



## 跑台运动对腹主动脉缩窄诱导的心衰大鼠骨骼肌凋亡和VEGFB及其受体表达的影响

### Effects of Treadmill Running on Skeletal Muscle Apoptosis and VEGFB/VEGFR1 Expression of Abdominal Aortic Constriction Induced Heart Failure Rats

李灵杰<sup>1,2</sup>, 张 靓<sup>1\*</sup>, 陈雪飞<sup>1</sup>, 李世田<sup>1</sup>, 张玉寒<sup>1</sup>, 任 静<sup>1</sup>, 余 玥<sup>1</sup>  
LI Lingjie<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing<sup>1\*</sup>, CHEN Xuefei<sup>1</sup>, LI Shitian<sup>1</sup>,  
ZHANG Yuhan<sup>1</sup>, REN Jing<sup>1</sup>, YU Yue<sup>1</sup>

**摘 要:**目的:观察跑台运动对腹主动脉缩窄(abdominal aortic constriction, AAC)诱导的心衰大鼠骨骼肌凋亡和血管内皮生长因子B(vascular endothelial growth factor B, VEGFB)及其受体表达的影响及机制。方法:210 g SD 雄性大鼠随机分为对照组和 AAC 手术组,手术组在术后四周随机分为 AAC 组和 AAC+E 组。AAC+E 组大鼠进行跑台训练,持续 4 周,每周 5 次,每次 40 min,跑速 12 m/min。采用超声心动方法检测大鼠心脏功能,H.E.染色方法观察心肌、腓肠肌和比目鱼肌结构变化,TUNEL 荧光染色法观察腓肠肌细胞凋亡变化,免疫组化法观察腓肠肌 VEGFB 及其受体血管内皮生长因子受体 1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)和神经纤毛蛋白 1(neuropilin-1, NRP1)的蛋白表达水平,实时定量 PCR 法(real-time PCR, RT-PCR)分别测定腓肠肌和比目鱼肌 VEGFB、VEGFR1、NRP1、肌肉指盒因子 1(muscle ring finger-1, MuRF1)、肌肉萎缩 F 因子(muscle atrophy F-box, MAFbx)、肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)、B 细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma 2, Bcl2)、Bcl2 相关蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)和 caspase3 的信使 RNA(messenger RNA, mRNA)表达,RT-PCR 检测心肌心钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)和脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)mRNA 的表达。结果:1)与对照组相比,AAC 大鼠心脏左心室质量显著增大( $P<0.05$ ),左心室舒张末期前壁厚度(left ventricular diastolic anterior wall thickness, LVAW d)显著增大( $P<0.05$ ),左心室舒张末期内径(left ventricular interval diameter at end-diastole, LVID d)显著增大( $P<0.01$ ),左心室收缩末期内径(left ventricular interval diameter at end-systole, LVID s)显著增大( $P<0.001$ ),左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)显著降低( $P<0.001$ ),左心室缩短分数(left ventricular fraction shortening, LVFS)显著降低( $P<0.01$ ),ANP( $P<0.001$ )和 BNP( $P<0.001$ )mRNA 表达显著升高;与 AAC 组相比,AAC+E 组大鼠心脏左室质量显著降低( $P<0.05$ ),LVAW d 显著降低( $P<0.05$ ),左心室舒张末期后壁厚度(left ventricular diastolic posterior wall thickness, LVPW d)显著降低( $P<0.05$ ),LVID d 显著降低( $P<0.05$ ),LVID s 显著降低( $P<0.05$ ),心肌 ANP( $P<0.01$ )和 BNP( $P<0.01$ )mRNA 表达显著降低。2)与对照组相比,AAC 大鼠比目鱼肌质量显著降低( $P<0.05$ ),萎缩分子标志 MuRF1( $P<0.001$ )、MAFbx( $P<0.05$ )、MSTN( $P<0.001$ )的 mRNA 表达显著增加;与 AAC 组相比,AAC+E 组比目鱼肌质量显著增加( $P<0.05$ ),MuRF1( $P<0.001$ )、MAFbx( $P<0.05$ )、MSTN( $P<0.001$ )的 mRNA 表达显著降低。与对照组相比,AAC 大鼠腓肠肌质量显著降低( $P<0.05$ ),MuRF1( $P<0.001$ )和 MSTN( $P<0.05$ )的 mRNA 表达显著增加;与 AAC 组相比,AAC+E 组大鼠腓肠肌质量显著增加( $P<0.05$ ),MuRF1 mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ ),MSTN 表达显著降低( $P<0.05$ )。3)与对照组相比,腓肠肌 Bax( $P<0.001$ )、caspase3( $P<0.01$ )mRNA 表达显著增加,Bax/Bcl2 比值显著增大( $P<0.001$ ),TUNEL 染色凋亡细胞增多;与 AAC 组相比,AAC+E 组腓肠肌 Bax

**基金项目:**  
国家自然科学基金项目(31871207)

**第一作者简介:**  
李灵杰(1988-),女,讲师,博士,主要研究方向为运动生物化学与代谢性疾病、运动机能与代谢,E-mail:lilingjie.ok@163.com。

**\*通信作者简介:**  
张靓(1976-),女,教授,博士,博士研究生导师,主要研究方向为运动生物化学与代谢性疾病,E-mail:zhangjing@bnu.edu.cn。

**作者单位:**  
1. 北京师范大学,北京 100875  
2. 上海体育学院,上海 200438;  
1. Beijing Normal University, Beijing 100875, China;  
2. Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China.

( $P<0.05$ )、caspase3( $P<0.01$ ) mRNA 表达显著降低,显著降低 Bax/Bcl2 的比值( $P<0.01$ )。4) 与对照组相比, AAC 大鼠腓肠肌 VEGFB( $P<0.01$ )和比目鱼肌 VEGFB mRNA( $P<0.01$ ) 表达显著下降,与 AAC 组相比, AAC+E 大鼠腓肠肌 VEGFB( $P<0.001$ )和比目鱼肌 VEGFB( $P<0.001$ ) mRNA 显著上调,腓肠肌 VEGFB 蛋白表达显著上调;与 AAC 组相比, AAC+E 组大鼠腓肠肌 VEGFB 受体 VEGFR1( $P<0.01$ )和比目鱼肌 VEGFR1 mRNA( $P<0.01$ ) 的表达显著上调,腓肠肌 VEGFR1 蛋白的表达显著上调, NRP1 的 mRNA 表达和蛋白水平在 3 组间差异不具有显著性。结论:跑台运动改善 AAC 诱导的心衰大鼠心脏结构重塑,但对射血分数作用不明显;跑台运动明显抑制心衰大鼠骨骼肌萎缩和凋亡,显著上调腓肠肌 VEGFB 及其受体 VEGFR1 的 mRNA 和蛋白表达,提示, VEGFB 及其受体 VEGFR1 可能参与了运动抑制心衰时骨骼肌萎缩和凋亡的过程。

