

· 基础研究 ·

有氧运动联合外源性脑源性神经营养因子协同增强心肌血管生成效应

王碧蕾¹, 夏宝妹¹, 金虹², 王锦玉^{3*}¹南京特殊教育师范学院康复科学学院医学康复教研室, 江苏 南京 210038; ²东南大学附属中大医院心血管内科, ³康复医学科, 江苏 南京 210009

[摘要] 目的:探讨脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对有氧运动促进心肌梗死后心肌血管生成、改善心功能的协同效应及其机制。方法:细胞实验中,利用平行板流动小室建立12 dyn/cm²的层流剪切力(laminar shear stress, LSS)以模拟运动对血管壁的生理效应。Western blot分别检测非循环流体、循环流体、循环流体加人重组BDNF蛋白(50 ng/mL)处理的人脐静脉内皮细胞HUVEC中BDNF蛋白表达水平、BDNF高亲和力受体TrkB及其下游Akt通路磷酸化水平,Transwell细胞迁移实验和小管形成实验检测HUVEC的体外血管生成能力。动物实验中,60只12周龄雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为假手术组(Sham)、心肌梗死组(MI)、心肌梗死+BDNF组(MI+BDNF)、心肌梗死+运动组(MI+Ex)、心肌梗死+运动+BDNF组(MI+Ex+BDNF);造模术前及术后1周分别进行心彩超检查,随后开始为期4周的运动训练,MI+Ex+BDNF组大鼠在运动前10 min尾静脉注射人重组BDNF蛋白(0.4 μg/kg),MI+BDNF组仅注射等量BDNF;训练结束后行心彩超检查后腹腔麻醉取材,免疫组化检测心肌梗死周围区血管密度。结果:循环流体产生的LSS可诱发HUVEC中BDNF蛋白表达增加,TrkB及其下游Akt通路磷酸化程度持续增强,循环流体中BDNF水平随干预时间的延长而升高。非循环流体产生的LSS可诱发HUVEC上BDNF蛋白表达增加,但TrkB及其下游Akt通路均处于未激活状态。增加循环流体中BDNF浓度可提高TrkB及其下游Akt通路活化程度,进一步提高HUVEC体外血管生成能力。心肌梗死大鼠有氧运动结合尾静脉注射BDNF较单纯注射BDNF和单纯运动组大鼠心肌血管密度显著增高、心功能改善。结论:运动通过LSS以BDNF浓度依赖性模式诱发HUVEC上TrkB持续磷酸化并激活其下游Akt信号通路,提高细胞迁移及小管形成能力;外源性补充BDNF可协同有氧训练强化运动的促心肌血管生成效应,进一步改善心功能。

[关键词] 有氧运动;脑源性神经营养因子;原肌球蛋白激酶受体B;层流剪切力;血管生成;心肌梗死**[中图分类号]** R542.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)04-466-10

doi:10.7655/NYDXBNS20220402

Aerobic exercise combined with exogenous brain-derived neurotrophic factor synergistically promotes myocardial angiogenesis

WANG Bilei¹, XIA Baomei¹, JIN Hong², WANG Jinyu^{3*}¹Faculty of Rehabilitation Science, Nanjing Normal University of Special Education, Nanjing 210038; ²Department of Cardiology, ³Department of Rehabilitation, Zhongda Hospital, Medical School of Southeast University, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To explore the synergistic effects and related mechanisms of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on aerobic exercise-induced angiogenesis and improved cardiac function. **Methods:** In the *in vitro* experiments, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were exposed to 12 dyn/cm² laminar shear stress (LSS) in parallel-plate flow chamber to mimic the effects of exercise training on vascular tissue. BDNF/TrkB protein expression levels in HUVECs treated by non-circulating flow, circulating flow, circulating flow with BDNF (50 ng/mL) were examined by Western blot, meanwhile phosphorylated TrkB and Akt protein levels were also analyzed; the capacities of cell migration and tube formation were analyzed to evaluate the angiogenesis of HUVEC. In the

[基金项目] 国家自然科学基金(81804068);江苏省自然科学基金(BK20190351)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangjinyu_seu@163.com

in vivo experiments, sixty rats were assigned to sham group, myocardial infarction (MIC) group, myocardial infarction+BDNF (MICB) group, myocardial infarction+exercise (MIE) group and myocardial infarction+exercise+BDNF (MIEB) group; cardiac functional was evaluated prior to exercise training and 1 week after cardiac surgery. the exercise groups were subjected to 4 weeks of treadmill running, the MIEB group subjected to exercise and daily tail intravenous injection of rhBDNF at a dose of 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 10 minutes before exercise, the MICB group subjected to the same dose of rhBDNF only. The rats underwent cardiac functional evaluations following the 4-week period of exercise training. The blood vessel density in the surrounding area of myocardial infarction was detected by immunohistochemistry after the 4-week period of training. **Results:** An increased BDNF protein expression, as well as phosphorylated of TrkB and Akt levels were observed in HUVECs exposed to LSS generated by circulating fluid. LSS elicited sustained increase BDNF level in the circulating medium. In HUVECs exposed to LSS generated by non-circulating fluid, an increased BDNF protein expression was also observed, while the TrkB and its downstream Akt pathway were inactive. Circulating fluid with BDNF could increase the TrkB and Akt phosphorylated degree and improve the angiogenesis ability of HUVECs. The *in vivo* experiments confirmed that BDNF administration in rats combined with aerobic exercise increased myocardial angiogenesis and improved cardiac function more significantly compared with those rats receiving exercise intervention only. **Conclusion:** Exercise activates BDNF/TrkB axis and its downstream Akt pathway through LSS in a BDNF-dependent manner, thereby enhancing cell migration and tubule formation; exogenous supplementation of BDNF in association with aerobic exercise may enhance the pro-myocardial angiogenesis effect of exercise and further improve cardiac function.

