

·运动人体科学·

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

韩书娜¹, 孙一², 叶琼³

(1.四川外国语大学 体育部, 重庆 400033; 2.吉林大学 体育学院, 吉林 长春 130012;

3.重庆幼儿师范高等专科学校 体育教研室, 重庆 404000)

摘 要: 观察规律抗阻训练对老年男性循环内皮祖细胞功能的影响并探讨 miR-21-5p/血小板反应蛋白(TSP-1)在其间的可能作用机理。60 名健康、无规律运动习惯的老年男性随机分为对照组和运动组, 对照组维持日常生活习惯, 运动组进行 3 次/周、共 12 周的抗阻训练干预。分别于试验前后, 利用超声诊断系统测定肱动脉血流介导的血管舒张功能(FMD); 取外周血分离培养内皮祖细胞, 利用 β -半乳糖苷酶染色法检测衰老水平, MTT 比色法、Matrigel 管腔形成实验分别检测体外增殖和成管能力, 通过裸鼠颈动脉内膜拉脱模型检测在体内皮损伤修复能力, 实时荧光定量 PCR 检测 miR-21-5p 和 TSP-1 mRNA 表达量, 免疫印迹法测定 TSP-1 蛋白表达量; 通过脂质体转染分别过表达 miR-21-5p(miR-21-5p 模拟物)和抑制 TSP-1(TSP-1 siRNA)表达后, 检测内皮祖细胞衰老和功能。结果: (1)训练依从性和安全性: 运动组 1 例(3.3%)脱落, 训练计划完成率为 96.8%, 无严重不良反应事件或心血管相关事件发生。(2)血管内皮功能和内皮祖细胞功能: 试验后, 与对照组比较, 运动组 FMD 升高($P<0.05$), 内皮祖细胞 β -半乳糖苷酶阳性细胞下降($P<0.05$), 体外增殖和成管能力增加($P<0.05$), 体内损伤血管再内皮化功能提高($P<0.05$), miR-21-5p 表达上调($P<0.05$), TSP-1 mRNA 和蛋白表达下调($P<0.05$)。 (3)细胞转染试验: 转染 miR-21-5p 模拟物诱导 miR-21-5p 过表达后, 内皮祖细胞 TSP-1 mRNA 和蛋白表达下降($P<0.05$), 体外增殖、成管能力以及体内损伤血管再内皮化功能改善($P<0.05$), 然而, β -半乳糖苷酶阳性细胞无显著性变化($P>0.05$); 转染 TSP-1 siRNA 诱导 TSP-1 沉默后, β -半乳糖苷酶阳性细胞下降($P<0.05$), 体外增殖、成管能力以及体内损伤血管再内皮化功能提升($P<0.05$)。结论: 抗阻训练通过上调 miR-21-5p 抑制 TSP-1 表达来改善老年男性内皮祖细胞功能, 通过下调 TSP-1 延缓内皮祖细胞衰老, 因此 miR-21-5p 和 TSP-1 是抗阻训练发挥心血管保护效应的重要靶点。

关 键 词: 运动生物化学; 抗阻训练; 内皮祖细胞; 血管内皮功能; 老年男性

中图分类号: G804.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1006-7116(2025)01-0150-07

A study on resistance training improves age-related circulating endothelial progenitor cell functional impairment in old males by miR-21-5p/TSP-1 pathway

HAN Shuna¹, SUN Yi², YE Qiong³

(1.Department of Physical Education, Sichuan International Studies University, Chongqing 400033, China;

2.School of Physical Education, Jilin University, Changchun 130012, China;

3.Department of Physical Education, Chongqing Preschool Education College, Chongqing 404000, China)

Abstract: To observe the effect of regular resistance training on the function of circulating endothelial progenitor cells in elderly men and to explore the possible mechanism of miR-21-5p/thrombospondin 1 (TSP-1). 60 healthy old

