

有氧运动对自发性高血压大鼠心肌MG53/NF- κ B信号通路的影响*

李凤仪¹ 张浴尘¹ 鹿国晖² 石丽君¹ 吴 迎^{1,3}

摘要

目的:研究有氧运动对自发性高血压大鼠心脏形态与功能的影响,并探讨MG53/NF- κ B信号通路在有氧运动调控高血压心脏重塑中的可能作用,为高心病的防治提供实验依据。

方法:正常血压对照大鼠(Wistar-Kyoto rat, WKY)随机分为正常血压运动组(WKY-EX)和正常血压安静组(WKY-SED);自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)随机分为高血压运动组(SHR-EX)和高血压安静组(SHR-SED);每组12只;3月龄雄性。经12周跑台训练(坡度0°,20m/min,5d/w),测量尾动脉血压;Millar压力-容积系统测定心功能;WGA染色分析心肌细胞横截面积;Masson染色分析心肌胶原容积分数(CVF%);实时荧光定量PCR测定心钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、MG53和NF- κ B p65 mRNA相对表达量;蛋白免疫印迹测定心肌MG53、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白表达。

结果:①12周有氧运动可有效降低SHR的心率和收缩压;②SHR-SED组CVF%和心肌细胞横截面积显著高于WKY-SED组($P<0.01$),SHR-EX组CVF%显著低于SHR-SED组($P<0.01$),心肌细胞横截面积无显著性差异($P>0.05$);③与WKY-SED组相比,SHR-SED组射血分数(EF)、左室内压上升最大速率(+dp/dt_{max})和左室内压下降最大速率(-dp/dt_{max})绝对值均显著下降($P<0.01$),与SHR-SED组相比,SHR-EX组EF($P<0.05$)、+dp/dt_{max}($P<0.05$)和-dp/dt_{max}绝对值($P<0.01$)均显著增高;④与WKY-SED组相比,SHR-SED组心肌ANP和BNP mRNA表达量显著增加($P<0.01$),NF- κ B p65 mRNA表达量也显著增加($P<0.05$),MG53 mRNA表达量无显著性差异($P>0.05$);与SHR-SED组相比,SHR-EX组心肌ANP、BNP和NF- κ B p65 mRNA表达量显著降低($P<0.01$),MG53 mRNA表达量显著增加($P<0.01$);⑤与WKY-SED组相比,SHR-SED组心肌MG53蛋白表达水平无显著性差异($P>0.05$),NF- κ B p65蛋白相对磷酸化水平显著升高($P<0.01$),与SHR-SED组相比,SHR-EX组心肌MG53蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),NF- κ B p65蛋白相对磷酸化水平显著下降($P<0.01$)。

结论:有氧运动可能通过上调MG53抑制NF- κ B表达,从而改善高血压心脏功能,延缓高血压性心脏病的发生发展。

关键词 MG53;有氧运动;高血压;心功能

中图分类号:R541.3,R87 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-09-1165-09

Effects of aerobic exercise on MG53/NF- κ B signaling pathway in the myocardium of spontaneously hypertensive rats/LI Fengyi, ZHANG Yuchen, LU Guohui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022,37(9): 1165—1173

Abstract

Objective: To investigate the possible role of MG53/NF- κ B signaling pathway in the regulation of hypertensive cardiac remodeling by aerobic exercise, and to provide a new idea for the treatment of hypertensive heart disease by combining aerobic exercise with drugs.

Method: Twenty-week-old male SHR and WKY rats were randomly assigned to sedentary and exercise training groups, respectively, 12 rats in each group. After 12 weeks of running platform training (incline 0°, 20m/

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.09.003

*基金项目:国家自然科学基金项目(31771312);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2020054)

1 北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室,北京市,100084; 2 北京体育职业学院; 3 通讯作者

第一作者简介:李凤仪,女,硕士研究生; 收稿日期:2021-10-26

min, 5d/w), tail artery blood pressure was measured; Millar pressure-volume system was used to determine cardiac function; WGA staining was used to analyze the cell surface area of cardiomyocytes; masson staining was used to analyze myocardial collagen volume fraction(CVF%); real-time fluorescence quantitative PCR was performed to determine the relative expression of cardiac natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), MG53 and NF- κ B p65 mRNA; western blot measures the protein expression of MG53, NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65.

Result: ①Twenty weeks aerobic exercise effectively reduced heart rate and systolic blood pressure in the hypertensive rats. ②CVF% and cardiac myocyte cross-sectional area were significantly higher in the SHR-SED group than in the WKY-SED group ($P<0.01$). CVF% was significantly lower in the SHR-EX group than in the SHR-SED group ($P<0.01$). There was no significant difference in cardiomyocyte cross-sectional area ($P>0.05$). ③Compared with the WKY-SED group, the SHR-SED group showed significantly lower EF, $+dp/dt_{max}$ and $-dp/dt_{max}$ in absolute terms ($P<0.01$). Compared with the SHR-SED group, the SHR-EX group showed significantly higher EF ($P<0.05$), $+dp/dt_{max}$ ($P<0.05$), and $-dp/dt_{max}$ ($P<0.01$) in absolute terms. ④Compared with the WKY-SED group, myocardial ANP and BNP mRNA expressions were significantly increased in the SHR-SED group ($P<0.01$), and NF- κ B p65 mRNA expression was also significantly increased ($P<0.05$), while MG53 mRNA expression had no significant difference ($P>0.05$). Compared with those in the SHR-SED group, myocardial ANP, BNP and NF- κ B p65 mRNA expression was significantly lower ($P<0.01$) and MG53 mRNA expression was significantly higher ($P<0.01$) in the SHR-EX group. ⑤Compared with the WKY-SED group, myocardial MG53 protein expression level had no change in the SHR-SED group ($P>0.05$) and NF- κ B p65 protein phosphorylation level was significantly increased in the SHR-EX group ($P<0.01$) and compared with SHR-SED group, myocardial MG53 protein expression level was significantly increased in the SHR-EX group ($P<0.01$) and NF- κ B p65 protein phosphorylation level was significantly decreased ($P<0.01$).

