

· 基础研究 ·

有氧运动对大鼠骨骼肌 mTOR 活性与蛋白表达的影响*

曹师承^{1,2} 孙黎光¹ 赵刚² 刘慧莉² 张合²

摘要 目的:观察有氧运动对大鼠骨骼肌哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)蛋白总量(t-mTOR)及磷酸化 mTOR(p-mTOR)与磷酸化的核糖体蛋白 S6 激酶 (p-P70^{S6K})的影响。方法:SD 大鼠随机分为对照组和运动组。运动组 1.5 h/d 训练,共 7 周。运动结束后分别在 24h 或 48h 取材,测定葡萄糖和胰岛素浓度;Western blot 法检测骨骼肌 t-mTOR 蛋白表达、p-mTOR 和 p-P70^{S6K} 磷酸化水平。结果:与对照组比较,运动组胰岛素浓度降低;各运动组 t-mTOR 升高;p-mTOR 和 p-P70^{S6K} 活性增高显著。结论:运动能提高大鼠骨骼肌对胰岛素的敏感性,改善 mTOR 与 P70^{S6K} 磷酸化及 mTOR 蛋白表达。

关键词 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;运动;骨骼肌;核糖体蛋白 S6 激酶

中图分类号:R587 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-01-0034-03

Effects of aerobic exercises on mTOR phosphorylation and protein expression in skeletal muscle of rats/ CAO Shicheng, SUN Liguang, ZHAO Gang, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(1): 34—36

Abstract Objective:To investigate the effects of exercises on mTOR and P70^{S6K} phosphorylation and protein expression of mTOR. **Method:** Male SD rats were randomly divided into control group and trained group. The trained rats were submitted to 1.5h of exercises daily and had a fragment of their excised gastrocnemius muscle, 24h or 48h after the last training session. The training lasted for 7 weeks. The changes in the expressions of mTOR and p-mTOR and p-P70^{S6K} were determined by Western blotting. The serum levels of glucose and insulin were measured. **Result:** Glucose tolerance test displayed blood insulin concentration decreased with exercises training. Exercises led to a marked increase in p-mTOR and p-P70^{S6K} of trained group as compared with that of controls, and increased mTOR protein expression of training 1.5h/d, 24h and 48h after the last training session. **Conclusion:** Exercises could elevate skeletal muscle responsiveness to insulin, improve the p-mTOR and p-P70^{S6K} and protein expression of mTOR.

Author's address Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shenyang, 110001

Key words mammalian target of rapamycin; exercises; skeletal muscle; ribosomal protein S6 kinas

有规律的运动增加骨骼肌血流量,改善骨骼肌对胰岛素的敏感性,促进葡萄糖的吸收和利用,调节血糖平衡,已被动物和人体实验所证实^[1-2]。运动预防糖尿病的发生,改善糖尿病患者机体代谢状况,作为糖尿病的辅助治疗已应用到临床实践^[3]。然而,其分子机制目前尚未十分清楚。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal protein S6 kinas, P70^{S6K})是胰岛素受体信号转导途径磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3 kinas, PI3K)的下游底物,运动通过激活 PI3K 影响 mTOR 和 P70^{S6K} 的活性和蛋白表达,但是由于运动方式的选择、运动强度和时间的确定,以及采样时间等不同,报道的结果并不一致^[4-5]。本研究建立有氧运动及不同取材时间的动物模型,探讨运动对 mTOR 和 P70^{S6K} 的磷酸化水平

及 mTOR 总蛋白(t-mTOR)表达的影响,以及胰岛素对运动的反应,旨在为糖尿病的临床辅助治疗和预防的运动干预方法提供分子机制的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型建立

SD 雄性大鼠 24 只(7 周龄),体重 150—200g (由中国医科大学实验动物中心提供)。随机分为 3 组,每组 8 只:安静对照组(CON)、1.5h 运动恢复 24h 组(YD-1.5-24)、1.5h 运动恢复 48h 组(YD-1.5-48)。

