

有氧运动对慢性心力衰竭大鼠病理性心脏肥大的影响

施曼莉¹, 李晓霞²

(1.重庆师范大学 体育学院, 重庆 401331; 2.山东体育学院, 济南 250102)

摘 要: 探讨有氧运动对慢性心力衰竭大鼠病理性心脏肥大的影响及可能机制, 为心衰的运动康复提供理论依据。将雄性 Wistar 大鼠结扎冠状动脉建立心梗后慢性心衰模型, 术后随机分为假手术对照组(SC 组)、假手术运动组(SE 组)、心衰对照组(HC 组)和心衰运动组(HE 组)。假手术运动组和心衰运动组进行 10 周跑台训练, 假手术对照组和心衰对照组保持安静状态。利用跑台递增负荷运动实验测定大鼠的运动耐力(最大跑速和力竭时间); 心脏超声检测心脏结构与功能参数(包括左室舒张期内径、左室收缩期内径、左室舒张期前壁厚度、左室收缩期前壁厚度、左室舒张期后壁厚度、左室收缩期后壁厚度、左室缩短分数和左室射血分数); 左室导管法测定血流动力学参数(包括左室收缩期压力、左室舒张末期压力、左心室压力最大上升速率和左室压力最大下降速率); 称量体重后取心脏并测定左室重量、右室重量, 计算左室质量指数; 利用 HE 和 Masson 染色法进行组织病理学观察并获得心肌细胞横截面积和胶原容积分数; 实时荧光定量 PCR 检测心肌 α -肌球蛋白重链、 β -肌球蛋白重链、心钠素、肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶、I 型胶原和 III 型胶原 mRNA 表达量; Western Blot 法检测心肌半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 3、钙调磷酸酶催化亚基 $\text{A}\beta$ 、活化 T 细胞核因子 3、磷脂酰肌醇-3 激酶催化亚基 p110 α 和磷酸化 Akt 蛋白表达量。结果显示: (1)与假手术对照组比较, 假手术运动组 BW 和 LVEDP 降低($P<0.05$), 最大跑速、力竭时间、LVW、LVMI、LVIDd、LVFS、LVEF、LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 、CSA、 α -MHC、SERCA2a mRNA 以及 PI3K(p110 α)和 p-Akt 蛋白表达量升高($P<0.05$), 心衰对照组最大跑速、力竭时间、BW、LVIDd、LVFS、LVEF、LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 以及 α -MHC 和 SERCA2a mRNA 表达水平降低($P<0.05$), LVW、LVMI、LVAWDd、LVAWDs、LVPWDd、LVPWDs、LVEDP、CSA、CVF、ANF、 β -MHC、Col-I 和 Col-III mRNA 以及 CaNA β 、NFAT3 和 Caspase-3 蛋白表达量升高($P<0.05$); (2)与心衰对照组比较, 心衰运动组最大跑速、力竭时间、LVW、LVMI、LVIDd、LVFS、LVEF、LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 、CSA、 α -MHC、SERCA2a mRNA 以及 PI3K(p110 α)和 p-Akt 蛋白表达水平升高($P<0.05$), LVEDP、CVF、ANF、 β -MHC、Col-I 和 Col-III mRNA 以及 CaNA β 、NFAT3 和 Caspase-3 蛋白表达量降低($P<0.05$)。结果表明: 长期有氧运动促使心衰大鼠心脏由病理性肥大向生理性肥大转变, 左室重塑得到抑制, 心功能和运动耐力改善, 其机制与运动抑制 CaN-NFAT 信号通路并激活 PI3K-Akt 信号途径进而下调胚胎基因表达、上调收缩蛋白表达、减轻心肌纤维化和抑制心肌细胞凋亡有关。

关 键 词: 运动医学; 有氧运动; 慢性心力衰竭; 心脏肥大; 大鼠

中图分类号: G804.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-7116(2015)03-0127-08

Effects of aerobic exercise on the pathological cardiac hypertrophy of rats suffering chronic heart failure

SHI Man-li¹, LI Xiao-xia²

(1.School of Physical Education, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;

2.Shandong Sport University, Jinan 250102, China)

收稿日期: 2014-11-17

基金项目: 山东省自然科学基金项目“长期有氧运动对慢性心力衰竭大鼠心脏交感神经功能的调节”(ZR2012HM074)。

作者简介: 施曼莉(1980-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 运动训练与运动医学。通讯作者: 李晓霞教授。E-mail: manli_shi_liman@126.com

