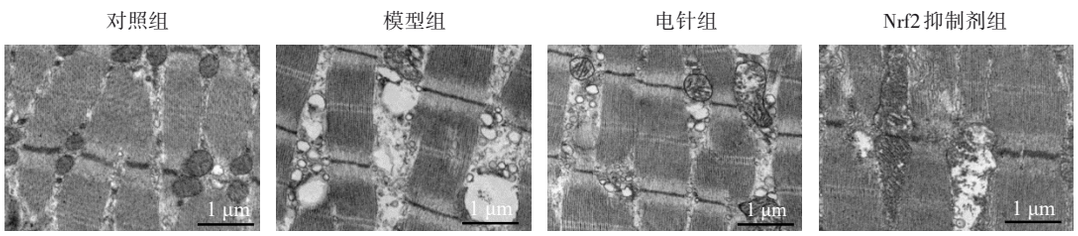


图2　4组骨骼肌组织超微结构比较(×10)

Figure 2　Comparison of the ultrastructure of skeletal muscle tissue in four groups (×10)

2.4　4组骨骼肌中SOD、铁含量及血清中CK含量比较

与对照组比较，模型组、电针组和Nrf2抑制剂组骨骼肌中SOD含量均降低($P<0.05$)，骨骼肌中铁含量和血清中CK含量均增加($P<0.05$)；与模型组比较，电针组骨骼肌中SOD含量升高($P<0.05$)，骨骼肌中铁含量和血清中CK含量均下降($P<0.05$)；与电针组比较，Nrf2抑制剂组骨骼肌中SOD含量降低($P<0.05$)，骨骼肌中铁含量和血清CK含量均增加($P<0.05$)。见表2。

表2　4组骨骼肌中SOD、铁含量及血清中CK含量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2　Comparison of SOD activity, iron content in skeletal muscles and CK levels of serums in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD含量/(U/mg prot)	铁含量/(μmol/g prot)	CK含量/(U/L)
对照组	10	13.06±0.11	3.51±0.47	704.87±18.24
模型组	10	8.17±0.22[1)]	15.57±0.96[1)]	966.87±14.37[1)]
电针组	10	10.13±0.19[1)2)]	7.85±0.61[1)2)]	840.27±14.13[1)2)]
Nrf2抑制剂组	10	8.37±0.66[1)3)]	10.56±0.90[1)3)]	957.87±11.29[1)3)]

注：与对照组比较，1) $P<0.05$；与模型组比较，2) $P<0.05$；与电针组比较，3) $P<0.05$。

Note: compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the electroacupuncture group, 3) $P<0.05$.

2.5　4组骨骼肌中ROS水平比较

与对照组比较，模型组、电针组和Nrf2抑制剂组骨骼肌中DHE平均荧光强度均更高($P<0.05$)；与模型组比较，电针组骨骼肌中DHE平均荧光强度更低($P<0.05$)；与电针组比较，Nrf2抑制剂组骨骼肌中DHE平均荧光强度更高($P<0.05$)。见图3、表3。

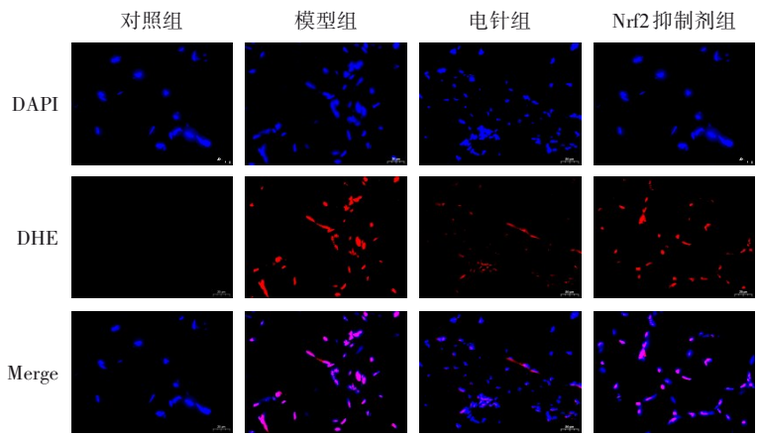


图3　4组骨骼肌DHE荧光染色对比图（×400）

Figure 3　Comparison of DHE fluorescence staining of skeletal muscle in four groups（×400）

