

有氧运动通过 miR-21/AMPK/Sirt1 通路调控自噬改善衰老小鼠心肌纤维化的研究*

赵晋枫¹ 陈万全¹ 徐温馨¹ 闫佩润¹ 王亚鑫^{1,2}

摘要

目的:探讨有氧运动对衰老诱导的心肌纤维化的改善作用及 miR-21 在其中的参与机制。

方法:将 2 月龄及 19 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为青年对照组(Y)、青年运动组(YE)、老年对照组(A)和老年运动组(AE)。运动组小鼠接受 12 周的有氧跑台训练。运动干预结束 24h 后处死小鼠,收集其心脏组织。测量小鼠体重、心脏重量及心脏器官指数;HE 染色观察心肌组织病理变化;Masson 染色检测心肌纤维化水平;qPCR 检测心肌纤维化及自噬标志蛋白、miR-21 及其下游信号通路的 mRNA 表达水平,Western Blot 检测其蛋白表达水平。

结果:①与 Y 组小鼠比,A 组小鼠心脏重量、心脏器官指数显著增加($P<0.05$),有氧运动干预后未出现明显变化。②衰老小鼠心肌细胞体积增大、肿胀、排列无序,而接受 12 周有氧运动干预的衰老小鼠心肌细胞肿胀得到改善,细胞排列整齐。③在心肌纤维化方面,衰老小鼠心肌组织出现损伤,蓝色胶原纤维沉积增多,纤维化标志物 α -SMA、collagen-I 表达明显增加($P<0.05$),经过运动干预后心肌纤维化得到明显改善。④在心肌细胞自噬方面,衰老组小鼠心肌自噬蛋白 ATG5、ULK1、Beclin1、LC3II 的表达水平均有所下降($P<0.05$),运动干预后均出现显著升高($P<0.05$)。⑤与 Y 组小鼠相比,A 组小鼠 miR-21 的表达显著上升,下游基因 AMPK、Sirt1、LKB1 的含量明显降低($P<0.05$),而运动干预后,AE 组小鼠心肌组织 miR-21 的含量显著下降,AMPK、Sirt1、LKB1 水平均显著增加($P<0.05$)。

结论:有氧运动可以改善衰老诱导的心肌纤维化,其机制可能与抑制 miR-21 的表达,激活下游 AMPK/Sirt1 自噬信号通路有关。

关键词 衰老;心肌纤维化;自噬;有氧运动

中图分类号:R493,R541 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2026)-06-0849-10

Aerobic exercise ameliorates age-related myocardial fibrosis by regulating autophagy through the miR-21/AMPK/Sirt1 pathway/ZHAO Jinfeng, CHEN Wanquan, XU Wenxin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2026, 41(6): 849—858

Abstract

Objective: To investigate the beneficial effects of aerobic exercise on age-related myocardial fibrosis and to explore the involvement mechanism of the miR-21/AMPK/Sirt1 signaling pathway.

Method: Male C57BL/6J mice aged 2-month-old (young) and 19-month-old (aged) were randomly divided into four groups: young control group (Y), young exercise group (YE), aged control group (A) and aged exercise group (AE). Mice in the exercise group underwent 12 weeks of aerobic treadmill training. Mice were euthanized 24 hours after the exercise intervention, and heart tissues were collected. Measurements included body weight, myocardial weight, and myocardial organ index. Histopathological changes were assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and myocardial fibrosis was evaluated using Masson staining. mRNA expression levels of fibrosis-related markers, autophagy-related genes, miR-21, and downstream signaling molecules were mea-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2026.06.002

*基金项目:山西省基础研究计划项目(202103021224428,20210302124022)

1 山西大学,山西省太原市,030006; 2 通讯作者

第一作者简介:赵晋枫,女,博士,副教授; 收稿日期:2024-10-24

sured by quantitative PCR, and corresponding protein expression levels were assessed by Western Blot.

Result: ① Compared to the Y group mice, aged mice showed significantly increased heart weight and heart weight index ($P<0.05$), with no significant changes after aerobic exercise intervention. ② Aged mice showed cardiomyocyte hypertrophy, swelling, and disorganized arrangement, while these morphological abnormalities were improved after 12 weeks of aerobic exercise. ③ Myocardial fibrosis was significantly increased in aged mice, with increased deposition of blue collagen fibers and significant increase in the expression of fibrosis markers α -SMA and collagen-I ($P<0.05$), but myocardial fibrosis was significantly improved after exercise intervention. ④ The expression of myocardial autophagy proteins ATG5, ULK1, Beclin1, and LC3II was decreased in the aged group of mice ($P<0.05$), but was significantly increased after exercise intervention ($P<0.05$). ⑤ The level of miR-21 in the A group significantly increased, while the expression of downstream genes AMPK, Sirt1, LKB1 significantly decreased ($P<0.05$). After exercise intervention, the content of miR-21 in the AE group significantly decreased, while the content of AMPK, Sirt1, LKB1 significantly increased ($P<0.05$).

Conclusion: Aerobic exercise can improve age-related myocardial fibrosis, and the mechanism may be related to the inhibition of miR-21 expression and activating the AMPK/Sirt1 autophagy signaling pathway.

Author's address Shanxi University, Taiyuan, Shanxi, 030006

Key word aging; myocardial fibrosis; autophagy; aerobic exercise

随着医疗卫生水平提高和公共卫生条件改善,人们的寿命得以不断延长,人口老龄化已成为人类共同面对的关键问题,随衰老而发生的心脏结构和功能的退行性改变是导致老年人心血管疾病的最主要危险因素。随着年龄的增长,胶原蛋白在血管壁、心脏间质和血管周围的沉积会导致心肌和动脉顺应性降低,从而导致心肌纤维化和心脏衰竭^[1]。心肌纤维化是心脏慢性衰老过程中常见的病理生理改变,表现为成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,细胞外基质合成增加而降解不足,合成降解失衡引起细胞外基质过度沉积,可引发心律失常、高血压、心力衰竭等多种心脏疾病^[2]。因此,明确其发病机制对预防和延缓多种心脏疾病的恶化,防治老年性心血管疾病,改善老年人生存质量具有重要现实意义。越来越多的证据表明,自噬功能障碍是心肌纤维化的主要原因之一,激活自噬可以有效抑制血管紧张素II诱导的炎症和心脏纤维化^[3-4]。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一种含量与种类都很丰富的小型非编码单链RNA,长约19—23个核苷酸,通过和靶基因mRNA 3'UTR中的部分序列发生反向互补配对,抑制mRNA的翻译,调节靶基因的表达^[5]。近年来,许多研究报道了miRNA在调控自噬途径相关的遗传和蛋白中的作用,因此,这些miRNA也称为自噬控制miRNA或自噬分子。其中,miR-21在不同疾病的自噬通路调控中起着重要

