

内皮型一氧化氮合酶在运动预适应改善心肌缺血-再灌注损伤中的作用

娄国¹, 张艳², 付常喜³<https://doi.org/10.12307/2023.993>

投稿日期: 2022-12-01

采用日期: 2023-01-10

修回日期: 2023-04-04

在线日期: 2023-04-19

中图分类号:

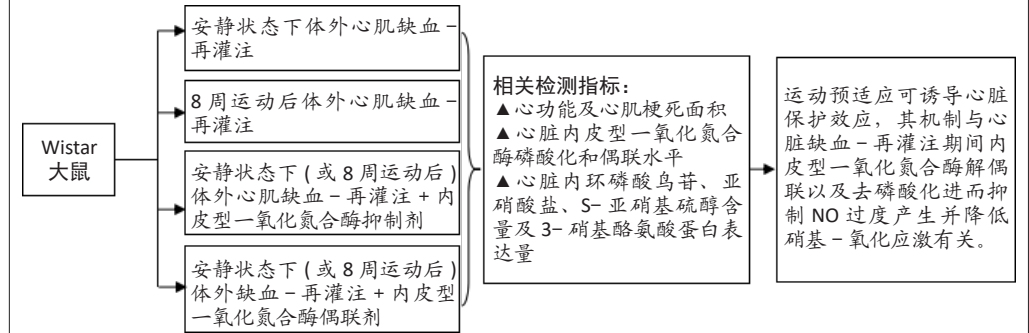
R459.9; R319; [G804.5]

文章编号:

2095-4344(2024)08-01283-06

文献标识码: B

文章快速阅读: 运动预适应改善心肌缺血-再灌注损伤的作用机制



文题释义:

运动预适应: 反复运动刺激诱导机体产生适应性变化, 机体对于随后的不良应激源(如缺血-再灌注)耐受性增强, 称为运动预适应, 这是运动促进健康、预防疾病的重要机制。

内皮型一氧化氮合酶解偶联: 内皮型一氧化氮合酶是一种同源二聚体酶(偶联), 在生理条件下催化L-精氨酸合成一氧化氮。当二聚体结构解离为单体时称为解偶联, 此时催化的生化反应发生变异, 其产物为超氧阴离子而非一氧化氮。

摘要

背景: 运动是防治各种心血管疾病并保护心脏免受缺血-再灌注损伤的有效策略, 其作用机制有待深入研究。

目的: 观察有氧运动预适应对心肌缺血-再灌注损伤的影响, 并探讨内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)激活(包括偶联和磷酸化)在其间的作用。

方法: 取80只成年Wistar大鼠, 采用随机数字表法分为安静组($n=40$)和运动组($n=40$), 运动组进行8周有氧运动, 安静组在鼠笼内安静饲养。8周后进行3项实验: ①实验1: 末次训练后, 检测大鼠心功能、心脏NO代谢物含量及心脏eNOS、磷酸化eNOS-S1177、eNOS二聚体、eNOS单体的蛋白表达量; ②实验2: 将大鼠分为安静对照组、运动对照组、安静+eNOS抑制剂组、运动+eNOS抑制剂组, 均进行体外心肌缺血-再灌注损伤实验, 安静+eNOS抑制剂组、运动+eNOS抑制剂组再灌注前10 min持续灌注eNOS抑制剂, 再灌注3 h后检测心功能与心肌梗死面积; ③实验3: 将大鼠分为安静对照组、运动对照组、安静+eNOS偶联剂组和运动+eNOS偶联剂组, 均进行体外心肌缺血-再灌注损伤实验, 安静+eNOS偶联剂组和运动+eNOS偶联剂组再灌注前10 min持续灌注eNOS偶联剂, 再灌注3 h后检测心肌梗死面积、心脏NO代谢物含量及心脏eNOS、磷酸化eNOS-S1177、eNOS二聚体、eNOS单体和3-硝基酪氨酸的蛋白表达量(其中, 磷酸化eNOS-S1177/eNOS比值反映eNOS磷酸化/去磷酸化水平, eNOS二聚体/单体比值反映eNOS偶联/解偶联水平)。

结果与结论: ①实验1: 与安静组比较, 运动组大鼠心输出量、左心室射血分数升高($P < 0.05$), 亚硝酸盐和S-亚硝基硫醇含量升高($P < 0.05$), 磷酸化eNOS-S1177、eNOS蛋白表达和磷酸化eNOS-S1177/eNOS比值上调($P < 0.05$), eNOS二聚体蛋白表达和eNOS二聚体/单体比值升高($P < 0.05$); ②实验2: 与安静对照组比较, 运动对照组左心室发展压升高($P < 0.05$), 心肌梗死面积下降($P < 0.05$); 与运动对照组比较, 运动+eNOS抑制剂组左心室发展压降低($P < 0.05$), 心肌梗死面积增加($P < 0.05$); ③实验3: 与安静对照组比较, 运动对照组左心室发展压升高($P < 0.05$), 心肌梗死面积下降($P < 0.05$), 磷酸化eNOS-S1177/eNOS比值下降($P < 0.05$), eNOS二聚体/单体比值下降($P < 0.05$), S-亚硝基硫醇含量增加($P < 0.05$), 3-硝基酪氨酸蛋白表达量下调($P < 0.05$); 与运动对照组比较, 运动+eNOS偶联剂组左心室发展压降低($P < 0.05$), 心肌梗死面积增加($P < 0.05$), 磷酸化eNOS-S1177/eNOS比值升高($P < 0.05$), eNOS二聚体/单体比值升高($P < 0.05$), 3-硝基酪氨酸蛋白表达升高($P < 0.05$); ④结果表明: 有氧运动预适应可诱导心脏保护效应, 其机制与心脏缺血-再灌注期间eNOS解偶联以及去磷酸化进而抑制NO过度产生并降低硝基-氧化应激有关。