收稿日期: 2024-07-09

基金项目: 吉林省科技发展规划项目(20230203105SF); 重庆市体育局体育科研项目(A202407, B202113)。

作者简介: 韩书娜(1980-), 女, 副教授, 硕士, 研究方向: 运动训练与全民健身。E-mail: 545835512@qq.com 通信作者: 孙一

males with no regular exercise habits were randomly divided into control group and exercise group. The control group maintained their daily habits, and the exercise group underwent resistance training intervention three times per week for a total of 12 weeks. Before and after the experiment, an ultrasonic diagnostic system was used to measure brachial artery flow mediated dilation (FMD). Peripheral blood was taken to isolate and culture endothelial progenitor cells, β -galactosidase staining to detect the aging level, MTT colorimetry and Matrigel tube formation assay to detect the proliferation and tube-forming ability in vitro respectively, the repair ability of endothelial damage in vivo through the nude mouse carotid artery intimal pull-off model, real-time fluorescence quantitative PCR to detect the expression of miR-21-5p and TSP-1 mRNA, and the expression of TSP-1 protein by Western blotting, were determined. After overexpressing miR-21-5p (miR-21-5p mimic) and inhibiting TSP-1 (TSP-1 siRNA) expression respectively by lipofectamine transfection, endothelial progenitor cell senescence and function were detected. The results show that: (1) Training compliance and safety: 1 case (3.3%) dropped out, the training plan completion rate was 96.8%, and no serious adverse events or cardiovascular-related events occurred in the exercise group. (2) Vascular endothelial function and endothelial progenitor cell function: After the experiment, compared with the control group, FMD increased ($P<0.05$), β -galactosidase-positive cells of endothelial progenitor cells decreased ($P<0.05$), the proliferation and tube formation abilities in vitro were increased ($P<0.05$), the reendothelialization function of injured blood in vivo was improved ($P<0.05$), the expression of miR-21-5p was up-regulated ($P<0.05$), and the expression of TSP-1 mRNA and protein was down-regulated ($P<0.05$) in the exercise group. (3) Cell transfection test: After transfection with miR-21-5p mimic to induce the overexpression of miR-21-5p, the expression of TSP-1 mRNA and protein in endothelial progenitor cells decreased ($P<0.05$), the proliferation and tube formation ability in vitro and reendothelialization function of injured blood in vivo were improved ($P<0.05$), however, there were no significant changes in β -galactosidase-positive cells ($P>0.05$). After transfection of TSP-1 siRNA to induce TSP-1 silencing, β -galactosidase-positive cells decreased ($P<0.05$), the proliferation and tube formation ability in vitro and reendothelialization function of injured blood in vivo increased ($P<0.05$). The conclusion reveal that: resistance training inhibits TSP-1 expression by up-regulating miR-21-5p, improves endothelial progenitor cell function, and delays endothelial progenitor cell aging by down-regulating TSP-1 in elderly men. Therefore, miR-21-5p and TSP-1 are important targets for the cardiovascular protective effects of resistance training

Keywords: sports biochemistry; resistance training; endothelial progenitor cells; vascular endothelial function; old males

增龄可导致血管内皮功能下降,从而诱导血管内膜层增生,最终引发多种心血管疾病^[1]。血管内皮细胞通过释放血管活性物质调节血管的舒缩活动,然而各种原因导致内皮细胞受损后,易发生动脉粥样硬化、血管狭窄、堵塞等病理性改变^[2]。由于损伤后内皮细胞增殖和修复能力有限,骨髓中的内皮祖细胞动员入血并诱导分化为内皮细胞以修复受损血管^[3]。Dight 等^[4]发现衰老导致循环内皮祖细胞基线数量减少以及功能降低,内皮祖细胞修复和更新受损血管的能力下降。

运动疗法是防治心血管疾病的重要策略^[5-6]。有氧运动对增龄所致心血管损伤的有益效应以及内皮祖细胞的作用机制已得到广泛证实^[7-13]。抗阻训练作为老年人运动处方的重要方式,具有增加肌肉含量、预防肌萎缩,提高骨密度和肌肉力量,预防跌倒与骨折^[14],同时通过释放多种肌肉因子(如鸢尾素、白细胞介素-6等)

调节远隔器官(包括心血管系统、骨骼系统)的功能^[15-16],因此同样具有心血管保护作用,然而其是否通过内皮祖细胞发挥健康效应仍未确定。据报道,衰老过程中肌肉含量下降(肌少症)导致肌肉因子(如鸢尾素、白细胞介素-6等)释放减少,从而间接影响内皮祖细胞功能,而外源性补充鸢尾素可增加骨髓内皮祖细胞数量^[17]。相较于有氧运动,抗阻训练能够促进肌肉因子大量分泌^[15],推测其理应对内皮祖细胞数量和功能产生有益作用。

微小核糖核酸(miRNA)是一类由内源基因编码的长度约 20~24 bp 的非编码单链 RNA,通过调控转录后的基因表达参与细胞分化、发育、组织生长等诸多生理过程^[18]。miR-21-5p 广泛存在于哺乳动物组织和器官中,对心血管功能起重要的调节作用。Mayourian 等^[19]发现,人骨髓间充质干细胞分泌的外泌体富含 miR-21-5p,能有效增强心肌收缩力。Souza 等^[20]研究