表3　4组骨骼肌中ROS水平比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 3　Comparison of reactive oxygen species levels of skeletal muscles in four groups（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	DHE平均荧光强度
对照组	10	1.00±0.41
模型组	10	7.17±1.09[1)]
电针组	10	4.09±0.50[1)2)]
Nrf2抑制剂组	10	5.05±0.90[1)3)]

注：与对照组比较，1）$P<0.05$；与模型组比较，2）$P<0.05$；与电针组比较，3）$P<0.05$。

Note: compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the electroacupuncture group, 3) $P<0.05$.

2.6　4组骨骼肌Nrf2、Fth1和GPX4蛋白相对表达量比较

与对照组比较，模型组、电针组和Nrf2抑制剂组Nrf2、GPX4和Fth1蛋白相对表达量均下降（$P<0.05$）；与模型组比较，电针组Nrf2、GPX4和Fth1蛋白相对表达量均上升（$P<0.05$）；与电针组比较，Nrf2抑制剂组Nrf2、GPX4和Fth1蛋白相对表达量均下降（$P<0.05$）。见图4、表4。

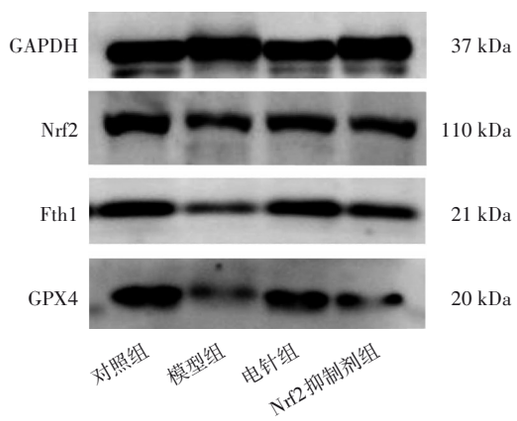


图4　4组骨骼肌Nrf2、Fth1和GPX4蛋白条带图

Figure 4　Western blot bands of Nrf2, Fth1 and GPX4 of skeletal muscle in four groups

表4　4组骨骼肌Nrf2、Fth1和GPX4蛋白相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 4　Comparison of Nrf2, Fth1, and GPX4 protein expression of skeletal muscle in four groups（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Nrf2	Fth1	GPX4
对照组	3	1.00±0.05	1.00±0.08	1.00±0.20
模型组	3	0.66±0.06[1)]	0.50±0.24[1)]	0.40±0.24[1)]
电针组	3	0.93±0.13[1)2)]	0.89±0.08[1)2)]	0.84±0.05[1)2)]
Nrf2抑制剂组	3	0.74±0.06[1)3)]	0.66±0.05[1)3)]	0.45±0.21[1)3)]

注：与对照组比较，1）$P<0.05$；与模型组比较，2）$P<0.05$；与电针组比较，3）$P<0.05$。

Note: compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the electroacupuncture group, 3) $P<0.05$.

3　讨　论

从康复医学角度看，EIF可视为运动负荷超过机体恢复能力所致的功能紊乱，其核心环节在于骨骼肌能量代谢障碍、线粒体结构与功能受损及氧化应激失衡[17-18]。因此，尽早恢复骨骼肌结构与功能、减轻氧化应激损伤、促进运动能力重建，是运动康复干预的关键靶点。电针作为电刺激类干预方法的一种，兼具电刺激与穴位的双重效应[19]。既往研

究已证实电刺激类干预可促进骨骼肌血液循环、加速代谢产物清除，有助于运动后恢复；电针足三里亦被证明可改善骨骼肌线粒体氧化应激、提高运动能力[20]。课题组前期研究发现，针刺足三里穴能有效减轻骨骼肌线粒体损伤与功能紊乱，提高机体运动机能，延缓EIF发生[13]。本实验结果显示，电针可显著逆转腓肠肌病理改变、氧化应激及铁过载，证实其具有抗EIF相关疗效。