关键词: 运动预适应; 内皮型一氧化氮合酶; 磷酸化/去磷酸化; 偶联/解偶联; 缺血-再灌注损伤; 硝基-氧化应激

缩略语: 内皮型一氧化氮合酶; endothelial nitric oxide synthase, eNOS

Role of endothelial nitric oxide synthase in exercise preconditioning-induced improvement of myocardial ischemia-reperfusion injury

Lou Guo¹, Zhang Yan², Fu Changxi³

¹Jiangsu Vocational Institute of Commerce, Nanjing 211168, Jiangsu Province, China; ²Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ³School of Physical Education, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, Jiangsu Province, China

Lou Guo, Master, Lecturer, Jiangsu Vocational Institute of Commerce, Nanjing 211168, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Fu Changxi, MD, Associate professor, School of Physical Education, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, Jiangsu Province, China

¹江苏经贸职业技术学院, 江苏省南京市 211168; ²广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市 530021; ³徐州工程学院体育学院, 江苏省徐州市 221008

第一作者: 娄国, 男, 1979年生, 山东省新泰市人, 汉族, 硕士, 讲师, 主要从事运动健康促进研究。

通讯作者: 付常喜, 博士, 副教授, 徐州工程学院体育学院, 江苏省徐州市 221008

<https://orcid.org/0000-0002-4369-0174> (娄国)

基金资助: 广西教育科学“十三五”规划课题(2017C386), 项目负责人: 张艳; 江苏省教育科学“十四五”规划课题(T-C/2021/14),

项目负责人: 付常喜; 江苏经贸职业技术学院“领军人才培养计划”项目(JYKJ2021-087MS), 项目负责人: 娄国

引用本文: 娄国, 张艳, 付常喜. 内皮型一氧化氮合酶在运动预适应改善心肌缺血-再灌注损伤中的作用[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(8):1283-1288.



Abstract

BACKGROUND: Exercise is an effective strategy to prevent and treat various cardiovascular diseases and protect the heart from ischemia-reperfusion injury. Its mechanism of action needs to be studied in depth.

OBJECTIVE: To observe the effect of aerobic exercise preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury and to explore the effect of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation (including coupling and phosphorylation).

METHODS: Eighty adult Wistar rats were randomly divided into sedentary ($n=40$) and exercise ($n=40$) groups. The rats in the exercise group were subjected to aerobic exercise for 8 weeks while those in the sedentary group were quietly fed and caged. After 8 weeks of intervention, three experiments were performed. (1) Experiment 1: After the last training, cardiac function, cardiac nitric oxide metabolite content and cardiac eNOS, phosphorylated eNOS-S1177, eNOS dimer and eNOS monomer protein expression levels were detected. (2) Experiment 2: Rats were divided into sedentary control group, exercise control group, sedentary+eNOS inhibitor group, exercise+eNOS inhibitor group, all of which were subjected to an *in vitro* myocardial ischemia-reperfusion injury experiment. eNOS inhibitor was continuously infused into the sedentary+eNOS inhibitor group and exercise+eNOS inhibitor group 10 minutes before reperfusion, and cardiac function and myocardial infarction area were detected 3 hours after reperfusion. (3) Experiment 3: Rats were divided into sedentary control group, exercise control group, sedentary+eNOS coupler group and exercise+eNOS coupler group, all of which were subjected to an *in vitro* myocardial ischemia-reperfusion injury experiment. The rats in the sedentary+eNOS coupler group and exercise+eNOS coupler group were treated with eNOS coupler. Myocardial infarction area, cardiac nitric oxide metabolite content, cardiac protein expression of eNOS, phosphorylated eNOS-S1177, eNOS dimer, eNOS monomer and 3-nitrotyrosine were detected 3 hours after reperfusion. The phosphorylated eNOS-S1177/eNOS ratio reflected the phosphorylated/dephosphorylated level of eNOS and eNOS dimer/monomer ratio reflected eNOS coupling/uncoupling level.

RESULTS AND CONCLUSION: Experiment 1: Compared with the sedentary group, the exercise group had increased cardiac output and left ventricular ejection fraction ($P < 0.05$), increased nitrite and S-nitrosothiol contents ($P < 0.05$), upregulated phosphorylated eNOS-S1177, eNOS protein expression and phosphorylated eNOS-S1177/eNOS ratio ($P < 0.05$), eNOS dimer protein expression and eNOS dimer/monomer ratios were elevated ($P < 0.05$). Experiment 2: Compared with the sedentary control group, left ventricular development pressure increased ($P < 0.05$) and myocardial infarct area decreased ($P < 0.05$) in the exercise control group. Compared with the exercise control group, left ventricular development pressure decreased ($P < 0.05$) and myocardial infarct area increased ($P < 0.05$) in the exercise+eNOS inhibitor group. Experiment 3: Compared with the sedentary control group, the exercise control group had increased left ventricular development pressure ($P < 0.05$), decreased myocardial infarct area ($P < 0.05$), decreased phosphorylated eNOS-S1177/eNOS ratio ($P < 0.05$), decreased eNOS dimer/monomer ratio ($P < 0.05$), increased S-nitrosothiol content ($P < 0.05$), and decreased 3-nitrotyrosine protein expression ($P < 0.05$). Compared with the exercise control group, the exercise+eNOS coupler group had decreased left ventricular development pressure ($P < 0.05$), increased myocardial infarct area ($P < 0.05$), increased phosphorylated eNOS-S1177/eNOS ratio ($P < 0.05$), increased eNOS dimer/monomer ratio ($P < 0.05$), and elevated 3-nitro tyrosine protein expression ($P < 0.05$). To conclude, aerobic exercise preconditioning could induce cardioprotection, which is related to uncoupling and dephosphorylation of eNOS during cardiac ischemia-reperfusion, thereby inhibiting the excessive production of nitric oxide and reducing nitro-oxidative stress.

Key words: exercise preconditioning; endothelial nitric oxide synthase; phosphorylation/dephosphorylation; coupling/uncoupling; ischemia-reperfusion injury; nitro-oxidative stress

Funding: Guangxi Educational Science "13th Five-Year Plan" Project, No. 2017C386 (to ZY); Jiangsu Province Education Science "14th Five-Year Plan" Project, No. T-C/2021/14 (to FCX); "Leading Talent Training Program" of Jiangsu Vocational Institute of Commerce, No. JYKJ2021-087MS (to LG)

How to cite this article: LOU G, ZHANG Y, FU CX. Role of endothelial nitric oxide synthase in exercise preconditioning-induced improvement of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(8):1283-1288.

