

## 论 著

(运动性心肌损伤的机制及干预研究专题)

## 有氧跑台训练对小鼠左右心肌特定 miRNAs 的影响

张海鹏, 徐琳, 宋彦霖, 徐盛嘉, 杨靖, 马继政, 钟勇

**【摘要】 目的** 有氧训练可导致独特的心脏保护表型,但左右心肌适应存在不同。文章评定 8 周有氧训练对小鼠左右心肌特定 miRNAs 的差异表达,从 miRNAs 参与心肌有氧运动适应的视角揭示 8 周有氧跑台训练对特定 miRNAs 表达水平的影响,为运动训练提供参考依据。**方法** 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 48 只,按体重随机数字分组划分对照组和训练组,每组 24 只。2 组在第 0 周进行跑台预适应及递增负荷测试后,运动组进行 8 周有氧跑台训练,对照组正常饲养不进行跑台训练。记录 2 组小鼠 0~8 周体重变化及第 0、4、8 周力竭速度的变化,在第 8 周递增负荷测试结束 48h 后取左右心肌,利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测肌组织特异 miRNAs 及其他 miRNAs 的变化情况。**结果** 8 周训练后,训练组体重显著下降 ( $P < 0.05$ ),递增负荷测试成绩明显上升 ( $P < 0.05$ );与对照组比较,训练组左心室心肌特异 miR-208b 和 miR-499 的水平显著减小 ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ),分别为对照组的 1.96 倍及 2.59 倍;但在右心室心肌中差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。miR-208a 在小鼠左右心室的心肌中并无显著性改变 ( $P > 0.05$ );与对照组比较,训练组左心室心肌中的 miR-21 与 miR-17-3p 水平显著增加 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ ),分别为对照组的 2.53 倍及 1.13 倍;但 miR-21 与 miR-17-3p 在右心室心肌中的水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。有氧训练不影响这些 miRNAs 在右心室心肌中的表达。**结论** 8 周有氧运动后心肌特定 miRNAs 在左右心室中表达水平并不一致,结构相关的 miRNAs 可能参与调控左室心肌肥大。

**【关键词】** miRNAs; 心肌; 有氧训练; 心脏肥大**【中图分类号】** G804.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)03-0235-05**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.03.003

## Effects of 8-week aerobic treadmill training on specific miRNAs of left and right myocardium in mice

ZHANG Hai-peng<sup>1</sup>, XU Lin<sup>1</sup>, SONG Yan-lin<sup>1</sup>, XU Sheng-jia<sup>2</sup>, YANG Jing<sup>2</sup>, MA Ji-zheng<sup>2</sup>, ZHONG Yong<sup>3</sup>

(1. Department of Exercise and Health, Nanjing Sport Institute, Nanjing 210014, Jiangsu, China; 2. The Research Center of Military Exercise Science, the Army Engineering University of PLA, Nanjing 211101, Jiangsu, China; 3. Department of Health Medicine, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

**【Abstract】 Objective** Aerobic training can lead to a unique cardiac protective phenotype, but there are differences in the adaptation of the left and right myocardium. In this study, the effects of 8 weeks of aerobic training on specific miRNAs in the left and right myocardium of mice were evaluated to provide a reference for exercise training and assessed the differential expression of the effects of specific miRNAs in myocardium. **Methods** A total of 48 8-week-old C57BL/6J male mice were randomly divided into control group and training group according to body weight.

**基金项目:**全军军事类研究生资助课题 (KYJXJQJY2001); 江苏省研究生科研与实践创新计划课题 (KYCX20\_1729); 军委后勤保障部卫生局保健专项课题 (18BJZ13)

**作者单位:** 210014 南京, 南京体育学院运动健康学院 (张海鹏、徐琳、宋彦霖); 211101 南京, 解放军陆军工程大学军事运动科学研究中心 (徐盛嘉、杨靖、马继政); 210002 南京, 东部战区总医院 (原南京军区南京总医院) 健康医学科 (钟勇)

**通信作者:** 钟勇, E-mail: zhongyongnj@163.com

Changes in body weight and exhaustion rate at week 0, 4 and 8 were recorded. Left and right myocardium were collected 48 hours after the incremental load test at week 8, using real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) to detect myocardial certain specific miRNAs and other changes of the miRNAs. After the two groups underwent treadmill pre-adaptation and incremental load tests in week 0, the exercise

group received aerobic treadmill training for 8 weeks, while the control group was given normal diet without treadmill training.

