



心梗大鼠通过有氧运动激活PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a通路抑制心肌细胞凋亡改善心功能*

刘 纽^{1,2)} 田振军^{1,2)**}⁽¹⁾ 渭南师范学院体育学院, 渭南 714099; ⁽²⁾ 陕西师范大学体育学院暨运动生物学研究所, 西安 710119

摘要 为探讨有氧运动对心梗大鼠心功能的影响, 将3月龄SD雄性大鼠适应性喂养1周后随机分为正常组(C组)、假手术组(S组)、心梗安静组(MI组)、正常+运动组(CE组)、心梗+运动组(ME组), 每组8只. MI组结扎左冠状动脉前降支制备心梗模型; S组只穿线不结扎; CE组与ME组术后1周开始有氧训练, 运动方式为依次以10 m/min×10 min, 13 m/min×10 min, 16 m/min×40 min进行跑台训练, 60 min/d, 每周5 d, 连续4周. 训练结束后次日, 采用血流动力学检测左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)和收缩/舒张速率($\pm dp/dt_{max}$)等心功能相关指标, 单细胞可视化边缘探测系统(IonOptix)测定 $[Ca^{2+}]_i$ 变化百分数($[Ca^{2+}]_i$ amplitude)、 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光比率(ratio)、达峰速率(departure velocity)、达峰时程(time to peak, TTP)、达峰50%时程(time to peak 50%, TTP50%)、达基线50%时程(time to baseline 50%, TTB50%)、达基线速率(return velocity)以及ratio改变幅度(ratio amplitude)等钙瞬变指标和肌节最大收缩及舒张速率($\pm dl/dt_{max}$)、肌节长度(sarcomere length, SL)、肌节收缩幅度(peak twitch amplitude, PTA)、肌节缩短分数(SL shortening%)等心肌细胞收缩指标, 蛋白质印迹(Western blotting)方法检测PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路及细胞凋亡相关蛋白. 与S组相比, MI组PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路被显著抑制, 心肌细胞凋亡显著增加, LVEDP显著升高, LVSP和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著降低, $[Ca^{2+}]_i$ amplitude、ratio amplitude、departure velocity和return velocity均显著下降, TTB50%、TTP和TTP50%均显著增加, 心肌细胞SL shortening%、PTA、 $\pm dl/dt_{max}$ 均显著减少; 与MI组相比, ME组PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路显著被激活, 细胞凋亡显著被抑制, LVEDP显著降低, LVSP和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著升高, ratio amplitude、 $[Ca^{2+}]_i$ amplitude、ratio velocity和departure velocity均显著提高, TTB50%、TTP和TTP50%均显著缩短, 心肌细胞SL Shortening%、PTA、 $\pm dl/dt_{max}$ 均显著提高. 上述结果表明, 有氧运动改善MI大鼠梗死周边区心肌细胞的钙瞬变和收缩功能异常, 并激活PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号, 抑制心肌细胞凋亡, 改善心梗心功能, 且心梗心功能的改善与PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路激活和心肌细胞凋亡抑制关系密切.

关键词 信号通路, 心肌梗死, 有氧运动, 大鼠**中图分类号** G804.2**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0386

心肌梗死(myocardial infarction, MI)后, 心肌缺血缺氧, 葡萄糖的无氧酵解和ATP的降解导致细胞酸中毒, 大量 H^+ 激活的胞内 Na^+/H^+ 交换体(Na^+/H^+ exchanger, NHE)又导致 Na^+ 大量涌入细胞, 进一步激活细胞中 Na^+/Ca^{2+} 交换体(Na^+/Ca^{2+} exchanger, NCX)的逆向交换作用, 致使细胞中的 Na^+ 外流、 Ca^{2+} 内流, 最终导致心肌细胞内 Ca^{2+} 超载(Ca^{2+} overload)^[1-2]. 文献报道, Ca^{2+} 超载

是损害心肌的一个关键诱因, 胞内异常 Ca^{2+} 在心功能不全和室性心律失常中起关键作用, 尤其在心肌缺血后, 心肌细胞内大量增加的 Ca^{2+} 可诱导心肌细

* 陕西省科技厅科研计划项目(2021JQ-827)、陕西省教育厅科研计划项目(20JK0633)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 029-85310156, E-mail: tianzhj@snnu.edu.cn

收稿日期: 2020-12-05, 接受日期: 2020-12-25

胞凋亡^[3-6]. 细胞凋亡又常伴有 Ca^{2+} 超载的现象, 胞质内 Ca^{2+} 超载后, Ca^{2+} 通过呼吸链刺激氧自由基的产生, 且 Ca^{2+} - Ca^{2+} 携带者结合到线粒体膜上, 导致其结构发生变化, 有利于氧自由基攻击线粒体膜蛋白, 且 Ca^{2+} - Ca^{2+} 携带可破坏线粒体膜的磷脂酶A2, 继而开放线粒体通透性转换孔(PTP), PTP的开放可诱导凋亡因素的激活, 最终诱导凋亡.

研究表明, 持续训练可恢复心梗大鼠心肌细胞收缩功能、胞内 Ca^{2+} 触发及 Ca^{2+} 敏感性^[7-8], 改善心梗大鼠心功能^[9-15]. 研究表明, 激活的蛋白激酶G-1 (protein kinase G-1, PKG-1)可引起肌浆网上受磷蛋白(phospholamban, PLN)的磷酸化, 有利于维持心肌细胞的 Ca^{2+} 稳态, 减少发生心衰的可能性, 增强心肌收缩力, 维持正常泵血功能^[16]. 文献报道, 运动后PLN磷酸化解除对肌浆网钙泵(sarcoplasmic reticulum calcium atpase, SERCA2a)的抑制, SERCA2a表达升高, SERCA2a/p-PLN比值增大, 从而促进肌浆网对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的重吸收, 继而增加肌浆网中 Ca^{2+} 浓度, 钙瞬变恢复速率明显加快^[17], 这为雷诺丁受体2(ryanodine receptors, RyR2)释放 Ca^{2+} 奠定基础, 所以运动对SERCA2a活性的调节是增强钙瞬变的关键. 文献报道, 运动通过激活PI3K/Akt通路在细胞凋亡的启动方面发挥着关键作用, 可抑制氧化应激引起的细胞凋亡^[18], 运动通过降低线粒体中 Ca^{2+} 的浓度来减轻线粒体结构和功能的紊乱, caspase-3裂解及Bax/Bcl-2比值均降低, 表明运动可改善心梗后心肌抗氧化水平和细胞凋亡现象. 但有氧运动是否能够激活PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a通路, 改善梗死周边区心肌活细胞钙调控和收缩力, 抑制心肌细胞凋亡, 提高心梗心功能, 目前尚无文献报道. 因此, 本研究对MI大鼠进行4周有氧运动干预研究, 为缺血心脏病的早期运动康复手段与方法筛选及其机制研究提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与心肌梗死模型制备

动物分组: 将45只3月龄SD雄性大鼠(体重180~220 g)随机分为5组: 正常组(C组)、假手术组(S组)、心梗安静组(MI组)、正常+运动组(CE组)、心梗+运动组(ME组), 心梗手术后成活40只, 每组8只. 实验饲养期间大鼠饲料均符合

国家标准饲料条件并予纯净水喂养, 饲养期间各组大鼠均自由饮食.

