

高脂膳食及有氧运动对 C57BL/6 小鼠骨骼肌基因表达谱的影响*

刘效磊¹ 牛燕媚¹ 袁海瑞¹ 刘素娟¹ 傅力^{1,2,3}

摘要

目的:运用基因芯片技术研究高脂膳食及有氧运动因素对 C57BL/6 小鼠骨骼肌基因表达谱的影响,初步探寻有氧运动改善机体胰岛素抵抗(IR)相关基因的机制。

方法:选用 C57BL/6 雄性小鼠 80 只,随机分为正常饮食组和 IR 模型组,分别饲以基础和高脂饲料 10 周。鉴定高脂膳食组 IR 小鼠模型建立成功后,将正常饮食组随机分为正常饮食安静组(NC)和正常饮食运动组(NE),IR 模型组分为高脂饮食安静组(HC)和高脂饮食运动组(HE)。运动方案采用强度为 75% VO_{2max} 有氧跑台训练,持续 6 周。后分离各组小鼠股四头肌,提取总 RNA,经荧光标记后进行芯片杂交,利用芯片扫描仪记录荧光信号,并通过相关软件对所得数据进行统计分析。

结果:HC/NC 共筛选差异表达基因 136 个;NE/NC 筛选差异表达基因 74 个;筛选 HE/HC 差异表达基因 29 个;HE/NC 差异表达基因共 252 个,其中 170 个基因(HE/NC-DF)的差异表达由高脂膳食和运动因素共同引起;HE/HC 中 16 个基因为与 HE/NC-DF 共同差异基因。

结论:高脂膳食及有氧运动对小鼠骨骼肌基因表达均有显著影响,本研究初步筛选出有氧运动改善 IR 潜在相关基因,为进一步研究有氧运动改善 IR 分子机制提供了理论依据。

关键词 高脂膳食;有氧运动;胰岛素抵抗;基因芯片

中图分类号:R493, R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-11-1021-05

Effects of high-fat-diet and aerobic exercise on skeletal muscle global gene expression in C57BL/6 mice/LIU Xiaolei, NIU Yanmei, YUAN Hairui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 25(11): 1021—1025

Abstract

Objective: To investigate the effects of high-fat-diet and aerobic exercise on global gene expression in skeletal muscle of C57BL/6 mice with gene microarray analysis and explore the relevant genes which are involved in aerobic exercise ameliorating insulin resistance(IR).

Method: Eighty male C57BL/6 mice were randomly divided into normal feed group and IR model group, fed by normal feed and high-fat-diet respectively for 10 weeks. Then the mice from IR model group were confirmed IR by fasting serum insulin and oral glucose tolerance test (OGTT). The two groups were then further divided into normal feed sedentary control group(NC) and normal feed exercise group(NE), high-fat-diet sedentary control group(HC) and high-fat-diet exercise group(HE) respectively. The mice in exercise groups were subjected to 6 weeks of treadmill training at the intensity of 75% VO_{2max} . Then quadriceps femoris samples were removed and total RNA was extracted from tissues and labeled with two color fluorescent dye for microarray hybridization. The microarray

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.11.001

* 基金项目:国家自然科学基金(30871213)和天津市应用基础及前沿技术重点研究计划(09JCZDJC17400)共同资助

1 天津体育学院健康与运动科学系、天津市运动生理与运动医学重点实验室,天津,300381; 2 天津医科大学康复与运动医学系;

3 通讯作者

作者简介:刘效磊,男,硕士研究生; 收稿日期:2009-10-29

slides were scanned to generate gene lists with corresponding fluorescence intensity data which was analyzed with related software.

Result: The results showed that 136 genes were differentially expressed in HC group compared to NC group; 74 genes were shown to exhibit differential expression profiles in NE group compared to NC group; 29 genes were differentially expressed in HE group compared to HC group, while 252 genes were found when compared to NC group; Of the 252 genes, 170 exclusive genes (HE/NC-DF) expression were affected by both high-fat-diet and aerobic exercise factors; 16 of the HE/NC-DF genes were common with the differentially expressed genes in HE group compared to HC group.