**Results** After 8 weeks of training, the NT group's body weight was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The score of incremental load test was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the CON, the left ventricular myocardial specific miR-208b and miR-499 levels in NT were 1.96 times and 2.59 times more than that in the control group, respectively ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ). But there was no significant difference in the right ventricular myocardium ( $P > 0.05$ ). miR-208a was not significantly changed in the myocardium of the left and right ventricles of mice ( $P > 0.05$ ). The levels of miR-21 and miR-17-3p in the left ventricular myocardium of the NT were 2.53 times and 1.13 times more than that of the control group ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ ). But there was no significant difference in the levels of miR-21 and miR-17-3p in the right ventricular myocardium ( $P > 0.05$ ). Aerobic training did not affect the expression of these miRNAs in the right ventricular myocardium. **Conclusion** After 8 weeks of aerobic exercise, the expression levels of specific miRNAs in myocardium were not consistent in the left and right ventricles, and structure-related miRNAs may be involved in regulating left ventricular myocardial hypertrophy.

**[Key words]** microRNAs; myocardium; aerobic training; cardiac hypertrophy

## 0 引言

合理的体育活动是一种有效的干预措施,可以改善生活质量,并延长预期寿命。目前,广泛认为有氧训练可以诱发独特的心脏保护表型,用来预防和治疗心血管疾病。心血管系统反映出急性和长期运动的明显改变。这些适应变化的核心涉及心血管系统内细胞和分子信号通路变化的协同整合,使组织能够应答运动时人体的需求<sup>[1]</sup>。心脏肥大是机体对有氧运动主要适应之一,可以正常化室壁应力,减少氧气消耗,并增加工作能力,使其存在明显的机械优势<sup>[1]</sup>。因此,认识运动性心肌肥大的适应过程,具有重要的生理意义。

当前,微小 RNA 分子 (micro RNAs, miRNAs) 已经成为潜在的生物标志物,可响应并参与运动中的适应性变化<sup>[2-3]</sup>。miRNAs 是短的非编码 RNA,通过抑制蛋白质翻译或增强信使 RNA (mRNA) 的降解,调节转录后基因的表达<sup>[2-3]</sup>。miRNAs 参与正常的功能性心脏组织的发育,控制细胞的生长、分化、凋亡和增殖,并参与心血管病理生理变化的调控,例如肥大、纤维化和心肌细胞的损害<sup>[2]</sup>。

左右心室是相互依存的,嵌套在心包内,具有共同的隔膜,并被共同的心肌纤维包围。研究表明耐力训练后左室中发生的结构和功能适应,可能与右室存在不同。鉴于上述原因,本研究选择肌肉组织高表达的肌组织特异 miRNAs (miR-208a、miR-208b 和 miR-499)<sup>[2,3]</sup>,以及其他的被认为在心肌中重要的 miR-21、miR-17-3p<sup>[2-3]</sup>,观察长期的有氧练习左右心肌中这些 miRNAs 的变化,为有氧运动提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 取 48 只健康 C57BL/6J 雄性小鼠 (8 周龄),购自北京生命实验动物技术有限公司 (SPF 级),小鼠置于光照/黑暗周期为 12 h,温度为  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,湿度为 45%~50% 的屏障环境中,自由饮食。实验程序经南京大学动物保护和使用委员会批准 (IACUC-2006001)。将小鼠按体重随机数字分组划分为对照组和训练组,每组 24 只。2 组在第 0 周进行跑台预适应及递增负荷测试 (incremental load test, ILT) 后,运动组进行 8 周有氧跑台训练,对照组正常饲养不进行跑台训练。动物于下午 1 点至 5 点在明亮室内进行跑台训练或运动能力测试。

### 1.2 测试方法

**1.2.1 ILT** 训练组小鼠使用运动跑台进行训练 (型号:ZH-PT,安徽正华),适应阶段对照组与训练组都以 10 m/min 的速度运动 10 min,跑步机无倾斜角度,持续 5 d<sup>[4]</sup>。48 h 后进行 ILT 测试,测试方案为:小鼠以 6 m/min 的速度在跑步机上进行运动,每 3 分钟增加 3 m/min 的速度递增直至小鼠力竭。当小鼠在 1 min 内触碰跑步机末端 5 次及以上时,被定义为力竭。力竭速度计算公式为:

$$EV = V + (n/b) \times a$$

其中  $V$  是最后一次完成阶段的速度; $n$  是未完成阶段的保持的持续时间; $b$  是每阶段的持续时间; $a$  是测试递增速度<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 有氧训练方案和表现评估** 本实验中使用的有氧训练方案参照文献<sup>[4]</sup>进行。期间每周第 6 天定时记录小鼠的体重变化情况。并在第 0 周适应