作用,包括慢性阻塞性肺疾病^[6]、癌症^[7-8]、心肌功能障碍^[9]等。研究表明,在糖尿病心肌病小鼠模型中,miR-21的过表达加重了心肌纤维化,减少了自噬,而降低miR-21可促进自噬并减轻心肌纤维化,从而改善心脏功能障碍^[10]。另一项研究也发现,敲低miR-21能够改善受损的心脏功能,抑制Collagen I和Collagen III mRNA的表达,并激活自噬,表明敲低miR-21通过促进自噬减弱了心力衰竭大鼠的心脏重构^[11]。腺苷酸活化蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]/沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, Sirt1)轴是miR-21的下游信号传导途径,同时是自噬的上游信号,在控制细胞稳态和自噬的协调网络中发挥着重要的作用^[12-13]。AMPK可以通过直接磷酸化ULK1或抑制mTOR信号通路促进自噬^[14]。例如,淫羊藿苷作为一种天然化合物,能够通过激活AMPK/mTOR通路增强自噬,减轻心肌细胞肥大并防止细胞损伤^[15]。因此miR-21/AMPK/Sirt1信号通路是自噬障碍诱导的心肌纤维化的重要研究靶点。

运动是预防慢性疾病的有效手段。有氧运动可以提高心肺适能,缓解心肌纤维化,对心血管疾病有一定治疗指导作用^[16]。已有研究表明,长期低强度的体育锻炼可以改善心衰大鼠的心肌纤维化^[17]。研究表明,间歇运动能够显著上调心梗大鼠心肌miR-21的表达,从而保护心功能^[18]。另一项研究也表明,

有氧抗阻运动可以调控海马组织中 miR-21 表达,改善大脑衰老^[9]。鉴于 miR-21 具有多效性调控功能,目前关于有氧运动是否通过 miR-21 介导的自噬激活来改善心肌纤维化的研究尚未充分阐明。为此,本研究以自然衰老小鼠为模型,并施加长期规律的有氧运动干预,拟探讨有氧运动对衰老诱导的心肌纤维化的改善作用及机制,为有氧运动防治老年心肌纤维化提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组

2月龄的SPF级C57BL/6J小鼠,雄性,40只,分2批购于北京维通利华实验动物技术公司,饲养于中国辐射防护研究院动物房,温度为20—26℃,湿度40%—70%,进行12h的光暗周期循环,食物和水自由获取。本研究所有动物实验均遵循山西大学实验动物护理和使用指南,并获得山西大学伦理委员会的批准(批准编号: SXULL2022084)。

19月龄自然衰老小鼠随机分为两组:老年组(A组, n=10)和老年运动组(AE组, n=10),2月龄的小鼠作为实验对照组,随机分为青年组(Y组, n=10)和青年运动组(YE组, n=10)。

1.2 运动干预方案

运动组小鼠在接受1周的适应性训练后,进行为期12周的正式有氧跑台运动干预。实验运动方案参照Guo等^[20],并根据实际情况进行改良。

运动方案:适应性训练1周,正式训练:以8m/min的速度热身训练5min,逐渐加速到14m/min持续运动30min,以5m/min的速度放松2min结束训练。整个运动过程中,跑台坡度设定为6%,每周干预5次(表1)。

1.3 样本采集

各组小鼠结束最后一次运动干预后禁食12h。麻醉后脱颈处死小鼠,立刻取出小鼠心脏组织。使用冷的磷酸盐缓冲盐水进行彻底清洗后,对其进行精确称量,取一部分组织保存在4%多聚甲醛溶液中固定,用于心脏组织切片;其余部分液氮速冻后,保存在-80℃冰箱中备用。

1.4 心脏重量和器官指数

心脏重量:心肌组织重量在大鼠取材期间用电

表1 有氧运动干预方案

实验期	训练时间(d)	速度(m/min)	持续时间(min)	坡度(%)
适应期训练	1—2	8	10	0
	3—4	11	20	6
	5—6	14	30	6
	7		Rest	
正式训练		8	5	6
	1—3	10	2	6
		12	2	6
	5—6	14	30	6
		5	2	6

子天平称量得出;心脏重量指数:心脏重量指数=心肌重量/体重。心脏重量直接反映心脏形态学改变,而心脏重量指数可标准化个体差异,二者均为评估心脏重构的关键指标。

1.5 HE染色

将心脏组织包埋块制备成6μm的切片,放入载玻片烘干。将切片放入二甲苯溶液、无水乙醇浸泡,进行水化,使用苏木素染料进行染色5—10min,染色完成后用流水稍微洗去染料。再使用伊红液染色3—5min,水洗去多余染料。使用二甲苯浸泡2次脱水后的组织样本切片,每次浸泡时间约为4min,以实现样本的透明化。最后将组织切片风干、封片,利用显微镜观察细胞形态。

1.6 Masson染色

将组织切片用铁苏木素染色5—10min,流水洗去多余试剂。分化后,采用丽春红染色剂染色5—10min,流水稍冲洗,磷钼酸分化液分化1—2min,苯胺蓝染色剂重染5min。快速水洗后,依次脱水,透明,经过风干封片程序,最后用显微镜观察。

1.7 实时荧光定量PCR

使用旋柱动物总RNA纯化试剂盒(Sangon 生物技术公司,中国上海)从小鼠心脏组织样本中分离总RNA。以总RNA为模板,使用M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒反转录成cDNA。用miRNeasy Mini试剂盒分离miRNA,并用Tail-added反转录试剂盒(上海生工生物技术有限公司)进行反转录。在Light Cycler480系统(Roche, 瑞士)上使用TB Green预混Ex Taq II混合物(TaKaRa, 中国)进行定量PCR,基因特异性引物列于表2,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达量,GAPDH、U6分别作为总RNA和小RNA的内参基因。

1.8 蛋白免疫印迹法

心脏组织加入裂解液后匀浆,4℃ 12000r/min 离心 5min,收集组织上清。采用 BCA 试剂盒 (P0010,碧云天)检测上清中的蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,并转移到 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 2h 后与一抗[p-ULK1(1:1000,abcam, USA)]、a-SMA(1:1000,14395-1-AP, Proteintech) CollagenI(1:1000, AF7001, Affinity)、Sirt1(1:1000, ab189494, Abcam)、ATG5(1:1000, ab108327, Abcam)、Beclin1(1:1000, AF5128, Affinity)、p-AMPK(1:1000, AF3423, Affinity)、LC3(1:1000, AF5402, Affinity)、LKB1(1:1000, bs-3948r, Bioss)、β-actin(1:3000, 66009-1-Ig, Proteintech)。

