

何苗, 李佳航, 刘鑫, 等. 中等强度和高强度间歇运动对非酒精性脂肪肝小鼠心肌线粒体自噬的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 1-9.

He M, Li JH, Liu X, et al. Effects of moderate- and high-intensity intermittent exercise on myocardial mitophagy in mice with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.001

中等强度和高强度间歇运动对非酒精性脂肪肝小鼠心肌线粒体自噬的影响

何苗¹, 李佳航¹, 刘鑫¹, 杨威¹, 吴良文¹, 范晶晶^{1,2*}

(1. 武汉体育学院运动医学院, 武汉 430079; 2. 武汉体育学院运动训练监控湖北省重点实验室, 武汉 430079)

【摘要】 目的 探讨中等有氧运动和高强度间歇运动对非酒精性脂肪肝小鼠心肌线粒体自噬的影响及可能机制。方法 将 40 只 3 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为普通饲养组 (Chow 组, $n=10$) 和高脂饲养组 (HFD 组, $n=30$)。第 18 周, 将 HFD 组体重超过普通饮食组 20%~30% (包含 20%) 者判定为肥胖小鼠 ($n=26$), 通过随机抽选 2 只小鼠做肝油红 O 染色, 确定 NAFLD 小鼠模型建立成功。随机筛选出 16 只 NAFLD 小鼠分成中等强度有氧运动组 (MICT 组) 和高强度间歇有氧运动组 (HIIT 组), 每组 8 只, 分别对两组进行 8 周的运动训练, 干预结束后称重取材。Masson 染色观察心肌纤维化情况; 透射电镜观察心肌细胞超微结构; Western blot 检测心肌中线粒体自噬和线粒体生物发生等相关蛋白表达。结果 (1) 与 Control 组相比, Model 组体重显著增加、心指数明显下降; 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组体重明显增加、MICT 组心指数上升。(2) Masson 结果显示, 与 Control 组相比, Model 组心肌内胶原纤维含量显著增加, 且电镜下心肌纤维排列杂乱、断裂, 心肌形态杂乱不堪, 线粒体肿胀、嵴发生断裂且模糊不清并夹杂多个脂滴; 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组心肌内胶原纤维含量显著性减少, 透射电镜下心肌纤维排列略有恢复, z 线清晰可见, 线粒体变性程度略有改善, 且脂滴也略有减少, 其中, MICT 组对心脏组织结构改善效果优于 HIIT 组。(3) Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, Model 组心肌组织中 PINK1 和 Beclin1 表达水平无明显变化, Parkin、LAMP1 和 PGC-1 α 表达显著下降 ($P<0.01$), 蛋白表达和 LC3-II/LC3-I 比值显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组 PINK1 和 Beclin1 表达水平无明显变化, PGC-1 α 表达呈上调趋势, 其中 MICT 组 Parkin、LAMP1 表达显著升高 ($P<0.05$), p62 蛋白表达和 LC3-II/LC3-I 比值明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), HIIT 组 Parkin、LAMP1 表达水平具有上调趋势, LC3-II/LC3-I 比值和 p62 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 不同方式有氧运动均能有效改善 NAFLD 小鼠心肌结构和功能损伤, 其作用途径可能是通过刺激心肌细胞内线粒体自噬通量, 激活自噬, 恢复细胞正常自噬功能, 从而改善心肌细胞损害, 且中等连续有氧运动改善效果更佳。

【关键词】 中等连续有氧运动; 高强度间歇运动; NAFLD 心肌病; 线粒体自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0001-09

Effects of moderate- and high-intensity intermittent exercise on myocardial mitophagy in mice with nonalcoholic fatty liver disease

HE Miao¹, LI Jiahang¹, LIU Xin¹, YANG Wei¹, WU Liangwen¹, FAN Jingjing^{1,2*}

(1. Wuhan University of Physical Education, College of Sports Medicine, Wuhan 430079, China.

2. Wuhan University of Physical Education, Hubei Key Laboratory of Sports Training Monitoring, Wuhan 430079)

【基金项目】 国家自然科学基金 (81701391); 湖北省自然科学基金计划项目 (2023AFB700); 武汉体育学院中青年科研团队项目 (21KT08)。

【作者简介】 何苗 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 运动干预对慢性疾病的预防与康复。E-mail: HM2670116194@163.com