性训练、第 4 周和第 8 周有氧训练结束后 48 h 对 2 组进行 ILT 测试,对小鼠的运动表现进行评估与记录。

**1.3 心肌样本提取** 于第 8 周最后一次 ILT 测试结束 48 h 后,断颈处死所有小鼠。在无菌无 RNA 酶的条件下,收集小鼠左、右心室心肌组织置于液氮中速冻,并保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  中后续分析待测。

**1.4 RNA 的提取** 使用 RNAiso Plus9 (型号:9109, Takara) 抽提试剂盒,将冷冻的左右心室心肌匀浆进行总 RNA 的提取。并进行定量聚合酶链式反应(RT-qPCR),所有样品都是在一个批次内进行处理。以探针法为基础进行 RT-qPCR,得到相应的 cDNA 产物。使用 TaqMan PCR 试剂盒(Thermo Fisher Scientific,美国)和 Roche LightCycler © 96 (Roche,瑞士)进行 qPCR 检验。qPCR 条件为  $95^{\circ}\text{C}$  预孵育 5 min,  $95^{\circ}\text{C}$  15 s、 $60^{\circ}\text{C}$  60 s 共 45 个循环,最后  $37^{\circ}\text{C}$  冷却 30 s。使用以下 TaqMan © 探针进行对应 miRNA 的检测: snRNA U6 (ID: 001973)、hsa-miR-208a (ID: 000511)、hsa-miR-208b (ID: 002290)、mmu-miR-499 (ID: 001352)、hsa-miR-21 (ID: 000397) 和 mmu-miR-17-3p (ID: 002543)。所有反应进行 3 次技术重复。将心肌中 miRNAs 的相对 snRNA U6 归一化表达,并使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法计算 Ct 值。

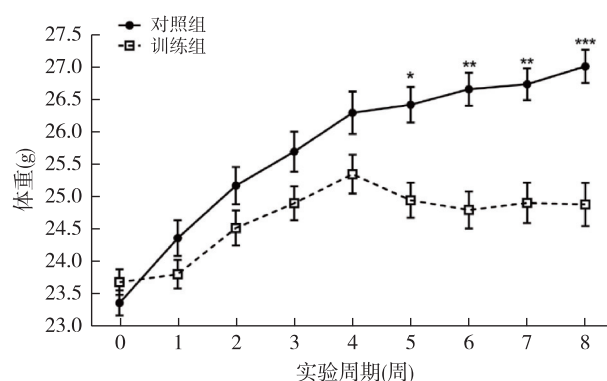
**1.5 统计学分析** 使用 GraphPad Prism 7.0 对所有数据进行统计分析,数据分布的正态性使用 Shapiro-Wilke 的 W 检验进行检验。计量资料用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。 $t$  检验来评价力竭速度和 QRT-PCR 的结果,而体重变化结果则使用单向方差分析进行比较,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 8 周有氧训练小鼠体重变化情况** 整个实验周期期间,对照组与训练组在训练后期产生体重变化上的差异,其中对照组于第 5 周、第 6 周、第 7 周和第 8 周的体重显著高于训练组 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ ;  $P < 0.001$ ;  $P < 0.0001$ ),见图 1。8 周的跑步机有氧训练方案结束时,对照组小鼠体重变化百分比 ( $16.18 \pm 5.14\%$ ) 与训练组 ( $5.30 \pm 6.15\%$ ) 比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.0001$ ),见图 2。