大鼠心梗模型制备: 采用结扎心脏左冠脉前降支(LAD)的方法制备大鼠心梗模型. 术前禁食, 次日, 5%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉, 手术全过程连接心电图监测. 在大鼠左侧第4肋骨位置开胸0.5 cm大小, 分离皮下筋膜及胸部肌肉, 剪断一根肋骨, 开胸暴露心脏, 打开心包膜, 在肺动脉圆锥和左心耳交点下2 mm处入针, 深度为0.3~0.5 mm, 并用5-0丝线结扎左冠脉前降支, 观察左心室前壁及心尖处的颜色变化, 颜色变白或变浅, 心电图显示ST段抬高或T波倒置时, 视为心梗模型制备成功. 稳定5 min无出血且心电图稳定后, 留管、排气、关胸、缝合. S组只穿线不结扎, 50 min后再次记录心电图.

1.2 大鼠运动训练方案

CE组与ME组分别在术后1周开始有氧训练, 运动方式为依次以10 m/min×10 min, 13 m/min×10 min, 16 m/min×40 min进行跑台训练, 60 min/d, 尽可能选取每天同一时间段训练, 每周5 d, 连续运动4周.

1.3 大鼠血流动力学实验

术前禁食12 h后, 次日采用5%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉, 遵循本实验室常规方法, 从右侧颈总动脉逆行插管至左心室后, 采用PowerLab多导生理记录仪(MacLab/8s)检测并记录左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)和收缩/舒张速率($\pm dp/dt_{max}$), 用于评价心功能.

1.4 蛋白质印迹(Western blot)实验

孵育: 抗体稀释比例分别为SERCA2a(1:3 000)、PI3K(1:2 000)、p-PI3K(1:3 000)、p-PLN(1:1 000)、PKG-1(1:1 000)、Akt(1:2 000)、p-Akt(1:2 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、GAPDH(1:5 000).

发光: ECL显迹, 多色凝胶成像系统分析目的条带.

1.5 心肌细胞急性分离、心肌细胞钙瞬变及收缩功能测定

配置心肌细胞急性分离溶液, 配方见表1.

为保证心肌细胞成活率, 所有配制的溶液均需

Table 1 Preparation of acute isolation solution of adult rat cardiomyocytes

Solution	Reagents
Sugar-free Ca^{2+} -free Tyrodes solution (NT(=))	7.947 8 g NaCl+0.402 6 g KCl+0.095 2 g MgCl_2 +2.383 0 g HEPES+0.051 5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ +1 000 ml Deionized water, pH =7.35
Ca^{2+} -free Tyrodes solution (NT(-))	200 ml NT(=)+0.360 3 g Glucose+0.202 2 g BDM
Enzymolysis solution (E)	30 ml NT(-)+30 mg CollagenaseII (275 U/mg) + 3 mg Protease + 30 mg BSA
Elution buffer (DE)	30 ml NT(=) + 30 mg BSA
Test buffer on the machine (T)	300 ml NT(=) + 0.540 0 g D- Glucose + 0.060 0 g CaCl_2 (1 mol/L, 0.54 ml)
1 mol/L CaCl_2 solution	1.100 0 g CaCl_2 +10 ml H_2O_2
0.2 mol/L CaCl_2 solution	0.2 ml 1 mol/L CaCl_2 +0.8 ml H_2O_2

BDM: N,N'-4,4'-diphenylmethylen-bismaleimide, BSA: bovine serum albumin.

充氧至少 20 min. 大鼠心肌细胞分离实验方法如下:

a. SD 大鼠用 5% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔麻醉后, 舌下静脉注射肝素钠 (1 000 U/kg). 10 min 后, 迅速开胸摘取完整心脏, 立即放入 50 ml 氧饱和的 4°C 预冷 NT(-) 溶液. 起初, 心脏会剧烈搏动排出腔内的血液, 再立即更换 50 ml 氧饱和和预冷的 NT(-) 溶液, 继续洗去心腔内的血液, 同时持吸有 NT(-) 溶液的注射器边从主动脉往心腔注射 NT(-) 溶液, 边将套有乳胶套的针头用血管夹夹紧在主动脉口, 针头端部不能进入主动脉瓣, 以免堵住血管影响灌流. 迅速转移心脏, 挂于 Langendorff 灌流装置并用丝线结扎固定. 灌流初, 先用 50 ml 37°C 预热的无钙台式液逆向灌流心脏 (流速为 6 ml/min), 直到心脏颜色稍变浅, 以及滴无色透明液体, 此步骤是为了进一步冲洗心腔内多余的血液.

b. 约 2 min 心脏停止跳动后, 换用 37°C 预热的 E 液灌流心脏约 30 min, 直至心脏明显变松软, 颜色呈粉红状, 再换 50 ml 37°C 预热的 DE 液继续灌流 5 min, 充分洗脱心腔中残留的 E 液.

c. 取下心脏放入 40 ml 37°C 预热的 NT(-) 溶液中, 剪掉心房和血管后, 剪开梗死边缘区心肌组织. 先用眼科剪将剩余心肌组织剪成小块, 再用一次性吸管反复轻柔地将组织吹散, 直到组织完全溶解. 接着, 用 200 目双层滤网过滤心肌细胞, 室温静置 10 min (状态良好的心肌细胞会沉淀到容器底部, 状态不好的心肌细胞会悬浮在溶液中) 后, 用一次性吸管将上层溶液轻轻吸走, 并加入等量新的 37°C 预热的 NT(-) 溶液, 使溶液保持 40 ml.

d. 每隔 5 min 向心肌细胞悬液中滴加无菌 CaCl_2 (0.2 mol/L) 溶液并缓慢摇匀, 直至溶液 Ca^{2+} 浓度达到 1.8 mmol/L. 取复钙前心肌细胞和复钙后心肌细胞悬液滴于载玻片上, 轻覆盖玻片, 于

奥林巴斯显微镜下观察心肌细胞状态.

1.6 心肌单细胞钙瞬变与收缩能力测定方法

a. 用氧饱和 T 液洗两次心肌细胞悬液后, 取 500 μl 细胞悬液于 EP 管中, 加入 0.5 μl Ca^{2+} 荧光染料 (Fura-2 AM Ca^{2+} 荧光探针), 4°C 避光, 移液枪每隔 10 min 轻轻吹打, 孵育 30 min. 采用拜谱 IonOptix 细胞收缩与离子浓度同步测量系统检测.

b. 将负载荧光探针的细胞悬液混匀后, 取 20 μl 滴入单细胞可视化边缘探测系统操作台内的细胞池中, T 液灌流, 寻找状态良好的细胞, 进行测试并记录.

c. 钙瞬变主要记录心肌细胞在收缩和舒张期的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光比率 (ratio), 统计 ratio 改变幅度 (ratio amplitude)、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化百分数 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitude)、达峰速率 (departure velocity)、达基线速率 (return velocity)、达峰时程 (time to peak, TTP)、达峰 50% 时程 (time to peak 50%, TTP50%)、达基线 50% 时程 (time to baseline 50%, TTB50%). 心肌细胞收缩功能指标为肌节长度 (sarcomere length, SL), 肌节收缩幅度 (peak twitch amplitude, PTA)、肌节缩短分数 (SL shortening%)、肌节最大收缩及舒张速率 (maximum contraction and diastolic rate of sarcomere, $\pm \text{dl}/\text{dtmax}$).