0 引言 Introduction

一氧化氮(NO)对于维持心血管功能具有重要作用^[1]。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)是一种同源二聚体酶,生理条件下催化L-精氨酸合成NO^[2],这一生化反应需要辅因子四氢生物蝶呤参与^[3]。当四氢生物蝶呤水平下降时,eNOS发生解偶联(即二聚体结构解离为单体),此时催化的生化反应发生变异,其产物为超氧阴离子而非NO^[4]。超氧阴离子与局部NO反应生成具有强细胞毒性的过氧亚硝酸盐,从而进一步下调NO含量、加重氧化应激并形成恶性循环^[5]。此外,eNOS活性同时还受到多个位点磷酸化的调节,其中丝氨酸-S1177是该酶的主要激活位点^[2]。因此,eNOS偶联和磷酸化是其活性的主要调节方式。

反复规律运动(即运动预适应)可保护心脏免受缺血-再灌注损伤^[6],但具体机制仍不清楚。研究发现,当eNOS/NO途径激活时如eNOS过表达^[7]、NO给药或补充四氢生物蝶呤(促进eNOS偶联)^[8-9],心脏对缺血-再灌注损伤的易感性降低,提示eNOS信号通路在心脏保护中发挥重要作用。实验证实,长期规律运动可上调心脏静息状态下的eNOS表达量和/或磷酸化水平,抑制eNOS解偶联,进而增加NO含量^[10-15],NO通过环磷酸鸟苷信号转导通路或蛋白质S-亚硝基化作用对心脏起保护作用^[16-17]。然而,缺血-再灌注(应激状态下)期间eNOS/NO与运动诱导的心脏保护之间的确切关系尚未阐明,仍存争议。因此,此次研究旨在探讨有氧运动预适应对心脏缺血-再灌注损伤的影响,并探讨eNOS激活(包括偶联和磷酸化)在其中的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,组间比较采用单因素方差分析,多重比较使用LSD检验。

1.2 时间及地点 实验于2021年7-12月在广西中医药大学运动生理实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 80只雄性Wistar大鼠,3月龄,体质量(210±15)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2018-0027。大鼠饲养环境:温度24-26℃,湿度50%-60%,12h/12h明暗周期,分笼(5只/笼)标准饲料饲养,自由进食水。实验获得广西中医药大学伦理委员会批准(批准号:E2021-03-005)。实验过程遵循了国际兽医编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 实验试剂与仪器 1%戊巴比妥钠(江苏恒瑞医药有限公司);eNOS特异性抑制剂L-亚氨基乙基鸟氨酸、eNOS偶联剂四氢生物蝶呤、氯化三苯基四氮唑溶液(美国Sigma公司);eNOS、3-硝基酪氨酸、GAPDH一抗(Santa cruz公司);磷酸化eNOS-S1177、eNOS二聚体、eNOS单体一抗(Abcam公司);二抗(武汉博士德生物工程有限公司);超声成像系统(VisualSonics Vevo 3100,加拿大);FT-200动物跑步机(成都泰盟科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 按照随机数字表法将80只大鼠分为安静组和运动组,每组40只,运动组进行8周有氧运动,安静组在鼠笼内安静饲养,8周干预后根据研究目的分别进行如下

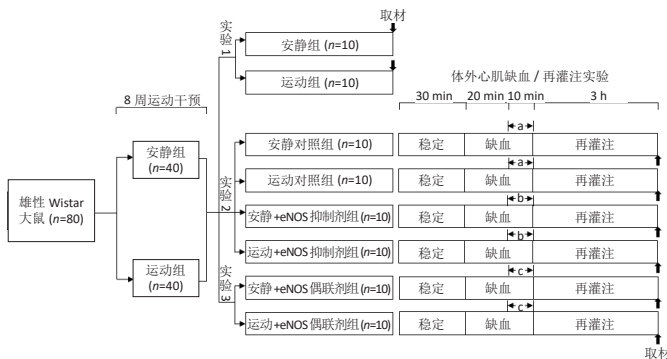
3 个实验。

实验 1: 为探讨运动对静息状态下心脏 eNOS/NO 信号途径的影响, 每组随机取 10 只动物, 末次训练后 48 h 测定心功能, 随后取心脏测定 eNOS 蛋白表达量、eNOS 磷酸化、eNOS 解偶联以及 NO 代谢物 (环磷酸鸟苷、亚硝酸盐、S-亚硝基硫醇) 含量。

实验 2: 为检验缺血-再灌注期间 eNOS 的作用, 安静组和运动组各随机取 20 只大鼠分为安静对照组、运动对照组、安静 +eNOS 抑制剂组、运动 +eNOS 抑制剂组, 每组 10 只。4 组进行体外心脏缺血-再灌注实验, 再灌注前 10 min, 安静 +eNOS 抑制剂组和运动 +eNOS 抑制剂组给予 eNOS 特异性抑制剂 L-亚氨基乙基鸟氨酸处理, 安静对照组和运动对照组给予等量生理盐水。实验后测定心功能 (左心室发展压) 和心肌梗死面积。

实验 3: 为进一步探讨缺血-再灌注期间 eNOS 在运动发挥心脏保护中的作用, 每组取剩余的 10 只动物分为安静 +eNOS 偶联剂组和运动 +eNOS 偶联剂组, 每组 10 只, 进行体外心脏缺血-再灌注实验, 再灌注前 10 min, 两组给予 eNOS 促偶联剂四氢生物蝶呤处理 (注: 数据统计时, 相应的对照组采用实验 2 中的安静对照组和运动对照组)。缺血-再灌注实验过程中测定左心室发展压, 实验后检测心肌梗死面积、eNOS 蛋白表达量、eNOS 磷酸化、eNOS 解偶联、NO 代谢物 (环磷酸鸟苷、亚硝酸盐、S-亚硝基硫醇) 含量以及 3-硝基酪氨酸的蛋白表达量。