【通信作者】 范晶晶 (1984—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 运动与营养干预慢性疾病。E-mail: jie_jing_1@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of moderate aerobic exercise and high intensity intermittent exercise on myocardial mitophagy in mice with nonalcoholic fatty liver disease and its possible mechanism. **Methods** Forty 3-week-old male C57BL/6J mice were randomly divided into a normal feeding group (Chow group, $n=10$) and high fat-fed group (HFD group, $n=30$). At week 18, mice in the HFD group with a body weight exceeding 20%~30% of the ordinary diet group were considered obese mice ($n=26$). Two mice were randomly selected for liver oil red O staining to confirm successful establishment of the NAFLD mouse model. Sixteen NAFLD mice were randomly selected and divided into a moderate intensity aerobic exercise group (MICT group) and high intensity intermittent aerobic exercise group (HIIT group) with eight mice in each group. The two groups were subjected to exercise training for 8 weeks, and samples were weighed after treatment. Masson staining was used to observe myocardial fibrosis. The ultrastructure of myocardial cells was observed by transmission electron microscopy. Mitophagy and mitochondrial biogenesis were assessed by Western blot. **Results** Compared with the Control group, the body weight and heart index in the Model group were significantly increased and decreased, respectively. Compared with the Model group, the body weight of MICT and HIIT groups was increased significantly, and the heart index of the MICT group was increased. Masson staining showed that, compared with the Control group, collagen fiber content in the myocardium in the Model group was significantly increased, and the myocardial fibers were disorganized and broken in electron microscopy. The myocardial morphology was disorganized, mitochondria were swollen, cristae were broken and blurred, and lipid droplets were observed. Compared with the Model group, the myocardial collagen fiber content in MICT and HIIT groups was significantly reduced, the myocardial fiber arrangement had slightly recovered in transmission electron microscopy, the z-line was clearly visible, the degree of mitochondrial degeneration was slightly improved, and lipid droplets were slightly reduced. The improvement in the cardiac tissue structure in the MICT group was better than that in the HIIT group. Western blot showed that, compared with the Control group, PINK1 and Beclin1 expression levels in myocardial tissue of the Model group underwent no significant changes, while Parkin, LAMP1, and PGC-1 α expression was significantly decreased ($P<0.01$). p62 protein expression and the LC3-II/LC3-I ratio were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the Model group, PINK1 and Beclin1 expression levels in MICT and HIIT groups were not significantly changed, while PGC-1 α expression was upregulated, and Parkin and LAMP1 expression in the MICT group was significantly increased ($P<0.05$). p62 protein expression and the LC3-II/LC3-I ratio were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), Parkin and LAMP1 expression levels were upregulated, and the LC3-II/LC3-I ratio and p62 protein expression were significantly decreased in the HIIT group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusions** Different forms of aerobic exercise effectively ameliorate myocardial structural and functional injury in NAFLD mice, which may be mediated through stimulating autophagy flux of mitochondria in cardiomyocytes, activating autophagy, and restoring the normal autophagy function of cells to ameliorate myocardial cell damage, and moderate continuous aerobic exercise has a better improving effect.

[Keywords] moderate continuous aerobic exercise; high-intensity intermittent exercise; NAFLD cardiomyopathy; mitophagy

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD) 是指在排除过量饮酒及其他引起肝损害的因素下,以肝细胞内脂肪堆积出现弥散性气球样病变为主要特征的慢性疾病,也被认为是在肝中表现出的代谢综合征 (metabolic syndrome, MS)^[1]。研究表明,NAFLD 不仅导致肝的损伤,也会增加肥胖、2 型糖尿病和心血管疾病等并发症的风险,其中心血管疾病是造成 NAFLD 患者最常见的死亡原因之一^[2]。自噬是一个动态变化的自我降解过程,通过清除异常蛋白质和受损细胞器而保护各种细胞和器官的功能损伤^[3]。线粒体自噬作为一种线粒体质量控制机制,通过消除受损或多余的

线粒体,早期可应对各种心脏压力和心脏病状况,但其功能发生障碍会导致异常线粒体聚集、氧化应激增强、活性氧增多、ATP 减少,而引起心肌结构和功能损害^[4]。其中,线粒体自噬标记蛋白 PINK1 通过激活 Parkin 的 E3 泛素连接酶活性,使线粒体被 p62 等自噬受体识别并降解,从而维持线粒体数量平衡。

运动作为一种非药物的干预手段,可有效调节人体的生理平衡,达到治病和预防的效果。Cuthbertson 等^[5]研究表示,运动干预不仅可以降低肝脂肪含量,还可以改善胰岛素抵抗及外周组织胰岛素敏感性。例如,适当的运动干预可明显改善心

脏收缩和舒张功能,显著增加左心室舒张末期血容量,是改善 NAFLD 患者心功能不全的有效策略^[6]。相关研究表明,运动可通过提高线粒体质量、改善代谢异常从而对心血管疾病等并发症产生良性影响^[7-8]。但最有效的运动方式和强度尚无共识。一项研究表示,与不运动小鼠相比,中等强度有氧运动和高强度间歇运动均能改善全身代谢参数来减少 NASH 的进展,但高强度间歇运动在改善葡萄糖和胰岛素耐量,减少肝脂肪变性和纤维化方面优于中等强度有氧运动^[9]。此外,一项随机对照研究比较了能量匹配的中等强度有氧运动和高强度间歇运动对 NAFLD 患者的影响,但这些患者在规律运动 4 周后未能检测到肝内脂质含量的差异^[10]。运动的强度和方式是否会影响运动在减轻 NAFLD 及心肌损伤进展方面的功效,以及这种有益作用的潜在机制尚不清楚。因此,本实验研究通过长期高脂饮食建立 NAFLD 小鼠模型,并对其分别进行 8 周的中等强度有氧运动和高强度间歇有氧运动干预,观察不同有氧运动形式对 NAFLD 小鼠心肌组织结构和线粒体自噬相关蛋白的影响,进一步揭示运动改善代谢性心肌病的机制提供理论依据,为临床对 NAFLD 患者制定运动处方提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,3 周龄,体重为 17~18 g,购自三峡大学实验动物中心[SCXK(鄂)2022-0012],动物合格证编号:42010200005795。饲养于武汉体育学院实验动物实验室[SYXK(鄂)2021-0087],适应性喂养 1 周后进行实验,保证干净充足的饮食和饮水,其中高脂饲养少量多次,每周彻底更换 1 次饲料,期间动物房室温维持在 22~25℃,相对湿度控制在 55%~65%,保持 12 h/12 h 昼夜节律。本实验经由武汉体育学院实验动物管理伦理委员会 IACUC 批准(S0087-20210712-01),所有实验过程严格遵守动物实验福利伦理 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

电镜固定液(型号:G1102)购自 Servicebio 公司;PMSF(型号:BL507A)购自 Biosharp 公司;油红 O 染色套装及 Masson 试剂盒购自四维加科技有限公司;PINK1 兔抗(型号:#6946)、Parkin 兔抗(型号:#32833)、Beclin1 兔抗(型号:#3738)、LC3A/B