1.7 数据采集与统计学处理

Image Lab 软件进行 Western blot 结果分析处理, 心肌细胞钙瞬变和收缩各指标均由 IonOptix 系统自带软件分析, 分析所得数据均采用 SPSS17.0 软件分析, 不同组别间显著性差异水平为 $P < 0.05$, $P < 0.01$, 分析所得数据均用 GraphPad Prism 8.0 软件制图. 实验结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示.

2 实验结果

2.1 有氧运动显著上调心梗心肌PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a通路

Western blotting 实验结果显示: 与 C 组比较, CE 组心肌 PKG-1、p-PI3K、PLN、SERCA2a 蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$, $P<0.05$), p-Akt 有增加

趋势; 与 S 组比较, MI 组心肌 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$, $P<0.05$), PKG-1、p-PLN 和 SERCA2a 蛋白表达均显著下调 ($P<0.01$, $P<0.05$); 与 MI 组比较, ME 组心肌 p-PI3K、p-Akt、PKG-1、p-PLN、SERCA2a 蛋白表达均显著增高 ($P<0.01$, $P<0.05$) (图 1)。上述结果表明, 心梗心肌 PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a 信号通路受到抑制, 有氧运动可显著激活该信号通路。

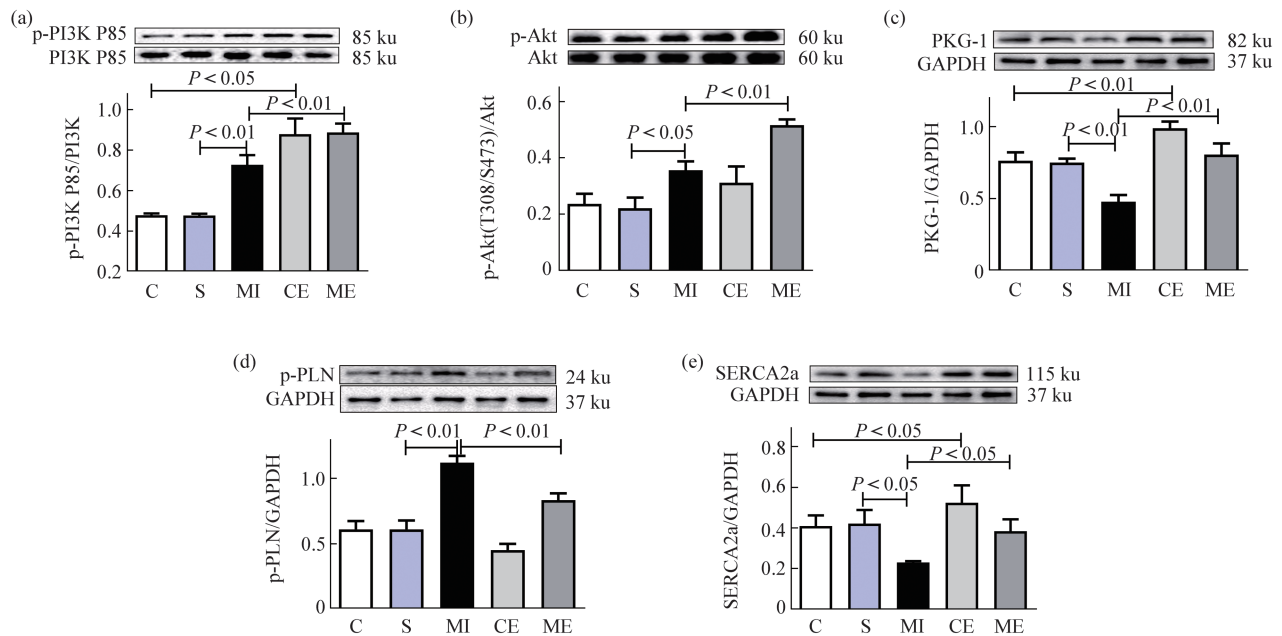


Fig. 1 Expression of p-PI3K(a), p-Akt(b), PKG-1(c), p-PLN(d) and SERCA2a(e) in cardiomyocytes

2.2 有氧运动显著改善心梗大鼠心功能

大鼠心功能测定结果显示: 与 C 组比较, CE 组 LVEDP 显著降低 ($P<0.05$), LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 无显著性变化; 与 S 组比较, MI 组 LVEDP 显著升高 ($P<0.01$), LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著降低

($P<0.01$); 与 MI 组比较, ME 组 LVEDP 显著降低 ($P<0.05$), LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著升高 ($P<0.01$) (图 2)。上述结果表明, 心梗严重损伤大鼠心脏功能, 有氧运动干预可有效改善心脏功能。

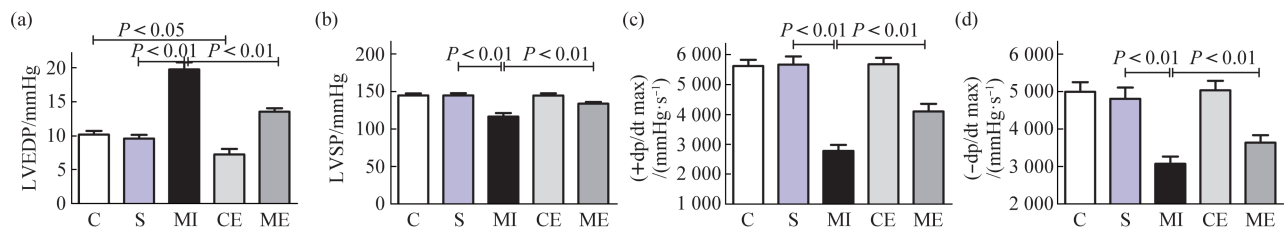


Fig. 2 The results of cardiac function

The systolic and diastolic function of the left ventricle was assessed by measuring cardiac hemodynamic parameters including (a) left ventricular end-diastolic pressure(LVEDP), (b) left ventricular systolic pressure(LVSP), (c) maximum pressure increasing rate (+dp/dt_{max}), and (d) maximum pressure decreasing rate (-dp/dt_{max}).

2.3 有氧运动改善心梗心肌单细胞钙瞬变

心肌细胞收缩动态图像由IonOptix系统将采集的心肌细胞收缩动态图像经软件分析转换,生成心肌细胞ratio和SL变化曲线.其中,心肌细胞钙瞬变Ratio曲线的生成是通过 Ca^{2+} 荧光染料Fura-2的荧光强度计算生成.

软件分析及拟合心肌细胞钙瞬变和收缩曲线结果显示:与C组比较,CE组心肌细胞SL变化幅度升高;与S组比较,MI组心肌细胞ratio和SL的变化幅度均降低;与MI组比较,ME组心肌细胞ratio和SL变化幅度均升高(图3).