**关键词:** 跑台运动;血管内皮生长因子 B;骨骼肌;凋亡;心衰

**Abstract:** Objective: To investigate the effects of treadmill running on abdominal aortic constriction (AAC) rats skeletal muscle apoptosis, vascular endothelial growth factor B (VEGFB) and its receptor expression and its underlying mechanism. Methods: Male SD rats randomly assigned into CON group and AAC surgery group. After 4 weeks of surgery, the rats were randomly assigned into AAC sedentary group and AAC+E group. The AAC+E group underwent 4 weeks treadmill running for 5 d/w, 12 m/min. Echocardiography test was used to measure rats cardiac function. Hematoxylin-eosin staining (H.E.) method was used to investigate myocardium and gastrocnemius structure. Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) fluorescence dyeing was used to test gastrocnemius cell apoptosis. VEGFB, vascular endothelial growth factor receptor 1(VEGFR1) and neuropilin-1 (NRP1) mRNA level and protein level were detected by real-time PCR and immunohistochemistry. Atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), muscle atrophy F-box (MAFbx), muscle ring finger-1 (MuRF1), myostatin (MSTN), Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma 2 (Bcl2) and caspase3 mRNA were detected by real-time PCR. Results: 1) Compared with CON, AAC rats left ventricle weight was significantly increased ( $P<0.05$ ), and left ventricular diastolic anterior wall thickness (LVAW d) was significantly increased ( $P<0.05$ ). Left ventricular interval diameter at end-diastole (LVID d) increased significantly ( $P<0.01$ ). Left ventricular interval diameter at end-systole (LVID s) increased markedly ( $P<0.001$ ). Left ventricular fraction shortening (LVFS) was significantly decreased ( $P<0.001$ ). LVFS decreased significantly ( $P<0.01$ ). ANP and BNP mRNA expression were increased markedly ( $P<0.001$  and  $P<0.001$ ). Compared with AAC group, 4 weeks treadmill running significantly decreased AAC rats left ventricle mass ( $P<0.05$ ). LVAW d was significantly decreased ( $P<0.05$ ), LVID d decreased markedly ( $P<0.05$ ), LVID s decreased markedly ( $P<0.05$ ). ANP and BNP mRNA expression were decreased markedly ( $P<0.01$  and  $P<0.01$ ). 2) Compared with CON, AAC rats soleus muscle weight significantly decreased ( $P<0.05$ ). MuRF1 ( $P<0.001$ ), MAFbx ( $P<0.05$ ) and MSTN ( $P<0.001$ ) mRNA expression were increased significantly. Compared with AAC group, AAC+E group soleus muscle weight significantly increased ( $P<0.05$ ). MuRF1 ( $P<0.001$ ). MAFbx ( $P<0.05$ ) and MSTN ( $P<0.001$ ) mRNA expression were decreased significantly. Compared with CON, AAC rats gastrocnemius weight significantly decreased ( $P<0.05$ ). MuRF1 ( $P<0.001$ ) and MSTN ( $P<0.05$ ) mRNA expression increased significantly. Compared with AAC group, AAC+E group gastrocnemius weight increased significantly ( $P<0.05$ ). MuRF1 and MSTN mRNA expression decreased significantly ( $P<0.01$  and  $P<0.05$ ). 3) Compared with CON, gastrocnemius Bax ( $P<0.001$ ) and caspase3 ( $P<0.01$ ) mRNA expression increased significantly, Bax/Bcl2 increased markedly ( $P<0.001$ ). Gastrocnemius apoptosis cells increased significantly. Compared with AAC group, AAC+E group gastrocnemius Bax ( $P<0.05$ ) and caspase3 ( $P<0.01$ ) mRNA expression and the ratio of Bax/Bcl2 ( $P<0.01$ ) decreased significantly. There was no significance between the expression of Bax, Bcl2, caspase3 and the ratio of Bax/Bcl2 of soleus muscle. 4) Compared with CON, AAC rats gastrocnemius muscle and soleus muscle VEGFB mRNA expression decreased significantly ( $P<0.01$  and  $P<0.01$ ). Compared with AAC group, AAC+E group gastrocnemius muscle and soleus muscle VEGFB mRNA up regulated markedly ( $P<0.001$  and  $P<0.001$ ). VEGFB protein level of gastrocnemius muscle increased significantly. Compared with AAC, AAC+E group gastrocnemius muscle and soleus muscle VEGFR1 mRNA upregulated significantly ( $P<0.01$  and  $P<0.01$ ). VEGFR1 protein level of gastrocnemius muscle increased significantly. There was no significant difference between the three groups of NRP1 mRNA expression and protein expression. Conclusions: Treadmill running

ameliorated AAC rats myocardium remodeling, but it had no significant effect on ejection fraction; treadmill running significantly inhibited skeletal muscle wasting and apoptosis and upregulated VEGFB and its receptor VEGFR1 mRNA and protein expression, which indicated that VEGFB and its receptor VEGFR1 could play the important role in exercise inhibiting skeletal muscle wasting and apoptosis during heart failure process.

**Keywords:** treadmill running; VEGFB; skeletal muscle; apoptosis; heart failure

**中图分类号:** G804.2 **文献标识码:** A

心力衰竭是指由心脏结构和功能异常导致心室收缩或舒张能力受损而引起的一系列病理生理变化的临床综合征(Braunwald et al., 2015)。临床上以左心室射血分数(left ventricular ejection fractions, LVEF)降低 50% 为临界点,将心衰分为射血分数降低的心衰(heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF)和射血分数保留的心衰(heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF)(LVEF $\geq$ 50%)(Sharma et al., 2014)。其中, HFpEF 的患病率约占全部心衰的 50%, 主要发病人群是老年、女性, 与 HFrEF 相比, 其病因更加复杂、治疗效果不明显、预后差、死亡率高, 正受到越来越多专家学者的关注(Sharma et al., 2014)。根据 HFpEF 的病因, 有学者提出, 在 HFpEF 的治疗中, 要从关注“中心机制”转向“外周机制”(Maurer et al., 2012; Upadhyaya et al., 2015; Wolfel, 2016), 骨骼肌正成为 HFpEF 治疗的主要靶器官之一。HFpEF 时, 骨骼肌质量减轻、横截面积减小、显著萎缩是骨骼肌改变的主要特征。炎症、氧化应激、自噬等多种机制诱导的骨骼肌细胞凋亡是导致骨骼肌萎缩的重要机制(Chang et al., 2017; Cunha et al., 2012; Fujita et al., 2015; Martins et al., 2014)。

对肌肉萎缩和恶病质的治疗手段主要包括营养补充、药物治疗和运动干预(李灵杰等, 2017), 运动干预对提升心衰患者生理功能、减少发病率和死亡率的有利作用在早期研究中被证实(Willius et al., 1961), 至今, 运动被认为是有临床意义的抗骨骼肌萎缩的治疗方法(Okoshi et al., 2017; Von et al., 2015)。有实验研究证实, 适度的运动显著改善 HFpEF 患者的肌肉萎缩(Souza et al., 2014; Tzanis et al., 2017)。运动通过抗氧化应激、抗炎、改善氧气利用等多个途径改善心衰时肌肉萎缩, 此外, 运动调节肌肉因子的转录和表达已成为重要的作用靶点。研究发现, 骨骼肌肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)、白介素-6、脂联素等在运动改善心衰中有着重要意义(Cai et al., 2018; Lenk et al., 2012; Ribeiro-Samora et al., 2017)。

血管内皮生长因子 B(vascular endothelial growth factor-B, VEGFB)是血管内皮生长因子家族新成员(Olofsson et al., 1996), 在骨骼肌中大量表达, 除促进血管内皮细胞脂肪酸转运、促进心脏血管生成、管径增加外, 还具有强大的抑制凋亡、促进细胞生存的作用(Zafar et al., 2017)。在血管内皮和平滑肌细胞、心肌细胞及大脑皮层神经元、视网膜神经元等多种细胞, VEGFB 均能显著促进

存活, 抑制凋亡的发生(Falk et al., 2011; Zhang et al., 2014)。心衰时, 骨骼肌 VEGFB 的表达如何改变, 能否通过运动调节其表达, 增强其抗凋亡的效应进而改善骨骼肌萎缩, 目前鲜见报道。

本研究以腹主动脉缩窄(abdominal aortic constriction, AAC)的大鼠为 HFpEF 模型, 观察运动对骨骼肌萎缩和凋亡的作用及骨骼肌 VEGFB 及其受体血管内皮生长因子受体 1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)和其辅受体神经纤毛蛋白 1(neuropilin-1, NRP1)表达的改变, 探讨 VEGFB 在运动改善心衰大鼠骨骼肌凋亡中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与材料

实验动物选用清洁级雄性 SD 大鼠, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0006。动物分笼饲养, 室内温度为 22 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C, 湿度为 50% $\pm$ 10%, 明暗交替周期为 12 h, 自由进食和饮水。所有饲料均由华阜康动物实验饲料厂提供。VEGFB、NRP1、VEGFR1 抗体购自 Abcam 公司(Cambridge, UK), 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)试剂盒购自 Roche 公司(Basel, Switzerland)。实验中所用其他试剂均为市售分析纯试剂。

### 1.2 动物分组与运动方案

选取 210 g 健康雄性 SD 大鼠 32 只, 适应性饲养 1 周后, 随机分成对照组(CON,  $n=8$ )和腹主动脉缩窄手术组( $n=24$ ), 分别进行假手术和腹主动脉缩窄手术组, 4 周后, 腹主动脉缩窄手术大鼠随机分为腹主动脉缩窄手术安静组(AAC,  $n=12$ )和腹主动脉缩窄手术运动组(AAC+E,  $n=12$ )。AAC+E 组采用跑台运动, 第 1 周进行适应性训练, 从 5 m/min、10 min/天、5 天/周逐渐递增至第 1 周末的 12 m/min、40 min/天、5 天/周, 以后的负荷同第 1 周末负荷, 训练干预 4 周。运动方案参考 Souza 等(2014)。每次训练在 16:00—18:00 进行, 不使用声、光、电等刺激手段。

### 1.3 腹主动脉缩窄术

腹主动脉缩窄术是模拟压力后负荷诱导的心力衰竭模型。210 g 雄性 SD 大鼠, 适应性饲养 1 周。术前禁食 24 h, 1% 戊巴比妥钠麻醉, 肋骨下缘 0.5 cm 处腹左侧备

皮,腹正中线旁 0.5 cm 处行 2 cm 左右切口,逐层分离皮下组织,进入腹腔。分离肠管,直到显露后腹膜和左侧肾脏,找到腹主动脉和肾动脉,于肾动脉上方分离腹主动脉,使用 0.7 mm 银夹缩窄大鼠腹主动脉,恢复肠管和脏器的位置,滴入青霉素适量,逐层缝合切口;假手术组只打开腹腔,分离腹主动脉,不使用银夹(Lu et al., 2015)。大鼠术后 4 周,出现心脏的代偿性改变,在术后 8 周,出现失代偿,发展为心力衰竭(奚晓青等, 2016)。术后 8 周进行超声心动测定,测定指标包括左心室质量(LV mass)、左室舒张末期前壁厚度(left ventricular diastolic anterior wall thickness, LVAW d)、左室舒张末期内径(left ventricular interval diameter at end-diastole, LVID d)、左室收缩末期内径(left ventricular interval diameter at end-systole, LVID s)增厚,左室缩短分数(left ventricular fraction shortening, LVFS)降低,左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)降低但是仍大于 50%,作为 HFpEF 成功模型。

