

·基础研究·

耐力运动对大鼠骨骼肌 PKB 磷酸化与表达的影响*

曹师承^{1,2} 孙黎光¹ 叶立平¹ 张莹¹ 王玉¹

摘要 目的:探讨耐力运动对大鼠骨骼肌蛋白激酶 B(PKB)mRNA 表达、蛋白总量(t-PKB)及磷酸化 PKB(p-PKB)的影响。方法:SD 大鼠随机分为对照组和运动组。运动组分为 1 h/d、1.5 h/d 组,运动 7 周,最后一次运动后 24h 和 48h 取材,分为 1 h/d 运动 24h 取材组、1 h/d 运动 48h 取材组、1.5 h/d 运动 24h 取材组、1.5 h/d 运动 48 h 取材组。测定血清葡萄糖和胰岛素浓度;采用 Western blot 法检测 t-PKB 和 p-PKB 水平;用 RT-PCR 法分析 PKB mRNA 的表达。结果:与对照组比较,1h/d 和 1.5h/d 运动 24h 和 48h 取材组 p-PKB 水平升高;1.5 h/d 运动 24h 与 48h 取材组 t-PKB 增加;PKB mRNA 改变发生于 1h/d 和 1.5h/d 运动 24 h 取材组;运动组血清胰岛素浓度下降。结论:运动可以增加大鼠骨骼肌 PKB 磷酸化水平、增加 PKB 蛋白总量和基因表达;改善大鼠骨骼肌对胰岛素的敏感性。

关键词 基因表达;蛋白激酶;骨骼肌;运动

中图分类号:R87 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-05-0416-03

Effects of endurance exercises on PKB phosphorylation and gene expressions in skeletal muscles of rats/
CAO Shicheng, SUN Liguang, YE Liping, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(5):
416—418

Abstract Objective:To study the effects of exercises on PKB phosphorylation(p-PKB),protein contents(t-PKB) and PKB mRNA gene expressions in skeletal muscles of rats. **Method:** All experimental rats were randomized into control group and exercises group. The rats of exercises group were trained for 7 weeks with different intensities and recovery periods of exercises. The changes in the expressions of t-PKB and p-PKB were determined with Western blotting. The expressions of PKB mRNA was determined with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The serum levels of glucose and insulin were measured. **Result:** As compared with control, in exercises 1h/d and 1.5h/d groups, at the 24th h and 48th h after the last training p-PKB increased. After exercises 1.5h/d,at the 24th h and 48th h after the last training t-PKB increased. In exercises 1h/d and 1.5h/d groups, the 24th h after the last training, PKB mRNA expressions increased respectively. The serum levels of insulin in exercises rats decreased. **Conclusion:** Exercises could improve the PKB phosphorylation, protein contents and gene expressions, and elevate insulin sensitivity in skeletal muscles of rats.

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

Key words gene expression; protein kinase; skeletal muscle; exercises

自从发现运动能够增加骨骼肌对胰岛素的敏感性,改善糖尿病患者胰岛素抵抗现象,运动疗法已应用于糖尿病的预防和临床辅助治疗^[1]。资料显示,运动干预通过促进骨骼肌细胞对血糖的摄取和利用,降低血糖,改善糖尿病患者糖耐量减低和脂代谢紊乱,从而缓解病情的发展^[2-3]。然而,运动干预是否通过改善胰岛素依赖信号途径磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3-K)/蛋白激酶 B (protein kinase, PKB) 级联蛋白激酶的活性和表达增加糖的吸收和利用,调节血糖平衡的分子机制目前尚未十分清楚。有文献报道,长期耐力运动能够提高大鼠骨骼肌 PI3-K/PKB 转导途径 PKB 的活性和磷酸化水平,促进葡萄糖转运,改善机体对糖的利用,但不改变 PKB 的蛋白总量^[4]。近期人体实验报道^[5],健康成人 3 周耐力运动,经胰岛素处理后增加骨骼肌葡萄糖吸收能力,并未影响 PKB 磷酸化水

平。以上实验结果的不一致,是实验对象种属间的差异,还是运动干预的强度、时间和频率的选择不同,尚需研究证实。本实验采用不同运动强度和取材时间的大鼠模型,探讨运动和胰岛素与 PKB 磷酸化和表达的关系,为糖尿病的预防和临床治疗提供运动干预的分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型建立

7 周龄 SD 雄性大鼠 50 只,体质量 150—200g (中国医科大学实验动物中心提供)。大鼠随机分为 5 组:安静对照组 (CON)、1h 运动恢复 24h 取材组

* 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

作者简介:曹师承,男,副教授,博士,硕士生导师

收稿日期:2008-09-29

(YD-1-24)、1h 运动恢复 48h 取材组 (YD-1-48)、1.5h 运动恢复 24h 取材组(YD-1.5-24)、1.5h 运动恢复 48h 取材组(YD-1.5-48), 每组动物 10 只。运动组大鼠在水温(32±1)℃和水深 50cm 的有机玻璃游泳池内游泳, 每周游 5d(休息 2d), 1 次/d。第 1 周为适应性运动, 第 2 周运动时间分别固定为 1h 和 1.5h。