Conclusion: This study demonstrated that high-fat-diet and aerobic exercise factors subtly regulated the gene expression of skeletal muscle in C57BL/6 mice. Sixteen highly promising gene relevant to aerobic exercise ameliorating IR were identified, and the data provides theoretical evidence for further studies about its molecular mechanisms.

Author's address Department of Health and Exercise Science, Tianjin Institute of Physical Education, Tianjin Key Lab of Exercise Physiology and Sports Medicine, Tianjin, 30081

Key words high-fat-diet; aerobic exercise; insulin resistance; gene microarray

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)即机体周围组织(肝脏、骨骼肌和脂肪组织)对胰岛素的反应性和敏感性降低,导致生理剂量的胰岛素产生低于正常的生理效应,是肥胖、2型糖尿病(T2DM)、高脂血症等一系列代谢性疾病的共同病理生理基础。大量研究认为,长期高营养膳食及运动过少是IR诱发的重要因素,并且运动与饮食控制及药物一起,是T2DM治疗的基本手段之一^[1-2]。虽然运动干预手段在肥胖及T2DM等代谢性疾病的预防及治疗中有着广泛的应用,但其具体分子机制尚不完全明确。基因芯片技术以其大规模、高通量的优点,被广泛应用于各种状态下大量基因的表达分析,因而为发现运动改善IR相关基因及分子机制提供了一种新的途径。本研究通过高脂饮食建立IR小鼠模型,再施以运动因素干预,运用基因芯片技术探究高脂膳食及有氧运动因素对C57BL/6小鼠骨骼肌基因表达谱的影响,以期发现运动改善IR相关基因及分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立

实验动物选用C57BL/6小鼠(军事医学科学院实验动物中心提供)。将80只清洁级、雄性、4周龄C57BL/6小鼠适应性喂养1周后随机分为正常饮食组和高脂饮食IR模型组(各40只),分别喂以基础和高脂饲料10周。随后检测高脂饮食组IR模型的

建立情况。然后将正常饮食组小鼠随机分为正常饮食安静组(NC)和正常饮食运动组(NE),高脂饮食组分为高脂饮食安静组(HC)和高脂饮食运动组(HE)。运动组运动方案均采用有氧跑台运动,首次运动控制跑台坡度为0,速度为10m/min,隔天递增速度直至12m/min(强度相当于75%VO_{2max})^[3],适应性训练1周。之后连续进行1次/d,60min/次,5次/周,为期6周。

1.2 指标检测及动物组织样本采集

实验10周后对小鼠进行口服葡萄糖耐量测试(OGTT)并测定小鼠空腹血清胰岛素水平(FINS)。OGTT测试前,小鼠禁食12h,尾静脉取血微量,使用ONE Touch血糖仪测定并记录每只小鼠空腹(T0 min)血糖值,后根据小鼠体重(10μl/g)灌注浓度为20%的葡萄糖溶液,分别检测灌注后T15, T30, T60, T90, T150和T180 min各时间点的血糖值。统计并对比各组小鼠的OGTT曲线,以观察血糖的变化,并根据公式计算各点的血糖曲线下面积(AUC)。尾静脉取血并采用ELISA法测定FINS。

运动训练结束24h后,各组动物禁食16h,腹膜下注射水合氯醛麻醉处死,分离小鼠股四头肌,并迅速置于液氮中速冻,后保存于-80℃冰箱。每组随机选取6只小鼠骨骼肌标本进行基因芯片的分析。

1.3 RNA提取及芯片制备

总RNA的提取采用Trizol(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)一步法,通过异丙醇沉淀

法沉淀 RNA, 并进一步采用 NucleoSpin® RNA clean-up 试剂盒 (Macherey-Nagel, Germany) 对总 RNA 进行过柱纯化, 最后用分光光度计定量, 甲醛变性凝胶电泳观察 RNA 质量。小鼠骨骼肌组织标本检测芯片采用北京博奥生物芯片有限公司 32k 小鼠基因组阵列, 该芯片共有约 32256 条 70bp 长度的 Oligo DNA, 来自于 Operon 公司的小鼠全基因组 Oligo 库 (<http://www.Operon.com>)。芯片的质量控制, 采用一段固定化的阳性对照序列及四个看家基因作为阳性对照, 并在芯片上点有 50% DMSO 作为阴性对照。

