

中等强度运动对去卵巢大鼠骨量及cGMP-PKG II-EnaC通路的影响*

郑 陆¹ 陈晓红¹ 王智强¹ 王文荣¹ 刘 洋¹

摘要

目的:通过中等强度跑台运动干预,探讨运动经cGMP-PKG II-EnaC通路对去卵巢大鼠骨量的影响效应,为阐明有氧运动对骨量的影响及机制提供实验依据。

方法:3月龄雌性SD大鼠随机分为10组:BC(基础对照组)、SHAM4、8、12(假手术4、8、12周)组;OVX4、8、12(去卵巢对照4、8、12周)组;OVX+T4、8、12(去卵巢+运动4、8、12周)组。运动组采用跑台训练,坡度5°,5d/w。以DXA测定大鼠全身骨密度(bone mineral density, BMD);以ELISA测定血清环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)含量;以Western blot和实时PCR法分别测定cGMP依赖性蛋白激酶G II(cGMP dependent protein kinase, PKG II)和EnaC- γ 的蛋白及mRNA表达量。

结果:运动组大鼠BMD呈现出随运动时间增长而增加态势,OVX+T 12组BMD显著高于同期OVX组($P < 0.01$),OVX+T 8和12虽仍低于同期SHAM组,但无显著性差异。与同期OVX组比较,OVX+T8、12组cGMP血清水平、股骨PKG II mRNA、EnaC- γ mRNA表达均显著增加($P < 0.05$),但仍均低于同期SHAM组。与同期OVX组比较,OVX+T4、12组PKG II蛋白表达显著增加($P < 0.05$),但仍低于同期SHAM组(P 均 < 0.01),运动组PKG II蛋白降低程度显著减缓。OVX+T4、8、12组EnaC- γ 蛋白表达均显著高于同期OVX组(P 均 < 0.01),但仍低于同期SHAM组($P < 0.05-0.01$),降低程度显著减缓。

结论:中等强度跑台运动干预能增加去卵巢大鼠cGMP浓度,同时上调骨PKG II、EnaC- γ 蛋白及mRNA的表达;中等强度跑台运动能够有效地增加去卵巢大鼠骨密度;运动增加去卵巢大鼠骨量的机制与cGMP-PKG II-EnaC通路激活密切相关。

关键词 中等强度跑台运动;cGMP-PKG II-EnaC通路;骨密度;去卵巢

中图分类号:R493.R58 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-06-0617-08

Effects of moderate intensity training on bone mass and cGMP-PKG II-EnaC in rats with ovariectomy/
ZHENG Lu, CHEN Xiaohong, WANG Zhiqiang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016,
31(6): 617—624

Abstract

Objective: To determine the effects of moderate intensity treadmill running on bone mass by cGMP-PKG II-EnaC in ovariectomy(OVX) rats, and provide experimental basis for exploring the mechanism of moderate intensity aerobic training on bone mass.

Method: Three-month-old female SD rats were divided into 10 groups randomly. They were basal control (BC) group, SHAM4, 8, 12 (pseudooperation 4, 8, and 12 weeks), OVX4,8,12 (Ovariectomy 4, 8, and 12 weeks), OVX+T 4, 8, 12 (Ovariectomy+training 4, 8, and 12 weeks). OVX+T groups respectively received 4, 8, and 12 weeks aerobic training on treadmill (5 days/week, slope 5°). BMD was measured by dual energy X-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.06.002

*基金项目:北京市教委科研基地科技创新平台项目(PXM2012-014206-000037)

¹ 首都体育学院,北京,100191

作者简介:郑陆,女,博士,教授;收稿日期:2014-06-24

ray absorptiometry (DXA). Serum cGMP was determined by ELISA. PKG II and ENaC- γ mRNA of femur were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). PKG II and ENaC- γ level of femur were detected by western-blot.

Result: BMD showed growing along with the training time in OVX+T. BMD in OVX+T12 showed significant higher than that in OVX12 ($P < 0.01$). BMD in OVX+T8 and OVX+T12 showed lower than that in SHAM8 and SHAM12 but not significant. Comparing with OVX8 and OVX12, serum cGMP, PKG II mRNA, and ENaC- γ mRNA were significantly elevated in OVX+T8 and OVX+T12 respectively ($P < 0.05$), but lower than that in SHAM8 and SHAM12. Compared separately with OVX4 and OVX12, PKG II expression markedly increasing in OVX+T4 and OVX+T12 (all $P < 0.05$), but lower than that in SHAM4 and SHAM12 (all $P < 0.01$). Comparing with OVX4 8 and 12, ENaC- γ expression significantly higher in OVX+T4, OVX+T8, and OVX+T12 (all $P < 0.01$), but lower than that in relevant SHAM groups ($P < 0.01-0.05$).