1.2 葡萄糖耐量试验

运动结束动物取材前禁食 12h, 大鼠经异戊巴比妥麻醉(15mg/kg BW), 麻醉后尾静脉取血用于空腹血糖和胰岛素测定。糖耐量试验, 尾静脉注射 20%葡萄糖(2g/kg), 分别在第 0、5、10、20 分钟取血样(根据参考文献[4], 及预实验结果稍调整), 提取血清测葡萄糖和胰岛素浓度。

1.3 Western blot 分析

兔 PKB 和 p-PKB 多克隆抗体, 马 actin 多克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗马二抗和 ECL 试剂盒(北京中山公司), Trizol(上海生工公司), TaKaRa RNA PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司), 其他试剂为分析纯。分别将各组大鼠于肝门静脉注射胰岛素(6μg/只, 血液胰岛素浓度约为 10—6mol/L), 90s 后取适量腓肠肌样品立即放入预冷的粉碎缓冲液中匀浆。采用 Western blot 方法根据试剂盒要求测定 PKB 含量, 一抗按 1:300 稀释, 二抗按 1:2000 稀释, 经凝胶自动分析成像系统和 Image J 图像分析软件对图中印迹区进行定量分析。

1.4 PKB mRNA 测定

PKB mRNA 的表达采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定。提取总 RNA 后进行 cDNA 的合成: 引物序列采用电脑软件 prim5 设计, 由大连宝生物技术有限公司合成。片段长 442bp, 序列如下: 上游 5'-GAGGAGCGGAAGAGTG-3'; 下游 5'-GAGACAGGTGGAAGAAGAGC-3'。内参考 β-actin701bp: 上游 5'-GCCAACCGTGAAAAGATG-3'; 下游 5'-CCAGGATAGAGCCACCAAT-3'。

PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色检测结果。利用 Image J 图像分析软件分析, 取 PKB 和 actin mRNA 吸光度比值对产物进行相对定量。

1.5 统计学分析

实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS11.0 统计软件包, 两组间的比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 运动对大鼠糖耐量的影响

与对照组比较, 7 周运动结束后各运动组大鼠空腹血糖和胰岛素浓度均无明显改变。糖耐量结果显示, 经分别处理第 0、5、10、20min 测试数据, 最后统计四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有下降趋势, 但无显著性差异; 运动组大鼠血浆胰岛素浓度明显低于对照组分别为($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明运动增加了大鼠对胰岛素的敏感性(见表 1)。

表 1 运动对大鼠血液葡萄糖和胰岛素的影响

($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	葡萄糖(mmol/L)				胰岛素(μIU/ml)			
	第 0min	第 5min	第 10min	第 20min	第 0min	第 5min	第 10min	第 20min
CON	5.041±0.383	5.978±1.601	4.978±1.600	3.498±1.095	15.241±2.775	17.020±1.956	15.336±2.734	14.025±2.456
YD-1-24	4.645±0.525	4.848±1.514	3.846±1.259	3.305±1.181	14.005±2.533	15.197±1.871 ^①	13.243±1.534 ^①	13.003±1.914
YD-1-48	4.734±0.514	4.780±1.312	3.860±0.926	3.287±1.669	13.567±2.569	14.997±2.052 ^①	13.026±1.608 ^①	12.409±1.954
YD-1.5-24	5.102±0.481	4.715±1.562	3.887±1.113	3.121±1.230	13.841±2.528	14.025±2.456 ^②	11.804±2.284 ^②	11.652±2.088 ^②
YD-1.5-48	4.930±0.684	4.746±0.972	3.815±1.012	3.060±1.321	13.051±2.419	13.403±2.887 ^②	11.638±1.869 ^②	11.813±2.160 ^②

①与 CON 比较 $P < 0.05$; ②与 CON 比较 $P < 0.01$

2.2 Western blot 检测结果

利用 Image J 图像分析软件分析经胰岛素处理的各组实验大鼠, 结果显示, 1 h 和 1.5 h 运动 24 h 和 48h 取材组 PKB 磷酸化水平与对照组比较差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)(图 1, 见彩色插页), 说明运动可以改善 PKB 活性。PKB 蛋白总量结果证实, 1h 运动 24h 和 48h 取材组蛋白含量变化与对照组比较差异无显著性; 1.5 h 运动 24h 与 48h 取材组蛋白总量与对照组比较有显著差异($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.3 PKB mRNA 的表达

RT-PCR 分析显示, 经胰岛素处理后运动引起大鼠骨骼肌 PKB mRNA 表达发生变化, 如运动强度

相同取材时间短基因表达增加明显, 1h 和 1.5h 运动 24h 取材组与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), 图 2 (见彩色插页)。

3 讨论

有规律的运动能够增加骨骼肌血流量, 改善骨骼肌对胰岛素的敏感性, 促进葡萄糖的吸收和利用, 降低血糖, 已被动物和人体实验所证实^[6-9]。运动和胰岛素是促进糖代谢的主要因素, 两者均可通过胰岛素受体信号转导途径实现其调节作用, 然而转导机制不同^[10-11]。胰岛素受体信号 PI3-K/ PKB 转导途径是促进葡萄糖载体 4 (glucose transporter,

