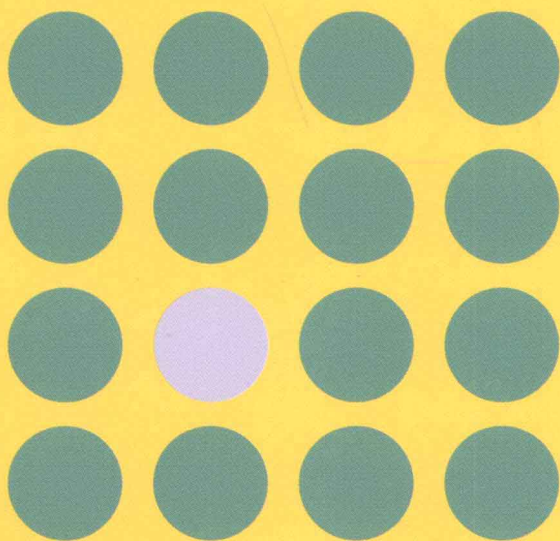


中国体育博士文丛

低氧和运动对骨骼肌 PKB/mTOR信号通路的影响

贺道远 著



北京体育大学出版社

中国体育博士文丛

低氧和运动对骨骼肌 PKB/ mTOR 信号通路的影响

贺道远 著

北京体育大学出版社

策划编辑:李志诚
责任编辑:冬梅
审稿编辑:熊西北
责任校对:春芝
版式设计:相林
责任印制:陈莎

图书在版编目(CIP)数据

低氧和运动对骨骼肌PKB/mTOR信号通路的影响/贺道远著.-北京:北京体育大学出版社,2010.10
ISBN 978-7-5644-0570-0

I. ①低… II. ①贺… III. ①气体代谢(运动生理)-影响-骨骼-蛋白质-合成-研究②体育运动-影响-骨骼-蛋白质-合成-研究 IV. ①G804.7

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第203439号

低氧和运动对骨骼肌PKB/mTOR信号通路的影响 贺道远 著

出版:北京体育大学出版社
地址:北京海淀区信息路48号
邮编:100084
邮购部:北京体育大学出版社读者服务部 010-62989432
发行部:010-62989320
网址:www.bsup.cn
印刷:北京市昌平阳坊精工印刷厂
开本:787x1092毫米 1/16
印张:7.25

2010年11月第1版第1次印刷

定价:28.00元

(本书因装订质量不合格本社发行部负责调换)

序 言

20 世纪生命科学所取得的巨大进步极大地影响了人们对运动生理学理解，同时也将运动生理学研究从传统组织器官水平推进到了细胞信号转导水平。依据分子生物学的观点，运动对基因表达调控是机体适应运动的主要方式。运动对基因表达调控成为近十年来运动分子生物学研究的重要内容。基因表达的调控既表现为转录水平的调控，也包括翻译水平的调控。但中国运动生理学研究过去的研究仅关注运动对转录的调控，如广泛采用 RT-PCR 方法研究运动如何影响 mRNA 水平的变化。虽然转录（DNA 到 mRNA）调控是基因特异性表达调控的基础，但 mRNA 变化并不能完全反映现实蛋白质水平的变化，翻译（mRNA 到蛋白质）是联系基因组和蛋白组的桥梁，翻译的调控同样是基因表达调控的重要环节。因此，运动对翻译调控的影响机理研究是近年国外学者开始关注的重要研究领域。

低氧和运动影响肌肉生长，研究证实力量运动促进骨骼肌适应性肥大，而长期低氧暴露抑制了肌肉生长。但低氧和运动效应的具体分子机制至今尚不清楚。肌肉生长的调控既涉及到转录水平又涉及到翻译水平，运动对翻译的调控是调控肌肉生长的重要一环，理应引起研究者的关注。因其专业修养和研究兴趣所致，运动对翻译的调控自然引起了贺道远博士的关注，由此我们合作申请了国家自然科学基金课题，并着

手进行项目的研究。

在三年的博士研究生阶段，贺道远一直刻苦努力，潜心研究这一课题，采用组织学、生物化学、分子生物学等技术，克服了实验技术等诸多障碍，基本确立了低氧、运动与mTOR 信号的关系，首次在国内运动医学领域进行了开创性研究，对我们的后续研究奠定了坚实的理论基础。作为其博士生导师，我为其所取得的成绩深感欣慰。