Abstract: In order to probe into the effects of aerobic exercise on the pathological cardiac hypertrophy of rats suffering chronic heart failure and the possible mechanism, and to provide a theoretical criterion for exercise recovery from heart failure, the authors established a chronic heart failure model by ligating the coronary artery of Wistar rats, randomly divided the rats into a sham operation control group (SC), a sham operation exercise group (SE), a heart failure control group (HC) and a heart failure exercise group (HE) after operation, let the rats in groups SE and HE carry out 10-week treadmill training, let the rats in groups SC and HC maintain a calm condition, measured the rats' exercise endurance (maximum running speed and time to exhaustion) by utilizing the experiment of exercise whose load was gradually increased via the treadmill, by means of echocardiogram, measured cardiac structure and function parameters, which included left ventricular internal diameter during diastole (LVIDd), left ventricular internal diameter during systole (LVIDs), left ventricular anterior wall diameter during diastole (LVAWDd), left ventricular anterior wall diameter during systole (LVAWDs), left ventricular posterior wall diameter during diastole (LVPWDd), left ventricular posterior wall diameter during systole (LVPWDs), left ventricular fractional shortening (LVFS) and left ventricular ejection fraction (LVEF), by means of pressure transducer inserted retrograde in left ventricle, measured hemodynamic parameters, which included left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), maximal developing rate of left ventricular pressure ($+dp/dt_{max}$) and maximal descending rate of left ventricular pressure ($-dp/dt_{max}$), weighed the rats, then took out their heart, measured left ventricular weight (LVW) and right ventricular weight (RVW), calculated left ventricular mass index (LVMI), by means of histopathological detection (HE) and Masson staining, carried out histopathological observation and acquired myocardial cross-sectional area (CSA) and collagen volume fraction (CVF), by means of real-time fluorescent quantitation PCR technique, measured mRNA expression level of myocardial α -myosin heavy chain (α -MHC), β -myosin heavy chain (β -MHC), atrial natriuretic factor (ANF), sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), collagen type I (Col-I) and collagen type III (Col-III), by means of Western Blot technique, measured protein expression level of myocardial cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), calcineurin (CaN) A β catalytic subunit (CaNA β), nuclear factor of activation T cell 3 (NFAT3), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) p110 α catalytic subunit [PI3K(p110 α)] and phospho-Akt (p-Akt). Results: (1) as compared with the rats in group SC, the BW and LVEDP of the rats in group SE decreased ($P<0.05$), their maximum running speed, time to exhaustion, LVW, LVMI, LVIDd, LVFS, LVEF, LVSP, $\pm dp/dt_{max}$, CSA, mRNA of α -MHC and SERCA2a, protein of PI3K(p110 α) and p-Akt increased ($P<0.05$); the maximum running speed, time of exhaustion, BW, LVIDd, LVFS, LVEF, LVSP, $\pm dp/dt_{max}$, mRNA of α -MHC and SERCA2a of the rats in group HC decreased ($P<0.05$), their LVW, LVMI, LVAWDd, LVAWDs, LVPWDd, LVPWDs, LVEDP, CSA, CVF, mRNA of ANF, β -MHC, Col-I and Col-III, protein of CaNA β , NFAT3 and Caspase-3 increased ($P<0.05$); (2) as compared with the rats in group HC, the maximum running speed, time to exhaustion, LVW, LVMI, LVIDd, LVFS, LVEF, LVSP, $\pm dp/dt_{max}$, CSA, mRNA of α -MHC and SERCA2a of the rats in group HE increased ($P<0.05$), their LVEDP, CVF, mRNA of ANF, β -MHC, Col-I and Col-III, protein of CaNA β , NFAT3 and Caspase-3 decreased ($P<0.05$). The said results indicated the followings: long-term aerobic exercise promoted the changing of the heart of the rats suffering heart failure from pathological hypertrophy to physiological hypertrophy, restrained left ventricle remodeling, and improved cardiac functions and exercise endurance, whose mechanism was related to that exercise restrained CaN-NFAT signal pathway and activated PI3K-Akt signal pathway, and then down-regulated fetal gene expression, up-regulated contractile protein, alleviated myocardial fibrosis and restrained cardiomyocyte apoptosis.

Key words: sports medicine; aerobic exercise; chronic heart failure; cardiac hypertrophy; rat

随着生活方式的改变和人口老龄化加剧,慢性心力衰竭(简称心衰)的发病率不断增高,已成为目前全球高罹患率和高死亡率的主要临床综合征^[1]。研究证实,规律的体力活动具有心血管保护效应,可显著降

低心血管疾病的危险因素(如高血压、肥胖、胰岛素抵抗等)^[2]。临床实践发现,坚持长期有氧运动可延缓心衰,改善心功能和运动能力,提高生活质量,降低死亡率和住院率^[3],因此运动对于稳定期心衰患者是一种

安全有效的康复治疗手段^[2]。

心梗、高血压等作为应激源可诱导病理性心脏肥大, 临床证实, 心脏肥大是重要的心血管危险因素, 同时也是心衰预后不良的独立预测因子^[4]。长期运动训练亦可造成心脏肥大, 虽然形态学上与病理性心脏肥大相似, 但心功能提高、运动能力增强, 是心脏对于运动应激的良性适应, 称为生理性心脏肥大(运动性心脏肥大或运动员心脏)^[5]。有氧运动对心衰时病理性心脏肥大的影响以及运动诱导的生理性心脏肥大在心衰运动康复中的作用及机制鲜有关注, 因此, 本研究以 Wistar 大鼠为实验对象, 通过结扎冠状动脉前降支建立心梗后心衰模型, 观察 10 周跑台训练对病理性心脏肥大的影响, 为心衰的机制研究及康复治疗提供依据。

1 研究对象和方法

1.1 实验动物

8 周龄健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 48 只(体重 250~280 g), 由山东鲁抗医药股份有限公司提供(实验动物许可证号: SCXK[鲁]2008-0003)。