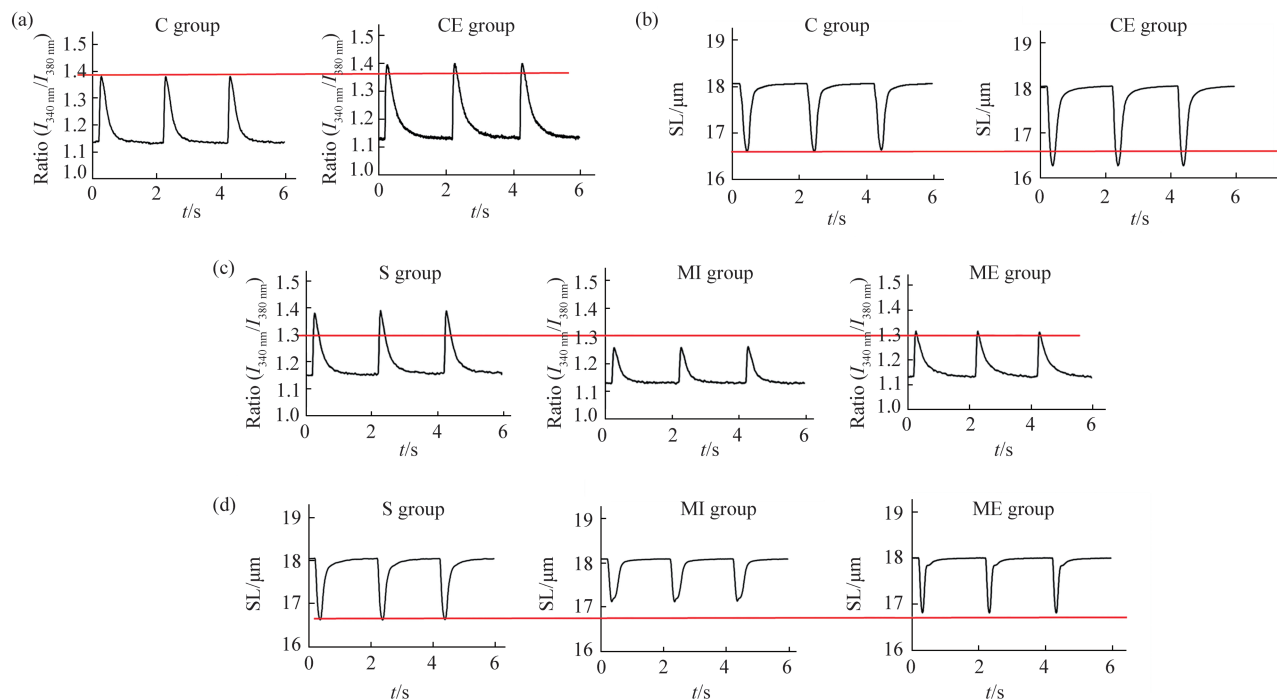


Fig. 3 Changes of calcium transient and systolic function of myocardial cells

(a) Ratio ($I_{340\text{ nm}}/I_{380\text{ nm}}$) of C group and CE group, (b) Sarc length of C group and CE group, (c) Ratio ($I_{340\text{ nm}}/I_{380\text{ nm}}$) of S group, MI group and ME group, (d) Sarc length of S group, MI group and ME group.

心肌细胞钙瞬变测定结果显示:与C组比较,CE组心肌细胞ratio amplitude、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitude、departure velocity 和 return velocity 值均显著升高 ($P<0.01$), TTP、TTP50%和TTB 50%值均显著降低 ($P<0.01$, $P<0.05$);与S组比较,MI组心肌细胞ratio amplitude、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitude、departure velocity 和 return velocity 值均显著降低 ($P<0.01$), TTP、TTP50%和TTB50%值均显著升高 ($P<0.01$);与MI组比较,ME组心肌细胞ratio amplitude、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitude、departure velocity 和 return velocity 值均显著升高 ($P<0.01$), TTP、TTP50%和TTB50%值均显著降低 ($P<0.01$) (图4).

上述结果表明,心梗导致大鼠单个心肌细胞 Ca^{2+} 调控发生异常,钙瞬变幅度及速率均明显降低,有氧运动能够有效改善心梗大鼠单个心肌细胞

的钙瞬变.

2.4 有氧运动改善心梗心肌单细胞的收缩功能

单个心肌细胞收缩功能检测结果显示:与C组比较,CE组单个心肌细胞的肌节PTA、SL shortening%、 $\pm\text{dl}/\text{dtmax}$ 值均显著增加 ($P<0.01$);与S组比较,MI组均显著降低 ($P<0.01$);与MI组比较,ME组均显著提高 ($P<0.01$, $P<0.05$) (图5).上述结果表明,心梗损伤单个心肌细胞的收缩能力,有氧运动干预后可显著改善单个心肌细胞的收缩能力.

2.5 有氧运动显著抑制心梗心肌细胞凋亡

Caspase 3试剂盒检测结果显示:与C组比较,CE组心肌Caspase 3活性显著降低 ($P<0.05$),与S组比较,MI组心梗周边区Caspase 3活性显著升高 ($P<0.05$);与MI组比较,ME组心梗边缘区Caspase 3活性显著降低 ($P<0.05$) (图6a).

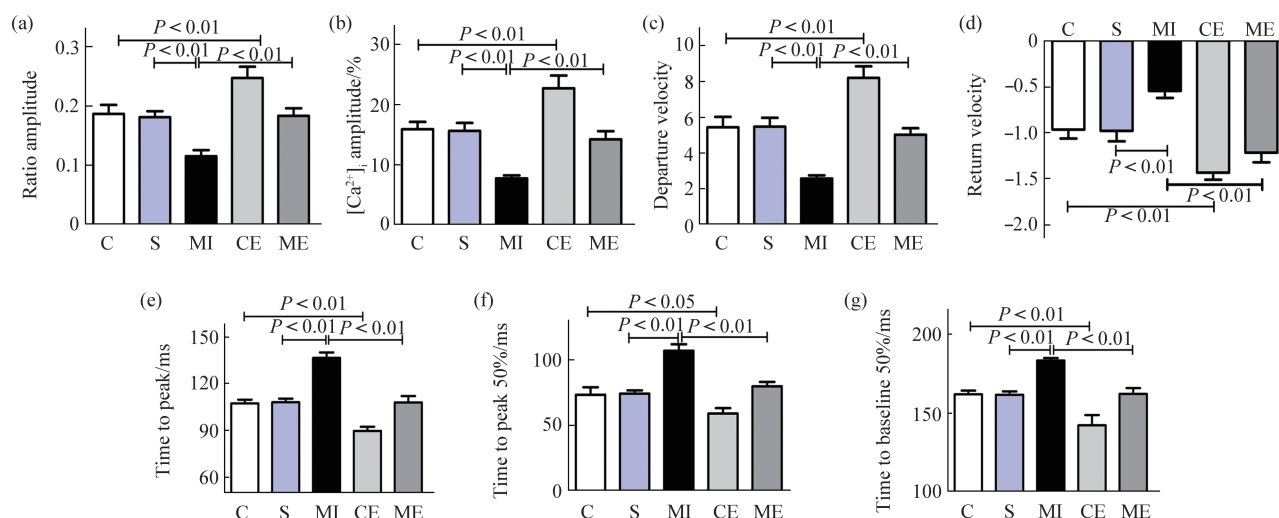


Fig. 4 The results of calcium transient in myocardial cells

(a) Ratio amplitude, (b) $[Ca^{2+}]_i$ amplitude, (c) Departure velocity, (d) Return velocity, (e) Time to peak (TTP), (f) Time to peak 50% (TTP50%), (g) Time to baseline 50% (TTB50%).