整体实验流程图见图 1 所示。



图注: eNOS 为内皮型一氧化氮合酶。对实验 3 进行数据统计时, 相应的对照组采用实验 2 中的安静对照组和运动对照组。a 代表灌注生理盐水, b 代表灌注 L-亚氨基乙基鸟氨酸, c 代表灌注四氢生物蝶呤

图 1 | 实验流程图

Figure 1 | Experimental flow chart

1.4.2 大鼠运动方案 运动组所有动物先进行 5 d 适应性跑台训练, 方案为: 速度 5-15 m/min, 坡度 0°, 时间 10-20 min/d。适应性训练结束后, 参照课题组前期建立的方法利用递增负荷跑台运动测试获取大鼠最大跑台速度, 方案如下^[18]: 坡度为 0°, 起始负荷为 5 m/min, 每 2 min 递增 1.5 m/min, 直至力竭, 记录最大跑台速度。运动组大鼠随后进行 8 周跑台运动训练, 运动强度为最大跑台速度的 60%, 运动时间为 60 min/d, 每周训练 5 d。分别于第 4, 6 周重新测定最大跑速以调整训练强度。

1.4.3 大鼠体外心脏缺血-再灌注实验与取材 末次训练后 48 h, 安静组和运动组每组随机取 10 只动物, 麻醉后利用超声心动图测定心功能 (指标包括心输出量和左心室射血分数), 随后取心脏, 待测 NO 代谢物含量以及相关蛋白表达量。

取剩余 60 只大鼠随机分为 6 组 (详见实验分组): 安静对照组、运动对照组、安静 +eNOS 抑制剂组、运动 +eNOS 抑制剂组、安静 +eNOS 偶联剂组和运动 +eNOS 偶联剂组, 每组 10 只。采用 Langendorff 离体灌注系统建立大鼠体外心脏缺血/再灌注模型^[19]: 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (0.06 g/kg) 麻醉大鼠, 固定在恒温手术台, 快速暴露心脏并分离, 固定于 Langendorff 灌注装置, 用 Krebs-Henseleit(K-H) 液常规恒压 (10.108 kPa) 灌注, 以体积分数 95%O₂+5%CO₂ 饱和, 维持灌注液温度 37 °C; 将已定标的双压力 Millar 导管经右颈总动脉插入到大鼠左心室内, 手术线固定, 连接 LabChart 8 数据采集系统, 监测左心室收缩压和左心室舒张压, 计算左心室发展压 (左心室收缩压-左心室舒张压) 作为体外心脏心功能参数; 各组心脏均稳定 30 min 后, 局部结扎冠状动脉左前降支模拟缺血 30 min, 松开结扎线再灌注 3 h; 再灌注开始前 10 min, 安静 +eNOS 抑制剂组和运动 +eNOS 抑制剂组大鼠给予 eNOS 特异性抑制剂 L-亚氨基乙基鸟氨酸 (10 μmol/L) 持续灌注, 安静 +eNOS 偶联剂组和运动 +eNOS 偶联剂组给予 eNOS 偶联剂四氢生物蝶呤 (50 μmol/L) 持续灌注, 安静对照组和运动对照组持续灌注生理盐水。在整个实验过程中以记录心脏插管灌注后 30 min 时的稳定数据作为左心室发展压基础值, 随后分别记录给药后固定时间点 (给药 10, 30, 60 min) 的数据, 计算给药后各时间点数据相对于灌注 30 min 时基础值的百分率。实验结束后将心脏分为两部分, 一部分染色后用于评估心肌梗死面积, 另一部分迅速投入液氮中并转移至 -80 °C 低温冰箱冻存, 待测 NO 代谢物含量以及相关蛋白表达量。

1.4.4 心肌梗死面积评估 取心脏沿垂直于心脏长轴的方向切取 2 mm 左右的组织片, 置于 2% 氯化三苯基四氮唑溶液中, 37 °C 避光孵育 30 min, 然后用 40 g/L 多聚甲醛固定。缺血区呈苍白色、未缺血区呈砖红色。拍照后用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量面积, 心肌梗死面积比例 = 白色区面积 ÷ 总面积 × 100%。

1.4.5 心脏 NO 代谢物含量测定 采用分光光度法于 540 nm 处测定亚硝酸盐含量, 酶联免疫吸附法测定环磷酸鸟苷含量, 高效液相色谱法测定 S-亚硝基硫醇含量 (代表蛋白质 S-亚硝基化反应)。

1.4.6 心脏相关蛋白表达量检测 采用免疫印迹法检测心脏 eNOS、磷酸化 eNOS-S1177、eNOS 二聚体、eNOS 单体、3-硝基酪氨酸的蛋白表达量。取适量心肌组织匀浆后, 4 °C 下 12 000×g 离心 5 min, 取上清, 采用考马斯亮蓝测定总蛋白质浓度。取 50 μg 蛋白样品在垂直电泳仪上经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 随后转移至聚偏二氟乙烯膜上。加入一抗 [eNOS(1 : 2 000)、磷酸化 eNOS-S1177(1 : 1 000)、eNOS 二聚体 (1 : 1 000)、eNOS 单体 (1 : 1 000)、3-硝基

酪氨酸 (1 : 2 000)] 后 4 °C 静置孵育过夜, 二抗 (1 : 5 000) 37 °C 孵育 2 h。充分洗涤后, 使用增强化学发光试剂盒发光成像, 凝胶成像系统拍照, Image-Pro Plus 6.0 软件测定各条带吸光度值。内参蛋白为 GAPDH(1 : 10 000), 将目的蛋白吸光度值与 GAPDH 的比值作为目的蛋白相对表达量, 计算各组各蛋白相对表达量与安静组或安静对照组的比值作为相对表达率。