1.4 芯片图像采集和数据分析

芯片采用博奥公司 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪进行扫描。扫描结果采用 LuxScan 3.0 图像分析软件对芯片图像进行分析, 并把图像信号转化为数字信号。然后运用 Lowess 方法对芯片数据进行归一化。将基因临界表达信号值定位 800, 删除荧光信号弱的基因以及芯片上的阴性对照、内标、外标等冗余的数据。然后运用 SAM 软件对所得芯片数据进行分析, 错误检出率 (false discovery rate, FDR) 控制在 5% 以内, 并以 2 倍标准筛选差异表达基因。运用博奥生物分子功能注释系统 V4.0 并采用 GO (Gene Ontology) 基因功能分类体系对差异基因进行基因的相关功能分析。

2 实验结果

2.1 动物模型鉴定

实验 10 周后, 高脂饮食 IR 模型组小鼠 FINS 水平显著高于正常饮食组 ($P < 0.05$)。OGTT 测试曲线表明, IR 模型组与正常组相比, 空腹血糖明显升高, 峰值时间点延迟, 且在峰值出现后血糖恢复速度明显下降, 3h 后仍未恢复到基础水平 (如图 1), AUC 较正常组增加了 54.31% (胰岛素抵抗模型组: 33211.96 ± 8669.46 , 对照组: 21522.86 ± 5627.76 , $P < 0.01$)。以上结果表明, 经过 10 周高脂饮食, 高脂饮食组 IR 模型建立成功。

2.2 RNA 提取结果

各组 RNA OD260/OD280 均大于 1.8, 甲醛变性凝胶电泳显示 28S, 18S 两条主带, 两条主带的亮度 28S:18S 为 2:1, 符合实验要求 (图 2)。

2.3 基因表达谱及数据分析

运用 SAM 软件对各组表达差异基因进行筛选, 筛选条件 FDR 设定为 5% 以内, 差异倍数 (fold change) 为 2 倍。对比 HC 与 NC 基因表达谱, 筛选差异表达基因 136 个, 其中上调基因 96 个, 下调表达基因 40 个; NE/NC 共筛选差异表达基因 74 个, 上调基因 69 个, 下调基因 5 个; HE/HC 则有 29 个基因差异表达, 且均为表达上调基因 (表 1)。

图 1 10 周小鼠 OGTT 曲线

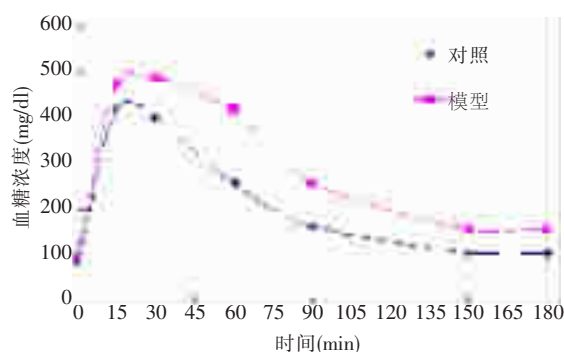
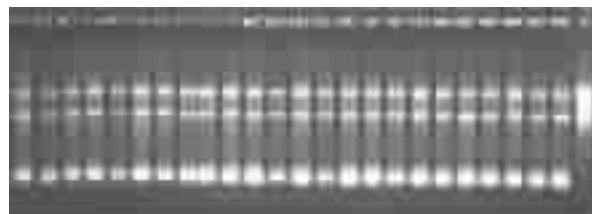


图 2 RNA 甲醛变性凝胶电泳



3 讨论

血脂代谢紊乱以及组织内脂类代谢产物异常堆积被认为是引发 IR 的重要原因^[4]。大量研究证明, 组织游离脂肪酸 (FFAs) 过多及甘油二酯 (diacylglycerol)、神经酰胺 (ceramides) 以及长链脂酰基 CoA (LCFA-CoA) 等脂质代谢中间产物的积累可干扰胰岛素信号转导, 造成外周组织对葡萄糖摄取能力下降, 引发 IR^[5-6]。啮齿类动物喂以高脂饮食以诱导产生 IR 动物模型已被广泛应用于 IR、T2DM 等代谢相关疾病的研究^[7-8]。本实验通过高脂饮食喂饲 C57BL/6 小鼠建立 IR 模型, 对 HC 组与 NC 组小鼠骨骼肌组织基因表达情况进行对比分析 (HC/NC), 共发现差异表达基因 136 个, 其中表达上调基因 96 个, 表达下调 40 个。