证实,运动上调心力衰竭小鼠内皮祖细胞 miR-21-5p 表达量,提示运动可能通过调节 miR-21-5p 表达改善内皮祖细胞功能。血小板反应蛋白(Thrombospondin 1, TSP-1)是内源性血管生成抑制因子,对细胞衰老具有促进作用^[21]。研究发现,增龄可诱导组织(尤其是心肌)中 TSP-1 表达上调,进而引起细胞功能减退并加速衰老进程^[22]。进一步研究证实, TSP-1 表达上调可能导致内皮祖细胞功能和血管生成能力下降^[23]。然而,衰老促进 TSP-1 表达与内皮祖细胞功能降低之间的关系尚未厘清。Hu 等^[24]发现,内皮祖细胞经由外泌体途径将 miR-21-5p 转运至内皮细胞, miR-21-5p 通过下调 TSP-1 表达改善内皮细胞功能。据此推测, miR-21-5p/TSP-1 信号通路可能参与运动对内皮祖细胞功能的调节。因此,本研究旨在观察规律抗阻训练对老年男性循环内皮祖细胞功能的影响并探讨 miR-21-5p/TSP-1 在其间的可能作用机理,为运动抗衰老效应提供理论基础、有效方法和干预靶点。

1 研究对象和方法

1.1 研究对象

1)样本量估算。

根据随机设计两个总体均数比较的样本量估算公式:

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times 2\sigma^2}{\delta^2}$$

其中 n 代表每组样本量, Z_{α} 为 α 水平相应的标准正态变量, Z_{β} 为 $1-\beta$ 水平相应的标准正态变量, σ 代表估计的标准差, δ 代表差值,即两组平均值的差值。本研究采用双侧检验, α 水平为 0.05, β 水平为 0.80, 依据 10% 样本流失率增加样本, 最终所需总样本量为 60 例。

2)研究对象

招募重庆市某社区 60~75 岁老年男性 60 名。纳入标准: (1)身心健康; (2)无规律运动习惯; (3)自愿参加本次研究, 并且能坚持配合运动者。排除标准: (1)患有心脑血管、代谢和肾脏等疾病; (2)运动风险筛查为中、高危者; (3)骨骼肌肉系统急性慢性损伤及运动障碍者; (4)认知障碍; (5)长期服药史以及吸烟酗酒等不良习惯者。所有人员均签署知情同意书, 本研究获得吉林大学伦理委员会批准(NO.2023030701)。按照随机数字表法将受试者分为对照组和运动组, 两组受试者入组前在年龄、身高、体重、体质量指数、安静心率、血压、心血管疾病家族史等参数间比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$), 组间具有可比性。

1.2 实验方法

对照组维持日常生活习惯, 运动组进行 12 周渐进

性抗阻训练。分别于试验前后, 利用超声诊断系统测定肱动脉血流介导的血管舒张功能(flow mediated dilation, FMD); 取外周血分离培养内皮祖细胞, 利用 β -半乳糖苷酶染色法检测衰老水平, MTT 比色法、Matrigel 管腔形成实验分别检测体外增殖和成管能力, 通过裸鼠颈动脉内膜拉脱模型检测在体内皮损伤修复能力, 实时荧光定量 PCR 检测 miR-21-5p 和 TSP-1 mRNA 表达量, 免疫印迹法测定 TSP-1 蛋白表达量; 通过脂质体转染分别过表达 miR-21-5p(miR-21-5p 模拟物)和抑制 TSP-1(TSP-1 siRNA)表达后, 检测内皮祖细胞衰老和功能。

(1)血管内皮功能测定。利用彩色超声诊断系统(LOGIQ7 型, 美国 GE 公司)测定肱动脉 FMD 反映血管内皮功能。受试者取仰卧位, 以右侧肘横纹上 5 cm 肱动脉段为靶血管。先测量静息时的肱动脉舒张末期内径 D_0 , 随后通过血压计袖带加压至 200 mmHg 完全阻断血流 5 min 后迅速放气, 测定肱动脉舒张末期内径 D_1 。用反应性充血前后肱动脉内径的变化率计算 FMD(%) = $(D_1 - D_0) \div D_0 \times 100\%$ 。

(2)外周血内皮祖细胞培养和鉴定。内皮祖细胞培养: 分别于试验前后清晨空腹状态下肘正中静脉取血 20 mL, 肝素抗凝。Ficoll 密度梯度离心法获取外周血单个核细胞。用 M199 培养基置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中孵育, 利用倒置显微镜(DM IL LED, 德国徕卡公司)观察细胞形态。内皮祖细胞鉴定: 利用吞噬实验鉴定内皮祖细胞。将单细胞悬液与 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, ac-LDL)(Dil-ac-LDL)(20 μ g/mL)溶液于 37℃孵育 120 min, 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤后与 FITC 标记的荆豆凝集素 1(ulex europaeus agglutinin-1, UEA-1)(FITC-UEA-1)(10 μ g/mL)溶液中于 37℃孵育 60 min, 甘油密封。激光共聚焦显微镜(TCS SP8 X, 德国徕卡公司)下随机选取 5 个视野, 计数双染细胞数(即内皮祖细胞)占总细胞数的百分比。