本研究结果还显示，模型组末次力竭游泳时间明显缩短，腓肠肌出现明显病理损伤及线粒体肿胀、嵴断裂、空泡化等超微结构改变，血清CK含量升高，SOD活性降低，铁含量与ROS水平升高；电针干预后上述指标明显改善。骨骼肌是重要的铁利用和储存组织之一，剧烈的运动会改变骨骼肌细胞的铁稳态，这种稳态的失衡反过来会影响骨骼肌细胞的功能，进而影响机体的运动能力[21-24]。研究证实，铁死亡是EIF的关键致病因素，铁死亡和EIF之间的联系由于ROS而引起广泛关注，ROS是致使EIF发生的主要媒介[25-26]。越来越多的证据表明，长时间或剧烈的运动均会导致骨骼肌的ROS急剧增加，ROS的这种活性依赖性增加会诱导细胞膜的脂质过氧化并加剧肌肉组织损伤[26-27]。同时，也有研究发现，过量的铁累积会导致机体抗氧化防御途径的紊乱，引发铁死亡的发生，抑制肌卫星细胞增殖和分化，诱导骨骼肌细胞死亡[28-30]。这些证据均提示铁死亡可能是参与EIF生理和病理过程的关键细胞死亡方式。最近有研究对铁死亡与EIF之间的关系做了进一步探究，采用强迫游泳实验构建了EIF小鼠模型，实验结果显示，EIF小鼠骨骼肌中存在与铁死亡相关的特征，如铁、脂质过氧化物的累积及GPX4相对表达量的降低，阐明铁死亡参与EIF的发生和发展[15]。

Nrf2和GPX4都是铁死亡的关键调节因子，靶向Nrf2/GPX4信号通路可有效调节抑制铁死亡发生发展[31]。据报道，Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1（Kelch-like ECH-associated protein 1，Keap1）作为Nrf2的负向调节因子，在无氧化应激的条件下，Nrf2与Keap1在细胞质中结合，导致Nrf2的泛素化和随后的降解，从而抑制Nrf2的活性。相反，在氧化应激状态下，Nrf2与Keap1的相互作用减弱，减少了Nrf2的泛素化，允许Nrf2从Keap1解离，并以更稳定的形式迁移至细胞核。在核内，Nrf2与抗氧化应激元件（antioxidant response element，ARE）结合，激活抗氧化和细胞保护相关基因的转录表达。这一过程促进了抗氧化基因GPX4的表达上调。值得注意的是，GPX4的功能依赖于谷胱甘肽的存在，它利用谷胱甘肽作为辅助因子，将细胞膜中的过氧化脂质还原。将过氧化脂质转化为脂质醇，抑制铁死亡发生[32]。大量研究表明，Nrf2/GPX4轴的激活可抑制肝细胞、心肌细胞、神经细胞、肺泡上皮细胞和骨骼肌细胞的铁死亡[33-37]。为进一步深入研究电针改善EIF的深层机制，本研究在电针干预的基础上加用Nrf2抑制剂ML385以阻断Nrf2通路。结果显示，与电针组比较，Nrf2抑制剂组Nrf2、Fth1、GPX4蛋白相对表达量均下降，铁含量与ROS水平回升，骨骼肌病理损伤加重，提示ML385可部分逆转电针的保护效应，反向证实电针抗EIF的作用依赖于Nrf2/GPX4信号通路的激活。

本研究存在一定局限性，如未设单独的Nrf2抑制剂组和假电针对照组，尽管已有研究显示ML385在常用剂量下对正常小鼠无明显毒性且不干扰基础运动能力，但是仍无法完全排除其在EIF特殊应激状态下的脱靶效应[38-39]；电针参数虽为常用方案，但未经系统优化，最佳刺激模式尚不明确；实验仅在雄性小鼠中进行，结论的性别普适性有待验证；作为临床前研究，其成果尚需人体试验进一步证实。

