

·基础研究·

不同强度运动调控 AMPK-SIRT 3 通路对自发性高血压大鼠血管功能的影响*

刘国纯¹ 常 青¹ 罗梦婷¹ 曹春梅^{2,3}

摘要

目的:研究不同强度运动对自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rats, SHR)主动脉血管功能的影响及其可能的机制。

方法:12只京都 Wistar 大鼠(Wistar-Kyoto Rats, WKY)为安静对照组(WKY-C, n=12), 48只 SHR 随机分为安静对照组(SHR-S, n=12), 低强度运动组(SHR-L, n=12), 中强度运动组(SHR-M, n=12)和高强度运动组(SHR-H, n=12)。运动组进行14周, 每周5次, 每次60mins的跑台运动训练。14周运动训练结束后取出胸主动脉, 进行血管反应性实验检测主动脉血管功能, Western Blot检测主动脉蛋白水平表达量。

结果:SHR-S组与WKY-C组比较血管功能受损, 内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)、磷酸化一氧化氮合成酶(p-eNOS)表达下调, 血管组织氧化应激水平升高, AMPK-SIRT 3表达下调。运动训练后, SHR-L组和SHR-M组血管功能与血管组织氧化应激水平相比较SHR-S组有明显改善($P<0.05$)。SHR-H组与SHR-S组比较血管功能与血管组织氧化应激水平没有改善, 乙酰胆碱依赖的血管舒张功能与内皮型一氧化氮合酶的功能降低。与SHR-S组比较, SHR-L组和SHR-M组 AMPK-SIRT 3表达水平明显上调($P<0.05$), 而SHR-H与SHR-S组比较没有明显改变。

结论:低、中强度运动可以有效减轻SHR的主动脉氧化应激并改善血管功能, 而高强度运动不能改善SHR的血管功能, 其机制可能与 AMPK-SIRT 3通路有关。

关键词 运动强度; AMPK-SIRT 3; 自发性高血压大鼠; 血管功能

中图分类号: R493, R544.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2022)-08-1030-09

Effects of AMPK-SIRT 3 pathway regulated by different intensity exercises on blood vessel function in spontaneously hypertensive rats/LIU Guochun, CHANG Qing, LUO Mengting, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(8): 1030—1038

Abstract

Objective: To study the effects of exercise training with different intensities on the aortic vascular function of spontaneously hypertensive rats (SHR) and the possible mechanism.

Method: Twelve Wistar-Kyoto Rats(WKY) served as the quiet control group (WKY-C, n=12), 48 SHRs were randomly divided into quiet control group (SHR-S, n=12), low-intensity exercise group (SHR-L, n=12), the medium-intensity exercise group (SHR-M, n=12) and the high-intensity exercise group (SHR-H, n=12). The rats in the exercise group were trained on treadmill with different intensities for 14 weeks, 5 times per week for 60 mins. After training, the thoracic aorta was taken out for testing. Vascular reactivity test was used to measure aortic vascular function, and Western Blot was used to detect aortic protein expression.

Result: Compared with WKY-C, the vascular function of SHR-S was impaired, the expression of endothelial nitric oxide synthase(eNOS) and phosphorylated nitric oxide synthase(p-eNOS) were down-regulated, the oxida-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.08.004

*基金项目:重庆医科大学哲学社会科学重点资助项目(TY201729);重庆市体育局科研资助项目(B202014)

1 重庆医科大学体育医学学院, 重庆市, 400031; 2 清华大学体育部; 3 通讯作者

第一作者简介:刘国纯,男,硕士,讲师; 收稿日期:2021-03-31

tive stress levels was increased, and the AMPK-SIRT 3 pathway was inhibited. After exercise training, the vascular function and oxidative stress level of SHR-L and SHR-M significantly improved compared with SHR-S ($P<0.05$). However, the vascular function and oxidative stress level did not get improved in SHR-H compared with in SHR-S. In addition, the AMPK-SIRT 3 pathway in SHR-L and SHR-M were significantly activated compared with in SHR-S ($P<0.05$), whereas there was no significant change in SHR-H.

Conclusion: Low-intensity exercise and moderate-intensity exercise can effectively reduce the oxidative stress of the aorta of SHR and improve the vascular function, while high-intensity exercise cannot improve the vascular function of SHR. The mechanism may be related to the AMPK-SIRT 3 pathway.

Author's address School of Sports Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400331

Key word exercise intensity; AMPK-SIRT 3; spontaneously hypertensive rats; vascular function

高血压是过早死亡的主要原因之一,全球有超过10亿高血压患者^[1]。高血压也是其他疾病的危险因素,如:脑卒中、充血性心力衰竭、心肌梗死、周围血管疾病和终末期肾脏疾病^[2]。血管内皮具有维持血液循环、调节血管张力、维持微血管通透性、参与信号传递、影响血管生成和炎症反应等重要特性^[3],作为高血压病理生理进展的始动环节,内皮功能障碍是预测心血管事件的重要因子^[4]。血管内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)参与的一氧化氮(nitric oxide, NO)产生降低是内皮功能障碍的标志^[5],被认为是血管疾病/动脉粥样硬化发病机制中的首要因素^[3]。eNOS作为血管内皮合成一氧化氮的关键酶,能拮抗活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成、保护血管内皮^[6]。然而,内皮功能紊乱是由多因素共同作用的,其中氧化应激(oxidative stress, OS)是最关键的因素之一,活性氧被认为是反映线粒体稳态和调节内皮功能的重要信号分子,包括增殖、炎症、完整性和血管重塑^[7]。

众所周知,运动锻炼通过不同的分子机制能够有效地控制高血压和动脉粥样硬化^[8-11]。规律的运动能够增加NO的产生,减少NO的失活,增加eNOS蛋白水平促进NO的生物利用度,上调抗氧化剂,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),来减少OS,从而改善内皮功能,降低高血压的风险^[12]。相反,高强度的运动训练(如马拉松)对血管内皮功能没有改善,可能导致心血管疾病的危险增加^[13-14]。因此,考虑到运动带给血管内皮功能和结构的变化取决于运动训练负荷的特点,在高血压运动处方中运动强度的设定显得尤为重要^[15-16]。

