

·基础研究·

长期中等强度运动对小鼠骨骼肌HIF-1 α mRNA的表达及葡萄糖转运的影响*

谢康玲¹ 刘遂心^{1,2} 蔡颖¹ 张文亮¹

摘要

目的:观察长期中等强度运动对小鼠骨骼肌血管内皮生长因子-A(VEGF-A)、葡萄糖转运体1(GLUT-1)、葡萄糖转运体4(GLUT-4)mRNA表达的影响,在此基础上进一步观察运动对缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)mRNA表达的影响,初步探讨运动对小鼠骨骼肌葡萄糖转运的影响及其可能机制。

方法:健康雄性昆明小鼠24只随机分为运动组和对照组,运动组小鼠给予12周中等强度跑步训练。末次运动后处死所有小鼠,取双侧腓肠肌,光镜及电镜观察显微及超微结构;实时PCR法测定小鼠骨骼肌VEGF-A、GLUT-1、GLUT-4及HIF-1 α mRNA的表达。

结果:①运动组小鼠较对照组体重明显增加($P < 0.05$);②骨骼肌肌细胞数目增加、肌纤维增粗,肌原纤维的直径增加,线粒体数目增加;③运动组小鼠骨骼肌VEGF-A、GLUT-1、GLUT-4及HIF-1 α mRNA表达明显高于对照组(分别增加1.68、1.14、2.31、1.92倍, P 分别 < 0.05 、 0.01 、 0.01 、 0.01)。

结论:长期中等强度运动可导致小鼠体重增加、肌纤维增粗、线粒体数目增加,VEGF-A mRNA表达增加;可增加骨骼肌GLUT-1、GLUT-4 mRNA的表达,其机制可能与上调骨骼肌HIF-1 α mRNA表达有关。

关键词 运动;缺氧诱导因子1 α ;骨骼肌;葡萄糖转运体;小鼠

中图分类号:G804.7,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-06-0514-05

Effects of long-term exercise with moderate intensity on the expressions of hypoxia inducible factor-1 α mRNA and glucose transporters in skeletal muscles of mice/XIE Kangling, LIU Suixin, CAI Ying, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(6): 514—518

Abstract

Objective: To investigate the effect of long-term exercise with moderate intensity on the expressions of glucose transporter-1 (GLUT-1) and glucose transporter-4 (GLUT-4) mRNA, as well as of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) mRNA in skeletal muscles of mice and explore its possible mechanisms.

Method: Kunming male mice (n=24) were randomly divided into exercise group and control group. The mice in exercise group were forced to run with moderate intensity on a treadmill. After 12 weeks of exercise, all mice were sacrificed immediately and both sides of gastrocnemius were harvested. The middle part of tissue samples were prepared for H & E staining, and analysed under light microscope and transmission electron microscope. In addition, part of tissues were used to check gene expression by real-time PCR.

Result: ①Compared to control group, the body weights of exercise group increased significantly($P < 0.05$). ②The number of muscle cells increased, the size of muscle fibers thickened, the diameter of myofibril and the amount of mitochondria increased significantly. ③The expressions of VEGF-A mRNA, GLUT-1 mRNA, GLUT-4 mRNA,

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.06.007

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672213)

1 中南大学湘雅医院康复医学科,长沙,410008;2 通讯作者

作者简介:谢康玲,女,主管技师;收稿日期:2011-10-20

and HIF-1 α mRNA in exercise group were significantly higher (increased by 1.68, 1.14, 2.31 and 1.92-fold separately, $P < 0.05$, 0.01, 0.01, 0.01 separately) than those of control group.

Conclusion: ①Long-term exercise with moderate intensity can cause weight gain, thickening of skeletal muscle fibers, increasing of mitochondria amount and expression of VEGF-A mRNA; ②Long-term exercise with moderate intensity can increase the expressions of GLUT-1 mRNA, GLUT-4 mRNA in skeletal muscles. Induction of HIF-1 α mRNA expression in skeletal muscles by exercise might be one of the possible mechanisms.