[Key words] aerobic exercise; brain-derived neurotrophic factor; tropomyosin kinase receptor B; laminar shear force; angiogenesis; myocardial infarction

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(04):466-475]

《中国心血管健康与疾病报告 2020 概要》指出,我国心血管疾病的患病率处于持续上升阶段,心血管病死亡占城乡居民总死亡原因的首位,已成为威胁我国公众健康的重要因素^[1]。心肌梗死(myocardial infarction, MI)是心血管疾病最严重的结果之一。虽然经皮冠状动脉介入治疗及药物干预降低了急性心肌梗死的病死率,但长时间的心肌缺血、缺氧导致心肌细胞坏死或凋亡,心肌梗死区发生心室重构,逐渐发展为慢性心功能不全,严重影响患者的生活质量,给家庭和社会带来巨大的经济负担。

指南推荐规律的有氧运动训练是保持心血管健康的重要因素,也是MI后心脏康复的重要组成部分^[2-3]。中、高强度有氧或抗阻运动均可增加心肌组织血管密度^[4-5],运动中增高的血液层流剪切力(laminar shear stress, LSS)发挥重要介导作用^[6]。中等强度有氧运动要求的时间较长(30~60 min)且需达到一定强度(运动时心率为最大心率的60%~85%)。然而,大量患者因高龄、重症、体弱或并发症等原因不能保证充分的运动训练,从而限制了该种运动方式的推广;另外,心血管疾病的危险因素也可能损害血管结构对运动训练的适应。所以,积极探寻诱导或强化运动效果、提高运动获益的治疗方法,可以为MI患者带来广泛获益。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)属于神经营养因子家族,是一种小分子二聚体蛋白质,通过与其高亲和力受体原肌球蛋白激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 结合发挥生物效应。我们前期研究证实 BDNF 介导了运动的血管保护效应,运动可增加 MI 大鼠血清 BDNF 水平,且与其心肌血管密度和心功能改善程度密切相关^[7]。但考虑到大量患者存在高血压、糖尿病等并发疾病,其内皮功能不佳、BDNF 分泌能力不足,可能影响其运动效果,那么在运动的同时外源性补充 BDNF 是否可促进运动效应更好地发挥?

本研究体外构建 12 dyn/cm² LSS 模拟运动对血管壁的生理效应,观察循环中 BDNF 水平对 TrkB 及其下游 Akt 通路激活的影响;利用 MI 大鼠模型,从整体水平探讨外源性补充 BDNF 是否可协同有氧运动强化其心肌血管生成及心功能改善的效应,为临床探求更为理想的诱导或强化运动获益的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验选用健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只,体重 220~250 g、12 周龄,由中国科学院上海实验动物研

究中心提供[许可证号:SCXK(沪)20130006]。饲养于东南大学实验动物中心,室温保持20~25℃,湿度(55±10)%,昼夜明暗交替时间10~14 h,噪音<60 dB,大鼠自由饮食和饮水。动物购买后在实验前分笼适应实验室环境饲养1周,4只/笼,期间统一适应性跑台训练5 d,每天10 min。所有动物实验均经东南大学实验动物福利伦理委员会批准(伦理号:20200406021)。

1.1.2 主要材料和试剂

HUVEC由东南大学医学院心血管病研究所提供。ECM培养基(Sciencell公司,美国),胰酶(Hyclone公司,美国),胎牛血清(杭州四季青公司),人重组BDNF(human recombinant brain-derived neurotrophic factor, rhBDNF)(Proteintech公司,美国),羊抗BDNF多克隆抗体、兔抗TrkB多克隆抗体、兔抗TrkB(phospho Y515)多克隆抗体、 β -actin多克隆抗体(Abcam公司,英国),抗羊二抗(Thermo Fisher Scientific公司,美国),兔抗CD34多克隆抗体、兔抗Akt多克隆抗体、兔抗磷酸化Akt多克隆抗体(Sigma-Aldrich公司,美国),抗兔二抗(北京中衫金桥生物技术有限公司),羊抗兔FITC(Proteintech公司,美国),即用型免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),DAB显色试剂盒(北京中衫金桥生物技术有限公司),BDNF检测试剂盒(R&D Systems公司,美国),Transwell小室(Corning公司,美国),Matrigel基质胶(BD Bioscience公司,美国),平行板流动小室(华西医学中心生物工程研究室),动物跑步机(成都泰盟软件有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 流室系统装配和细胞干预

系统装配:本系统由流室系统和灌流系统两部分组成,包括蠕动泵、流室、储液槽和医用硅胶管道等(图1)。蠕动泵为本系统提供稳定的常定流。流室系统是由有机玻璃制成的盒装结构(包括流入仓、剪切力发生仓和流出仓),为保证流动液以均匀速度通过相同缝隙流入发生仓,两端的流入仓和流出仓分别外接灌流系统。灌流液以固定流量由蠕动泵泵出后经管道进入流室系统而对HUVEC施加剪切力,后经管道流回储液槽,灌流液循环利用。也可在流入、流出口分别放置储液槽,一端提供新鲜培养液,一端接收流出液,灌流液非循环利用。

流量流速计算:剪切力SS与流量Q、流室尺寸之间的计算公式为 $SS=6\eta Q/WH^2$ (η 为灌流液的黏度,Q为循环液的流量,W为流室宽度,H为流室

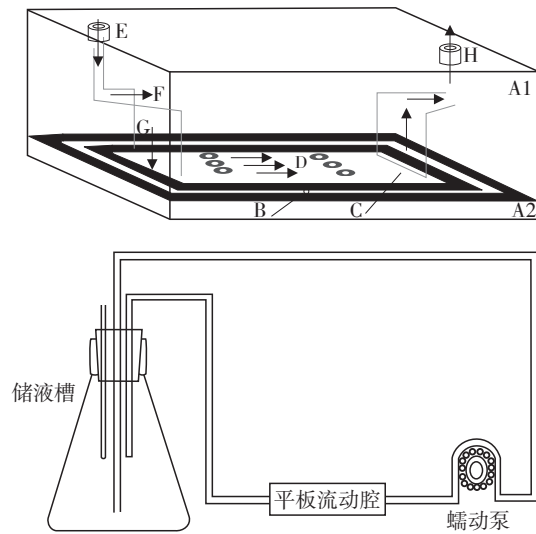


图1 平行板流动小室系统(循环流体)

Figure 1 Parallel plate flow cell system(circulating flow)

高度)。本实验中 $\eta=0.765$ 1 dyn/cm², W=2.57 cm, H=0.04 cm, SS=12 dyn/cm², Q=0.050 7 mL/s。

流体剪切力的加载:载玻片经高压消毒灭菌后,放入超净台中风干,并使用0.2%多聚赖氨酸包被。将包被好的载玻片用PBS清洗3遍,再将培养至第2~5代的细胞接种于载玻片上,放入培养皿,静置2 h待细胞贴壁后,往培养皿中加入培养基,置于培养箱中继续培养待细胞长满80%后部分继续静止培养,取出置于流室系统中进行实验。流室系统装备完善后,在储液槽中加入ECM培养基,开启蠕动泵,产生LSS作用于HUVEC;LSS分别由非循环流体、循环流体、循环流体加入人重组BDNF(50 ng/mL)^[8]产生。