Conclusion: The moderate intensity treadmill running intervention increased BMD and increased serum cGMP level, up-regulated PKG II mRNA and ENaC- γ mRNA expression, PKG II and ENaC- γ levels in femur of OVX rats. These results may provide a new clue that the mechanism of exercise increasing bone mass in OVX rats may be via cGMP-PKG II-EnaC pathway activity.

Author's address Capital University of Physical Education and Sports, Beijing, 100191

Key word the moderate intensity treadmill running; cGMP-PKG II-EnaC pathway; bone mineral density; ovariectomy

运动对骨健康及骨质疏松性骨折的康复均具有重要促进作用^[1-2]。采用运动手段干预骨健康的应用及其机制研究,已经成为体育科学和老年科学等多学科交叉领域的研究热点。但是,运动的健骨效应机制尚存在诸多不甚明了并亟待解读的空白点。

ENaC蛋白属于ENaC/DEG超基因家族,作为新型的非电压依赖性钠离子通道蛋白,主要调控跨上皮细胞的钠离子转运,维持体内钠离子平衡。已有研究证实,小鼠原代培养的成骨细胞及源于人股骨的成骨细胞^[3-4]上均存在ENaC表达,ENaC对成骨细胞的成骨具有正性影响作用^[5],钠离子与骨质疏松症可能有密切关系^[6-7]。雌激素可以上调ENaC的基因和蛋白表达,刺激成骨细胞后ENaC通道活性增高,并且环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)能明显增加ENaC通道活性,而cGMP依赖性蛋白激酶G II (cGMP dependent protein kinase, PKG, cGK II)基因敲除的小鼠头盖骨和胫骨中ENaC蛋白表达明显降低,提示PKG II基因与骨骼的发生和代谢具有直接关系。这些结果表明,成骨细胞表达ENaC可能参与骨代谢的调节。但是,目前国内外有关cGMP-PKG II-EnaC通路的研究甚少,ENaC在骨代谢中的调节机制尚不明确。同时,作为成骨细胞上重要的化学物质通道和可能的机械

应力感受器,ENaC在运动干预骨代谢过程中的变化特点和影响机制尚未见相关研究报道。因此,本研究结果将有助于阐释运动健骨的机制,为探索一条非药物性、非侵入性的骨质疏松预防及治疗途径,提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

3月龄健康雌性SD大鼠100只,体重(270 $\pm$ 10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,于北京大学实验动物中心(SPF/VAF级实验室)分笼饲养,每笼3只,环境温度控制为(20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度55%—58%,维持12/12h明暗环境。以国家标准啮齿类动物饲料行常规饲养,自由进食和饮水。大鼠适应性喂养1周后,随机分为4组:基础对照组(BC, n=10)、单纯去卵巢组(OVX)、假手术组(SHAM)、运动训练组(OVX+T)。

去卵巢组(OVX):大鼠行OVX手术,术后3天将其随机分为OVX4、OVX8、OVX12组,每组10只,分别在饲养4周、8周及12周后处死,并进行取材及指标测试;假手术组(SHAM):大鼠按照OVX模型制作方法进行假手术,手术步骤同OVX,术中仅取卵巢周围与卵巢等体积脂肪予以切除。术后3天将

其随机分为 SHAM4、SHAM8、SHAM12 组,每组 10 只,分别在饲养 4 周、8 周及 12 周后处死,并进行取材及指标测试;去卵巢+运动训练组(OVX+T):大鼠行 OVX 手术,术后 3 天将其随机分为 OVX+T4、OVX+T8、OVX+T12 组,每组 10 只,分别在完成 4 周、8 周、12 周运动后处死,并进行取材及指标测定。OVX 术后行大鼠阴道脱落细胞检查,4—5d/w,观察脱落细胞成熟程度,以确定去卵巢手术效果。

1.2 运动负荷方案

运动负荷的设定参照 Bedford TG^[8]报道的有氧运动负荷标准及郑陆等^[9]前期的动物实验负荷标准。采用段氏 PT2000 型鼠类跑台(杭州钱江科技公司)进行运动。运动方案为:起始跑速为 12m/min,持续时间均为 20min,跑台倾斜度均为 0°,隔日增加跑速 3m/min,增加运动时间 10min,第 2 周起跑速为 20m/min,持续时间为 60min,跑台倾斜为 5°,每周运动 5 天,休息 2 天,总运动时间 12 周。

本研究操作过程严格遵守《北京市实验动物管理条例》。本实验符合医学科学国际组织理事会(CIOMS)和 WHO《涉及动物的生物医学研究的国际伦理学准则》,实验中尽量避免不适、痛苦或使痛苦最小化,必要时进行镇静、止痛、麻醉或无痛苦处死。

1.3 取材

取材前 24h,予大鼠禁食。腹腔注射 10%水合氯醛(345mg/kg),麻醉后测定大鼠骨密度(bone mineral density, BMD)。予大鼠心脏取血处死,将大鼠全血静置取血清,置于-80℃保存,备用于 cGMP 测定。取大鼠右侧股骨,去除肌肉、肌腱等软组织,以生理盐水纱布包裹置于冻存管中,于-80℃保存,备用于 PKG II 及 ENaC 基因及蛋白测试。