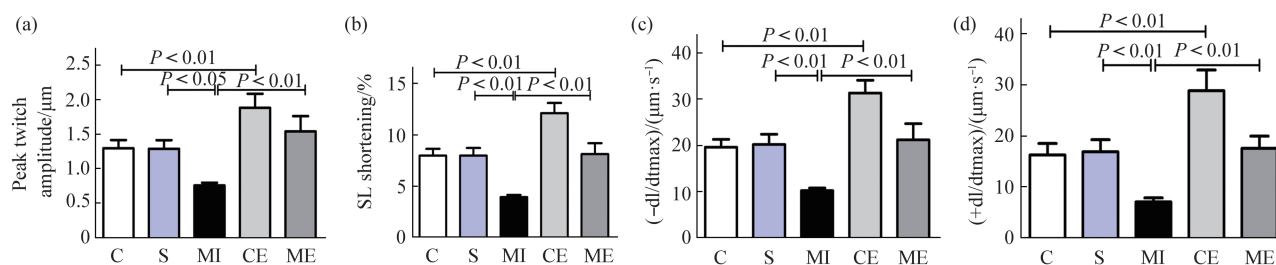


Fig. 5 The results of single myocardial cell systolic function

(a) Peak twitch amplitude(PTA), (b) SL shortening %, (c) Maximum diastolic rate of sarcomere($-dl/dt_{max}$), (d) Maximum contraction rate of sarcomere ($+dl/dt_{max}$).

Western blot实验结果显示: 与C组比较, CE组心肌Bax蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2和Bcl-2/Bax表达无显著差异; 与S组比较, MI组心肌Bax蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$), Bcl-2及Bcl-2/Bax显著下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与MI组比较, ME组Bax蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2及Bcl-2/Bax均显著升高 ($P < 0.01$) (图6b~d)。

上述结果表明, 心梗边缘区心肌凋亡显著增加, 而有氧运动可显著抑制心肌凋亡。

2.6 心功能与PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a激活和细胞凋亡关系密切

Pearson相关性分析结果显示, 大鼠心肌收缩

功能与心肌PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路中p-PI3K/PI3K、p-AKT/Akt、p-PLN蛋白表达以及心肌促凋亡因子Caspase 3活性和Bax蛋白表达存在显著负相关, 与心肌PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路中PKG-1、SERCA2a蛋白表达及与心肌抑凋亡因子Bcl-2蛋白表达存在显著正相关 (图7)。表明心梗大鼠心功能的改善与PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路的激活和心肌细胞凋亡抑制关系密切。

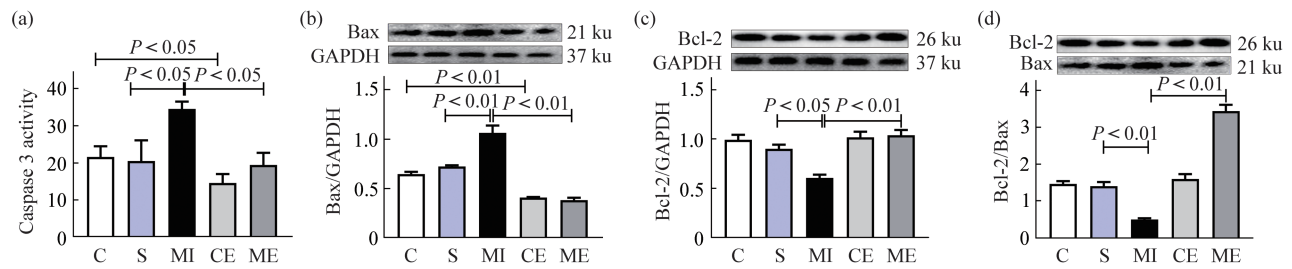


Fig. 6 The results of apoptosis related proteins expression in heart

(a) The activity of Caspase 3 in the myocardium was measured using a spectrophotometer, (b-d) Representative blots of the apoptotic proteins, Bax (b), Bcl-2 (c), Bcl-2/BAX (d) ratio.

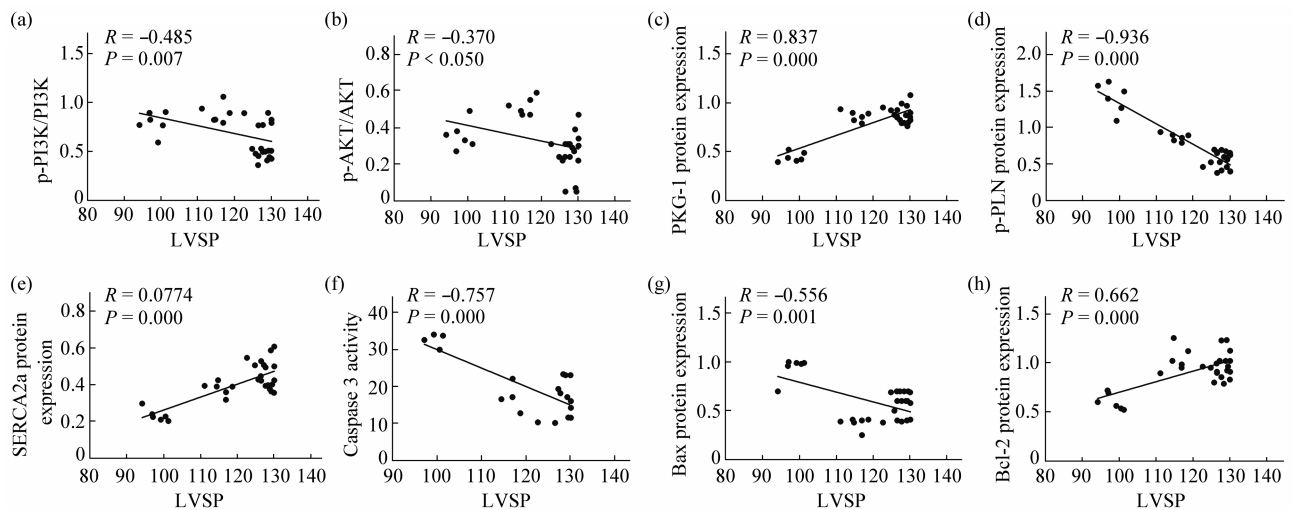


Fig. 7 The correlation analysis of myocardial LVSP with PI3K-AKT-PKG-1/p-PLN-SERCA2a pathway and apoptosis

The correlation analysis between myocardial LVSP and (a) p-PI3K/PI3K, (b) p-AKT/AKT, (c) pPKG-1, (d) p-PLN, (e) SERCA2a, (f) Caspase 3, (g) Bax, (h) Bcl-2.