兔抗(型号:#4108)购自 Cell Signaling Technology 公司;LAMP1 兔抗(型号:ab208943)、PGC-1 α 兔抗(型号:ab72230)、GAPDH 兔抗(型号:ab8245)购自 Abcam 公司;p62 鼠抗(型号:EM0704)购自中能华安科技有限公司;HPR 标记的山羊抗兔二抗(型号:ab8245)购自启动子生物有限公司;HPR 标记的山羊抗小鼠二抗(型号:ab8245)购自 Servicebio 公司。

病理切片机(型号:RM20116)购自上海徕卡仪器有限公司;超声波细胞粉碎机(型号:Scientz-IID)购自宁波新芝生物科技股份有限公司;高速冷冻离心机(型号:HC-2518R)购自安徽中科中佳仪器有限公司;垂直电泳仪(型号:DYY-6C)购自北京六一仪器厂;脱色摇床(型号:TSY-B)购自 Servicebio 公司;超敏荧光化学发光成像仪(型号:6300)购自上海勤翔科学仪器有限公司;透射电子显微镜(型号:HT770)购自日本东京日立集团;小动物跑步机(动物实验跑台,型号:ZS-PT-III)购自北京众实迪创科技发展有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,随机分为普通饲养组(Chow 组, $n=10$)和高脂饲养(能量配比为蛋白质 20%,碳水化合物 20%,脂肪 60%)组(HFD 组, $n=30$)。实验第 18 周,根据体重超过 Chow 组小鼠 20%的 26 只 HFD 组小鼠进行模型鉴定检测,两组随机抽取 2 只小鼠处死,做肝病理切片,对比观察其肝脂肪变性情况,确定 NAFLD 模型建立成功。剩余 Chow 组小鼠继续编为标准对照组(Control 组),将 HFD 组小鼠随机分为模型组(Model 组),中等强度有氧运动组(MICT 组)和高强度间歇有氧运动组(HIIT 组),每组 8 只,所有小鼠维持原有饲养条件并根据不同运动方案对运动组小鼠施加运动干预。

1.3.2 运动干预方案

所有运动组小鼠在正式运动干预前进行 1 周的跑台适应性训练,在最后 1 d 进行最大摄氧量检测,之后实行正式运动干预,每周 5 d,连续 8 周。运动方式包括中等强度有氧训练以及高强度间歇训练,运动方案均在相关参考文献基础上改进。MICT 组^[11]:第 1 周运动速度 12 m/min,时间由 40 min 递增至 60 min,第 2 周速度增加至 15 m/min(50%~75% VO_{2max}),每天 60 min,保持此运动强度至实验结束;HIIT 组^[12]:第 1 周以 18 m/min(90%~95%

$VO_{2\max}$) 的速度在跑步机上跑 2 min, 然后以 5 m/min (30% ~ 40% $VO_{2\max}$) 休息 2 min, 总共 40 min, 最大跑速每周增加 1 m/min, 在最后 1 周获得 25 m/min 的最终速度。训练时驱赶不跑步小鼠, 保证充足的运动量。实验期间, 密切观察每只小鼠体重变化、摄食量及精神状态。

1.3.3 实验取材

在最后一次运动干预结束 48 h 后, 所有小鼠称重后断颈处死, 迅速取心肌组织并称重。根据体重和心脏重量计算心脏指数: 心脏指数 = (心脏重量(g)/体重(g)) × 100%。每组随机取 3 只小鼠左心室心肌样本部分置于 40% 多聚甲醛固定后分别用油红 O 染色和 Masson 染色观察, 部分心肌样本放置于 4% 戊二醛电镜固定液中储存供后续电镜检测, 其余组织置于冻存管中于 -80℃ 冰箱储存待用。

1.3.4 油红 O 染色

小鼠肝组织固定好后, 由不同浓度梯度酒精进行脱水, 置于二甲苯中透明, 浸蜡、包埋和切片, 将石蜡切片脱蜡至水, 有稀释后的油红 O 储存液染色 10 min, 而后脱色、复染, 中性树脂封片, 置于显微镜下镜检, 获得不同区域视野图像, 接着拍照保存。图像中, 脂滴呈现红色, 细胞核呈现蓝色。

1.3.5 Masson 染色

将多聚甲醛固定的左心室石蜡包埋和切片。石蜡切片经二甲苯脱蜡两次, 无水乙醇梯度脱水后先后用苏木素和丽春红溶液染色, 再通过苯胺蓝复染 5 min, 后用 1% 冰醋酸处理 1 min, 将切片依次放入浓度为 50%、70%、90%、100% 乙醇中各冲洗 5 min, 使用二甲苯脱水透明后用中性树胶封片。在 200 倍镜显微镜下观察拍摄, 每只小鼠随机选取 3 个切片, 在显微镜下选取最具代表的视野进行拍摄, 利用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件, 计算各区域心肌胶原沉积所占比例, 即胶原容积分数 (CVF) = 胶原面积/组织总面积 × 100%。

1.3.6 透射电镜

将心肌组织切成 1 mm³ 大小的组织块, 迅速将样品放入 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中固定 24 h, 之后使用不同浓度梯度无水乙醇各脱水 15 min, 再用 90% 和 100% 丙酮各脱水 15 min, 用纯丙酮/包埋液混合液处理过夜后在包埋板上包埋, 室温下处理 3 h 后在烘箱内固化, 通过超薄切片机切片 70 nm 左右, 最后使用 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染切片, 使用 HT 7800 透射电镜检查心肌线粒体形态和组织纤维化。