#### 1.4 取材

大鼠末次运动结束 24 h 后,禁食过夜,自由饮水。称重后麻醉,腹主动脉取血,分离心脏、比目鱼肌和腓肠肌的白肌部分进行实验。

#### 1.5 超声心动测定

测定前,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)麻醉,胸部备皮,仰卧位将其头部及四肢固定在小动物超声实时影像系统 VEVO 2100(VisualSonics Inc, Toronto, Canada)测试板上,将探头置于左前胸,与前正中线呈 30°左右的夹角,显示胸骨旁左室长轴切面;探头顺时针旋转 90°可显示左室短轴切面图像,取 M 型曲线,进行心功能测量。超声心动图测量指标包括:LVID d 与 LVID s; LVAW d 与后壁厚度(left ventricular diastolic posterior wall thickness, LVPW d); LVEF 和 LVFS。所有测量值均测量 3 个心动周期取平均值。

#### 1.6 TUNEL 染色

比目鱼肌与腓肠肌均置于 10% 的多聚甲醛溶液中浸泡过夜,转至 20% 蔗糖溶液中浸泡过夜,进行石蜡包埋,用于石蜡切片,切片厚度为 5 μm。按照试剂盒流程进行:4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.5% Triton X-100 室温孵育 5 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。按 1:9 的比例避光混合 TdT 酶和荧光标记液,配置 TUNEL 检测液。充分弃去各孔 PBS,每孔加入 TUNEL 检测液 50 μL, 37 °C 孵育 60 min 后加入 DAPI 复染 5 min。PBS 洗涤 3 次。荧光显微镜观察和拍摄图片。

#### 1.7 Real-time PCR 测定腓肠肌和比目鱼肌中 VEGFB 及其受体、凋亡相关基因的 mRNA 水平

采用天根动物组织总 RNA 提取试剂盒(TianGen Biotech, Beijing)提取骨骼肌总 RNA,天根逆转录系统(TianGen Biotech, Beijing)进行逆转录。Real-time PCR 反应体积共 20 μL: Super Real Pre Mix Plus (SYBR Green) 体系

(TransGene Biotech, Beijing) 15 μL, 10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL, cDNA 模板 5 μL。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司(Shanghai, China)合成。进行 94 °C 30 s, 94 °C 5 s, 60 °C 30 s, 热循环 40 次。Real-time PCR 于 ABI Q6 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)上进行,以 GAPDH 作为内参(表 1)。

表 1 Real-time PCR 测定的基因表达引物序列

Table 1 The Primer Sequence of Genes Detected by Real-Time PCR

Gene	Sequence (5'-3')
GAPDH	Forward 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'
	Reverse 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'
ANP	Forward 5'-CTGATGGATTTCAGAATTTGCTGG-3'
	Reverse 5'-TCATTCGGCTCACTGAGCACTT-3'
BNP	Forward 5'-TACAGGAGCAGCGCAACCATT-3'
	Reverse 5'-CCGCCTCAGCACTTTGCAG-3'
MuRF1	Forward 5'-GCAAGTCCCATCAGCAACTG-3'
	Reverse 5'-GGGGGAAATCAGACTTCTC-3'
MAFbx	Forward 5'-TACTAAGGAGCGCCATGGATACT-3'
	Reverse 5'-GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT-3'
MSTN	Forward 5'-GTCTTCACATCAATACTCTGCCA-3'
	Reverse 5'-CATGCCTACCGAGTCTGACTT-3'
Bax	Forward 5'-ACGCATCCACCAAGAAGC-3'
	Reverse 5'-GCCACACGGAAGAAGACCT-3'
Bcl2	Reverse 5'-TGCAGAGATGTCCAGTCAGC-3'
	Forward 5'-TCAAAGAAGGCCACAATCCT-3'
Caspase3	Forward 5'-ACGGGACTTGGAAAGCAT C-3'
	Reverse 5'-TAAGGAAGCCTGGAGCACAG-3'
VEGFB	Forward 5'-GATCCAGTACCCGAGCAGTCA-3'
	Reverse 5'-TCTCCTTTCTTTTGGTCTGCAT-3'
VEGFR1	Forward 5'-AGATGCGGGAAACTACACGG-3'
	Reverse 5'-GGGAGGGTTGGCATAGACTGv-3'
NRP1	Forward 5'-AAAGTCCGTGTCGTCCCTTC-3'
	Reverse 5'-ACAGCCAATTGATGGTAGGC-3'

#### 1.8 免疫组化

腓肠肌均置于 10% 的多聚甲醛溶液中浸泡过夜,转至 20% 蔗糖溶液中浸泡过夜,进行石蜡包埋和切片,切片厚度为 5 μm。染色流程:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗 3 次后,过氧化氢孵育 5~10 min,消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗后, PBS 浸泡 5 min。经 10% 山羊血清封闭后冲洗,分别滴加 1:100 VEGFB、1:200 VEGFR1 和 1:100 NRP1 一抗、1:500 生物素标记二抗、适量辣根酶工作液 37 °C 孵育 10~30 min 后, PBS 冲洗,显色剂显色。VEGFB、VEGFR1 和 NRP1 特异性染色为褐色。自来水冲洗,复染,脱水,透明,封片,观察结果。随机抽取各组动物比目鱼肌和腓肠肌切片(n=3),在 400 倍视野下随机观察 5 个视野,确定 VEGFB、VEGFR1 和 NRP1 的表达变化。

#### 1.9 统计方法

实验结果以平均值±标准差( $M\pm SD$ )表示。数据采用 Prism 5.0 软件进行单因素方差分析处理,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 跑台运动对心衰大鼠心脏结构和功能的影响

腹主动脉缩窄手术 8 周后, AAC 大鼠心脏左心室质量显著高于 CON 组 ( $P < 0.05$ ), 心肌细胞横截面积增大; 与 AAC 组相比, 4 周跑台运动显著降低心衰大鼠心脏左心室质量和心肌细胞横截面积 ( $P < 0.05$ ; 图 1A~1C)。ANP 和 BNP 是检测心脏病理性重塑的重要分子指标, 与对照组相比, AAC 大鼠 ANP ( $P < 0.001$ ; 图 1D) 和 BNP ( $P < 0.001$ ; 图 1E) 的 mRNA 表达显著升高, 达 10 倍左右; 与 AAC 组相比, 跑台运动显著降低了 ANP ( $P < 0.01$ ) 和 BNP ( $P < 0.01$ ) 的 mRNA 相对表达 (图 1D, 图 1E)。

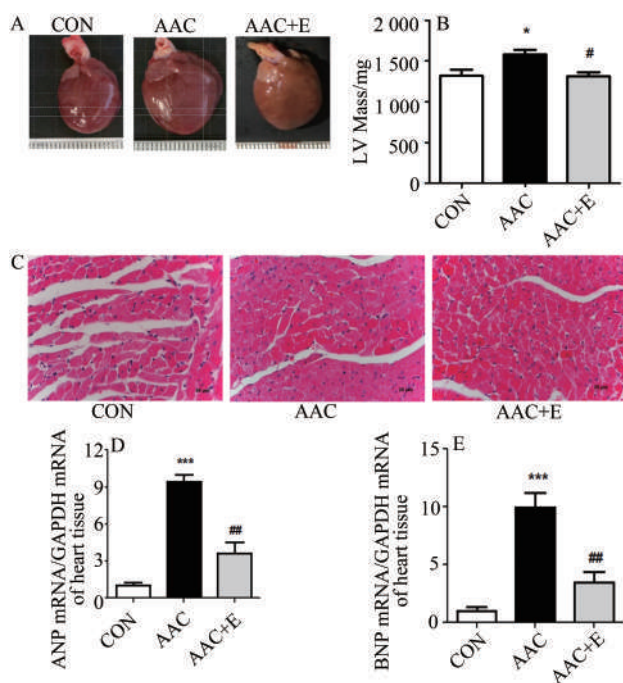


图1 各组大鼠心脏质量形态和心肌 ANP 和 BNP 表达的比较  
**Figure 1. Heart Weight, Heart Morphology and the Comparison of Myocardium ANP, BNP mRNA Expression in Three Groups**  
 注: A 为 3 组大鼠心脏形态比较; B 为左心室质量; C 为心肌细胞 H.E. 染色 (400 $\times$ ); D 为心肌组织 ANP mRNA 相对表达量; E 为心肌组织 BNP mRNA 相对表达量。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与 CON 组相比; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与 AAC 组相比 ( $n=8\sim 12$ )。