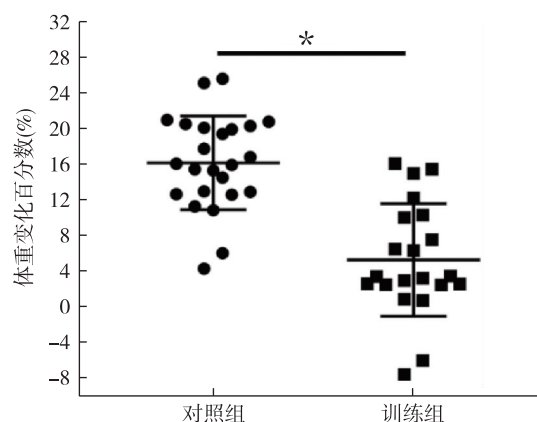
**2.2 8 周有氧训练小鼠 ILT 测试结果** 第 0 周时对照组与训练组的力竭速度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );第 4 周训练后训练组力竭速度

[ $(29.37 \pm 3.49)\%$ ] 显著高于对照组 [ $(20.54 \pm 2.21)\%$ ],  $P < 0.0001$ ;第 8 周时测试结果表明,训练组力竭速度 [ $(35.71 \pm 4.53)\%$ ] 仍显著高于对照组 [ $(21.28 \pm 5.47)\%$ ],  $P < 0.0001$ ;见图 3。此外,随着有氧训练方案的推行,训练组小鼠的有氧运动能力不断提升,与第 0 周力竭速度比较,第 4 周时提升  $40.79\%$  ( $P < 0.0001$ ),第 8 周时提升  $71.15\%$  ( $P < 0.0001$ ),第 8 周较第 4 周成绩上升  $21.56\%$  ( $P < 0.0001$ )。



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$

图 1 有氧跑台训练实验周期小鼠的体重测量结果 ( $n=24$ )

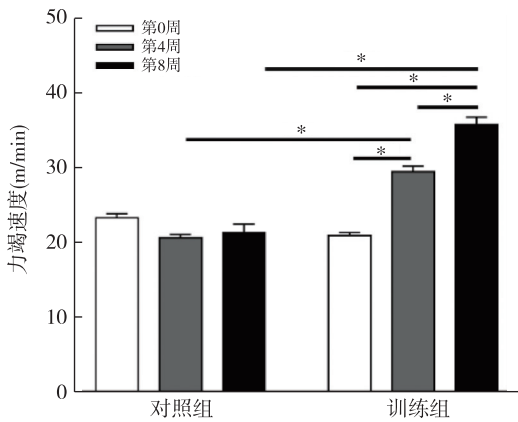


\*  $P < 0.0001$

图 2 有氧跑台训练结束时小鼠体重变化的百分比 ( $n=24$ )

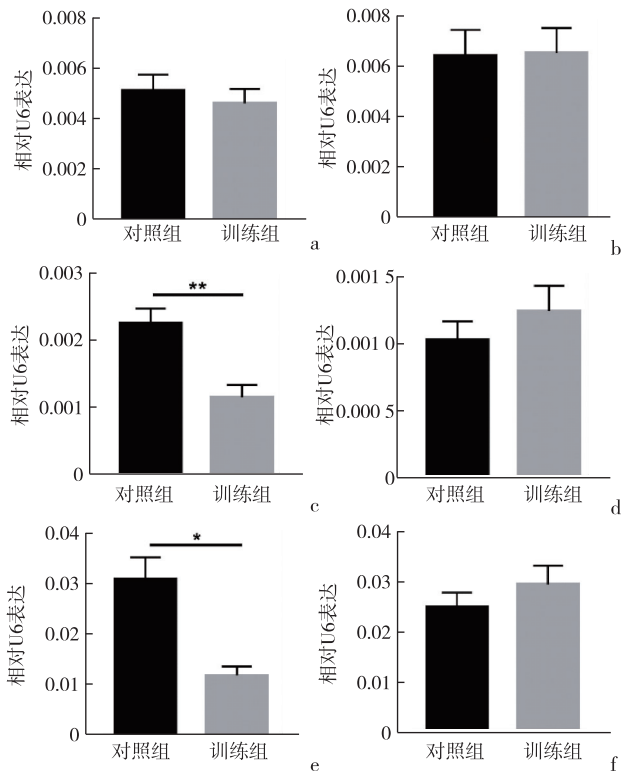
## 2.3 8 周有氧训练心肌组织中 miRNAs 的变化

**2.3.1 左右心肌组织中肌组织特异 miRNAs 的变化** 与对照组比较,训练组中左心室心肌 miR-208b 和 miR-499 的水平显著下降 ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ),分别改变 1.96 倍与 2.59 倍,但在右室心肌中差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。值得注意的是,miR-208a 在小鼠左右心室的心肌中差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 4。