1.2 心衰造模与动物分组

大鼠适应环境 1 周后, 随机选取 28 只进行心梗后心衰模型制备: 动物以质量分数 1% 戊巴比妥钠麻醉后仰卧固定在手术台上, 术区备皮。气管插管, 缝线固定。连接小动物呼吸机, 调整参数为潮气量 10 mL/kg、呼吸频率 65 次/min、呼吸比 1.5:1。术区消毒后于胸骨左侧第 3—4 肋间开胸暴露心脏, 在左心耳下方 2~3 mm 处用 0 号丝线结扎左冠状动脉前降支。结扎后肉眼可见结扎区域变白、收缩力降低, 心电图记录仪 I、II 导联 ST 段明显抬高, 证明结扎成功。然后迅速放回心脏缝合胸壁。另外 20 只大鼠作为对照进行假手术, 即开胸后只栓线不结扎, 其他操作同心衰组。术后连续 1 周肌注抗生素预防感染。术后 4 周行心脏超声检查(方法见 1.4 节), 以左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) $\leq 45\%$ 作为心衰造模成功的标志。

心衰造模中, 2 只动物失败, 1 只死亡, 假手术组则全部存活。将心梗造模成功的大鼠($n=25$ 只)随机分为心衰对照组(HC 组, $n=12$ 只)和心衰运动组(HE 组, $n=13$ 只), 假手术的大鼠($n=20$ 只)随机分为假手术对照组(SC 组, $n=10$ 只)和假手术运动组(SE 组, $n=10$ 只)。其中 SE 和 HE 组进行 10 周跑台训练, SC 组和 HC 组保持安静状态。

1.3 运动耐力测试与跑台运动方案

首先参照本课题组已建立的递增负荷实验测定大鼠的运动耐力^[6]。HC 组和 HE 组进行 15 min 热身(速度

5 m/min, 坡度 0°) 后休息 5 min 再进行递增负荷实验, 起始负荷为 7 m/min, 每 3 min 递增 5 m/min(坡度 0°), 直至力竭, 记录最大跑速和力竭时间。SC 组和 SE 组除起始负荷定为 10 m/min 外, 其他步骤相同。

SE 组 HE 组大鼠进行 10 周跑台训练。具体方案如下: 跑速(前 2 周为最大跑速的 50%, 后 8 周为最大跑速的 60%)、时间(第 1 天 30 min, 以后每天递增 10 min, 直至 60 min); 频率(5 d/周)。

1.4 心脏超声和血流动力学测定

动物腹腔麻醉后仰卧固定, 用小动物超声仪(visualsonics vevo770, 加拿大)检测心脏结构与功能(取胸骨旁左室短轴切面进行测量), 参数包括左室舒张期内径(left ventricular internal diameter at diastole, LVIDd)、左室收缩期内径(left ventricular internal diameter at systole, LVIDs)、左室舒张期前壁厚度(left ventricular anterior wall diameter at diastole, LVAWDd)、左室收缩期前壁厚度(left ventricular anterior wall diameter at systole, LVAWDs)、左室舒张期后壁厚度(left ventricular posterior wall diameter at diastole, LVPWDd)、左室收缩期后壁厚度(left ventricular posterior wall diameter at systole, LVPWDs)、左室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS)和 LVEF(左室射血分数)。

心脏超声检查后, 分离右侧颈总动脉, 插入连接压力换能器的聚乙烯心导管, 通过生物信号处理和分析系统进行血流动力学测定。心导管在颈动脉中记录动脉收缩压(systolic arterial pressure, SAP)、动脉舒张压(diastolic arterial pressure, DAP)和心率(heart rate, HR); 稳定 10 min 后, 将心导管进一步插入左心室, 记录左室收缩期压力(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末期压力(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左室压力最大上升速率(maximal developing rate of left ventricular pressure, $+dp/dt_{max}$)和左室压力最大下降速率(maximal descending rate of left ventricular pressure, $-dp/dt_{max}$)。

1.5 动物取材

大鼠称体重(body weight, BW)后麻醉开胸迅速取出心脏, 用冷 PBS 冲洗残血, 纱布吸干表面液体, 分离左右心室, 分别称量左室重量(left ventricular weight, LVW)、右室重量(right ventricular weight, RVW)并计算左室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)($LVMI=LVW/BW$)。切取左室非梗死区的心肌, 分成两份, 每份约 100 mg, 一份进行心脏组织病理学观察, 另一份用于实时定量荧光 PCR 和 Western Blot 检测。迅速将组织置于液氮中并转移至 -80 °C 冰箱冻

存待测。

1.6 心肌细胞横截面积和胶原容积分数测定

将左室心肌组织固定于质量分数 10% 的福尔马林中, 经脱水、透明、包埋、切片(5 μm) 等操作后分别进行苏木精-伊红(he)染色和 Masson 染色。he 染色的切片, 每张随机选取 10 个视野, 每个视野选 10 个细胞(要求尽量呈圆形), 采用图像分析软件测量心肌细胞横截面积(cross-sectional area, CSA)并计算平均值。Masson 染色的切片, 每张随机选取 5 个视野, 用图像分析软件测量胶原组织面积, 胶原组织面积占所测视野面积的百分比即为胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达水平