(3)细胞转染试验。按照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒(美国 invitrogen 公司)说明书, 将 miR-21-5p 模拟物(用于过表达 miR-21-5p)(引物设计: 上游 5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3', 下游 5'-UCA ACA UCA GUC UGA UAA GCU A-3')、模拟物阴性对照(引物设计: 上游 5'-UUU GUA CUA CAC AAA AGU ACU G-3', 下游 5'-CAG UAC UUU UGU GUA GUA CAA A-3')以及 TSP-1 siRNA(用于沉默 TSP-1 mRNA)(引物设计: 上游 5'-GCC AGU AUG UUU ACA ACG UdTdT-3', 下游 5'-ACG UUG UAA ACA UAC UGG CdTdT-3')和 siRNA 对照(引物设计: 上游

5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3', 下游 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3')装载脂质体后转染至运动组分离培养的内皮祖细胞中孵育 72 h。设置非转染空白对照。

(4)内皮祖细胞衰老水平检测。利用 β -半乳糖苷酶染色法检测内皮祖细胞衰老水平。取单细胞悬液,加入 0.5 mL β -半乳糖苷酶染色固定液于室温下固定 15 min。光学显微镜拍照, Image J 软件测定 β -半乳糖苷酶阳性细胞占细胞总数的比例。

(5)内皮祖细胞体外功能检测。增殖能力:采用噻唑蓝(MTT)比色法检测内皮祖细胞体外增殖能力。取单细胞悬液接种于包被有人纤维连接蛋白的 96 孔培养板中,每孔加入 MTT(5 mg/mL)50 μ L,向每孔加入二甲亚砜 200 μ L,充分振荡后利用全自动酶标仪(Multiskan FC, 美国 Thermo 公司)于波长 490 nm 处测定吸光度(optical density, OD)值。成管能力:采用 Matrigel 管腔形成实验检测内皮祖细胞体外成管能力。将 Matrigel 胶预铺在预冷的 96 孔板中,取 100 μ L 细胞悬液均匀接种到孔板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h。倒置显微镜(DM IL LED, 德国徕卡公司)下随机选取 5 个视野,拍照后采用 Image J 图像分析软件计算血管总长度。

(6)内皮祖细胞在体(体内)内皮损伤修复能力测定。取 10 只 8~10 周龄裸鼠,腹腔麻醉后肝素抗凝,颈部正中切口游离、暴露右侧颈动脉后,血管夹夹住颈总动脉近心端和颈内动脉起始端。在近端颈外动脉上剪开小口,插入直径 0.4 mm 的金属导丝至颈总动脉,旋转进出 3 次后退出并逐层缝合颈部切口。取内皮祖细胞悬液,将细胞浓度调整至 $5 \times 10^5/100 \mu$ L,颈动脉内膜损伤模型建立后 3 h,通过尾静脉注射 100 μ L。移植 3 天后裸鼠腹腔麻醉,经尾静脉注射 5%伊文思蓝溶液 100 μ L 进行血管染色,分离右颈总动脉,显微镜(DM IL LED, 德国徕卡公司)下观察伊文思蓝染色情况并拍照,利用 Image J 图像分析软件对染色区域行定量分析。

(7)内皮祖细胞 miR-21-5p 和 TSP-1 mRNA 基因表达检测。RT-qPCR 法检测内皮祖细胞 miR-21-5p 和 TSP-1 mRNA 基因表达量。TRIzol 法提取总 RNA,逆转录反应获取 cDNA。以 cDNA 为模板,利用 RT-qPCR(7 500 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司)扩增目的基因,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 92 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 完全延伸 5 min。引物序列设计如下:miR-21-5p(上游:5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3', 下游:5'-UCA ACA UCA GUC UGA UAA GCU A-3'); TSP-1(上游:5'-GCC AGA

TGAC AAG TTC CAA G-3', 下游:5'-CTG ACA CCA CTT GCT GCT TC-3'); U6(上游:5'-CAG CAC ATA TAC TAA AAT TGG AAC-3', 下游:5'-ACG AAT TTG CGT GTC ATC C-3'); GAPDH(上游:5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3', 下游:5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3')。记录各样本循环阈值(cycle threshold, CT),以 U6 和 GAPDH 分别作为 miR-21-5p 和 TSP-1 的内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。