表 1 HE/HC 差异表达基因

基因编号	基因名称	差异倍数	q 值(FDR)	种类
M200002860	Mcee ^①	3.497202908	7.168692618	甲基丙二酰辅酶 A 表异构酶
M200013794	Mfap5	2.837523806	4.682179848	微纤丝结合蛋白 5
M200015284	Gadd45gip1	3.140053918	3.828072753	生长抑制 DNA 损伤基因, γ 作用蛋白 1
M400000996	Adal	4.712968725	3.782881109	腺苷脱氨酶样
M200001749	Endog	1.487969801	3.64459631	核酸内切酶 G
M200003616	Nrm	1.487969801	3.529070224	核膜蛋白
M400009011	Pigp	3.497202908	3.494243642	磷脂酰肌醇聚糖 P
M200005413	Ndufa11 ^①	1.487969801	3.196096345	NADH 脱氢酶 1α, 亚单位 11
M400011399	Myoz1	4.712968725	3.114897126	
M300001020	Rarres2	3.140053918	2.971778551	视黄酸受体/维甲酸受体反应元件 2
M200014439	Tnmd	3.497202908	2.779860665	腱调蛋白
M300007542	Ndufb11	3.140053918	2.652255798	NADH 脱氢酶 1β, 亚单位 11
M400012886	Sort1 ^①	4.507888805	2.607814343	分拣蛋白 1
M200005803	Plcl2 ^①	3.497202908	2.594136555	磷脂酶 C-L 2
M200006041	Chchd1 ^①	3.497202908	2.586954771	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix 结构域蛋白 1
M200006933	Ube2r2 ^①	3.497202908	2.542535365	遍在蛋白缀合酶 E2R 2
M300000946	Cd80 ^①	3.970854321	2.5156495	CD80
M400014440	Mgst3 ^①	3.970854321	2.416385845	微粒体谷胱甘肽 S-转移酶 3
M400011190	Ecsit ^①	1.487969801	2.398163818	
M300014263	Rfesd ^①	3.497202908	2.198316449	Rieske Fe-S 蛋白
M400003653	LOC433743 ^①	1.487969801	2.188447816	LOC433743
M200014420	Ppp1r11	1.487969801	2.176395778	蛋白质磷酸酶 1, 调节亚基 1
M300015514	2310022M17Rik ^①	1.487969801	2.165748078	
M200014529	2410005O16Rik ^①	3.497202908	2.131732918	
M300001826	Rwdd1 ^①	1.487969801	2.087257763	RWD 结构域蛋白 1
M200001333	Adssl1	3.497202908	2.069630646	腺苷酸(基)琥珀酸合成酶样 1
M400003089	EG239760 ^①	1.487969801	2.026087262	
M200002898	Syngri1	3.497202908	2.016395173	突触回蛋白 1
M400006060	LOC626150 ^①	1.487969801	2.013156983	

①HE/HC 与 HE/NC-DF 共同差异表达基因

有氧运动能够引起骨骼肌组织发生适应性改变,这些变化包括骨骼肌细胞线粒体生物合成增加,肌纤维类型改变以及代谢功能增强等^[9],所有这些结构及功能的变化均以基因表达谱的变化为基础。研究表明,经过 6 周有氧运动,NE 组小鼠骨骼肌相对 NC 组(NE/NC)有 74 个基因表达差异显著,其中 69 个基因表达上调,5 个基因表达下调,表明这些基因对运动因素敏感并且运动可能通过改变这些基因的表达而引起骨骼肌的适应性改变。对 HC/NC 和 NE/NC 两组差异表达基因进行分析,共发现 25 个相同基因(图 3),推测这些基因可能对高脂膳食及有氧运动干预因素均敏感。

长期进行有氧运动可有效促进糖、脂代谢,改善外周组织特别是骨骼肌对葡萄糖的摄取和利用,增强组织对胰岛素的敏感性,进而有效改善 IR^[10-12]。已有大量报道涉及有氧运动改善 IR 的机制研究^[13-15],但目前其具体机制仍不完全清楚。基因芯片技术的