综上，电针能有效改善EIF，其机制可能与激活Nrf2/GPX4信号通路、抑制铁死亡有关，为电针防治运动性疲劳的临床应用提供了实验依据。

4 结 论

本研究证实电针能有效延长末次力竭游泳时间，改善骨骼肌病理损伤及线粒体超微结构，其作用机制与抑制铁死亡密切相关。电针通过上调Nrf2及其下游靶蛋白GPX4、Fth1的相对表达量，减少了铁的异常积累和ROS的产生，从而阻断脂质过氧化链式反应，保护骨骼肌细胞免受氧化损伤。使用Nrf2抑制剂ML385可部分抵消电针的积极效应，进一步证实了Nrf2/GPX4信号通路是电针干预EIF的关键分子靶点。本研究不仅为“治脾以强筋”的传统理论提供了激活Nrf2/GPX4信号通路抑制铁死亡的现代生物学解释，也为临床运用针灸治疗EIF及相关慢性劳损性疾病提供了科学的实验依据。未来可基于本研究参数，开展临床随机对照试验以优化个体化治疗方案。

参考文献

[1] 邹志睿,朱和平,吴廉卿,等.湖北杂交枸杞浓浆饮料的营养品质及抗疲劳功效研究[J].华中农业大学学报,2024,43(6):316-324.
ZOU Z R,ZHU H P,WU L Q,et al. Nutritional quality and anti-fatigue effect of Hubei hybrid wolfberry thick pulp beverage [J]. J Huazhong Agric Univ,2024,43(6):316-324.

[2] WANG C,ZHU H K,CHENG Y L,et al. Aqueous extract of *Brassica rapa* L.′s impact on modulating exercise-induced fatigue via gut-muscle axis [J]. Nutrients,2023,15(22):4737.

[3] ZHANG X Y,JING S,LIN H J,et al. Anti-fatigue effect of anwulignan via the NRF2 and PGC-1α signaling pathway in mice [J]. Food Funct,2019,10(12):7755-7766.

[4] 高泽谨,康妲,宋巧.甜叶菊糖苷对过度运动疲劳大鼠肝脏线粒体能量代谢和氧化应激的影响[J].食品工业科技,2025,46(6):377-386.
GAO Z J,KANG H,SONG Q. Effects of steviol glycosides on mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in liver of rats with excessive exercise fatigue [J]. Sci Technol Food Ind,2025,46(6):377-386.

[5] WANG Y,ZHANG Z P,JIAO W K,et al. Ferroptosis and its role in skeletal muscle diseases [J]. Front Mol Biosci,2022,9:1051866.

[6] WANG B Q,WANG Y,ZHANG J,et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome:mechanisms behind apoptosis,autophagy,and ferroptosis [J]. Arch Toxicol,2023,97(6):1439-1451.

[7] LIU L X,ZHANG Y Y,LIU T,et al. Pyrroloquinoline quinone protects against exercise-induced fatigue and oxidative damage via improving mitochondrial function in mice [J]. FASEB J,2021,35(4):e21394.

[8] 熊波,李航,文远超,等.京尼平苷通过调控GPX4介导的细胞铁死亡对急性缺血性脑卒中大鼠脑损伤的保护作用[J].中国老年学杂志,2024,44(22):5540-5544.
XIONG B,LI H,WEN Y C,et al. Protective effect of geniposide on brain injury in rats with acute ischemic stroke by regulating cell iron death mediated by GPX4 [J]. Chin J Gerontol,2024,44(22):5540-5544.

[9] WANG H Q,WU S,JIANG X D,et al. Acteoside alleviates salsolinol-induced Parkinson′s disease by inhibiting ferroptosis via activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway [J]. Exp Neurol,2025,385:115084.

[10] CAPELLETTI M M,MANCEAU H,PUY H,et al. Ferroptosis in liver diseases:an overview [J]. Int J Mol Sci,2020,21(14):4908.

[11] 陈玉,苏建军,韩允,等.富马酸二甲酯调控Nrf2-GPX4介导的铁死亡途径对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用研究[J].天津医药,2022,50(6):601-607.
CHEN Y,SU J J,HAN Y,et al. Study on the protective effect of dimethyl fumarate on myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the iron death pathway mediated by Nrf2-GPX4 in rats [J]. Tianjin Med J,2022,50(6):601-607.

[12] KERINS M J,OOI A. The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis [J]. Antioxid Redox Signal,2018,29(17):1756-1773.

[13] 鲁刚.针刺上调MCT1活化CRTC2/CREB通路促进糖异生抗运动性疲劳机制研究[D].广州:广州中医药大学,2023:33-34.
LU G. Study on the mechanism of acupuncture against exercise-induced fatigue by upregulating MCT1 and activating the CRTC2/CREB pathway to promote gluconeogenesis [D]. Guangzhou:Guangzhou University of Chinese Medicine,2023:33-34.

