

[文章编号] 1007-3949(2007)15-01-0027-04

• 实验研究 •

运动对高脂血症大鼠骨骼肌过氧化体增殖物 激活型受体 γ 辅激活因子 1 表达的影响

刘聪¹, 陈威¹, 李莉¹, 李玲¹, 韩萍¹, 刘国良²

(中国医科大学 1. 附属第二医院内分泌科; 2. 附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 内科学; 大鼠; 高脂血症; 过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1; 糖耐量异常; 动脉粥样硬化; 骨骼肌

[摘要] 目的 通过研究高脂血症大鼠运动后骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 的变化, 探讨过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 在运动改善大鼠能量代谢中的作用。方法 将 26 只大鼠分为 3 组, 正常对照组 9 只, 高脂膳食组(高脂组)9 只, 高脂膳食+ 60 min 运动组(运动组)8 只。测定各组骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 基因和蛋白表达的变化。结果 高脂组甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇较对照组显著升高($P < 0.05$); 运动组甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇较高脂组显著降低($P < 0.05$), 高密度脂蛋白胆固醇较高脂组显著升高($P < 0.05$)。与对照组比较, 运动组大鼠骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 mRNA 表达显著增高($P < 0.01$); 与高脂组大鼠比较, 运动组大鼠骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 mRNA 表达显著增高($P < 0.05$)。运动组骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 蛋白表达较对照组增加了 2.14 倍($P < 0.05$), 较高脂组增加了 2.02 倍($P < 0.05$)。结论 运动能够通过过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 改善骨骼肌的能量代谢, 从而改善机体的脂质代谢, 防止糖代谢异常和动脉粥样硬化的发生。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Exercise on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 Expression in Rat Skeletal Muscle

LIU Cong, CHEN Wei, LI Li, LI Ling, HAN Ping, and LIU Guo-Liang

(Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Rat; Hyperlipidemia; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1; Impaired Glucose Tolerance; Atherosclerosis; Skeletal Muscle

[ABSTRACT] **Aim** To observe the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 (PGC-1) expression in rat skeletal muscle after the low-intensity swimming exercise, and to determine whether the PGC-1 is involved in the regulation of rat energy metabolism. **Methods** 26 Wistar rats were divided into 3 groups: 9 in control group, 9 in high-fat feeding group and 8 in swimming exercise following high-fat feeding group (exercise group). PGC-1 mRNA expressions were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with control group, serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) levels were elevated in high-fat feeding group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); Compared with high-fat feeding group, serum TG, TC and LDLC levels were decreased ($P < 0.05$), while high-density lipoprotein cholesterol (HDL) was increased in exercise group ($P < 0.05$). Low-intensity of swimming induced a significantly elevated expression of PGC-1 mRNA in rat skeletal muscle, compared with the control rats ($P < 0.01$) and high-fat feeding rats ($P < 0.05$). PGC-1 protein was also elevated in swimming rats than those in control and high-fat feeding rats ($P < 0.05$).

Conclusion Exercise training improved the energy metabolisms of skeletal muscles via PGC-1 in rats, and thus may altered the hyperlipidemia as well as the course of atherosclerosis.

血脂代谢异常、肥胖及胰岛素抵抗与糖耐量异常和 2 型糖尿病及并发症密切相关。研究表明, 运动能改善骨骼肌胰岛素敏感性, 降低胰岛素抵抗, 因

而运动作为糖尿病治疗的基础, 对于血糖控制和预防并发症起关键作用。运动能够减轻体重, 同时, 运动也能改善血脂异常。然而, 运动引起骨骼肌胰岛素敏感性增加及改善血糖血脂异常的分子机制尚不清楚。本文通过建立高脂血症大鼠模型, 并在高脂血症形成和发展过程中施予有氧运动, 研究高脂血症发生发展中以及运动后骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 (peroxisome proliferator-acti-

[收稿日期] 2006-09-14 [修回日期] 2007-01-06

[基金项目] 辽宁省教育厅 B 类项目 (202010795)

