

·基础研究·

CaMK II δ 在有氧运动调控高血压心肌细胞凋亡中的作用*

张浴尘¹ 石丽君¹ 吴迎^{1,2}

摘要

目的:探讨 II 型钙/钙调素依赖性蛋白激酶 δ 亚型 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ , CaMK II δ) 在有氧运动调控自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡中的作用。

方法:雄性 12 周龄自发性高血压大鼠和 Wistar-Kyoto 大鼠,随机分为正常安静组(WKY-SED)、正常有氧运动组(WKY-EX)、高血压安静组(SHR-SED)、高血压有氧运动组(SHR-EX)。经 12 周中等强度跑台运动(坡度 0°, 20m/min, 60min/d, 5d/w)后,测定大鼠尾动脉血压;Millar 压力-容积系统测定在体心功能;Masson 染色分析心肌胶原容积分数(CVF%);caspase 3 活性检测与 TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡;Western Blot 检测 CaMK II δ 、ox-CaMK II δ 、I κ B α 、NF- κ B P65、HSP70、Bax、Bcl-2 的蛋白表达。

结果:12 周有氧运动后,SHR-EX 组较 SHR-SED 组心率、血压显著降低($P<0.05$),心功能左室压力最大上升速率(+dp/dt_{max})、射血分数(EF)与收缩末期压力-容积关系曲线(ESPVR)斜率(Ees)显著升高($P<0.05$),心室压力最大下降速率(-dp/dt_{max})的绝对值与每搏输出量(SV)显著升高($P<0.01$),收缩末期压力(ESP)、舒张末期压力(EDP)与有效动脉弹性(Ea)显著下降($P<0.01$),等容舒张常数(Tau)显著降低($P<0.05$)。Masson 染色结果显示 SHR-EX 组心肌组织纤维化减少,CVF %显著降低($P<0.01$)。WKY-EX 组较 WKY-SED 组 caspase 3 显著下降($P<0.05$)。SHR-EX 组较 SHR-SED 组 caspase 3 显著降低($P<0.05$),TUNEL 阳性颗粒数量显著降低($P<0.01$)。Western Blot 结果显示 WKY-EX 组较 WKY-SED 组 NF- κ B P65 与 Bax 的蛋白表达、Bax/Bcl-2 比值显著下降($P<0.05$),I κ B α 与 HSP70 蛋白表达显著升高($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达显著上升($P<0.05$);SHR-EX 组较 SHR-SED 组 ox-CaMK II δ 、NF- κ B P65 与 Bax 蛋白表达显著降低($P<0.05$),Bax/Bcl-2 比值显著降低($P<0.01$),I κ B α 与 Bcl-2 蛋白表达显著上升($P<0.05$),HSP70 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。

结论:有氧运动通过下调 SHR 心肌 ox-CaMK II δ 抑制心肌细胞凋亡,同时激活抗凋亡相关信号通路改善心功能,可能是运动诱导高血压心脏重塑的机制之一。

关键词 有氧运动;钙/钙调素依赖性蛋白激酶 δ 亚型;高血压;心肌细胞;凋亡

中图分类号:R544,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-07-0872-10

Role of CaMK II δ in the regulation of cardiomyocyte apoptosis in hypertension induced by aerobic exercise/ZHANG Yuchen, SHI Lijun, WU Ying/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(7): 872—881

Abstract

Objective: To explore the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ (CaMK II δ) in the regulation of cardiomyocyte apoptosis in spontaneous hypertensive rat (SHR) by aerobic exercise.

Method: 12-week-old male SHR and WKY rats were randomly divided into normal control group (WKY-SED), normal aerobic exercise group (WKY-EX), hypertensive control group (SHR-SED) and hypertensive aerobic exercise group (SHR-EX). After 12 weeks of treadmill running (slope 0°, 20m/min, 60min/d, 5d/w),

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.07.002

*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,北京市,100084; 2 通讯作者

第一作者简介:张浴尘,女,硕士研究生;收稿日期:2022-01-15

the blood pressure of the tail artery was measured. The Millar pressure-volume system was used to measure the heart function of the rats in vivo. Analysis of myocardial collagen volume fraction was made by Masson staining. Detection of caspase 3 activity and TUNEL staining were used to observe the apoptosis of cardiac myocytes. Western Blot was used to measure the protein expression of CaMKII δ , ox-CaMKII δ , I κ B α , NF- κ B P65, HSP70, Bax and Bcl-2 in rat myocardial tissue.

Result: After 12 weeks of aerobic exercise, the heart rate and blood pressure in the SHR-EX group were significantly lower than those in the SHR-SED group ($P<0.05$). Compared with the SHR-SED group, the maximum rising rate of left ventricular pressure(+dp/dtmax), ejection fraction (EF) and slope Ees of end-systolic pressure-volume relationship curve(ESPVR) in the SHR-EX group were significantly increased ($P<0.05$), and the absolute value of the maximum decreasing rate of ventricular pressure(-dp/dtmax) and stroke volume (SV) were significantly increased ($P<0.01$); ventricular end-systolic pressure (ESP), end-diastolic pressure (EDP) and effective arterial elasticity (Ea) were significantly decreased ($P<0.01$); isovolumic diastolic constant (Tau) was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the SHR-SED group, the myocardial tissue fibrosis in the SHR-EX group was reduced, and the CVF% decreased significantly ($P<0.01$). Compared with WKY-SED group, the number of myocardial caspase 3 in WKY-EX group decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the SHR-SED group, the number of myocardial caspase 3 in the SHR-EX group was significantly reduced ($P<0.05$), and the number of TUNEL-positive particles was significantly reduced ($P<0.01$). The results of Western Blot showed that the expressions of NF- κ B P65 and Bax protein and the ratio of Bax/Bcl-2 in the WKY-EX group were significantly lower than those in the WKY-SED group ($P<0.05$), while the expressions of I κ B α and HSP70 protein were significantly increased ($P<0.01$). The expression of Bcl-2 protein increased significantly ($P<0.05$). Compared with the SHR-SED group, the expressions of ox-CaMKII δ , NF- κ B P65 and Bax protein in the SHR-EX group were significantly decreased ($P<0.05$). The ratio of Bax/Bcl-2 was significantly decreased ($P<0.01$). The expressions of I κ B α and Bcl-2 protein were significantly increased ($P<0.05$), and the expression of HSP70 protein was significantly increased ($P<0.01$).