[14] YAN K,GAO H Y,LIU X H,et al. Establishment and identification of an animal model of long-term exercise-induced fatigue [J]. Front Endocrinol,2022,13:915937.

[15] XIAO R,WEI Y,ZHANG Y P,et al. Trilobatin,a naturally occurring food additive,ameliorates exhaustive exercise-induced fatigue in mice:involvement of Nrf2/ARE/ferroptosis signaling pathway [J]. Front Pharmacol,2022,13:913367.

[16] 李辞蓉,宋大鲁.小鼠常用针灸穴位[J].实验动物与动物实验,1992(2):85-87.
LI C R,SONG D L. Common acupuncture points used on mice [J]. Lab Anim Anim Exp,1992(2):85-87.

[17] VARGAS-MENDOZA N,ANGELES-VALENCIA M,MORALES-GONZÁLEZ Á,et al. Oxidative stress,mitochondrial function and adaptation to exercise:new perspectives in nutrition [J]. Life,2021,11(11):1269.

[18] WANG F,WANG X,LIU Y P,et al. Effects of exercise-induced ROS on the pathophysiological functions of skeletal muscle [J]. Oxid Med Cell Longev,2021,2021(1):3846122.

[19] ACKERMANN P W,JUTHBERG R,FLODIN J. Unlocking the potential of neuromuscular electrical stimulation:achieving physical activity benefits for all abilities [J]. Front Sports Act Living,2024,6:1507402.

[20] 董佳梓,魏云涛,许环宇,等.电针“足三里”对慢性疲劳综合征大鼠骨骼肌腺苷酸活化蛋白激酶/过氧化物酶体增殖物活化受体γ共激活因子α信号通路基因表达的影响[J].针刺研究,2018,43(6):335-340.
DONG J Z,WEI Y T,XU H Y,et al. Electroacupuncture of "Zusanli" (ST 36) raises muscular force by adjusting AMPK/PGC-1α signaling in rats with chronic fatigue syndrome [J]. Acupunct Res,2018,43(6):335-340.

[21] SUN C C,XIAO J L,SUN C,et al. Ferroptosis and its potential role in the physiopathology of skeletal muscle atrophy [J]. Int J Mol Sci,2024,25(22):12463.

[22] 王海涛,刘玉倩,刘建国,等.骨骼肌细胞铁代谢的研究进展[J].体育学刊,2009,16(3):96-100.
WANG H T,LIU Y Q,LIU J G,et al. Progress in the study of iron metabolism of skeletal muscle cells [J]. J Phys Educ,2009,16(3):96-100.

[23] TAO L,WANG J P,WANG K,et al. Exerkine FNDC5/irisin-enriched exosomes promote proliferation and inhibit ferroptosis of osteoblasts through interaction with Caveolin-1 [J]. Aging Cell,2024,23(8):e14181.

[24] 温小龙，刘玉倩，郭文闪，等. Nrf2调控的铁死亡通路在有氧运动预防肌少症中的研究进展[J]. 生命科学，2024，36(5)：676-683.
WEN X L，LIU Y Q，GUO W S，et al. Research progress on the Nrf2-regulated ferroptosis pathway in the prevention of sarcopenia by aerobic exercise [J]. Chin Bull Life Sci，2024，36(5)：676-683.

[25] DAVIES K J，QUINTANILHA A T，BROOKS G A，et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise [J]. Biochem Biophys Res Commun，1982，107(4)：1198-1205.

[26] ALESSIO H M，GOLDFARB A H，CUTLER R G. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat [J]. Am J Physiol Cell Physiol，1988，255(6)：C874-C877.

[27] DILLARD C J，LITOV R E，SAVIN W M，et al. Effects of exercise，vitamin E，and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol，1978，45(6)：927-932.

[28] GUERRERO-HUE M，GARCÍA-CABALLERO C，PALOMINO-ANTOLÍN A，et al. Curcumin reduces renal damage associated with rhabdomyolysis by decreasing ferroptosis-mediated cell death [J]. FASEB J，2019，33(8)：8961-8975.