1.2.2 ELISA检测循环流体BDNF浓度

收集LSS干预0、15、30、60 min时段的循环流体。96孔板前2列为标准曲线孔,按照试剂盒说明书给出的浓度使用标准品稀释液稀释相应标准品;按照1:4加入样品稀释液稀释样品100 μ L/孔,室温孵育过夜。严格按照试剂盒说明书检测各时段循环流体中BDNF的浓度。

1.2.3 Western blot检测蛋白表达及磷酸化水平

在LSS干预的0、15、30、60 min检测BDNF、TrkB蛋白表达及TrkB、Akt磷酸化水平。细胞裂解液提取各组细胞样本总蛋白,采用BCA法对蛋白含量进行定量检测。与上样缓冲液按比例混合均匀后煮沸5 min,进行SDS-PAGE凝胶电泳后转膜,5%脱脂奶粉溶液常温封闭1 h,分别加入1:200稀释的抗BDNF、1:50稀释的抗TrkB、1:50稀释的抗TrkB

(phospho Y515)、1:800稀释的抗Akt多克隆抗体和兔抗磷酸化Akt多克隆抗体,4℃下孵育过夜,TBST缓冲液洗涤3次、10 min/次;随后以1:800稀释的二抗室温孵育1 h,TBST缓冲液洗涤3次、15 min/次,加入化学发光试剂显色,胶片行显影、定影后扫描。

1.2.4 Transwell小室测定HUVEC迁移能力

将HUVEC随机分为对照组(Ctrl组)、非循环SS组、循环SS组、BDNF组、循环SS+BDNF组,干预6 h后取出,消化重悬细胞,调整为 5×10^8 个/L,吸取0.1 mL细胞悬液加入上室,置于37℃、5% CO₂培养箱中,18 h后取出滤膜,4%多聚甲醛固定10 min,PBS冲洗,棉签拭去上室表面内残存细胞,结晶紫染色。显微镜下随机选取5个清晰的视野拍照,计算每个视野穿膜细胞数取平均值。

1.2.5 小管形成实验检测HUVEC体外血管生成能力

将HUVEC随机分为对照组(Ctrl组)、非循环SS组、循环SS组、BDNF组、循环SS+BDNF组,干预6 h后取出,消化重悬细胞,调整为 5×10^7 个/L。将细胞外基质胶溶解后铺于96孔板,细胞培养箱中孵育60 min。将上述细胞悬液加入96孔板(300 μL/孔),每组设置3个复孔,继续培养18 h。每组随机选取5个视野于倒置显微镜下观察、拍照并统计其每个视野下小管形成数量,取均值。

1.2.6 动物造模、分组和干预措施

雄性SD大鼠随机分为5组、每组12只,分别为假手术组(Sham)、心肌梗死组(MIC)、心肌梗死+BDNF组(MICB)、心肌梗死+运动组(MIE)、心肌梗死+运动+BDNF组(MIEB)。心梗模型制备:使用戊巴比妥钠(0.2 mL/10 g)腹腔注射麻醉,建立呼吸支持,行冠状动脉左前降支结扎术,结扎成功后,左心室前壁会变苍白并且运动异常,逐层关胸。假手术组只开胸穿线,不结扎冠状动脉,手术时间与其他组匹配。有氧运动:参照Morais等^[9]的方法,采用跑台的方式进行有氧运动训练。心梗手术后1周开始跑台适应训练,训练时长从10 min/d开始,逐日增加,至第5天达到60 min/d并长期维持至训练结束。训练速度从5 m/min开始,逐渐增加到20 m/min并长期维持至训练结束。跑步机坡度从0°开始,逐渐增加到25°。每周训练5 d、休息2 d,共训练4周。MICB和MIEB组大鼠在运动前10 min尾静脉注射BDNF蛋白 $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}^{[10-11]}$ 。

1.2.7 心功能检测

心梗手术后1周、运动方案实施前以及最后一次运动训练完成后48 h,每组分别取6只大鼠,异氟

烷吸入麻醉下进行经胸超声心动图检测,用来评估心功能。选取频率为12 MHz的超声探头进行心脏大小和功能参数的采集,用高分辨率超声Vevo770系统进行数据分析。探头放置于大鼠左前胸,在心脏乳头肌水平进行M型超声检测,测量舒张末期左室内径(left ventricular internal diameter at end-diastole, LVIDd)、收缩末期左室内径(left ventricular internal diameter at end-systolic, LVIDs),系统自动算出射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)。所有检测指标均取3个心动周期的平均值,超声测量依据美国超声心动图学会制定的标准。

1.2.8 免疫组化检测心肌血管密度

最后一次运动训练完成后3 h,每组取6只大鼠,迅速摘取大鼠心脏,沿心梗结扎线以下取部分左心组织经4%多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,常规脱蜡至水,经抗原修复后,用3% H₂O₂消除内源性过氧化物酶活性,抗原修复,滴加兔抗CD34多克隆抗体4℃过夜,PBS冲洗3次,加入二抗37℃孵育60 min,PBS冲洗3次,用DAB显色,再经苏木素复染,最后脱水、透明、封片。显微镜下观察,CD34主要表达在血管内皮细胞中,呈黄色至褐色。每张免疫组化切片随机选择10个视野,计数阳性血管总数。毛细血管判断标准:以黄染的血管内皮细胞为标准,数个血管内皮细胞围成管腔,直径小于10 μm或单细胞管腔均作为1个毛细血管计数。

1.3 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行统计学分析,实验流程重复3次,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LSS干预对BDNF表达的影响