(8)内皮祖细胞 TSP-1 蛋白表达量测定。

采用免疫印迹法测定内皮祖细胞 TSP-1 蛋白表达量。收集细胞,提取总蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白含量。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行蛋白分离,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂牛奶 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。TSP-1 一抗(稀释比 1:500, 英国 Abcam 公司,货号:ab267388)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记二抗(稀释比 1:5 000, 武汉博士德生物工程有限公司,货号:BA1058)室温孵育 1 h。洗膜后电化学发光试剂显影,凝胶成像仪采集图像, Image Pro Plus 6.0 图像软件分析蛋白条带光密度值,以 β -actin(稀释比 1:5000, 英国 Abcam 公司,货号:ab8226)为内参蛋白,计算目的蛋白的相对表达量。

1.3 训练方案

运动组受试者进行每周 3 次,共 12 周的抗阻训练。采用自由重量(哑铃)、固定器械和自重训练 3 类练习,共 10 个动作。自由重量类动作包括仰卧飞鸟(胸大肌)、俯身双臂划船(背阔肌)、侧平举(三角肌)、前臂弯举(肱二头肌)、颈后臂屈伸(肱三头肌)和提踵(小腿三头肌);固定器械类包括坐姿腿屈伸(股四头肌)、俯卧小腿弯举(腓肠肌);自重训练类包括平板支撑和卷腹(腹肌)。运动强度采用对老年人群安全有效的 10~15 RM(最大重复次数),结合主观疲劳感觉(RPE)评分(11~15)监控和调整训练负荷。每个动作重复 10~15 次为 1 组,组间间歇 1~2 min,共完成 2~3 组。若受试者某一动作能完成 15 次以上,则增加此动作 2.5%~5.0%的负重量。记录受试者脱落以及运动计划完成情况,用实际完成的运动次数占训练计划总次数的百分比表示患者的依从性。记录运动期间以及运动后 48 h 内发生的不良事件。

1.4 数据处理

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计分析。计数资料(心血管疾病家族史)用“%”表示,组间比较使用卡方检验。计量资料用“均数 \pm 标准差”表示,组内干预前后比较使用配对 t 检验,组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析,内皮祖细胞增殖功能比较采用双因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 训练依从性和安全性评估

12 周干预过程中, 对照组 3 例(16.7%, 原因: 日程冲突、个人事务或无故失联)、运动组 1 例(3.3%, 原因: 个人事务)脱落, 最终 56 名受试者纳入研究。运动组训练计划完成率(训练依从性)为 96.8%。运动组受试者仅在运动中和运动后出现气喘、延迟性肌肉酸痛等症状, 所有不良症状均较轻微, 可继续进行运动或在经休息后缓解, 无严重不良反应事件或心血管相关事件发生。

2.2 两组试验前后血管内皮功能比较

试验前, 两组 FMD 比较差异无统计学意义(对照组(6.7 ± 1.1)%, 运动组(7.4 ± 1.5)%, $P>0.05$)。试验后, 与试验前比较, 运动组 FMD 升高, 差异有显著性意义(试验前(7.4 ± 1.5)%, 试验后(10.5 ± 2.8)%, $P<0.05$), 对照组无统计学意义(试验前(6.7 ± 1.1)%, 试验后(7.0 ± 1.6)%, $P>0.05$); 组间比较, 运动组 FMD 高于对照组, 差异有显著性意义(对照组(7.0 ± 1.6)%, 运动组(10.5 ± 2.8)%, $P<0.05$)。

2.3 内皮祖细胞鉴定

倒置显微镜观察显示, 培养 3 天时贴壁的单核细胞并呈现纺锤形, 7 天时纺锤形细胞形成细胞集落。培养 7 天时利用激光共聚焦显微镜观察发现, Dil-ac-LDL 阳性细胞呈红色, FITC-UEA-1 阳性细胞呈现绿色, 双阳性细胞呈黄色(即内皮祖细胞, 约占 91.7%)。

2.4 抗阻训练对内皮祖细胞衰老水平、体外体内功能及 miR-21-5p/TSP-1 基因表达的影响

1) 两组试验前后内皮祖细胞衰老水平比较。

试验前, 两组内皮祖细胞 β -半乳糖苷酶阳性率比较, 差异无统计学意义(对照组(45.1 ± 6.8)%, 运动组(43.9 ± 6.1)%, $P>0.05$)。试验后, 与试验前比较, 运动组 β -半乳糖苷酶阳性细胞下降, 差异有显著性意义(试验前(43.9 ± 6.1)%, 试验后(27.4 ± 5.3)%, $P<0.05$), 对照组差异无统计学意义(试验前(45.1 ± 6.8)%, 试验后(49.2 ± 7.3)%, $P>0.05$); 组间比较, 运动组 β -半乳糖苷酶阳性细胞低于对照组, 差异有显著性意义(对照组(49.2 ± 7.3)%, 运动组(27.4 ± 5.3)%, $P<0.05$)。