[作者简介] 刘聪, 博士, 副教授, 研究方向为糖尿病遗传学及分子生物学, E-mail 为 liucongjp@yahoo.com。韩萍, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为糖尿病及胰岛素抵抗分子生物学。刘国良, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为糖尿病病因学。

vated receptor- γ coactivator-1, PGC-1) 的变化^[1], 旨在探讨 PGC-1 在运动引起骨骼肌胰岛素敏感性增加及改善血脂异常中的作用, 为有氧运动预防和改善糖代谢异常和动脉粥样硬化提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及饲养

雄性 Wistar 大鼠 26 只(为同一批繁殖, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司), 7~8 周龄, 体重 200~240 g, SPF 级。适应性喂养 1 周, 随机分三组: 正常对照组 9 只; 高脂膳食组(高脂组) 9 只; 高脂膳食+60 min 运动组(运动组) 8 只。对照组饲喂国家标准固定混合饲料, 高脂组和运动组饲喂高脂膳食。分笼饲养, 自由取食、饮水。动物室温 22~25℃, 相对湿度 40%~50%, 昼夜节律为自然节律。

1.2 动脉粥样硬化动物模型的复制

三组大鼠均以维生素 D3 70 万 u/kg 灌胃, 分 3 天灌完, 然后喂以正常饮食(含 4% 脂肪、24% 蛋白和 4.5% 粗纤维)。高脂组和运动组给予高脂膳食 8 周。高脂膳食配方: 标准饲料中添加 1% 胆固醇, 0.30% 胆酸钠, 5.5% 猪油, 0.61% 丙基硫氧嘧啶。

1.3 运动方案

高脂组和对照组大鼠自由活动。运动组大鼠采用无负重游泳, 游泳在 100 cm×70 cm×90 cm 的玻璃钢水池中进行, 水深 60 cm, 约为大鼠身长 2 倍以上, 水温(33±1)℃。每周进行 6 天游泳训练, 周日休息。适应性训练 1 周, 每次运动时间从最初的 10 min/d, 1 周内逐渐增至 60 min/d, 持续 2 周。游泳每天在 8 点到 12 点之间进行。

1.4 标本的收集与处理

最后一次游泳后, 所有动物禁食 12 h 后, 腹腔注射 10% 水合氯醛(4 mL/kg) 麻醉动物, 腹主动脉取血法采血。取骨骼肌用冷生理盐水冲洗, 滤纸吸干。锡箔纸包装, 置于液氮中保存待测。同时分离血清。

1.5 血脂的测定

采用日本 HITACHI 日立 7600-020 全自动生化分析仪测定血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)的含量及空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)。

1.6 过氧化物增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 mRNA 的半定量检测

采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription

polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术, 以 β -actin 作内参照。 β -actin 引物序列为: 上游引物 5'-GAT TGC CTC AGG ACA TTT CTG-3', 下游引物 5'-GAT TGC TCA GGA CAT TTC TG-3', 扩增产物为 690 bp; 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.6.1 骨骼肌总 RNA 提取 RNA 采用 Invitrogen™ 公司的 TRIZOL RNA 试剂盒提取, 严格按说明书进行操作。

1.6.2 引物设计 从 GenBank 中检索出大鼠 PGC-1 基因的 cDNA 序列, 根据其 cDNA 序列及 PCR 引物的设计原则, 采用计算机软件 Primer 5.0 版设计引物。PGC-1 引物序列: 上游引物 5'-CGC ACA ACT CAG CAA GTC CTC-3', 下游引物 5'-CCT TGC TGG CCT CCA AAG TCT G-3', 扩增产物为 263 bp。

1.6.3 逆转录反应 20 μ L 反应混合物中含总 RNA 1 μ g, 2×逆转录缓冲液 10 μ L, dNTP(各 10 mmol/L) 2 μ L, oligo(dT)₁₅(50 μ mol) 1 μ L (Promega), 逆转录酶(AMV) (2.2×10⁷ U/L) 1 μ L (Gibco), RNase-Inhibitor (4×10⁷ U/L) 0.5 μ L, MgSO₄ (25 mmol/L) 4 μ L, 加灭菌纯水至 20 μ L 体积。反应混合物 42℃反应 60 min, 然后 99℃反应 5 min 以灭活 AMV, 产物可用作 PCR。

