

· 基础研究 ·

太极拳运动对老年人骨骼肌全基因组表达的影响

柯杰兵^{1,2} 马文丽^{1,4} 钟梅³ 姜立¹ 林建棣² 郑文岭¹

摘要 目的:研究太极拳运动对骨骼肌全基因组表达的影响及太极拳促进健康的分子机制。方法:6 名健康的老年人(65.5±8.9 岁)参加了为期 12 周的太极拳训练。在训练前后分别对实验对象进行肌活检,提取总 RNA,经处理后与 Affymetrix U133A 基因芯片进行杂交,分析数据。结果:太极拳运动使老年人骨骼肌全基因组表达发生明显改变,筛选出 725 条表达有差异的基因。本文对表达差异最显著的 20 条差异表达基因进行研究(3 条基因表达上调,17 条基因表达下调)。根据基因功能分类对比,差异表达基因分别归属 8 种细胞组分和生物过程,经 KEGG 搜索找到 4 条基因的代谢途径。结论:太极拳运动有助保持神经系统的灵敏性,提高反应能力,有助于抗衰老和减肥等,而不利于骨骼肌蛋白质的合成。

关键词 BRB 阵列工具;KEGG 搜索;基因表达;数据挖掘;太极拳

中图分类号:R455,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-04-0306-04

Global gene expression in human skeletal muscle of the elderly person influenced by Tai Chi Chuan training/KE Jiebing,MA Wenli,ZHONG Mei,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007,22(4): 306—309

Abstract Objective: In order to evaluate the effect of Tai Chi Chuan (TCC; shadow boxing) on global gene expression in human skeletal muscle and study the molecular mechanism in improving fitness by TCC. **Method:** Six health elderly men (65.5±8.9yr of age) participated TCC training for 12 weeks. Needle biopsies were obtained from the skeletal muscle before and after the training course. RNA extracted from the samples was hybridized to Affymetrix U133A platform and analyzed the gene expression data. **Result:** TCC training improved the overall physical fitness. Number of genes that passed filtering criteria were 725. The most differently expressed genes were selected in which there were 3 genes upregulated and 17 genes downregulated. According to GO Annotations, the differential genes were classified into 8 GO categories concerning Cellular Component Biological Process, KEGG Searching found 4 genes metabolism pathway. **Conclusion:** Systematic TCC training can upregulate expression of genes concerning energy metabolism and downregulate expression of genes concerning protein metabolism. TCC is good at protect human nerves sphingolipid integrity, which is perhaps the main reason for anti-aging, but it isn't beneficial for protein synthesis.

Author's address Institute of Gene Engineering, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515

Key words BRB array tools; KEGG searching; gene expression; data mining; Tai Chi Chuan

太极拳(Tai Chi Chuan, TCC)是一种传统的中国健身操,是一种中等强度的有氧运动,在中国老年人健身运动中十分普及。很多实验都已证明:这种运动对身体健康有好处,经常参加太极拳运动的人在应急条件下,其体位的稳定性表现出更多的优势,尤其对心肺功能的提高有较好的效果^[1]。但到目前为止,很少有人研究这种运动方式是如何影响人全基因组表达的。

本课题研究目的就是试探着在这方面有所突破。我们用 BRB 阵列工具(BRB-array tools)和 KEGG 搜索的方法,对基因芯片数据进行挖掘^[2],试图阐释太极拳运动促进老年人健康的分子机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

6 名来自某部队干休所的很少运动的健康老年人(65.5±8.9 岁)参加了本课题的研究,其基本情况见表 1。实验对象不吸烟,无各类疾病,排除了因疾病而影响其基因表达的各种因素。“很少运动”在本实验中界定为:每周不超过一次体育锻炼。本研究要求所有受试者在实验过程中不能服用任何药物或额外的营养补充品。在完成这些工作之后,所有受试者都接受统一饮食,按有计划的食谱进行实验。按计划

1 南方医科大学基因工程研究所,广州,510515

2 中国人民解放军军事体育进修学院军事体育理论教研室

3 南方医科大学附属南方医院

4 通讯作者:马文丽(南方医科大学基因工程研究所,广州,510515)