将心室肌组织匀浆后, 用 Trizol 法抽提心肌总 RNA。逆转录反应获得 cDNA, 实时荧光定量 PCR(ABI 7900 型荧光定量 PCR 仪, 美国)测定心肌胚胎基因——心钠素(atrial natriuretic factor, ANF)和 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC), 收缩蛋白基因—— α -肌球蛋白重链(α -myosin heavy chain, α -MHC)和肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶(sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA2a)以及胶原基因——I 型胶原(collagen type I, Col-I)和 III 型胶原(collagen type III, Col-III)mRNA 表达量。扩增条件为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}/1 \text{ min}$, 95 $^{\circ}\text{C}/15 \text{ s}$, 55 $^{\circ}\text{C}/15 \text{ s}$, 72 $^{\circ}\text{C}/15 \text{ s}$, 共 40 个循环。以 β -actin 作为内参, 计算目的基因的相对表达量(SC 组的倍数)。引物序列与产物大小见表 1。

表 1 引物序列设计

基因名称	序列	产物大小/bp
ANF	上游: 5'-CATCACCTGGGCTTCTTCCT-3'	406
	下游: 5'-TGGGCTCCAATCCTGTCAATC-3'	
SERCA2a	上游: 5'-CCATCTGCTTGCCATGTCACCT-3'	213
	下游: 5'-CAAATGGTTTAGGAAGCGGTTACT-3'	
Col-I	上游: 5'-TTGACCCTAACCAAGGATGC-3'	197
	下游: 5'-CACCCCTTCTGCGTTGTATT-3'	
Col-III	上游: 5'-AGATGGACTAAGTGGACATC-3'	450
	下游: 5'-CATGTTTCTCCGTTTCCAT-3'	
α -MHC	上游: 5'-CCAATGAGTACCGCGTGAA-3'	254
	下游: 5'-ACAGTCATGCCGGGATGAT-3'	
β -MHC	上游: 5'-ATGTGCCGGACCTTGGA-3'	170
	下游: 5'-CCTCGGGTTAGCTGAGAGATCA-3'	
β -actin	上游: 5'-AGACCTTCAACACCCAG-3'	316
	下游: 5'-CACGATTCCTCTCAGC-3'	

1.8 Western blot 检测蛋白表达水平

检测蛋白包括半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 3(cysteine aspartate protease-3, Caspase-3)、钙调磷酸酶(calcineurin, CaN)催化亚基 A β (CaNA β)、活化 T 细胞核因子 3(nuclear factor of activation T cell 3, NFAT3)、磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)催化亚基 p110 α [PI3K(p110 α)]和磷酸化 Akt(p-Akt): 取 100 mg 心肌组织, 加入裂解液, 冰上裂解 1 h, 提取细胞内蛋白, 用 BCA 法进行蛋白定量。取各组蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 转膜后用牛血清蛋白封闭, 经一抗结合后洗膜, 二抗结合, 洗膜后采用增强型 ECL 化学发光法显色。以 β -actin 为内参蛋白, 对目的蛋白进行光密度分析并计算相对表达量(SC 组的倍数)。

1.9 统计学分析

所有数据以“平均数 \pm 标准差”表示, 组间比较使用单因素方差分析, 两两比较使用 LSD 检验。显著性水平定为 $P < 0.05$ 。统计软件使用 SPSS15.0。

2 结果及分析

2.1 最终样本量

造模过程中, 2 只动物造模失败, 1 只死亡; 10 周运动实验中, SC 组拒跑大鼠 1 只, HC 组死亡 2 只、拒跑 1 只, HE 组死亡 3 只、拒跑 2 只。剔除上述大鼠后, 最终样本量 36 只, 其中 SC 组 9 只, SE 组 10 只, HC 组 9 只, HE 组 8 只。

2.2 运动耐力的变化

与 SC 组比较, SE 组最大跑速和力竭时间升高($P < 0.05$), HC 组运动耐力下降($P < 0.05$); 与 HC 组比较, HE 组最大跑速和力竭时间增加($P < 0.05$)(见表 2)。

表 2 运动耐力 ($\bar{x} \pm s$) 的变化

组别	n/只	最大跑速/ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	力竭时间/min
SC	9	35.2 \pm 5.2	26.2 \pm 3.8
SE	10	41.0 \pm 4.6 ¹⁾	31.1 \pm 4.1 ¹⁾
HC	9	17.6 \pm 3.5 ¹⁾	11.2 \pm 2.9 ¹⁾
HE	8	23.1 \pm 4.0 ²⁾	18.6 \pm 3.4 ²⁾

1)与 SC 组比较, $P < 0.05$; 2)与 HC 组比较, $P < 0.05$

2.3 心脏结构与功能变化

与 SC 组比较, SE 组 BW 降低($P<0.05$), LVW、LVMI、LVIDd、LVFS 和 LVEF 增加($P<0.05$), 而 HC 组 BW、LVIDd、LVFS 和 LVEF 降低($P<0.05$), LVW、LVMI、LVAWDd、LVAWDs、LVPWDd 和 LVPWDs 增加($P<0.05$); 与 HC 组比较, HE 组 LVW、LVMI、LVIDd、LVFS 和 LVEF 升高($P<0.05$)(见表 3)。

表 3 心脏结构与功能($\bar{x} \pm s$)变化

组别	n/只	BW/g	LVW/mg	RVW/mg	LVMI/(mg·g ⁻¹)	LVIDd/mm	LVIDs/mm
SC 组	9	430±38	802±105	185±19	1.89±0.26	8.5±1.3	5.3±0.8
SE 组	10	375±40 ¹⁾	1 236±125 ¹⁾	196±22	3.32±0.45 ¹⁾	10.2±1.8 ¹⁾	5.5±1.0
HC 组	9	316±36 ¹⁾	988±112 ¹⁾	178±20	3.16±0.50 ¹⁾	7.2±1.0 ¹⁾	5.1±1.1
HE 组	8	337±45	1 178±118 ²⁾	185±24	3.59±0.52 ²⁾	8.6±1.2 ²⁾	5.4±0.9