运动对翻译调控的研究是运动生理学研究的新领域，还需要进行大量的实验探索。希望本书的出版能对有志于该领域研究的学者有一定的借鉴作用。

北京体育大学运动生理学教授
中国体育科学学会
运动生理生化专业委员会委员

曾凡星



摘 要

目的：为探讨运动和低氧对骨骼肌蛋白质合成的影响和调控机制，本文研究了运动和低氧对肌肉生长的正负调控因子 IGF-1、Myostatin 表达和 PKB/mTOR 信号通路的影响。

方法：以 SD 大鼠为研究对象，随机分为常氧对照组、常氧运动组、低氧暴露组和高住低训组四大组。低氧暴露方式为每天晚上在氧浓度 13.6% 的低氧舱内低氧暴露 12 小时，白天为常氧环境的间歇性低氧暴露方式。运动方式为坡度 5°，上坡跑，速度 20m/min，每次 60min，1 次/天，6 天/周的跑台运动。常氧下运动后 1 小时高住低训组再继续进行低氧暴露 12 小时。常氧运动组、高住低训组分别进行 1 天、28 天和（或）复氧 7 天的运动和（或）低氧暴露。采用 RT-PCR 方法、ELISA 和 western 等方法分别检测大鼠腓肠肌中 IGF、Myostatin、PKB、mTOR、p70S6K 的表达水平。

结果：（1）28 天高住低训组大鼠体重和骨骼肌质量显著下降，骨骼肌蛋白含量有下降趋势。（2）28 天高住低训组骨骼肌 IGF-1 蛋白表达显著下降 ($p < 0.05$)、Myostatin 蛋白表达显著上升 ($p < 0.05$)。（3）28 天常氧运动组骨骼肌磷酸化 PKB、mTOR 和 p70S6K 蛋白表达都显著上升 ($p < 0.05$)。（4）28 天高住低训组骨骼肌 mTOR 表达显著下降，p70S6K 蛋白表达无变化，而复氧 7 天后表达都显著上升 ($p < 0.05$)。

结论：（1）运动和低氧暴露抑制骨骼肌蛋白合成，其机

制可能是通过调节 mTOR 信号通路进行的。(2) IGF-1 和 Myostatin 以相反的作用共同参与运动和低氧运动对骨骼肌生长和蛋白质代谢的调控。(3) 运动和低氧调控 mTOR 信号可能存在 IGF-1 参与的 PKB/mTOR 途径和非 IGF-1 参与的其他途径。

关键词：低氧运动；生长因子；翻译调控；肌肉生长抑制素；哺乳动物雷帕霉素靶蛋白



Abstract

Aims: To study the effect and mechanism of hypoxic exercise on protein synthesis in skeletal muscle, it tested the effect of exercise and hypoxia on IGF-1 and Myostatin expression which are positive and negative regulating factor of muscle growth, and the influence on PKB/mTOR signal pathway.

Materials and methods: SD rats were randomly divided into four groups: normoxia control group, normoxic exercise group, hypoxic exposure group, living high training low (HiLo) group. Hypoxic exposure treatment consisted of intermittent hypoxia with 13.6% O₂ for 12 h/day under normobaric conditions in hypoxic chamber, and the training protocol consisted of treadmill running with 5° incline, 20 m/min, 1 h/day, 1 time/day, 6 days/wk. One hour after the exercise under normoxic condition, the HiLo group rats were exposed to hypoxia under normobaric condition for 12 h. 1 day, 28 days of exercise and intermittent hypoxia exposure (13.6% oxygen concentration), 7 days of reoxygen and exercise are carried out in the HiLo group and the normoxic exercise group. IGF-1, Myostatin, PKB, mTOR, p70S6K expression in gastrocnemius muscle were tested with the method of RT-PCR, ELISA, western blot.

Results: (1) After exercise and hypoxia exposure for 28 days, the HiLo group rats body weight, muscle mass and total protein content had been the decreased tendency; (2) After exercise and hypoxia exposure for 28 days, IGF-1 protein expression in muscle decreased significantly, myostatin protein expression increased significantly in the HiLo group ($p < 0.05$); (3) After 28 days exercise, phosphorylated PKB protein,



mTOR and p70S6K protein expression in muscle increased significantly; (4)After 28 days living high training low, mTOR protein expression in muscle had no change, but increased significantly after 7 days reoxygen.