GLUT4)跨膜转运,增加葡萄糖吸收的主要途径。胰岛素主要通过 PI3-K/PKB 信号途径发挥作用;而运动的作用比较复杂,运动干预通过改善骨骼肌对胰岛素的敏感性,激活 PI3-K/ PKB 信号途径级联蛋白激酶的活性,增加 GLUT4 跨膜转运调节血糖平衡。资料报道^[12-14],运动可以促进 GLUT4mRNA 表达,而运动加胰岛素具有更高的 GLUT4mRNA 表达以及更好的降糖效果。然而,运动对 PI3K/PKB 信号途径的影响,由于运动方式、强度和时间等因素的选择不同,实验结果并不一致。

Eliete L 等^[4]发现 6 周游泳运动大鼠,经过胰岛素处理后,PKB 磷酸化水平明显高于对照组,但其蛋白表达无显著性意义。Reynolds TH 等^[15]报道,轮滑训练 20—22 月龄小鼠,骨骼肌 PKB 磷酸化水平高于对照组 45%,蛋白含量升高 50%。Atherton PJ 等^[16]发现耐力训练大鼠仅诱导部分快和慢肌表型转化及线粒体功能变化,不引起肌肉增长;而分别用高频和低频电刺激骨骼肌进行抗阻训练,证实高频电可增加 PKB 磷酸化,低频电无作用。总之,动物模型不同实验结果各异。而人体实验结果与动物实验不同,3 周耐力运动后,经胰岛素处理未影响 PKB 的磷酸化水平^[5]。故运动干预是否可以改善 PKB 的磷酸化水平,增加蛋白总量,与运动强度和频率有何关系,尚需进一步研究。本实验经不同运动强度和取材时间训练大鼠,经过胰岛素处理发现各运动组 PKB 磷酸化水平均高于对照组,而 1.5h 运动组非常显著升高,表明 PKB 的磷酸化受运动强度影响。蛋白表达变化仅发生于 1.5h 运动组,1.5h 运动 48h 取材组有恢复趋势。说明运动可以改善 PKB 蛋白含量,但有时限制,超过运动的后作用,作用效果消失。至于 1h 运动 24h 和 48h 取材组是否改变 PKB 蛋白表达,资料分析^[4]很可能是合成代谢和分解代谢处于动态平衡。运动对 PKB mRNA 表达的影响目前尚未见报道,本研究发现只有 1h 和 1.5h 运动 24h 组升高,提示 PKB mRNA 表达受运动影响,但基因表达的增加发生迅速。

总之,运动可以增加骨骼肌对胰岛素的敏感性,通过提高 PKB 磷酸化水平、蛋白和基因表达,改善胰岛素受体 PI3K/PKB 信号途径影响糖代谢,调节血糖平衡,达到糖尿病预防和临床辅助治疗的作用,但需要选择合理的运动方式,适当的强度和运动持续时间及间隔频率。

参考文献

- [1] Henriksen EJ. Exercise effects of muscle insulin signaling and action Invited review: Effects of acute exercise training on insulin resistance [J]. Journal of Applied Physiology, 2002,93(2): 788—796.
- [2] 商永芳,姚民秀,徐倩,等.运动疗法对 2 型糖尿病患者血糖、血脂的影响[J].中国康复医学杂志,2006,21(4):367.
- [3] 景志强,景欣悦.运动对 2 型糖尿病脂代谢的影响[J].中国康复医学杂志,2005,20(8):636—638.
- [4] Eliete L, Everardo M, Carlar RO, et al. Endurance-training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3 -kinase/Akt pathway [J]. European Journal of Endocrinology, 2002, 147(1): 149—157.
- [5] Adam J, Jonas T, Erik A, et al. Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle [J]. Diabetes, 2007, 56(8):2093—2102.
- [6] 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(8):2437—2446.
- [7] Dele F, Handberg A, Mikines KJ, et al. GLUT-4 and insulin receptor binding and kinase activity in trained human muscle [J]. Jour of Physiology, 1993, 469(4): 615—624.
- [8] 胡瑞萍,吴毅,胡永善.运动对大鼠骨骼肌胰岛素信号转导蛋白表达和活性的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2005,26(6):409—411.
- [9] 陈翠娟.运动对门诊糖尿病患者疗效影响的观察 [J]. 中国康复医学杂志, 2005,20(7):531.
- [10] 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(1): E987—E995.
- [11] Wojtaszewski JF, Hansen BF, Ursø B, et al. Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle[J]. Appl Physiol, 1996, 81(4): 1501—1509.
- [12] 王丹,吴毅,胡永善,等.耐力运动对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌葡萄糖载体 4 基因表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007,22(5):391—394.
- [13] 刘传道,江钟立,朱红军,等.不同强度的耐力运动对糖尿病大鼠骨骼肌 GLUT4mRNA 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2005,20(4):244—247.
- [14] 吴毅,吴军发.运动疗法在糖尿病预防和治疗中的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2007,22(5):385—386.
- [15] 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 simulation [J]. FASEB J, 2005, 19(7): 786—788.