孵育过夜,使用 TBST 清洗膜并与标记的二抗(1:2000,BA1054,武汉博士德生物工程有限公司)孵育 1h。ECL 检测试剂盒(P1050,北京普利莱基因技术有限公司)检测信号,并在自动成像仪中成像,使用 Image J 进行灰度值分析。

1.9 统计学分析

实验数据均以平均值±标准差表示。应用 SPSS 26.0 软件进行数据处理,应用 Origin 2022 软件统计分析绘图,数据经正态性及方差齐性检验后,

运用双因素方差分析对数据进行差异分析,并采用 Tukey 检验进行组间两两比较, $P<0.05$ 为数据有显著性差异。

2 结果

2.1 有氧运动对衰老小鼠体重、心脏重量及心脏器官指数的影响

如图 1A 所示,相较于 5 月龄小鼠,21 月龄的衰老小鼠出现了明显的衰老迹象,如毛发脱落、毛色暗淡、行动迟缓、体型增大等。各组小鼠体重没有出现明显差异(图 1B),老年对照组小鼠心脏重量和心脏器官指数显著高于青年对照组小鼠($P<0.05$),这一结果表明随着年龄的增长,自然衰老小鼠心脏的负担在逐渐增加,可能出现了病理性心脏肥大,运动干预后没有出现明显变化(图 1C、D)。

2.2 有氧运动对衰老小鼠心肌组织形态的影响

心肌组织的病理学改变通过 HE 染色来进行评估。如图 2 所示,青年对照组和青年运动组小鼠心肌组织形态保持完好,心肌细胞排列规则,心肌纤维结构清晰。与青年对照组小鼠相比,老年对照组小鼠心肌细胞呈现肿胀,体积增大,心肌细胞排列紊乱,表明衰老会导致心肌细胞的损伤和结构破坏。经过 12 周运动干预后,老年运动组小鼠心肌纤维排列较为整齐,心肌细胞肿胀、炎性细胞浸润、细胞间隙变宽等均得到一定程度的改善,这一结果说明长期规律的运动可以延缓衰老导致的心肌组织的病理学改变,对其结构具有一定的改善作用。

2.3 有氧运动对衰老小鼠心肌纤维化的影响

Masson 染色显示,青年对照组小鼠心肌组织及血管周围几乎没有胶原纤维沉积。然而,与青年对照组小鼠相比,老年对照组小鼠心肌组织出现明显损伤,红细胞聚集,蓝色胶原纤维沉积增多,并沿着血管和紊乱的心肌组织分布,心肌纤维化加重。与老年对照组小鼠相比,老年运动组小鼠心肌组织仅有少量胶原纤维包绕,胶原纤维沉积减少(图 3A)。

同时,采用 Q-PCR 和 Western Blot 检测了肌成纤维细胞标记物 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)及胶原蛋白-I(collagen-I)mRNA 及蛋白的表达。从图 3B、C 可以发现,与青年对照组小鼠相比,老年对照组小鼠心肌 α-SMA、collagen-

表 2 引物序列

基因	序列
miR-21	5'-GTATTGCGACTGGATACGACTCAACATC-3'
a-SMA	正向: 5'-GTACCACCATGTACCCAGGC-3' 反向: 5'-GAAGGTAGACAGCGAAGCCA-3'
Collagen-I	正向: 5'-GAGAGGTGAACAAGGTCCCG-3' 反向: 5'-AAACCTCTCTCGCCTCTTGC-3'
Sirt1	正向: 5'-CGAGGTCCATATACTTTTGTTCAG-3' 反向: 5'-GCGTCATATCATCCAGCTCAG-3'
ULK1	正向: 5'-CTCATGGAGCAAGAGCACACG-3' 反向: 5'-GGTCAATGGCAGTCTGTAGGC-3'
ATG5	正向: 5'-GAGGCTCACTTTATGTCGTGTATG-3' 反向: 5'-CCCAAACTGGTCAAATCTGTCAT-3'
Beclin1	正向: 5'-CCGTACAGGATGGACGTGGA-3' 反向: 5'-TGGGTTTGTATGGAATAGGAGC-3'
LC3	正向: 5'-CCGTCCGAGAAGACCTTCAA-3' 反向: 5'-TCTTGCAGCAGGAGAACCTA-3'
AMPK	正向: 5'-TCAGGCACCTCACATC-3' 反向: 5'-TTCCTTTTCGTCCAACC-3'
LKB1	正向: 5'-CTTCCAGCCTCCTGAGATTGC-3' 反向: 5'-GGCTCATACTCCAACATCCCTC-3'
GAPDH	正向: 5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3' 反向: 5'-TGAGGTCAATGAAGGGTCTGT-3'
U6	正向: 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3' 反向: 5'-AAATATGGAACGCTTCACGA-3'