1.4 指标测试及方法

1.4.1 BMD 测定:以 DXA (Lunar Prodigy, GE Inc., U.S.A)测量大鼠全身 BMD,用 enCORE(小动物分析软件,版本 10.50.086)进行分析。每日实验前,以随机附带模块对 DXA 进行质控检测。

1.4.2 cGMP 测定:以 ELISA 法测定血清 cGMP,按照试剂盒(Cayman Chemical Company 生产,货号 Cat No.581021, Lot No.0442726)说明操作。以酶标仪(BioTek 生产,型号 Synergy H1)测定 OD450

值,并依照标准曲线计算出样品中的特异性抗体或抗原含量。

1.4.3 PKG II 及 ENaC- γ mRNA 表达测定:采用 qRT-PCR 测定 PKG II 及 ENaC- γ 的 mRNA 表达。以 Trizol 法(Trizol 试剂盒)从骨粉中提取总 RNA。PKG II 及 ENaC- γ mRNA 反转录引物的设计与合成由北京天一辉远生物技术公司完成。

PKG II 引物:

PKG II Left Primer:5'GAAGGGAGCACCTTTTTCATCTT 3'

PKG II Right Primer:5'GGCCGATCTGACATCATCATCT 3'

ENaC- γ 引物:

ENaC- γ Left Primer:5'TGAGTACGGGCTGCAAGTCA 3'

ENaC- γ Right Primer:5'GACATTGCTGTCTCGATCTCAT 3'

GAPDH 引物:

Left Primer:5'TGCCCCCATGTTTGTGATG 3'

Right Primer:5'GTGGTCATGAGCCCTTCCA 3'

荧光定量 PCR 以 SYBR Premix Ex TaqTM II (购于宝生物工程(中国)有限公司)试剂盒测试。包括:预变性,95℃ 30s;PCR 反应(荧光检测),95℃ 3s,60℃ 30s,40 cycles;融解曲线分析,95℃ 15s,65℃ 60s,95℃ 15s。最后得出 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[10]将数据进行线性转换做进一步统计分析。

1.4.4 PKG II 及 ENaC- γ 蛋白表达:采用 Western Blot 方法进行 PKG II 及 ENaC- γ 蛋白测定。总蛋白提取,取右股骨上 1/2 置于液氮环境下研磨机内研磨。各组取等量骨粉,置于研钵中,加入含有蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich)的组织裂解液(Sigma-Aldrich),于冰上匀速研磨 15min。4℃,13000r/min,离心 15min,取上清。以 BCA 法进行蛋白定量(普利莱基因技术有限公司),按试剂盒说明书完成。以酶标仪测定 570nm OD 值,绘制标准曲线,并计算待测样品蛋白浓度。取各标本蛋白 100 μ l,加 5 $\times$ loading buffer,混匀 100℃煮沸 15min。Western blot 步骤包括:制备 10%分离胶和 5%浓缩胶(SDS-PAGE 凝胶)。将样品加入到 SDS-PAGE 胶中,每孔加样 140 μ g。浓缩胶 100V,分离胶 120V,恒压电泳。冰浴中,300mA 恒流 160min 转膜。用 5% BSA(用

10ml TBST溶解0.5g BSA)封闭,室温1h或4℃过夜。分别加入一定体积TBST溶液溶解的适当浓度PKG II及ENaC- γ 和 β -actin一抗(Santa curz)孵育,4℃过夜。在摇床上10—20ml TBST溶液振荡洗膜3次 $\times$ 10min。加入相应的一定体积TBST溶解并带有HRP标记的二抗(猴抗羊、羊抗兔及羊抗鼠IgG-HRP, Santa curz),室温孵育1h。在摇床上,10—20ml TBST溶液振荡洗膜3次 $\times$ 10min。显色:将Super ECL底物发光液的A、B液等体积混合,均匀滴于膜上,柯达X光胶片压片、感光、曝光,经显影、定影后,自来水冲洗,室温晾干。Western Blot数据分析,扫描仪扫描胶片,用Gel-Pro Analyzer 4.0软件扫描分析各条带灰度值,将PKG II、ENaC- γ 的灰度值分别与相应的 β -actin比值作为其蛋白的相对表达量。

1.5 统计学分析

采用SPSS 16.0软件进行数据统计分析,结果以均数 $\pm$ 标准差表示。结果为正态分布,以单因素方差分析分别对各组间的实验数据进行组间差异性检验,出现显著性时用最小显著差异法(LSD)多重比较检验。

2 结果

2.1 BMD

SHAM组大鼠BMD表现为随月龄增大而稳定增加,与BC组比较,SHAM各组BMD均显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。OVX组BMD呈依次缓慢下降态势,OVX8及OVX12均显著低于同期SHAM组(P 均 < 0.01)。OVX+T组BMD呈依次升高态势,随运动时间增长而增加,OVX+T4仍显著低于同期SHAM4($P < 0.05$),OVX+T8和12虽均低于同期SHAM组,但无显著性意义(P 均 > 0.05)。