[29] HUANG Y，WU B L，SHEN D Z，et al. Ferroptosis in a sarcopenia model of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) [J]. Int J Biol Sci，2021，17(1)：151-162.

[30] DING H R，CHEN S J，PAN X H，et al. Transferrin receptor 1 ablation in satellite cells impedes skeletal muscle regeneration through activation of ferroptosis [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle，2021，12(3)：746-768.

[31] ZHENG Q，XING J H，LI X Z，et al. PRDM16 suppresses ferroptosis to protect against sepsis-associated acute kidney injury by targeting the NRF2/GPX4 axis [J]. Redox Biol，2024，78：103417.

[32] SONG J Y，WANG H R，SHENG J Y，et al. Vitexin attenuates chronic kidney disease by inhibiting renal tubular epithelial cell ferroptosis via NRF2 activation [J]. Mol Med，2023，29(1)：147.

[33] LETTIERI-BARBATO D，MINOPOLI G，CAGGIANO R，et al. Fasting drives Nrf2-related antioxidant response in skeletal muscle [J]. Int J Mol Sci，2020，21(20)：7780.

[34] YANG W C，WANG Y X，ZHANG C G，et al. Maresin1 protect against ferroptosis-induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 activation [J]. Front Pharmacol，2022，13：865689.

[35] LI D N，SONG C Z，ZHANG J，et al. Resveratrol alleviated 5-FU-induced cardiotoxicity by attenuating GPX4 dependent ferroptosis [J]. J Nutr Biochem，2023，112：109241.

[36] GUI J X，WANG L M，LIU J，et al. Ambient particulate matter exposure induces ferroptosis in hippocampal cells through the GSK3B/Nrf2/GPX4 pathway [J]. Free Radic Biol Med，2024，213：359-370.

[37] LIN L D，YANG L，WANG N，et al. FGF10 protects against LPS-induced epithelial barrier injury and inflammation by inhibiting SIRT1-ferroptosis pathway in acute lung injury in mice [J]. Int Immunopharmacol，2024，127：111426.

[38] SINGH A，VENKANNAGARI S，OH K H，et al. Small molecule inhibitor of NRF2 selectively intervenes therapeutic resistance in KEAP1-deficient NSCLC tumors [J]. ACS Chem Biol，2016，11(11)：3214-3225.

[39] JI L L，MOGHAL N，ZOU X R，et al. The NRF2 antagonist ML385 inhibits PI3K-mTOR signaling and growth of lung squamous cell carcinoma cells [J]. Cancer Med，2023，12(5)：5688-5702.

Mechanism Underlying Electroacupuncture-Mediated Inhibits of Ferroptosis to Alleviate Exercise-Induced Fatigue through the Nrf2/GPX4 Signaling Pathway

ZHANG Shiwen[1,2,3], LIU Wei[4], XIE Qiongsheng[5], ZOU Lijuan[6], PAN Huashan[6,7*]

[1] *The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China;*

[2] *Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China;*

[3] *Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China;*

[4] *Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China;*

[5] *Guangdong Eco-Engineering Polytechnic, Guangzhou, Guangdong 510520, China;*

[6] *Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520, China;*

[7] *Dongguan Research Institute of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan, Guangdong 523808, China*

*Correspondence: PAN Huashan, E-mail: phs681011@163.com

ABSTRACT **Objective** To investigate the mechanism of electroacupuncture in improving exercise-induced fatigue (EIF) by inhibiting ferroptosis via the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway. **Methods** After one week of acclimatization, a total of 40 male specific-pathogen-free (SPF) grade C57BL/6J mice were randomly divided into four groups using table of random number method: the control group, the model group, the electroacupuncture group, and the Nrf2 inhibitor group, with 10 mice in each group. Except for the control group, an EIF model was established in other three groups. The control group was not given any treatment. The model group underwent exhaustive swimming only. The electroacupuncture group received electroacupuncture intervention 30 minutes after exhaustive swimming every day 15 min each time,