Author's address Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008

Key word exercise; hypoxia inducible factor-1 α ; skeletal muscle; glucose transporter; mouse

糖尿病是一个备受关注的公众健康问题。研究显示,坚持长期中等强度的有氧运动能起到降低糖尿病危险因素水平及预防糖尿病发生等重要作用^[1]。骨骼肌是机体运动时葡萄糖利用和代谢的主要场所。葡萄糖转运是机体糖代谢的限速步骤,葡萄糖转运体(glucose transport, GLUTs)的功能状态是细胞摄取葡萄糖,调节糖代谢的关键。在目前已知的5种葡萄糖转运体中,骨骼肌组织中存在 GLUT-4和 GLUT-1两种^[2]。研究表明肌肉收缩或运动能够增加 GLUT-4转位和 GLUT-4的蛋白含量及其 mRNA 的表达,同时发现肌肉收缩是生理状态下调节骨骼肌细胞糖转运的主要因素^[3-5]。

缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)通过与靶基因结合,使机体产生一系列适应性反应。有研究显示适当的运动可导致 HIF-1 α 表达增加,并且其在运动诱导的骨骼肌生理性适应(如葡萄糖的摄取和利用增加等)中有重要的作用^[6-7]。目前有关 HIF-1 α 在运动训练中表达的相关研究不多;关于长期运动训练时 HIF-1 α 在骨骼肌中的表达及其与葡萄糖转运之间的关系报道较少。本研究模拟人的中等运动强度、时间、方式及频率^[8-9],选择运动时糖代谢的主要器官——骨骼肌为主要研究对象,观察中等强度运动对小鼠骨骼肌 VEGF-A、GLUT-1、GLUT-4 mRNA 表达的影响,在此基础上进一步观察运动对 HIF-1 α mRNA 表达的影响,初步探讨运动对小鼠骨骼肌葡萄糖转运的影响及其可能机制,为推广运动预防和延缓糖尿病的发生提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

SYBR Green PCR Super Mix-UDG、96孔光学

反应板、实时荧光定量PCR仪、2XRT Reaction Mix、RT Enzyme Mix、光学膜、ROX Reference Dye(美国 Applied Biosystems 公司), RT-PCR kit (Stratagene, LaJolla, CA), RNA Stat-60TM reagent Tel-Test (Inc, Friendswood, TX), ZH-PT 小鼠跑台(安徽淮北正华公司)。

1.2 动物分组及干预方法

24只健康雄性昆明小鼠,22—30g(由中南大学湘雅医学院动物实验中心提供)。随机分为对照组(12只)和运动组(12只)。

运动组根据文献^[4,23]提供的小鼠中等强度运动训练方法,采用小鼠跑台训练法,训练总时间为12周。具体运动方案如下:起始跑速 10m/min,时间 20min,跑台倾角 0°。隔日增加运动时间 10min;每周增加跑速 1m/min,跑台倾角增加 1°,直到跑速增至 15m/min,时间 60min,跑台倾角 6°。对照组除不进行运动干预外,余同运动组。

1.3 标本采集与处理

运动训练 12 周后,麻醉处死各组小鼠,取双侧腓肠肌,一侧装入冻存管,投入液氮过夜,次日转移至 -80℃ 冰箱保存;另一侧常规制片行光镜、电镜观察。

1.4 测定骨骼肌中 VEGF-A、GLUT-1、GLUT-4 及 HIF-1 α mRNA 的表达

采用实时-PCR法(相对定量法)测定骨骼肌中 VEGF-A、GLUT-1、GLUT-4 及 HIF-1 α mRNA 的表达,以 18s rRNA 为实时-PCR 相对定量的内参照。数值以 ΔC_T 进行校正, $\Delta C_T = C_{T\text{样本}} - C_{T\text{内参}}$ 。基因表达的相对变化用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算,

$$\Delta\Delta C_T = C_{T\text{运动组}} - C_{T\text{内参}} - (C_{T\text{对照}} - C_{T\text{内参}})$$