1.6.4 聚合酶链反应 50 μ L 反应混合物中含 cDNA 6 μ L, 10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺) 10 μ L, dNTP(各 10 mmol/L) 4 μ L, β -actin 引物(含上、下游引物, 终浓度 20~25 pmol/L) 2.0 μ L, PGC-1 引物(含上、下游引物, 终浓度 20~25 pmol/L) 2.0 μ L, Taq(5×10⁶ U/L) 酶(Gibco) 0.4 μ L, 加灭菌纯水至 50 μ L, 置 Biometra (TGRADIENT) 热循环仪中进行反应。反应参数: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 45 s→55℃退火 60 s→72℃延伸 60 s, 共 35 个循环。最后 72℃延伸 7 min, 终止反应。

1.6.5 聚合酶链反应产物的定量 PCR 产物 10 μ L 置 2% 琼脂糖(含 20 g/L 溴乙锭)电泳, 对电泳带进行密度扫描, 存入计算机 1Dkodak 成像分析系统, 以 PGC-1/ β -actin 比值代表 PGC-1 mRNA 表达量。

1.7 骨骼肌过氧化物增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 蛋白的表达

采用 Western blotting 方法测定, 取保存的各组动物骨骼肌组织 100 mg, 提取细胞膜蛋白, Lowry 法蛋白定量, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印于聚亚乙烯双氟化膜, 先后加入一抗及二抗, 一抗采用兔抗小鼠的 PGC-1 多克隆抗体(购自美国 CHEMICON 生物工程公司), 显色至条带呈现, 采用 GIS-700D 数码凝胶图像处理系统扫描分析结果。

1.8 统计学分析

使用 SPSS11.5 For Windows 统计软件对数据行方差分析。统计值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

经过 8 周饲养后, 对照组大鼠精神佳, 饮食良好, 反应敏捷, 皮毛光滑。高脂组大鼠精神欠佳, 饮食尚可, 反应尚可, 皮毛欠光滑。运动组大鼠一般情况优于高脂组(表 1)。

2.2 血脂及血糖的改变

高脂组 TG、TC 和 LDLC 较对照组显著升高 ($P < 0.05$), HDLC 与对照组差异无显著性 ($P > 0.05$); 运动组 TC、TG 和 LDLC 较高脂组显著降低 ($P < 0.05$), HDLC 较高脂组显著升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 高脂组及运动组空腹血糖水平无显著变化(表 1)。

表 1. 各组大鼠一般资料 ($\bar{x} \pm s$)

一般情况	对照组	高脂组	运动组
体重增加 (g)	108.35 ± 24.09	53.77 ± 25.86 ^b	56.52 ± 26.53 ^b
FBG (mmol/L)	4.69 ± 1.17	6.08 ± 1.48	5.06 ± 1.81
TG (mmol/L)	0.73 ± 0.32	1.61 ± 1.11 ^a	0.68 ± 0.35 ^c
TC (mmol/L)	1.86 ± 1.20	3.98 ± 2.05 ^a	2.04 ± 1.32 ^c
LDLC (mmol/L)	0.64 ± 0.46	1.57 ± 0.93 ^b	0.67 ± 0.36 ^c
HDLC (mmol/L)	1.01 ± 0.55	0.55 ± 0.39	1.04 ± 0.47 ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与高脂组比较。

2.3 大鼠骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1mRNA 表达水平

运动组大鼠骨骼肌 PGC-1 mRNA (灰度值为 171.92 ± 57.76) 表达较对照组(灰度值为 109.15 ± 21.82 , $P < 0.01$) 和高脂组(灰度值为 117.17 ± 37.80 , $P < 0.05$) 显著增高(图 1)。