2) 两组试验前后内皮祖细胞体外功能比较。

试验前, 两组内皮祖细胞体外增殖(对照组(0.87 ± 0.04), 运动组(0.83 ± 0.09), $P>0.05$)和成管(对照组(215.2 ± 38.6) mm, 运动组(201.7 ± 40.9) mm, $P>0.05$)能力比较, 差异无统计学意义。试验后, 与试验前比较, 运动组增殖(试验前(0.83 ± 0.09), 试验后(1.25 ± 0.06) $P<0.05$)和成管(试验前(201.7 ± 40.9) mm, 试验后

(311.2 ± 51.3) mm, $P<0.05$)能力升高, 差异有显著性意义, 对照组差异无统计学意义($P>0.05$); 组间比较, 运动组增殖(对照组(0.92 ± 0.07), 运动组(1.25 ± 0.06), $P<0.05$)和成管(对照组(237.9 ± 43.5) mm, 运动组(311.2 ± 51.3) mm, $P<0.05$)能力高于对照组, 差异有显著性意义。

3) 两组试验前后内皮祖细胞体内功能比较。

试验前, 两组内皮祖细胞在体内内皮损伤修复能力比较, 差异无统计学意义(对照组(16.2 ± 4.3)%, 运动组(19.1 ± 5.0)%, $P>0.05$)。试验后, 与试验前比较, 运动组再内皮化面积升高, 差异有显著性意义(试验前(19.1 ± 5.0)%, 试验后(68.5 ± 8.8)%, $P<0.05$), 对照组差异无统计学意义(试验前(16.2 ± 4.3)%, 试验后(18.5 ± 4.7)%, $P>0.05$); 组间比较, 运动组再内皮化面积高于对照组, 差异有显著性意义(对照组(18.5 ± 4.7)%, 运动组(68.5 ± 8.8)%, $P<0.05$)。

4) 两组试验前后内皮祖细胞 miR-21-5p/TSP-1 基因表达比较。

试验前, 两组内皮祖细胞 miR-21-5p/TSP-1 基因表达比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。试验后, 与试验前比较, 运动组 miR-21-5p 表达升高 70.7%, 差异有显著性意义($P<0.05$), TSP-1 mRNA、蛋白表达分别下降 42.5%和 53.1%, 差异有显著性意义($P<0.05$), 对照组差异无统计学意义($P>0.05$); 组间比较, 运动组 miR-21-5p 表达较对照组升高 108.4%, 差异有显著性意义($P<0.05$), TSP-1 mRNA、蛋白表达分别较对照组下降 40.4%和 52.1%, 差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.5 转染 miR-21-5p 模拟物对内皮祖细胞衰老水平、体外体内功能的影响

1) 内皮祖细胞 miR-21-5p 和 TSP-1 表达的变化。

与空白对照比较, 转染模拟物阴性对照后 miR-21-5p 和 TSP-1 表达, 差异无统计学意义($P>0.05$), 转染 miR-21-5p 模拟物后 miR-21-5p 表达升高 480.7%, 差异有显著性意义($P<0.05$), TSP-1 mRNA、蛋白表达分别下降 82.8%和 64.2%, 差异有显著性意义($P<0.05$)。

2) 内皮祖细胞衰老水平的变化。

与空白对照(12.3 ± 3.5)%比较, 转染模拟物阴性对照(15.2 ± 4.1)%以及 miR-21-5p 模拟物(13.3 ± 3.8)%后内皮祖细胞 β -半乳糖苷酶阳性率差异无显著性意义($P>0.05$)。

3) 内皮祖细胞体外功能的变化。

与空白对照比较, 转染模拟物阴性对照后内皮祖细胞体外增殖和成管能力差异无统计学意义($P>0.05$), 转染 miR-21-5p 模拟物后增殖(1.88 ± 0.12) vs. ($1.35 \pm$

0.11), $P<0.05$)和成管(287.3 ± 45.9 mm vs. 178.2 ± 29.8 mm, $P<0.05$)能力升高, 差异有显著性意义。

4)内皮祖细胞体内功能的变化。

与空白对照比较, 转染模拟物阴性对照后内皮祖细胞在体内皮损伤修复能力差异无统计学意义(43.1 ± 7.0 % vs. 39.2 ± 5.8 %, $P>0.05$), 转染 miR-21-5p 模拟物后再内皮化面积升高, 差异有显著性意义(82.5 ± 9.3 % vs. 39.2 ± 5.8 %, $P<0.05$)。

2.6 转染 TSP-1 siRNA 对内皮祖细胞衰老水平、体外体内功能的影响

1)内皮祖细胞 miR-21-5p 和 TSP-1 表达的变化。

与空白对照比较, 转染 siRNA 阴性对照后 miR-21-5p 和 TSP-1 表达差异无统计学意义($P>0.05$), 转染 TSP-1 siRNA 后 miR-21-5p 差异无统计学意义($P>0.05$), TSP-1 mRNA、蛋白表达分别下降 90.7%和 73.5%, 差异有显著性意义($P<0.05$)。