1.4.1 引物设计。引物设计根据基因库中查得小鼠目的基因 mRNA 序列,再通过 Premier 5 设计软件辅

助设计引物(见表1)。

1.4.2 实时-PCR检测。取肌肉组织提取总RNA并测定其含量、纯度后进行cDNA合成。按SYBR Green PCR Super Mix-UDG使用说明配制SYBR green I 实时-PCR 反应液、调整反应条件,将引物浓度配成5 μ mol/L。

1.5 统计学分析

所有数据和表用SPSS 11.5统计软件处理,数据以平均值 \pm 标准差表示,两样本均数比较采用独立样本t检验统计。P值<0.05为有显著性意义。

①SYBR green I 实时-PCR反应液组成如下:

SYBR Green PCR Super Mix-UDG	15 μ l
Forward primer 上游引物	0.5 μ l
Reverse primer 下游引物	0.5 μ l
cDNA	2.5 μ l
加DEPC处理水至	25 μ l

②SYBR green I 实时-PCR 反应液反应条件如下:

50 $^{\circ}$ C	2min	} \times 40 cycles
95 $^{\circ}$ C	2min	
95 $^{\circ}$ C	30s	
60 $^{\circ}$ C	30s	
72 $^{\circ}$ C	30s	

③测得CT 值并分析溶解曲线。

表1 引物设计表

	forward 上游	reverse 下游
HIF-1 α	CTCGCGAAGCAAAGACT	GCCATCTAGGGCTTTCAG
VEGF-A	AAGGAGAGCAGAAGTCCCATGA	CACAGGACGCTTGAAGATGT
GLUT-1	GGGCTGCCAGGTTCTAGTC	CCTCCGAGGTCCTTCTCA
GLUT-4	TATTTGGCTTTGTGGCCTTC	CGGCAAATACAAGGAAGACG
18s rRNA	TTCCGATAACGAACGAGACTCT	TGGCTGAACGCCACTTGTC

2 结果

2.1 一般情况观察及小鼠体重变化情况

运动训练前对照组及运动组小鼠形态正常,皮毛光亮。训练第5周开始,运动组小鼠较前进食增多,后肢较对照组小鼠明显发达。

运动训练后第10、20、30天,运动组较对照组小鼠体重无明显变化;运动训练后第40、50天,运动组平均体重较对照组有增长趋势,但无显著性意义(P>0.05);从第60天开始,运动组体重较对照组明显增加(P<0.05),见表2。

表2 两组小鼠体重变化情况

组别	例数	第10天	第20天	第30天	第40天	第50天	第60天	第70天	第80天	第90天
对照组	12	23.3 \pm 2.7	24.5 \pm 2.8	26.2 \pm 2.5	27.1 \pm 2.4	29.4 \pm 2.3	30.7 \pm 2.2	32.5 \pm 2.6	33.8 \pm 2.9	35.6 \pm 3.1
运动组	12	23.7 \pm 2.2	24.4 \pm 2.1	25.4 \pm 2.3	28.9 \pm 2.0	31.2 \pm 2.4	35.6 \pm 2.5 ^①	39.3 \pm 2.1 ^①	44.7 \pm 3.1 ^①	48.4 \pm 3.4 ^①

与对照组比较:①P<0.05

2.2 骨骼肌显微结构观察

光镜下可见:对照组肌细胞及肌纤维形态正常(图1);运动组与对照组相比肌细胞数目增加,肌纤维增粗(图2)。电镜下可见:对照组肌节结构正常,肌丝排列有序,细胞内线粒体丰富(图3);运动组较对照组肌丝丰富,排列紧密有序,肌原纤维的直径增加,细胞内线粒体数目增多,体积增大(图4)。