2.4 各组大鼠骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 蛋白表达

运动组骨骼肌 PGC-1 蛋白表达较对照组增加了 2.14 倍 ($P < 0.05$), 较高脂组增加了 2.02 倍 ($P < 0.05$, 图 2)。

3 讨论

实验表明, 给大鼠喂食胆固醇可引起高脂血症、

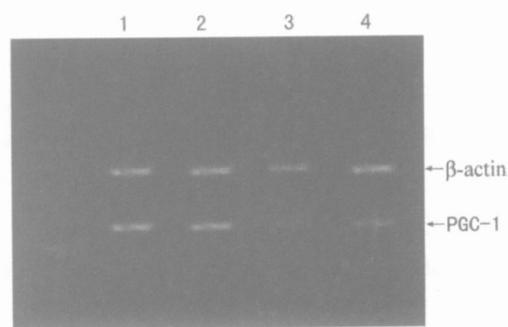


图 1. 大鼠骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1mRNA 表达 1、2 为运动组, 3 为对照组, 4 为高脂组。

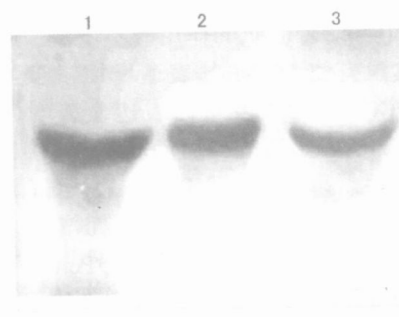


图 2. 大鼠骨骼肌过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 蛋白表达 1 为运动组, 2 为对照组, 3 为高脂组。

损伤血管内皮, 并导致动脉粥样硬化^[2]。由于大鼠无胆囊, 对胆固醇等脂质吸收少, 单纯的高胆固醇饲料很难诱导大鼠高脂血症和动脉粥样硬化的形成。为保证大鼠能够较多地吸收摄入的胆固醇, 于饲料中添加一定比例的胆酸钠, 能显著增加大鼠小肠对胆固醇的吸收量。同时加入一定比例的丙基硫氧嘧啶, 可抑制甲状腺功能, 减少对胆固醇的代谢, 保证血清胆固醇含量升高。另在饲料中添加一定比例的猪油, 以促进高脂血症和动脉粥样硬化形成的可能性和速度。本实验给大鼠喂食高脂膳食后, 其 TG、TC 和 LDLC 水平高于对照组, 符合高脂血症的诊断, 可用于高脂血症的研究。

高脂血症与动脉粥样硬化密切相关, 是 2 型糖尿病及并发症的危险因素, 也是心脑血管疾病的危险因素。研究表明, 运动和体力活动对血清脂质和脂蛋白含量均有积极作用^[3]。本研究结果表明, 运动后大鼠 TG、TC 和 LDLC 水平显著降低, 而 HDLC 水平显著升高, 提示有氧运动对高脂血症的发生发展有显著的预防和减轻病变程度作用。

研究表明, 长时间的肌肉收缩运动能增加线粒体的生成, 并能增加线粒体蛋白, 包括细胞色素 C、F1-ATP 酶的 β 亚基和细胞色素氧化酶, 转录因子如

肌原细胞决定因子和肌细胞生成素的表达^[4,5]。然而,运动引起的骨骼肌线粒体和转录因子的这种变化的分子机制尚不完全清楚,可能与 PGC-1 有关。

过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 (PGC-1) 是新近发现的一种过氧化体增殖物受体 γ 及其它核受体家族基因转录的共同作用因子。PGC-1 mRNA 主要表达于需要高能量和线粒体丰富的组织,如心脏、骨骼肌、棕色脂肪、肾、肝以及脑中^[1,6]。它对机体的能量代谢起关键调节作用,是调节能量代谢基因的辅转录激活物。在线粒体脂肪酸 β -氧化酶基因的转录调控中,它起着重要的作用^[7]。