1.5 主要观察指标 安静组和运动组大鼠心功能、心脏 NO 代谢物含量及心脏 eNOS、磷酸化 eNOS-S1177、eNOS 二聚体、eNOS 单体的蛋白表达量; 安静对照组、运动对照组、安静 + eNOS 抑制剂组、运动 + eNOS 抑制剂组心功能与心肌梗死面积; 安静对照组、运动对照组、安静 + eNOS 偶联剂组和运动 + eNOS 偶联剂组心肌梗死面积、心脏 NO 代谢物含量及心脏 eNOS、磷酸化 eNOS-S1177、eNOS 二聚体、eNOS 单体和 3-硝基酪氨酸的蛋白表达量。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件包对数据进行统计学处理与分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 多重比较使用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经广西中医药大学生物统计学专家审核。

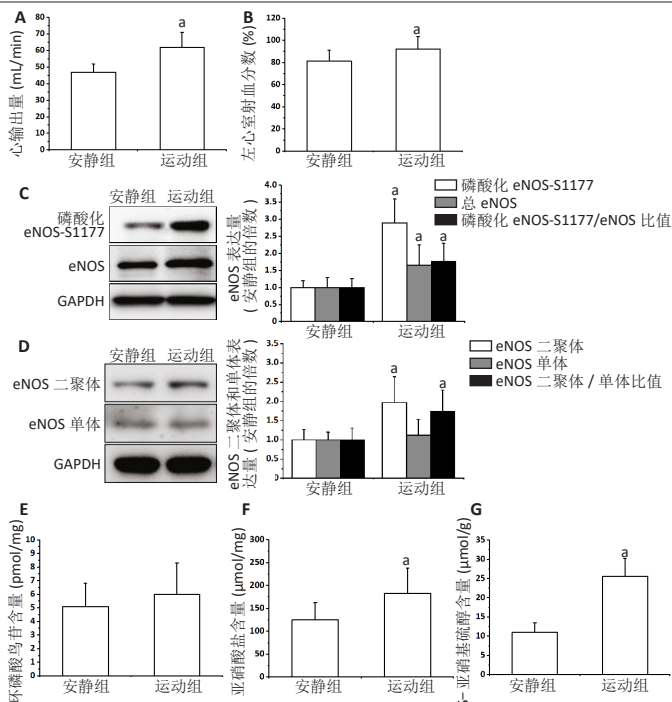
2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 80 只大鼠全部进入结果分析。

2.2 实验 1: 运动对静息状态下心功能及心脏 eNOS/NO 信号途径的影响 与安静组比较, 运动组大鼠心输出量、左心室射血分数升高 (P < 0.05), 磷酸化 eNOS-S1177、eNOS 蛋白表达和磷酸化 eNOS-S1177/eNOS 比值上调 (P < 0.05), eNOS 二聚体蛋白表达和 eNOS 二聚体 / 单体比值升高 (P < 0.05), 亚硝酸盐和 S-亚硝基硫醇含量升高 (P < 0.05), 见图 2。

2.3 实验 2: 缺血 - 再灌注期间 eNOS 的作用 与安静对照组比较, 运动对照组左心室发展压升高 (P < 0.05), 心肌梗死面积下降 (P < 0.05); 与运动对照组比较, 运动 + eNOS 抑制剂组左心室发展压降低 (P < 0.05), 心肌梗死面积增加 (P < 0.05), 见图 3。

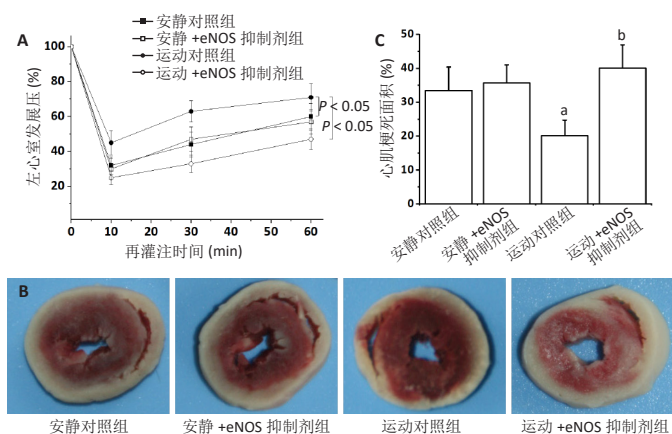
2.4 实验 3: 缺血 - 再灌注期间 eNOS 在运动发挥心脏保护中的作用 与安静对照组比较, 运动对照组左心室发展压升高 (P < 0.05), 心肌梗死面积下降 (P < 0.05), 磷酸化 eNOS-S1177 蛋白表达和磷酸化 eNOS-S1177/eNOS 比值下降 (P < 0.05), eNOS 二聚体蛋白表达下降 (P < 0.05), eNOS 单体蛋白表达升高 (P < 0.05), eNOS 二聚体 / 单体比值下降 (P < 0.05), S-亚硝基硫醇含量增加 (P < 0.05), 3-硝基酪氨酸蛋白表达下调 (P < 0.05); 与运动对照组比较, 运动 + eNOS 偶联剂组左心室发展压降低 (P < 0.05), 心肌梗死面积增加 (P < 0.05), 磷酸化 eNOS-S1177 蛋白表达和磷酸化 eNOS-S1177/eNOS 比值升高 (P < 0.05), eNOS 二聚体蛋白表达升高 (P < 0.05), eNOS 单体蛋白表达下降 (P < 0.05), eNOS 二聚体 / 单体比值升高 (P < 0.05), 3-硝基酪氨酸蛋白表达升高 (P < 0.05); 各组环磷酸鸟苷、S-亚硝基硫醇和亚硝酸盐含量比较差异均无显著性意义 (P > 0.05), 见图 4。



图注: A 为心输出量; B 为左心室射血分数; C 为 eNOS 蛋白表达量; D 为 eNOS 二聚体和单体蛋白表达量; E 为环磷酸鸟苷含量; F 为亚硝酸盐含量; G 为 S-亚硝基硫醇含量。与安静组比较, ^aP < 0.05

图 2 | 运动对静息状态下大鼠心功能及心脏内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)/NO 信号途径的影响