3 讨论与分析

3.1 有氧运动改善心肌梗大鼠心肌细胞的钙瞬变

研究表明, 心肌细胞的兴奋-收缩耦合 (excitation-contraction coupling, ECC) 依赖于胞内 Ca^{2+} 的循环, 且由肌质网 (sarcoplasmic reticulum, SR) 严格把控胞内 Ca^{2+} 的释放和回收^[19]. 当心肌细胞发生ECC时, 胞质的 Ca^{2+} 浓度大幅提升, 当细胞为静息状态时, Ca^{2+} 被调控到胞外, 这种胞质中 Ca^{2+} 浓度瞬时增加与降低的过程称为 Ca^{2+} 瞬变 (Ca^{2+} transient). 胞内 Ca^{2+} 跨膜转运数量的相等确保心肌细胞能够正常收缩和舒张. 骨骼肌ECC的发生是细胞膜和横管系统L-型钙通道 (L-type Ca^{2+} channel, LTCC) 去极化引起的; 而心肌中LTCC与RyR2的调节却是由胞质中的钙信号介导. 二联

体中, LTCC介导的 Ca^{2+} 内流能够快速引起局部 Ca^{2+} 浓度增加, 并与RyR2的钙结合位点结合, 激活RyR2, 使大量的 Ca^{2+} 进入胞浆, 这一过程称为钙致钙释放 (Ca^{2+} induced Ca^{2+} release, CICR)^[20]. CICR是大多数细胞中 Ca^{2+} 信号放大的基本机制^[20-22]. 这种机制在心肌细胞中是由质膜中LTCC与SR中 Ca^{2+} 释放通道的RyR2调控^[20]. LTCC中 Ca^{2+} 需跨越细胞表面和SR膜之间12 nm的缝隙才能激活邻近的RyR2, 并以 Ca^{2+} 火花 (Ca^{2+} sparks) 的形式释放 Ca^{2+} ^[23]. 其中, 单个LTCC开放引起的局部 Ca^{2+} 浓度变化称 Ca^{2+} 火星 (Ca^{2+} sparklet). Wang等^[24] 已证实, 心肌SR中, Ca^{2+} 的释放是由单个LTCC调控的. 尽管 Ca^{2+} 火星与LTCC的开放和关闭密切相关, 但 Ca^{2+} 火花与 Ca^{2+} 火星的持续时间是相对独立的. Ca^{2+} 火星可触发4~6个RyR2产生一个 Ca^{2+}

火花. SR中 Ca^{2+} 释放到一定程度时可抑制RyR2的活性,并停止向胞浆释放 Ca^{2+} ,继而导致心肌细胞舒张^[25].当心肌细胞舒张时,CICR受到抑制的同时,胞浆中的 Ca^{2+} 被回收,大部分 Ca^{2+} 被重回收到SR,一部分 Ca^{2+} 通过膜上的钙泵运出细胞外,少部分通过线粒体上 Ca^{2+} 单向传递体转运至线粒体,该过程通过SERCA实现.其中,SERCA2a是含量最丰富的蛋白质之一,能反映 Ca^{2+} 转运体的作用. PLN是SERCA2a主要的调节蛋白^[26],PLN非磷酸化时,SERCA2a与PLN结合,降低其对 Ca^{2+} 的亲合力.研究证实,PKG-1能够调节肌浆网PLN的磷酸化,磷酸化的PLN可促进SERCA2a与 Ca^{2+} 的结合,增强SR对 Ca^{2+} 的回收^[27].综上所述,钙瞬变能够反映心肌细胞收缩功能,而钙瞬变受到SERCA2a和PLN、PKG-1的调节,但其上游的调节通路目前尚无研究报道.本实验研究结果显示,心梗大鼠心肌细胞ratio amplitude和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitude,departure velocity和return velocity值显著下降,TTP、TTP50%和TTB50%值显著增加.说明,心梗时,心肌细胞在CICR过程中受到了抑制,导致其活性降低,造成心肌细胞在收缩期和舒张期SR对 Ca^{2+} 的释放和回收能力下降.4周有氧运动干预后,心肌细胞ratio amplitude和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitude,departure velocity和return velocity值显著增加,TTP、TTP50%和TTB50%值显著缩小.表明,有氧运动能够增强SR摄钙和回收钙的能力,而SR回收钙的能力受SERCA2a的调节,由此推测,有氧运动改善心梗心肌钙瞬变可能与SERCA2a有关. Western blotting结果显示,心梗组大鼠心肌中,PKG-1表达和PLN磷酸化水平显著下降,SERCA2a蛋白显著下降,在有氧运动干预后,PI3K/Akt通路进一步被激活,PKG-1表达和PLN磷酸化水平显著上调,SERCA2a蛋白表达显著上调,表明,心梗心肌PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路受到抑制,有氧运动可显著激活该信号通路,从而保护心梗心肌.

3.2 有氧运动改善心梗大鼠心肌细胞的收缩与舒张能力

正常心肌细胞膜表面的兴奋-收缩装置是由肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)释放的 Ca^{2+} 调控的. SR和T管系统能够调节钙稳态中的插件,从而使心脏有节奏地跳动. MI后,心肌缺血缺氧,导致细胞内钙超载. 心肌细胞高浓度的 Ca^{2+} 导致心肌受损^[28]. NCX是一种逆向转运膜蛋白,它能维持

各类细胞内 Ca^{2+} 的稳定. 研究表明,抑制NCX的活性能够降低缺血再灌引起的梗死面积、减少乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的含量以及抑制细胞凋亡^[29-30],此外,Salas等^[31]也提出,在缺血再灌注模型中,NCX调节 Ca^{2+} -钙调蛋白依赖性蛋白激酶(Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)的活性. 文献报道,心梗导致LTCC电流降低,进而降低RyR集群对刺激的反应^[2, 31],同时,在心衰模型中也发现T管丢失^[32-35]和亲联蛋白水平降低现象^[36-37]. 研究已证实,心肌收缩能力的下降是由于SR对 Ca^{2+} 调控能力的下降. SR对 Ca^{2+} 调控能力的下降导致SERCA2a和RyR等 Ca^{2+} 转运蛋白活性的减弱. 近期研究证实,减少SERCA2a的蛋白质含量可导致肌浆网摄钙能力下降,引起心律不齐^[38-39],因此,在缺血心脏中,心肌细胞收缩和舒张功能的下降与SERCA2a蛋白有关. 研究表明,心衰模型中,SERCA的过表达可使SR稳定摄钙,进而改善心功能^[40],且心衰早期,RyR2可通过降低SR的阈值来维持正常的钙瞬变状态^[41-42]. 心衰后期,异常高活性的RyRs导致SR对 Ca^{2+} 的敏感性增加,故而在心肌舒张时肌浆网摄钙的耐受性降低,导致钙瞬变减弱. 因此,缺血心脏中,心肌细胞 Ca^{2+} 调节的紊乱,SERCA摄钙能力的下降,钙瞬变幅度的减小都导致舒张期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度的增高,这些因素共同造成心肌细胞的收缩和舒张紊乱. 本实验研究结果显示,MI大鼠心肌细胞肌节PTA、 $\pm\text{dl}/\text{dtmax}$ 和SL shortening%显著降低,表明心肌细胞绝对与相对收缩幅度以及收缩速率下降,MI后心肌细胞收缩能力下降. 有氧运动干预后,MI大鼠心肌细胞肌节PTA、 $\pm\text{dl}/\text{dtmax}$ 和SL shortening%显著增加,表明有氧运动能够改善心肌细胞收缩能力.