腹主动脉缩窄手术 8 周后, 与 CON 组相比, AAC 大鼠 LVAW d 显著增加 ( $P < 0.05$ ; 图 2B), LVPW d 有增大的趋势, 差异不具有显著性 (图 2C), LVID d 显著增加 ( $P < 0.01$ ; 图 2E), LVID s 显著增加 ( $P < 0.001$ ; 图 2F), LVEF 显著降低 ( $P < 0.001$ ; 图 2D), 但保留 50% 以上, LVFS 显著降低 ( $P < 0.01$ ; 图 2G), 提示, 腹主动脉缩窄手术诱导射血分

数保留型心衰大鼠模型确立。4 周跑台运动干预后, 与 AAC 组相比, AAC+E 组 LVAW d 显著降低 ( $P < 0.05$ ), LVPW d 显著降低 ( $P < 0.05$ ), LVID d 显著降低 ( $P < 0.05$ ), LVID s 显著降低 ( $P < 0.05$ )。4 周运动干预后, 与 AAC 组相比, AAC+E 组大鼠 LVEF 和 LVFS 有上升趋势, 差异不具有显著性。

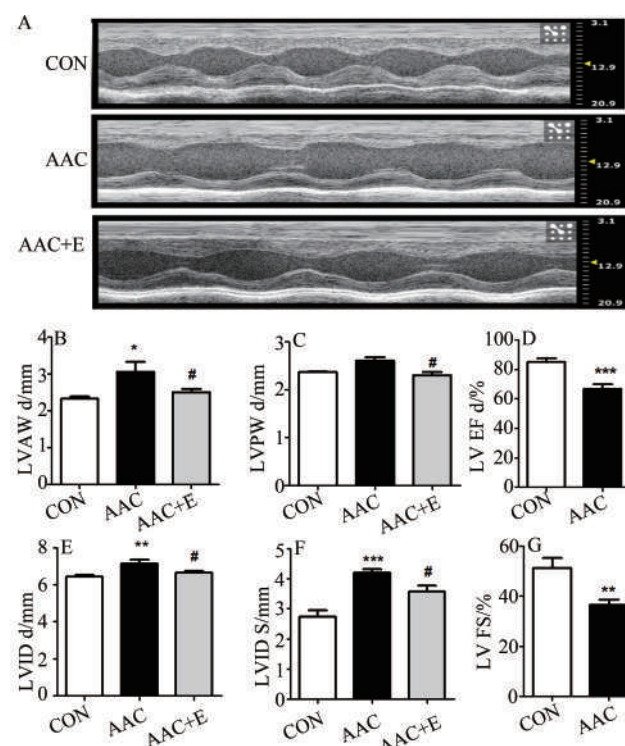


图2 各组大鼠心脏超声心动结果比较

**Figure 2. Comparison of Heart Echocardiography of Three Groups**

注: A 为二维超声心动图; B 为左心室舒张末期前壁厚度 (LVAW d); C 为左心室舒张末后前壁厚度 (LVPW d); D 为左心室射血分数 (LVEF); E 为左心室舒张末期内径 (LVID d); F 为左心室收缩末期内径 (LVID s); G 为左心室缩短分数 (LVFS)。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与 CON 组相比; # $P < 0.05$ , 与 AAC 组相比 ( $n=8\sim 12$ )。

### 2.2 跑台运动抑制心衰诱导的大鼠骨骼肌萎缩

腹主动脉缩窄手术 8 周后, 与 CON 组相比, AAC 大鼠腓肠肌和比目鱼肌质量显著降低 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.05$ ); 与 AAC 组相比, 4 周有氧运动显著增加 AAC 大鼠腓肠肌和比目鱼肌质量 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.05$ ; 图 3A、图 3B)。H.E. 染色结果显示, 与 CON 组相比, AAC 大鼠腓肠肌肌细胞核增多, 肌纤维的规则排列被破坏, 细胞形态趋于圆形化和边缘多边形, 肌细胞间隙有胶原沉积和纤维化物质, 细胞直径差异增大 (图 3C); 与 AAC 组相比, 4 周有氧运动恢复了肌纤维的规则排布和减少了细胞核数量。与 CON 组相比, AAC 大鼠比目鱼肌肌纤维的规则排列被破坏, 肌纤维筋膜间隙增大 (图 3D); 与 AAC 组相比, 4 周有氧运动

显著增加了比目鱼肌质量( $P<0.05$ ;图3B),恢复了肌纤维的规则排布和肌纤维筋膜结构(图3D)。

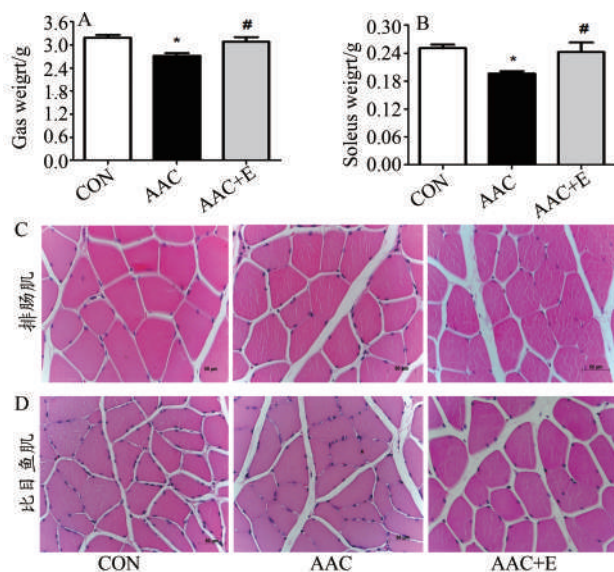


图3 各组大鼠腓肠肌和比目鱼肌质量和肌纤维结构的比较

Figure 3. The Gastrocnemius and Soleus Muscle Weight and Muscle Fiber Morphology Comparison of Three Groups

注:A为腓肠肌质量;B为比目鱼肌质量;C为腓肠肌H.E.染色(400 $\times$ );D为比目鱼肌H.E.染色(400 $\times$ )。\* $P<0.05$ ,与CON组相比;# $P<0.05$ ,与AAC组相比。

肌肉环指蛋白1(muscle ring finger 1, MuRF1)和肌肉萎缩盒F蛋白(muscle atrophy F-box, MAFbx)/Atrogin-1是在骨骼肌中特异性表达的E3泛素连接酶。MSTN是肌肉质量的负调控因子。本研究将它们作为骨骼肌萎缩的分

子标志。实验结果显示,与对照组相比,AAC大鼠腓肠肌和比目鱼肌 MuRF1 mRNA 相对表达显著升高( $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ),升高倍数为3~5倍(图4A、图4D),腓肠肌 MAFbx mRNA 表达有增高的趋势,无显著性差异(图4B),比目鱼肌 MAFbx mRNA 相对表达显著升高( $P<0.05$ ;图4E),腓肠肌和比目鱼肌 MSTN mRNA 相对表达量显著升高( $P<0.01$ 和 $P<0.001$ ;图4C、图4F);与AAC组相比,4周有氧运动显著降低了腓肠肌和比目鱼肌 MuRF1 的表达( $P<0.01$ 和 $P<0.001$ ),腓肠肌 MAFbx 表达有下调趋势,比目鱼肌 MAFbx 显著降低( $P<0.05$ ),腓肠肌和比目鱼肌 MSTN 的相对表达量显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ )。

### 2.3 跑台运动抑制心衰诱导的大鼠腓肠肌凋亡

与CON组相比,AAC大鼠腓肠肌 Bax ( $P<0.001$ ;图5A)、caspase3 ( $P<0.01$ ;图5D)mRNA 表达显著升高,Bax/Bcl2 比值显著增大( $P<0.001$ ;图5C);与AAC组相比,4周有氧运动可以显著抑制 Bax ( $P<0.05$ )、caspase3 ( $P<0.01$ )mRNA 的表达和 Bax/Bcl2 比值( $P<0.01$ )。

与CON组相比,AAC组比目鱼肌 Bax、Bcl2、caspase3 mRNA 的表达和 Bax/Bcl 的比值差异均不具有显著性,与AAC组相比,AAC+E组 Bax、Bcl2 和 caspase3 mRNA 的表达和 Bax/Bcl 的比值差异不具有显著性(图5E~图5H)。

本研究采用 TUNEL 检测骨骼肌细胞凋亡的情况。TUNEL 染色阳性凋亡细胞核为绿色,细胞核为蓝色 DAPI 染色,从图6可以看出 AAC 大鼠腓肠肌细胞凋亡显著增加,绿色荧光较强;AAC+E 组腓肠肌绿色荧光显著减弱(图6),提示,4周跑台运动能显著抑制腓肠肌肌细胞凋亡。