1.3.7 Western blot 实验

每只小鼠称取 0.04 g 心脏组织置于 2 mL 的匀浆管中, 加入 600 μL 蛋白酶抑制剂和 6 μL RIPA 裂解液并混匀, 于匀浆机内机械匀浆, 匀浆液在 4℃、10 000 r/min 条件下, 离心 5 min, 取上清液, 在参数设置工作 2 s, 间歇 2 s, 超声 5 min, 取上清液, BCA 法测蛋白浓度。2× 的蛋白上样缓冲液, 按照 1 : 1 与上清液样品充分混匀, 再放置 100℃ 煮样机中 10 min, 待冷却后放入 -20℃ 冰箱中保存, 即为蛋白样品。取等体积蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳条件为 45 V, 40~60 min, 85 V, 1 h。此后以湿转法恒流 330 mA 转膜 60~120 min, 转膜结束后将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶中常温封闭 2 h, 之后与一抗 4℃ 孵育摇床过夜 (一抗稀释比例: PINK1, 1 : 1000; Parkin, 1 : 1000; PGC-1α, 1 : 1000; Beclin1, 1 : 1000; LC3A/B, 1 : 1000; LAMP1, 1 : 1000; p62, 1 : 500), 次日使用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 室温下与二抗孵育 1.5 h (二抗稀释比例: 1 : 5000)。再次用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。使用化学发光成像仪扫描条带, 滴加发光剂显色成像, 并保存。

1.4 统计学方法

图像由 Image J 软件和 Adobe Photoshop 2022 软件分析处理, 所有统计数据由 Graph Pad Prism 8.0.0 软件 (La Jolla, CA, USA) 进行统计分析并进行图像化处理, 结果采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 组间比较均采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示结果具有显著性差异。

2 结果

2.1 NAFLD 小鼠模型建立

小鼠基础体重为 (17.30 ± 0.60) g, 分别对 Chow 组和 HFD 组进行普通饲料和高脂饲料喂养。喂养 2 周后, Chow 组小鼠体重为 (21.15 ± 0.76) g, HFD 组小鼠体重为 (22.41 ± 0.85) g; 喂养 6 周后, Chow 组小鼠体重为 (25.19 ± 1.11) g, HFD 组小鼠体重为 (27.88 ± 1.76) g; 喂养 10 周后, Chow 组小鼠体重为 (27.53 ± 1.31) g, HFD 组小鼠体重为 (30.96 ± 2.33) g; 喂养 14 周后, Chow 组小鼠体重为 (28.73 ± 1.29) g, HFD 组小鼠体重为 (34.16 ± 3.13) g; 喂养 18 周后, Chow 组小鼠体重为 (28.54 ± 1.30) g, HFD 组小鼠体重为 (38.58 ± 3.99) g (图 1)。18 周建模结束后, HFD 组

体重比 Chow 组高 35.18% (>20%); 随后每组随机选取 2 只小鼠做肝油红 O 染色观察肝脂肪变性情况, 如图 2 显示, Chow 组肝无明显脂质沉积, HFD 组肝细胞内发生明显脂质沉积, 存在大量空泡样变, 表明 NAFLD 模型建立成功。

2.2 有氧运动改善 NAFLD 小鼠体重及心脏指数

8 周运动干预结束后, 与 Control 组相比, Model 组的终末体重极显著升高 (图 3, $P<0.001$), 且与干预前体重相比, 体重也显著性增长 ($P<0.01$); 与 Model 组相比, 经过中强度和高强度有氧训练后, 高脂喂养小鼠体重极显著降低 ($P<0.001$)。除体重增加外, Model 组小鼠心脏指数显著低于 Control 组 ($P<0.01$), 经过运动干预后, 与 Model 组相比, MICT 组小鼠心脏指数明显上升 ($P<0.05$), HIIT 组小鼠心脏指数呈上升趋势, 但无统计学意义 ($P>0.05$)。这表明 8 周的有氧运动和高脂饮食分别对体重和心脏指数的影响具有统计学意义。

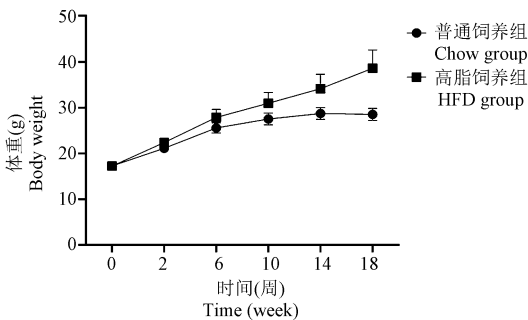


图 1 NAFLD 模型建立过程中体重的变化
Figure 1 Change of body weight during the establishment of NAFLD model

2.3 有氧运动对 NAFLD 小鼠心肌形态结构和功能影响

通过观察小鼠心肌 Masson 染色及计算心肌细胞胶原容积分数 (图 4) 发现, Control 组心肌内有少量胶原纤维分布。与 Control 组相比, Model 组小鼠心肌内胶原纤维含量极显著增加 ($P<0.01$); 经过 8 周运动干预后, 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组心肌内胶原纤维含量显著减少 ($P<0.05$)。进一步通过透射电镜观察小鼠心肌细胞内结构 (图 4) 发现, Control 组心肌结构较清晰, 肌纤维排列整齐, 肌小节明暗带分布均匀, z 线连续清晰 (黑色箭头), 线粒体结构完整 (红色箭头), 少见或不见脂滴 (黄色箭头); 与 Control 组相比, Model 组心肌肌纤维排列杂乱、断裂, 明暗带模糊、甚至消失, 心肌形态杂乱不堪, 线粒体肿胀、嵴发生断裂且模糊不清, 其中夹杂多个脂滴。经过 8 周运动干预后, 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组心肌肌纤维排列略有恢复, 明暗带、z 线清晰可见, 线粒体水肿、变性程度略有改善, 心肌形态较好恢复, 脂滴也略有减少, 其中, MICT 组改善效果优于 HIIT 组。以上结果表明, 长期高脂饮食可导致心肌大量胶原纤维沉积, 使心肌发生纤维化病理改变, 且可引起心肌细胞内肌纤维排列紊乱, 线粒体结构受损, 但经不同运动干预后, 均可有效减少心肌胶原沉积, 减少心肌纤维化, 并且可有效改善心肌肌纤维排列紊乱、恢复线粒体结构和功能。