Conclusion: Aerobic exercise may inhibit NF- κ B expression through up regulation of MG53, thereby improving hypertensive cardiac function and delaying the development of hypertensive heart disease.

Author's address Beijing Sport University, Beijing, 100084

Key word mitsugumin 53; aerobic exercise; hypertension; cardiac function

《中国心血管健康与疾病报告(2020)》指出,高血压患者数量约占心血管疾病现患人数的74.2%,严重危害人体健康^[1]。高血压对心脏的影响主要表现为诱发炎症反应和损伤心肌组织,增加心脏不良事件的发生风险,严重者可致心力衰竭^[2],故预防和改善心脏重塑对于高血压的防治具有重要意义。研究表明,有氧运动可降低高血压患者和正常血压人群的血压,定期锻炼可缓解心肌细胞炎症反应、氧化应激及过度凋亡,改善心脏的病理性重塑,但目前有氧运动介导高血压心脏重塑的关键靶点尚未明确^[3]。

MG53蛋白(mitsugumin 53)作为肌肉特异性(tripartite motif, TRIM)家族成员之一,主要存在于心肌和骨骼肌。大量研究已证实,MG53可促进急性损伤的质膜修复、调节心肌纤维化、减轻心脏缺血再灌注损伤、维持心电稳定性以及增强组织再生^[4]。核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)是一种核转录因子,抑制其异常激活可以降低细胞

凋亡和活性氧水平,改善炎症反应和氧化应激^[5]。研究发现,MG53不仅在神经保护、心肌梗死和心脏中参与调节NF- κ B相关信号通路转导,还在心脏肥大中下调NF- κ B下游靶基因ANP和BNP发挥抗炎作用^[6-8],提示MG53/NF- κ B信号通路可能在心血管损伤发病机制中扮演重要角色。然而,目前尚不清楚MG53/NF- κ B信号通路在有氧运动改善高血压心脏重塑中的作用。故本研究旨在观察有氧运动对自发性高血压大鼠心脏形态功能的影响,并探讨MG53/NF- κ B信号通路在有氧运动调控高血压心脏重塑中的可能作用,为高血压性心脏病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本实验选取SPF级健康雄性3月龄正常血压大鼠(Wistar-Kyoto rat, WKY)和自发性高血压大鼠

(spontaneously hypertensive rat, SHR)各24只。根据运动干预与否,将SHR和WKY各自均分为有氧运动组(SHR-EX、WKY-EX)和安静对照组(SHR-SED、WKY-SED)共4组,组间体重差异无显著性。实验动物由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,饲养于北京体育大学动物房内,通风条件良好,均使用国家标准啮齿类动物常规饲料进行喂养,分笼饲养,大鼠自由饮水进食,控制饲养环境温度(22—24℃)和相对湿度(40%—60%),昼夜时间为12h,本动物实验的处理方法已获北京体育大学运动科学实验伦理委员会批准(批号:2019036A)。

1.2 跑台运动方案

依据Bedford^[9]标准制定中等强度(55%—65% VO_{2max})的有氧运动方案:SHR-EX组和WKY-EX组适应性训练一周后进行大鼠 VO_{2max} 测试。运动方案:①适应训练:第1—2日每天跑台训练10min,跑速10m/min;第3—5日每天跑台训练30min,提高跑速至15m/min;第6—7日休息;②正式训练:每天跑台训练60min,跑速18—20m/min,每周训练5天,共持续12周。适应性训练以及正式训练跑台坡度均为0°。

1.3 仪器与试剂

RIPA裂解液、PMSF(中国上海碧云天生物技术有限公司),蛋白酶抑制剂片(Roche,德国),BCA试剂盒、电泳缓冲液、PVDF膜、GAPDH抗体、Trizol reagent、Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific,美国),Masson染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),小麦凝集素L4895(Sigma,美国),MG53抗体、NF- κ B p65抗体(中国武汉三鹰生物技术有限公司),Phospho-NF- κ B p65抗体(Cell Signaling Technology,美国)。小动物血压监测仪(BP-2010A)(Softron Biotechnology,日本),Millar压力-容积测定系统(AD Instrument,澳大利亚),iBlot 2干式转印系统、电泳仪、分光光度计、荧光定量PCR仪(Thermo Fisher,美国),酶标仪(Bio-Rad,美国),离心机(Eppendorf,德国),ChemiDoc XRS+成像系统(Bio-Rad, LTD,美国),倒置荧光显微镜Leica DMI4000B(Leica,德国)。

1.4 心脏结构与功能检测

运动干预前测定各组大鼠体重(body weight,

BW),尾动脉无创血压测试仪监测安静时收缩压(systolic pressure, SBP)和心率(heart rate, HR)。在第12周运动组完成训练后,对包括安静组在内的全部大鼠禁食不禁水12h,使用电子天平称重并做好记录。戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔麻醉,行右颈动脉插入米勒导管,使用LabChart软件记录射血分数(ejection fraction, EF)和左室内压变化最大速率($\pm dp/dt_{max}$)等血流动力学指标,心功能检测完成后立即取材,使用预冷的PBS冲掉血液,剔除周围附着的多余结缔组织后用滤纸滤干,称取心脏重量(heart weight, HW)并测量胫骨长度(tibial length, TL),记录数据。随即修剪心脏,仅保留室间隔和左心室游离壁并称重,所得数值为左心室重量(left ventricular weight, LVW)。最后将样本分装后,快速放入液氮速冻,然后存入-80℃超低温冰箱冷冻保存或投入4%多聚甲醛固定液,以供后续实验使用。