Conclusions: (1) Exercise followed by hypoxia repress muscle protein synthesis, and its mechanism may be the regulation of exercise and hypoxia on mTOR signal in skeletal muscle. (2) In the condition of exercise and hypoxia, IGF-1 and Myostatin expression have complete contrast changes and involved in the regulation of exercise and hypoxia on muscle growth and metabolism of muscle protein together. (3) Exercise and hypoxia regulate mTOR signal via PKB/mTOR pathway maybe involved in IGF-1 and others pathway not involved in IGF-1.

Key Words: hypoxic exercise; growth factor; translation regulation; myostatin; Mammalian target of Rapamycin (mTOR)

目 录

1 前 言	(1)
2 文献综述	(4)
2.1 低氧运动和骨骼肌蛋白质代谢调控	(4)
2.2 肌肉生长调控因子 IGF-1 和 Myostatin	(12)
2.3 蛋白翻译调控与 PKB/mTOR 信号通路	(15)
3 研究一：低氧和运动对骨骼肌形态和蛋白含量的影响	(21)
3.1 引 言	(21)
3.2 材料与方法	(21)
3.3 结 果	(26)
3.4 分析与讨论	(30)
3.5 小 结	(34)
4 研究二：低氧和运动对骨骼肌 IGF-1 和 Myostatin 表达的影响	(35)
4.1 引 言	(35)

4.2	材料与amp;方法	(35)
4.3	结 果	(42)
4.4	分析与讨论	(47)
4.5	小 结	(54)
5	研究三：低氧和运动对骨骼肌 mTOR 信号的影响	(55)
5.1	引 言	(55)
5.2	材料与amp;方法	(56)
5.3	结 果	(59)
5.4	分析与讨论	(68)
5.5	小 结	(72)
6	全文总结	(73)
6.1	研究方法	(73)
6.2	研究结果	(73)
6.3	运动、运动和低氧影响 mTOR 信号的可能机制探讨	(74)
6.4	研究结论	(76)
6.5	本文特色和创新	(77)
	致 谢	(78)
	参考文献	(80)
	附 录	(98)



1 前 言

运动影响骨骼肌蛋白质合成。阻力运动后肌肉蛋白质含量将增加^[1]。较长时间耐力运动^[2]、耐力运动加力量运动的组合运动方式也可增加肌肉中蛋白质合成^[3]。缺乏体力活动会导致肌肉蛋白质合成下降^[4]。一些长时间的力竭性运动往往导致蛋白质分解增加。低氧训练对蛋白质代谢影响的研究报道不多, 研究结果不尽相同, 大部分研究显示低氧运动是抑制合成的。低氧复合运动时蛋白质合成的变化和调节是一个复杂的过程, 从内分泌的角度看, 与一些激素, 如儿茶酚胺、生长激素、胰岛素、雄激素等的变化有关; 从细胞分子水平看, 与骨骼肌细胞内分子的转录和翻译的调控有关。

低氧训练已经广泛应用到体育运动训练实践各领域中。低氧训练模式主要包括: 传统高原训练方式以及间歇性低氧训练、高住低练、低住高练等新的人工模拟低氧训练方式, 是在运动训练周期中持续或间断采用低氧条件刺激, 利用高原自然或人工模拟低氧环境对人体所产生的特殊生物学效应, 配合运动训练来增加机体的缺氧程度, 以调动体内的机能潜力, 从而产生一系列有利于提高运动能力的抗缺氧生理反应及适应, 进而达到提高运动成绩的目的^[5]。关于低氧训练的生理学基础的理论研究已经有了大量的报道, 比较集中在有氧耐力方面, 能提高最大摄氧量、红细胞生成素(EPO)、血红蛋白等水平; 有关低氧训练与免疫的关系、低氧训练与个体适应基因选材的关系等有关低氧训练的课题已经进行和正在进行深入研究, 而低氧训练对蛋白质代谢调控的研究还有待深入。