2.4 有氧运动上调 NAFLD 小鼠心肌线粒体自噬

与 Control 组相比, Model 组小鼠心肌细胞内 PINK1 表达无明显变化 ($P>0.05$), 但 Parkin 表达水

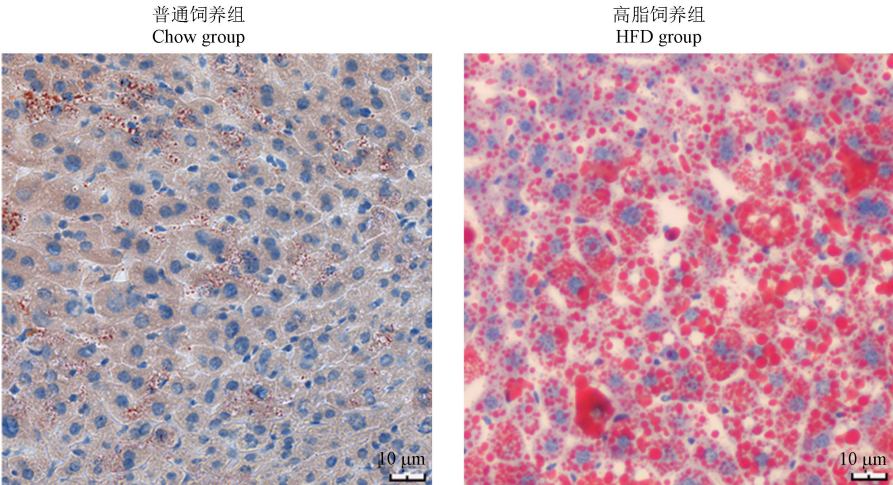
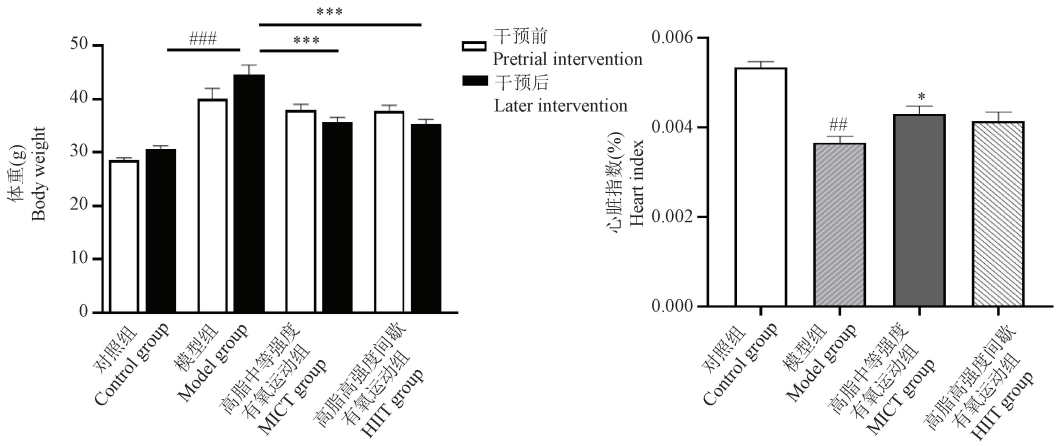


图 2 各组小鼠肝油红 O 染色 (18 周)
Figure 2 Liver oil red O staining of mice in each group (18 weeks)

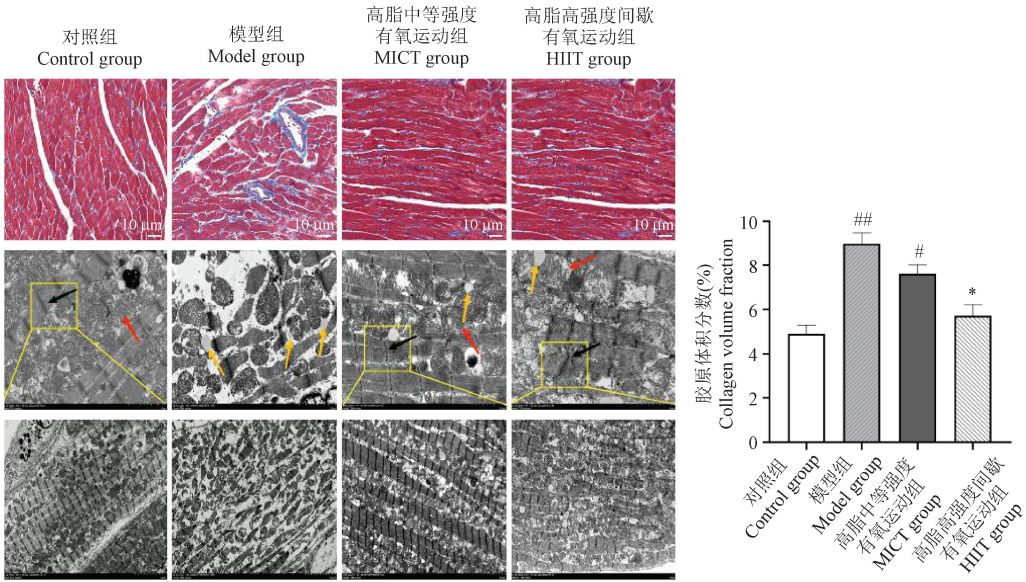


注:与 Control 组相比, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$;与 Model 组相比, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ 。

图 3 各组体重、心脏指数比较

Note. Compared with Control group, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$. Compared with Model group, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$.