Conclusion: Aerobic exercise inhibits cardiomyocyte apoptosis by down-regulating SHR myocardium ox-CaMKII δ , while activating anti-apoptosis-related signal pathways, thus improves cardiac function, which may be one of the mechanisms of exercise-induced heart remodeling in hypertension.

Author's address Beijing Sports University, Beijing, 100084

Key word aerobic exercise;calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ ;hypertension;cardiomyocytes;apoptosis

国家心血管病中心发布的《中国心血管病报告2018》显示,高血压是全球负担最重的疾病之一,也是我国面临的重要公共卫生问题,而原发性高血压又是高血压中发病率最高的,且呈上升趋势^[1]。长期高血压将导致心脏重构,出现病理性心肌肥大、心肌纤维化增多及心衰等。如能合理干预高血压心脏重构的发生,将有效降低高心病的致残和致死率。心肌细胞凋亡是高血压性心脏病(hypertensive heart disease, HHD)发生发展的重要诱因^[2]。近年来,越来越多的研究关注于通过抑制心肌细胞凋亡改善高血压性心脏病的发生发展。

大量研究证实,高血压可导致心肌活性氧(reactive oxygen species, ROS)增加^[3-4]。ROS的关键

下游信号之一是II型钙/钙调素依赖性蛋白激酶(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II),其 δ 亚型(CaMK II δ)在心脏病理性重构中扮演了重要角色^[5],并在诱发心肌细胞凋亡过程中发挥着核心作用^[6]。健康大鼠过表达CaMK II δ 将导致病理性心肌肥大,而CaMK II δ 基因敲除可减轻主动脉缩窄引起的病理性心肌肥大和纤维化,抑制心室扩张,改善心功能^[7],这提示CaMK II δ 可能是介导高血压心肌病理性变化的关键因子。

运动作为治疗或预防心血管疾病的重要干预手段之一,其机制远未明了。规律的有氧运动可降低高血压心肌ROS水平,改善心功能^[8-9],相关分子机制有待深入研究。因此,本研究围绕CaMK II δ 展

开,探讨其在有氧运动改善高血压心肌细胞凋亡中的作用,以期在有氧运动联合药物治疗高血压性心脏病的相关靶点筛选提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型与分组

SPF级3月龄雄性自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat, SHR)和Wistar-Kyoto大鼠(Wistar Kyoto rat, WKY)购自北京维通利华公司;随机将其分为正常安静对照组(WKY-SED)、正常有氧运动组(WKY-EX)、高血压安静组(SHR-SED)和高血压有氧运动组(SHR-EX),每组各12只。大鼠自由饮食,环境温度(22±1)°C,相对湿度45%—65%。动物实验研究内容及研究方法通过北京体育大学运动科学实验伦理委员会(BSU IRB)批准,伦理编号:2019036A。

运动组大鼠经适应性训练1周后,进行12周中等强度有氧运动训练,运动方案:跑台运动,坡度0°,20m/min,60min/天,5天/周,55%—65%VO_{2max}。

1.2 大鼠无创尾动脉血压测定

采用小动物血压监测仪(BP-2010A)测定大鼠尾动脉血压。连接仪器压力传感器,接通电源,保温筒温度设置为34°C,预热仪器。鼠笼固定大鼠,传感器置于大鼠鼠尾根部,对大鼠尾部进行加压阻断,测量尾动脉血压与心率。

1.3 大鼠在体心功能测定:左心室压力容积测定

采用AD Instruments与Millar压力容积系统测定大鼠在体心功能。大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,50mg/kg,置于加热板上保温,剪去大鼠颈部毛发,划开皮肤分离出左颈静脉与右颈总动脉。剪开右颈总动脉,将SPR-838导管插入动脉中,快速推导管逆流进入心脏,记录心脏压力容积环。3次25%高渗盐水校准后,开大鼠腹腔进行下腔静脉阻断,记录收缩末期压力-容积关系曲线(end-systolic pressure-volume relationship, ESPVR)。取血进行定标管定标。

1.4 Masson染色

大鼠麻醉后开胸取心脏,称取心脏重量(heart weight, HW);剪去左右心房与右室游离壁,称取左心室重量(left ventricular weight, LVW),计算LVW

与HW之比即为左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)。心脏置于4%多聚甲醛固定液中固定24h,常规石蜡包埋,横切心肌组织,切片厚5μm。进行Masson染色。经脱蜡、水化、染色、脱水、透明、封片等步骤后在镜下拍照。Image-ProPlus软件分析测定心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF%)。

1.5 caspase 3活性测定

采用碧云天caspase 3活性检测试剂盒(C1116)测定大鼠心肌组织中的caspase 3活性。左心室组织加入液氮研磨至粉末状,按10mg:100μl加入裂解液,混匀冰浴静置裂解5min,4°C,16000g,离心15min。取蛋白上清Bradford法测定蛋白浓度。设置反应体系,检测缓冲液与待测蛋白上清样品中各加入10μl Ac-DEVD-pNA(2mM),37°C孵育60min。酶标仪测定A405。计算不同蛋白上清中含有的不同酶活力单位的caspase 3。

1.6 TUNEL染色

采用碧云天一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(C1088)检测心肌组织细胞凋亡。石蜡切片脱蜡至水,滴加20μg/ml不含DNase的蛋白酶K 36°C作用25min,PBS洗涤5次,滴加TUNEL检测液,37°C避光孵育60min,PBS洗涤3次,抗荧光淬灭封片液封片后用激光共聚焦系统进行观察。激发波长范围为450—500nm,发射波长范围为515—565nm(绿色荧光)。

1.7 Western Blot

大鼠左心室组织加入液氮研磨至粉末状,按100mg:1ml加入RIPA裂解液,混匀冰浴静置20min。4°C,12000r/min,离心15min。提取蛋白上清BCA测定蛋白浓度。常规制样、电泳、转膜、BSA封闭2h,加入5%BSA稀释的一抗(GAPDH 1:1000, CaMK II δ 1:1000, ox-CaMK II δ 1:1000, NF-κB P65 1:2000, IκBα 1:500, HSP70 1:2000, Bcl-2 1:500, Bax 1:2000),4°C孵育过夜。TBST洗涤3次,孵育二抗1h, TBST洗涤3次。免疫蛋白活性由化学发光法检测,用ImageLab™软件进行半定量分析。