Figure 2 | Effects of exercise on resting cardiac function and cardiac endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide signaling pathway in rats

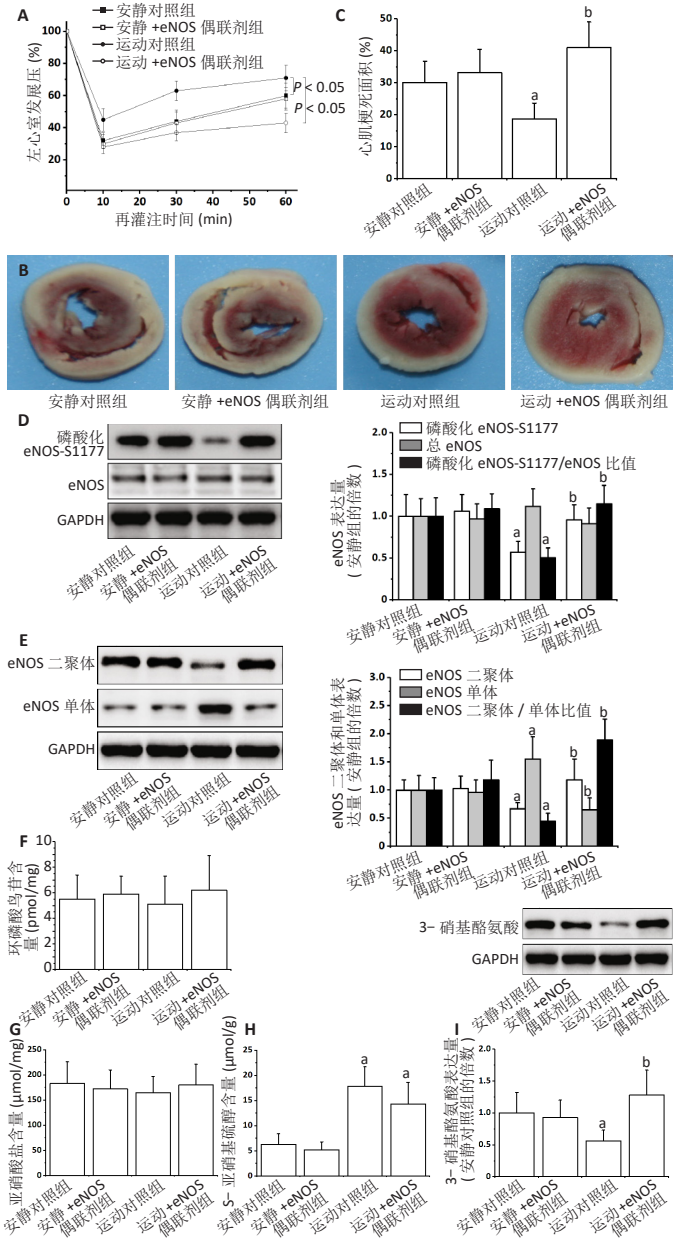


图注: A 为各组左心室发展压比较; B 为心脏氯化三苯基四氮唑染色; C 为各组心肌梗死面积比较。与安静对照组比较, ^aP < 0.05; 与运动对照组比较, ^bP < 0.05

图 3 | 缺血 - 再灌注期间各组心脏内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的作用
Figure 3 | The role of endothelial nitric oxide synthase during cardiac ischemia-reperfusion

3 讨论 Discussion

此次研究的主要发现是: ①运动通过提升静息状态下心脏 eNOS 磷酸化和偶联水平活化 eNOS 并增加 NO 利用度, 进而改善大鼠安静时的心功能; ②运动预适应减轻体外心脏缺血 - 再灌注损伤, 通过 eNOS 抑制剂处理则抵消了运动的益处, 说明 eNOS 在运动诱导的心脏保护中起关键作用; ③出乎意料的是, 运动对照组大鼠心脏缺血 - 再灌注期间 eNOS 发生解偶联和去磷酸化, 然而 NO 生物利用度增加、3-硝基酪氨酸表达量降低; 利用四氢生物蝶呤稳定 eNOS 二聚体 (即抑制



图注: A 为各组左心室发展压比较; B 为心脏氯化三苯基四氮唑染色; C 为各组心肌梗死面积比较; D 为各组 eNOS 蛋白表达量比较; E 为各组 eNOS 二聚体和单体蛋白表达量比较; F 为各组环磷酸鸟苷含量比较; G 为各组亚硝酸盐含量比较; H 为各组 S-亚硝基硫醇含量比较; I 为各组 3-硝基酪氨酸蛋白表达量比较。与安静对照组比较, ^a*P* < 0.05; 与运动对照组比较, ^b*P* < 0.05

图 4 | 缺血-再灌注期间内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 在运动发挥心脏保护中的作用

Figure 4 | The mechanism of endothelial nitric oxide synthase in exercise-induced cardiac protection during cardiac ischemia-reperfusion

eNOS 解偶联) 并促进其磷酸化未改善 NO 生物利用度, 但却增加 3-硝基酪氨酸表达量, 进而造成硝基-氧化应激并阻断运动诱导的心脏保护效应。因此, 有氧运动预适应诱导的心脏保护效应与缺血-再灌注期间 eNOS 解偶联和去磷酸化有关。

规律运动能够改善静息状态下的心功能, 这在先前的多项研究中均得到证实^[18, 20], NO 是介导这一过程的关键因子^[2]。在此次研究中, 运动组 eNOS 总蛋白、磷酸化 eNOS-S1177/eNOS 比值以及二聚体/单体比值上调, 环磷酸鸟苷、亚硝

酸盐和 S-亚硝基硫醇含量增加, 心输出量、左心室射血分数升高, 说明运动通过促进 eNOS 表达、磷酸化以及偶联水平活化 eNOS, 促进 NO 合成并增加心脏基线水平 NO 代谢储存, 进而通过环磷酸鸟苷信号转导通路以及蛋白质 S-亚硝基化作用改善心功能^[16-17]。