Figure 3 Comparison of body weight and heart index in each group



注:黑色箭头代表肌节,红色箭头代表线粒体,黄色箭头代表脂滴。与 Control 组相比, $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与 Model 组相比, $^{*}P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠左心室 Masson 染色、透射电镜及心肌胶原体积统计分数

Note. Black arrows represent sarcomere, red arrows represent mitochondria and yellow arrows represent lipid droplets. Compared with Control group, $^{#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. Compared with Model group, $^{*}P<0.05$.

Figure 4 Masson staining, transmission electron microscopy and myocardial collagen volume statistical fraction in left atrial tissue of mice in each group

平极显著下调(图 5, $P<0.01$)。通过 8 周运动干预后,与 Model 组相比较,两个运动组心肌细胞 PINK1 表达水平均无显著性差异($P>0.05$),而在 MICT 组心肌细胞内 Parkin 活性被显著激活($P<0.05$),HIIT 组 Parkin 表达水平具有上调趋势,但无统计学意义。以上结果表明,长期高脂饮食可抑制小鼠心肌

内 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,导致功能障碍的线粒体积聚和心肌病的发展,而不同强度有氧运动均可恢复由 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,改善线粒体功能。

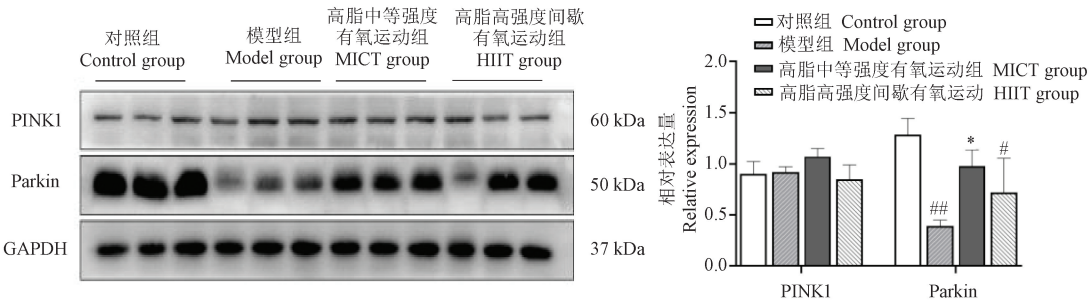
2.5 有氧运动促进对 NAFLD 小鼠心肌自噬

由于线粒体可通过一般自噬途径被清除,因此

我们进一步检测一般自噬及溶酶体相关指标 Beclin1、LC3、p62 和 LAMP1。如图 6 结果显示,与 Control 组相比,Model 组心肌细胞内 Beclin1 表达水平无明显变化($P>0.05$);而 LC3-II/LC3-I 比值和 p62 蛋白表达水平都显著上调($P<0.01$ 、 $P<0.05$),但 LAMP1 表达水平显著下降($P<0.01$),这些结果表明,长期高脂喂养小鼠,导致心肌细胞内自噬通量受阻,可能是由于阻断了溶酶体对内容物的降解,而不是自噬的启动。经过 8 周运动干预后,与 Model 组相比,两个运动组心肌细胞 Beclin1 表达无显著性差异($P>0.05$);MICT 组 p62 表达水平及 LC3-II/LC3-I 比值显著降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$),LAMP1 活性被显著激活($P<0.05$);HIIT 组 LC3-II/LC3-I 比值显著下降($P<0.05$)、p62 蛋白表达水平极显著下调($P<0.01$)、LAMP1 蛋白表达水平

具有上升趋势,但无显著性差异($P>0.05$)。以上结果表明,运动可增加高脂条件下心肌细胞中总的自噬通量,此外,还可显著增加高脂条件下 LAMP1 蛋白表达,促进自噬溶酶体降解。

由于线粒体平衡依赖于新线粒体的生成或受损线粒体的清除,因此我们又进一步检测线粒体生物发生相关蛋白 PGC-1 α 表达水平。与 Control 组相比,Model 组心肌细胞内 PGC-1 α 蛋白表达极显著下降($P<0.01$)。通过运动干预后,与 Model 组相比,两个运动组内 PGC-1 α 蛋白表达呈现上调趋势,但无统计学意义($P>0.05$)。综上所述,本实验推测高脂喂养的小鼠心脏中可能存在功能障碍的线粒体体积聚,其原因可能是由于心肌细胞清除线粒体的能力受损,而运动可以改善并恢复线粒体自噬正常水平。

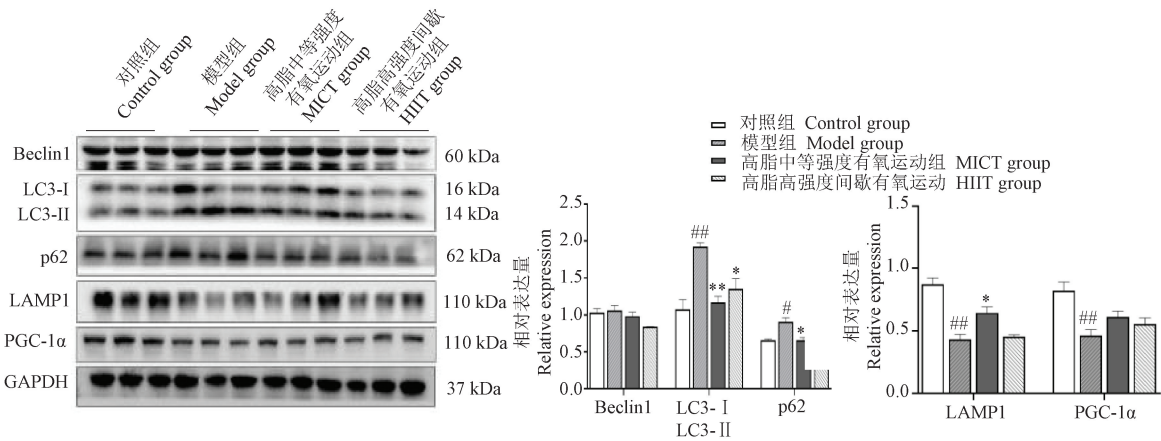


注:与 Control 组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与 Model 组相比, $^{*}P<0.05$ 。