* 基金项目:辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目(2004D244)

1 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,沈阳,110001

2 中国医科大学基础医学院运动医学基础教研室

作者简介:曹师承,男,博士,副教授

收稿日期:2007-10-23

所有动物训练期间自由饮食、饮水。运动组在水温 $(32\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、水深 50cm 的有机玻璃泳池内游泳,每周训练 5d,每天 1 次。第 1 周为适应性运动,每次运动 20—40min。第二周运动时间固定为 1.5h,运动 7 周,最后一次运动后 24h 或 48h 取材。

1.2 葡萄糖耐量试验

7 周运动后对运动组和安静对照组进行葡萄糖耐量试验,试验前各组大鼠分别禁食 12h 造成空腹血糖。异戊巴比妥 (15mg/kg) 麻醉后首先取尾静脉血测空腹血糖和胰岛素,继经尾静脉注射 20% 葡萄糖 (2g/kg) ,注糖后分别于 0、5、10、20min 取血样,提取血清测葡萄糖和胰岛素浓度。

1.3 Western 印迹分析

麻醉大鼠于肝门静脉注射胰岛素 $(6\mu\text{g})$,血液胰岛素浓度约为 10^{-6}mol/L ,90s 后取适量腓肠肌样品立即放入预冷的粉碎缓冲液 $(20\text{mmol/L Tris/HCl pH}=7.5$ 50mmol/L NaCl 0.1mmol/L Na_3VO_4 25mmol/L NaF 2mmol/L EDTA EGTA 1mmol/L DTT,1mg/ml 亮氨酸/抑肽酶)中匀浆。 4°C ,12000g 离心 1h 取上清。酚试剂法定蛋白。样品经 10%SDS-PAGE 电泳分离后,转移到硝酸纤维素膜上,分别与一抗(mTOR、p-mTOR 和 p-P70^{S6K})和相应二抗孵育。E-CL 法显带,X 线片曝光。扫描后经 Image J 图像分析软件对图中印迹区进行灰度分析。

1.4 统计学分析

实验结果以均数 $\pm$ 标准差表示。应用 SPSS 11.5 统计软件包对两组进行组间 t 检验。

2 结果

2.1 有氧运动对大鼠糖耐量的影响

7 周运动结束后各组大鼠空腹血糖和胰岛素浓度均无明显改变;糖耐量结果经分别处理 0、5、10、20min 测试数据,最后统计 4 个时间点分析整体变化并与对照组比较发现,运动组大鼠血糖浓度与对照组比较有下降趋势,但无显著性意义;运动组大鼠血浆胰岛素浓度明显低于对照组,有显著性意义 $(P<0.01)$,说明运动增加了大鼠对胰岛素的敏感性(表 1)。

表 1 运动对大鼠血液葡萄糖和胰岛素的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	血糖(mmol/L)		胰岛素($\mu\text{IU/ml}$)	
		空腹血糖	糖耐量血糖	空腹胰岛素	糖耐量胰岛素
对照组	8	5.041 ± 0.383	4.937 ± 1.603	15.241 ± 2.775	15.312 ± 2.114
YD-1.5-24	8	5.102 ± 0.481	4.519 ± 1.673	14.005 ± 2.533	$11.729\pm 2.382^{\text{①}}$
YD-1.5-48	8	4.930 ± 0.684	3.261 ± 1.820	13.567 ± 2.569	$11.986\pm 2.016^{\text{①}}$

YD-1.5-24;1.5h 运动恢复 24h 取材组;YD-1.5-48;1.5h 运动恢复 48h 取材组;①与对照组比较 $P<0.01$

2.2 有氧运动对大鼠骨骼肌 mTOR 磷酸化和蛋白总量的影响

Western 印迹分析显示,运动结束经胰岛素处理可以改善 mTOR 磷酸化水平,与对照组比较,1.5h 运动 24h 取材和 48h 取材组与对照组比较差异非常显著 $(P<0.01)$ (图 1)。运动促进 mTOR 蛋白合成,与对照组比较,1.5 h 运动 24 h 取材和 48h 取材组蛋白含量非常显著升高 $(P<0.01)$ 。