与同期OVX组比较,OVX+T4组BMD略低,OVX+T8组略高但均无显著性差异(P 均 > 0.05);OVX+T12组呈现显著升高($P < 0.01$)。

OVX+T组各期组间比较,OVX+T8及12组BMD均显著高于OVX+T4(P 均 < 0.05),OVX+T8与12组BMD无显著差异($P > 0.05$)。见表1。

2.2 cGMP变化

与同期SHAM组比较,OVX8、12组及OVX+T4、8、12组cGMP血清水平均显著降低($P < 0.05$,

$P < 0.01$; $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。OVX4与SHAM4无显著差异。

与同期OVX组比较,OVX+T8、12组cGMP血清水平显著增加(P 均 < 0.05),OVX+T4组与OVX4组无显著差异。

各组组内比较,SHAM表现出随鼠龄增大,cGMP显著升高,各组间差异显著(P 均 < 0.05)。OVX8与4、OVX12与8组、OVX12与4组间均有显著性差异(P 均 < 0.05),并呈现随鼠龄周数增加cGMP血清水平降低态势。OVX+T各组cGMP浓度总体虽呈下降态势,但各组间无显著差异。见表2。

2.3 PKG II和ENaC- γ mRNA变化

2.3.1 PKG II mRNA的变化:与BC组比较,OVX4、8、12组、OVX+T8、12组的PKG II mRNA表达水平均呈显著降低($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$; $P < 0.05$, $P < 0.05$),SHAM4、8组PKG II mRNA表达水平均无显著性差异,而SHAM12组PKG II mRNA表达水平显著高于BC组($P < 0.05$)。

与同期OVX组比较,OVX+T8、12组PKG II mRNA表达显著增加(P 均 < 0.05),与同期SHAM组比较,OVX4、8、12组及OVX+T4、8、12组PKG II mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$; $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$)。

与同期OVX组比较,OVX+T8、12组PKG II mRNA表达显著增加(P 均 < 0.05),OVX+T4组PKG II mRNA无显著变化。

各组组内比较,SHAM12组PKG II mRNA表达水平显著高于BC组及SHAM4与8,SHAM8与12组间PKG II mRNA表达水平均无显著差异,

表1 大鼠全身BMD ($\bar{x} \pm s, g/cm^2$)

周数	SHAM	OVX	OVX+T
BC	0.146 $\pm$ 0.01		
4w	0.155 $\pm$ 0.00	0.148 $\pm$ 0.00	0.146 $\pm$ 0.00
8w	0.158 $\pm$ 0.01	0.144 $\pm$ 0.01	0.155 $\pm$ 0.00
12w	0.159 $\pm$ 0.00	0.143 $\pm$ 0.00	0.156 $\pm$ 0.00

表2 大鼠血清cGMP浓度变化 ($\bar{x} \pm s, pmol/ml$)

周数	SHAM	OVX	OVX+T
4w	2.25 $\pm$ 0.03	1.92 $\pm$ 0.02	2.01 $\pm$ 0.03
8w	2.31 $\pm$ 0.06	1.84 $\pm$ 0.05	1.96 $\pm$ 0.02
12w	2.42 $\pm$ 0.07	1.72 $\pm$ 0.05	1.93 $\pm$ 0.03

SHAM12组 PKG II mRNA 显著高于 SHAM4($P < 0.05$)。OVX8与4、OVX12与8组、OVX12与4组间均有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$),并呈现出随着鼠龄周数增加PKG II mRNA 表达降低态势。OVX+T8与4、OVX+T12与4组组间有显著性差异(P 均 < 0.05),OVX+T4组 PKG II mRNA 表达量最大。见表3。

2.3.2 ENaC- γ mRNA 变化:与BC组比较,OVX4、8、12组、OVX+T4、8、12组的ENaC- γ mRNA 表达水平均呈显著降低($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01; P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$),SHAM8组 ENaC- γ mRNA 表达水平显著高于BC组($P < 0.01$),SHAM4、12组表达水平无显著性差异。

与同期SHAM组比较,OVX4、12组及OVX+T4、8、12组 ENaC- γ mRNA 表达水平均显著降低($P < 0.05, P < 0.01; P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$)。

与同期OVX组比较,OVX+T8、12组 ENaC- γ mRNA 表达显著增加($P < 0.05, P < 0.01$),OVX+T4组 ENaC- γ mRNA 无显著变化。

各组组长内比较,SHAM8组 ENaC- γ mRNA 表达水平显著高于SHAM4($P < 0.01$),其他组间无显著差异。OVX8与4、OVX12与8组、OVX12与4组间均有显著性差异($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$),并呈现随鼠龄周数增加ENaC- γ mRNA 表达降低态势。OVX+T8与4、OVX+T12与8组、OVX+T12与4组组间有显著性差异($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$),亦表现随鼠龄周数增加ENaC- γ mRNA 表达降低态势。见表4。