once a day, for 4 weeks. The Nrf2 inhibitor group received intraperitoneal injection of ML385 (30 mg/kg) immediately after exhaustive swimming every day, and electroacupuncture was performed half an hour later with the same protocol as that of the electroacupuncture group for 4 weeks. On the day after the experimental period ended (within 24 hours after the final intervention), an exhaustive swimming test was conducted for each group. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the histopathological changes of the gastrocnemius in each group; transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes; water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) assay was used to measure the content of total superoxide dismutase (SOD); colorimetry was used to determine the iron in skeletal muscle tissues and serum creatine kinase (CK); dihydroethidium (DHE) fluorescent staining was used to assess the levels of reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle; and Western blot was performed to detect the protein expressions of Nrf2, its downstream target GPX4, and the iron metabolism-related protein ferritin heavy chain 1 (Fth1). **Results** Compared with the control group, the final exhaustive swimming time shortened in the model, electroacupuncture, and the Nrf2 inhibitor groups (P<0.05); compared with the model group, the final exhaustive swimming time of the electroacupuncture group was prolonged (P<0.05); compared with the electroacupuncture group, the final exhaustive swimming time of the Nrf2 inhibitor group was shorter (P<0.05). In the control group, muscle fibers were neatly and tightly arranged, with intact fascicles, clear striations, and absence of interstitial gaps. Compared with the control group, varying degrees of muscle fiber injury appeared in the model group, the electroacupuncture group, and the Nrf2 inhibitor groups; in the model group, the intermuscular spaces were markedly widened, muscle fibers were uneven in size with rupture, and interstitial edema was obvious. Compared with the model group, the above pathological changes in the electroacupuncture group were significantly alleviated, showing a narrowed intermuscular space, only minimal myofiber rupture, and relieved edema. Compared with the electroacupuncture group, the pathological changes in the Nrf2 inhibitor group were aggravated, with a widened intermuscular space and more obvious muscle fiber rupture and edema. Under transmission electron microscopy, the mitochondria in the control group showed clear and intact structure with densely and neatly arranged cristae. Compared with the control group, the model group showed swollen skeletal muscle mitochondria with ruptured cristae, accompanied by vacuolization or pyknosis. The above pathological changes in the electroacupuncture group were markedly alleviated, showing a basically intact structure, relieved mitochondrial swelling, and reduced cristae rupture. Compared with the electroacupuncture group, mitochondrial injury in the Nrf2 inhibitor group was aggravated, with more obvious swelling, cristae rupture, vacuolization, or pyknosis. Compared with the control group, the SOD content in skeletal muscle decreased in the model, the electroacupuncture group, and the Nrf2 inhibitor groups (P<0.05), while the iron content in skeletal muscle and the CK content in serum increased (P<0.05); compared with the model group, the SOD content in skeletal muscle of the electroacupuncture group increased (P<0.05), while the iron content in skeletal muscle and the CK content in serum decreased (P<0.05); compared with the electroacupuncture group, the SOD content in skeletal muscle of the Nrf2 inhibitor group decreased (P<0.05), while the iron content in skeletal muscle and the CK content in serum increased (P<0.05). Compared with the control group, the average DHE fluorescence intensity in skeletal muscle was higher in the model group, the electroacupuncture group, and the Nrf2 inhibitor groups (P<0.05); compared with the model group, the average DHE fluorescence intensity in skeletal muscle of the electroacupuncture group was lower (P<0.05); compared with the electroacupuncture group, the average DHE fluorescence intensity in skeletal muscle of the Nrf2 inhibitor group was higher (P<0.05). Compared with the control group, the relative protein expressions of Nrf2, GPX4, and Fth1 in skeletal muscle decreased in the model group, the electroacupuncture group, and the Nrf2 inhibitor group (P<0.05); compared with the model group, the relative protein expressions of Nrf2, GPX4, and Fth1 in skeletal muscle of the electroacupuncture group increased (P<0.05); compared with the electroacupuncture group, the relative protein expressions of Nrf2, GPX4, and Fth1 in skeletal muscle of the Nrf2 inhibitor group decreased (P<0.05). **Conclusion** Electroacupuncture can effectively improve EIF, and the mechanism may be associated with the inhibition of skeletal muscle ferroptosis mediated by the Nrf2/GPX4 signaling pathway.

KEY WORDS exercise-induced fatigue; electroacupuncture; Nrf2/GPX4 signaling pathway; ferroptosis; reactive oxygen species
DOI:10.3724/SP.J.1329.2026.10009