组别	n/只	LVAWDd/mm	LVAWDs/mm	LVPWDd/mm	LVPWDs/mm	LVFS/(mm·s ⁻¹)	LVEF/%
SC 组	9	1.3±0.3	2.6±0.4	1.4±0.2	2.2±0.5	47.6±6.7	56.5±7.6
SE 组	10	1.4±0.4	2.8±0.6	1.4±0.4	2.4±0.9	53.9±7.0 ¹⁾	63.4±7.8 ¹⁾
HC 组	9	1.9±0.2 ¹⁾	3.2±0.7 ¹⁾	2.2±0.5 ¹⁾	2.8±0.8 ¹⁾	31.2±4.6 ¹⁾	38.5±5.7 ¹⁾
HE 组	8	1.8±0.2	3.0±0.9	2.2±0.6	2.6±0.7	38.8±3.9 ²⁾	47.2±5.8 ²⁾

1)与 SC 组比较, $P<0.05$; 2)与 HC 组比较, $P<0.05$

2.4 血流动力学参数

与 SC 组比较, SE 组 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 升高($P<0.05$), LVEDP 降低($P<0.05$), HC 组 LVEDP 升高

($P<0.05$), LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 降低($P<0.05$); 与 HC 组比较, HE 组 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 升高($P<0.05$), LVEDP 降低($P<0.05$)(见表 4)。

表 4 血流动力学($\bar{x} \pm s$)变化

组别	n/只	LVSP	LVEDP	$+dp/dt_{max}$	$-dp/dt_{max}$
SC 组	9	17.1±2.8	0.8±0.2	871±146	689±118
SE 组	10	21.5±2.5 ¹⁾	0.4±0.1 ¹⁾	1 126±188 ¹⁾	851±125 ¹⁾
HC 组	9	12.8±1.8 ¹⁾	2.5±0.5 ¹⁾	436±128 ¹⁾	376±98 ¹⁾
HE 组	8	15.9±1.5 ²⁾	1.4±0.3 ²⁾	683±116 ²⁾	541±105 ²⁾

1)与 SC 组比较, $P<0.05$; 2)与 HC 组比较, $P<0.05$

2.5 心脏组织病理学改变

心肌 he 染色显示:SC 和 SE 组心肌细胞染色清楚,胞浆呈红色、胞核呈蓝色,细胞排列整齐、形态正常、边界清楚,细胞间无纤维细胞聚集增生现象。HC 组心肌组织可见典型心肌梗死病理改变,心肌细胞损伤、组织着色不均匀、心肌细胞肿胀、细胞核固缩或碎裂,部分心肌细胞坏死、肌浆溶解、横纹消失、细胞数目减少。HE 组心肌梗死病变严重程度低于 HC 组,肌纤维排列轻度紊乱、着色较好、着色稍深,但较为均一。与 SC 组比较, SE 组、HC 组和 HE 组心肌均出现明显

肥厚,心肌细胞横截面积(CSA)增加($P<0.05$); HE 组 CSA 高于 HC 组($P<0.05$)。心肌 Masson 染色显示:胶原纤维呈蓝色,心肌细胞呈红色。SC 组和 SE 心肌纤维着色均匀,无胶原成分; HC 组心肌细胞减少,胶原成分显著增多,纤维化程度明显,胶原纤维溶积分数(CVF)高于 SC 组($P<0.05$); HE 组较 HC 组心肌细胞增多且排列较为整齐,胶原纤维(CVF)明显减少($P<0.05$)。心肌 HE 染色见图 1, Masson 染色见图 2, 各组 CSA 和 CVF 变化见图 3。