AMP激活蛋白激酶(Adenosine 5'-monophos-

phate(AMP)-activated protein kinase, AMPK)是细胞能量代谢的中枢调节因子,在Ser 1177处,AMPK通过磷酸化eNOS来刺激eNOS活性,对高血压血管功能障碍和炎症相关的血管损伤保护作用已被广泛研究^[17]。乙酰化酶3抗体(Sirtuin 3, SIRT 3)主要位于线粒体内,SIRT 3的靶标主要是线粒体中大多数生物学过程的功能蛋白,影响ATP产生、线粒体动力学、活性氧(reactive oxygen species, ROS)解毒和抗炎作用^[18]。SIRT 3在心血管生理和病理中参与调节内皮代谢和血管生成^[19],增加SIRT 3可以防止细胞凋亡、OS、线粒体分裂^[20],能够有效地抑制高血压血管炎症和OS水平^[21]。研究证明,AMPK介导运动训练诱导的SIRT 3功能变化,运动训练能够有效升高SIRT 3的表达^[22],考虑到AMPK和SIRT 3对线粒体动态平衡和血管有保护作用,以及运动对于高血压疾病的益处,研究不同强度的运动训练对AMPK-SIRT 3的作用,确定它在高血压血管功能中的作用具有重要意义。

本研究目的是探索不同强度跑台运动训练是否通过调节AMPK-SIRT 3通路的功能,进而影响SHR主动脉的血管功能。

1 材料与方法

1.1 实验动物与运动训练方案

所有的研究程序都得到了重庆医科大学研究伦理委员会批准(批号:2018006)。实验遵守了中华人民共和国《实验动物管理条例(2017修订)》,以及《心血管研究动物运动和训练规程指南》的要求^[23]。选用8周龄雄性SHR 48只,分4组:久坐组(SHR-S, n=12)、低强度运动组(SHR-L, n=12)速度为14m/min,约35%最大摄氧量(VO_{2max})、中强度运动训练组

(SHR-M, n=12)速度为20m/min,约50%VO_{2max},高强度运动组(SHR-H, n=12)速度为26m/min,约65%VO_{2max}^[24-25]。以年龄匹配的雄性京都Wistar大鼠(Wistar-Kyoto Rats, WKY)为正常血压久坐对照组(WKY-C, n=12)。所有实验大鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,均为无特定病原体动物(SPF级),体重约190—200g。大鼠被统一饲养在重庆医科大学实验动物中心,每笼5只,室温约22℃,光循环(12:12h的光暗),湿度保持40%—45%,可以自由地获得水,灭菌大鼠饲料喂养,所有实验环境均达到SPF。实验前大鼠进行适应性训练1周,并替换运动表现不佳的SHR大鼠(n=3)。大鼠在跑步机(SA101C,赛昂斯,中国)进行14周的运动训练,每周5次,每次60min,跑步机坡度为0。每次训练结束之后给予0.5g巧克力奖励^[23]。试验结束后大鼠处以安乐死。

1.2 材料和药物

一抗eNOS(1:2000)、Phospho-eNOS-Ser 1177(1:1000)、iNOS(1:2000)、p65(1:2000)、AMPKα(1:2000)、Phospho-AMPKα(Thr172)(1:1000)和SIRT 3(1:1000)购自Cell Signaling Technology(USA)。一抗SOD2(1:1000)、NOX2(1:1000)、NOX4(1:1000)、GAPDH(1:5000)和二抗山羊-兔(1:5000)均来自美国Proteintech Group公司。本研究中使用的所有其他化学品均来自西格玛。

1.3 血管反应性实验

快速取出主动脉并放入生理盐溶液(PSS)缓冲液(mmol/L):葡萄糖5.5、NaCl 119、NaHCO₃ 25、KCl 4.7、CaCl₂ 2.5、KH₂PO₄ 1.2和MgSO₄ 1.2。除去黏附的组织,将主动脉切成环(3mm),然后将环移入Multi Myograph System室(DMT,丹麦)。将这些环安装在装有加热(37℃),充氧(混合空气中含有95%O₂和5%CO₂)PSS的腔室中。LabChart软件(DMT)用于连续记录血管张力。将主动脉环在1g的静态张力下适应90mins,然后预先用KCl(60mmol/L)-PSS刺激2次。加入累计浓度的乙酰胆碱(ACh)(内皮依赖性舒张),硝普钠(SNP)(非内皮依赖性舒张)和去甲肾上腺素(NE)(10—9至10—5M)。绘制平均浓度-响应曲线。血管功能由EC50(产生最大响应的50%的浓度)和E_{max}(最大响应)表示,这是使用8.0版GraphPad软件通过非线性回归分析确定的。主动脉的敏感性

表示为pD2(log10-EC50)。

1.4 蛋白质印迹分析(Western Blot, WB)、总亚硝酸盐和硝酸盐的测定

将动脉在裂解缓冲液中裂解1h。通过Bradford测定法测量蛋白质浓度,并将30—50μg蛋白质用于蛋白质印迹。蛋白质通过8%—10%SDS-PAGE分离并转移到PVDF膜上,在室温下用5%脱脂牛奶将膜封闭1h,然后在4℃与一抗孵育过夜。将膜与过氧化物酶缀合的二抗在室温下反应1h。最终通过化学发光检测试剂(碧云天,中国)检测到条带。NO分解为硝酸盐和亚硝酸盐(NOx),因此我们通过测量NOx来测量NO。使用商业试剂盒(碧云天,中国)测量NOx。将硝酸盐还原为亚硝酸盐,并在540nm下用分光光度法测量总亚硝酸盐。