1.5 MASSON染色检测心肌胶原纤维面积

常规石蜡包埋,切片厚5 μ m,脱蜡至水,采用Masson染色试剂盒制成组织切片,光镜下观察并评估左心室心肌纤维化程度,切片中红色部分为心肌组织,蓝色部分为增生沉积的胶原纤维。采用Image J软件测量心肌胶原面积,将胶原面积与所测视野面积比值作为胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF%)。

1.6 WGA染色检测心肌细胞横截面积

常规石蜡包埋,切片厚5 μ m,脱蜡至水,组织切片置于EDTA抗原修复缓冲液,使用微波炉进行抗原修复。室温冷却后,将玻片置于PBS溶液,在摇床上洗涤3次,每次5min。滴加WGA染液(1:500稀释),37℃避光孵育30min,PBS漂洗后DAPI复染细胞核避光室温孵育10min,PBS漂洗后加入自发荧光淬灭剂5min,流水冲洗10min,切片甩干后使用抗荧光淬灭封片剂封片。切片于荧光显微镜下观察拍照,DAPI染的细胞核在紫外激发下为蓝色,阳性表达为绿光。采用Image J软件计算心肌细胞横截面积。

1.7 实时荧光定量PCR检测心肌ANP、BNP和MG53 mRNA含量

各组取6只大鼠心脏组织,用Trizol裂解细胞后提取总RNA,取2 μ l RNA用1%琼脂糖凝胶进行电

表1 引物序列

引物名称	引物序列
ANP	
上游	5'-CTCCGATAGATCTGCCCTCTTG-3'
下游	5'-AGCTGTTGCAGCCTAGTCCACT-3'
BNP	
上游	5'-AAGAGAAAAGTCAGAGGAAATGGC-3'
下游	5'-GAACTATGTGCCATCTTGAATTT-3'
MG53	
上游	5'-CATCGTCATTGGCATTCTGGT-3'
下游	5'-CCAACTTCCGTTTCTCATCCTT-3'
NF-κB p65	
上游	5'-CAGATACCACTAAGACGCACCC-3'
下游	5'-CTCCAGGTCTCGCTTCTTACA-3'
GAPDH	
上游	5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'
下游	5'-GGTGGAAGAAATGGGAGTTGCT-3'

泳,以检测RNA的完整性;RNase-Free DNase处理RNA后使用M-MLV反转录试剂盒对mRNA进行反转录,参照cDNA合成试剂盒合成cDNA;用ABI Step One Plus型荧光定量PCR仪检测心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、MG53和NF-κB p65,以GAPDH为内参基因,引物序列见表1。

反应条件:95℃ 1min,(95℃ 15s,60℃ 50s)循环40次;将各样品cDNA取2μl作模板,分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增。同时在60—95℃进行溶解曲线分析。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析,记录threshold cycle(Ct)值并通过内参基因GAPDH的结果校正目的基因,使用WKY-SED组的Ct值作对照,计算得到其他组的相对值。

1.8 Western Blot测定心肌MG53、NF-κB p65和Phospho-NF-κB p65蛋白表达

实验前准备100ml RIPA裂解液,加入5片蛋白酶抑制剂与1ml PMSF制成匀浆液于4℃冰箱静置。将1.4中冻存的心肌组织样本称取100mg置于离心管,加入1ml匀浆液,于冰水浴中震荡摇匀。4℃静置30min后,置于离心机(4℃,12000rpm),30min后取上清液备用。蛋白浓度采用BCA试剂盒测定,根据蛋白定量结果调整上样量。按照常规方法制备电泳样品、电泳、转膜、5%BSA封闭2h。加入用0.01mol/L TBST稀释的一抗(anti-MG53 1:2000,GAPDH 1:2000,anti-NF-κB p65 1:2000,anti-Phospho-NF-κB p65 1:1000),室温摇床孵育1h后4℃冰箱孵育过夜。次日0.01mol/L TBST漂洗3

次,每次10min,加入TBST配置的二抗(兔抗1:10000,鼠抗1:5000)摇床孵育1h。再次TBST漂洗3次,使用增强化学发光法曝光显像并保存图像,使用Image Lab™软件分析条带灰度值。

1.9 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,数据以平均数±标准误表示,组间比较采用双因素方差分析(two-way ANOVA,高血压×运动),同组12周前后比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为对比组之间有显著性差异。

2 结果

2.1 有氧运动对大鼠体重、血压、心率的影响

有氧运动干预前测得各组大鼠体重无显著性差异($P>0.05$);12周后,与自身干预前相比,四组大鼠体重均显著增加($P<0.01$);与干预后各组相比,WKY-EX组和SHR-EX组体重显著低于其各自的安静对照组($P<0.01$)。

有氧运动干预前测得运动组与其各自的安静对照组之间血压无显著性差异($P>0.05$),SHR-SED组SBP显著高于WKY-SED组($P<0.05$),12周后,与自身干预前相比,WKY-EX组SBP显著下降($P<0.01$),SHR-SED组SBP显著上升($P<0.01$),SHR-EX组SBP显著下降($P<0.05$);与干预后各组相比,SHR-SED组SBP显著高于WKY-SED组($P<0.01$),SHR-EX组SBP显著低于SHR-SED组($P<0.01$)。