作者简介:柯杰兵,男,博士研究生

收稿日期:2007-01-10

食谱控制饮食 2 周后, 抽取实验组织样品, 再按计划正式开始运动实验。

1.2 体质锻炼效果评估

在运动实验前和运动 12 周后, 所有受试都进行了体质评估。测试指标包括身高(Ht)、体重(Wt)、肺活量(LV)、哈佛台阶实验(HIS)、最大摄氧量(VO_{2max}), 由北京华夏汇海科技有限公司提供全套体质测试器材进行以上指标的测试评估(表 1)。

1.3 训练计划

受试者每天打 24 式太极拳 1 次, 时间在下午 16—18 点, 每次运动 40min 以上, 持续 12 周。

1.4 肌肉活检

在实施锻炼计划之前及训练计划全部结束 48h 后的晨起安静状态下, 用活检针(规格: 14Ga.TW*6)采集受试者左腿股外肌活组织。采集之前, 用 2% 的利多卡因对活检部位进行麻醉, 每个受试者采集 100mg 肌组织样品, 分成两份(备用), 立即用液氮冷冻, 冷藏于 -80°C 的冰箱中。

1.5 总 RNA 的提取

采用 Qiagen 公司提供的 RNeasy 微型试剂盒提取总 RNA, 随机抽取一个样本的 RNA, 用安捷伦公司提供的 Agilent 2100 生物分析仪分析 RNA 的质量。从每一份样品中抽取 1 μl RNA, 用 Beckman 公司提供的 DU530 紫外分光光度计分析 RNA 的浓度, 分别检测 OD 值 (260/280)。其余的 RNA 用 DEPC 处理水保存。

1.6 cRNA 合成与标记准备及基因芯片杂交

按照 Affymetrix 基因表达实验操作规范和提供的配套试剂盒对芯片杂交前样品进行处理, 先合成 cDNA, 再合成 cRNA 并进行标记, 按 Affimatrix 芯片杂交试剂盒与 Human U133A Affymetrix 基因芯片进行杂交、洗片、烘干, 最后置于 G2500A 型基因芯片扫描仪进行扫描, 获取杂交图像, 分析数据。

1.7 数据挖掘

1.7.1 分类对比:分类对比分析是 BRB Array Tools 软件系统中的一种对基因芯片数据进行分析的主要方法, 采用随机变量 t 检验来确定差异表达基因所属的功能类别。

1.7.2 基因功能分类:BRB-Array Tools 中有一种分析方法叫做基因功能分类对比 (gene ontology comparison)^[3-4]。以线性排列(least squares, LS)和峰态筛选(kolmogorov-smirnov, KS)的方法选取表达差异的基因, 最后根据各基因在 GO 术语中的注释情况进行基因功能分类。

1.7.3 聚类分析:聚类分析法是目前使用得较多的

一种方法。本文采用了系统聚类中的最短距离法进行双向分层聚类。在用户确定好参数后, BRB 阵列工具可以自动进行聚类分析, 并给出双向聚类图。

1.7.4 KEGG 搜索:1995 年 5 月日本科学家建立了京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)。KEGG 数据库网址: <http://www.genome.jp/kegg>。本研究采用了 KEGG Searching 模块对所有差异表达基因进行了代谢途径分析。

1.8 RT-PCR 验证部分差异表达基因

总 RNA 逆转录成为 cDNA 第一链, 再用半定量 RT-PCR 验证部分差异表达基因。取两组 PCR 产物 5 μl , 用 1% 或 2% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭)电泳进行鉴定, 经 UV 分析仪分析结果。

2 结果

2.1 太极拳对体质变化的影响

有规律系统的太极拳运动对体质健康有积极影响。体重下降了 8%, 肺活量提高了 5.6%, 哈佛台阶指数提高了 21.1%, 最大摄氧量增加了 31.8%, 这些变化均有显著性意义($P < 0.01$, 见表 1)。其中肺活量、台阶指数、最大摄氧量(VO_{2max})均为心肺功能评价指标, 可见太极拳运动可明显改善老年人心肺功能, 同时有一定降低体脂功效。