2.3 小鼠骨骼肌实时 PCR 检测结果

运动组小鼠较对照组小鼠骨骼肌HIF-1 α 、VEGF-A及GLUT-1、GLUT-4及mRNA表达(以百分数表示,以对照组为100%)明显增加(P分别<0.01,0.05,0.01,0.01),见表3。

表3 小鼠骨骼肌HIF-1 α 、VEGF-A及GLUT-1、GLUT-4 mRNA的相对表达 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

	对照组	运动组
HIF-1 α mRNA	100%	292% \pm 57% ^②
VEGF-A mRNA	100%	268% \pm 34% ^①
GLUT-1 mRNA	100%	214% \pm 37% ^②
GLUT-4 mRNA	100%	331% \pm 61% ^②

与对照组比较:①P<0.05;②P<0.01

3 讨论

本研究模拟人的中等运动强度、时间、方式及频率,根据Angelis等^[8-9]提供的小鼠运动训练方法,选择速度在5—20m/min之间,倾角为6 $^{\circ}$ (60%VO₂max—80%VO₂max)之间的跑台运动,运动时间为1h/次,运动频率为5d/周,做共计12周的运动训

图1 对照组骨骼肌细胞HE (×200)

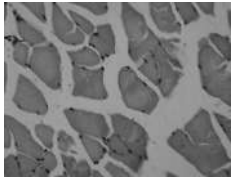


图2 运动组骨骼肌细胞HE (×200)

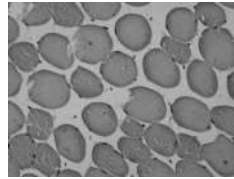
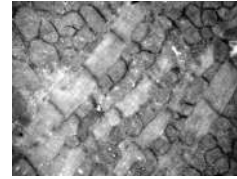


图3 对照组骨骼肌细胞 (×20000)



图4 运动组骨骼肌细胞 (×20000)



练干预,结果显示此方法安全、有效。

长期中等强度运动对人体各器官、系统的形态、结构和机能水平都会产生影响。大量研究也证实训练能提高人^[10]和动物^[11-12]骨骼肌 VEGF-A mRNA 水平。VEGF-A 参与骨骼肌运动适应性新生血管生成,这是骨骼肌对运动训练适应的一个关键,可使单位肌纤维毛细血管增加,从而增加氧及能量物质的输送^[13]。

骨骼肌是运动训练时全身利用葡萄糖最主要组织之一^[14]。研究发现,葡萄糖进入骨骼肌细胞须由细胞膜上的 GLUT 介导,此过程是糖代谢的主要限速步骤^[15]。骨骼肌细胞膜上有 GLUT-4 和 GLUT-1 两种 GLUTs。GLUT-4 是骨骼肌特异性的葡萄糖转运体,在骨骼肌的葡萄糖转运中发挥着重要作用。

大量研究发现运动能够增加 GLUT-4 蛋白含量和 mRNA 的表达。吴毅^[6]等发现,有规律的中等程度运动训练后,大鼠骨骼肌细胞中的 GLUT-4 mRNA 含量增加,高于非运动组大鼠。另有研究表明,7名男性久坐者经过7d的功率自行车运动后,骨骼肌 GLUT-4 蛋白含量增加2.8倍^[17]。

研究发现 GLUT-1 是基础代谢过程中在许多细胞中广泛表达的 GLUT。哺乳动物细胞在处于低氧分压、葡萄糖浓度低等代谢压力的情况下,通过 GLUT-1 摄入的葡萄糖将会急剧增加。这种适应性的反应使得细胞得以获得更多的能量,以供代谢之需^[18]。骨骼肌在运动时需要的葡萄糖大量增加,在通过 GLUT-4 转运的葡萄糖不能完全满足代谢的需要时, GLUT-1 的表达量增加,使细胞葡萄糖摄入增加^[19],增加骨骼肌葡萄糖的供给。Thorkil^[20]等通过对大鼠骨骼肌的研究显示,经11周游泳训练后,腓肠肌中 GLUT-1 mRNA 量比对照组增加1倍,提示长期运动训练能增加 GLUT-1 的基因转录。