有氧运动干预前测得运动组与其各自的安静对照组之间HR无显著性差异($P>0.05$),SHR-SED组HR显著高于WKY-SED组($P<0.05$);12周后,与自身干预前相比,WKY-EX组HR显著下降($P<0.01$),SHR-SED组HR显著上升($P<0.05$),SHR-EX组HR无显著性差异($P>0.05$);与干预后各组相比,SHR-SED组HR显著高于WKY-SED组($P<0.01$),WKY-EX组较WKY-SED组无显著性差异($P>0.05$),SHR-EX组HR显著低于SHR-SED组($P<0.01$)(表2)。

2.2 有氧运动对大鼠心脏形态学的影响

分别以心重体重比(HW/BW)、心重胫骨长(HW/TL)和左心室肥大指数(LVW/HW)作为评价大鼠心脏肥大程度的相关指标,结果显示,WKY-EX组HW/TL比值显著高于WKY-SED组($P<0.01$),HW/BW和

表2 有氧运动对各组大鼠体重、血压和心率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

项目	WKY-SED	WKY-EX	SHR-SED	SHR-EX
BW(g)				
干预前	264.6±2.44	260.2±1.96	259.9±1.63	262.1±1.07
干预12周后	365.4±2.16	336.6±3.55 ^②	355.6±2.13 ^②	334.3±1.48 ^③
SBP(mmHg)				
干预前	125.5±1.48	125.2±0.70	186.0±1.79	188±1.65
干预12周后	135.3±0.71	132.3±0.76 ^①	199.3±0.88 ^②	192.7±0.33 ^③
HR(beats·min ⁻¹)				
干预前	332.8±6.22	333.8±3.92	397.5±6.47	399.17±7.44
干预12周后	312.7±7.02	300.2±3.18	419.17±2.61 ^②	392.8±6.21 ^③

注:与12周后WKY-SED组相比,① $P<0.05$,② $P<0.01$;与12周后SHR-SED组相比,③ $P<0.01$ 。

LVW/HW 比值与WKY-SED组无显著性差异($P>0.05$);SHR-SED组HW/BW、HW/TL和LVW/HW比值均显著高于WKY-SED组($P<0.01$);SHR-EX组HW/TL比值显著高于SHR-SED组($P<0.01$),HW/BW显著高于SHR-SED组($P<0.05$),LVW/HW比值与SHR-SED组无显著性差异($P>0.05$)(表3)。

使用WGA标记心肌细胞膜以比较心肌细胞横截面积,结果显示,与WKY-SED组相比,WKY-EX组心肌细胞横截面积显著增大($P<0.01$),SHR-SED组心肌细胞横截面积显著增大($P<0.01$);与SHR-SED组相比,SHR-EX组无显著性差异($P>0.05$)(图1A、图1B)。Masson染色结果显示,与WKY-SED组相比,SHR-SED组心肌间质胶原明显增生,CVF%显著增加($P<0.01$);与SHR-SED组相比,SHR-EX组心肌组织纤维化程度较低,CVF%显著降低($P<0.01$)(图1C、D)。

2.3 有氧运动对大鼠心脏功能的影响

血流动力学数据显示,与WKY-SED组相比,WKY-EX组EF、+dp/dt_{max}和-dp/dt_{max}绝对值均显著增高($P<0.05$),SHR-SED组EF、+dp/dt_{max}和-dp/dt_{max}绝对值均显著降低($P<0.01$);与SHR-SED组相比,SHR-EX组EF($P<0.05$)、+dp/dt_{max}($P<0.05$)和-dp/dt_{max}绝对值($P<0.01$)显著增高(图2)。

2.4 有氧运动对大鼠心肌ANP、BNP、MG53和NF-κB p65mRNA水平的影响

实时荧光定量PCR结果显示,与WKY-SED组相比,WKY-EX组心肌ANP、BNP、MG53和NF-κB p65 mRNA相对表达水平无显著性差异($P>0.05$),SHR-SED组心肌ANP、BNP和NF-κB p65 mRNA相对表达水平显著升高($P<0.01$),MG53 mRNA相

对表达水平则无显著性差异($P>0.05$);与SHR-SED组相比,SHR-EX组心肌ANP、BNP和NF-κB p65 mRNA相对表达水平显著下降($P<0.01$),MG53 mRNA相对表达水平则显著升高($P<0.01$)(图3)。

2.5 有氧运动对大鼠心肌MG53、NF-κB p65和Phospho-NF-κB p65蛋白表达的影响

Western Blot结果显示,与WKY-SED组相比,SHR-SED组心肌MG53蛋白表达无显著性差异($P>0.05$),NF-κB p65相对磷酸化表达显著增高($P<0.05$);WKY-EX组心肌MG53蛋白表达显著高于WKY-SED组($P<0.05$),NF-κB p65相对磷酸化水平显著低于WKY-SED组($P<0.01$);SHR-EX组心肌MG53蛋白表达显著高于SHR-SED组($P<0.01$),NF-κB p65表达显著低于SHR-SED组($P<0.05$)(图4)。

表3 有氧运动对各组大鼠心脏肥大程度的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

项目	WKY-SED	WKY-EX	SHR-SED	SHR-EX
HW(mg)/BW(g)	3.61±0.06	3.76±0.07	4.14±0.07 ^①	4.31±0.03 ^②
HW(mg)/TL(mm)	30.94±0.18	34.73±0.71 ^①	36.52±0.73 ^①	39.20±0.70 ^③
LVW/HW	0.70±0.01	0.69±0.02	0.77±0.01 ^①	0.76±0.01