图 5 Western blot 检测各组小鼠心肌内 PINK1 和 Parkin 蛋白表达水平

Note. Compared with Control group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. Compared with Model group, $^{*}P<0.05$.

Figure 5 Western blot detection of PINK1 and Parkin protein expression levels in mice myocardium of each group



注:与 Control 组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与 Model 组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 6 Western blot 检测各组小鼠心肌内自噬相关蛋白表达水平

Note. Compared with Control group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. Compared with Model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 6 Western blot detection of related autophagy protein expression levels in mice myocardium of each group

3 讨论

NAFLD 作为一种代谢性慢性疾病,长期高热量饮食可显著增加心血管疾病,造成心肌组织结构和功能的损害。Gonçalves 等^[13]研究证实 6 周高糖膳食饲养可诱导 Wistar 大鼠左右心室心肌肥大和心肌纤维化,表现为心肌僵硬增加和心脏舒张功能障碍;Wang 等^[14]研究同样发现进行 11 个月高脂膳食后小鼠呈现出明显的心肌肥大和心肌纤维化。本实验中,18 周高脂饮食可以引起 NAFLD 小鼠心脏指数显著增加,Masson 染色和透射电镜结果显示高脂组心肌内胶原纤维含量相比于对照组明显增加,且心肌纤维排列杂乱、断裂,明暗带模糊、甚至消失,心肌形态杂乱不堪,线粒体肿胀、嵴发生断裂且模糊不清,夹杂多个脂滴,说明经过 18 周高脂膳食饲养成的 NAFLD 小鼠呈现出明显的心肌结构的损害。研究表明,运动是改善 NAFLD 进展的重要方式,可延缓甚至逆转高脂环境下的心肌损伤^[15]。张磊等^[16]研究发现,在对肥胖 SD 大鼠进行 8 周跑台有氧运动可明显降低肥胖小鼠的心肌胶原沉积,改善心肌纤维化。另一项研究表明,8 周高脂饲养诱导的小鼠呈现心肌纤维化,但经过 8 周自主运动后,不仅心肌炎症受到抑制,心肌纤维化也因运动而减轻,心肌功能显著改善^[17]。该研究结果与上述研究结论一致,经过 8 周中强度和高强度间歇有氧运动后,两个运动组体重和心脏指数明显下降,心肌细胞胶原沉积减少,心肌纤维排列略有恢复,明暗带、Z 线清晰可见,线粒体水肿、变性程度略有改善,心肌形态较好恢复,脂滴也略有减少,并且中等强度有氧运动改善效果更为显著。以上结果表明,长期高脂饮食可导致心肌大量胶原纤维沉积,使心肌发生纤维化病理改变,且可引起心肌细胞内肌纤维排列紊乱,线粒体结构受损,但经有氧运动干预后,均可有效减少心肌胶原沉积,减少心肌纤维化,并且可有效改善心肌纤维排列紊乱、恢复线粒体结构和功能。

线粒体自噬是一种选择性自噬过程,可有效去除功能障碍或多余的线粒体^[18],并与自噬途径共享其核心分子机制。因为受损的线粒体导致活性氧的过量产生和细胞死亡^[19-20],通过线粒体吞噬选择性去除功能障碍的线粒体是维持线粒体稳态和保持细胞活力的重要机制。然而自噬的改变在代谢性心脏病中的功能作用仍有争议,或被抑制^[21-22],

或被激活^[23-24]。最近一项研究表明,进行 2 个月的高脂喂养可以激活小鼠心肌自噬,但这些小鼠却表现出心脏肥大、舒张功能障碍和脂质积聚^[25]。本研究发现高脂诱导的 NAFLD 小鼠心肌细胞表现出 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬下降,Beclin1 表达水平无变化,LC3-II/LC3-I 的比值、p62 表达水平的增加,LAMP1 蛋白水平的显著降低,提示小鼠心肌细胞中线粒体自噬受抑制,且自噬流受阻。这种自噬受损状态可能是由于高脂状态下心肌溶酶体对内容物的降解被阻断。因此,推断出 HFD 喂养的小鼠心脏中可能存在功能障碍的线粒体积累。但与此同时,本实验的另一结果表示高脂条件下线粒体生物发生相关蛋白 PGC-1 α 表达却显著减少,这个结果与 Mu 等^[26]研究结果一致,这说明高脂喂养的小鼠心肌线粒体的积累主要由于心肌细胞清除线粒体的能力受损。

目前有多项研究证实,运动训练在预防和改善心血管疾病方面发挥重要作用。Gonçalves 等^[27]研究表明,对 NAFLD 小鼠进行自由活动和耐力有氧训练干预,可有效恢复正常线粒体自噬及增加线粒体生物发生,且耐力训练优于自由训练。运动过程中自噬的调节是一个双向过程,合适的运动可刺激线粒体自噬通量,恢复细胞正常自噬功能,有效预防心功能受损,延缓代谢性心脏病的发展^[15]。在本研究中发现,经过 8 周有氧运动干预后,两个运动组均可增加高脂条件下心肌细胞中的自噬通量,上调新生心肌细胞中线粒体自噬、线粒体生物发生和溶酶体功能相关蛋白的表达,可有效维持非酒精性脂肪肝小鼠心肌中内环境稳态。