3.3 心功能与PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a激活和细胞凋亡关系密切

适宜的运动训练可降低心梗引起的大鼠心肌细胞凋亡水平,减轻心肌纤维化,提高心肌抗氧化能力,改善心肌病理性重塑和心功能^[9-15]. 运动也可通过调节线粒体介导的细胞凋亡通路有效减少心肌细胞的凋亡,其中主要通过降低 Ca^{2+} 在线粒体中的浓度减少 Ca^{2+} 超载对线粒体结构和功能造成的破坏,在这一过程中caspase-3裂解及Bax/Bcl-2比值均降低^[43-44],此报道与本实验研究结果一致. 上述研究结果表明,运动能够提升心梗大鼠心功能以及抑制细胞凋亡现象. 运动在心脏通过激活MEK/

Erk1/2、PI3K/Akt和FAK三条信号通路,维持心脏正常生长发育,保护心肌细胞存活及抑制凋亡,维持心脏正常功能^[45].其中PI3K/Akt通路的激活在细胞增殖、细胞周期调控、凋亡启动、血管生成等方面发挥着关键作用,可抑制氧化应激引起的细胞凋亡^[46-48],这与本实验研究结果一致,表明心肌梗死大鼠心功能的改善与PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路的激活和心肌细胞凋亡抑制关系密切.

综上所述,有氧运动改善MI大鼠梗死周边区心肌细胞的钙瞬变和收缩功能异常,并激活PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号,抑制心肌细胞凋亡,改善心肌梗死功能.且心肌梗死功能改善与PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a信号通路激活和心肌细胞凋亡抑制关系密切.该研究将为运动对缺血心脏保护效应的生物学机制提供实验依据,为运动与心血管疾病预防和运动康复方面的研究提供新思路和方法.

参 考 文 献

- [1] Qu Z, Nivala M, Weiss J N. Calcium alternans in cardiac myocytes: order from disorder. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, **58**: 100-109
- [2] Gershon C, Lin E, Kashiara H, *et al.* Colocalization of voltage-gated Na⁺ channels with the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in rabbit cardiomyocytes during development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, **300**(1): H300-H311
- [3] Valverde C A, Kornyejev D, Ferreira M, *et al.* Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc Res*, 2010, **85**(4): 671-680
- [4] Stamm C, Friehs I, Choi Y H, *et al.* Cytosolic calcium in the ischemic rabbit heart: assessment by pH- and temperature-adjusted rhod-2 spectrofluorometry. *Cardiovasc Res*, 2003, **59**(3): 695-704
- [5] Steenbergen C, Murphy E, Levy L, *et al.* Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res*, 1987, **60**(5): 700-707
- [6] Kihara Y, Grossman W, Morgan J P. Direct measurement of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Circ Res*, 1989, **65**(4): 1029-1044
- [7] Negretti N, O'Neill S C, Eisner D A. The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 1993, **27**(10): 1826-1830
- [8] Wisløff U, Loennechen J P, Currie S, *et al.* Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2002, **54**(1): 162-174
- [9] Wu F, Li Z, Cai M, *et al.* Aerobic exercise alleviates oxidative stress-induced apoptosis in kidneys of myocardial infarction mice by inhibiting ALCAT1 and activating FNDC5/Irisin signaling pathway. *Free Radic Biol Med*, 2020, **158**: 171-180
- [10] Song W, Liang Q, Cai M, *et al.* HIF-1 α -induced up-regulation of microRNA-126 contributes to the effectiveness of exercise training on myocardial angiogenesis in myocardial infarction rats. *J Cell Mol Med*, 2020, **24**(22): 12970-12979
- [11] Cai M X, Shi X C, Chen T, *et al.* Exercise training activates neuregulin 1/ErbB signaling and promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model. *Life Sci*, 2016, **149**: 1-9
- [12] Jia D, Hou L, Lv Y, *et al.* Post-infarction exercise training alleviates cardiac dysfunction and adverse remodeling via mitochondrial biogenesis and SIRT1/PGC-1 α /PI3K/Akt signaling. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(12): 23705-23718
- [13] Xi Y, Hao M, Liang Q, *et al.* Dynamic resistance exercise increases skeletal muscle-derived FSTL1 inducing cardiac angiogenesis via DIP2A-Smad2/3 in rats following myocardial infarction. *J Sport Health Sci*, 2020, **S2095-2546**(20): 30161-30167
- [14] Cai M, Wang Q, Liu Z, *et al.* Effects of different types of exercise on skeletal muscle atrophy, antioxidant capacity and growth factors expression following myocardial infarction. *Life Sci*, 2018, **213**: 40-49
- [15] Jia D, Cai M, Xi Y, *et al.* Interval exercise training increases LIF expression and prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle atrophy in rats. *Life Sci*, 2018, **193**: 77-86
- [16] Brero A. Neuregulin-1 beta1 rapidly modulates nitric oxide synthesis and calcium handling in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2010, **88**(3): 443-452
- [17] Kemi O J, Wisløff U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010, **199**(4): 425-439
- [18] Lin J Y, Kuo W W, Baskaran R, *et al.* Swimming exercise stimulates IGF1/ PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. *Aging (Albany NY)*, 2020, **12**(8): 6852-6864
- [19] Görlach A, Bertram K, Hudecova S, *et al.* Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol*, 2015, **6**: 260-271
- [20] Eisner D A, Caldwell J L, Kistamas K, *et al.* Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. *Circ Res*, 2017, **121**(2): 181-195
- [21] Zhou X, Park K H, Yamazaki D, *et al.* TRIC-A channel maintains store calcium handling by interacting with type 2 ryanodine receptor in cardiac muscle. *Circ Res*, 2020, **126**(4): 417-435
- [22] Heine M, Heck J, Ciurazkiewicz A, *et al.* Dynamic compartmentalization of calcium channel signalling in neurons. *Neuropharmacology*, 2020, **169**: 107556
- [23] Berridge M J, Taylor C W. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1988, **53**(Pt 2): 927-933
- [24] Wang S Q, Song L S, Lakatta E G, *et al.* Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells.