研究表明,高脂膳食可诱导大鼠肝脏 PGC-1 表达增加,但其对骨骼肌的作用尚不清楚。本研究中,高脂膳食没有使 PGC-1 的表达增加,但运动后大鼠骨骼肌 PGC-1 mRNA 及蛋白表达显著增加,运动后 PGC-1 增加的原因可能与运动对 β -肾上腺素能受体的激活有关^[8]。而骨骼肌 PGC-1 表达的增加对机体能量代谢调节的结果是使能量消耗增加,血脂水平下降。PGC-1 的作用机制包括: Pere 等^[9]研究表明,PGC-1 能通过诱导解偶联蛋白 2 和调节核呼吸因子 1 和 2 (nuclear respirator factor-1 and 2, NRF-1, NRF-2) 的表达,使线粒体呼吸链中细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome C oxidase, COX)、 β -ATP 合成酶及线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, mtTFA), 而刺激骨骼肌线粒体和心脏线粒体的生成,影响线粒体功能,增加线粒体呼吸。④体外实验中,当 PGC-1 表达于骨骼肌 C2C12 细胞上时,刺激线粒体 DNA 复制,增加细胞氧耗量。⑤骨骼肌 iv 型肌纤维(慢肌纤维)含较多线粒体,氧化代谢率较高。Lin 等^[10]研究发现,PGC-1 是 iv 型肌纤维的生理性调节因子,当 PGC-1 在富含 I 型肌纤维(快肌纤维)的肌肉里表达升高时,PGC-1 使肌肉形态、基因及功能发生变化,使快肌纤维转变为慢肌纤维。PGC-1 促进肌肉类型的转变有助于防止肥胖及糖尿病的发生。

过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 (PGC-1) 对糖代谢的影响比较复杂。研究表明,在肝脏,PGC-1 表达的增高能促进肝糖异生,从而使血糖增高。而在骨骼肌,PGC-1 可强烈诱导骨骼肌细胞内源性葡萄糖转运子 4 (glucose transporter 4, GLUT4)

的表达^[11]。本研究中,高脂组血糖为 6.08 ± 1.48 mmol/L,虽与正常对照组无统计学差异,但已符合糖耐量异常的临床诊断,说明高脂膳食在导致高脂血症的同时,也促进了大鼠糖代谢异常的发生。再次证明糖代谢紊乱与血脂异常密切相关。

本研究中,运动后大鼠血糖下降,因为运动能改善骨骼肌胰岛素敏感性,降低胰岛素抵抗,因而运动作为糖耐量异常和糖尿病治疗的基础,对于血糖控制和预防并发症起关键作用。运动改善胰岛素敏感性的机制除与其能增加能量消耗,使胰岛素刺激的骨骼肌葡萄糖摄取和代谢增加外,还可能与 PGC-1 诱导的 GLUT4 含量增高有关。

综上所述,运动能够通过 PGC-1 改善骨骼肌能量代谢状况,从而改善脂质代谢,同时有氧运动能防止糖代谢异常和动脉粥样硬化的发生。

[参考文献]

- [1] Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease [J]. *J Clin Invest*, 2006, **116** (3): 615-622.
- [2] 温进坤, 韩梅, 杜玮南, 高社军. 一种快速建立大鼠动脉粥样硬化模型的实验方法[J]. *中国老年学杂志*, 2001, **21** (1): 50-52.
- [3] Peter W, Grandjean, Crouse SF, James Rohack. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise [J]. *J Appl Physiol*, 2000, **89**: 472-480.
- [4] Hood DA, Takahashi M, Connor MK, Freyssen D. Assembly of the cellular powerhouse: current issue in muscle mitochondrial biogenesis [J]. *Exerc Sports Sci Rev*, 2000, **28**: 68-73.
- [5] David AH. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle: invited review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol*, 2001, **90**: 1 137-157.
- [6] Master SR, Hartman JL, Celina M, D' Cruz. Functional microarray analysis of mammary organogenesis reveals a developmental role in adaptive thermogenesis [J]. *Mol Endocrinol*, 2002, **16** (6): 1 185-203.
- [7] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adlment G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. *Cell*, 1999, **98** (1): 115-124.
- [8] Boss O, Bachman E, Vidal-Puig A, Zhang CY, Peroni O, Lowell BB. Role of the β_3 -adrenergic receptor and/or a putative β_4 -adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **261** (3): 870-876.
- [9] Pere Puigserver, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (pgc-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator [J]. *Endo Rev*, 2003, **24** (1): 78-90.
- [10] Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres [J]. *Nature*, 2002, **418** (6899): 797-801.
- [11] Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (7): 3 820-825.

(此文编辑 许雪梅)