图1 有氧运动干预后衰老小鼠体重、心脏重量、器官指数变化

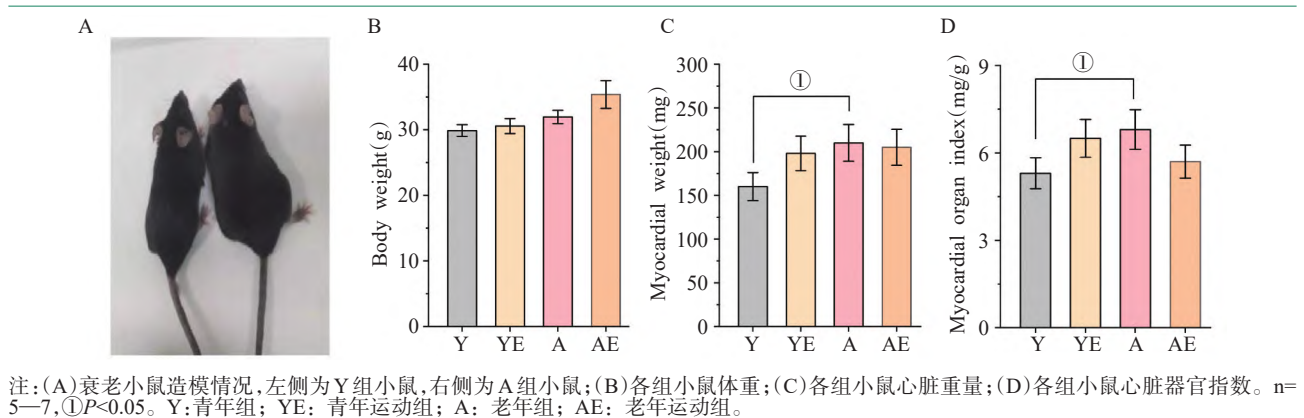
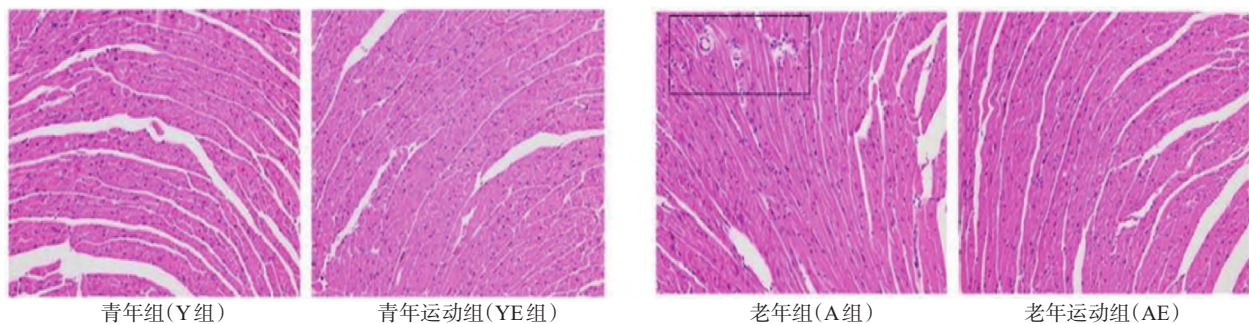


图2 有氧运动干预后衰老小鼠心肌组织病理变化情况

(HE染色, 200×)



I表达均显著上升($P<0.05$), 12周的有氧运动干预后, 老年运动组小鼠 α -SMA及collagen-I mRNA表达均显著下降($P<0.05$), 蛋白表达水平与基因表达水平相一致(图3B、C)。这一结果说明了衰老进程中出现了心肌纤维化, 而有氧运动干预可减轻衰老小鼠的心肌纤维化程度, 对心肌组织具有保护作用。

2.4 有氧运动激活衰老小鼠自噬相关指标

如图4所示, 对自噬相关指标UNC-51样激酶(UNC-51-like kinase 1, ULK1)、自噬相关蛋白5 (autophagy related protein5, ATG5)、微管相关蛋白II (microtubule-associated proteins light chain 3, LC3II)、苊氯素1(Beclin1)的mRNA及蛋白表达含量进行检测发现与青年对照组小鼠相比, 老年对照组小鼠ULK1、ATG5、LC3II、Beclin1的mRNA表达含量显著下降($P<0.05$), 运动干预后均出现明显升高。并且各组小鼠心肌组织中p-ULK1、Atg5、LC3II, 以及Beclin1的蛋白表达与mRNA表达呈一致性变化, 同时各组小鼠心肌中LC3II/LC3I的蛋白比值呈相同趋势($P<0.05$)。提示随着小鼠年龄的增

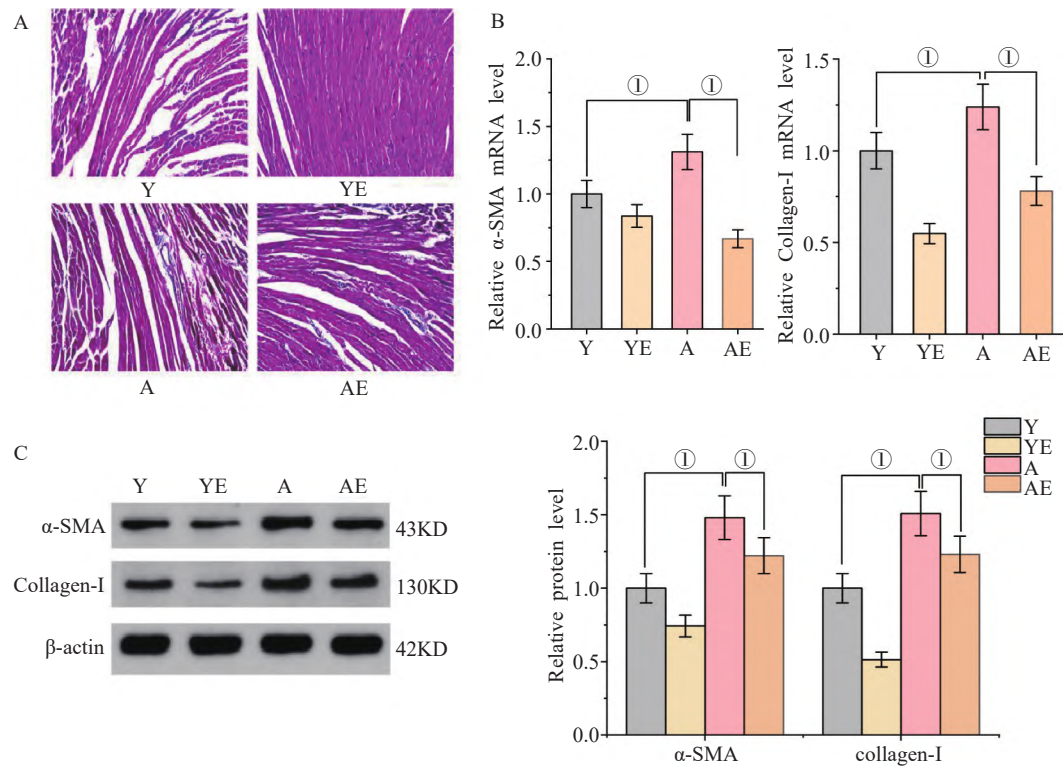
长, 自噬功能发生障碍, 而规律有氧运动能够有效抑制衰老导致的自噬下调, 改善衰老小鼠的自噬功能(图4B)。

2.5 有氧运动调控衰老小鼠心肌miR-21/AMPK/Sirt1信号通路

对各组小鼠心肌组织miR-21的表达水平进行检测发现老年对照组小鼠较青年对照组小鼠心肌组织中miR-21的表达显著上升($P<0.05$), 而运动干预后, 老年运动组小鼠心肌miR-21的表达显著下降($P<0.05$)(图5A)。

通过进一步分析miR-21下游的自噬信号传导途径AMPK/Sirt1发现与青年对照组小鼠相比, 老年对照组小鼠AMPK、Sirt1的mRNA表达显著下调($P<0.05$), 运动干预后均出现明显升高, 并且各组小鼠心肌组织中p-AMPK及Sirt1蛋白水平与mRNA表达呈一致性变化(图5B、C)。此外, 肝激酶B1 (Liver kinase B1, LKB1)是AMPK的重要调节因子, 其既可以由运动变构激活, 激活AMPK的表达, 也可以被Sirt1去乙酰化, 进一步加强AMPK的活