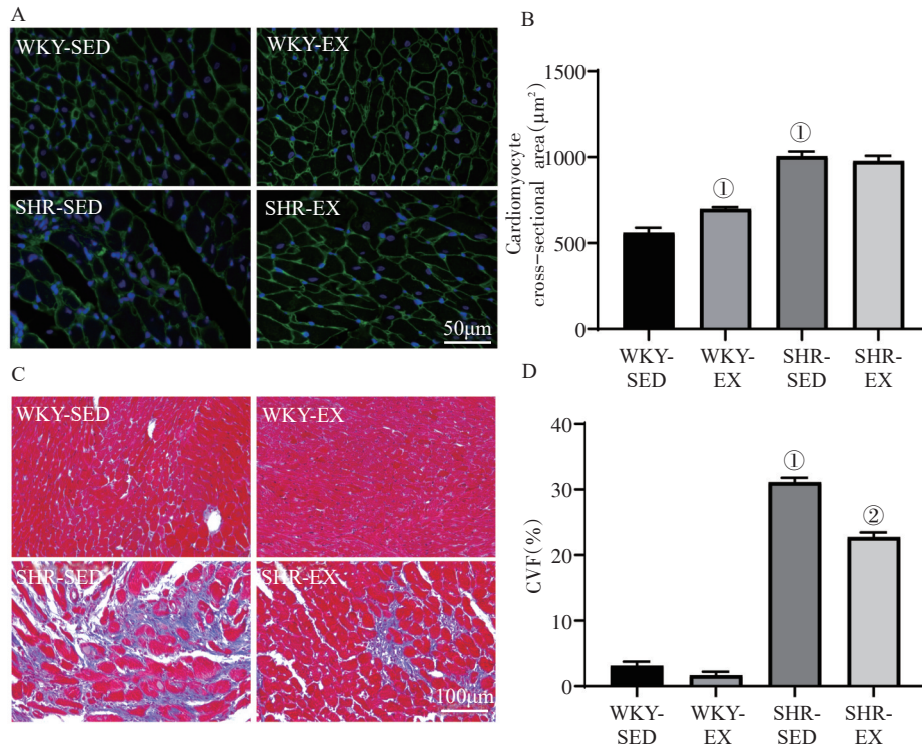
注:与WKY-SED组相比,① $P<0.01$;与SHR-SED组相比,② $P<0.05$,③ $P<0.01$ 。

3 讨论

3.1 有氧运动对高血压心脏重塑的影响

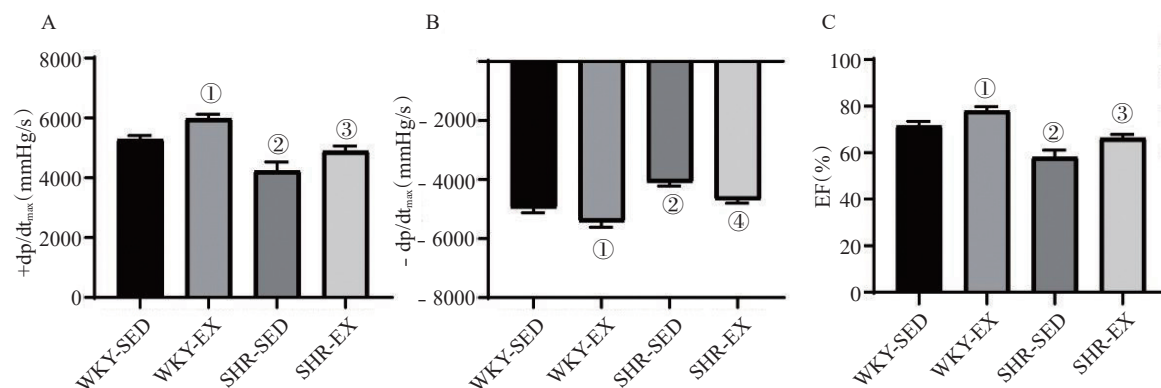
原发性高血压是一种常见的慢性疾病,是造成全球疾病负担和心血管疾病最主要的危险因素。近年来,运动成为改善慢性心血管疾病的重要干预手段,而中等强度有氧运动的降压效果相对明显。Lopes S等^[10]发现,8—12周有氧运动可有效降低顽固性高血压患者24h动态血压。静息心率作为心血管疾病的风险指标,其水平的异常升高会影响自主神经系统的失衡,增加高血压患者的死亡风险。研究表明,运动可以改善副交感神经张力降低静息心率,增加心率储备,从而提高心血管疾病患者的生存率^[11]。在本研究中,12周有氧运动降低了SHR的体重、血压和心率,与既往研究结果相符^[12-13]。长期高血压易引发高心病,早期表现为心脏舒张功能减退,伴随心脏后负荷持续性增加,收缩末期心室壁的高张力会刺激心肌细胞肥大并伴有间质胶原沉积增生,严重可致心肌纤维化,心功能不全,造成心脏重构,诱发心脏表型、胚胎基因型和功能发生病理变

图1 有氧运动对各组大鼠心脏形态的影响



注:图A为各组大鼠心肌WGA染色图($\times 400$),标尺=50 μm ;图B为各组大鼠心肌细胞横截面积;图C为各组大鼠心肌MASSON染色图($\times 200$),标尺=100 μm ;图D为各组大鼠心肌胶原纤维容积百分比(CVF%)。与WKY-SED组相比,① $P < 0.01$;与SHR-SED组相比,② $P < 0.01$ 。