在调节肌肉生长和蛋白质合成的一些生长因子中, IGF-1 一直引人关注。IGF-1 可促进肌肉生长和蛋白质合成^[6,7]。运动影响骨骼肌中 IGF-1 的水平, 阻力运动后 IGF-1 水平增加^[8], 耐力运动对 IGF-1 水平有不同影响^[9,10]。研究表明, IGF-1 在运动时蛋白合成中起正调控作用。

Myostatin 是一种新的细胞因子, 对肌肉的生长起负调控作用。

Myostatin 表达下调导致肌肉的肥大, Myostatin 基因敲除的小鼠其骨骼肌体积是正常野生型小鼠的 2~3 倍以上。在一种称为双肌现象的比利时蓝牛 (Belgian blue) 和皮尔蒙特牛 (Piedmontese) 中, Myostatin 基因发生突变, 肌肉明显增加。Myostatin 表达上调导致肌肉萎缩, 如后肢去负荷^[12,13]、空中飞行失重^[14]、卧床休息^[15]、衰老。运动影响 Myostatin 的表达^[13,16]。研究显示, 阻力运动后血液及肌肉中的 Myostatin 的表达下降, 并且 Myostatin 的表达与肌肉质量和体积, 肌纤维面积、蛋白含量呈现负相关^[17,18]。

目前还没有任何有关低氧运动对 IGF-1 和 Myostatin 的研究报道。由于已有的研究提示骨骼肌蛋白的变化与 IGF-1 和 Myostatin 有关, 因此低氧运动中蛋白代谢的变化也可能与 IGF-1 和 Myostatin 表达变化有关。

越来越多的证据表明, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 在翻译调控中占有中心的地位^[19], 调节蛋白翻译的起始, 是控制肌肉生长的重要信号分子^[20,21]。目前, mTOR 信号通路比较明确的有三条: 一是生长因子影响途径。IGF-1 与其受体 IGF-1R 结合形成配基受体复合物后, 依次激活胰岛素受体底物 (IRS)、PI3K、蛋白激酶 B (PKB)、mTOR 磷酸化过程, 即 PI3K/PKB/mTOR 途径^[22]。二是能量变化影响途径。在机体消耗能量时, AMP/ATP 比值增加, 会抑制 mTOR 的活性; 反之增加 mTOR 的活性。mTOR 对能量状态的感受正好与 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 的变化相反, 被认为是除 AMPK 外的第二个能量感受器。三是一些氨基酸 (AA) 激活 mTOR 的途径。可能有几种途径, 具体方式还不太清楚^[23]。mTOR 的下游靶蛋白至少有两种, 即 4E-BP1 和 p70S6K。4E-BP1 和 p70S6K 是蛋白质合成的重要调控因子, 4E-BP1 通过磷酸化来调节 eIF4E 的活性再影响 eIF4F 形成而调节翻译的起始, p70S6K 的磷酸化被认为是提高翻译效率的关键因素。目前对调节 mTOR 活性的其他可能信号途径仍然在探索之中, 如低氧刺激、热应急等。

目前虽然有较多研究报道了运动能调节 mTOR 信号的活性, 但其机制还不清楚。低氧复合运动对 mTOR 信号的影响还未见报道。

运动使肌细胞膜通透性增加、骨骼肌的血流量增加、细胞内氨基酸增多; 运动中一些激素, 如儿茶酚胺、生长激素、胰岛素样因子、雄激素等发生变化; 运动中能量的变化引起 ATP/AMP 的改变; 运动

使骨骼肌局部缺氧、热应激等各种环境变化。这些可能的刺激因素与调节蛋白合成的 mTOR 信号的上游通路具有明显的对应关系,因此 mTOR 信号可能在运动、低氧运动调节蛋白合成过程中起关键的作用。

运动对基因表达的调控主要表现为转录水平的调控和翻译水平的调控。从目前的研究看,运动对转录调控的研究已被关注,广泛采用 RT-PCR 方法研究运动如何影响 mRNA 水平的变化。虽然转录(DNA 到 mRNA)调控是基因特异性表达调控的基础,但是 mRNA 变化并不能完全反映现实蛋白质水平的变化,翻译(mRNA 到蛋白质)水平的调控也是基因表达调控的重要环节。由于蛋白组学和信号转导成为近年来生命科学的研究热点,近几年来运动对翻译调控引起了关注。1999 年 Baar 等^[24]研究了阻力运动后翻译水平的变化,2002 年 Chen 等^[25]对运动性肌肉肥大既研究了转录水平也研究了翻译水平的变化。