图3 有氧运动对衰老小鼠心肌纤维化的影响



注:(A)各组小鼠心肌组织Masson染色图(200 $\times$),n=3;(B)各组小鼠心肌组织 α -SMA、collagen-I的mRNA及蛋白;(C)表达水平,n=3。① $P<0.05$ 。Y:青年组;YE:青年运动组;A:老年组;AE:老年运动组。

性,因此对LKB1的含量进行检测发现与青年对照组小鼠相比,老年对照组小鼠LKB1的表达显著下调($P<0.05$),经过12周的跑台运动后,老年运动组小鼠LKB1的表达显著上升($P<0.05$)。这一结果说明了有氧运动可能通过激活miR21/AMPK/Sirt1信号通路激活自噬进而抑制心肌纤维化过程。

3 讨论

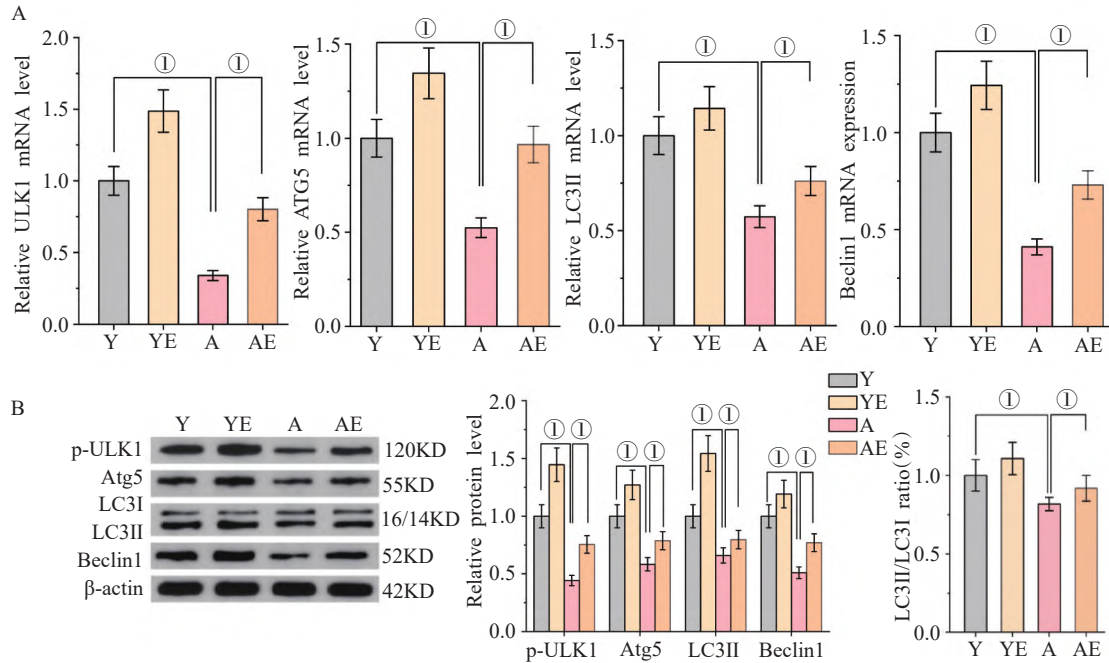
3.1 有氧运动对衰老基础指标的影响

心脏的重量与性别、体重、心血管疾病等因素密切相关,随着年龄的增长,心脏重量会出现增加的趋势。弗雷明汉心脏研究和巴尔的摩老龄化纵向研究表明^[21],在没有心血管疾病的健康个体中,衰老导致左心室肥厚患病率增加,左心室质量指数和左心房尺寸随着年龄的增长而显著增加。Chen等^[22]的研究发现,与3月龄青年组小鼠相比,18月龄老年组小鼠心脏/体重比明显增加,二者具有显著性差异。本研究结果也发现了与青年对照组相比,老年对照组小鼠的心脏重量和心脏器官指数明显升高,这表

明衰老过程会导致心脏的肥厚和质量的增加。在Liao等^[23]的研究中,18周月龄的衰老大鼠在有氧运动12周后,与安静组相比运动后的小鼠心脏重量、心脏重量与胫骨长度比值,以及胶原蛋白均呈现下降趋势。而在Yoshizaki等^[24]的研究中进行6周的游泳训练,发现与安静衰老大鼠相比,运动后的大鼠心脏器官指数上升而胶原蛋白下降,并提高了心肌收缩力。与此同时,Ma等^[25]研究发现,8周游泳训练提高了miR-21的表达,并促进了心脏生理性肥大,减少了病理性肥大。而本研究中接受运动干预后的衰老小鼠心脏重量没有出现明显变化,这可能是由于长期运动干预,会使小鼠的心肌细胞体积增大,产生生理性心肌肥厚,减少了病理性肥大,同时减少了心肌纤维化,如心肌 α -SMA、collagen-I蛋白减少,使得总体呈下降趋势。因此,衰老会导致病理性的心脏肥厚和质量增加,而衰老阶段运动干预是否改善心脏功能,除了观察心脏器官指数外,还需结合其他指标判断。