1.5 数据分析与统计

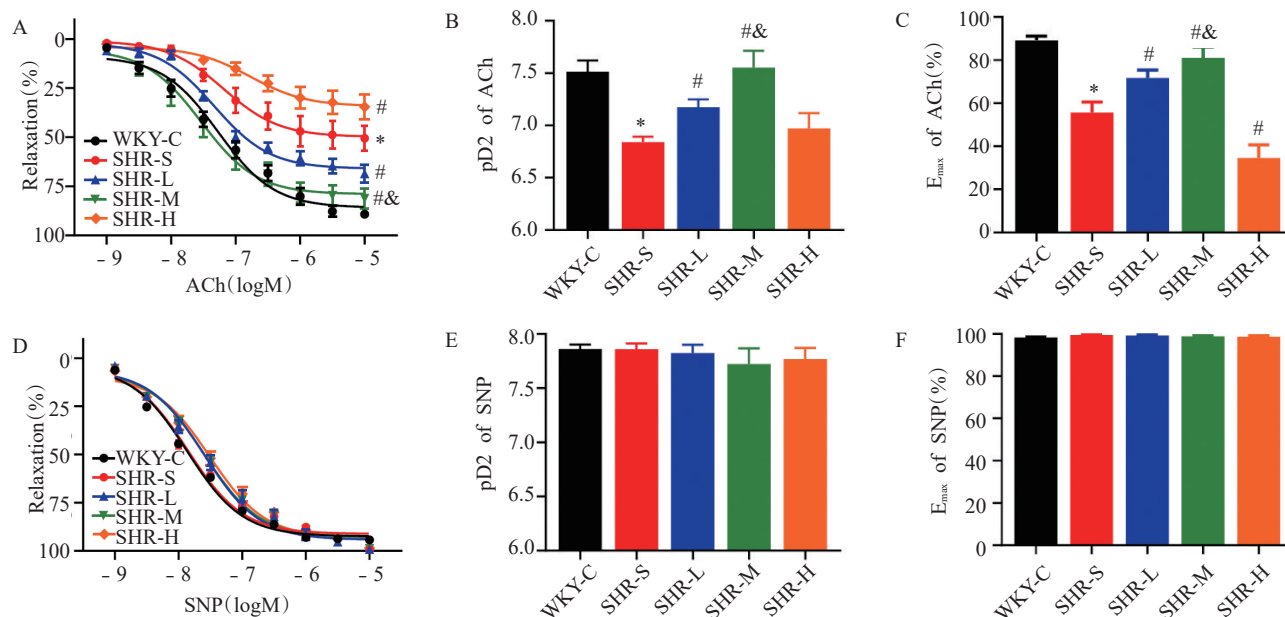
所有数据均表示为平均值±标准差。通过单向或双向方差分析,然后进行Bonferroni后测,进行统计学评估。 $P<0.05$ 的值被认为具有显著性意义。使用GraphPad软件8.0版。

2 结果

2.1 主动脉血管舒张功能的变化

运用血管环张力实验对ACh和SNP诱导的大鼠主动脉舒张反应,来评估运动训练对主动脉血管内皮依赖性与非内皮依赖性血管舒张功能的影响。如图1A、1D所示,在NE介导的血管收缩的张力平衡后,以半对数的增量添加ACh或SNP(10-9-10-5M)。SHR-S组与WKY-C组相比内皮依赖性舒张功能受损(pD2:WKY-C 7.51、SHR-S 6.84), (E_{max}:WKY-C 89.18、SHR-S 55.66)($P<0.05$),但非内皮依赖性舒张功能无明显差异。SHR-L、SHR-M分别与SHR-S相比显著改善了主动脉血管内皮依赖性血管舒张功能的损伤(pD2:SHR-S 6.84、SHR-L 7.17、SHR-M 7.55), (E_{max}:SHR-S 55.66、SHR-L 71.68、SHR-M 81.08)($P<0.05$),而SHR-H组则进一步损害了SHR的内皮依赖性血管舒张功能(pD2:SHR-S 6.84、SHR-H 6.97), (E_{max}:SHR-S 55.66、SHR-H 34.52)($P<0.05$)。pD2和E_{max}如图1B、1C所示。所有组中非内皮依赖性血管舒张功能(SNP诱导)均无显著差异(图1D、E、F)($P>0.05$)。

图1 主动脉血管舒张功能变化



注: ACh引起的主动脉舒张(A)和SNP引起的主动脉舒张(D)。显示了ACh引起的弛豫的pD2(B)和Emax(C), SNP引起的弛豫的pD2(E)和Emax(F)。与WKY-C组相比, * $P < 0.05$; 与SHR-S组相比, # $P < 0.05$; 与SHR-L组相比, & $P < 0.05$ 。

2.2 主动脉收缩功能的变化

本实验测试了不同运动强度对SHR中NE诱导的主动脉收缩功能变化。如图2A所示, SHR-S组与WKY-C组相比NE引起的收缩增加, 而收缩敏感性降低(pD2: WKY-C 7.08、SHR-S 6.75); (Emax: WKY-C 1.70、SHR-S 2.64)($P < 0.05$)。SHR-L组和SHR-M组NE诱导的SHR主动脉的收缩功能显著改善(pD2: SHR-S 6.75、SHR-L 7.25、SHR-M 7.22); (Emax: SHR-S 2.64、SHR-L 1.86、SHR-M 1.76)($P < 0.05$), 而SHR-H组则没有改善(pD2: SHR-S 6.75、SHR-H 6.84); (Emax: SHR-S 2.64、SHR-H 2.41)($P < 0.05$), pD2和Emax如图2B、C所示。以上结果表明低等强度运动与中等强度训练能够逆转SHR中NE诱导的主动脉收缩功能增强, 而高强度训练对其没有作用。