为探讨低氧运动时蛋白质代谢调控的规律,研究分三部分:一是低氧和运动中蛋白质代谢变化;二是低氧和运动中骨骼肌 IGF-1 和 Myostatin 的 mRNA 和蛋白表达;三是低氧和运动中骨骼肌 PKB/mTOR 信号的变化。研究旨在通过形态学、物质代谢、基因的 mRNA 转录和蛋白表达及 mRNA 翻译水平调控和信号转导等角度来揭示低氧运动对大鼠骨骼肌生长的影响,探讨这一过程中生长调控因子基因的表达及蛋白翻译调节信号 mTOR 的变化规律。

2 文献综述

骨骼肌在运动医学研究领域一直倍受关注。骨骼肌机能是影响运动能力的重要因素。肌肉质量主要取决于肌肉蛋白含量和构成，肌肉蛋白是肌肉功能的主要执行者。肌肉的收缩活动依靠肌肉中收缩蛋白完成，耐力运动中约有 10% 的能量供应由蛋白质来补充提供，肌肉组织的损伤修复等多种机能都要靠蛋白质来完成。骨骼肌还是人体蛋白质的最大储存库。运动对蛋白质代谢的影响已有许多研究，力量运动和某些耐力运动促进蛋白合成。虽然运动对蛋白质代谢调控分子机制一直不清楚，但最近有研究表明运动对蛋白质的翻译过程具有调控作用。

运动促进骨骼肌蛋白合成，并且 IGF-1、Myostatin 等生长调控因子的表达以及翻译调控的 PKB/mTOR 信号通路会发生相应的变化，提示运动对骨骼肌的翻译调控可能通过 IGF-1 调节和（或）PKB/mTOR 信号介导。

低氧复合运动对蛋白质代谢的影响更为复杂。低氧运动在提高有氧能力的同时可能存在骨骼肌蛋白的丢失问题。低氧运动对 IGF-1、Myostatin 等生长调控因子以及翻译调控信号 PKB/mTOR 的影响还完全不清楚。

2.1 低氧运动和骨骼肌蛋白质代谢调控

2.1.1 蛋白质代谢及翻译调控

肌肉的生长包括肌纤维的增粗和肌细胞数目的增多，无论是哪方面都离不开蛋白含量和构成的变化，即蛋白质代谢的过程。肌肉蛋白质的代谢包括蛋白质合成和分解两个方面。蛋白质的合成是指氨基酸形成蛋白质，即 mRNA 翻译过程，包括翻译起始、延长、终止及修饰

等环节, 不仅有三种 RNA 分子的参与, 还有各种调节因子如翻译起始因子等的参与。蛋白质的分解代谢是蛋白质在一些蛋白水解酶的参与下分解成氨基酸, 氨基酸进一步生糖或生酮, 氧化分解, 或再合成蛋白质。蛋白质代谢状况取决于合成和分解的结果, 合成大于分解蛋白含量增加, 分解大于合成蛋白含量减少。

正常机体的蛋白质代谢是受到调节控制的。蛋白质代谢调节包括合成代谢的调节和分解代谢的调节。蛋白合成的调节包括对蛋白合成起始、延长、终止、修饰等环节的调节; 蛋白分解的调节包括对蛋白水解酶、氨基酸的氧化、利用等的调节。

基因的表达包括转录和翻译两个阶段。蛋白质生物合成是遗传信息的翻译过程, 是基因表达的第二个阶段。相应地, 基因表达的调控包括转录的调控和翻译的调控。基础生物学对于转录调控已进行了大量的研究, 最近 10 年翻译的调控研究也开始受到重视。由于翻译是联系基因组和蛋白组的桥梁, 因此翻译调控的研究具有重要的意义。

翻译过程主要包括起始、延伸和终止三个阶段, 其中起始阶段最为复杂。与原核生物不同, 真核生物 mRNA 没有特异性的起始序列, 而是通过扫描真核 mRNA 确定 AUG 起始密码子: mRNA 的 5' 非翻译区穿入核糖体 40S 亚基中, 利用遇到的第一个 AUG, 发生较为稳定的作用, 最后与 60S 亚基一道生成 80S 起始复合物, 起始翻译过程。一个 AUG 密码子能否作为起始子还取决于其前后序列的组成, 如果序列环境不适合于起始, 则继续扫描到下一个 AUG 处起始。这就是被称作翻译起始的扫描模型 (scanning model)^[26]。