图2 有氧运动对各组大鼠血流动力学指标的影响

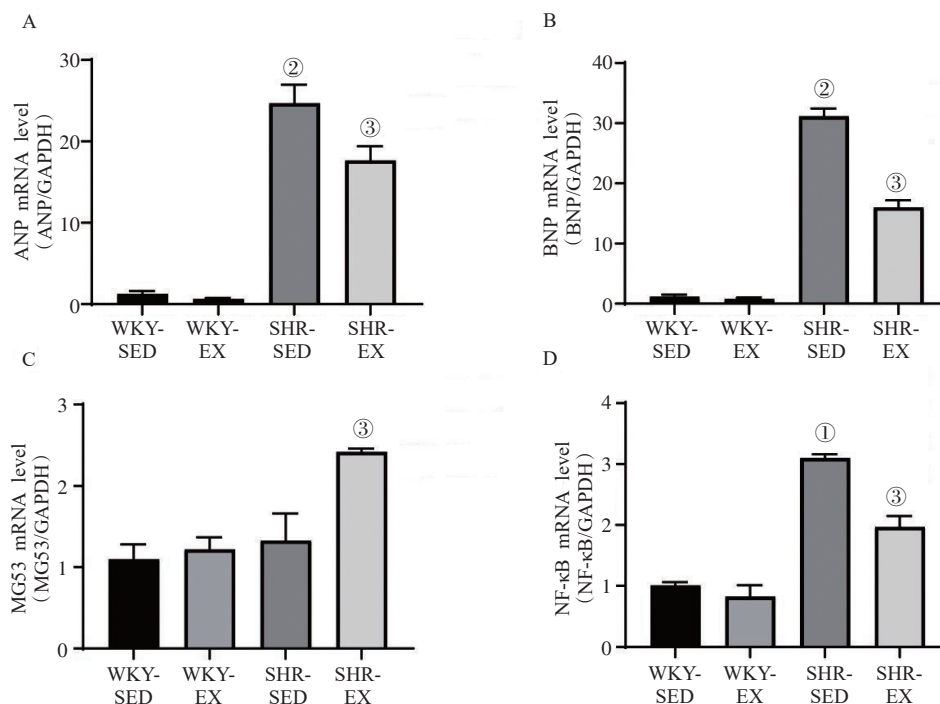


注:与WKY-SED组相比,① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;与SHR-SED组相比,③ $P < 0.05$,④ $P < 0.01$ 。

化。本研究首先检测各组大鼠心脏质量(心重体重比值、心重胫骨长比值和左心室肥大指数)、心肌细胞横截面积和CVF%,结果表明,在中等强度有氧运动负荷的刺激下,SHR的心脏肥大程度并未明显改善,这可能与运动引起的生理性心脏肥大和高血压所致的病理性心脏肥大交互作用有关。MASSON

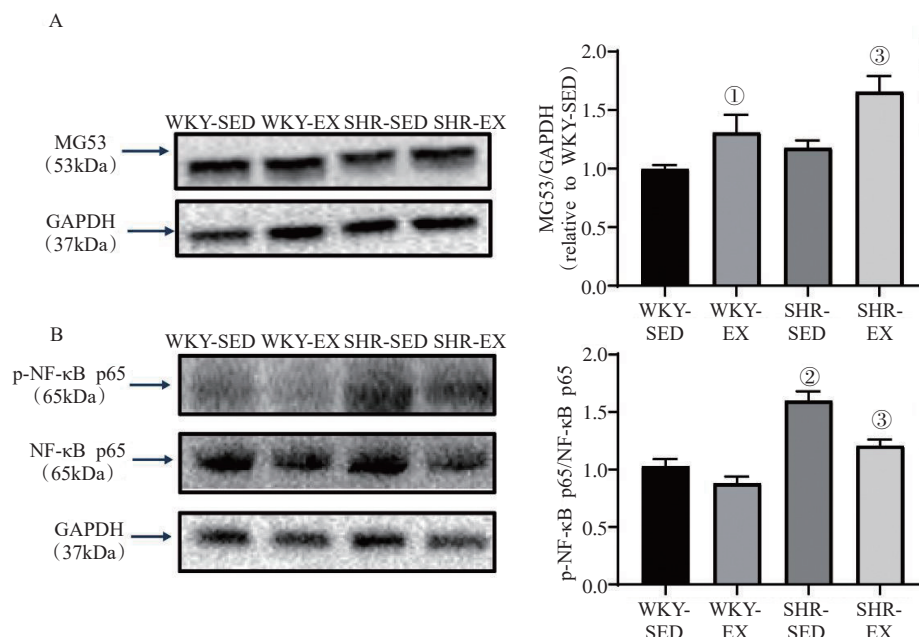
染色结果显示,SHR-EX组心肌的CVF%较SHR-SED组显著下降,提示有氧运动可改善SHR心肌胶原纤维的沉积程度,这与Peng等^[14]以SHR为模型进行长期有氧运动干预的研究结果一致。胚胎基因主要在胚胎期的心脏表达,其编码的蛋白质功能水平较低,成年后其表达水平能够作为心脏的生物标志

图3 各组大鼠心肌ANP、BNP、和MG53和NF- κ B p65的mRNA相对表达水平



注:与WKY-SED组相比,① $P<0.05$,② $P<0.01$;与SHR-SED组相比,③ $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠心肌MG53、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白的相对表达水平