2.3 有氧运动对大鼠骨骼肌 P70^{S6K} 活性的影响

Western 印迹分析显示,运动结束后经胰岛素处理增加 P70^{S6K} 活性,1.5h 运动 24h 取材和 48h 取材组磷酸化水平显著高于对照组 $(P<0.01)$ (图 2)。

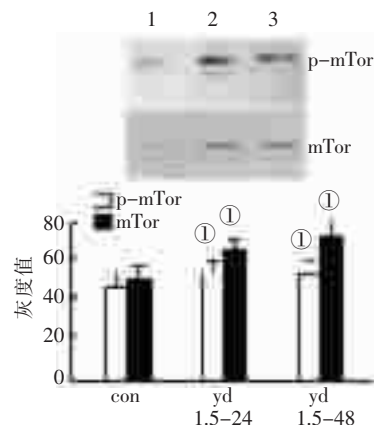


图 1 有氧运动和不同取材时间对大鼠骨骼肌 mTOR 磷酸化和蛋白总量的影响

1:con; 2:yd-1.5-24; 3:yd-1.5-48; ①与对照组比较 $P<0.01$

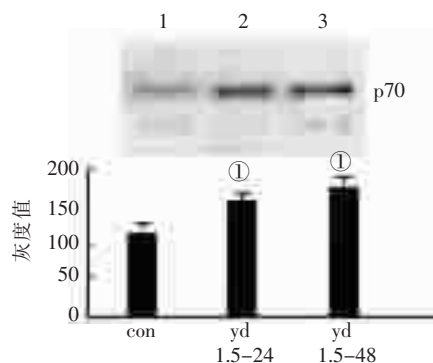


图 2 有氧运动和不同取材时间对大鼠骨骼肌 P70^{S6K} 磷酸化的影响

1:con; 2:yd-1.5-24; 3:yd-1.5-48; ①与对照组比较 $P<0.01$

3 讨论

运动和胰岛素是促进糖代谢的主要因素,两者均通过信号转导途径实现其调节作用,然而转导机制不同^[6-7],胰岛素主要通过磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3-K)/蛋白激酶 B 信号途径发挥作用;而运动的作用比较复杂,如激活有丝分裂原信号途径、蛋白激酶 C 及自分泌和/或旁分泌等多条途径发挥生物学效应。运动和胰岛素是改善 mTOR 磷酸化和蛋白表达的重要因素。Fluckey JD 等^[8]通过飞轮设备训练 SD 大鼠,训练分两段,每次飞轮旋转 25 周,中间隔 48h,第二次运动结束 16h 后,测试 mTOR 蛋白含量