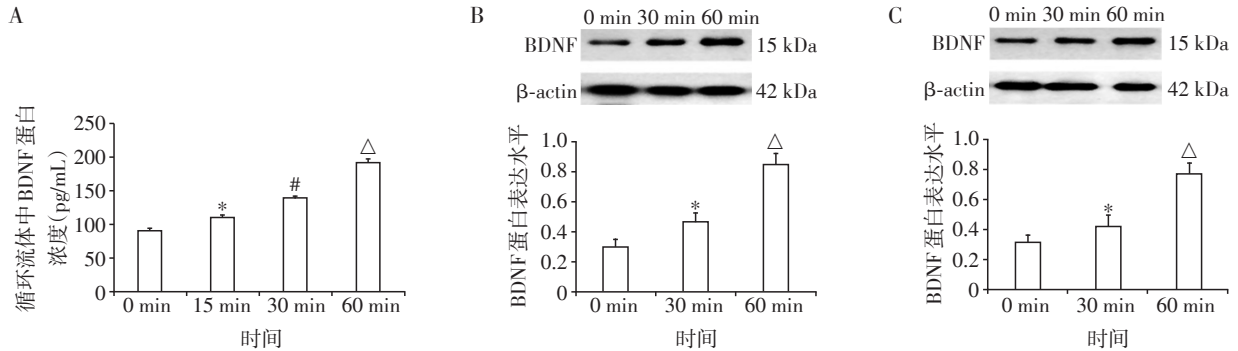
循环流体和非循环流体产生的LSS分别干预HUVEC 0、15、30、60 min。循环流体中BDNF蛋白浓度随着干预时间延长逐渐增高,各时段间差异有统计学意义($P < 0.05$,图2A)。两种流体干预下,HUVEC中BDNF蛋白表达水平均随干预时间延长而逐渐升高,各时段间差异有统计学意义($P < 0.05$,图2B、C)。

2.2 LSS干预过程中流体BDNF水平对TrkB磷酸化的影响

循环流体和非循环流体产生的LSS分别干预

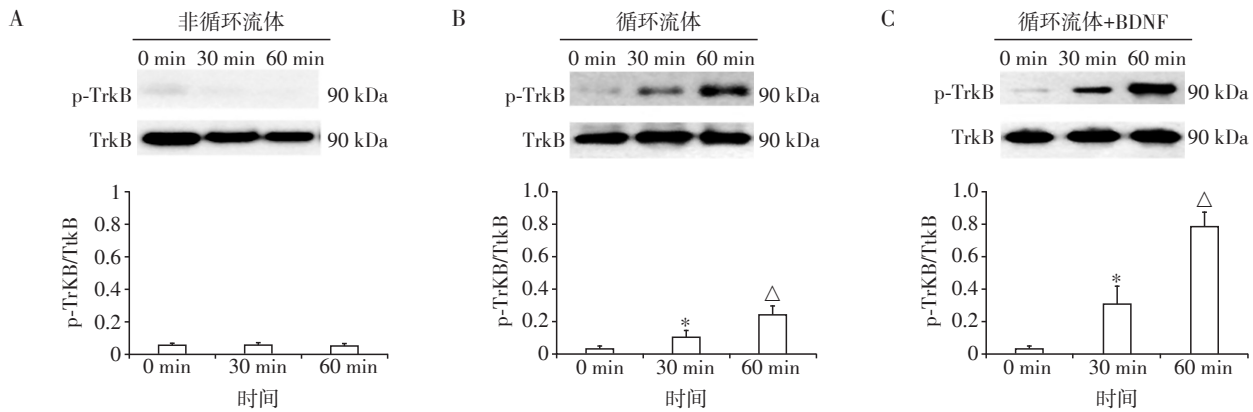
HUVEC 0、30、60 min。非循环流体环境中,TrkB 蛋白磷酸化水平随着 LSS 干预时间延长无明显变化,各时段间无显著差异($P > 0.05$);循环流体环境中,TrkB 蛋白磷酸化水平随着 LSS 干预时间延长而逐渐

升高,各时段间差异有统计学意义($P < 0.05$);循环流体加入 BDNF 后,TrkB 蛋白磷酸化水平较单纯循环流体干预组进一步增强,各时段间差异有统计学意义($P < 0.05$,图3)。



A: ELISA 检测循环流体中 BDNF 蛋白浓度;B:非循环流体干预下 BDNF 蛋白表达情况;C:循环流体干预下 BDNF 蛋白表达情况。与 0 min 组比较,* $P < 0.05$;与 15 min 组比较,# $P < 0.05$;与 30 min 组比较,[△] $P < 0.05$, $n=3$ 。

图2 循环流体及非循环流体干预下 BDNF 蛋白表达水平
Figure 2 BDNF levels in the circulating flow and non-circulating flow



A:非循环流体干预下 TrkB 蛋白磷酸化情况;B:循环流体干预下 TrkB 蛋白磷酸化情况;C:循环流体+BDNF 干预下 TrkB 蛋白磷酸化情况。与 0 min 组比较,* $P < 0.05$;与 30 min 组比较,[△] $P < 0.05$, $n=3$ 。

图3 Western blot 检测不同 BDNF 水平的流体干预下 TrkB 蛋白磷酸化情况
Figure 3 TrkB phosphorylation states in the flows with different BDNF levels detected by Western blot

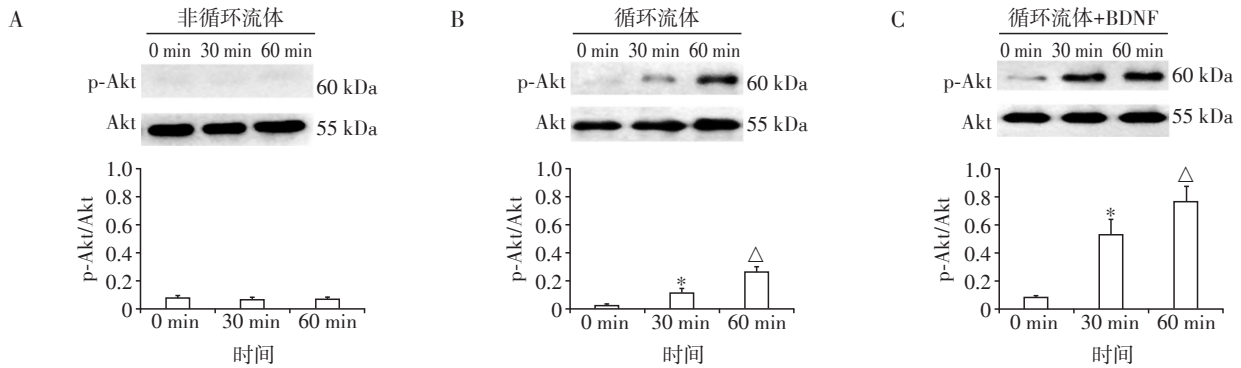
2.3 LSS 干预过程中增加流体 BDNF 水平对 TrkB 下游 Akt 通路激活的影响