表3 PKG II mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)			
周数	SHAM	OVX	OVX+T
BC	1.00±0.00		
4w	1.02±0.07	0.86±0.03	0.93±0.09
8w	1.04±0.03	0.72±0.04	0.84±0.03
12w	1.08±0.02	0.64±0.01	0.76±0.03

表4 ENaC- γ mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)			
周数	SHAM	OVX	OVX+T
BC	1.00±0.00		
4w	1.04±0.02	0.89±0.02	0.91±0.02
8w	1.11±0.01	0.78±0.03	0.83±0.02
12w	1.06±0.02	0.69±0.01	0.76±0.02

注:mRNA 表达差异用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算

2.4 PKG II 和ENaC- γ 蛋白变化

2.4.1 PKG II 蛋白表达变化:OVX4、8、12组、OVX+T4、8、12组与BC组相较,PKG II 蛋白表达水平均呈显著降低(P 均 < 0.01);SHAM4、8、12组与BC组均无显著性差异。

与同期SHAM组比较,OVX4、8、12组及OVX+T4、8、12组 PKG II 蛋白表达水平均显著降低(P 均 < 0.01)。

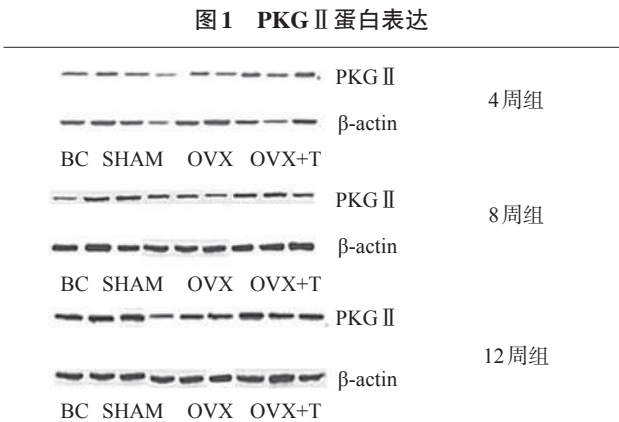
与同期OVX组比较,OVX+T4、12组 PKG II 蛋白表达显著增加(P 均 < 0.05),OVX+T8组 PKG II 蛋白无显著变化,OVX+T组 PKG II 蛋白降低程度显著减缓。

各组组长内比较,SHAM各组组长间无显著性差异。OVX12与8组、OVX12与4组间均有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$),并呈现随鼠龄周数增加PKG II 蛋白表达降低态势。OVX+T8与4、OVX+T12与4组组长间有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$),亦表现随鼠龄周数增加PKG II 蛋白表达降低态势。见图1,表5。

2.4.2 ENaC- γ 蛋白变化:OVX4、8、12组、OVX+T4、8、12组与BC组相较,ENaC- γ 蛋白表达水平均呈显著降低($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01; P < 0.01, P < 0.05, P < 0.05$);SHAM4、8、12组与BC组均无显著

表5 PKG II 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)			
周数	SHAM	OVX	OVX+T
BC	1.00±0.00		
4w	1.03±0.09	0.51±0.03	0.66±0.09
8w	1.01±0.02	0.48±0.04	0.55±0.03
12w	1.01±0.03	0.39±0.02	0.50±0.04

注:蛋白表达差异用灰度值计算,将各条带的灰度值分别与相应 β -actin 的比值作为其蛋白的相对表达量



性差异。

与同期SHAM组比较,OVX4、8、12组及OVX+T4、8、12组ENaC- γ 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

与同期OVX组比较,OVX+T4、8、12组ENaC- γ 蛋白表达降低程度显著减缓(P 均 < 0.01)。

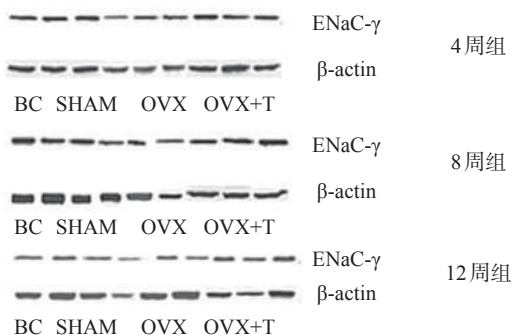
各组组内比较,SHAM各组组间无显著性差异。OVX8与4、OVX12与8组组间均有显著性差异(P 均 < 0.01),并呈现随鼠龄周数增加ENaC- γ 蛋白表达降低态势。OVX+T8、OVX+T12与4组组间有显著性差异(P 均 < 0.01),亦表现随鼠龄周数增加ENaC- γ 蛋白表达降低态势。见图2,表6。

表6 ENaC- γ 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)