虽然翻译每一阶段都存在调控机制, 但和转录相似, 起始是真核翻译调控的关键。翻译调控中, 最为重要的几个方面是: mRNA 自身的稳定性、核糖体的生成、参与翻译的起始因子的作用等。

通过与 mRNA 5' 或 3' 末端的结合进行翻译起始调节。对起始的抑制可以通过对 mRNA 不翻译的 5' 或 3' 末端的蛋白质结合来实现。核糖体与 mRNA 5' 末端的结合可以被结合在相同区域的 RNA 结合蛋白所封闭, 这些序列特异性的 RNA 结合蛋白对翻译起负调控作用, 是翻译抑制子。通过蛋白质与 mRNA 3' 末端的结合进行翻译抑制的机制还不太清楚。通常基因产物可以作为自身翻译的抑制子通过反馈机制使翻译过程适合需要。

通过修饰起始因子进行调节。蛋白质生物合成的调节重要的在于

通过翻译起始因子的磷酸化进行。真核生物最重要的调节点是翻译因子 eIF-2 和 eIF-4F，激素、有丝分裂原或生长因子等会调节它们的磷酸化，影响其活性。eIF-2 属于调节性三磷酸鸟苷酸酶（GTPase）超家族，可以完成将甲硫氨酸-起始子-tRNA 带到核糖体 40S 亚基。活性形式的 eIF-2*GTP 结合甲硫氨酸-起始子-tRNA 和 mRNA 的帽子结构，开始沿 mRNA 扫描。一旦遇到 AUG 密码子，结合的 GTP 被水解成 GDP，导致 eIF-2*GDP 从 40S 核糖体上解离。在无活性的 eIF-2*GDP 变为有活性的 eIF-2*GTP 中需要 eIF-2B 的 G-核苷酸交换因子，包括调节性亚复合物和催化性亚复合物，它们以磷酸化的形式调节自身的活性。eIF4E 即真核启动因子-4 复合物，能与 eIF4A、eIF4G 结合形成 eIF4F。eIF4F 复合物对于翻译的起始是必须的。eIF4E 则是形成该复合物的关键性限速因子，它具有识别 mRNA 的 5' 帽并与之结合的结构域。由于 4E-BP1 与 eIF4G 在 eIF4E 上的结合位点互相重叠，因此它们可以竞争性的与之结合。4E-BP1 主要通过磷酸化来调节 eIF4E 的活性。4E-BP1 不被磷酸化时，4E-BP1 就与 eIF4E 结合；当 4E-BP1 被 mTOR 磷酸化，eIF4E 就与之解离释放出来并与 eIF4G 结合形成复合物 eIF4F，启动翻译过程。

核糖体形成的调节。S6K1 是核糖体 40s 小亚基 S6 蛋白激酶，其功能是使细胞内 40s 核糖体蛋白 S6 磷酸化，而 S6 的磷酸化被认为是提高翻译效率的关键因素。p70s6k 是 S6K 家族的一个成员 S6K1。S6K1 是一种普遍表达的蛋白，可以被多种细胞信号活化，其中包括 mTOR 信号。

mRNA 稳定性的调节。mRNA 稳定性在细胞和组织特异性基因表达中具有重要作用，细胞中各种 mRNA 稳定性变化非常大，从几分钟到 24 小时不等。mRNA 的这种大范围变动在基因表达调节中具有重要作用，能控制蛋白质的含量和性质。mRNA 特异性降解由顺式作用元件及反式作用因子决定。

一些小分子的 RNA (miRNAs) 可通过与 mRNA 的结合来抑制翻译过程。miRNAs 是一类保守的，约 21 个核苷酸长度的小 RNA，它们通过通过与 mRNA 中的 5' 帽子结构和 3' 非翻译区作用，从而抑制翻译的进行，最终达到抑制特定基因表达的目的。miRNA 已被证实存在于植物和动物中广泛存在，并被认为是多细胞生物发育的重要调节因子^[27, 28]。