发现运动后经过胰岛素处理的蛋白表达明显高于非胰岛素处理组, 同时发现没经过胰岛素处理的运动 mTOR 蛋白表达高于经过胰岛素处理和没经过胰岛素处理的对照组。可见运动不但通过提高胰岛素的敏感性促进其蛋白合成, 也是独立增加合成的主要因素。Parkington 等^[9]用 100Hz 刺激坐骨神经, 发现刺激即刻 mTOR 磷酸化水平明显升高, 并可以维持刺激结束 6h 后, 磷酸化的改变主要发生在 IIa 型肌纤维而不是 I 型纤维。Atherton PJ 等^[10]的实验也证实了这一点, 100Hz 每次 3s 反复刺激骨骼肌增加 mTOR 磷酸化。以上报道多限于一次性刺激作用引起 mTOR 磷酸化和蛋白含量变化的结果。而本研究采用长期游泳大鼠模型, 并在最后一次运动结束给胰岛素处理, 结果显示运动各组 mTOR 磷酸化水平明显高于对照组, 且取材时间越短变化越明显。运动和胰岛素共同作用引起其蛋白含量升高也很典型, 除 1.5h 运动 48h 取材组有下降趋势外, 其他 3 组均非常显著升高。Parkington JD 等^[11]选用 6 个月成年鼠和 30 个月的老鼠, 用一次性 100Hz 刺激坐骨神经发现老鼠肌 P70^{S6K} 磷酸化水平刺激后即刻显著变化, 并可维持 6h; 而成年鼠的变化不典型。Eliasson 等^[12]分别用向心收缩和离心收缩两种肌肉工作形式, 观察运动对骨骼肌 P70^{S6K} 磷酸化的影响, 证实最大离心收缩增加 P70^{S6K} 和 S6 激酶磷酸化水平的 2—8 倍, 可维持 2 h 恢复到正常; 而同样强度的向心收缩和次最大强度的离心收缩均不改变 P70^{S6K} 和 S6 激酶磷酸化水平, 运动 2h 后仍无变化。即使上述实验所用实验方式不同, 肌肉工作方式有别, 但有一个趋势只要刺激方式得当, 可以改变 P70^{S6K} 磷酸化的状态。本实验发现运动各组 P70^{S6K} 磷酸化水平明显高于对照组, 表明长期运动干预可以改善其活性。

4 结论

运动能提高大鼠骨骼肌对胰岛素的敏感性, 改善胰岛素受体信号途径脂酰肌醇-3-激酶的下流底物 mTOR 蛋白表达及 mTOR 和 P70^{S6K} 磷酸化水平, 实验结果可以为糖尿病的预防和临床治疗的运动干预提供理论参考, 然而其分子机制尚需进一步探讨。

参考文献

- [1] Hardin DS, Azzarelli B, Edwards J, et al. Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes; effects on blood flow and differential expression of GLUT-4 in skeletal muscle [J]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1995, 80(2):2437—2446.
- [2] Dele F, Handberg A, Mikines KJ, et al. GLUT-4 and insulin receptor binding and kinase activity in trained human muscle [J]. *J of Physiology*, 1993, 469(3): 651—654.
- [3] Wasserman DH, Zinman B. Exercise in individuals with IDDM [M]. *Diabetes Care*, 1994, 17:924—37.
- [4] Parkington JD, LeBrasseur NK, Siebert AP, et al. Contraction-mediated mTOR, p70s6k, and ERK1/2 phosphorylation in aged skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol*, 2004, 97(1):243—248.
- [5] Kei Sakamoto, Laurie J. Exercise effects on muscle insulin signaling and action. Invited Review: Intracellular signaling in contracting skeletal muscle [J]. *Appl Physiol*, 2002, 93: 369—383.
- [6] Giorgino TW, Balon G, Condorelli RJ. Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1995, 268(31): E987—E995.
- [7] Wojtaszewski JF, Hansen BF, Ursø B, et al. Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol*, 1996, 81(5): 1501—1509.
- [8] Fluckey JD, Knox M, Smith L, et al. Insulin-facilitated increase of muscle protein synthesis after resistance exercise involves a MAP kinase pathway [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(6): E1205—1211.
- [9] Parkington JD, Siebert AP, LeBrasseur NK, et al. Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 285(5): R1086—1090.
- [10] Atherton PJ, Babraj J, Smith K, et al. Selective activation of AMPK-PGC-1α or PKB-TSC2-Mtor signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation [J]. *FASEB J*, 2005, 19(7): 786—788.
- [11] Parkington JD, LeBrasseur NK, Siebert AP, et al. Contraction-mediated mTOR, p70^{S6K}, and ERK1/2 phosphorylation in aged skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol*, 2004, 97(1):243—248.
- [12] Eliasson J, Elfegoun T, Nilsson J, et al. Maximal lengthening contractions increase p70^{S6K} kinase phosphorylation in human skeletal muscle in the absence of nutritional supply [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(6): E1197—1205.