注:与WKY-SED组相比,① $P<0.05$,② $P<0.01$;与SHR-SED组相比,③ $P<0.01$ 。

物反映心血管功能状态。本研究通过RT-PCR定量方法来检测SHR心肌中胚胎基因(ANP和BNP)的

mRNA表达水平,观察到SHR-EX组胚胎基因的mRNA表达水平显著低于SHR-SED组,提示有氧运

动可抑制胚胎基因在高血压病理状态下的异常激活。本研究通过 Millar 压力-容积系统测定心脏功能,结果显示,SHR-EX 组的 $\pm dp/dt_{max}$ 绝对值和 EF 显著高于 SHR-SED 组,提示有氧运动可以缓解 SHR 心脏的舒缩功能障碍。坚持以有氧运动为主的体育锻炼能够改善高血压患者的血流供应,提高氧气运输效率和利用率,增强心肌收缩力,是非药物途径缓解高心病的有效手段。

3.2 MG53/NF- κ B 信号通路在有氧运动改善高血压心脏重塑中的作用

MG53 蛋白通过参与不同信号通路调节多种生理病理过程,既可以作为分泌因子响应生理或病理刺激,也可以作为调节分子参与多种组织器官的细胞膜修复。越来越多证据表明,MG53 在心脏组织中具有潜在的保护作用。在心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤状态下,MG53 与 PI3K 的 p85 亚基和小窝蛋白 3(caveolin3, CaV3)构成功能复合体 p85-PI3K/MG53/CaV3,激活再灌注损伤挽救激酶(reperfusion injury salvage kinase, RISK)信号通路,参与心肌细胞膜损伤的修复^[15],对七氟烷后处理的高胆固醇血症大鼠心脏也起到保护作用^[16]。MG53 还可以通过转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路调节心肌成纤维细胞的增殖和迁移^[17]。在心脏缺血预适应(ischemic precondition, IPC)中,Shan 等^[18]将 MG53 定义为心脏保护性调节因子而非被动外渗的蛋白质,调节心肌细胞活力和心脏功能。NF- κ B 作为调控心肌细胞增殖、分化、凋亡和炎症反应的重要核转录因子,当机体处于应激或损伤状态时,NF- κ B 与其抑制因子解离后活化并进入细胞核,发挥调控作用^[19]。在心血管系统中,NF- κ B 的异常活化参与调控心脏肥大、心肌炎以及心肌梗死等多种疾病的发生发展。最新研究表明,MG53 通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路减轻脂多糖诱导的神经毒性和神经炎症,过表达 MG53 可以抑制 NF- κ B 活化入核,进而上调心肌缺血缺氧所致钾通道相互作用蛋白 KCHIP2 的辅助亚基 KChIP2 的表达,增强心脏中瞬时外向钾离子电流(I_{to})并延长动作电位时程,维持心电稳定,发挥心脏保护作用^[6,20]。

高血压伴随全身炎症反应,引发心脏和血管功

能障碍,加剧血压升高并导致终末靶器官的损伤,使用运动结合药物治疗减轻炎症反应能够延缓高心病的发生发展。研究表明,敲除 MG53 蛋白不仅会加重力竭运动和缺血再灌注引起的小鼠骨骼肌细胞结构和线粒体损伤,还致使内质网应激持续时间延长及应激强度增加,造成运动能力的下降^[21-22],提示运动可以改变 MG53 的表达水平。中等强度有氧运动可以通过抑制 NF- κ B 活化减轻糖尿病小鼠心肌炎症反应和 ROS 的生成,减轻心肌细胞肥大程度^[23]。那么 MG53/NF- κ B 信号通路是否有氧运动改善高血压心脏重塑中发挥修复作用,如果可以该通路又呈现出怎样的特点,目前还没有关于以上问题的研究报道,故对此展开探究。在本研究中,与 SHR-SED 组相比,12 周有氧运动干预后 SHR-EX 组心肌 MG53 的 mRNA 和蛋白表达水平显著增高,NF- κ B mRNA 和蛋白磷酸化水平显著下降,故可推测 MG53 在有氧运动改善心脏重塑中的作用机制为通过上调自身水平进而抑制 NF- κ B 表达,改善高血压病理状态下心脏的炎症反应,发挥心脏保护作用。本研究还发现,SHR-SED 组 MG53 蛋白表达量较 WKY-SED 组有增高趋势但无显著性差异,目前尚未见有关 SHR 心肌中 MG53 变化的研究报道,但有证据显示,敲除 MG53 加剧压力超负荷引起的心脏肥大效应,改善心率失常^[20],同时引起心肌膜损伤修复缺陷,增加心脏损伤的易感性,减弱 IPC 的保护作用^[15]。外源性注射重组人 MG53(recombinant human MG53, rhMG53)能够有效改善脓毒性心功能障碍小鼠的心功能,抑制炎症信号通路的激活^[24],还能够减少缺血再灌注损伤的心脏梗死面积^[25],以上研究结果为 MG53 作为心脏保护因子提供了依据。然而 MG53 在糖尿病性心肌病和代谢综合征中的潜在作用仍存在争议,过表达 MG53 可能会引起脂质异位沉积,产生胰岛素抵抗^[26]。最新研究发现,MG53 基因敲除会使小鼠的肾功能随年龄增长而下降,并伴随肾脏纤维化,外源性注射 rhMG53 能够通过抑制 NF- κ B 信号的磷酸化和激活,减少肾脏炎症和纤维化程度,发挥保护作用^[27]。参考前人相关研究结果,推测在 SHR 心肌肥大代偿期,内源性 MG53 可能代偿性增多,在高血压所致的炎症反应中起负反馈调节作用,这一病理状态下 MG53 对于 NF- κ B