本研究发现,经12周干预后,运动组小鼠骨骼

肌 VEGF-A mRNA 表达较对照组增加 268%。VEGF-A mRNA 表达增加可能促进毛细血管增生,从而使肌肉血流增多,以保证充足的葡萄糖供应;这与运动时葡萄糖转运及代谢增加相适应^[21]。上述变化表明骨骼肌对运动发生了良好的生理性适应。同时,运动组小鼠 GLUT-4、GLUT-1 mRNA 较对照组表达分别增加 231%和 114%,与上述研究结果基本一致,提示细胞内 GLUT-1、GLUT-4 基因转录增加,可能使骨骼肌转运葡萄糖的能力增加。这可能是运动影响骨骼肌葡萄糖转运的可能机制之一。

在运动过程中,由于能量的大量消耗、血液的重新分配及机体的氧消耗量迅速增加,超过了生理动员能力,就会造成骨骼肌等参与运动的组织或细胞内出现一个相对缺血、缺氧的环境,即负荷性的缺血、缺氧。长时间重复一定强度的运动会产生一种持续的刺激,作用于氧感受器,通过不同的低氧信号转导通路,使机体组织或细胞产生一系列的适应性变化^[22]。HIF-1 α 是组织细胞缺氧条件下的一个主要的调节因子,在组织、细胞处于缺血、缺氧状态时, HIF-1 α 通过诱导 GLUT-1、VEGF-A 等靶基因表达,继而增加葡萄糖的转运和糖酵解,有助于组织细胞对缺血、缺氧的耐受性^[23]。

编码 VEGF 的基因是 HIF-1 α 介导转录活化的一个靶基因,其在低氧组织中的表达通过 HIF-1 α 诱导, HIF-1 α 通过转录编码 VEGF 基因而刺激血管新生。有研究表明^[24],在低氧或低氧训练时, VEGF mRNA 水平的表达与 HIF-1 α mRNA 水平具有同步变化的关系。

已有研究证实: HIF-1 α mRNA 可以通过与 GLUT-1 的基因中的低氧反应元件(HRE)上的结合位点结合,诱导 GLUT-1 的转录、表达。Keith A^[21]等的研究表明,骨骼肌细胞供能方式从有氧转换到无氧时,为了维持代谢平衡,葡萄糖的转运也相应地增

加。其他研究证实 HIF-1 α 可以诱导 GLUT 表达增多^[25]。Reynolds 在大鼠的骨骼肌细胞中观察到低氧对 GLUT-4 的诱导作用^[26]。低氧刺激诱导葡萄糖的消耗增多,通过诱导 GLUT 表达和活性的增加,保证了糖代谢的速率。

本研究结果显示,经长期中等强度运动干预后,运动组小鼠骨骼肌 HIF-1 α mRNA 较对照组表达增加 192%。本研究同时也发现运动组小鼠骨骼肌 VEGF-A、GLUT-1、GLUT-4 mRNA 较对照组表达明显增加。推测其机制可能与 HIF-1 α mRNA 表达的上调相关,HIF-1 α mRNA 表达的上调可能使靶基因转录增加,VEGF-A、GLUT-1 的基因转录增加进而增加骨骼肌氧及能量物质的供应,增强骨骼肌的葡萄糖转运能力,这可能是运动增强骨骼肌的葡萄糖转运的重要机制之一,但其确切关系尚不清楚,有待进一步阐明。

本研究结果提示,长期中等强度运动引起骨骼肌肌纤维增粗、线粒体数目增加及 VEGF、GLUT-1、GLUT-4 mRNA 表达增加,增强了葡萄糖的转运能力,其机制可能与骨骼肌中 HIF-1 α mRNA 表达上调有关;为临床推广运动预防和延缓糖尿病的发生、发展提供了分子生物学的依据,同时有可能为糖尿病的治疗寻找出新的靶点。

参考文献

[1] Bunt JC, Salbe AD, Harper IT, et al. Weight, adiposity, and physical activity as determinants of an insulin sensitivity index in pima Indian children[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(9): 2524—2530.