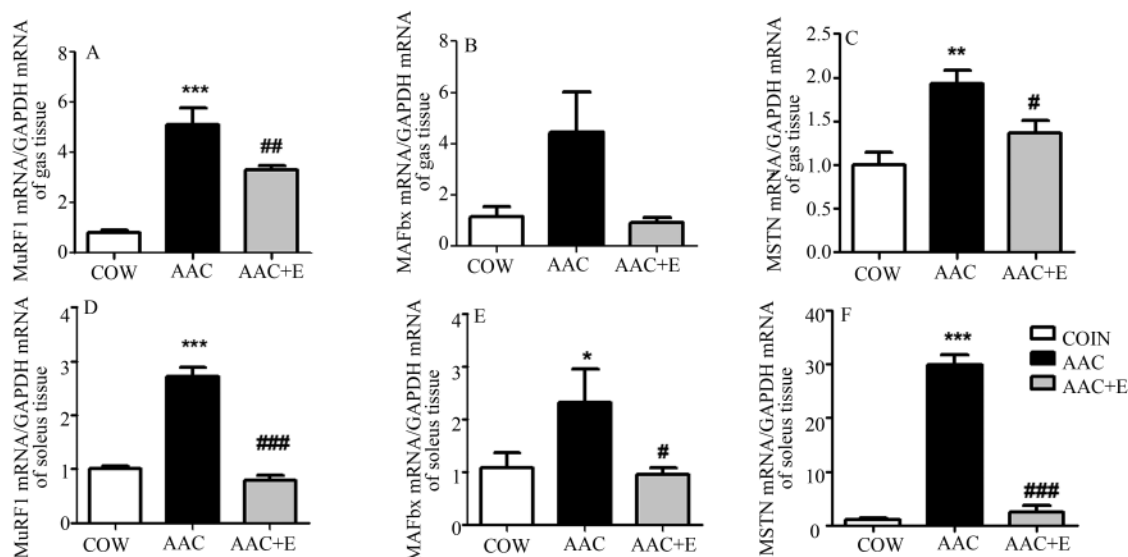


图4 各组大鼠腓肠肌和比目鱼肌萎缩分子指标的比较。

Figure 4. The Comparison of Gastrocnemius and Soleus Muscle Atrophy Molecular Markers of Three Groups

注:A为腓肠肌 MuRF1 mRNA 相对表达量;B为腓肠肌 MAFbx mRNA 相对表达量;C为腓肠肌 MSTN mRNA 相对表达量;D为比目鱼肌 MuRF1 mRNA 相对表达量;E为比目鱼肌 MAFbx mRNA 相对表达量;F为比目鱼肌 MSTN mRNA 相对表达量。\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ,与CON组相比;# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ,### $P<0.001$ ,与AAC组相比。

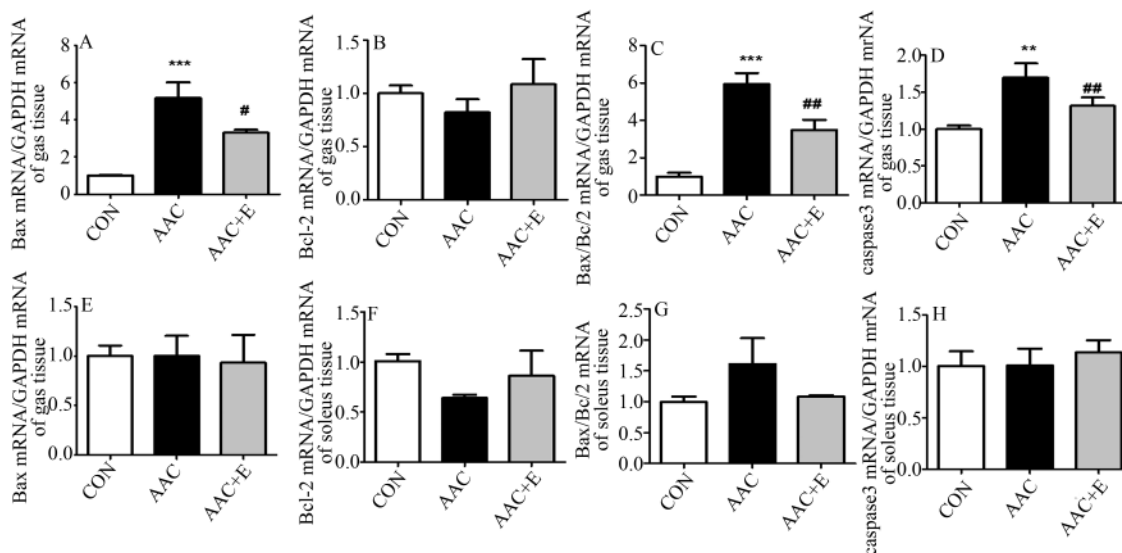


图5 有氧运动对腓肠肌和比目鱼肌凋亡分子标记Bax、Bcl2、Bax/Bcl2和caspase3 mRNA表达的影响

Figure 5. The Effects of Aerobic Exercise on Gastrocnemius and Soleus Muscle Apoptosis Molecular Markers of Bax, Bcl2, Bax/Bcl2, and Caspase 3 mRNA Expression

注:A为腓肠肌Bax mRNA;B为腓肠肌Bcl2 mRNA;C为腓肠肌Bax/Bcl2的比值;D为腓肠肌caspase3 mRNA;E为比目鱼肌Bax mRNA;F为比目鱼肌Bcl2 mRNA;G为比目鱼肌Bax/Bcl2的比值;H为比目鱼肌caspase3 mRNA。\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ ,与CON组相比;# $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ,与AAC组相比( $n=8\sim 12$ )。

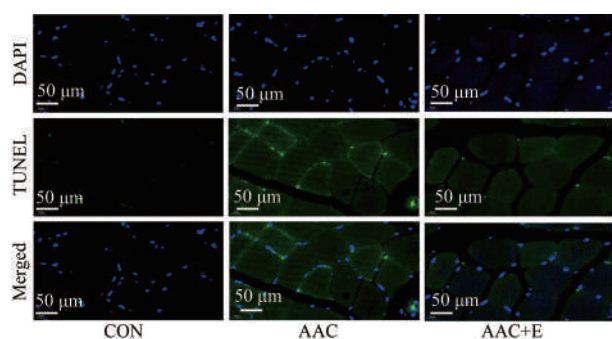


图6 各组大鼠腓肠肌TUNEL染色的比较(400×)

Figure 6. Three Groups Gastrocnemius Muscle TUNEL Staining Comparison (400×)

注:DAPI为蓝光,TUNEL为绿光。

#### 2.4 跑台运动促进心衰大鼠比目鱼肌和腓肠肌 VEGFB 及其受体 VEGFR1 和 NRP1 的表达

与 CON 组相比,AAC 大鼠腓肠肌和比目鱼肌 VEGFB mRNA 相对表达量显著降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ );4 周的跑台运动显著增加了心衰大鼠腓肠肌和比目鱼肌 VEGFB mRNA 相对表达( $P < 0.001$  和  $P < 0.001$ ;图 7A、图 7D)。与 CON 组相比,AAC 大鼠腓肠肌和比目鱼肌 VEGFR1 mRNA 表达无显著变化;与 AAC 组相比,AAC+E 组腓肠肌和比目鱼肌 VEGFR1(图 7B、图 7E)mRNA 的表达水平显著上调( $P < 0.01$ )。无论是腓肠肌还是比目鱼肌,3 组间 NRP1 表达均无显著性差异(图 7C、图 7F)。免疫组化结果提示,跑台运动显著上调腓肠肌 VEGFB 和 VEGFR1 蛋白表达水平(图 8A、图 8B)。

### 3 讨论

#### 3.1 心衰时骨骼肌萎缩

临床研究发现,心力衰竭患者骨骼肌出现明显萎缩,大约 2/3 的心力衰竭患者腓肠肌质量显著降低(Kennel et al., 2015),骨骼肌萎缩是心力衰竭病人死亡的独立风险因素(Fearon et al., 2013)。本研究利用腹主动脉缩窄 8 周诱导的 HFpEF 模型,大鼠心质量增加,左室壁厚度增加,左室舒张和收缩功能均降低,射血分数保留 50% 以上,模型指标符合 HFpEF 表现。发现 AAC 大鼠比目鱼肌和腓肠肌质量均出现显著下降,肌细胞圆形化和小角化,骨骼肌萎缩的多个分子标志基因, MuRF1、MAFbx 和 MSTN 的表达在骨骼肌均显著上调,与 Mangner 等(2015)和 Cunha 等(2012)结果一致,提示,AAC 诱导的心衰大鼠出现了显著的骨骼肌萎缩。

心力衰竭时,多种机制诱导了骨骼肌萎缩的发生。心衰时骨骼肌毛细血管密度下降,血管内皮功能下降,导致骨骼肌血液灌注量下降(Okita et al., 2013);机体的炎症水平升高,多种炎症因子如 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著升高(Suthahar et al., 2018);氧化应激系统过度激活,活性氧大量生成(Dey et al., 2018),这些因素共同作用、彼此叠加,诱导骨骼肌凋亡发生,进一步加重肌肉萎缩,促进心源性恶病质的发展。在心力衰竭患者和心衰动物模型中均发现骨骼肌细胞的程序性死亡,线粒体色素 C 氧化酶的释放、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 和 9 的激活(Fujita et al., 2015; Vescovo et al., 2006)。骨骼肌细胞凋亡是心力衰竭时肌肉萎缩的重要机制。本研究也发现,心衰大鼠腓肠肌 Bax/Bcl2 比值显著升高,TUNEL 染色显著增