周数	SHAM	OVX	OVX+T
BC	1.00 $\pm$ 0.000		
4w	1.02 $\pm$ 0.018	0.55 $\pm$ 0.016	0.65 $\pm$ 0.022
8w	0.98 $\pm$ 0.021	0.44 $\pm$ 0.029	0.55 $\pm$ 0.014
12w	1.01 $\pm$ 0.025	0.36 $\pm$ 0.014	0.51 $\pm$ 0.017

注:蛋白表达差异用灰度值计算,将各条带的灰度值分别与相应 β -actin的比值作为其蛋白的相对表达量

图2 ENaC- γ 蛋白表达



3 讨论

3.1 cGMP/PKG II 通路对骨代谢的作用

骨骼的生长、代谢、更新、重建均以对所承受力学刺激的适应为前提,运动负荷的机械刺激传导作用于骨骼,传导过程需要借助相关信号因子的接力,并通过相应路径而实现,最终实现对骨骼形态结构功能及骨量的调控^[11]。cGMP/PKG II 信号通路对骨代谢的影响和作用近些年来受到关注的研究热

点。cGMP作为第二信使,其主要作用方式为通过激活PKG而发挥作用。PKG是广泛存在于真核细胞内的一种丝/苏氨酸蛋白激酶。其中,PKG II分布比较局限,主要分布在小肠微绒毛上皮、中枢神经系统和肾脏的一些细胞中,近来发现其在骨组织中也有表达^[12]。PKG II的主要作用是转导cGMP信号,发挥对骨骼生长的调控作用^[13]。有研究表明,增加细胞内的cGMP可以促进软骨细胞的增殖与矿化,PKG II在这一软骨内成骨过程中发挥了关键性的直接调节作用^[14,17]。PKG在骨组织中的存在形式主要是PKG II,其在介导细胞生长过程的信号转导中发挥了核心作用^[15-16]。PKG II可通过增加生长板软骨数量和加速软骨成骨过程,导致骨生长加强^[18]。并与氯离子转运、钠离子转运和转录过程的调节密切相关^[19]。通过cGMP-PKG的介导作用能够加速成骨细胞的分化与矿化过程^[20]。

本研究结果表明,SHAM各组cGMP浓度呈现升高态势(P 均 < 0.05),提示在大鼠自然生长过程中,cGMP参与整体生长调控,其中包括对骨组织的代谢调控。而运动8及12周组(OVX+T8、12组)cGMP浓度分别显著高于同期去势大鼠(OVX8及12),但OVX+T4、8、12组各组间无显著差异。提示持续4周以上的中等强度跑台运动可有效上调cGMP。同时,运动组各组间结果比较可见,4周组(OVX+T4组)PKG II mRNA及PKG II蛋白表达量最大,且运动4、12周组PKG II mRNA及蛋白均显著高于同期OVX组,且这种效应以运动4周组最强。表明持续4周的中等强度跑台运动即可有效激活PKG II表达。cGMP的上调及其下游信号分子PKG II对运动负荷的迅速反应,经cGMP/PKG II通路实现对力学信号的转导,进而发挥对骨代谢的调节作用。

3.2 运动对EnaC的影响及其对骨量的分子调控机制

ENaC是细胞膜上的大分子糖基化蛋白,具有调节钠离子平衡和传导机械刺激等功能,属于一种新型非电压依赖性离子通道蛋白^[21],可以依据电化学梯度调节钠离子跨膜转运,对于维持体内血容量和血压的平衡具有重要作用^[22]。ENaC主要表达在肺、肾等多种组织器官^[23]。20世纪90年代末,发现其在禽类成骨细胞、软骨细胞上也有分布^[24]。在哺乳类动物体内上皮钠通道蛋白ENaC α , β , γ 三种亚

单位可以构成不同异聚体,异聚体的结构与机体所处的生理及病理状态有关^[21,24],阿米洛利是ENaC家族的阻断剂,可以抑制通道复合体。据研究报道,Na⁺变化明显影响成骨细胞中ENaC- α 的转录水平,表现为低浓度Na⁺促进基因转录,高浓度Na⁺抑制其转录;而且ENaC- α 基因的转录变化与成骨细胞分化矿化的一些重要指标基因变化一致,表明ENaC与Na⁺对成骨细胞成骨功能的影响作用具有一定相关性^[25]。推测ENaC通过调节成骨细胞内、外钠平衡,对成骨细胞分化及矿化功能活性产生一定影响,从而影响成骨功能。通过细胞体外培养并施加雌激素干预的研究证实,成骨细胞上有ENaC表达,雌激素促进成骨细胞增殖,同时ENaC的mRNA表达量增加,说明ENaC参与了成骨细胞的增殖过程,且雌激素通过调节ENaC影响成骨细胞的骨形成功能^[26]。最新研究发现,采用SiRNA技术沉默原代培养的大鼠成骨细胞ENaC基因后,成骨细胞的成骨相关基因(ALP、COL-I)表达下降,而于原代培养的大鼠和小鼠成骨细胞里加入雌二醇后,其ENaCmRNA表达量增加。说明成骨细胞上的ENaC参与了成骨细胞的成骨^[27]。Kizer等^[28]的研究发现,ENaC参与了成骨细胞在压力刺激作用下的机械力学信号的传导,调节了成骨细胞相关基因的表达信号转导,从而发挥其调节骨形成的功能。