\*  $P < 0.0001$

图3 有氧跑台训练入组小鼠在第0、4和8周的ILT测试期间力竭速度的变化 ( $n=24$ )



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

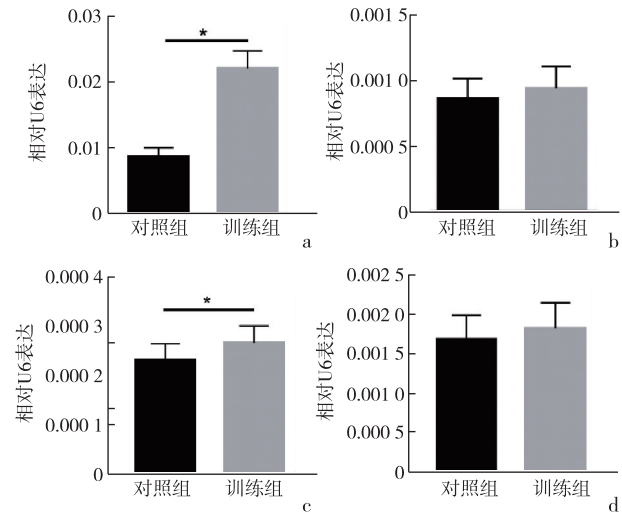
a: 左心室 miR-208a; b: 右心室 miR-208a; c: 左心室 miR-208b; d: 右心室 miR-208b; e: 左心室 miR-499; f: 右心室 miR-499

图4 特异 miR-208a、miR-208b 和 miR-499 在入组小鼠左右心室心肌中的表达 ( $n=16$ )

### 2.3.2 左右心肌组织中心肌其他 miRNAs 的变化

与对照组比较,训练组左心室心肌 miR-21 与 miR-17-3p 水平显著减少 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ ),分别改变 2.53 倍和 1.13 倍。与左心室心肌的显著改变

不同的是,miR-21 与 miR-17-3p 在右心室心肌中的水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 5。有氧训练并不影响这些 miRNAs 在右心室心肌中的表达。



\*  $P < 0.05$

a: 左心室 miR-21; b: 右心室 miR-21; c: 左心室 miR-17-3p; d: 右心室 miR-17-3p

图5 miR-21 和 miR-17-3p 在入组小鼠左右心室心肌中的表达 ( $n=16$ )

## 3 讨论

长期有氧训练会导致心脏超负荷,引起结构和功能发生适应变化,被称为“运动员的心脏”。传统上,认为这种心脏重塑的量在左右心腔之间是平衡的。但是,在剧烈运动期间,右心室会承受不成比例的后负荷和室壁应力,长期运动引起的变化可能更为明显。本研究结果显示心肌相关的 miR-208b 和 miR-499 水平仅在左心室心肌中下降,而 miR-21 与 miR-17-3p 仅在左心室心肌中增加。表明左、右心室心肌重构存在不同。

有氧运动引起的心脏肥大是一种生理反应,涉及对收缩和代谢成分的基因和蛋白质表达的精确编排。miRNAs 参与这些生理过程的变化。前期研究发现,miR-208a、miR-208b 和 miR-499 均由肌球蛋白基因编码,因此也被称为“肌相关 microRNAs (MyomiRs)”,调节多个 mRNA 靶标,进而调节心肌肥大和代谢途径<sup>[6]</sup>。研究表明,游泳训练对 miR-208a 和 miR-208b 水平的表达存在抑制作用,会增加 Med13、Purβ、Sox6、异染色质蛋白 1β (Heterochro-



matin Protein 1 $\beta$ , HP1 $\beta$ ) 和特异性蛋白 (specificity proteins, Sp)/Kruppel 样转录因子 3 (Kruppel-like transcription factor 3, SP3) 蛋白的表达, 调节代谢, 收缩途径和表观遗传控制, 从而调节  $\alpha$ -MHC/ $\beta$ -MHC 比率并传递信号, 诱发生理性的肌肉肥大。但 miR-499 未发生变化<sup>[6]</sup>。本研究结果显示, 8 周有氧跑台训练可影响 miR-208b 和 miR-499 水平的变化, 进一步表明这些 MyomiRs 参与调控心脏肥大。其出现差异的原因可能和有氧练习的方式有关<sup>[2-3]</sup>。另外, 研究发现游泳训练可增加 miR-21 水平[靶向磷脂酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 和 TSC-2], 可激活心肌细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号途径<sup>[7]</sup>; 增加 miR-17-3p 的表达, 可抑制 PTEN (PI3K/Akt 拮抗途径), 而 PI3K/Akt 是参与心肌肥大最重要的一个途径<sup>[8]</sup>; 本研究同样观察到 8 周跑台训练后左室心肌 miR-21 和 miR-17-3p 水平增加, 进一步支持体育活动的有益影响。但值得注意的是, 在心血管疾病中, miR-21 的表达普遍升高<sup>[9]</sup>。