循环流体和非循环流体产生的 LSS 分别干预 HUVEC 0、30、60 min。非循环流体环境中,TrkB 蛋白磷酸化水平随着 LSS 干预时间延长无明显变化,各时段间差异无统计学意义($P > 0.05$);循环流体环境中,Akt 蛋白磷酸化水平随着 LSS 干预时间延长而逐渐升高,各时段间差异有统计学意义($P < 0.05$);循环流体加入 BDNF 后,Akt 磷酸化水平较单纯循环流体干预组进一步增强,各时段间差异有统计学意义($P < 0.05$,

图4)。

2.4 LSS 干预过程中增加流体 BDNF 水平对 HUVEC 体外血管生成能力的影响

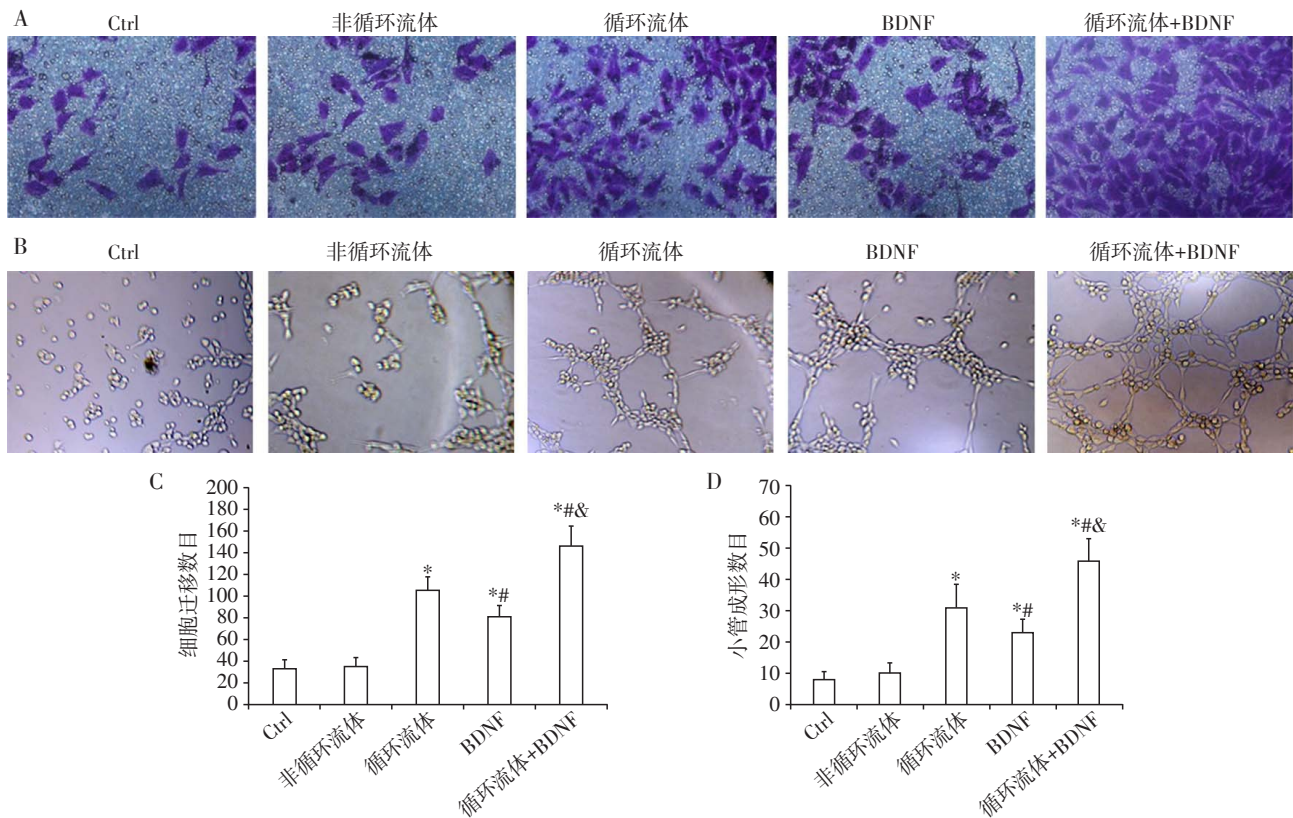
体外细胞迁移和小管形成实验结果显示,非循环流体干预组 HUVEC 迁移和小管形成能力与对照组(Ctrl 组)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。BDNF 干预组 HUVEC 迁移和小管形成能力较对照组显著增高($P < 0.05$),但仍低于循环流体干预组($P < 0.05$)。循环流体+BDNF 干预组 HUVEC 迁移和小管形成能力较其他各组均显著增高($P < 0.05$,图5)。



A: 非循环流体干预下 Akt 蛋白磷酸化情况; B: 循环流体干预下 Akt 蛋白磷酸化情况; C: 循环流体+BDNF 干预下 Akt 蛋白磷酸化情况。与 0 min 组比较, * $P < 0.05$; 与 30 min 组比较, [△] $P < 0.05$, $n=3$ 。

图4 Western blot 检测不同 BDNF 水平的流体干预下 Akt 蛋白磷酸化情况

Figure 4 Western blot measurement of Akt phosphorylation states in the flows with different BDNF levels



A: 各组 HUVEC 细胞迁移能力代表性图片 ($\times 200$); B: 各组 HUVEC 小管形成能力代表性图片 ($\times 100$); C: 各组 HUVEC 细胞迁移数目统计; D: 各组 HUVEC 细胞小管形成数目统计。与 Ctrl、非循环流体组比较, * $P < 0.05$; 与循环流体组比较, # $P < 0.05$; 与 BDNF 组比较, & $P < 0.05$, $n=3$ 。

图5 不同 BDNF 水平的流体干预对 HUVEC 迁移及小管形成能力的影响

Figure 5 Effects of the flows with different BDNF level on HUVEC migration and tube-forming capacity

2.5 BDNF 协同有氧运动促进 MI 大鼠心肌血管生成

图5为各组心肌组织免疫组化 CD34 染色切片代表照片, 黄染部位为毛细血管。MIC 组和 MICB 组心肌毛细血管密度显著低于 Sham 组 ($P < 0.05$); MIC 组和 MICB 组心肌毛细血管密度无显著性差异 ($P > 0.05$); MIE 组心肌毛细血管密度显著高于 MIC、

MICB 组 ($P < 0.05$), 仍低于 Sham 组 ($P < 0.05$); MIEB 组心肌毛细血管密度显著高于 MICB 组和 MIE 组 ($P < 0.05$), 低于 Sham 组 ($P < 0.05$, 图6)。