转录活性的调控可能受到Toll样受体(TLR4)、促炎因子TNF- α 和Ⅱ型钙/钙调素依赖性蛋白激酶 δ 亚型(calmodulin-dependent protein kinase II δ , CaMK II δ)等其他炎症因子和信号通路的干预介导,具体机制有待进一步探究求证。综合以上研究结果, MG53/NF- κ B信号通路可能在有氧运动改善高血压心脏重塑中发挥了保护作用。

4 结论

12周有氧运动可能通过提高SHR心脏保护因子MG53水平,抑制NF- κ B表达,改善心脏功能,从而延缓高心病的发生发展。

参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组,胡盛寿.中国心血管健康与疾病报告2020概要[J].中国循环杂志,2021,36(6):521—545.
- [2] Traynor K. Guideline highlights role of hypertension control in preventing heart failure[J]. Am J Health Syst Pharm, 2017,74(15):1119—1120.
- [3] Zheng J, Cheng J, Zheng S, et al. Physical exercise and its protective effects on diabetic cardiomyopathy: what is the evidence?[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018(9):729.
- [4] Bian Z, Wang Q, Zhou X, et al. Sustained elevation of MG53 in the bloodstream increases tissue regenerative capacity without compromising metabolic function[J]. Nat Commun, 2019,10(1):4659.
- [5] Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B[J]. Circ Res, 2011,108(9):1122—1132.
- [6] Guan F, Zhou X, Li P, et al. MG53 attenuates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and neuroinflammation via inhibiting TLR4/NF- κ B pathway in vitro and in vivo[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019(95):109684.
- [7] Sermersheim M, Kenney AD, Lin PH, et al. MG53 suppresses interferon- β and inflammation via regulation of ryanodine receptor-mediated intracellular calcium signaling[J]. Nat Commun, 2020,11(1):3624.
- [8] Wang X, Li X, Ong H, et al. MG53 suppresses NF- κ B activation to mitigate age-related heart failure[J]. JCI Insight, 2021,6(17):e148375.
- [9] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979,47(6):1278—1283.
- [10] Lopes S, Mesquita-Bastos J, Garcia C, et al. Effect of exercise training on ambulatory blood pressure among patients with resistant hypertension: a randomized clinical trial[J]. JAMA Cardiol, 2021,6(11):1317—1323.
- [11] Kingsley JD, Figueroa A. Acute and training effects of resistance exercise on heart rate variability[J]. Clin Physiol Funct Imaging, 2016,36(3):179—187.
- [12] Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, et al. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function[J]. Cardiovasc Res, 2005,67(1):161—172.
- [13] Libonati JR. Cardiac remodeling and function following exercise and angiotensin II receptor antagonism[J]. Eur J Appl Physiol, 2012,112(8):3149—3154.
- [14] Peng WW, Hong L, Liu GY, et al. Prehypertension exercise training attenuates hypertension and cardiac hypertrophy accompanied by temporal changes in the levels of angiotensin II and angiotensin (1-7)[J]. Hypertens Res, 2019,42(11):1745—1756.
- [15] Cao CM, Zhang Y, Weisleder N, et al. MG53 constitutes a primary determinant of cardiac ischemic preconditioning[J]. Circulation, 2010,121(23):2565—2574.
- [16] 张冯江.七氟烷后处理对高胆固醇血症大鼠心脏的作用及与膜修复蛋白MG53的联系[D].杭州:浙江大学,2013.
- [17] Zhao J, Lei H. Tripartite motif protein 72 regulates the proliferation and migration of rat cardiac fibroblasts via the transforming growth factor- β signaling pathway[J]. Cardiology, 2016,134(3):340—346.
- [18] Shan D, Guo S, Wu HK, et al. Cardiac ischemic preconditioning promotes MG53 secretion through H₂O₂-activated protein kinase C- δ signaling[J]. Circulation, 2020,142(11):1077—1091.
- [19] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. Cell, 2017,168(1—2):37—57.
- [20] Liu W, Wang G, Zhang C, et al. MG53, a novel regulator of KChIP2 and I(to,f), plays a critical role in electrophysiological remodeling in cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2019,139(18):2142—2156.
- [21] 邓皓皓.MG53基因敲除对小鼠一次性下坡跑后肱三头肌内质网应激蛋白GRP78、Caspase12表达的影响[D].上海:上海体育学院,2019.
- [22] 吴迎,伊木清,曾凡星.MG53基因敲除对小鼠延迟性肌肉酸痛期骨骼肌损伤的影响[J].中国康复医学杂志,2017,32(6):636—642.
- [23] 柳华,孙静,于晓涵,等.运动诱导的miR-126对糖尿病小鼠心肌的保护作用及机制研究[J].中国体育科技, 2022,58(6):74—80.
- [24] 田苗.MG53保护脓毒性心功能障碍及GRK4在心肌梗死后心脏损伤中的相关研究[D].重庆:陆军军医大学,2020.
- [25] Liu J, Zhu H, Zheng Y, et al. Cardioprotection of recombinant human MG53 protein in a porcine model of ischemia and reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015(80):10—19.
- [26] Yi JS, Park JS, Ham YM, et al. MG53-induced IRS-1 ubiquitination negatively regulates skeletal myogenesis and insulin signalling[J]. Nat Commun, 2013(4):2354.
- [27] Li H, Duann P, Li Z, et al. The cell membrane repair protein MG53 modulates transcription factor NF- κ B signaling to control kidney fibrosis[J]. Kidney Int, 2022, 101(1):119—130.