ENaC可能作为cGMP/PKG II信号通路下游的信号分子在骨形成中发挥调节作用^[23]。进一步的研究发现,前列腺素活性促进剂阿魏酸能够促进cGMP分泌,增加PKG II和ENaC以及成骨细胞成骨相关基因mRNA的表达,证实了cGMP-PKG II-ENaC信号通路参与成骨细胞骨形成的调节^[29]。cGMP通过cGMP/PKG II/ENaC通路,刺激成骨细胞增殖、分化和成骨相关基因的表达^[28]。上述研究表明,ENaC参与成骨细胞的成骨作用可能通过cGMP-PKG信号系统来实现,即通过cGMP-PKG信号系统影响ENaC,进而影响成骨细胞的增殖分化和成骨功能。尽管ENaC在机械力依赖的反应中发挥着显著作用,但尚不完全清楚其传导机械刺激的传感器作用机制^[30],尚需通过进一步的研究予以确定。

本研究结果发现,各SHAM组大鼠的全身骨密度、骨PKG II基因和蛋白、ENaC基因和蛋白的表达

与BC组均无显著性差异。OVX组与OVX+T组PKG II及ENaC基因及蛋白表达均显著低于SHAM组,说明PKG II和ENaC基因及蛋白表达下调,究其原因可能与大鼠雌激素水平下降有关。由于这种表达下调与骨密度的变化趋势相吻合,提示去势导致的雌激素水平大幅度降低,通过转录及翻译水平共同影响PKG II和ENaC表达,干扰骨量的维系,表明PKG II/ENaC通路的表达受抑可能是绝经后骨质疏松的发病机制之一。

在运动影响下,PKG II/ENaC信号通路的表达如何,是否亦能通过传导力学负荷刺激,实现促进成骨增加骨量的作用。本研究可见,运动4周组(OVX+T4组与OVX组比较)PKG II及ENaC基因和蛋白表达最高,表明运动对PKG II及ENaC具有显著刺激效应。提示运动负荷有效激活PKG II/ENaC通路,而这种效应以运动4周表达最强。同时,运动8周和12周组(OVX+T8和12组)PKG II基因及蛋白、ENaC基因及蛋白表达均显著高于同期OVX组($P < 0.05-0.01$),且运动8周和12周组全身BMD出现升高,并与同期SHAM组无显著差异。结果提示,中等强度运动可以有效延缓去势大鼠骨量的下降,而延缓的机制至少部分是通过cGMP/PKG II/ENaC信号通路实现对成骨促进作用的结果。

本结果显示,运动激活cGMP/PKG II/ENaC信号通路在先,而出现的骨量增加在运动持续4周以上(本实验在8周和12周均出现增高)。这些一致性结果出现的时间节点恰与骨代谢周期的时间长度吻合一致^[31],表明运动延缓去势大鼠骨量减少的效应需要一定的作用时间。该结果亦得到本项目组另一项平行研究结果所证实^[32],即运动8周和12周组去势大鼠的成骨功能均显著增强。该结果亦与其他有关运动改善骨量的研究报道结果一致^[33-34]。

综上所述,本研究就运动对cGMP/PKG II/EnaC通路蛋白及mRNA表达的影响,以及运动负荷通过cGMP/PKG II/EnaC通路对骨量的调控机制进行了研究。结果表明,持续4—12周的中等强度跑台运动,可以有效增加cGMP/PKG II/EnaC通路各组分mRNA及蛋白的表达,cGMP/PKG II/EnaC信号通路的激活,通过促进成骨细胞增殖、分化和矿化过程,至少可以部分地抵抗因去势雌激素水平显著

降低所造成的骨丢失,延缓整体骨量的降低。

中等强度跑台运动干预能够有效地增加去卵巢大鼠骨密度;中等强度跑台运动能够增加去卵巢大鼠血清cGMP浓度,同时上调骨PKGⅡ、ENaC- γ 蛋白及mRNA的表达;中等强度跑台运动干预增加去卵巢大鼠骨量的机制与cGMP-PKGⅡ-ENaC通路的激活密切相关。