2)内皮祖细胞衰老水平的变化。

与空白对照比较, 转染 siRNA 阴性对照后内皮祖细胞 β -半乳糖苷酶阳性率差异无统计学意义(15.2 ± 3.5 % vs. 17.1 ± 4.0 %, $P>0.05$), 转染 TSP-1 siRNA 后 β -半乳糖苷酶阳性细胞降低, 差异有显著性意义(5.2 ± 1.1 % vs. 17.1 ± 4.0 %, $P<0.05$)。

3)内皮祖细胞体外功能的变化。

与空白对照比较, 转染模拟 siRNA 阴性对照后内皮祖细胞体外增殖和成管能力差异无统计学意义($P>0.05$), 转染 TSP-1 siRNA 后增殖(1.59 ± 0.11) vs. (1.05 ± 0.09) , $P<0.05$)和成管(262.8 ± 45.3 mm vs. 152.5 ± 22.6 mm, $P<0.05$)能力升高, 差异有显著性意义。

4)内皮祖细胞体内功能的变化。

与空白对照比较, 转染 siRNA 阴性对照后内皮祖细胞在体内皮损伤修复能力差异无统计学意义(41.2 ± 6.2 % vs. 35.6 ± 5.3 %, $P>0.05$), 转染 TSP-1 siRNA 后再内皮化面积升高, 差异有显著性意义(74.9 ± 8.7 % vs. 35.6 ± 5.3 %, $P<0.05$)。

3 讨论

研究旨在探讨抗阻训练对老年男性循环内皮祖细胞功能的影响及其机制, 结果发现, 运动组受试者试验后血管内皮功能改善, 内皮祖细胞衰老水平下降, 体内体外功能升高, miR-21-5p 表达上调而 TSP-1 表达下调; 细胞转染试验证实, 过表达 miR-21-5p 或沉默 TSP-1 均可提高内皮祖细胞体内体外功能, 然而仅沉默 TSP-1 能够抑制其衰老进程。结果提示, 规律抗阻训练通过调控 miR-21-5p/TSP-1 通路改善老年男性内皮祖细胞功能, 通过下调 TSP-1 延缓内皮祖细胞

衰老。

衰老内皮祖细胞增殖、迁移和定向分化为内皮细胞以修复血管的能力均显著降低^[3-4]。据此推测, 延缓内皮祖细胞衰老, 将有助于维持外周血内皮祖细胞数量以及血管修复功能。多项研究证实, 长期有氧运动可有效延缓内皮祖细胞衰老进程并改善其体外体内功能, 进而纠正血管内皮紊乱^[7-13]。本研究采用抗阻训练方案同样证实这一结论, 说明不同运动方式对内皮祖细胞和内皮功能均具有有益效应。据报道, 运动还提高内皮祖细胞向受损血管部位的归巢能力, 进而分化为内皮细胞并执行修复功能^[5]。结合本研究结果推测, 延缓内皮祖细胞衰老并改善其功能有助于细胞快速定位至血管受损部位, 实现血管的快速增殖和修复, 这对预防衰老所致的血管内皮功能减退、降低心血管疾病发生率具有积极作用。

miR-21-5p/TSP-1 与血管形成和修复有关^[19]。有氧运动能够上调 miR-21-5p 并下调 TSP-1 表达^[20], 这在本研究中同样得到印证, 然而 miR-21-5p/TSP-1 与内皮祖细胞之间的确切关联仍未明确。本研究通过细胞转染实验证实, miR-21-5p 通过调控 TSP-1 改善内皮祖细胞体内体外功能, 这对于内皮祖细胞修复受损血管并纠正内皮障碍、进而预防老年人心血管疾病发生具有重要意义。上述结果提示, 抗阻训练通过调控 miR-21-5p/TSP-1 信号途径改善内皮祖细胞功能。除调节细胞功能外, TSP-1 还参与细胞衰老进程^[23]。本研究在体实验与细胞转染实验证实, 抗阻训练通过下调 TSP-1 表达延缓细胞衰老。然而令人意外的是, 过表达 miR-21-5p 并未改变内皮祖细胞衰老速率, 这可能是因为 miR-21-5p 模拟物对 TSP-1 表达的抑制程度不足以显著影响细胞衰老, 提示抗阻训练延缓内皮祖细胞衰老可能是通过直接抑制 TSP-1 表达介导的。

本研究尚存在些许不足。第一, 本研究样本量较小, 同时仅纳入男性受试者, 因此在应用研究结论时应持谨慎态度。第二, 本研究重点关注抗阻训练的效果, 其他运动方式的疗效不得而知, 今后的研究应扩大样本量并从临床研究、动物实验和细胞实验等多个层面进一步探索不同运动方式(有氧运动、高强度间歇训练、静力性运动等)以及内皮祖细胞移植对多种心血管疾病以及心血管危险因素的作用及机制, 以形成针对特定人群或患者的最佳康复治疗策略。

参考文献:

- [1] JIA G, AROOR AR, JIA C, et al. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 65(7):

1802-1809.