运动同时也是保护心脏免受缺血-再灌注损伤的有效策略^[1]。在此次研究中, 运动预适应对心脏产生保护效应, 表现为运动对照组大鼠缺血-再灌注时左心室发展压升高, 心肌梗死面积下降, 即缺血-再灌注损伤程度减轻。利用 eNOS 特异性抑制剂灌注后阻断了运动的益处, 而安静对照组 eNOS 受抑后心肌梗死面积无显著变化, 提示 eNOS 在运动诱导的心脏保护中起关键作用, 然而这一过程中 eNOS 的具体调节机制尚不明确。磷酸化和二聚化 (偶联) 是 eNOS 激活的主要调节方式, 也是运动诱导心脏保护的重要因素, 然而出乎意料的是, 运动对照组心肌缺血-再灌注期间磷酸化 eNOS-S1177/eNOS 比值和二聚体/单体比值下降, 提示发生 eNOS 去磷酸化以及 eNOS 解偶联。CHEN 等^[21]的研究认为, eNOS 在 S1177 位点处磷酸化水平上调有利于 eNOS 在应激时的解偶联; ARAGÓN 等^[22]报道, 安静动物注射肾上腺素诱导 eNOS-S1177 磷酸化可减轻心脏缺血-再灌注损伤。结合此次研究结果, 作者认为缺血-再灌注时 eNOS 解偶联和去磷酸化是一种特异性运动依赖机制, eNOS 解偶联将造成酶结构变异并破坏其磷酸化位点。eNOS 解偶联可能是由于缺血期间四氢生物蝶呤含量降低造成的, 有研究证实, 四氢生物蝶呤减少与血流限制时间呈正比^[23]。四氢生物蝶呤是 eNOS 二聚体的必需辅因子, 其含量下降直接导致 eNOS 解偶联以及去磷酸化^[4]。随后, 为阐明 eNOS 解偶联和去磷酸化在运动诱导的心脏保护中的确切作用, 采用 eNOS 偶联剂四氢生物蝶呤灌注离体心脏, 结果发现灌注四氢生物蝶呤的运动组大鼠 (运动+eNOS 偶联剂组) eNOS 偶联和磷酸化得以维持, 但令人意外的是, 心肌梗死面积增加、心肌功能下降, 表明 eNOS 解偶联和去磷酸化是运动性心脏对抗缺血-再灌注损伤所必需的。

通常情况下, eNOS 解偶联和去磷酸化导致 NO 含量减少^[5]。在此次研究中, 运动对照组磷酸化 eNOS-S1177/eNOS 比值和 eNOS 二聚体/单体比值下降, S-亚硝基硫醇含量升高, 环磷酸鸟苷和亚硝酸盐含量则不变, 提示缺血-再灌注时 eNOS 解偶联和去磷酸化并未影响 NO 的生物利用度。由于心肌缺血期间 NO 主要来源于 NO 代谢物而非 eNOS 活性^[24], 因此推测, 运动组静息状态下 (基线水平) 心脏产生的较高含量的 NO 代谢物作为 NO 储备是缺血和再灌注期间维持 NO 利用度的重要来源。亚硝酸盐和 S-亚硝基硫醇既是 NO 的代谢产物, 也是 NO 的重要供体, 参与 NO 的储存和转运^[2]。此外, S-亚硝基硫醇是含巯基蛋白质亚硝基化的产物, 而 S-亚硝基化是蛋白质重要的翻译后修饰方式, 可增强蛋白活性、参与对信号转导的调节, 同时也是诱导心脏保护效应的关键触发因素^[25]。

研究证实, eNOS 解偶联时催化的生化反应发生变异, 其产物是超氧阴离子而非 NO, 超氧阴离子可直接与 NO 反应生成毒性更强的过氧亚硝酸盐并造成硝基-氧化应激^[5]。

过氧化硝酸盐具有强氧化和硝基化作用，可硝基化蛋白质中的酪氨酸残基生成 3-硝基酪氨酸，从而改变一些重要酶蛋白的活性、损伤线粒体及诱导细胞凋亡和死亡，因此，3-硝基酪氨酸是过氧化硝酸盐的生物标志物^[26]。结合此次研究结果推测，在缺血-再灌注期间，NO 的保护或有害作用可能主要取决于 NO 和超氧阴离子的相对含量。此次研究中，运动对照组 3-硝基酪氨酸蛋白表达量较安静对照组下降，提示 eNOS 去磷酸化以及解耦联可能限制了 NO 和自由基过量产生，进而减轻 NO 和超氧阴离子之间的毒性反应。运动组灌注四氢生物蝶呤后（运动 +eNOS 偶联剂组），eNOS 重新偶联和磷酸化，这可能导致 NO 过量产生，然而过量的 NO 水平并未提高 NO 利用度，而是增加了硝基-氧化应激水平，表明过量的 NO 迅速与再灌注时释放的自由基反应形成过氧化硝酸盐，进而削弱了运动的保护作用。因此，运动诱导的 eNOS 解耦联和去磷酸化有助于防止 NO 与超氧阴离子反应形成过氧化硝酸盐，降低硝基-氧化应激，进而发挥心脏保护效应。尽管研究证实，未经训练的大鼠在缺血期间通过补充四氢生物蝶呤促进 eNOS 重新偶联有助于改善缺血后的心功能恢复^[11]，但结合此次研究结果提示，经过规律训练后补充四氢生物蝶呤应持谨慎态度，具体效应和机制尚需深入研究。

现将 eNOS 在运动预适应诱导心脏保护中的可能作用机制总结如下：规律运动促进 eNOS 表达、磷酸化以及偶联水平活化 eNOS，催化 NO 合成并增加心脏基线水平 NO 代谢储存，进而通过环磷酸鸟苷信号转导通路以及蛋白质 S-亚硝基化作用改善心功能。在缺血-再灌注过程中，eNOS 发生解耦联和去磷酸化，但 NO 利用率仍维持较高水平，表明 NO 合成主要依赖于储存的 NO 代谢物；此时 NO 维持在生理剂量，通过蛋白质 S-亚硝基化作用对心脏起保护效应。在缺血-再灌注过程中使用 eNOS 偶联剂四氢生物蝶呤处理后导致 NO 过量产生，但并未增加 NO 利用率，而是通过与超氧阴离子反应生成过氧化硝酸盐，增加硝基-氧化应激水平，从而削弱了运动的保护作用。