1.8 统计学分析

数据表示为均数±标准误,统计学分析采用SPSS 17.0统计软件进行双因素方差分析(two-way ANOVA, 高血压×运动),同一组12周前后比较采用

配对样本 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 有氧运动降低高血压大鼠血压与心率

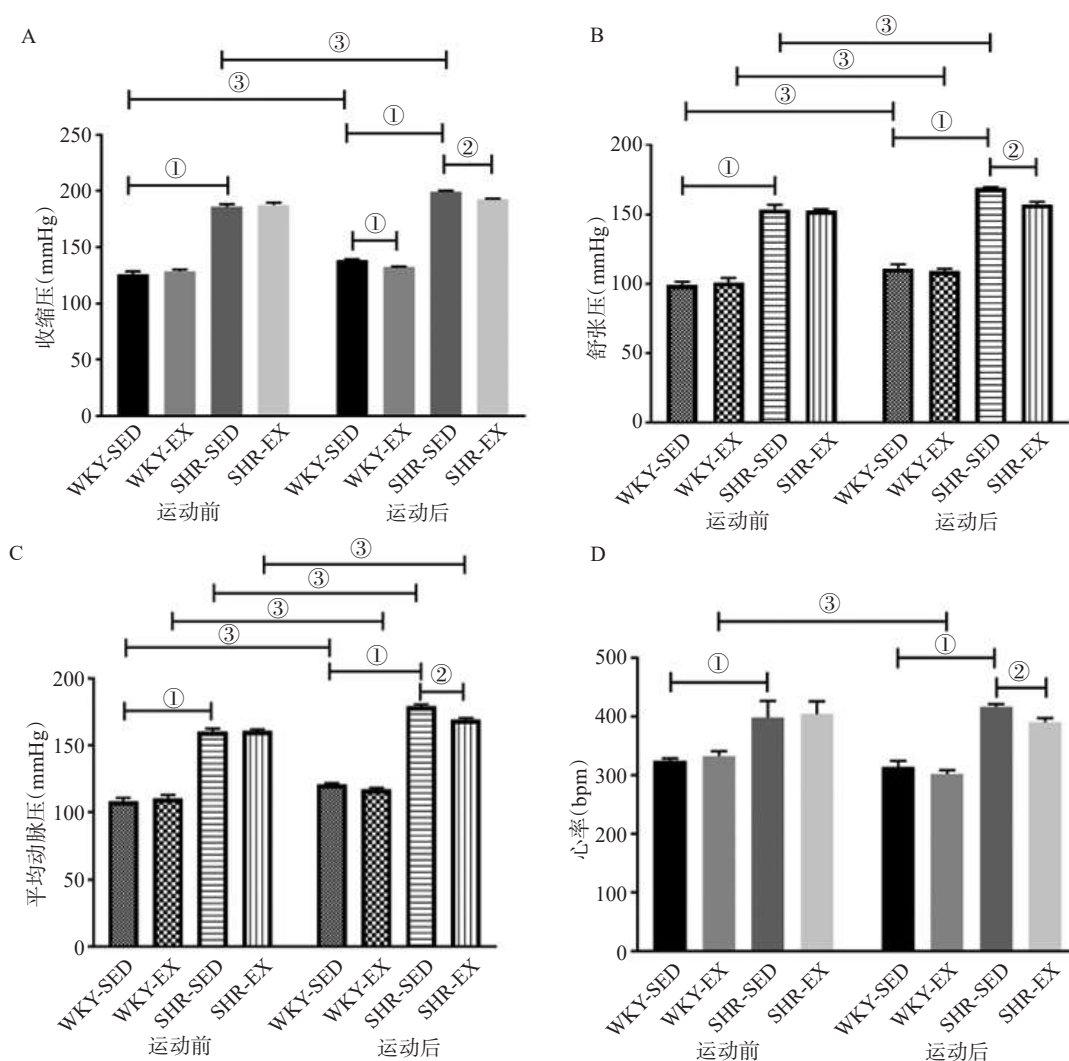
大鼠尾动脉无创血压测得运动前 SHR-SED 组收缩压、舒张压、平均动脉压和心率均明显高于 WKY-SED 组 ($P<0.05$) (图 1)。12 周后, WKY-SED 组与 SHR-SED 组大鼠的收缩压、舒张压、平均动脉压均比 12 周前显著上升 ($P<0.05$); WKY-EX 组舒张压和平均动脉压比 12 周前显著上升 ($P<0.05$), 心率则比 12 周前明显降低 ($P<0.05$); SHR-EX 组大鼠平

均动脉压比 12 周前显著上升 ($P<0.05$)。12 周有氧运动后, SHR-SED 组大鼠的血压和心率仍高于 WKY-SED 组 ($P<0.05$)。与 WKY-SED 组相比, WKY-EX 组大鼠的收缩压明显下降 ($P<0.05$); 与 SHR-SED 组相比, SHR-EX 组大鼠的血压和心率均显著下降 ($P<0.05$), 说明有氧运动可以在一定程度上有效降低正常大鼠收缩压以及高血压大鼠的血压与心率。

2.2 有氧运动对大鼠体重与心脏形态的影响

12 周有氧运动后, WKY-EX 组大鼠比 WKY-SED 组体重显著减少 ($P<0.01$), SHR-EX 组大鼠体重低于 SHR-SED 组 ($P<0.05$), 说明有氧运动可以降

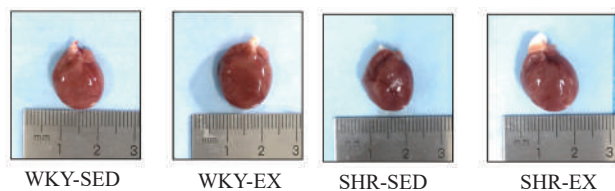
图 1 12 周有氧运动对大鼠血压心率的影响



注: A、B、C、D 图分别为四组大鼠 12 周运动前和 12 周运动后收缩压、舒张压、平均动脉压与心率统计图。① $P<0.05$ 与 12 周后 WKY-SED 组相比; ② $P<0.05$ 与 12 周后 SHR-SED 组相比; ③ $P<0.05$ 与 12 周前自身比较。