图 3 NE/NC, HC/NC, HE/NC 差异表达基因



应用为发现有氧运动改善 IR 潜在相关基因提供了新的手段和途径。对 HE/NC 基因表达谱进行分析,发现差异表达基因 252 个,即小鼠在 IR 状态下受到 6 周有氧运动刺激后相对于正常安静对照小鼠骨骼肌共有 252 个基因表达出现显著差异。而其中 170 个基因(HE/NC-DF)表达不受高脂膳食或运动单因素影响,其差异表达仅出现在给予有氧运动干预的 IR 小鼠中,推测这些基因可能参与了运动改善

IR 的生物过程。

为进一步筛选运动改善 IR 相关基因,对比 HE 组和 HC 组基因表达情况(HE/HC),共发现两组差异表达基因 29 个(表 1)。将 HE/HC(n=29)与 HE/NC-DF(n=197)进行对比,发现 55%(n=16)的共同差异表达基因(表 1),因而进一步推测这 16 个基因可能与运动改善 IR 过程密切相关。按 GO 对其进行分类,这 16 个基因参与细胞的多种生物过程(biological process),包括代谢(metabolism)、发育(development)、转运(transport)、免疫应答(immune response)等,并且代谢相关基因占较大比重(37.5%),进一步证明了有氧运动在改善糖脂代谢中所发挥的巨大作用。由于基因芯片技术的局限性,依据芯片数据分析结果及目前对于基因分子功能的认识还无法确定这些基因与有氧运动改善 IR 的具体关系,因而还需要进一步深入研究。

4 结论

长期高营养饮食及运动过少是造成 IR 的重要因素。高脂饮食及 6 周有氧运动对小鼠骨骼肌基因表达均有显著影响。通过对比分析各组差异表达基因,初步筛选出有氧运动改善 IR 的潜在相关基因,为研究 IR 发生及运动改善 IR 的相关分子机制提供了理论基础。基因芯片数据分析结果仅作为一种证据和提示,而要确定相关基因与有氧运动改善 IR 的确切关系,还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Zanuso S, Jimenez A, Pugliese G, et al. Exercise for the management of type 2 diabetes: A review of the evidence[J]. *Acta Diabetol*, 2009, [Epub ahead of print].
- [2] Musi N, Goodyear LJ. Insulin resistance and improvements in signal transduction[J]. *Endocrine*, 2006, 29(1): 73—80.
- [3] Fernando P, Bonen A, Hoffman-Goetz L. Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1993, 71(10-11): 854—857.
- [4] Muoio DM, Koves TR. Lipid-induced metabolic dysfunction in skeletal muscle [J]. *Novartis Found Symp*, 2007, 286:24—38; discussion 38—46, 162—163, 196—203.
- [5] Hegarty BD, Furler SM, Ye J, et al. The role of intramuscular lipid in insulin resistance[J]. *Acta Physiol Scand*, 2003, 178(4): 373—383.
- [6] Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, et al. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B α [J]. *Diabetes*, 2002, 51(7): 2005—2011.
- [7] Hancock CR, Han DH, Chen M, et al. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(22): 7815—7820.
- [8] Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, et al. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in wistar rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(6): E1231—1238.
- [9] Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation[J]. *Sports Med*, 2007, 37(9): 737—763.
- [10] Berggren JR, Boyle KE, Chapman WH, et al. Skeletal muscle lipid oxidation and obesity: influence of weight loss and exercise [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(4): E726—732.
- [11] Toledo FG, Menshikova EV, Ritov VB, et al. Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2007, 56(8): 2142—2147.
- [12] Phielix E, Mensink M. Type 2 diabetes mellitus and skeletal muscle metabolic function [J]. *Physiol Behav*, 2008, 94(2): 252—258.
- [13] 苑红, 牛燕媚, 刘彦辉, 等. mTOR/S6K1 信号通路与有氧运动改善小鼠高脂饮食诱导胰岛素抵抗间的关系 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(4): 297—302.
- [14] 杜晓平, 衣雪洁, 符谦, 等. 运动干预对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌蛋白激酶 B 活性和蛋白与基因表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(4): 303—305.
- [15] 张玥, 姜宁, 苏丽, 等. PPAR α 与运动改善脂质代谢的关系[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(6): 495—498.