2.6 BDNF 协同有氧运动改善 MI 大鼠心脏功能

造模术后 1 周, MIC、MICB、MIE、MIEB 组大鼠 LVEF、LVFS 显著低于 Sham 组 ($P < 0.05$), LVIDd、

LVIDs 较 Sham 组显著增高 ($P < 0.05$); MIC、MICB、MIE、MIEB 组间 LVEF、LVFS、LVIDd、LVIDs 无明显差异 ($P > 0.05$, 图7)。

经过4周的干预, MIE 组和 MIEB 组 LVEF、LVFS

均较干预前升高 ($P < 0.05$), LVIDd、LVIDs 均降低 ($P < 0.05$), 且 MIEB 组变化较 MIE 组更为明显 ($P < 0.05$), 但与 Sham 组比较, 差异仍有统计学意义 ($P < 0.05$); MIC 组和 MICB 组 LVEF、LVFS、LVIDd、LVIDs

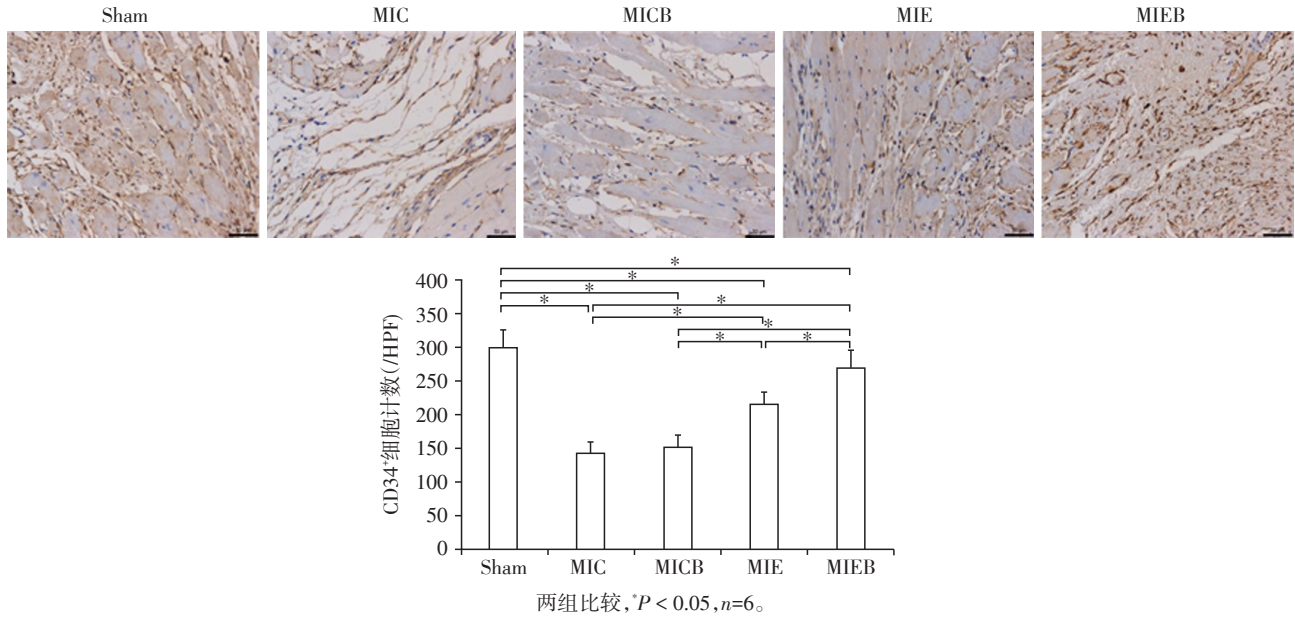
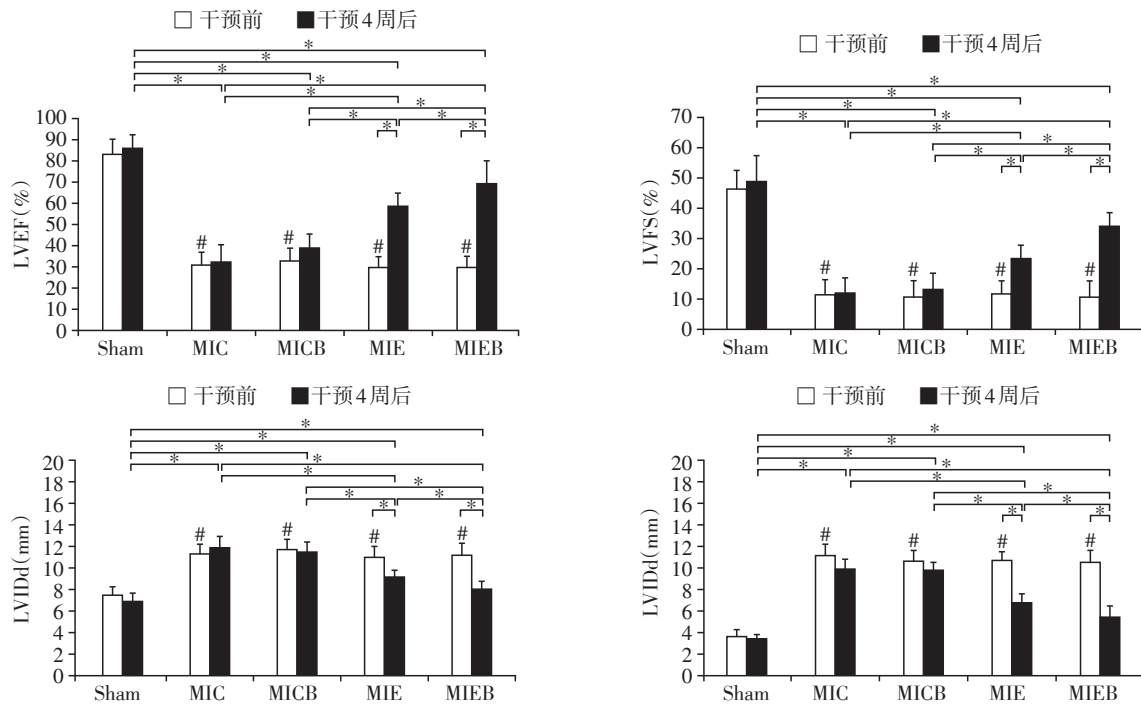


图6 外源性注射BDNF、运动及两者协同作用对MI大鼠心肌血管生成的影响($\times 200$)