低运动组大鼠体重。与WKY-SED组相比,WKY-EX组大鼠心脏重量与左心室重量显著上升($P<0.05$);SHR-SED组与WKY-SED组相比,心脏重量也显著增大($P<0.05$),左心室重量、心脏重量/体重比值与左心室质量指数也显著增加($P<0.01$)。而与SHR-SED组相比,SHR-EX组心脏重量与左心室重量显著性上升($P<0.01$),心重/体重比值也进一步升高($P<0.05$)(图2及表1),说明中等强度的有氧运动能引起心肌肥大。

图2 12周有氧运动后大鼠心脏整体形态图

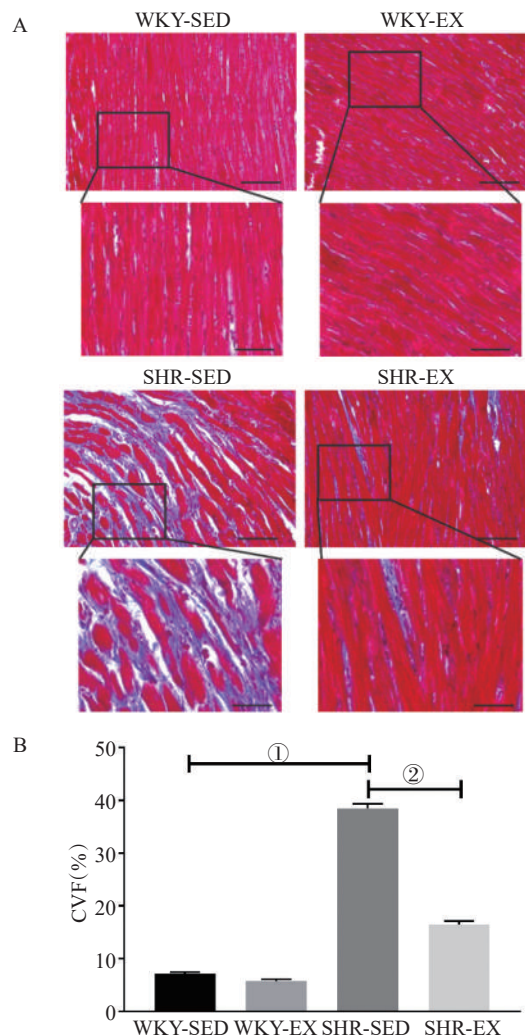


Masson染色结果显示,光镜下,心肌细胞核呈棕褐色至黑色,心肌细胞胞质呈品红色至粉红色,胶原纤维呈蓝紫色,红细胞呈正红色。与WKY-SED组比较,SHR-SED组胶原纤维过度增生,心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF%)显著增加($P<0.01$);与SHR-SED组比较,SHR-EX组心肌组织纤维化有所减少,CVF%显著降低($P<0.01$)(图3),说明有氧运动可以改善高血压引起的心肌纤维化。

2.3 有氧运动改善大鼠心功能

大鼠在体心脏压力-容积实验测试结果得出:与WKY-SED组相比,WKY-EX组心功能左室压力最大上升速率(maximal left ventricular pressure rising rate, $+dp/dt_{max}$)、心室压力最大下降速率($-dp/dt_{max}$)的绝对值、每搏输出量(stroke volume, SV)、射血分数(ejection fraction, EF)与收缩末期压力-容积关系曲线(ESPVR)斜率(Ees)显著性增高($P<0.05$),收缩末期压力(end systolic pressure, ESP)

图3 12周有氧运动对大鼠心肌纤维化的影响



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

显著下降($P<0.05$)。与WKY-SED组相比,SHR-SED组大鼠心功能 $+dp/dt_{max}$ 、 $-dp/dt_{max}$ 绝对值、SV、EF与Ees显著下降($P<0.01$),ESP、舒张末期压力(end diastolic pressure, EDP)与等容舒张常数(Tau)均显著性上升($P<0.01$),有效动脉弹性(arterial elas-

表1 12周有氧运动对大鼠心脏肥大指数的影响

($\bar{x}\pm s$)

项目	WKY-SED (n=12)	WKY-EX (n=12)	SHR-SED (n=12)	SHR-EX (n=12)
BW(g)	362.3±2.8	338.4±6.0 ^②	352.0±3.4	333.4±5.3 ^③
HW(mg)	1276.52±20.37	1379.43±26.55 ^①	1369.90±31.97 ^①	1484.65±26.49 ^④
LVW(mg)	896.05±18.47	972.41±26.39 ^①	1032.87±29.53 ^②	1180.87±22.27 ^④
HW(mg)/BW(g)	3.59±0.08	3.76±0.07	4.10±0.09 ^②	4.39±0.10 ^③
LVW/HW	0.707±0.009	0.706±0.009	0.757±0.010 ^②	0.758±0.009

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

tance, Ea)明显升高($P<0.05$)。经过12周中等强度有氧运动后,SHR-EX组大鼠与SHR-SED组大鼠相比较,心功能 $+dp/dt_{\max}$ 、EF与Ees明显升高($P<0.05$), $-dp/dt_{\max}$ 绝对值与SV显著性上升($P<0.01$);ESP、EDP与Ea显著下降($P<0.01$),Tau也显著降低($P<0.05$)(表2及图4),说明有氧运动可以降低高血压大鼠心脏后负荷(ESP、Ea),改善心脏泵血功能(SV、EF)、收缩功能($+dp/dt_{\max}$ 、Ees)和舒张功能($-dp/dt_{\max}$ 、EDP、Tau)。

2.4 有氧运动改善大鼠心肌细胞凋亡

根据caspase 3活性检测与TUNEL免疫荧光染色结果显示,与WKY-SED组相比,WKY-EX组大鼠心肌caspase 3显著性下降($P<0.05$);SHR-SED组大鼠心肌caspase 3则显著增加($P<0.05$),TUNEL阳性颗粒显著增加($P<0.01$)。与SHR-SED组相比,SHR-EX组大鼠心肌caspase 3显著性降低($P<0.05$),SHR-EX组阳性颗粒显著减少($P<0.01$),说明有氧运动可以减少高血压引起的心肌细胞凋亡(图5)。