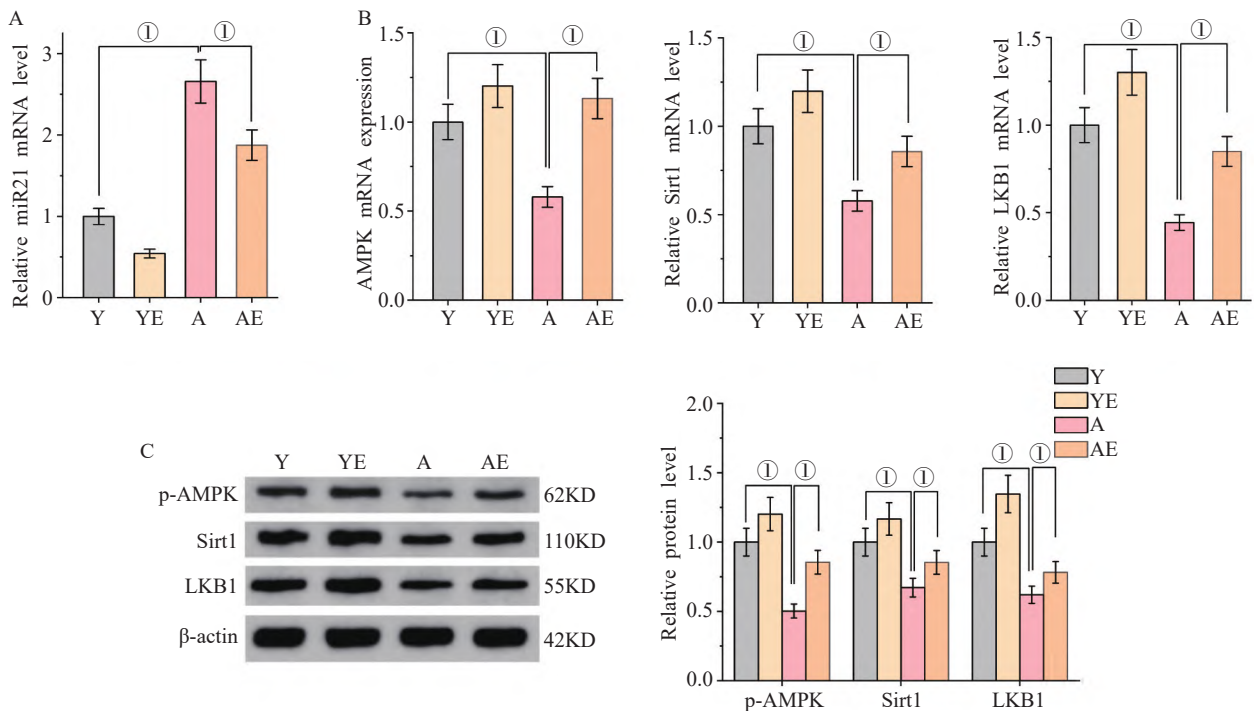
3.2 有氧运动对衰老相关心肌纤维化的影响

图4 有氧运动对衰老小鼠自噬功能的影响



注:(A)各组小鼠心肌中ULK1、ATG5、LC3II、Beclin1的mRNA表达水平;(B)各组小鼠心肌中p-ULK1、ATG5、LC3II、Beclin1的蛋白表达水平以及LC3II/LC3I蛋白比值,n=3。① $P<0.05$ 。Y:青年组;YE:青年运动组;A:老年组;AE:老年运动组。

图5 有氧运动对衰老小鼠miR-21/AMPK/Sirt1信号通路的影响



注:(A)各组小鼠心肌中miR-21的表达水平;(B)各组小鼠心肌中AMPK、Sirt1、LKB1 mRNA及蛋白;(C)表达水平,n=3。① $P<0.05$ 。Y:青年组;YE:青年运动组;A:老年组;AE:老年运动组。

运动训练作为改善心脏功能的有效策略,已经在越来越多的临床和动物实验研究中得到证实。临床试验表明,为期3个月的运动训练后,慢性心力衰竭患者的身体功能及心脏功能能力显著改善,步行距离增加,再住院发生率显著降低,生存质量明显提升^[26]。在动物实验方面,8周的中等强度跑台运动干预可以改善糖尿病性心脏病小鼠冠状动脉和心脏功能障碍、细胞凋亡、纤维化和miRNA信号通路中断等,运动干预在改善小鼠DHD的发病和进展中发挥重要作用^[27]。此外,研究也证实了运动可减轻与年龄相关的心肌纤维化,预防或逆转病理性心脏重塑。Liao等^[23]对18个月的大鼠进行为期12周的游泳运动训练,发现在老年对照组中,胶原蛋白随着年龄的增长而积累,而运动训练减少了衰老大鼠胶原蛋白的积累,表明运动训练可以预防衰老诱导的心肌纤维化。Soori等^[16]也发现6周的持续运动训练,通过增加心脏和内皮组织中血管的生成相关分子减轻了与年龄相关的心肌纤维化。目前研究表明,衰老心脏表现出线粒体自噬抑制^[28],从而使得ROS增多,并且分泌炎症细胞因子(IL-1/6、TNF- α 、TGF- β 等)以及分泌Edn3、GDF-15和TNF- β 等促纤维因子的表达,导致心脏成纤维细胞纤维化和肌成纤维细胞活化^[29]。另一方面,心肌细胞自噬还会影响心肌细胞分泌外泌体,而外泌体中的一些物质,包括蛋白质、脂质、碳水化合物、线粒体DNA(mtDNA)、mRNA、miRNA和长链非编码RNA(lncRNA),与胞外细胞建立联系。例如,心肌细胞产生的外泌体中IL-6通过作用于成纤维细胞中STAT3从而发挥促纤维化的作用^[30]。另一项研究中,降低了心肌细胞产生的外泌体中miR-29b以及miR-455的含量,进而上调MMP9促进了纤维化,而运动可以逆转这种现象^[31]。本研究通过对衰老小鼠心脏组织HE染色和Masson染色进行病理检查及对纤维化指标 α -SMA、Collagen-I的表达水平进行检测发现衰老小鼠心脏出现明显病理改变,出现心肌纤维化情况。在12周的有氧运动干预后,老年运动组小鼠心肌纤维排列较为整齐,蓝色胶原纤维沉积减轻, α -SMA、Collagen-I的表达均显著下降,心脏组织结构及心肌纤维化情况得到改善,表明规律有氧运动可改善与衰老相关的心肌纤维化。

3.3 有氧运动对衰老心肌细胞自噬的影响

近年来,研究证实了自噬功能障碍与心肌纤维化的关系,通过激活自噬途径,可以有效地减轻心肌纤维化程度。自噬过程的调控机制非常复杂,其中AMPK通过介导ULK1磷酸化调控自噬,激活的ULK1形成分离膜,体内外实验均证实ULK1的磷酸化是自噬的必要条件^[32]。ATG5、LC3II、Beclin1在自噬形成中起到关键作用,它们是自噬现象较为可靠的生物学标志物。ATG5参与自噬体的起始、成核、延伸、闭合等阶段;LC3I转化为LC3II并募集到自噬体,LC3II的浓度反映了自噬体的数量;Beclin1负责自噬体的成核,参与溶酶体的融合和降解等,他们的表达都与自噬呈正相关^[33]。在衰老过程中,自噬相关蛋白的表达会发生改变。有氧运动作为一种有效的自噬诱导剂,在心脏中发挥重要作用。长期自愿跑轮运动可以激活自噬,有效降低纤维化反应,改善蛋白质毒性条件下的心脏功能^[34]。与这些发现一致,本研究观察到衰老小鼠心肌组织中p-ULK1、ATG5、LC3II、Beclin1表达含量均明显下调,而有氧运动干预后自噬相关蛋白的表达含量均有所上升,这表明有氧运动可以增强自噬通量,加速细胞内损伤蛋白和代谢废物的清除,从而改善衰老引起的心肌纤维化。