2.3 血清一氧化氮含量及主动脉中p-eNOS、eNOS、iNOS表达的变化

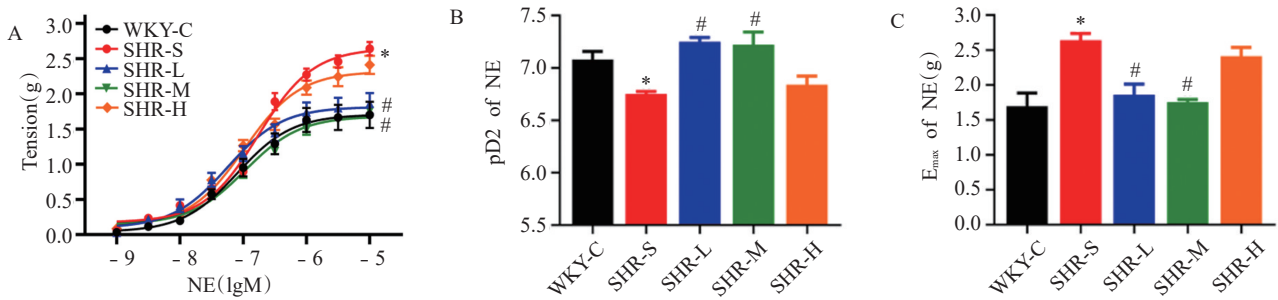
本实验运用WB对大鼠主动脉的p-eNOS、eNOS、iNOS蛋白含量进行检测。如图3A所示, SHR-S组与WKY-C组相比血清NO含量降低, SHR-L组和SHR-M组显著改善了SHR中NO含量的降低, 而SHR-H组则进一步受损。所有组中SHR-M

组的NO含量最高, SHR-H组NO的含量最低(WKY-C 26.31、SHR-S 16.80、SHR-L 23.11、SHR-M 25.42、SHR-H 8.51)($P < 0.05$)。如图3B所示, 主动脉的p-eNOS、eNOS、iNOS表达, SHR-L组和SHR-M组显著改善了SHR中主动脉的eNOS降低和iNOS增加, SHR-M组p-eNOS、eNOS、iNOS改善最为明显, SHR-H组中eNOS的表达量与中等训练强度基本一致, 而SHR-H中p-eNOS相比较SHR-S组有所降低, 且是最底的组。SHR-H中iNOS相比较SHR-S组无显著性差异(图3E), (p-eNOS: SHR-S 0.53、SHR-L 0.62、SHR-M 0.88、SHR-H组是WKY-C组的0.28倍); (eNOS: SHR-S 0.45、SHR-L 0.61、SHR-M 0.93、SHR-H组是WKY-C组的0.90倍); (iNOS: SHR-S 7.10、SHR-L 4.99、SHR-M 2.75、SHR-H组是WKY-C组的6.28倍)($P < 0.05$)。统计值如图3C、3D、3E所示。以上结果提示低、中等强度训练可以显著改善/逆转主动脉中p-eNOS、eNOS、iNOS表达水平, 中等强度效果最好。高强度训练改善了eNOS表达, 但损害了p-eNOS和iNOS的表达水平。

2.4 主动脉中SOD2、NOX2、NOX4的表达

通过检测SOD2、NOX2、NOX4蛋白的表达水

图2 主动脉收缩功能的变化



注:实验结束后使用血管反应性实验测量主动脉血管功能,去甲肾上腺素(NE)诱导的主动脉收缩(A)。显示了pD2(B)和Emax(C)。与WKY-C组相比,* $P<0.05$;与SHR-S组相比,# $P<0.05$ 。

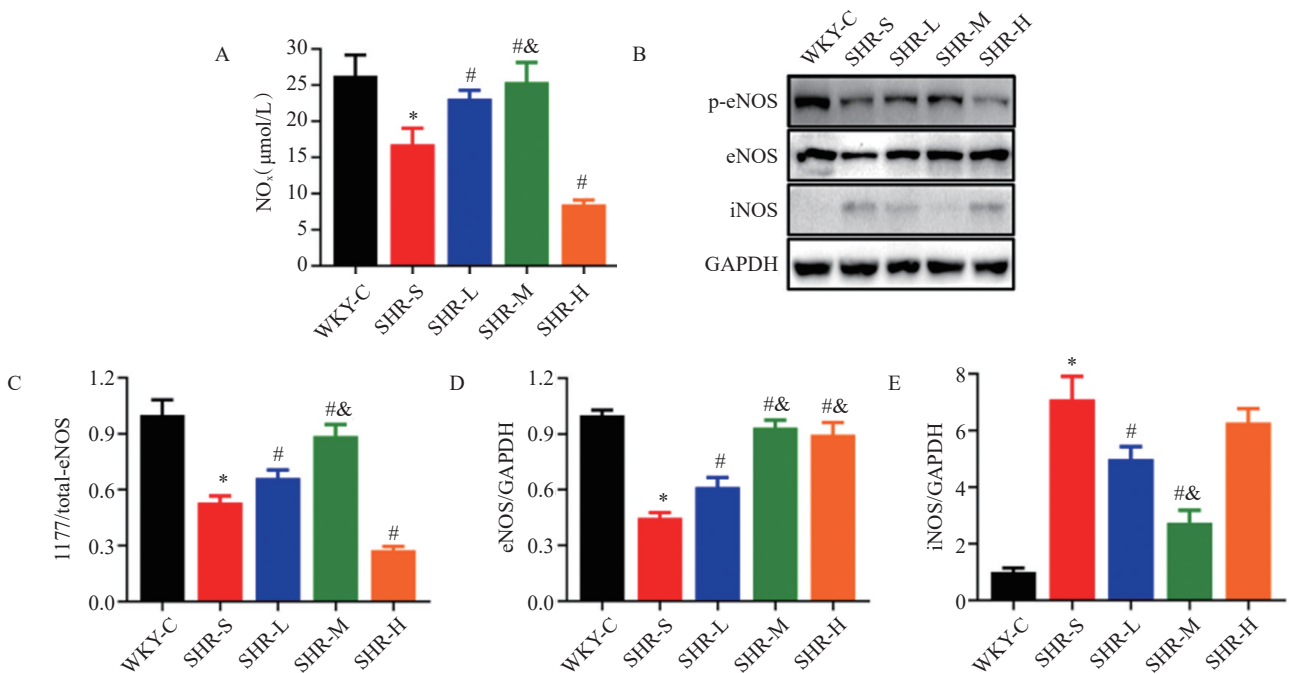
平以确定OS水平。如图4A所示,SHR-L组和SHR-M组显著改善了SHR的SOD2减少和NOX2、NOX4增加,其中SHR-M组比SHR-L组改善更明显,而高强度运动并不能获得改善(SOD2:SHR-S 0.60、SHR-L 0.83、SHR-M 0.93,SHR-H组是WKY-C组的0.66倍);(NOX2:SHR-S 1.88、SHR-L 1.63、SHR-M 1.17,SHR-H组是WKY-C组的1.91倍);(NOX4:SHR-S 2.15、SHR-L 1.75、SHR-M 1.12,SHR-H组是WKY-C组的2.07倍)($P<0.05$),统计值如图4B、4C、4D所示。以上结果提示低等强度与中等强度