2.5 有氧运动对大鼠心肌CaMK II δ 相关凋亡蛋白表达的影响

免疫印迹 Western Blot实验检测结果显示,四组大鼠心肌内CaMK II δ 蛋白含量无显著性差异(图6)。与WKY-SED组比较,WKY-EX组大鼠心肌促凋亡蛋白NF- κ B P65与Bax的表达、Bax/Bcl-2比值显著下降($P<0.05$),抗凋亡蛋白I κ B α 与HSP70表达显著性升高($P<0.01$),抗凋亡蛋白Bcl-2表达明显上升($P<0.05$)。SHR-SED组与WKY-SED组相比,大鼠心肌ox-CaMK II δ 蛋白表达显著增多($P<0.01$);促凋亡蛋白NF- κ B P65与Bax表达显著增加($P<0.05$),Bax/Bcl-2比值显著性升高($P<0.01$);抗凋亡蛋白I κ B α 与Bcl-2表达显著降低($P<0.01$),抗凋亡蛋白HSP70表达显著降低($P<0.05$)。SHR-EX组比SHR-SED组大鼠心肌ox-CaMK II δ 蛋白表达显著性下降($P<0.05$);促凋亡蛋白NF- κ B P65与Bax蛋白显著性降低($P<0.05$),Bax/Bcl-2比值显著性降低($P<0.01$);抗凋亡蛋白I κ B α 与Bcl-2蛋白表达显著性上升($P<0.05$),抗凋亡蛋白HSP70表达显著升高($P<0.01$)。说明有氧运动可以抑制高血压大鼠心肌细胞内CaMK II δ 蛋白的氧化,抑制大鼠心肌细胞内NF- κ B P65与Bax促凋亡蛋白的表达,增加I κ B α 、

图4 12周有氧运动对大鼠心功能压力容积环(PV Loop)与ESPVR的影响

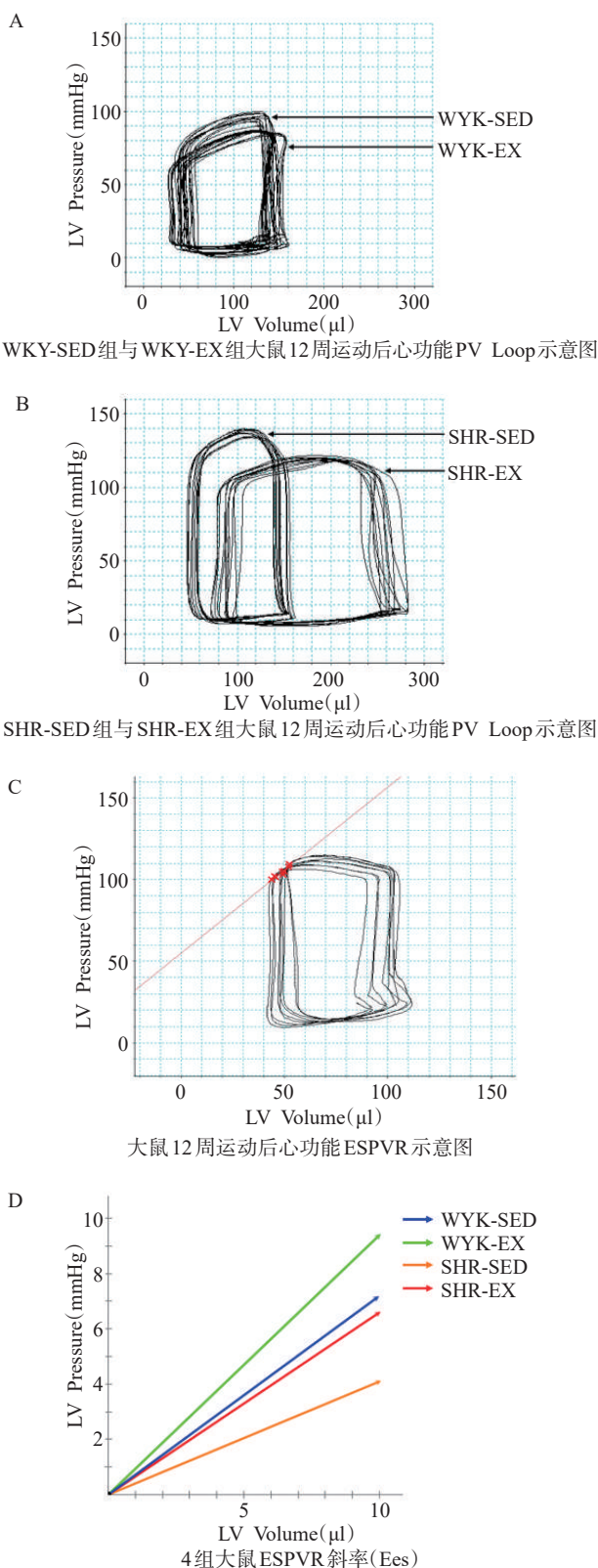


表2 12周有氧运动对大鼠心功能的影响

($\bar{x} \pm SEM$)

项目	WKY-SED (n=6)	WKY-EX (n=6)	SHR-SED (n=6)	SHR-EX (n=6)
心率(bpm)	322.73±3.61	296.17±10.61 ^①	402.25±4.36 ^②	381.25±5.88 ^③
+dp/dt _{max} (mmHg/s)	5290.67±119.41	5980.33±141.54 ^①	4246.00±283.15 ^②	4902.00±160.79 ^③
- dp/dt _{max} (mmHg/s)	- 4976.00±151.05	- 5439.83±176.57 ^①	- 4100.33±120.23 ^②	- 4700.50±101.48 ^④
ESP(mmHg)	86.75±4.74	76.17±4.84 ^①	121.97±1.78 ^②	99.36±1.40 ^④
EDP(mmHg)	5.79±0.70	3.72±0.62	13.58±0.93 ^②	9.52±1.06 ^④
SV(μl)	110.72±2.25	118.93±2.29 ^①	100.73±2.31 ^②	179.75±2.68 ^④
EF(%)	72.69±1.31	78.65±1.64 ^①	57.46±1.99 ^②	64.01±2.19 ^③
Ees(mmHg/μl)	0.72±0.07	0.94±0.06 ^①	0.41±0.04 ^②	0.66±0.10 ^③
Ea(mmHg/μl)	0.77±0.03	0.66±0.06	0.97±0.08 ^①	0.66±0.05 ^④
Tau(ms)	11.71±0.59	10.34±0.55	15.97±0.38 ^②	13.98±0.44 ^③