3.4 有氧运动对miR-21/AMPK/Sirt信号通路的影响

在众多器官纤维化现象中,包括肾脏、肝脏、心脏以及肺,miR-21都发挥着至关重要的作用^[35]。前期研究结果已经证明了肾小管上皮细胞外泌体中的miR-21对肾阻塞中的成纤维细胞产生激活作用,从而促进肾纤维化的发展进程^[36],其机制可能与miR-21/PTEN/Akt通路有关。此外,研究显示在链脲佐菌素(STZ)诱导的1型糖尿病(T1D)模型小鼠的糖尿病心脏中,miR-21的上调表现为心脏纤维化和Collagen-I、Collagen-3和纤连蛋白表达增加^[37]。敲除miR-21可改善纳米镍诱导的肺部炎症、损伤和纤维化^[38]。MiR-21促进器官纤维化的重要的一个生理学机制是抑制自噬。AMPK信号通路是细胞内外能量整合的关键因素之一,与细胞自噬密切相关,是miR-21调控自噬的重要的下游信号通路^[39]。AMPK/SIRT1信号通路可以通过上调自噬相关基因

的转录而被激活,从而增强自噬体与溶酶体的融合^[40]。SIRT1的激活能够改善衰老引起的心肌细胞收缩功能障碍和线粒体自噬。例如,PDE4D的抑制通过SIRT1信号通路促进线粒体自噬,从而保护心肌细胞免受病理肥大刺激^[41]。此外,姜黄素通过Sirt1/AKT/FoxO3a通路抑制心肌细胞的自噬依赖性铁死亡和细胞凋亡,从而提高心肌细胞存活率并维持心脏功能^[42]。LKB1可以被Sirt1去乙酰化,同时也是AMPK的重要调节因子,进一步加强AMPK的活性。研究表明,LKB1的功能失活对心肌重塑和心力衰竭的发展具有重要影响^[43]。例如,LncHrt通过与SIRT2的相互作用维持心脏代谢平衡,并激活LKB1-AMPK级联反应的下游信号传导,从而保护心脏免受不良重塑反应^[43]。并且雌激素分别通过丝氨酸428和苏氨酸172的磷酸化激活LKB1和AMPK,进而影响线粒体自噬^[44]。本研究发现运动可调控自噬相关基因,如ULK1,从而影响纤维化,其具体机制可能涉及AMPK/Sirt1信号通路。另有研究发现鱼藤酮处理通过AMPK/Sirt1/ULK1通路增强细胞自噬^[45]。此外,有研究发现ULK1上至少有4个位点可被AMPK磷酸化以刺激其活性^[40]。这些研究表明AMPK对ULK1的调控可能通过直接磷酸化或间接表观调控(Sirt1)双重途径进行。本研究发现21月龄小鼠的心肌组织中miR-21的表达明显升高,p-AMPK和SIRT1的表达明显降低,运动干预后,miR-21的表达明显下降,p-AMPK和SIRT1的表达显著升高。目前,研究发现运动诱导的血流剪切应力增加或运动时分泌的运动因子可以改变循环miRNA的表达,并促进其向特定细胞转运^[46]。迄今为止,大多数关于外泌体介导的运动有益作用的研究主要集中在运动的急性和短暂效应上,关于长期有氧运动影响心肌miR-21表达的机制还需进一步深入研究。

4 结论

有氧运动可能通过抑制miR-21的表达,激活AMPK/Sirt1信号通路,进而促进自噬相关基因的表达,从而改善衰老小鼠的心肌纤维化,本研究将为心肌纤维化治疗提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Lakatta GE, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises[J]. Circulation, 2003, 107(2): 346—354.
- [2] Lopez B, Ravassa S, Moreno MU, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(7): 479—498.
- [3] 聂佩,顾崇怀,乔锐,等.黄芪甲苷通过调控线粒体自噬抑制血管紧张素II诱导的心肌纤维化[J].中药药理与临床,2025,41(12):52—58.
- [4] 魏俊萍,符达佳,孟庆雯,等.敲低MKL1通过激活自噬流抑制心肌成纤维细胞活化与纤维化表型的作用研究[J].转化医学杂志,2024,13(1):1—6.
- [5] Kwon JJ, Factoria TD, Dey S, et al. A systematic review of miR-29 in cancer[J]. Molecular Therapy Oncolytics, 2019, 12: 173—194.
- [6] Zeng ZP, He SY, Lu J, et al. MicroRNA-21 aggravates chronic obstructive pulmonary disease by promoting autophagy[J]. Experimental Lung Research, 2018, 44(2): 89—97.
- [7] Gu YF, Fei ZW, Zhu RH. miR-21 modulates cisplatin resistance of gastric cancer cells by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway[J].Anticancer Drugs, 2020, 31(4): 385—393.
- [8] Zhang HH, Huang ZX, Zhong SQ, et al. miR-21 inhibits autophagy and promotes malignant development in the bladder cancer T24 cell line[J].International Journal of Oncology, 2020, 56(4): 986—998.
- [9] Reddy S, Hu DQ, Zhao M, et al. miR-21 is associated with fibrosis and right ventricular failure[J]. JCI insight, 2017, 2(9):91625.
- [10] Li XC, Meng C, Han F, et al. Vildagliptin attenuates myocardial dysfunction and restores autophagy via miR-21/SPRY1/ERK in diabetic mice heart[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 634365.
- [11] 郭俊玲,吴曼,李颖,等. miR-21通过PTEN/AKT/TFEB通路对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2023, 21(15): 2766—2772.
- [12] Wang CZ, Yao ZJ, Zhang YQ, et al. Metformin mitigates cartilage degradation by activating AMPK/SIRT1-mediated autophagy in a mouse osteoarthritis model[J].Frontiers in Pharmacology,2020, 11: 1114.
- [13] Wang Y, Zhao H, Li X, et al. Tangshen formula alleviates hepatic steatosis by inducing autophagy through the AMPK/SIRT1 pathway[J].Frontiers in Physiology, 2019, 10: 494.
- [14] González A, Hall MN, Lin SC, et al. AMPK and TOR: the yin and yang of cellular nutrient sensing and growth control[J]. Cell Metab, 2020, 31(3):472—492.
- [15] Hu L, Wang ZY, Li H, et al. Icaritin inhibits isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophic injury through activating autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 593: 65—72.
- [16] Rahman S, Arab AA, Siroos C, et al. Exercise attenuates myocardial fibrosis and increases angiogenesis-related molecules in the myocardium of aged rats[J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2022, 128(1): 1—6.