强,提示,腓肠肌细胞凋亡显著增强。但在慢肌纤维为主的比目鱼肌却未发现显著的凋亡增加,提示,心衰时快肌纤维更易于发生凋亡。

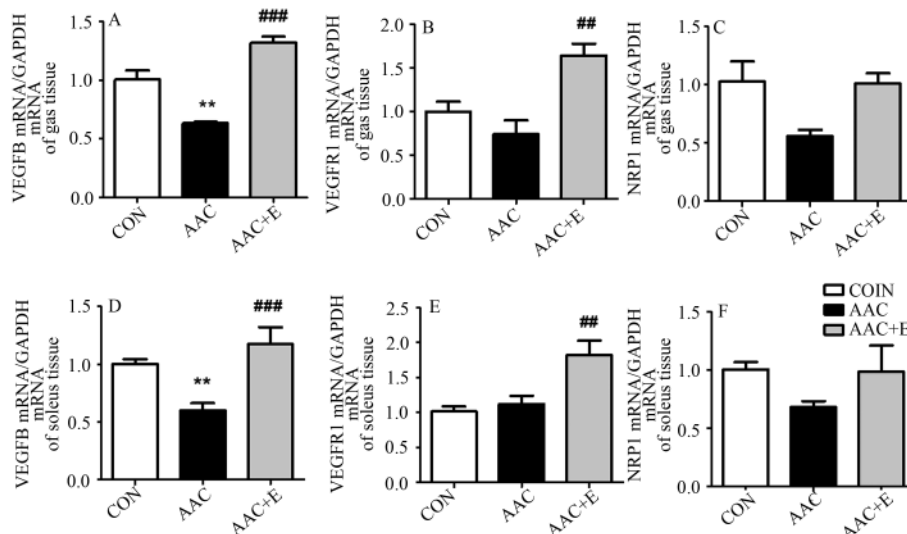


图7 运动促进AAC大鼠腓肠肌和比目鱼肌 VEGFB 及其受体 VEGFR1, NRP1 mRNA 的表达

Figure 7. Exercise Promoted AAC Rats Gastrocnemius and Soleus Muscle VEGFB and Its Receptor VEGFR1, NRP1 Expression

注:A为腓肠肌 VEGFB mRNA 相对表达量;B为腓肠肌 VEGFR1 mRNA 相对表达量;C为腓肠肌 NRP1 mRNA 相对表达量;D为比目鱼肌 VEGFB mRNA 相对表达量;E为比目鱼肌 VEGFR1 mRNA 相对表达量;F为比目鱼肌 NRP1 mRNA 相对表达量。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , 与 CON 组相比;  $###P < 0.01$ ,  $####P < 0.001$ , 与 AAC 组相比 ( $n=8 \sim 12$ )。

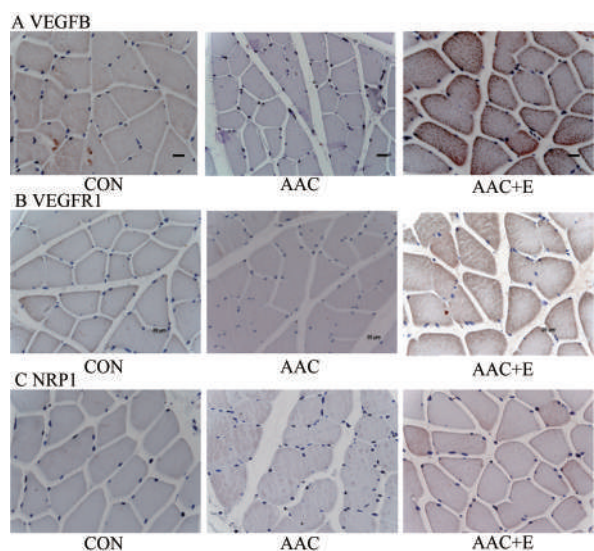


图8 运动促进腓肠肌 VEGFB 及其受体 VEGFR1 蛋白的表达,免疫组化结果

Figure 8. Exercise Promoted Gastrocnemius Muscle VEGFB and Its Receptor VEGFR1 Protein Expression of Immunohistochemical Staining

注:A为腓肠肌 VEGFB 蛋白的表达;B为腓肠肌 VEGFR1 蛋白的表达;C为腓肠肌 NRP1 蛋白的表达。400×视野下拍摄,棕褐色代表蛋白的表达。

### 3.2 运动改善心衰骨骼肌萎缩

运动是改善心衰时骨骼肌萎缩有效的防治手段之一,Lenk 等(2012)对 12 名心衰患者的运动干预发现,骨骼肌 MSTN 分泌显著降低,心衰诱导的骨骼肌萎缩得到

显著改善。Souza 等(2014)在升主动脉缩窄 18 周的 Wistar 大鼠,进行 10 周有氧运动干预发现,比目鱼肌肌肉萎缩明显改善,萎缩标志分子 MuRF-1 和 MAFbx 表达显著降低。本研究结果同样证实中小强度的跑台运动后,大鼠比目鱼肌和腓肠肌质量恢复,萎缩减轻,萎缩的分子标志基因表达均显著降低,提示,运动有效抑制了 AAC 诱导的骨骼肌萎缩。同时,虽然运动显著地改善 AAC 诱导的心脏重塑,但未对心功能有显著的改善作用,运动后心脏的射血分数并没有显著升高,该结果与多篇报道一致 (Bhella et al., 2011; Haykowsky et al., 2012; Tucker et al., 2018; Upadhyaya et al., 2015),提示,运动改善 HEpEF 的骨骼肌萎缩并不是通过“中心机制”,即不是通过改善心功能实现的。运动可能是通过“外周机制”,即直接作用于骨骼肌本身,发挥其抗萎缩效应。

运动对细胞凋亡的效应是明确的,有氧运动可以抑制神经细胞 caspase3、Bax 的表达,表现出强大的抗凋亡作用 (Jang et al., 2018; Terashi et al., 2019);运动可以改善肿瘤化疗引起的肌肉萎缩,抑制肌细胞凋亡 (Park et al., 2019),抑制衰老引起的骨骼肌细胞凋亡 (Dethlefsen et al., 2018; Marzetti et al., 2008)。目前,关于运动抗心衰时骨骼肌凋亡的研究尚未见报道。本研究证实,中小强度跑台运动显著下调了腓肠肌 Bax/Bcl2 的比值, TUNEL 染色阳性显著减少,提示,骨骼肌凋亡显著减轻。

运动抑制骨骼肌凋亡的机制,有研究报道运动可通过调节骨骼肌中 MSTN (Lenk et al., 2012)、ghrelin (Tsub-



ouchi et al., 2014)、白介素-6(Nunes et al., 2013)和脂联素(Krause et al., 2008)等肌肉因子的表达、合成和分泌,减轻骨骼肌的萎缩。

### 3.3 肌肉因子 VEGFB 的抗凋亡作用

VEGFB 是 VEGF 家族成员之一,在体内代谢性旺盛的组织和细胞大量表达,有着丰富的生物学功能,主要表现在促进内皮细胞脂质摄入、促进心脏血管生成、管径增加等作用(马谨等,2015)。有研究证实,VEGFB 具有强大的抑制凋亡、促进细胞生存的作用。有文献报道,VEGFB 在心肌细胞(Huusko et al., 2012; Karpanen et al., 2008)、内皮细胞(Bry et al., 2010; Li et al., 2008)、神经细胞(Arjunan et al., 2018; Falk et al., 2011; Huang et al., 2016; Poesen et al., 2008)均可发挥抑制细胞凋亡的作用。

心梗模型和主动脉缩窄诱导的心力衰竭模型的研究结果发现,血浆 VEGF-B 显著下降(Huusko et al., 2012; Zhao et al., 2013)。在本实验中,AAO 大鼠 VEGFB 比目鱼肌和腓肠肌 mRNA 表达和蛋白水平显著降低,与骨骼肌细胞凋亡增加相关,提示,VEGFB 在心衰时骨骼肌病变中有重要的病理生理意义。

### 3.4 运动对骨骼肌 VEGFB 及其受体的调节作用

VEGFB 及其受体在骨骼肌中大量表达,运动对 VEGFB 表达有显著的促进作用。研究提示,单次运动后骨骼肌(Bailey et al., 2006) VEGFB 的受体 VEGFR1 的表达水平显著上调。12 周龄小鼠在进行 3 周自由跑轮运动后,与对照组相比,骨骼肌 VEGFB 和 PGC1 $\alpha$  mRNA 表达水平显著升高(Boström et al., 2012)。同时,一项在糖尿病小鼠的运动干预实验的研究报道显示,腓肠肌中 VEGFB 在单次运动后只有上升的趋势,差异不具有显著性( $P=0.08$ )(Kivelä et al., 2008)。目前鲜见关于运动对心力衰竭大鼠骨骼肌 VEGFB 表达的影响研究。本研究发现,4 周的跑台运动显著上调了腓肠肌 VEGFB 的 mRNA 和蛋白的表达水平,尤其是运动对骨骼肌中 VEGFR1 受体的促进作用更为明显,这与前期关于跑台运动促进高脂饮食喂养的肥胖小鼠比目鱼肌 VEGFR1 表达的研究结果一致(张靓等,2017),但 VEGFB 作用的辅受体 NRP1 并未见显著改变,提示,VEGFB 及其受体 VEGFR1 可能是运动抑制心衰大鼠骨骼肌凋亡的分子靶点之一。

## 4 总结

4 周的跑台运动显著提高了心衰大鼠骨骼肌质量,改善腓肠肌和比目鱼萎缩,显著抑制腓肠肌凋亡,VEGFB 及其受体 VEGFR1 的 mRNA 和蛋白表达显著上调,提示,VEGFB 及其受体 VEGFR1 可能参与了运动抑制心衰时骨骼肌萎缩和凋亡的过程。

### 参考文献:

李灵杰,张靓,2017.心力衰竭时骨骼肌重塑[J].生理科学进展,48

(6): 435-440.