[2] 于洪旭.葡萄糖转运蛋白的新进展[J].*临床和实验医学杂志*, 2007,6(8):155—157.

[3] Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor-1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5—6):993—998.

[4] Barnes K, Ingram JC, Porras OH, et al. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK) [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt11):2433—2442.

[5] 李永春.糖尿病大鼠骨骼肌细胞膜葡萄糖转运蛋白 4 含量在不同强度运动状态下的变化[J].*中国组织工程研究与临床康复*, 2008,12(20):3926—3929.

[6] 余斌.低氧及运动对骨骼肌中低氧诱导因子影响的实验研究[D].广州:第一军医大学,2005.

[7] 张幸.不同运动强度对大鼠骨骼肌中低氧诱导因子-1 α mRNA 表达的影响[D].广州:第一军医大学,2006.

[8] De Angelis K, Wichi RB, Jesus WR, et al. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice[J]. *J Appl Physiol*, 2004, 96(6):2174—2178.

[9] Desai KH, Sato R, Schauble E, et al. Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(2Pt2): H1053—1061.

[10] Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, et al. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle[J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(2Pt2):H679—685.

[11] 赵鹏,路瑛丽,冯连世.低氧训练对大鼠骨骼肌 VEGF mRNA 表达及毛细血管密度的影响[J].*中国运动医学杂志*,2009,28(2): 131—136.

[12] 郑澜,陆爱云,周志宏.低氧训练对大鼠骨骼肌缺氧诱导因子-1 α 蛋白和血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响[J].*中国运动医学杂志*,2005,24(4):424—429.

[13] Fink RI, Wallace P, Brechtel G, et al. Evidence that glucose transport is rate-limiting for in vivo glucose uptake[J]. *Metabolism*, 1992, 41(8):897—902.

[14] 陆彩凤,王维群.血管内皮细胞生长因子与运动[J].*四川体育科学*,2007,12(4):64—69.

[15] 蒋仲伟,蒋文攻.骨骼肌葡萄糖转运的运动性适应信号机制[J].*中国组织工程研究与临床康复*,2009,13(2):388—391.

[16] 吴毅,李益明.耐力运动对大鼠骨骼肌葡萄糖载体基因表达的调节作用[J].*中国康复医学杂志*,1997,12(4):149—153.

[17] Houmard JA, Hickey MS, Tyndall GL, et al. Seven days of exercise increase GLUT-4 protein content in human skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol*, 1995, 79(6):1936—1938.

[18] Barnes K, Ingram JC, Porras OH, et al. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK) [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt11):2433—2442.

[19] Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia[J]. *J Appl Physiol*, 2000, 88(4):1474—1480.

[20] Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen O, et al. Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle[J]. *Am J Physiol*, 1990, 259(6Pt1):E778—786.

[21] 吴红艳,向明珠.运动与型糖尿病的预防和治疗[J].*中国医学文摘*,2001,22(6):80—84.

[22] Lin Z, Weinberg JM, Malhotra R, et al. GLUT-1 reduces hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 278(5):E958—966.

[23] Vogt M, Puntschart A, Geiser J, et al. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 91(1):173—182.

[24] Webster KA. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia[J]. *J Exp Bio*, 2006, 206 (Pt17):2911—2922.

[25] Klitgaard H, Bergman O, Betto R, et al. Co-existence of myosin heavy chain I and IIa isoforms in human skeletal muscle fibers with endurance training[J]. *Pflugers Arch*, 1990, 416(4):470—472.

[26] Reynolds TH 4th, Brozinick JT Jr, Rogers MA, et al. Mechanism of hypoxia-stimulated glucose transport in rat skeletal muscle: potential role of glycogen[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(5Pt1):E773—778.