可显著改善SHR血管中的OS水平,中等强度的效果最好,而高强度没有效果。

2.5 主动脉中p-AMPK、AMPK、SIRT 3的表达

考虑到SHR中AMPK-SIRT 3途径的激活对血管功能障碍的重要作用,我们运用WB对大鼠主动脉的p-AMPK、AMPK、SIRT 3蛋白含量进行检测。如图5A所示,SHR-S组主动脉p-AMPK和SIRT 3较于WKY-C组显著降低。SHR-L组和SHR-M组显著改善了主动脉p-AMPK和SIRT 3的降低,SHR-M组p-AMPK、AMPK、SIRT 3蛋白表达的改善最为明

图3 血清中一氧化氮含量和主动脉中p-eNOS、eNOS、iNOS表达的变化



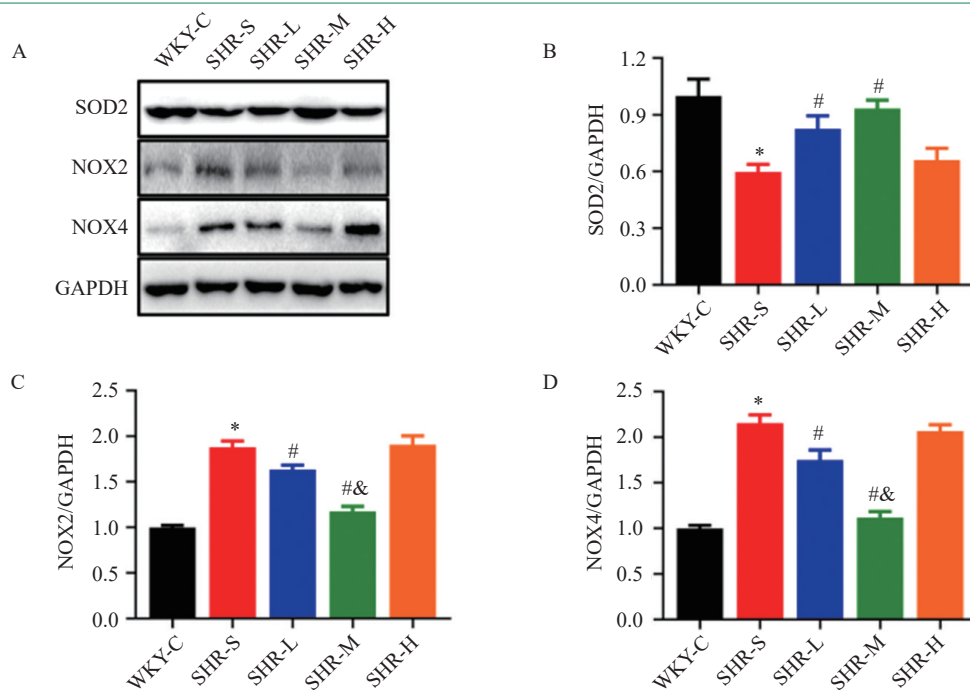
注:实验结束后用试剂盒检测血清(A)中一氧化氮的含量,用WB(B)测定主动脉中的p-eNOS(C)、eNOS(D)、iNOS(E)表达。与WKY-C组相比,* $P<0.05$;与SHR-S组相比,# $P<0.05$;与SHR-L组相比,& $P<0.05$ 。

显,而高强度运动则无法进一步改善这些情况(p-AMPK: SHR-S 0.57、SHR-L 0.91、SHR-M 1.11, SHR-H组是WKY-C组的0.59倍);(SIRT 3: SHR-S 0.59、SHR-L 0.71、SHR-M 1.07, SHR-H组是WKY-C组的0.60倍)。统计值显示在图5B、5C中。以上结果提示低等强度与中等强度可显著改善SHR血管中的AMPK-SIRT 3通路表达水平下降,中等强度的效果最好,而高等强度没有效果。