马谨,张靓,2015.肌肉因子新成员:血管内皮生长因子B[J].生理科学进展,46(4): 299-302.

奚晓青,陈小真,马全鑫,等.2016.主动脉弓狭窄致大鼠慢性心力衰竭模型的建立及病理过程观察[J].中国比较医学杂志,26(4): 35-40.

张靓,马谨,高海宁,等.2017.跑台运动对高脂饮食喂养的肥胖小鼠比目鱼肌脂质沉积和血管内皮生长因子B表达的影响[J].中国运动医学杂志,36(9): 773-778.

ARJUNAN P, LIN X, TANG Z, et al., 2018. VEGF-B is a potent antioxidant [J]. P Nat Acad Sci, 115(41): 10351-10356.

BAILEY A P, SHPARAGO M, GU J W, 2006. Exercise increases soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) in circulation of healthy volunteers [J]. Med Sci Monit, 12(2): CR45-CR50.

BHELLA P S, PRASAD A, HEINICKE K, et al., 2011. Abnormal haemodynamic response to exercise in heart failure with preserved ejection fraction [J]. Eur J Heart Fail, 13(12): 1296-1304.

BOSTRÖM P, WU J, JEDRYCHOWSKI M P, et al., 2012. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. Nature, 481(7382): 463-468.

BRAUNWALD E, NICHOLLS M, 2015. Leaders in Cardiovascular Medicine. Eugene Braunwald MD: An icon of the 20th century still going strong [J]. Eur Heart J, 36(22): 1350-1351.

BRY M, KIVELÄ R, HOLOPAINEN T, et al., 2010. Vascular endothelial growth factor-B acts as a coronary growth factor in transgenic rats without inducing angiogenesis, vascular leak, or inflammation [J]. Circulation, 122(17): 1725-1733.

CAI M, WANG Q, LIU Z, et al., 2018. Effects of different types of exercise on skeletal muscle atrophy, antioxidant capacity and growth factors expression following myocardial infarction [J]. Life Sci, 213: 40-49.

CHANG H, LI C, WANG Q, et al., 2017. QSKL protects against myocardial apoptosis on heart failure via PI3K/Akt-p53 signaling pathway [J]. Sci Rep, 7(1): 16986.

CUNHA T F, BACURAU A V N, MOREIRA J B N, et al., 2012. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure [J]. PLoS One, 7(8): e41701.

COATS A J S, 2011. Clinical utility of exercise training in chronic systolic heart failure [J]. Nat Rev Cardiol, 8(7): 380.

DETHLEFSEN M M, HALLING J F, MØLLER H D, et al., 2018. Regulation of apoptosis and autophagy in mouse and human skeletal muscle with aging and lifelong exercise training [J]. Exp Gerontol, 111: 141-153.

DEY S, DEMAZUMDER D, SIDOR A, et al., 2018. Mitochondrial ROS drive sudden cardiac death and chronic proteome [J]. Circ Res, 123(3): 356-371.

FALK T, YUE X, ZHANG S, et al. 2011. Vascular endothelial growth factor-B is neuroprotective in an in vivo rat model of Parkinson's disease [J]. Neurosci Lett, 496(1): 43-47.

FEARON K, ARENDS J, BARACOS V, et al., 2013. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia [J]. Nat Rev Clin Oncol, 10(2): 90-99.

- FUJITA N, FUJINO H, SAKAMOTO H, et al., 2015. Time course of ubiquitin-proteasome and macroautophagy-lysosome pathways in skeletal muscle in rats with heart failure[J]. *Biomed Res*, 36(6): 383-392.
- GIELEN S, SANDRI M, KOZAREZ I, et al., 2012. Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: The randomized Leipzig exercise intervention in chronic heart failure and aging catabolism study[J]. *Circulation*, 125: 2716-2727.
- HAYKOWSKY M J, BRUBAKER P H, STEWART K P, et al., 2012. Effect of endurance training on the determinants of peak exercise oxygen consumption in elderly patients with stable compensated heart failure and preserved ejection fraction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 60(2):120-128.
- HUANG D, ZHAO C, JU R, et al., 2016. VEGF-B inhibits hyperglycemia-and Macugen-induced retinal apoptosis [J]. *Sci Rep*, 6: 26059.
- HUUSKO J, LOTTONEN L, MERENTIE M, et al., 2012. AAV9-mediated VEGF-B gene transfer improves systolic function in progressive left ventricular hypertrophy[J]. *Mol Ther*, 20(12):2212-2221.
- JANG Y C, HWANG D J, KOO J H, et al., 2018. Association of exercise-induced autophagy upregulation and apoptosis suppression with neuroprotection against pharmacologically induced Parkinson's disease[J]. *J Exerc Nutr Biochem*, 22(1):1-8.
- KARPANEN T, BRY M, OLLILA H M, et al., 2008. Overexpression of vascular endothelial growth factor-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy [J]. *Circ Res*, 103(9): 1018-1026.
- KENNEL P J, MANCINI D M, SCHULZE P C, 2015. Skeletal muscle changes in chronic cardiac disease and failure[J]. *Compr Physiol*, 5(4):1947-1969.
- KAUR A, JAIN A K, SEHGAL R, et al., 2013. Hemodynamics and early recovery characteristics of desflurane versus sevoflurane in bariatric surgery[J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 29(1): 36.
- KIVELÄ R, SILVENNOINEN M, LEHTI M, et al., 2008. Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 7(1): 13.
- KRAUSE M P, LIU Y, VU V, et al., 2008. Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function[J]. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 295(1):C203-212.
- LENK K, ERBS S, HÖLLRIEGEL R, 2012. Exercise training leads to a reduction of elevated myostatin levels in patients with chronic heart failure[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 19(3):404-411.
- LI X, TJWA M, VAN HOVE I, et al., 2008. Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(9): 1614-1620.
- LU W W, ZHAO L, ZHANG J S, et al., 2015. Intermedin-1-53 protects against cardiac hypertrophy by inhibiting endoplasmic reticulum stress via activating AMP-activated protein kinase[J]. *J Hypertens*, 33(8):1676-1687.
- MANGNER N, WEIKERT B, BOWEN T S, et al., 2015. Skeletal muscle alterations in chronic heart failure: differential effects on quadriceps and diaphragm [J]. *J Cachexia Sarcopeni*, 6(4): 381-390.
- MARTINS T, VITORINO R, MOREIRA-GONCALVES D, et al., 2014. Recent insights on the molecular mechanisms and therapeutic approaches for cardiac cachexia[J]. *Clin Biochem*, 47(1-2): 8-15.
- MARZETTI E, GROBAN L, WOHLGEMUTH S E, et al., 2008. Effects of short-term GH supplementation and treadmill exercise training on physical performance and skeletal muscle apoptosis in old rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(2): R558-67.
- MAURER M S, SCHULZE P C, 2012. Exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: shifting focus from the heart to peripheral skeletal muscle[J]. *J Am Coll Cardiol*, 60(2): 129-131.
- NUNES R B, ALVES J P, KESSLER L P, et al., 2013. Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats [J]. *Clinics*, 68(6): 876-882.
- OKITA K, KINUGAWA S, TSUTSUI H, 2013. Exercise intolerance in chronic heart failure--skeletal muscle dysfunction and potential therapies[J]. *Circ J*, 77(2):293-300.
- OKOSHI M P, CAPALBO R V, ROMEIRO F G, et al., 2017. Cardiac cachexia: Perspectives for prevention and treatment[J]. *Arq Bras Cardiol*, 108(1):74-80.
- OLOFSSON B, PAJUSOLA K, KAIPAINEN A, et al., 1996. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6):2576-2581.
- PARK S S, PARK H S, JEONG H, et al., 2019. Treadmill exercise ameliorates chemotherapy-induced muscle weakness and central fatigue by enhancing mitochondrial function and inhibiting apoptosis [J]. *Int Neurourol*, 23(1):S32-39.
- POESEN K, LAMBRECHTS D, VAN DAMME P, et al., 2008. Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration[J]. *J Neurosci*, 28(42): 10451-10459.
- RIBEIRO-SAMORA G A, RABELO L A, FERREIRA A C C, et al., 2017. Inflammation and oxidative stress in heart failure: Effects of exercise intensity and duration[J]. *Braz J Med Biol Res*, 50(9):e6393.
- SHARMA K, KASS D A, 2014. Heart failure with preserved ejection fraction: Mechanisms, clinical features, and therapies [J]. *Circ Res*, 115(1):79-96.
- SMART N A, STEELE M, 2011. The effect of physical training on systemic proinflammatory cytokine expression in heart failure patients: A systematic review[J]. *Congest Heart Fail*, 17:11-114.
- SOUZA R W, PIEDADE W P, SOARES L C, et al., 2014. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions [J]. *PLoS One*, 9(10):e110020.
- SUTHAHAR N, MEIJERS W C, BROUWERS F P, et al., 2018. Heart failure and inflammation-related biomarkers as predictors of new-onset diabetes in the general population[J]. *Int J Cardiol*, 250: 188-194.