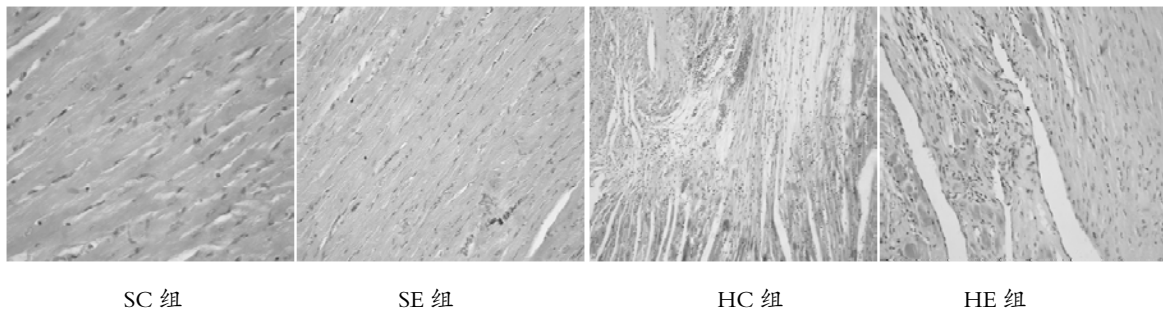


图 1 心肌 HE 染色

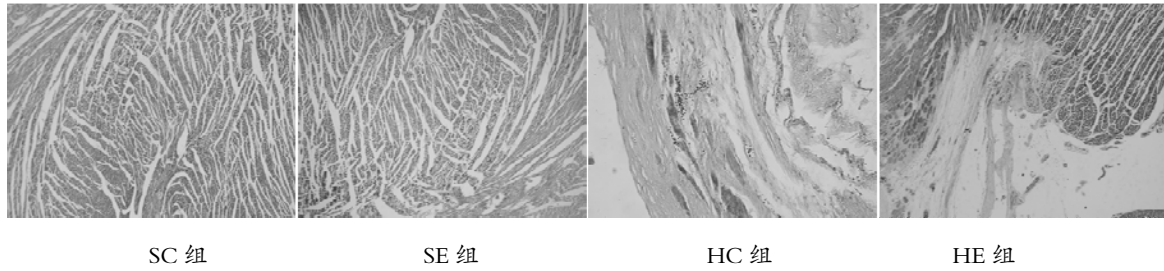
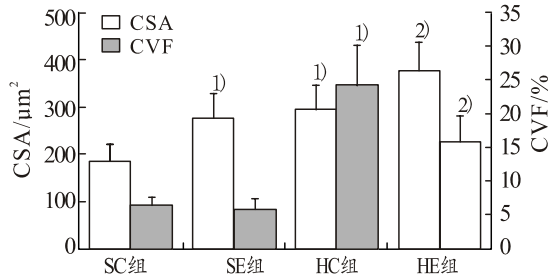


图 2 心肌 Masson 染色

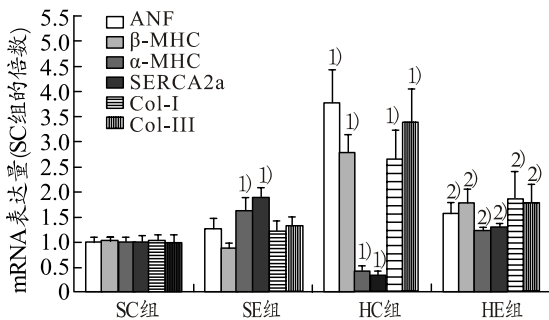


1)与 SC 组比较, $P < 0.05$; 2)与 HC 组比较, $P < 0.05$

图 3 心肌 CSA 和 CVF 的变化

2.6 mRNA 表达水平的变化

与 SC 组比较, SE 组 α -MHC 和 SERCA2a 升高 ($P < 0.05$), HC 组 α -MHC 和 SERCA2a 降低, ANF、 β -MHC、Col-I 和 Col-III 升高 ($P < 0.05$); 与 HC 组比较, HE 组 α -MHC 和 SERCA2a 升高, ANF、 β -MHC、Col-I 和 Col-III 降低 ($P < 0.05$) (见图 4)。



1)与 SC 组比较, $P < 0.05$; 2)与 HC 组比较, $P < 0.05$

图 4 mRNA 表达的变化

2.7 蛋白表达水平的变化

与 SC 组比较, SE 组 PI3K(p110 α)和 p-Akt 升高 ($P < 0.05$), HC 组 CaNA β 、NFAT3 和 Caspase-3 升高 ($P < 0.05$); 与 HC 组比较, HE 组 PI3K(p110 α)和 p-Akt 升高 ($P < 0.05$), CaNA β 、NFAT3 和 Caspase-3 降低 ($P < 0.05$)。 (见图 5、图 6)。

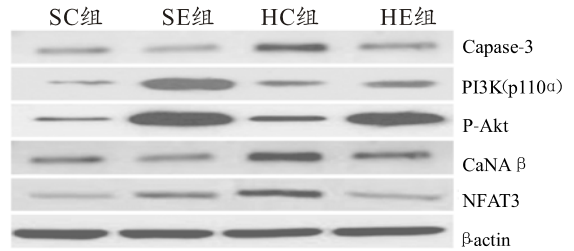
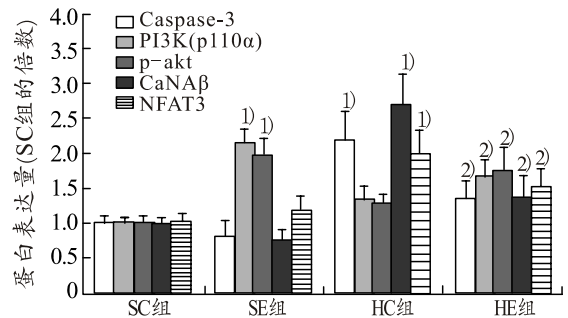


图 5 蛋白印迹图



1)与 SC 组比较, $P < 0.05$; 2)与 HC 组比较, $P < 0.05$

图 6 蛋白表达的变化

3 讨论

结扎冠状动脉前降支造成心梗是心衰造模最常用的方法, 一般认为手术后 2~4 周可获得慢性心衰模型并广泛应用于心衰病因、发病机制与疗效评价等研究。

心衰时心泵功能受损, 血流动力学出现异常^[8]。LVSP、+dp/dt_{max}、LVFS 和 LVEF 反映心室收缩功能, LVEDP、-dp/dt_{max} 则反映心室舒张功能和室壁顺应性。本研究中, 与 SC 组比较, HC 组 LVEDP 升高, LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、LVFS 和 LVEF 显著性降低, 说明心衰时心肌顺应性下降, 左室舒缩功能明显降低, 最终导致运动能力低下(最大跑速和力竭时间下降)。研究证实, 运动耐力下降是影响心衰患者生活质量的主要原因, 也是心衰患者预后的独立危险因子^[9]。长期中低强度有氧运动可延缓心衰进程, 有效改善心衰患者生活质量, 降低住院率与死亡率, 并已成为防治心衰的重要康复手段之一^[2]。这在本研究得到进一步证实, 即 HE 组较 HC 组心功能和血液动力学参数明显改善、运动耐力增强, 但运动良性效应的具体机制尚未明确。