Figure 6 Effects of intraventricular application of BDNF, exercise training and synergistic action of the two factors on myocardial angiogenesis of MI rats ($\times 200$)



与干预前Sham组比较, * $P < 0.05$; 两组比较, * $P < 0.05$, $n=6$ 。

图7 外源性注射BDNF、运动及两者协同作用对MI大鼠心功能的影响

Figure 7 Effects of intraventricular application of BDNF, exercise training and synergistic action of the two factors on cardiac function of MI rats

与干预前比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,图7)。

3 讨论

循证医学证据表明,以运动疗法为核心的心脏康复在降低心血管病致残率和死亡率以及提高心血管病患者生活质量方面有确切获益^[2-3]。其中,冠心病运动康复的中心效应发挥了重要的心脏保护作用。中心效应的原理主要是指运动能够促进心肌血管生成及增强心肌收缩能力。

大量研究证实 BDNF/TrkB 通路作为一种诱导性配体/受体系统在体内展现出强大的促血管生成和心脏保护作用^[12]。冠心病患者循环 BDNF 水平与血管内皮功能^[13]和心肺适应能力(峰值耗氧量)呈正相关^[14]。血清 BDNF 水平降低与心衰患者的死亡和再住院有关^[15]。而低水平 BDNF 和低水平峰值耗氧量结合可预测心衰患者的心血管相关死亡率^[16]。我们前期的研究结果揭示,有氧运动训练可提高 MI 大鼠血清 BDNF 浓度,并与心肌血管密度及心功能水平的改善呈正相关,提示该系统在运动的心血管获益中发挥重要作用;同时,我们构建了 12 dyn/cm² LSS,以模拟运动对血管的生理效应,发现 LSS 作用下内皮细胞 BDNF 合成和分泌显著增加,从而判断运动主要通过其诱导的 LSS 增高促进 BDNF 生成^[7]。在血液循环过程中,血流与血管内皮接触而生成和血流方向一致的摩擦力,称为血流剪切力(shear stress,SS)。其中,LSS是通过与血流方向相同的层流血流形成的。在生理范围 LSS(10~15 dyn/cm²)作用下,内皮细胞可释放多种生物活性物质,维持血管适度的张力、抑制血小板黏附及血管重塑,并且随着剪切力在一定范围内的适度增大,这种作用得到进一步增强。适度的运动训练能够通过心率的加快及心输出量的增加,加快血流速度、提高外周血管张力,从而导致平均 LSS 的增加^[17]。运动性充血状态下,加速的血流可引起动脉系统反馈性舒张以降低局部剪切力至基础水平,从而间接改善局部血供;但毛细血管顺应性有限,运动可导致其承受的剪切力维持在较高水平,其机械应力传导是微血管重构的重要因素^[18]。升高的剪切力可以加速内皮细胞分裂,在体内,局部血管生成情况也与局部组织充血程度、即局部微血管剪切力密切相关^[19]。

随着运动强度的适度提升,局部血管 LSS 水平相应升高,其发挥的血管保护效应亦随之增强。研究证实,BDNF 的生成与运动强度呈正相关,且可影

响运动获益程度^[20-22],而低强度有氧运动提高 BDNF 的效果不明显^[23]。故而,充足的运动强度才能确保 LSS 上升、BDNF 浓度提高至获益水准;充足的运动时间才能达到足够的 LSS 作用起效时限。然而,相当一部分患者因重视程度不足、医疗条件欠缺、高龄、重症后虚弱等原因不能保证充足的训练强度和时

间。细胞实验中,本研究亦发现在 LSS 干预下, BDNF 是配体浓度依赖性地发挥其生物学效应的。LSS 诱发的 TrkB 及其下游 Akt 通路的磷酸化持续增强依赖于流体中 BDNF 水平的维持。在平行板流动小室中,循环和非循环流体产生的 LSS 均可使 BDNF 表达增加。但在使用开放回路的非循环流体进行干预时,非循环流体中 HUVEC 分泌的 BDNF 不停随液体流出,故 BDNF 浓度极低、可忽略不计;同时,其中的 TrkB 受体及下游 Akt 通路亦处于未激活状态。而 Akt 通路在心脏血管生成方面发挥重要作用,Cao 等^[8]证实老化的心脏微血管内皮细胞 TrkB 表达降低以及相应的 BDNF-TrkB-PI3K/Akt 信号通路的损伤可导致 BDNF 介导的细胞迁移障碍。在使用循环流体产生的 LSS 进行干预时,灌流液中 BDNF 浓度随干预时间延长而持续增高,TrkB 及其下游 Akt 通路激活程度呈持续增高趋势。在循环流体中加入 BDNF 后,TrkB、Akt 的磷酸化水平较单纯循环流体干预组显著增高,相应的 HUVEC 体外血管生成能力也显著增强。这也进一步解释了为何运动后 BDNF 水平与心肌血管生成及心功能改善呈正相关性。循环 BDNF 浓度越高,其受体 TrkB 表达及其下游通路激活程度越高,能够发挥出更显著的生物学效应。

然而,心血管疾病危险因素可损害血管内皮细胞功能,影响 BDNF 分泌。冠心病患者循环 BDNF 浓度显著降低,且与血管性血友病因子呈正相关,提示内皮功能障碍是循环 BDNF 水平受损的重要决定因素^[13]。动物及临床实验均证实存在高血压^[24]、糖尿病^[25-26]、肥胖^[27]等情况下,个体血清 BDNF 水平低于对照组,且对运动的敏感度也可能相对较低,无论是心肌梗死后的心肌代偿水平还是运动后心脏恢复能力都有所下降。Val66Met 单核苷酸多态性(SNP)携带者中 BDNF 的钝化表达亦可能不会表现出血清 BDNF 浓度的运动强度依赖性变化,也为其运动获益带来不确定性^[28]。

所以,改善血管内皮功能、从而诱导或强化运动效果的治疗药物的产生,可以为医学界带来广泛

的益处。这也为外源性注射 BDNF 强化运动效应带来了理论可行性。Hang 等^[10]发现静脉注射 BDNF 可减轻阿霉素对心脏的毒性作用;皮下注射 BDNF 可改善心功能不全小鼠的运动耐力,进一步证实其在体内的生物学效应^[29-30]。这些研究结果均提示外源性 BDNF 对于心血管疾病亦存在一定的治疗意义。我们的动物实验发现静脉注射 BDNF 协同运动可显著提高 MI 大鼠心肌血管密度及左心功能,考虑运动时增高的 LSS 结合较高浓度的 BDNF 能够强化其 TrkB 及下游 Akt 通路激活程度,从而有效改善内皮细胞功能。其心功能的改善,一方面与心肌细胞血供改善有关,另一方面外源性 BDNF 可能对心肌细胞本身亦有一定的保护作用,这也是我们下一步研究中拟进一步探讨的问题。