目前运动是治疗 NAFLD 便捷且安全的有效策略,但不同的运动形式可能会引起不同的效果。首先,本实验的研究结果提供了证据支持运动对 NAFLD 小鼠其他代谢器官有益,并发现长期高脂饮食可造成心肌结构损伤,抑制心肌自噬流量,损伤细胞清除线粒体的能力。其次,本研究认为两种运动方式均能恢复因长期高脂饮食造成的心肌细胞内自噬受损,促进心肌线粒体自噬,改善心肌纤维化,其中中等强度有氧运动改善效果更佳。这些结果为运动改善代谢性心脏病提供了新思路和实践基础。但本实验缺乏超声心动图直接评估实验中小鼠心脏功能,未能直接观察到不同运动方案改善心脏功能的情况,后续实验应继续补充完善。

参考文献:

[1] Gadiparthi C, Spatz M, Greenberg S, et al. NAFLD

- epidemiology, emerging pharmacotherapy, liver transplantation implications and the trends in the United States [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2020, 8(2): 215–221.
- [2] Mantovani A, Scorletti E, Mosca A, et al. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Metabolism*, 2020, 111: 154170.
- [3] Meng T, Lin S, Zhuang H, et al. Recent progress in the role of autophagy in neurological diseases [J]. *Cell Stress*, 2019, 3(5): 141–161.
- [4] Kubli DA, Gustafsson ÅB. Mitochondria and mitophagy: the Yin and Yang of cell death control [J]. *Circ Res*, 2012, 111(9): 1208–1221.
- [5] Cuthbertson DJ, Shojaaee-Moradie F, Sprung VS, et al. Dissociation between exercise-induced reduction in liver fat and changes in hepatic and peripheral glucose homeostasis in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Sci*, 2016, 130(2): 93–104.
- [6] Cassidy S, Thoma C, Hallsworth K, et al. High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(1): 56–66.
- [7] Luan X, Tian X, Zhang H, et al. Exercise as a prescription for patients with various diseases [J]. *J Sport Health Sci*, 2019, 8(5): 422–441.
- [8] Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, et al. Understanding key mechanisms of exercise-induced cardiac protection to mitigate disease: current knowledge and emerging concepts [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1): 419–475.
- [9] Fredrickson G, Barrow F, Dietsche K, et al. Exercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH [J]. *Mol Metab*, 2021, 53: 101270.
- [10] Winn NC, Liu Y, Rector RS, et al. Energy-matched moderate and high intensity exercise training improves nonalcoholic fatty liver disease risk independent of changes in body mass or abdominal adiposity-A randomized trial [J]. *Metabolism*, 2018, 78: 128–140.
- [11] 李娣, 陈锐, 陈嘉勤, 等. 有氧运动与黑狗黄酮干预酒精性肝损伤模型小鼠炎症因子的变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(32): 5197–5202.
- [12] Marcinko K, Sikkema SR, Samaan MC, et al. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity [J]. *Mol Metab*, 2015, 4(12): 903–915.
- [13] Gonçalves N, Silva AF, Rodrigues PG, et al. Early cardiac changes induced by a hypercaloric Western-type diet in “subclinical” obesity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(6): H655–H666.
- [14] Wang Z, Li L, Zhao H, et al. Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice [J]. *Metabolism*, 2015, 64(8): 917–925.
- [15] Wu NN, Tian H, Chen P, et al. Physical exercise and selective autophagy: benefit and risk on cardiovascular health [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1436.
- [16] 张磊, 严玉, 刘崑, 等. 8 周有氧运动改善肥胖诱导心肌纤维化过程中核因子 E2 相关因子 2 通路的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(17): 2650–2656.
- [17] Zhang H, Meng J, Yu H. Trimethylamine N-oxide supplementation abolishes the cardioprotective effects of voluntary exercise in mice fed a western diet [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 944.
- [18] Kubli DA, Gustafsson ÅB. Unbreak my heart: targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(17): 1527–1544.
- [19] Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling [J]. *Biochimie*, 2002, 84(2–3): 131–141.
- [20] Marchi S, Giorgi C, Suski JM, et al. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging [J]. *J Signal Transduct*, 2012, 2012: 329635.
- [21] Kanamori H, Takemura G, Goto K, et al. Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes [J]. *Autophagy*, 2015, 11(7): 1146–1160.
- [22] Sciarretta S, Zhai P, Shao D, et al. Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome [J]. *Circulation*, 2012, 125(9): 1134–1146.
- [23] Mellor KM, Bell JR, Young MJ, et al. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(6): 1035–1043.
- [24] Munasinghe PE, Riu F, Dixit P, et al. Type-2 diabetes increases autophagy in the human heart through promotion of Beclin-1 mediated pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 202: 13–20.
- [25] Tong M, Saito T, Zhai P, et al. Mitophagy is essential for maintaining cardiac function during high fat diet-induced diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2019, 124(9): 1360–1371.
- [26] Mu J, Zhang D, Tian Y, et al. BRD4 inhibition by JQ1 prevents high-fat diet-induced diabetic cardiomyopathy by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy *in vivo* [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 149: 1–14.
- [27] Gonçalves IO, Passos E, Diogo CV, et al. Exercise mitigates mitochondrial permeability transition pore and quality control mechanisms alterations in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Physiol Appliquee Nutr Metab*, 2016, 41(3): 298–306.