近年来的研究认为, 心脏重塑是心衰发生发展的基本病理生理学机制, 是心衰发生率和死亡率的决定因素, 而心肌细胞肥大则是心脏重塑的主要特征^[10]。心肌的损伤(如心肌梗死)或负荷增加均可导致心肌细胞反应性肥大。本研究利用心梗造成病理性心脏肥大模型, 利用 10 周运动训练造成生理性心脏肥大模型, 结果显示, 病理性心脏肥大形态与结构上表现为心脏重量增加、心腔缩小、心壁增厚, 即向心性肥大; 在基因水平上表现为胚胎基因重新激活、胶原基因表达上调、收缩蛋白基因表达下调; 在细胞水平上则出现心肌细胞肥大、细胞凋亡和心肌纤维化, 最终导致心功能下降。而生理性心脏肥大则表现为左室离心性肥大, 收缩蛋白基因表达上调, 心功能增强, 不存在细胞凋亡与心肌纤维化。研究发现, 长期有氧运动(如长跑或游泳等耐力型运动员)通过增加回心血量(即心脏前负荷或容量负荷)造成心室壁应力增大, 引起心肌细胞肌节串联排列为主, 心脏扩大以适应增加的容量负荷^[11]。有氧运动对心衰时病理性心脏肥大的影响以及运动诱导的生理性心脏肥大在心衰运动康复中的作用鲜有关注。在本研究中, 与 HC 组比较, HE 组心肌细胞肥大、左室重量增加、心腔内径增大, 室壁厚度无明显改变, 即左室由运动康复前的“向心性肥大”转变为“离心性肥大”。同时胶原基因表达下调伴 CVF 明显减少说明心肌纤维化程度减轻, 心肌顺应性增加, 而胚胎基因表达下调、收缩蛋白基因表达上调则提示胚胎基因异常激活得到抑制, 心肌收缩力提高, 提示有氧运动促使心衰大鼠由病理性心脏肥大向生理性肥大转变。

病理性与生理性心脏肥大的形成是不同的刺激因素激活不同的信号转导途径并导致不同基因表达的结果^[12]。目前的研究显示, 胰岛素样生长因子 1(insulin like growth factor-1, IGF1)通过与 IGF1 受体结合介导的 PI3K-Akt 信号途径是生理性心脏肥大形成的主要机制^[13], 而血管紧张素 II(angiotensin II, AngII)通过与 G 蛋白偶联受体结合(G protein-coupled receptor, GPCR)介导的 CaN-NFAT 信号通路则在病理性心脏肥大形成中起关键作用^[14]。CaN 是一种 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性丝氨酸-苏氨酸磷酸酶, 通过使转录因子 NFAT3 去磷酸化而调节肥大基因的转录^[15]。NFAT3 活性在压力过负荷小鼠模型中升高, 但在生理性心脏肥大模型中则无显著性变化, 过表达 CaNA β 小鼠在压力过负荷下更易发生心脏肥大^[16], 提示 CaN 是诱导病理性心脏肥大的关键因子。PI3K-Akt 则在心脏正常生长发育以及运动应激过程中起重要作用, 该信号通路具有促进细胞存活以及抗凋亡等效应^[17]。小鼠 PI3K(p110 α)基因持续激活后可形成生理性心脏肥大^[18]; PI3K(p110 α)基因失

活小鼠心脏指数明显减小^[19], 且对于运动训练的反应钝化, 在压力过负荷下易造成心脏肥大和心衰^[20], 说明 PI3K(p110 α)在病理状态下对心脏起保护作用。Akt 属于丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 被 PI3K 磷酸化而激活, 通过调控蛋白合成与细胞凋亡发挥心脏保护作用^[21]。Akt 可抑制下游的效应分子哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)进而抑制心肌蛋白合成^[22], 抑制 mTOR 信号途径能显著改善病理性心脏肥大^[23]。运动促使心衰大鼠心脏由病理性肥大向生理性肥大转变的信号机制尚不清楚, 本研究对此进行了初探, 结果发现, 与 HC 组比较, HE 组 CaNA β 和 NFAT3 表达下调而 PI3K(p110 α)和 p-Akt 表达上调, 提示有氧运动可抑制心衰时 CaN-NFAT 介导的病理性肥大信号并激活 PI3K-Akt 介导的生理性肥大信号途径。此外, PI3K-Akt 激活还可通过下调 GPCR 下游效应分子如蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)和胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)表达和活性从而对病理性心脏肥大信号产生抑制作用^[24]。结合上述心脏形态、结构、功能与基因表达等结果, 我们推测, 有氧运动诱导的左室生理性重塑与病理性重塑在心衰大鼠运动康复过程中同时存在并相互抗衡, 最终前者的良性作用逆转了后者的负面效应, 表现为左室由病理性肥大向生理性肥大转变, 心功能改善、运动能力提高。因此, 激活心脏 PI3K-Akt 并抑制 CaN-NFAT 信号通路是治疗心衰的崭新思路, 同时也是运动防治心衰的干预靶点。