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

HSP70与Bcl-2抗凋亡蛋白的表达。

3 讨论

3.1 有氧运动改善高血压大鼠心脏形态与心功能

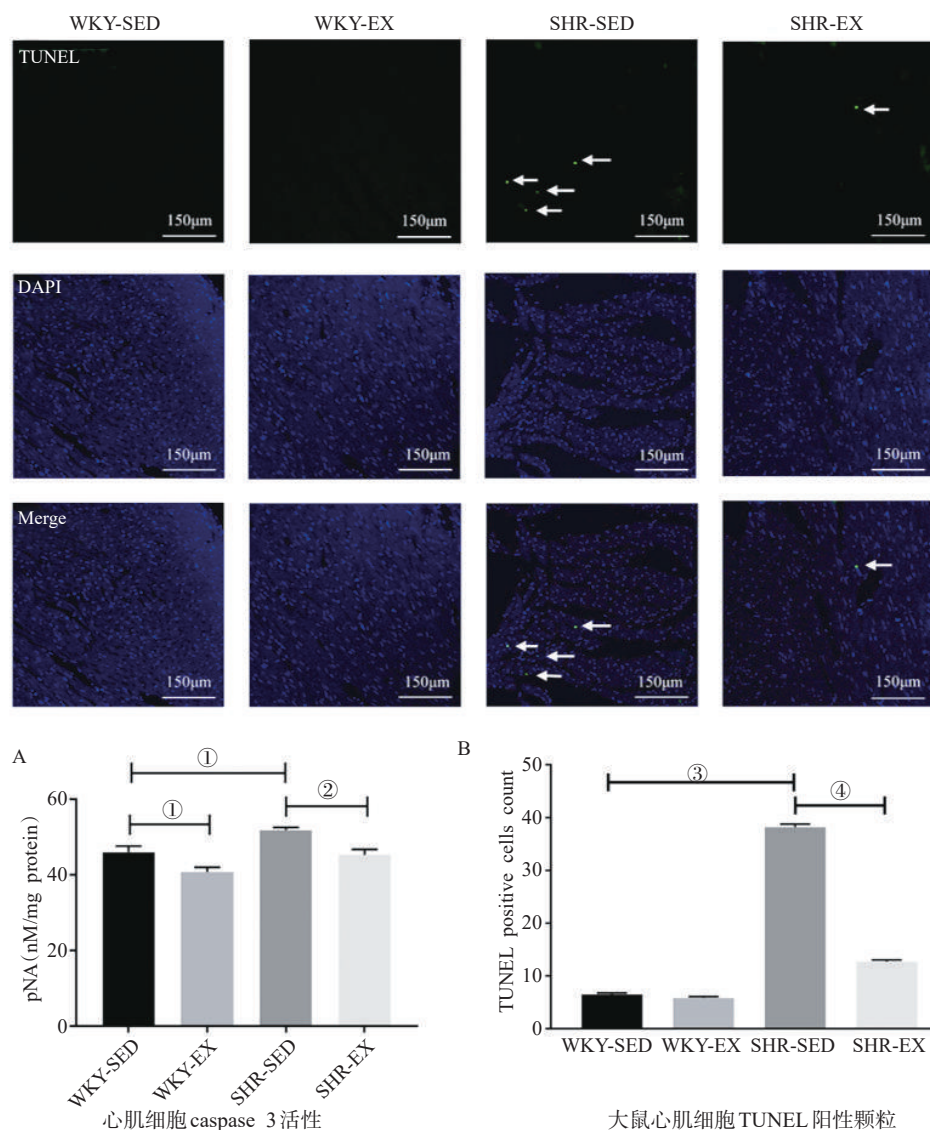
高血压的病理特征是动脉血压较正常范围明显上升,伴有代谢紊乱和重要靶器官结构功能的病理性改变,主要以原发性高血压为主。原发性高血压由遗传基因的先天因素或不良的环境因素诱发,目前仍然难以诊断明确其病因。因此,为了能靶向治疗高血压,研究其发病机制显得十分重要。越来越多的证据支持生活方式的改变,尤其是运动锻炼,可以预防和辅助治疗高血压。运动本身对降低高血压患者的血压和降低患高血压风险有明显益处,而如果能结合体重的减轻,则可能会最大限度地发挥这些益处^[10]。本实验研究结果发现,12周规律的中等强度有氧运动降低了自发性高血压大鼠的体重和血压,表明该非药物的干预手段对高血压的治疗起着良好的作用。除此之外,有氧运动不仅可以降低WKY运动组大鼠的心率,产生良好的运动性心动徐缓,而且可以降低高血压大鼠的心率。研究显示,有氧运动可以降低心率4.94次/分,增加心率储备,改善高血压患者交感迷走神经平衡^[11]。因此,有氧运动降低高血压患者的心率是非常有意义的结果。

随着高血压病情的进展,心脏作为高血压疾病最为重要的靶器官之一,出现明显的结构和功能改变。心脏受高血压的影响最初会出现代偿性肥大,以应对高血压造成的长期的高压力负荷,心肌细胞逐渐增大,心室壁明显增厚,心室容积保持不变或有所减小,出现向心性心脏肥大,心脏重量增加。若高血压的病情没有得到有效控制,压力负荷持续增加,心脏的代偿性改变最终会向着失代偿发展,心腔容

积增大,心室壁变薄,出现离心性肥大,促进心肌细胞凋亡和心力衰竭的发展。本实验研究结果表明,12周规律有氧运动后,WKY大鼠运动组出现运动性心脏肥大;而SHR大鼠安静组也出现心脏重量增加的现象,这表明SHR大鼠作为研究自发性高血压的模型非常成功,在6月龄时SHR大鼠高血压性心脏病的病理变化十分明显,心脏重量显著增加。经过12周运动后,SHR运动组大鼠体重降低,心脏重量却进一步增加,与Garciaarena^[12]、Fernandes^[13]等研究结果一致,提示有氧运动干预对高血压性心脏病有明显作用,可能介导高血压大鼠心脏由病理性心脏肥大向运动引起的生理性肥大转变,但仍需进一步证实。