2.2 样品提取 RNA 的质量控制

随机抽取 6 组样品中的一组, 采用 Beckman 紫外分光光度计和 Agilent 2100 生物分析仪分别对两组样品中提取的总 RNA 进行定量定性分析, 结果显示两种方法所得到的 RNA 质量和数量是一致的。训练前随机抽取样品的 RNA 浓度为 1.1325 $\text{g}/\mu\text{l}$, A260/A280 为 1.925。转染组样品的 RNA 浓度 1.1056 $\text{g}/\mu\text{l}$, A260/A280 为 1.978。

2.3 分类对比结果

训练前后骨骼肌中差异表达基因的筛选。根据表 1 中的设计, 将训练前和训练后两类样本进行分类对比分析, 参与随机变量估计的基因数为 22283; 通过滤除标准的基因数为 725; 单变量检验的类型为双尾 t 检验(采用随机变量模型)。利用 P 值作为参数来评价两组间基因表达差异显著性。表 2 中所列的为 20 条基因表达差异显著性水平均为 $P \leq 0.001$ 。

2.4 聚类分析的结果

将 20 条差异表达基因人为分为三类。采用双向分层聚类的方法对样本和基因分别进行聚类。样本分为两类, 即训练前被聚为一类, 训练后被聚为一类, 其距离完全符合实验设计。20 条基因如果被看

表1 实验对象基本情况及太极拳训练前后体质效果评估结果

样本编号	基因芯片数据编号		年龄(岁)	身高 ^① (cm)	体重(kg) ^②		肺活量(ml) ^②		台阶指数 ^②		VO ₂ max(L·min ⁻¹) ^②	
	训练前	训练后			训练前	训练后	训练前	训练后	训练前	训练后	训练前	训练后
01	Exp01pre	Exp01post	55	176	86	75	3400	3600	55	65	1.91	2.13
02	Exp02pre	Exp02post	56	172	74	68	3600	3800	51	63	1.45	1.94
03	Exp03pre	Exp03post	65	170	73	69	3300	3400	56	64	1.52	1.98
04	Exp04pre	Exp04post	66	171	75	71	3500	3800	54	66	1.43	2.25
05	Exp05pre	Exp05post	75	164	73	66	3000	3200	50	59	1.49	1.84
06	Exp06pre	Exp06post	76	165	69	65	2900	3000	48	58	1.69	1.96
$\bar{x}\pm s$			65.5±8.9	169.7±4.5	75±5.8	69±3.6	3283±279	3467±327	52±3.1	63±3.4	1.58±0.19	2.08±0.15

①实验前后,身高没有显著变化;②体重、肺活量、台阶指数和最大摄氧量都有显著变化($P<0.01$)。

表2 太极拳运动前后差异表达基因及其描述

基因	P 值	探针号	基因符号	基因描述
1	0.00001	200653_s_at	CALM1	钙调节蛋白(磷酸化激酶)
2	0.00005	222043_at	CLU	丛生蛋白
3	0.00006	213068_at	DPT	肾上腺皮质激素
4	0.00006	221748_s_at	TNS1	张力蛋白
5	0.00008	208942_s_at	TLOC1	转运蛋白 1
6	0.00013	203766_s_at	LMOD1	平滑肌瘤诱发因子
7	0.00017	214722_at	NOTCH2NL	切迹同系物 2
8	0.00019	221648_s_at	C1orf121	染色体 1 开放阅读框 121
9	0.00020	200793_s_at	ACO2	顺乌头酸酶 2
10	0.00020	201812_s_at	TOMM7//LOC201725	线粒体外膜移位酶 7 同系物//假定蛋白 LOC
11	0.00025	222024_s_at	AKAP13	激酶锚定蛋白 13
12	0.00034	208791_at	CLU	丛生蛋白
13	0.00050	219599_at	PRO1843	假定蛋白 PRO1843
14	0.00055	200834_s_at	RPS21	核糖体蛋白 S21
15	0.00061	209249_s_at	GHITM	生长激素诱导跨膜蛋白
16	0.00061	213619_at	HNRPH1	不均一核糖核酸核内核糖核蛋白 H1(H)
17	0.00064	207585_s_at	RPL36AL	核糖体蛋白 L36a-like
18	0.00068	217767_at	C3	补体成分 3
19	0.00074	203394_s_at	HES1	断裂多毛强化因子 1
20	0.00076	202236_s_at	SLC16A1	溶解物载体家族 16 (一元羧酸运载体)