在后续研究中,我们还会进一步摸索 BDNF 的给药浓度、给药方式和给药时机,探讨 BDNF 协同有氧运动对心肌 BDNF/TrkB 及其下游信号通路的影响,在争取获得更佳疗效的同时,为临床优化有氧运动效果改善 MI 预后寻找新策略并提供理论和实践依据。

[参考文献]

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 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] 中华医学会心血管病学分会预防学组, 中国康复医学会心血管病专业委员会. 冠心病患者运动治疗中国专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(7):575-588
- [3] ARNETT D K, BLUMENTHAL R S, ALBERT M A, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74(10):e177-e232
- [4] TIAGO F, BARAÚNA V G, NEGRÃO C E, et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(4):H543-52
- [5] HOTTA K, BEHNKE B J, ARJMANDI B, et al. Daily muscle stretching enhances blood flow, endothelial function, capillarity, vascular volume and connectivity in aged skeletal muscle[J]. J Physiol, 2018, 596(10):1903-1917
- [6] STÖCKER F, VON O C, PATERNOSTER F K, et al. Does postexercise modelled capillary blood flow accurately reflect cardiovascular effects by different exercise intensities?[J]. Clin Physiol Funct Imaging, 2018, 38(3):431-438
- [7] WANG B L, JIN H, HAN X Q, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in exercise-induced cardioprotection of post-myocardial infarction rats[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(5):2867-2880
- [8] CAO L, ZHANG L, CHEN S Y, et al. BDNF-mediated migration of cardiac microvascular endothelial cells is impaired during ageing[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(12):3105-3115
- [9] DE MORAIS V A C, DA SILVA TOURINO M F, DE SOUZA ALMEIDA A C, et al. A single session of moderate intensity walking increases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic post-stroke patients[J]. Top Stroke Rehabilitation, 2018, 25(1):1-5
- [10] RAMOS - CEJUDO J, GUTIÉRREZ - FERNÁNDEZ M, OTERO - ORTEGA L, et al. Brain - derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke[J]. Stroke, 2015, 46(1):221-228
- [11] HANG P Z, ZHAO J, SUN L, et al. Brain-derived neurotrophic factor attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction through activating Akt signalling in rats[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(4):685-696
- [12] PIUS - SADOWSKA E, MACHALIŃSKI B. BDNF - A key player in cardiovascular system[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 110:54-60
- [13] JIN H, CHEN Y F, WANG B L, et al. Association between brain - derived neurotrophic factor and von Willebrand factor levels in patients with stable coronary artery disease[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2018, 18(1):23
- [14] SWARDFAGER W, HERRMANN N, MARZOLINI S, et al. Brain derived neurotrophic factor, cardiopulmonary fitness and cognition in patients with coronary artery disease[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25:1264-1271
- [15] BARMAN H A, ŞAHIN I, ATİCİ A, et al. Prognostic significance of brain-derived neurotrophic factor levels in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction[J]. Anatol J Cardiol, 2019, 22(6):309-316
- [16] SHIBATA A, HANATANI A, IZUMI Y, et al. Serum brain - derived neurotrophic factor level and exercise tolerance complement each other in predicting the prognosis of patients with heart failure[J]. Heart Vessels, 2018, 33(11):1325-1333
- [17] GREEN D J, SMITH K J. Effects of exercise on vascular function, structure, and health in humans[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, 8(4):a029819- a029833
- [18] GREEN D J, HOPMAN M T E, PADILLA J, et al. Vascular adaptation to exercise in humans: role of hemodynamic stimuli[J]. Physiol Rev, 2017, 97(2):495-528

- [19] EGGINTON S, ZHOU A L, BROWN M D, et al. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49(3):634-646
- [20] BOYNE P, MEYROSE C, WESTOVER J, et al. Exercise intensity affects acute neurotrophic and neurophysiological responses poststroke [J]. *J Appl Physiol*, 2019, 126(2):431-443
- [21] LEECH K A, HORNBY T G. High-intensity locomotor exercise increases brain-derived neurotrophic factor in individuals with incomplete spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(6):1240-1248
- [22] JEON Y K, HA C H. The effect of exercise intensity on brain derived neurotrophic factor and memory in adolescents[J]. *Environ Heal Prev Med*, 2017, 22(1):27
- [23] MARINUS N, HANSEN D, FEYS P, et al. The impact of different types of exercise training on peripheral blood brain-derived neurotrophic factor concentrations in older adults: a meta-analysis[J]. *Sports Med Auckl N Z*, 2019, 49(10):1529-1546
- [24] ANNE P T, AURORE Q, KATY M G, et al. Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(3):374-82
- [25] DAVARPANAH M, SHOKRI-MASHHADI N, ZIAEI R, et al. A systematic review and meta-analysis of association between brain-derived neurotrophic factor and type 2 diabetes and glycemic profile[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):13773
- [26] ROZANSKA O, URUSKA A, ZOZULINSKA-ZIOLKIEWICZ D. Brain-derived neurotrophic factor and diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):841
- [27] KAUR S, GONZALES M M, TARUMI T, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor mediates the relationship between abdominal adiposity and executive function in middle age[J]. *J Int Neuropsychol Soc*, 2016, 22(5):493-500
- [28] LEMOS J R, ALVES C R, DE S S B C, et al. Peripheral vascular reactivity and serum BDNF responses to aerobic training are impaired by the BDNF Val66Met polymorphism[J]. *Physiol Genom*, 2016, 48(2):116-23
- [29] MATSUMOTO J, TAKADA S, KINUGAWA S, et al. Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure [J]. *Circulation*, 2018, 138(18):2064-2066
- [30] MATSUMOTO J, TAKADA S, FURIHATA T, et al. Brain-derived neurotrophic factor improves impaired fatty acid oxidation via the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase- α -proliferator-activated receptor coactivator-1 α signaling in skeletal muscle of mice with heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2021, 14(1):e005890
- [收稿日期] 2022-01-28
(本文编辑:蒋莉)

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
稿件审理情况。