心室压力与容量的关系是公认的评估完整心脏功能的最优方法之一,是评价心室功能的金标准^[14]。SHR大鼠在8周龄时即出现心脏收缩功能的下降,12周龄开始出现舒张功能障碍^[15]。本实验选用12周龄的自发性高血压大鼠,以期能在早期延缓和改善高心病的发生发展。12周有氧运动后SHR运动组大鼠+dp/dt_{max}升高,说明有氧运动可以有效改善SHR大鼠心脏收缩功能。压力容积环(PV Loop)在体心功能测试实验中给予下腔静脉阻断,会改变心肌受到的前负荷,心肌在前负荷变化过程中的多个心动周期连成的线性曲线为收缩末期压力-容积关系曲线(ESPVR)。ESPVR的斜率(Ees)表示收缩末期的弹性,它反映心室收缩的能力。本研究结果显示,12周运动干预后,SHR安静组大鼠的Ees值最小,表明高血压损害了心脏靶器官的收缩能力,SHR运动组大鼠的Ees值则升高,表明长期规律有氧运动改善了高血压心脏收缩功能。有氧运动同时降低WKY大鼠运动组和SHR大鼠运动组ESP、EDP、Ea与Tau值,增高-dp/dt_{max}的绝对值,表明有氧

图5 12周有氧运动对大鼠心肌细胞凋亡的影响



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

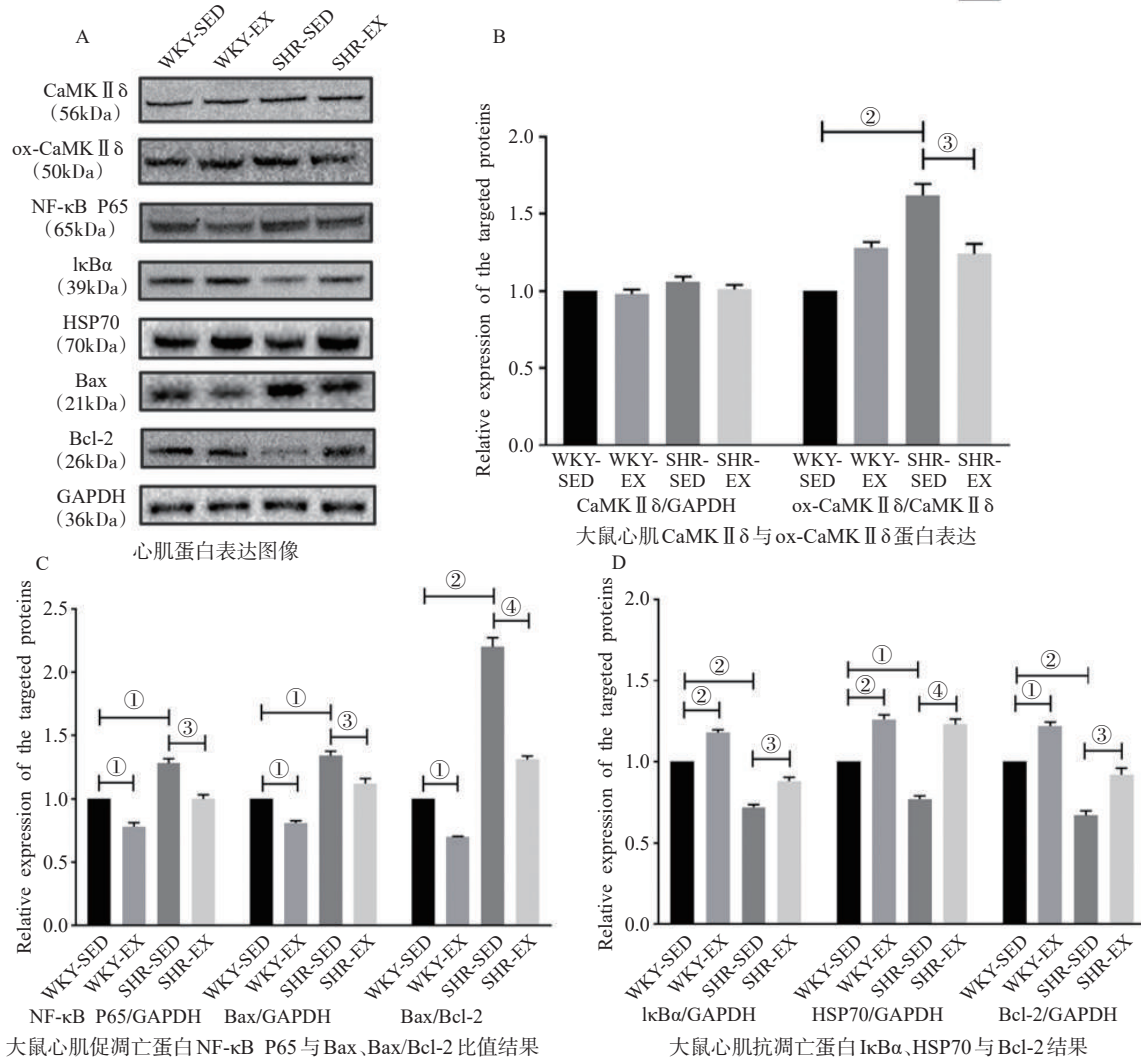
运动可以降低心脏后负荷,改善高血压大鼠心脏舒张特性。结合本研究形态学结果,有氧运动诱导了高血压大鼠心脏的良性重构。

3.2 有氧运动调控CaMK II δ 改善高血压大鼠心肌细胞凋亡

心肌细胞为几乎不可再生的已分化细胞,因此,改善高血压心肌细胞凋亡已被视为重要的治疗靶标。本研究通过测定caspase 3活性和TUNEL免疫荧光染色证实,12周规律的中等强度有氧运动能明显降低高血压大鼠心肌细胞的异常凋亡,从而减缓

高血压病程的进一步恶化。

高血压诱导过量的ROS产生,进而在心肌细胞中触发一系列凋亡事件^[16]。CaMK II δ 可通过多种ROS的氧化活化(ox-CaMK II δ),NOX2衍生、内质网应激诱导以及线粒体的ROS均能增加ox-CaMK II δ 水平^[6]。抑制任何一条途径去除ROS,均会导致氧化型CaMK II δ 的表达显著降低^[17]。CaMKII的氧化在心肌细胞凋亡中起关键作用^[18]。CaMK II δ 是NF- κ B的上游蛋白激酶,在心肌缺血/再灌注损伤中调节NF- κ B的活化^[19]。NF- κ B活性主要受I κ B α 结