但在右心室的心肌中, 未观察到这些 miRNAs 的变化, 表明左右心肌重构存在不同。与左心室相比, 长期耐力运动右心室的扩大程度有所提高<sup>[10]</sup>。研究发现长期的有氧运动训练主要是通过增加线粒体产生 ATP 的能力, 增强右心室的代谢重塑<sup>[11]</sup>。因此, 评定代谢相关 miRNAs 的变化, 有助认识右心室的重构现象。运动过程中右心室承受的负荷和室壁压力大于左心室<sup>[12]</sup>。在健康个体中, 右心室具有足够的心力储备, 以适应短期高强度运动期间肺动脉压的升高<sup>[13]</sup>。但是, 如果保持高强度运动数小时, 则可能会影响右心室功能并导致心肌微损伤, 最终导致心脏病理性改变<sup>[14]</sup>。认识运动性心肌肥大的适应过程, 了解运动如何诱导心脏生长可能有助于确定新的治疗靶标, 以减轻对病理应激的不良心脏重塑。但这些途径是否可以增强心脏有限的再生能力, 从而帮助补偿心肌细胞的损失, 仍是未经证实的<sup>[15]</sup>。

#### 【参考文献】

- [1] Penna C, Alloatti G, Crisafulli A. Mechanisms involved in cardioprotection induced by physical exercise [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32(15): 1115-1134.
- [2] Sopłinska A, Zareba L, Wicik Z, et al. MicroRNAs as biomarkers of systemic changes in response to endurance exercise—a comprehensive review [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10(10): 813.
- [3] Schüttler D, Clauss S, Weckbach LT, et al. Molecular mechanisms of cardiac remodeling and regeneration in physical exercise [J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1128.
- [4] Pereira BC, Filho LA, Alves GF, et al. A new overtraining protocol for mice based on downhill running sessions [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(9): 793-798.
- [5] Kuipers H, Verstappen FT, Keizer HA, et al. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates [J]. *Int J Sports Med*, 1985, 6(4): 197-201.
- [6] Soci UPR, Fernandes T, Barauna VG, et al. Epigenetic control of exercise training-induced cardiac hypertrophy by miR-208 [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(22): 2005-2015.
- [7] Ma Z, Qi J, Meng S, et al. Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2013, 113(10): 2473-2486.
- [8] Shi J, Bei Y, Kong X, et al. miR-17-3p Contributes to Exercise-Induced Cardiac Growth and Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 664-676.
- [9] 项 灯, 程 灏. microRNA-21 的表达调控在器官纤维化中的作用 [J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(12): 1326-1331.
- [10] La Gerche A, Rakhit DJ, Claessen G. Exercise and the right ventricle: a potential Achilles' heel [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(12): 1499-1508.
- [11] Nogueira-Ferreira R, Ferreira R, Padrão AI, et al. One year of exercise training promotes distinct adaptations in right and left ventricle of female Sprague-Dawley rats [J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(4): 561-572.
- [12] Sanz-De La Garza M, Carro A, Caselli S. How to interpret right ventricular remodeling in athletes [J]. *Clin Cardiol*, 2020, 43(8): 843-851.
- [13] La Gerche A, Burns A, D'hooge J, et al. Exercise strain rate imaging demonstrates normal right ventricular contractile reserve and clarifies ambiguous resting measures in endurance athletes [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2012, 25(3): 253-262. e1.
- [14] 刘 扬. 运动性心肌微损伤的研究现状 [J]. *东南国防医药*, 2014, 16(4): 401-403.
- [15] Boström P, Mann N, Wu J, et al. C/EBP $\beta$  controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling [J]. *Cell*, 2010, 143(7): 1072-1083.

(收稿日期: 2020-11-24; 修回日期: 2021-03-25)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)