3 讨论

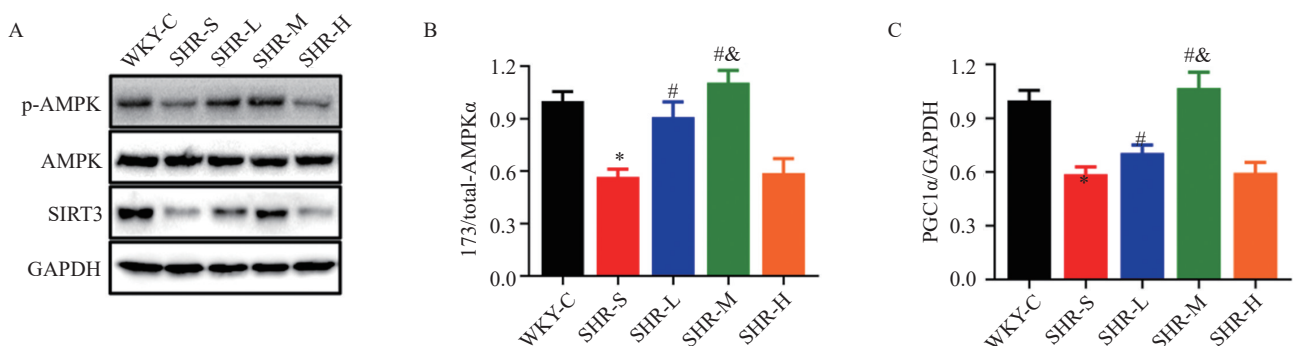
AMPK-SIRT 3功能障碍诱导的过氧化物表达和高血压的发生有关系^[26]。在众多相关研究中,越来越注重运动强度带给血管内皮功能的影响^[15-16]。为此,我们研究了不同运动强度跑台实验(30% VO_{2max} 、50% VO_{2max} 、70% VO_{2max})是否对SHR主动脉AMPK-SIRT 3通路激活产生不同的影响,从而影响血管OS和血管功能。

图4 主动脉中SOD2、NOX2、NOX4表达的变化



注:实验结束后使用WB(A)测量主动脉中SOD2(B)、NOX2(C)、NOX4(D)的蛋白质表达。与WKY-C组相比,* $P<0.05$;与SHR-S组相比,# $P<0.05$;与SHR-L组相比,& $P<0.05$ 。

图5 主动脉中p-AMPK α 、AMPK α 、SIRT 3表达的变化



注:实验后使用WB(A)测量主动脉中p-AMPK α (B)和SIRT 3(C)的蛋白表达。与WKY-C组相比,* $P<0.05$;与SHR-S组相比,# $P<0.05$;与SHR-L组相比,& $P<0.05$ 。

研究发现,①低、中强度运动有效改善了 SHR 主动脉内皮依赖性舒张和收缩功能,而高等强度运动对内皮依赖性舒张和收缩功能存在潜在危害。不同强度运动对 SHR 非内皮依赖性舒张功能均没有显著作用;②低、中强度运动上调 SHR 主动脉 eNOS 的表达和 Ser-eNOS-1177 磷酸化位点的表达,增加血清 NO 含量,同时抑制了 iNOS 的增加,中等强度改善最为明显。高等强度运动也增加了 eNOS,但进一步抑制了 Ser-eNOS-1177 的表达;③低、中强度都能够有效地改善血管内皮细胞中的 OS 水平和 AMPK-SIRT 3 通路表达,其中中等强度最明显,而高等强度没有变化。

高血压的内皮功能障碍是多因素的复杂过程,主要是受血管中 NO 的产生减少和/或 NO 释放减少而导致的 NO 供应受损^[27]。作为内源性血管舒张剂,NO 能够控制血管形态变化,减少活性氧(ROS)的产生而 eNOS 表达异常会引起 NO 产生紊乱,导致血管内皮功能受损^[12],丝氨酸 1177 处的 eNOS 磷酸化位点在血管内皮细胞产生 NO 方面起着至关重要的作用^[16]。我们的研究进一步证实了 SHR-S 组相比较 WKY-C 组血管功能受损^[28],在 SHR-L 和 SHR-M 中能够有效地改善主动脉内皮依赖性收缩功能和舒张功能,但是对非内皮依赖性血管收缩和舒张功能没有影响。中等强度运动更好地保护了血管内皮功能,这种积极的作用主要是体现在 ACh 诱导的主动脉内皮依赖性舒张功能。SHR-H 与 WKY-C 组比较,NE 诱导的血管收缩功能没有显著性差异,ACh 诱导的血管舒张反应比较有明显下降,可能部分与 eNOS 产生有关。在 SHR-S 和 SHR-H 中血清 NO、eNOS 含量比 WKY-C 少,iNOS 含量增加,且 SHR-H 的 NO 是所有组中最少的,p-eNOS-Ser-1177 磷酸化程度最低,这表明高等强度运动不能很好产生 NO,还可能对血管功能造成伤害。与 SHR-S 比较,SHR-L 和 SHR-M 的 NO、eNOS 含量增加,这与 p-eNOS-Ser-1177 表达是相一致的,而 iNOS 含量降低。这表明低、中强度运动训练有利于 NO 的产生。有趣的是,eNOS 的表达在 SHR-M 和 SHR-H 中增加,SHR-H 中 eNOS 的产生并没有改善 NO 的减少,有研究认为是高等强度运动训练导致了 eNOS 解偶联,引起 eNOS 正常功能被抑制^[12,28],我们推测是高等强度运动

产生较多的 NO 转化为过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻),而 ONOO⁻ 的增加导致 NO 的生物利用度降低,可能参与了 OS 的进展。这可能也是本研究中高强度运动组 SHR 内皮功能没有改善的原因。SHR-H、SHR-L、SHR-M 呈现不一致的结果,表明不同强度运动对 SHR 血管内皮功能影响不同。中等强度运动最有利,而高等强度运动训练并不能对主动脉血管内皮功能产生积极影响,甚至是有害的。

运动训练可以对 OS 产生积极或消极的影响,体力活动和规律训练有利于心血管功能改善,而久坐或剧烈的大强度运动会导致 OS 损伤^[29]。AMPK 参与了运动训练诱导的 SIRT 3 产生,以及运动训练诱导的线粒体生物发生的增加和活性氧(ROS)处理的改善^[30]。本实验证实了不同强度运动通过 AMPK-SIRT 3 影响动脉血管的 OS,并导致动脉血管功能改变。研究认为,运动能够通过干扰 ATP 合成来干扰能量代谢平衡,并激活 AMPK^[17]。本实验发现,SHR-L 和 SHR-M 主动脉血管中的 AMPK 激活,但是没有发现高强度运动中 SHR-H 的 AMPK 增加,可能是因为高等运动强度不能引起 AMPK-T172 的磷酸化,从而不能激活 AMPK,这与实验检查的结果是一致的。而 Thr-172 的激活可能受低、中强度运动和高等强度运动代谢方式不同的影响。已有证据表明,长期高强度运动所产生的乳酸浓度增加,导致氢离子浓度改变,当 pH 低于 6.8 以下 1h AMPK-T172 磷酸化降低,pH 增加 1h AMPK-T172 磷酸化增强^[31]。随着运动强度的增加,高强度运动产生的乳酸导致 pH 降低可能是抑制 AMPK 表达的关键,从而引起血管内皮功能改变。而中强度和高等强度运动中间存在一个分界点:乳酸阈。我们的分析越来越指向于乳酸阈是低、中强度运动和高等强度运动带给血管内皮功能相反差异的关键,也可能是影响 eNOS 在高等强度运动中解偶联的原因。