- 孔庆波, 崔瑞华, 2012. 基于供求理论反思公共体育场地建设的合理规划与布局[J]. 西安体育学院学报, 29(1):32-36.
- 孔庆波, 崔瑞华, 2014. 农村体育场地供需认知与矛盾剖析[J]. 成都体育学院学报, 40(2):33-36, 42.
- 罗伯特·平狄克, 2013. 微观经济学(第八版)[M]. 李彬, 高远, 译. 北京: 中国人民大学出版社.
- 李小建, 杨慧敏, 2017. 乡村聚落变化及发展型式展望[J]. 经济地理, 37(12):1-8.
- 梁勤超, 李源, 石振国, 2017. 供给侧改革视域下社区体育公共空间供需矛盾及其化解[J]. 武汉体育学院学报, 32(3):208-212.
- 刘亮, 王惠, 2016. 供给侧改革视角下我国公共体育资源供需矛盾的消解与改革路径[J]. 武汉体育学院学报, 50(4):51-55.
- 刘明慧, 常晋, 2015. 政府购买公共服务主体: 职责界定、制约因素与政策建议[J]. 宏观经济研究, (11):3-13, 71.
- 鲁西奇, 2013. 散村与集村: 传统中国的乡村聚落形态及其演变[J]. 华中师范大学学报(人文社会科学版), 52(4):113-130.
- 马淑卿, 王伟, 2017. 农村体育公共产品供给的差异化治理[J]. 云南行政学院学报, 19(2):165-170.
- 莫妮娜, 许晋, 李艳菊, 2014. 新农村建设中传统村落空间形态延续探讨[J]. 农村经济, (8):22-25.
- 任映红, 王勇, 2015. 城市化进程中村落变迁的条件和作用机理[J]. 理论探讨, (1):136-140.
- 孙招谦, 周游, 2019. 国内乡村空间形态研究综述[J]. 小城镇建设, 37(8):5-10.
- 谭雪兰, 安悦, 蒋凌霄, 等, 2018. 江南丘陵地区乡村聚落地域分异特征研究: 以湖南省为例[J]. 地理科学, 38(10):1707-1714.
- 万波, 2012. 公共服务设施选址问题研究[D]. 武汉: 华中科技大学.
- 王驰, 何元春, 2018. 地方性知识视阈下我国农村公共体育服务供给理念的反思及重构[J]. 北京体育大学学报, 41(7):9-16.
- 王富百慧, 王梅, 张彦峰, 等, 2016. 中国家庭体育锻炼行为特点及代际互动关系研究[J]. 体育科学, 36(11):31-38.
- 王甫园, 王开泳, 丁俊, 2018. 全面实施二孩政策后中国公共服务资源需求与空间配置格局[J]. 地理与地理信息科学, 34(1):105-113.
- 汪文奇, 金涛, 庞俊鹏, 2017. 共建共享视域中我国农村公共体育服务发展的困境与突破[J]. 武汉体育学院学报, 51(10):25-31.
- 新华网, 2018. 李克强在全国深化“放管服”改革转变政府职能电视电话会议上的讲话[EB/OL].[2018-07-13]. [http://www.xinhuanet.com/politics/2018-07/13/c\\_1123118771.htm](http://www.xinhuanet.com/politics/2018-07/13/c_1123118771.htm).
- 熊禄全, 张玲燕, 孔庆波, 2018a. 农村公共体育服务供给侧改革治理的内在需求与路径导向[J]. 体育科学, 38(4):22-36.
- 熊禄全, 张玲燕, 孔庆波, 2018b. 我国农村公共体育场地有效供给研究[J]. 体育文化导刊, (2):47-52.
- 许建和, 柳肃, 熊鹰, 等, 2017. 南方山地乡村聚落空间分布及其格局优化调整: 以临武县西山瑶族乡为例[J]. 经济地理, 37(10):221-227.
- 杨剑, 邱茜, 季浏, 2014. 锻炼行为生态学模型及其在体育领域的应用[J]. 武汉体育学院学报, 48(10):75-81.
- 杨希, 2020. 近 20 年国内外乡村聚落布局形态量化研究方法进展[J]. 国际城市规划, 35(4):72-80.
- 岳俞余, 彭震伟, 2018. 乡村聚落社会生态系统的韧性发展研究[J]. 南方建筑, (5):4-9.
- 詹新寰, 仇泽国, 2018. 我国农村公共体育服务运行现状研究[J]. 首都体育学院学报, 3(4):292-296.
- 张玲燕, 孔庆波, 熊禄全, 等, 2017. 农村体育场地低效供给及其成因[J]. 体育学刊, 24(2):64-67.
- 张晴, 2018. 近三十年来成都平原农村村落空间形态演变研究[D]. 西安: 西安交通大学.
- 张志强, 谭益民, 许程, 等, 2018. 基于聚居动态进化理论的传统村落空间形态演变研究: 以湘西地区山背村为例[J]. 南方建筑, (3):71-77.
- 卓佳, 冯新刚, 张文成, 2018. 基于需求导向的村镇公共服务设施布局优化: 以黄山市歙县为例[J]. 小城镇建设, (2):80-86.
- KIDD B, DONNELLY P, 2000. Human rights in sports[J]. Int Rev Sociol Sport, 35(2):131-148.

(收稿日期: 2019-11-18; 修订日期: 2021-12-06; 编辑: 丁合)

(上接第 93 页)

- TERASHI T, OTSUKA S, TAKADA S, et al., 2019. Neuroprotective effects of different frequency preconditioning exercise on neuronal apoptosis after focal brain ischemia in rats[J]. Neurol Res, 41(6):510-518.
- TSUBOUCHI H, YANAGI S, MIURA A, et al., 2014. Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the development of lung adenocarcinoma in mice[J]. Eur J Pharmacol, 743: 1-10.
- TUCKER W J, LIJAUCO C C, HEARON C M, et al., 2018. Mechanisms of the improvement in peak VO<sub>2</sub> With exercise training in heart failure with reduced or preserved ejection fraction[J]. Heart Lung Circ, 27(1):9-21.
- TZANIS G, PHILIPPOU A, KARATZANOS E, et al., 2017. Effects of high-intensity interval exercise training on skeletal myopathy of chronic heart failure[J]. J Card Fail, 23(1):36-46.
- UPADLHYA B, HAYKOWSK M J, EGGEBEEN J, et al., 2015. Exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: More than a heart problem[J]. J Geriatr Cardiol, 12(3):294-304.
- VESCOVO G, DALLA LIBERA L, 2006. Skeletal muscle apoptosis in experimental heart failure: The only link between inflammation and skeletal muscle wastage?[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 9(4):416-422.
- VON HAEHLING S, 2015. The wasting continuum in heart failure: From sarcopenia to cachexia[J]. Proc Nutr Soc, 74(4):367-377.
- WILLIUS F A, KEYS T E, 1961. Classics of Cardiology[M]. New York: H. Schuman.
- WOLFEL E E, 2016. Exploring the Mechanisms of Exercise Intolerance in patients with HFpEF: Are we too “cardiocentric?” [J]. JACC Heart Fail, 4(8):646-648.
- ZAFAR M I, ZHENG J, KONG W, et al., 2017. The role of vascular endothelial growth factor-B in metabolic homeostasis: Current evidence[J]. Biosci Rep, 37(4): BSR20171089.
- ZHANG G H, QIN R, ZHANG S H, et al., 2014. Effects of vascular endothelial growth factor B on proliferation and migration in EA. Hy926 cells[J]. Mol Biol Rep, 41(2):779-785.
- ZHAO T, ZHAO W, CHEN Y, et al., 2013. Differential expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptor subtypes in the infarcted heart[J]. Int J Cardiol, 167(6):2638-2645.

(收稿日期: 2019-04-10; 修订日期: 2021-04-21; 编辑: 尹航)