- [2] BLOOM S I, ISLAM M T, LESNIEWSKI L A, et al. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(1): 38-51.
- [3] YANG J X, PAN Y Y, WANG X X, et al. Endothelial progenitor cells in age-related vascular remodeling[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(5): 786-795.
- [4] DIGHT J, ZHAO J, STYKE C, et al. Resident vascular endothelial progenitor definition and function: The age of reckoning[J]. *Angiogenesis*, 2022, 25(1): 15-33.
- [5] FERENTINOS P, TSAKIRIDES C, SWAINSON M, et al. The impact of different forms of exercise on circulating endothelial progenitor cells in cardiovascular and metabolic disease[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2022, 122(4): 815-860.
- [6] KOUREK C, KARATZANOS E, PSARRA K, et al. Endothelial progenitor cells mobilization after maximal exercise according to heart failure severity[J]. *World J Cardiol*, 2020, 12(11): 526-539.
- [7] SILVA C. Endothelial progenitor cells and exercise: Working together to target endothelial dysfunction in metabolic syndrome[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2021, 117(1): 118-119.
- [8] LANDERS-RAMOS R Q, SAPP R M, SHILL D D, et al. Exercise and cardiovascular progenitor cells[J]. *Compr Physiol*, 2019, 9(2): 767-797.
- [9] MOEBIUS-WINKLER S, SCHULER G, ADAMS V. Endothelial progenitor cells and exercise-induced redox regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(4): 997-1011.
- [10] TAN Q, LI Y, GUO Y. Exercise training improves functions of endothelial progenitor cells in patients with metabolic syndrome[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2021, 117(1): 108-117.
- [11] CUSTODIS F, LAUFS U. Physical exercise and endothelial progenitor cells[J]. *J Cardiopulm Rehabil Prev*, 2007, 27(2): 74-75.
- [12] KOUREK C, KARATZANOS E, PSARRA K, et al. Endothelial progenitor cells mobilization after maximal exercise in patients with chronic heart failure[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2021, 62(1): 70-72.
- [13] RIBEIRO F, RIBEIRO I P, ALVES A J, et al. Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in cardiovascular disease: A systematic review[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2013, 92(11): 1020-1030.
- [14] FRAGALA M S, CADORE E L, DORGIO S, et al. Resistance training for older adults: Position statement from the National Strength and Conditioning Association[J]. *J Strength Cond Res*, 2019, 33(8): 2019-2052.
- [15] KIM H J, LEE H J, SO B, et al. Effect of aerobic training and resistance training on circulating irisin level and their association with change of body composition in overweight/obese adults: A pilot study[J]. *Physiol Res*, 2016, 65(2): 271-279.
- [16] 王光平, 张开发. 抗阻训练对老年人肌肉力量影响的元分析[J]. *体育学刊*, 2011, 18(5): 132-138.
- [17] ZHU G, WANG J, SONG M, et al. Irisin Increased the number and improved the function of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus mice[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2016, 68(1): 67-73.
- [18] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: From cells to clinic[J]. *Trends Genet*, 2022, 38(6): 613-626.
- [19] MAYOURIAN J, CEHOLSKI D K, GORSKI P A, et al. Exosomal microRNA-21-5p mediates mesenchymal stem cell paracrine effects on human cardiac tissue contractility[J]. *Circ Res*, 2018, 122(7): 933-944.
- [20] SOUZA R W, FERNANDEZ G J, CUNHA J P, et al. Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309(10): H1629-1641.
- [21] ISENBERG J S, ROBERTS D D. Thrombospondin-1 in maladaptive aging responses: A concept whose time has come[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1): C45-C63.
- [22] KELM N Q, BEARE J E, WEBER G J, et al. Thrombospondin-1 mediates Drp-1 signaling following ischemia reperfusion in the aging heart[J]. *FASEB Bioadv*, 2020, 2(5): 304-314.
- [23] WU J, HE Z, GAO X, et al. Oxidized high-density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells' function by activation of CD36-MAPK-TSP-1 pathways[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(4): 308-324.
- [24] HU H, WANG B, JIANG C, et al. Endothelial progenitor cell-derived exosomes facilitate vascular endothelial cell repair through shuttling miR-21-5p to modulate Thrombospondin-1 expression[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(14): 1629-1644.