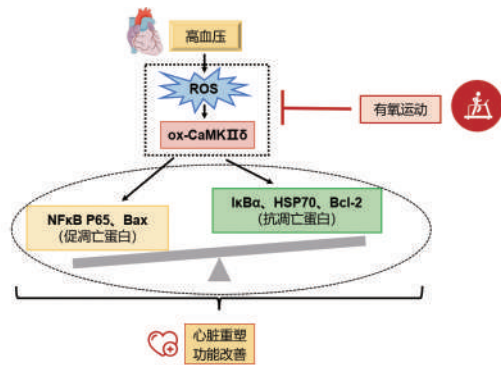
图6 12周有氧运动对大鼠心肌CaMK II δ 相关凋亡蛋白表达的影响

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

合调控,许多慢性疾病病理与NF- κ B和I κ B α 复合体的磷酸化/激活失调有关,因此,抑制I κ B α 防止其磷酸化被视为是一种有效的治疗策略^[20]。促凋亡成员通过破坏膜的完整性直接形成孔道或与线粒体通道蛋白结合来介导细胞凋亡,而抗凋亡蛋白成员则通过干扰促凋亡成员的聚集来保护线粒体膜完整性,控制凋亡膜间蛋白的释放,阻止细胞凋亡^[21]。抗凋亡蛋白(Bcl-2)和促凋亡蛋白(Bax)水平的比值决定心肌细胞在凋亡刺激后的存活或死亡,Bcl-2/Bax比值的降低可能导致心肌细胞凋亡率增加,而抑制促凋亡的Bax可以改善心肌梗死面积和心功能^[22]。本实验研究结果显示,有氧运动干预后可明

显抑制ox-CaMK II δ 在SHR运动组大鼠心肌中的表达,这表明有氧运动可能通过ox-CaMK II δ 途径抑制心肌细胞凋亡。检测心肌组织中I κ B α 与NF- κ B蛋白表达结果显示,有氧运动增加了SHR运动组大鼠心肌组织中I κ B α 的表达,从而抑制了NF- κ B蛋白表达,抑制心肌细胞凋亡的发生。BAX和Bcl-2蛋白结果和比值也可进一步证实有氧运动具有改善高血压心肌细胞凋亡的作用。综上所述,ox-CaMK II δ 在介导有氧运动改善高血压心脏重塑中可能发挥了关键的枢纽作用,其可能通过调节I κ B α -NF κ B信号通路,上调Bcl-2和HSP70表达,抑制心肌细胞凋亡,发挥心脏保护效应(图7)。

图7 CaMK II δ 在有氧运动调控高血压心肌细胞凋亡中的作用及可能机制



4 结论

有氧运动通过下调SHR心肌ox-CaMK II δ 抑制心肌细胞凋亡,同时激活抗凋亡相关信号通路改善心功能,可能是运动诱导高血压心脏重塑的机制之一。

参考文献

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209—220.
- [2] González A, Ravassa S, López B, et al. Apoptosis in hypertensive heart disease: a clinical approach[J]. Curr Opin Cardiol, 2006, 21(4): 288—294.
- [3] Li J, Kemp BA, Howell NL, et al. Metabolic changes in spontaneously hypertensive rat hearts precede cardiac dysfunction and left ventricular hypertrophy[J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(4): e010926.
- [4] Zhang Y, Murugesan P, Huang K, et al. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(3): 170—194.
- [5] Li Q, Qin M, Tan Q, et al. MicroRNA-129-1-3p protects cardiomyocytes from pirarubicin-induced apoptosis by down-regulating the GRIN2D-mediated Ca^{2+} signalling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(3): 2260—2271.
- [6] Feng N, Anderson ME. CaMK II is a nodal signal for multiple programmed cell death pathways in heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 103: 102—109.
- [7] Beckendorf J, van den Hoogenhof MMG, Backs J. Physiological and unappreciated roles of CaMK II in the heart[J]. Basic Res Cardiol, 2018, 113(4): 29.
- [8] de Andrade LH, de Moraes WM, Matsuo Junior EH, et al. Aerobic exercise training improves oxidative stress and ubiquitin proteasome system activity in heart of spontaneously hypertensive rats[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 402(1—2): 193—202.
- [9] Silva SD Jr, Jara ZP, Peres R, et al. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189535.
- [10] Valenzuela PL, Carrera-Bastos P, Gálvez BG, et al. Lifestyle interventions for the prevention and treatment of hypertension[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(4): 251—275.
- [11] Cao L, Li X, Yan P, et al. The effectiveness of aerobic exercise for hypertensive population: A systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Hypertens (Greenwich), 2019, 21(7): 868—876.
- [12] Garciarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy[J]. Hypertension, 2009, 53(4): 708—714.
- [13] Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7)[J]. Hypertension, 2011, 58(2): 182—189.
- [14] Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, et al. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats[J]. Nat Protoc, 2008, 3(9): 1422—1434.
- [15] Kokubo M, Uemura A, Matsubara T, et al. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography[J]. Hypertens Res, 2005, 28(7): 601—609.
- [16] Cheng Y, Shen A, Wu X, et al. Qingda granule attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and apoptosis and modulates the PI3K/AKT pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111022.
- [17] Luo M, Guan X, Luczak ED, et al. Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMK II[J]. J Clin Invest, 2013, 123(3): 1262—1274.
- [18] Erickson JR, Joiner ML, Guan X, et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMK II by methionine oxidation[J]. Cell, 2008, 133(3): 462—474.
- [19] Singh MV, Swaminathan PD, Luczak ED, et al. MyD88 mediated inflammatory signaling leads to CaMK II oxidation, cardiac hypertrophy and death after myocardial infarction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(5): 1135—1144.
- [20] Ben-Neriah Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system[J]. Nat Immunol, 2002, 3(1): 20—26.
- [21] Crow MT, Mani K, Nam YJ, et al. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis[J]. Circ Res, 2004, 95(10): 957—970.
- [22] Hochhauser E, Cheporko Y, Yasovich N, et al. Bax deficiency reduces infarct size and improves long-term function after myocardial infarction[J]. Cell Biochem Biophys, 2007, 47(1): 11—20.