研究尚存在些许不足之处：第一，eNOS 在冠状动脉内皮细胞中高表达，有助于调节冠状动脉血流量^[27]，但内皮细胞在运动性心脏保护中的作用尚不明确；第二，研究证实未经规律训练的大鼠在心脏体外缺血-再灌注过程中补充四氢生物蝶呤有助于减轻心肌损伤^[11]，然而此次研究中安静 +eNOS 偶联剂组并未观察到类似效应，可能与使用的四氢生物蝶呤剂量较低有关；第三，在缺血-再灌注过程中尚存在诸多环节（如缺血早期、缺血晚期、再灌注早期、再灌注晚期）^[28]，不同环节可能存在不同的生物学机制，研究并未细化上述环节。

结论：有氧运动预适应可诱导心脏保护效应，其机制与心脏缺血-再灌注期间 eNOS 解耦联以及去磷酸化进而抑制 NO 过度产生并降低硝基-氧化应激有关。

作者贡献：晏国和付常喜进行实验设计，实验实施为晏国、张艳和付常喜，实验评估为张艳，资料收集为晏国、晏国成文，付常喜审核。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商

业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- ORAL O. Nitric oxide and its role in exercise physiology. *J Sports Med Phys Fitness*. 2021;61(9):1208-1211.
- WU Y, DING Y, RAMPRASATH T, et al. Oxidative stress, gtpch1, and endothelial nitric oxide synthase uncoupling in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2021;34(9):750-764.
- CHANNON KM. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide synthase recouplers. *Handb Exp Pharmacol*. 2021;264:339-352.
- HONG FF, LIANG XY, LIU W, et al. Roles of eNOS in atherosclerosis treatment. *Inflamm Res*. 2019;68(6):429-441.
- FARIA A, PERSAUD SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2017;172:50-62.
- QUINDRY JC, FRANKLIN BA. Exercise preconditioning as a cardioprotective phenotype. *Am J Cardiol*. 2021;148:8-15.
- JONES SP, GREER JJ, KAKKAR AK, et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(1):H276-282.
- LEE JW, LEE DH, PARK JK, et al. Sodium nitrite-derived nitric oxide protects rat testes against ischemia/reperfusion injury. *Asian J Androl*. 2018;21(1):92-97.
- WANG C, QIAO S, HONG L, et al. NOS cofactor tetrahydrobiopterin contributes to anesthetic preconditioning induced myocardial protection in the isolated ex vivo rat heart. *Int J Mol Med*. 2020;45(2):615-622.
- SANTANA M, SOUZA DS, MIGUEL-DOS-SANTOS R, et al. Resistance exercise mediates remote ischemic preconditioning by limiting cardiac eNOS uncoupling. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;125:61-72.
- COUTO GK, PAULA SM, GOMES-SANTOS IL, et al. Exercise training induces eNOS coupling and restores relaxation in coronary arteries of heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(4):H878-887.
- HASEGAWA N, FUJIE S, HORII N, et al. Effects of different exercise modes on arterial stiffness and nitric oxide synthesis. *Med Sci Sports Exerc*. 2018;50(6):1177-1185.
- FARAH C, NASCIMENTO A, BOLEA G, et al. Key role of endothelium in the eNOS-dependent cardioprotection with exercise training. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;102:26-30.
- ACIKEL ELMAS M, CAKICI SE, DUR IR, et al. Protective effects of exercise on heart and aorta in high-fat diet-induced obese rats. *Tissue Cell*. 2019;57:57-65.
- 王英伟, 曹永刚, 孟丽娜, 等. 游泳对心肌梗死大鼠心脏微血管的保护作用及机制研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2021,36(9):1060-1067.
- PREEDY M, BALIGA RS, HOBBS AJ. Multiplicity of nitric oxide and natriuretic peptide signaling in heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2020;75(5):370-384.
- ZHAO S, SONG TY, WANG ZY, et al. S-nitrosylation of Hsp90 promotes cardiac hypertrophy in mice through GSK3 β signaling. *Acta Pharmacol Sin*. 2022;43(8):1979-1988.
- 朱政, 付常喜, 马文超, 等. 有氧运动调控自发性高血压模型大鼠心脏重塑的机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(14):2231-2237.
- 王晓梅, 李正红, 夏满莉, 等. 不同浓度硝酸甘油对心脏缺血/再灌注的作用及 ALDH2 的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2011,31(23):4597-4599.
- 付常喜, 李平, 秦永生, 等. 高强度间歇训练对自发性高血压大鼠肾脏纤维化的影响 [J]. *山东体育学院学报*, 2020,36(3):75-82.
- CHEN CA, DRUHAN LJ, VARADHARAJ S, et al. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem*. 2008;283(40):27038-27047.
- ARAGÓN JP, CONDIT ME, BHUSHAN S, et al. Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(25):2683-2691.
- DUMITRESCU C, BIONDI R, XIA Y, et al. Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(38):15081-15086.
- MITSUHASHI T, UEMOTO R, ISHIKAWA K, et al. Endothelial nitric oxide synthase-independent pleiotropic effects of pivalastatin against atherogenesis and limb ischemia in mice. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25(1):65-80.
- TOTZECK M, KORST S, MIINALAINEN I, et al. S-nitrosation of calpains is associated with cardioprotection in myocardial I/R injury. *Nitric Oxide*. 2017;67:68-74.
- FERRER-SUETA G, CAMPOLO N, TRUJILLO M, et al. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem Rev*. 2018;118(3):1338-1408.
- GONG DS, SHARMA K, KANG KW, et al. Endothelium-dependent relaxation effects of actinidia arguta extracts in coronary artery: involvement of eNOS/Akt pathway. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020;20(9):5381-5384.
- WU MY, YANG GT, LIAO WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-1667.

(责任编辑: GW, ZN, WL, LCH)