线粒体会在长期运动训练环境下产生适应变化,长期高强度运动中,随着 pH 降低,线粒体生物发生减少^[32],可能是血管内皮功能没有改善的另一个主要原因。随着乳酸浓度增加和 pH 下降,阻碍线粒体的生物发生,诱导参与线粒体生物发生的基因表达减少(例如 PGC-1)^[33]。短期的高强度运动训练对线粒体功能产生损害,导致形态和数量上的变化,抑

制了线粒体氧化磷酸化能力,导致线粒体发生减少^[34]。而适宜的长期运动训练带给线粒体功能的改善已经被证明^[35]。低、中强度有氧运动能够增加SOD2活性和ATP产量并改善线粒体形态,增强线粒体摄取氧和呼吸酶的作用,发展线粒体的呼吸功能和含量^[36]。低、中强度运动带给线粒体数量、形态、结构和功能的改善可能有效地保护了SHR血管内皮功能。而长期高强度运动训练产生的乳酸堆积导致细胞液PH降低,引起了AMPK-T 172磷酸化降低,抑制AMPK表达^[31],可能是损伤血管内皮功能的重要原因。基于这些分析,我们预测,高强度运动训练的SHR长期处于乳酸增加和PH降低的内环境中,从而影响AMPK表达和线粒体发生,抑制了eNOS的激活,减少NO的合成,不能够改善SHR-H的OS以及带给血管内皮功能积极性影响。

SIRT 3的功能障碍和失活导致SOD2失活,SIRT 3被抑制显著影响AMPK表达的激活,参与高血压的发病机制^[37]。而运动训练能够增加大鼠SIRT 3的表达^[38],SIRT 3可能参与运动训练引起线粒体的生物发生和ROS处理的改善,且在线粒体功能和ROS处理中发挥重要作用^[30],这可能是运动带给SHR OS改善的重要原因。大量研究证明,在SHR中过量生产ROS^[39],从而导致Thr 172-AMPK去磷酸化速率降低^[40]。参与中强度运动训练能够改善SHR中ROS的产生,进行高等强度运动不能改善SHR中ROS的产生^[30, 32],在缺乏ROS测定的情况下,本研究不直接测量主动脉中ROS的产生,但对SOD2、NOX2和NOX4的测定可间接表明不同强度的运动训练对于SHR血管OS水平的作用。结果显示,低、中强度运动训练增加了SHR主动脉血管SOD2的水平,减少NOX2和NOX4水平,而高等强度运动训练没有改善SHR的SOD2、NOX2和NOX4水平。分析认为,低等强度运动和中等强度运动有效地改善SHR的OS水平,且中等强度效果最明显,高等强度没有改善SHR的OS水平。

高等强度运动所产生的代谢产物可以影响OS的变化。高强度运动训练能够使机体产生大量的乳酸是已经被公认的,乳酸使H₂O₂的产生增加4倍,O₂⁻含量增加^[31]。由于线粒体的DNA没有组蛋白的保护和有效的DNA修复系统,长期暴露在高水平的

活性氧环境中,很容易引起氧化损伤。而SOD2能够对线粒体中活性氧的浓度调节起到重要作用。中低强度运动SHR主动脉血管SOD2的水平增加,调控了线粒体活性氧的浓度,AMPK的增加可能显著激活了SIRT 3的表达,抑制了NOX2、NOX4的表达,有助于血管抗氧化应激水平。而高等强度运动SHR中的SOD2水平和AMPK的表达无明显变化。这可能是由于高强度运动训练导致乳酸含量增加,产生了过多的H₂O₂和O₂⁻,从而加剧了OS损伤,同时高强度运动产生的乳酸和PH降低抑制了AMPK的功能。这些因素都可能与高等强度运动训练不能很好地改善血管氧化损伤有关。

4 结论

本研究重点关注AMPK失活和SIRT 3下调导致的高血压血管功能障碍。低、中强度运动SHR获得了积极的改善,高强度运动并不会改变SHR中AMPK-SIRT 3的表达,对于血管的OS水平和血管功能障碍没有改善作用。在中等强度运动(50%VO_{2max})与高等强度运动(65%VO_{2max})之间似乎存在一个临界点导致结果完全相反。我们认为,随着运动强度的增加,长期高强度运动产生的乳酸堆积导致细胞外环境pH改变是影响血管内皮功能的关键,值得进一步深入研究。总之,低、中强度可显著改善SHR血管损伤、一氧化氮生物利用度和OS水平,且中等强度效果最明显,而高强度运动对于SHR血管功能障碍与OS水平没有作用,其机制可能与AMPK-SIRT 3功能有关。

参考文献

- [1] WHO. Hypertension[EB/OL]. [2021-02-06]. https://www.who.int/health-topics/hypertension/#tab=tab_1.
- [2] Costa EC, Hay JL, Kehler DS, et al. Effects of high-intensity interval training versus moderate intensity continuous training on blood pressure in adults with pre- to established hypertension: a systematic review and meta-analysis of randomized trials[J]. Sports Med, 2018, 48(9):2127—2142.
- [3] Kiseleva RY, Glassman PM, Greineder CF, et al. Targeting therapeutics to endothelium: are we there yet?[J]. Drug Deliv Transl Res, 2018, 8(4):883—902.
- [4] Santoro C, Cosmas A, Forman D, et al. Exercise training alters skeletal muscle mitochondrial morphometry in heart failure patients[J]. J Cardiovasc Risk, 2002, 9(6):377—381.
- [5] Sessa WC. eNOS at a glance[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt

- 12):2427—2429.
- [6] Sugamura K, Keaney JF. Reactive oxygen species in cardiovascular disease[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2015, 51(5):978—992.
- [7] Viridis A, Bacca A, Colucci R, et al. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation[J]. *Hypertension*, 2013, 62(2):337—344.
- [8] Pagan LU, Damatto RL, Cezar MD, et al. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1):61—74.
- [9] Schuler G, Adams V, Goto Y. Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(24):1790—1799.
- [10] Nystoriak MA, Bhatnagar A. Cardiovascular effects and benefits of exercise[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018(5):135.
- [11] 王军威,袁琼嘉,杨澎湃,等.运动疗法对我国原发性高血压干预效果的meta分析[J]. *中国康复医学杂志*, 2017, 32(4):454—460.
- [12] Battault S, Singh F, Gayraud S, et al. Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling[J]. *Hypertens Res*, 2016, 39(2):70—78.
- [13] Haus JM, Hill BG. Editorial: mechanisms by which acute and chronic exercise promote cardiometabolic health[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2019(6):159.
- [14] 郑丽维,陈庆月,陈丰,等.八段锦运动对老年1级高血压患者血管内皮功能的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29(3):223—227.
- [15] Petriz BA, Almeida JA, Gomes CP, et al. Exercise performed around MLSS decreases systolic blood pressure and increases aerobic fitness in hypertensive rats[J]. *BMC Physiol*, 2015(15):1.
- [16] Di Francescomarino S, Sciarilli A, Di Valerio V, et al. The effect of physical exercise on endothelial function[J]. *Sports Med*, 2009, 39(10):797—812.
- [17] Siragusa M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction[J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(7):1125—1137.
- [18] Sun W, Liu C, Chen Q, et al. SIRT 3: a new regulator of cardiovascular diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018(2018):7293861.
- [19] Dikalova AE, Pandey AK, Itania HA, et al. Targeting Mitochondrial Deacetylase Sirt3 in Endothelial Dysfunction and Hypertension[J]. *The FASEB Journal*, 2018(32):843.8.
- [20] He X, Zeng H, Chen JX. Emerging role of SIRT 3 in endothelial metabolism, angiogenesis, and cardiovascular disease[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3):2252—2265.
- [21] Dikalova AE, Pandey A, Xiao L, et al. Mitochondrial deacetylase sirt 3 reduces vascular dysfunction and hypertension while sirt 3 depletion in essential hypertension is linked to vascular inflammation and oxidative stress[J]. *Circ Res*, 2020, 126(4):439—452.
- [22] Lanza LR, Short DK, Short KR, et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging[J]. *Diabetes*, 2008, 57(11):2933—2942.
- [23] Poole DC, Copp SW, Colburn TD, et al. Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 318(5):H1100—H1138.
- [24] Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, et al. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training[J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2007, 14(6):753—760.
- [25] Almeida JA, Petriz Bde A, da Costa Gomes CP, et al. Assessment of maximal lactate steady state during treadmill exercise in SHR[J]. *BMC Res Notes*, 2012(5):661.
- [27] Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2010, 12(2):135—142.
- [28] Ye F, Wu Y, Chen Y, et al. Impact of moderate- and high-intensity exercise on the endothelial ultrastructure and function in mesenteric arteries from hypertensive rats[J]. *Life Sci*, 2019(222):36—45.
- [29] Radak Z, Chung HY, Koltai E, et al. Exercise, oxidative stress and hormesis[J]. *Ageing Res Rev*, 2008, 7(1):34—42.
- [30] Brandauer J, Andersen MA, Kellezi H, et al. AMP-activated protein kinase controls exercise training- and AICAR-induced increases in SIRT 3 and MnSOD[J]. *Front Physiol*, 2015(6):85.
- [31] Genders AJ, Martin SD, McGee SL, et al. A physiological drop in pH decreases mitochondrial respiration, and HDAC and Akt signaling, in L6 myocytes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(3):C404—C414.
- [32] Zhang Y, Liu Y, Bi X, et al. Therapeutic approaches in mitochondrial dysfunction, inflammation, and autophagy in uremic cachexia: role of aerobic exercise[J]. *Mediators Inflamm*, 2019(2019):2789014.
- [34] Layec G, Blain GM, Rossman MJ, et al. Acute high-intensity exercise impairs skeletal muscle respiratory capacity[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2018, 50(12):2409—2417.
- [35] Jiang HK, Wang YH, Sun L, et al. Aerobic interval training attenuates mitochondrial dysfunction in rats post-myocardial infarction: roles of mitochondrial network dynamics[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4):5304—5322.
- [36] Farhat F, Simon B, Amérand A, et al. Exercise training changes mitochondrial function and its vulnerability to reactive oxygen species exposure differently in male and female silver European eels [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2020, 103(4):363—375.
- [37] Dikalova AE, Itani HA, Nazarewice RR, et al. Sirt 3 impairment and SOD2 hyperacetylation in vascular oxidative stress and hypertension[J]. *Circ Res*, 2017, 121(5):564—574.
- [38] Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, et al. Diet and exercise signals regulate SIRT 3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle[J]. *Aging (Albany NY)*, 2009, 1(9):771—783.
- [39] Kim YW, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease[J]. *Blood*, 2014, 123(5):625—631.
- [40] Kim YM, Kim SJ, Tatsunami R, et al. ROS- induced ROS release orchestrated by Nox4, Nox2, and mitochondria in VEGF signaling and angiogenesis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312(6):C749—C764.