参考文献

- [1] Hind K, Burrows M. Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: a review of controlled trials[J]. Bone, 2007, 40(1):14—27.
- [2] 郑陆,陈晓红,周志雄,等.绝经女性体力活动特征及其与骨量关系的研究[J].中国运动医学杂志,2013,32(3):197—203.
- [3] Trujillo E, Alvarez de la Rosa D, Mobasheri A, et al. Sodium transport systems in human chondrocytes. II. Expression of ENaC, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter and Na^+/H^+ exchangers in healthy and arthritic chondrocytes[J]. Histo Histopathol, 1999, 14(4):1023—1031.
- [4] Mobasheri A. Regulation of Na^+ , K^+ -ATPase density by the extracellular ionic and osmotic environment in bovine articular chondrocytes[J]. Physiol Res, 1999, 48(6):509—512.
- [5] Mobasheri A, Barrett-Jolley R, Shakibaei M, et al. Enigmatic Roles of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) in Articular Chondrocytes and Osteoblasts: Mechanotransduction, Sodium Transport or Extracellular Sodium Sensing[M]. Mechanosensitivity in Cells and Tissues. Moscow: Academia, 2005. 452—464.
- [6] Devine A, Criddle RA, Dick IM, et al. A longitudinal study of the effect of sodium and calcium intakes on regional bone density in postmenopausal women[J]. Am J Clin Nutr, 1995, 62(4):740—745.
- [7] Cohen AJ, Roe FJ. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible aetiological role of dietary salt[J]. Food Chem Toxicol, 2000, 38(2—3):237—253.
- [8] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. J Appl Physiol, 1979, 47(6):1278—1283.
- [9] 郑陆,潘力平,隋波,等.运动性动情周期紊乱动物模型的建立[J].山东体育学院学报,2005,21(2):46—49.
- [10] 纪冬,辛绍杰.实时荧光定量PCR的发展和数据分析[J].生物技术通讯,2009,20(4):598—600.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402—408.
- [12] 郑陆,王智强.运动与骨骼的力学信号转导[J].山东体育学院学报,2009,25(2):40—44.
- [13] 高建林.第二信使cAMP/cGMP信号通路调节骨形成的研究进展[J].中国药理学通报,2010,26(12):1545—1549.
- [14] Hofmann F, Wegener JW. cGMP-dependent protein kinases (cGK)[J]. Methods Mol Biol, 2013, (1020):17—50.
- [15] Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice[J]. Front Biosci, 2005, (10):1279—1289.
- [16] 李昕,张瑞明.降钙素与骨代谢的研究进展[J].内蒙古医学院学报,2010,32(3):79—82.
- [17] Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, et al. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion[J]. Physiol Rev, 2006, 86(1):1—23.
- [18] Gillespie JR, Ulici V, Dupuis H, et al. Deletion of glycogen synthase kinase-3 β in cartilage results in up-regulation of glycogen synthase kinase-3 α protein expression[J]. Endocrinology, 2011, 152(5):1755—1766.
- [19] Schlossmann J, Desch M. cGK substrates[J]. Handb Exp Pharmacol, 2009, (191):163—193.
- [20] 崔梓豪,李青南,陆幸妍.上皮钠通道与疾病和药物机制的研究进展[J].广东医学,2012,33(19):3002—3004.
- [21] Fyfe GK, Quinn A, Canessa CM. Structure and function of the Mec- ENaC family of ion channels[J]. Semin Nephrol, 1998, 18(2):138—151.
- [22] 张丽,李南方.上皮细胞钠离子通道ENaC及其基因研究现状[J].国际遗传学杂志,2007,30(1):29—33.
- [23] Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation[J]. Physiol Rev, 1997, 77(2):359—396.
- [24] Killick R, Richardson G. Isolation of chicken alpha ENaC splice variants from a cochlear cDNA library[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1350(1):33—37.
- [25] 卢丽,吴亮,陈珺,等.钠离子对成骨细胞的影响及其与上皮钠通道的关系[J].南方医科大学学报,2011,11(31):1871—1873.
- [26] 陈珺,巫小容,卢丽,等.上皮钠离子通道参与雌激素影响成骨细胞成骨的作用[J].中国药学杂志,2011,46(3):180—184.
- [27] Chen J, Zhang H, Zhang X, et al. Epithelial sodium channel enhanced osteogenesis via cGMP/PKGII/ENaC signaling in rat osteoblast[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(4):2161—2169.
- [28] Kizer N, Guo XL, Hruska K. Reconstitution of stretch-activated cation channels by expression of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel cloned from osteoblasts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(3):1013—1018.
- [29] 高建林.阿魏酸通过调节钠离子通道(ENaC)介导骨形成的研究[D].广州:广东药学院,2009.
- [30] Drummond HA, Jernigan NL, Grifoni SC. Sensing tension: epithelial sodium channel/acid-sensing ion channel proteins in cardiovascular homeostasis[J]. Hypertension, 2008, 51(5):1265—1271.
- [31] 黄公怡.骨重建与骨质量[J].中华骨科杂志,2006,26(11):787—789.
- [32] 陈晓红,郑陆,于吕栋.不同持续时间中等强度运动对去卵巢大鼠骨量及骨微结构的影响[J].中国运动医学杂志,2015,34(6):571—577.
- [33] 周勇.传统体育对绝经女性骨密度的影响[J].北京体育大学学报,2004,27(3):354—355,360.
- [34] 赵宁.体育锻炼对中老年女性骨健康的影响[D].苏州:苏州大学,2004.