- Nature, 2001, **410**(6828): 592-596
- [25] Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Valdivia H H, *et al.* Luminal Ca^{2+} controls termination and refractory behavior of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Circ Res*, 2002, **91**(5): 414-420
- [26] Kranias E G, Hajjar R J. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res*, 2012, **110**(12): 1646-1660
- [27] Simmerman H K, Collins J H, Theibert J L, *et al.* Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem*, 1986, **261**(28): 13333-13341
- [28] Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, *et al.* Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity *via* cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion*, 2001, **1**(2): 151-159
- [29] Petrosillo G, Ruggiero F M, Di Venosa N, *et al.* Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J*, 2003, **17**(6): 714-716
- [30] Ferreira D J S, Pedroza A A, Braz G R F, *et al.* Mitochondrial dysfunction: maternal protein restriction as a trigger of reactive species overproduction and brainstem energy failure in male offspring brainstem. *Nutr Neurosci*, 2019, **22**(11): 778-788
- [31] Salas MA, Valverde C A, Sánchez G, *et al.* The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, **48**(6): 1298-1306
- [32] Chen S, Li S. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit*, 2012, **18**(11): RA161-RA165
- [33] Gómez A M, Valdivia H H, Cheng H, *et al.* Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*, 1997, **276**(5313): 800-806
- [34] He J, Conklin M W, Foell J D, *et al.* Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca^{2+} channels in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res*, 2001, **49**(2): 298-307
- [35] Litwin S E, Zhang D, Bridge J H. Dyssynchronous Ca^{2+} sparks in myocytes from infarcted hearts. *Circ Res*, 2000, **87**(11): 1040-1047
- [36] Balijepalli R C, Lokuta A J, Maertz N A, *et al.* Depletion of T-tubules and specific subcellular changes in sarcolemmal proteins in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res*, 2003, **59**(1): 67-77
- [37] Crossman D J, Ruygrok P N, Soeller C, *et al.* Changes in the organization of excitation-contraction coupling structures in failing human heart. *Plos One*, 2011, **6**(3): e17901
- [38] Louch W E, Bito V, Heinzel F R, *et al.* Reduced synchrony of Ca^{2+} release with loss of T-tubules-a comparison to Ca^{2+} release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2004, **62**(1): 63-73
- [39] Lyon A R, MacLeod K T, Zhang Y, *et al.* Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(16): 6854-6859
- [40] Song L S, Sobie E A, McCulle S, *et al.* Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(11): 4305-4310
- [41] Wei S, Guo A, Chen B, *et al.* T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ Res*, 2010, **107**(4): 520-531
- [42] Wilson L D, Jeyaraj D, Wan X, *et al.* Heart failure enhances susceptibility to arrhythmogenic cardiac alternans. *Heart Rhythm*, 2009, **6**(2): 251-259
- [43] Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium- apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**(7): 552-565
- [44] Pinton P, Giorgi C, Siviero R, *et al.* Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 2008, **27**(50): 6407-6418
- [45] Mendes-Ferreira P, De Keulenaer G W, Leite-Moreira A F, *et al.* Therapeutic potential of neuregulin-1 in cardiovascular disease. *Drug Discov Today*, 2013, **18**(17-18): 836-842
- [46] Fukazawa R, Miller T A, Kuramochi Y, *et al.* Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis *via* erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, **35**(12): 1473-1479
- [47] Kuramochi Y, Lim C C, Guo X, *et al.* Myocyte contractile activity modulates norepinephrine cytotoxicity and survival effects of neuregulin-1beta. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, **286**(2): C222-C229
- [48] Kuramochi Y, Cote G M, Guo X, *et al.* Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1 beta/erbB4 signaling. *J Biol Chem*, 2004, **279**(49): 51141-51147

Aerobic-exercise-induced Activation of PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a Pathway Inhibits Myocardial Cell Apoptosis and Improves Cardiac Function in Myocardial Infarction Rats*

LIU Niu^{1,2)}, TIAN Zhen-Jun^{1,2)**}

⁽¹⁾School of Physical Education, Weinan Normal University, Weinan 714099, China;

⁽²⁾Institute of Sports and Exercise Biology, School of Physical Education, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract To investigate the effect of aerobic exercise on cardiac function in myocardial infarction rats, SD male rats were randomly divided into normal group (C group), sham operation group (S group), myocardial infarction group (MI group), normal+exercise group (CE group) and myocardial infarction+exercise group (ME group) after 1 week of adaptive feeding. Then, an MI model was established by ligating the left anterior descending coronary artery and group S only threading without ligation. One week after surgery, animals were randomly assigned to receive 4 weeks of no training or training (1 h/d, 5 d/week on a treadmill). In detail, the training consisted of two 10-minute sessions at speed of 10 m/min and 13 m/min, and the remaining 40 min at speed of 16 m/min. The next day after the training, blood flow mechanics was used to detect cardiac function. A single cell visual moving edge detection system (Ion Optix) was used to determine $[Ca^{2+}]_i$ amplitude, $[Ca^{2+}]_i$ fluorescence ratio, departure velocity, time to peak(TTP), time to peak50%(TTP50%), time to baseline50%(TTB50%), return velocity, ratio amplitude, maximum contraction and diastolic rate of sarcomere($\pm dl/dt_{max}$), sarcomere length(SL), peak twitch amplitude(PTA) and SL shortening%. The related proteins of PI3K-AKT-PKG-1/p-PLN-SERCA2a signaling pathway and apoptosis were detected by PI3K-AKT-PKG-1/p-PLN-SERCA2a signaling pathway and apoptosis related proteins were detected by Western blotting. Compared with group S, in group MI, PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a signaling pathway is significantly inhibited, apoptosis and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) are significantly increased, left ventricular systolic pressure (LVSP) and maximum pressure increasing and decreasing rate($\pm dp/dt_{max}$), $[Ca^{2+}]_i$ amplitude, $[Ca^{2+}]_i$ ratio amplitude, departure velocity and return velocity all significantly reduce, and TTB50%, TTP and TTP50% both significantly increase. The myocardial cells were significantly reduced at the SL shortening%, PTA, $\pm dp/dt_{max}$. Compared with MI group, PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a signaling pathway in ME group is significantly activated, apoptosis and LVEDP are significantly reduced, LVSP and $\pm dp/dt_{max}$ are significantly increased, ratio amplitude, $[Ca^{2+}]_i$ amplitude, ratio velocity and departure velocity are significantly increased, and TTB50%, TTP and TTP50% are significantly shortened. The myocardial cells were significantly increased at the SL shortening%, PTA, $\pm dp/dt_{max}$. It can be concluded that aerobic exercise improves the calcium transient and myocardial systolic function in peripheral infarction area of MI rats, activates the PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a signal, inhibits the apoptosis of myocardial cells, and improves myocardial infarction function. Moreover, the improvement of myocardial infarction function is closely related to the activation of PI3K-Akt-PKG-1/p-PLN-SERCA2a signaling pathway and the inhibition of myocardial cell apoptosis.

Key words signaling pathway, myocardial infarction, aerobic exercise, rats

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0386

* This study was funded by Scientific Research Project of Science and Technology Department of Shaanxi Province, China (2021JQ-827) and Scientific Research Special Project of Shaanxi Provincial Department of Education, China (20JK0633).

** Corresponding author.

Tel: 86-29-85310156, E-mail: tianzhj@snnu.edu.cn

Received: December 5, 2020 Accepted: December 25, 2020