成三类。可以发现 SLC16A1、ACO₂ 和 GHITM 三条基因表达上调,且被聚为一类,说明这 3 条基因具有相同的表达模式。另外 17 条基因表达下调,可进一步看成两类,LMOD1、CLU1、CLU2 三条基因具有相同的表达模式,而 HES1、PRO1843、RPS21、RPL36AL、TOMM7、LOC201725、TNS1、HNRPH1、AKAP13、C1orf121、NOTCH2NL、CALM1、TLOC1、DPT、C3 等 14 条基因表达模式更为接近。其中表达上调的 3 条基因与三羧酸循环中的调节酶有关。表达下调的 14 条基因(第二类)与核糖体蛋白、肌动蛋白、钙调蛋白等有关,表达下调的最后 3 条基因(第三类)与抑制免疫因子、睾丸酮阻遏前列腺信使、载脂蛋白等有关(见表 2)。

2.5 KEGG 代谢途径分析结果

在 20 条差异表达基因中,有四条基因的代谢途径被找到。与 202236_s_at 序列匹配(匹配度 E-value=6.1)最好的表达序列标签共有 1476bp,其产物有 491aa,其产物为核糖核酸酶 G,其代谢途径有两条,催化以下生化反应:

(1)N-乙酰基-D-甘露糖胺+UDP $\rightleftharpoons$ UDP-乙酰基-D-甘露糖胺+水;

(2)甘油-3-磷酸乙醇胺+水 $\rightleftharpoons$ 甘油+乙醇胺磷

酸盐。

探针号为 200793_s_at 的基因经 KEGG 搜索后,其匹配的基因为 ACO₂(匹配度较高,为 E-value=6×10⁻⁸³),基因碱基序列及基因名称、符号完全一致,其涉及三条代谢途径:三羧酸循环、乙醛酸和二元羧酸和还原性羧酸盐代谢。探针号为 219599_at 的基因经 KEGG 搜索后,其匹配最好的基因产物为胰多肽受体(匹配度为 85%),参与刺激神经配体-受体相互作用代谢过程。探针号为 221748_s_at 的基因经 KEGG 搜索后,其匹配最好的基因为 LOC495272 (匹配度 E-value=9.2),其编号为 EC:3.5.1.-,其产物为一种神经酰胺酶,参与神经鞘脂质代谢过程。

2.6 基因功能分类结果

BRB-Array Tools 中的基因功能分类工具提供了基因功能分类列表,列表中所列的差异表达基因比先前的要多。分别用 LS 和 KS 检验。本研究中,用随机变量估计法对 22283 条基因进行了筛选,共有 725 条基因通过筛选标准,其中 293 条基因与 GO 分类匹配。我们列出了 8 类(共 117 条)匹配基因,其 KS 或 LS 的 P 值显著性在 0.005 水平上(见表 3)。其中 41 条基因涉及细胞组分 (cellular component,

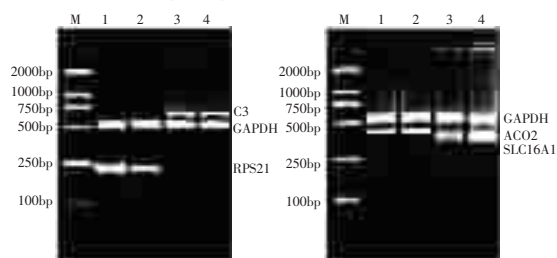
表 3 基因功能分类结果

	GO 类号	GO 术语	GO 描述	基因数目	LS 排列 P 值	KS 排列 P 值
1	0044429	CC	线粒体组成	5	0.02269	0.004
2	0006091	BP	代谢产物前体和能量生成	44	0.0231	0.00252
3	0044422	CC	细胞器组成	14	0.0254	0.00122
4	0044446	CC	细胞内细胞器组成	14	0.0254	0.00122
5	0006092	BP	糖类代谢的主要途径	19	0.03808	0.00443
6	0031090	CC	细胞器膜结构框架	8	0.05091	0.00332
7	0009892	BP	代谢负调控	7	0.06487	0.00139
8	0031324	BP	细胞内代谢负调控	6	0.07686	0.00396