- [17] Pagan UL, Damatto LR, Cezar DM, et al. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 36(1): 61—74.
- [18] 林琴琴, 张伟超, 王湘怡, 等. 间歇运动激活 miR-21-PTEN-Akt 通路抑制 NLRP3 炎症小体表达保护心梗心功能[J]. 中国体育科技, 2022, 58 (2): 82—88.
- [19] 韩书娜, 孙一, 叶琼. 抗阻运动通过 miR-21-5p/TSP-1 途径改善老年男性增龄性循环内皮祖细胞功能损伤研究[J]. 体育学刊, 2025, 32(1): 150—156.
- [20] Guo MW, Qiu J, Shen F, et al. Comprehensive analysis of circular RNA profiles in skeletal muscles of aging mice and after aerobic exercise intervention[J]. Aging, 2020, 12: 5071—5090.
- [21] Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part II: The aging heart in health: Links to heart disease[J]. Circulation, 2003, 107: 346—354.
- [22] Chen FF, Song FQ, Chen YQ, et al. Exogenous testosterone alleviates cardiac fibrosis and apoptosis via Gas6/Axl pathway in the senescent mice[J]. Experimental Gerontology, 2019, 119: 128—137.
- [23] Liao PH, Hsieh DJ, Kuo CH, et al. Moderate exercise training attenuates aging- induced cardiac inflammation, hypertrophy and fibrosis injuries of rat hearts[J]. Oncotarget, 2015, 6 (34): 35383—35394.
- [24] Yoshizaki A, Antonio EL, Silva Junior JA, et al. Swimming training improves myocardial mechanics, prevents fibrosis, and alters expression of Ca^{2+} handling proteins in older rats[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2018, 73 (4): 468—474.
- [25] Ma Z, Qi J, Meng S, et al. Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves micro RNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/m TOR signaling pathway[J]. Eur J Appl Physiol, 2013, 113 (10): 2473—2486.
- [26] Antonicelli R, Spazzafumo L, Scalvini S, et al. Exercise: a "new drug" for elderly patients with chronic heart failure [J]. Aging (Albany NY), 2016, 8(5): 860—872.
- [27] Lew JK, Pearson JT, Saw E, et al. Exercise regulates MicroRNAs to preserve coronary and cardiac function in the diabetic heart[J]. Circulation Research, 2020, 127 (11): 1384—1400.
- [28] Gao BL, Yu WJ, Lv P, et al. Parkin overexpression alleviates cardiac aging through facilitating K63- polyubiquitination of TBK1 to facilitate mitophagy[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2021, 1867 (1): 165997.
- [29] Chen MS, Lee RT, Garbern JC. Senescence mechanisms and targets in the heart[J]. Cardiovascular Research, 2022, 118(5): 1173—1187.
- [30] Datta R, Bansal T, Rana S, et al. Myocyte-derived Hsp90 modulates collagen upregulation via biphasic activation of STAT-3 in fibroblasts during cardiac hypertrophy[J]. Molecular and Cellular Biology, 2017, 37(6): e00611—00616.
- [31] Pankaj Chaturvedi, Anuradha Kalani, Ilza Medina, et al. Cardiosome mediated regulation of MMP9 in diabetic heart: role of mir29b and mir455 in exercise[J]. Journal of Cellular And Molecular Medicine, 2015, 19(9): 2153—2161.
- [32] Liu J, Long SY, Wang HA, et al. Blocking AMPK/ULK1-dependent autophagy promoted apoptosis and suppressed colon cancer growth[J]. Cancer Cell International, 2019, 19: 336.
- [33] Ariosa AR, Klionsky DJ. Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons[J]. Journal of Molecular Medicine, 2016, 94(11): 1217—1227.
- [34] Bhuiyan MS, Pattison JS, Osinska H, et al. Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy[J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(12): 5284—5297.
- [35] Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease[J]. RNA Biology, 2011, 8(5): 706—713.
- [36] Zhao S, Li W, Yu W, et al. Exosomal miR-21 from tubular cells contributes to renal fibrosis by activating fibroblasts via targeting PTEN in obstructed kidneys[J]. Theranostics, 2021, 11(18): 8660—8673.
- [37] Li Q, Yao Y, Shi S, et al. Inhibition of miR-21 alleviated cardiac perivascular fibrosis via repressing EndMT in T1DM[J]. Cell Mol Med, 2020, 24(1): 910—920.
- [38] Mo Y, Zhang Y, Wan R, et al. miR-21 mediates nickel nanoparticle-induced pulmonary injury and fibrosis[J]. Nanotoxicology, 2020, 14(9): 1175—1197.
- [39] Li S, Zeng X, Ma R, et al. MicroRNA 21 promotes the proliferation, migration and invasion of non small cell lung cancer A549 cells by regulating autophagy activity via AMPK/ULK1 signaling pathway[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2018, 16(3): 2038—2045.
- [40] Wang SY, Li HY, Yuan MH, et al. Role of AMPK in autophagy[J]. Frontiers in Physiology, 2022, 13: 1015500.
- [41] Fu J, Su CQ, Ge Y, et al. PDE4D inhibition ameliorates cardiac hypertrophy and heart failure by activating mitophagy[J]. Redox Biol, 2025, 8: 103563.
- [42] Zhao ST, Qiu ZC, Xu ZQ, et al. Curcumin attenuates myocardial ischemia- reperfusion-induced autophagy-dependent ferroptosis via Sirt1/AKT/FoxO3a signaling[J]. Int J Mol Med, 2025, 55(3): 51.
- [43] Liu N, Kataoka M, Wang YC, et al. LncRNA LncHrt preserves cardiac metabolic homeostasis and heart function by modulating the LKB1- AMPK signaling pathway[J]. Basic Research in Cardiology, 2021, 116(1): 48.
- [44] Sasaki Y, Ikeda Y, Uchikado Y, et al. Estrogen plays a crucial role in Rab9- dependent mitochondrial autophagy, delaying arterial senescence[J]. Journal of The American Heart Association, 2021, 10(7): e019310.
- [45] Wessam H Elesawy, Ayman E El-Sahar, Rabab H Sayed, et al. Repurposing ezetimibe as a neuroprotective agent in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats: Role of AMPK/SIRT- 1/PGC- 1 α signaling and autophagy[J]. International Immunopharmacology, 2024, 138: 112640.
- [46] Hou ZX, Qin XH, Hu Y, et al. Longterm exercise-derived exosomal miR-342-5p: a novel exerkine for cardioprotection[J]. Circulation Research, 2019, 124(9): 1386—1400.