综上所述, 可得到如下结论:

1)心衰时心脏出现病理性肥大, 心功能和运动耐力降低, 其机制与 CaN-NFAT 信号通路活化引起胚胎基因重新激活、收缩蛋白表达下调、心肌纤维化和细胞凋亡, 进而造成左室重塑有关。

2)长期有氧运动促使心衰大鼠心脏由病理性肥大向生理性肥大转变, 左室重塑得到逆转, 心功能和运动耐力改善, 其机制与运动抑制 CaN-NFAT 信号通路并激活 PI3K-Akt 信号途径进而下调胚胎基因表达、上调收缩蛋白表达、减轻心肌纤维化和抑制细胞凋亡有关。

参考文献:

- [1] Rodriguez F H, Marelli A J. The epidemiology of heart failure in adults with congenital heart disease[J]. Heart Fail Clin, 2014, 10(1): 1-7.
- [2] Schwarz S, Halle M. Exercise training in heart failure patients[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2014, 139(16): 845-850.
- [3] Brum P C, Bacurau A V, Cunha T F, et al. Skeletal myopathy in heart failure: effects of aerobic exercise

- training[J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(4): 616-620.
- [4] Hildick D J, Shapiro L M. Echocardiographic differentiation of pathological and physiological left ventricular hypertrophy[J]. *Heart*, 2001, 85(6): 615-619.
- [5] 刘冠楠, 陈钢. 运动性与病理性心脏肥大[J]. *沈阳体育学院学报*, 2014, 33(2): 90-96.
- [6] 周义义, 李晓霞. 运动对慢性心力衰竭大鼠心脏交感神经功能的调节——去甲肾上腺素转运蛋白的作用[J]. *体育科学*, 2012, 32(3): 67-73.
- [7] 耿阳, 刘学刚. 建立动物心衰模型的方法及意义[J]. *中华全科医学*, 2014, 12(2): 282-285.
- [8] Lumens J, Ploux S, Strik M, et al. Comparative electromechanical and hemodynamic effects of left ventricular and biventricular pacing in dyssynchronous heart failure: electrical resynchronization versus left-right ventricular interaction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(25): 2395-2403.
- [9] Ismail H, McFarlane J R, Dieberg G, et al. Exercise training program characteristics and magnitude of change in functional capacity of heart failure patients[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 171(1): 62-65.
- [10] Ljubojevic S, Radulovic S, Leitinger G, et al. Early remodeling of perinuclear Ca^{2+} stores and nucleoplasmic Ca^{2+} signaling during the development of hypertrophy and heart failure[J]. *Circulation*, 2014, 130(3): 244-255.
- [11] Lewis E J, McKillop A, Banks L. The morganroth hypothesis revisited: endurance exercise elicits eccentric hypertrophy of the heart[J]. *J Physiol*, 2012, 590(Pt 12): 2833-2834.
- [12] Balakumar P, Jagadeesh G. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared?[J]. *Pharmacol Res*, 2010, 62(5): 365-383.
- [13] Riehle C, Wende A R, Zhu Y, et al. Insulin receptor substrates are essential for the bioenergetic and hypertrophic response of the heart to exercise training[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(18): 3450-3460.
- [14] Ding W, Dong M, Deng J, et al. Polydatin attenuates cardiac hypertrophy through modulation of cardiac Ca^{2+} handling and calcineurin-NFAT signaling pathway[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(5): H792-802.
- [15] Chen Q Q, Zhang W, Chen X F, et al. Electrical field stimulation induces cardiac fibroblast proliferation through the calcineurin-NFAT pathway[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(12): 1611-1622.
- [16] Kreusser M M, Lehmann L H, Keranov S, et al. Cardiac CaM kinase II genes delta and gamma contribute to adverse remodeling but redundantly inhibit calcineurin-induced myocardial hypertrophy[J]. *Circulation*, 2014, 130(15): 1262-1273.
- [17] Sun X, Gu J, Chi M, et al. Activation of PI3K-Akt through taurine is critical for propofol to protect rat cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(2): 155-161.
- [18] McMullen J R, Shioi T, Zhang L, et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(21): 12355-12360.
- [19] Lu Z, Jiang Y P, Wang W, et al. Loss of cardiac phosphoinositide 3-kinase p110 alpha results in contractile dysfunction[J]. *Circulation*, 2009, 120(4): 318-325.
- [20] Lin R C, Weeks K L, Gao X M, et al. PI3K(p110 alpha) protects against myocardial infarction-induced heart failure: identification of PI3K-regulated miRNA and mRNA[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(4): 724-732.
- [21] Ong S B, Hall A R, Dongworth R K, et al. Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology[J]. *Thromb Haemost*, 2014, 113(1): 367-370.
- [22] Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease[J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 549-564.
- [23] Volkers M, Toko H, Doroudgar S, et al. Pathological hypertrophy amelioration by PRAS40-mediated inhibition of mTORC1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(31): 12661-12666.
- [24] Rigor D L, Bodyak N, Bae S, et al. Phosphoinositide 3-kinase Akt signaling pathway interacts with protein kinase Cbeta2 in the regulation of physiologic developmental hypertrophy and heart function[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(3): H566-572.