CC), 76 条基因涉及生物过程 (biological process, BP)。

2.7 半定量 RT-PCR 验证结果

我们选取了四条差异表达基因, 用半定量 RT-PCR 技术进行了验证, 看其是否与前面所述的差异表达结果相符。结果显示, 太极拳训练后, 基因 RPS21 表达下调 27.6%, 基因 C3 表达下调 25.7%, 基因 ACO₂ 表达上调 35.6%, 基因 SLC16A1 表达上调 91.9%。该结果证明了基因芯片实验结果和以上的分析是可信的(图 1)。



A 表达下调的两条基因

B 表达上调的两条基因

1 和 3 泳道为太极拳训练前的样品, 2 和 4 道为训练后样品。PCR 产物是在适宜的循环条件下产生的, 图中条带浓度形成了鲜明的对比; 训练后的 C3, RPS21 浓度明显低于训练前, 而 ACO₂, SLC16A1 的浓度明显高于训练前。

图 1 基因芯片实验结果的可靠性验证

3 讨论

GEO 上可以搜索到一个数据库, 其编号为 GSE1786。该数据库是由 Shlomit Radom-AiZik 等提交的。他们对参加为期 3 个月有氧运动的健康老年人的肌肉全基因组表达进行了研究, 结果有 397 条基因表达有明显改变, 其中 181 条表达上调, 216 条基因表达下调。这些基因表达的变化与训练效果的改变是一致的, 且有些变化已有报道^[6-7]。正如前人所描述的一样, 这些差异表达基因与能量代谢、物质代谢、肌肉质量、肌肉收缩、肌肉成分信息转导和亚铁血红素的生物合成等有关^[8-11]。

本研究中, 我们用艾菲公司的 U133A 型基因芯片对参加为期 12 周太极拳运动的健康老年人基因全基因组表达进行了研究, 并用 BRB 阵列工具对数据进行了分析, 在 22283 条基因中, 有 20 条表达差异最明显的基因被筛选出来, 有 3 条基因表达上调,

17 条基因表达下调。然后又对这 20 条基因进行了聚类分析, 人为地分为三类, 发现 3 条表达上调的基因被聚为第一类, 说明它们有相同的表达模式, 17 条表达下调的基因被分为两类。通过 KEGG 搜索, 我们认为 202236_s_at 这条基因应该重新定义为核糖核酸酶 G 的编码基因, 它与氨基糖代谢和乙酰脂类代谢有关, 该酶的底物是 N-乙酰基-D-甘露糖胺, 催化该底物与 UDP 的脱水反应, 生成 UDP-N-乙酰基-D-甘露糖胺和水。另外, 该酶还催化甘油-3-磷酸乙醇胺与水的反应, 生成甘油和氨基乙酰磷酸盐。该基因表达上调, 可以解释有氧运动(太极拳)促进健康的分子机制。

探针号为 200793_s_at 的基因涉及三羧酸循环、乙醛酸和二元羧酸代谢, 也与还原性羧酸盐代谢有关, 其编码产物为顺乌头酸酶, 其催化的反应发生在线粒体内。这条基因表达上调, 说明太极拳运动可加速体内物质的有氧代谢, 它与上述与脂类代谢相关的基因表达共同上调, 可以证明太极拳运动减肥的分子机制。

探针号为 219599_at 的基因涉及刺激神经的配体-受体相互作用, 通过分析, 我们将该基因产物的功能定义为: 环境信息处理、信息分子和相互作用, 刺激神经的配体-受体相互作用, 蛋白家族, 细胞过程和信息处理, 受体和通道等。探针号为 221748_s_at 的基因涉及神经鞘脂类代谢, 通过分析, 我们可以补充以下注释: 与神经鞘脂类代谢有关。这两条基因表达下调, 提示太极拳运动对减少神经鞘脂类物质降解, 维护神经细胞正常功能有积极作用。可以初步确定, 太极拳运动抗衰老可以起到很好的作用。

另外, 在 20 条差异表达基因中, 17 条基因表达下调, 大部分都涉及编码肌肉蛋白质的基因, 这些基因表达下调, 意味着太极拳运动对骨骼肌质量的提高不能起到积极作用。但有三条表达上调的基因却证明了其对体内物质有氧代谢有积极影响。

通过基因功能分类对比, 用基因功能分类术语

(下转 322 页)