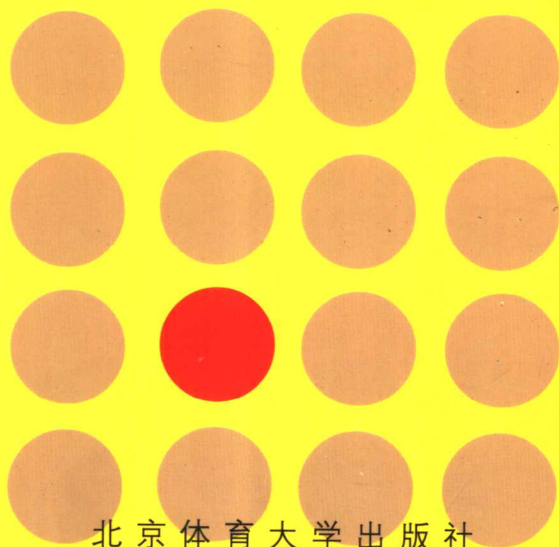


中国体育博士文丛

低氧运动促进 肌组织血管生成的机制

郑 澜 著

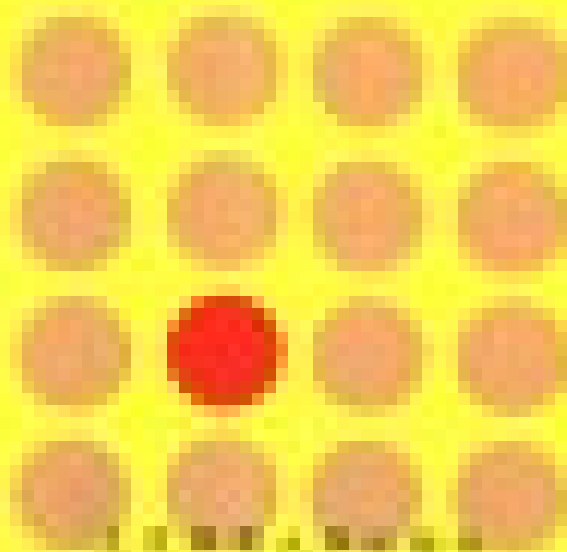


北京体育大学出版社

中国体育科学

低氧运动促进 肌组织血管生成的机制

王 强¹ 王 强² 王 强³ 王 强⁴ 王 强⁵



中国体育科学 2010 年第 36 卷第 1 期

低氧运动促进肌组织 血管生成的机制

郑 澜 著

北京体育大学出版社

策划编辑 梁 林
责任编辑 梁 林
审稿编辑 李 飞
责任校对 尚 琦
责任印制 陈 莎

图书在版编目(CIP)数据

低氧运动促进肌组织血管生成的机制/郑澜著. - 北京:北京体育大学出版社,2006. 1

ISBN 7-81100-385-6

I. 低… II. 郑… III. 气体代谢(运动生理)-影响-肌肉-血管-生成-研究 IV. G804.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 125200 号

低氧运动促进肌组织血管生成的机制

郑 澜 著

出 版 北京体育大学出版社
地 址 北京海淀区中关村北大街
邮 编 100084
发 行 新华书店总店北京发行所经销
印 刷 北京市昌平阳坊精工印刷厂
开 本 787×960 毫米 1/16
印 张 10

2006 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

定 价 33.00 元

(本书因装订质量不合格本社发行部负责调换)

作者简介



郑澜，女，1967年4月出生于湖南长沙，1987年毕业于湖南城市学院，1998年考入上海体育学院运动人体科学专业，2001年获硕士学位，2004年获博士学位，并于同年荣获国家留学基金资助赴美国留学1年。

长期从事运动性疲劳及恢复的研究，近些年来主要从事低氧训练适应机制的研究。先后主持湖南省自然科学基金课题“低氧运动促进中老年心肌组织血管生成的作用和机制”、湖南省科技厅专项基金子课题“低氧运动促进EPO及其受体表达对红细胞生成的影响”等3项。参加研究的课题有国家奥运科技专项“重点体能项目运动员消除疲劳及综合体能恢复系统的研究和建设：睾酮高效促进剂的研制”、国家教育部“十五”重点项目“高校终身体育的内涵与外延及其对发展21世纪人才素质的意义与作用研究”、国家体育总局“133”工程课题“健脾生血中药恢复运动性疲劳对心钠素表达的影响”等10项，发表论文20余篇，参加国际国内论文交流8篇，论文“Effects of Progressive Hypoxia on Ultrastructure of Myocardial Capillary in Training Rats”被2004年奥运会前科技大会录用为口头报告。

现任湖南师范大学体育学院运动健康与社会体育学系主任，副教授，硕士导师。担任本科生课程《运动解剖学》、《运动生物力学》，及研究生课程《人体结构学》、《运动实验动物学》、《细胞与分子生物学》等课程的教学任务，这些课程都采用现代化多媒体辅助教学，《人体结构学》采用双语教学形式。

序 言

日前郑澜来电告之欲将论文“低氧运动促进肌组织血管生成的研究”送至“中国体育博士文丛”出版,想请我写序言。为论文写评审意见有过无数次,可写序言还是第一次,但想想这是件好事,便欣然同意了。

认识郑澜有许多年了,好像是在1987年她作为进修生进入上海体育学院运动解剖学教研室,忙于听课、向技术员学习解剖技术,有时还参与教研室的业务活动,讨论教学进度、教学方法……,给我的印象是个活泼好学的湘妹子。后经过努力于1998年考入上海体育学院,攻读运动人体科学专业硕士学位,师从潘珊珊老师,通过三年的学习,在科研能力及专业基础知识方面都取得了长足的进步。毕业后继续深造,考入了我的博士生,研究方向定为低氧训练机体适应性机制的探讨。低氧训练是目前体育科学研究的热点课题,已呈现基础研究和运动训练实践应用同步发展的趋势。鉴于低氧条件及运用时机直接影响低氧在运动训练中的应用效果,以及血管生成低氧反应基因随时间的动态变化规律,在论文研究中郑澜采用了低氧和递增负荷跑台运动两种处理因素,针对低氧训练中肌组织血管生成这一现象,进行了细胞培养和动物实验,应用分子生物学、免疫组织化学、体视学等研究方法,为揭示低氧运动促进肌组织血管生成的作用机制提供了理论依据和应用途径。

博士论文研究是艰苦的,郑澜在三年博士求学道路上克服了旁人难以想象的困难,凭借其良好的解剖学基础和科研能力,如期完成了学业。其刻苦、好学和执着的求学精神更给我留下深刻的印象。希望郑澜以此为良好的起点,坚实的支点,在她所喜爱的运动人体科学领域内有更多的耕耘,更多的收获。

陆爱云

2005. 6

摘 要

研究目的:

通过研究低氧运动对肌组织血管生成低氧反应基因的转录调节、低氧反应基因产物对肌组织血管生成的促进作用、低氧运动肌组织血管的生成机制,来探讨低氧运动促进肌组织血管生成的机制,为低氧训练在运动实践中的运用提供理论依据和应用途径。

研究方法:

应用低氧细胞培养、凝胶迁移率变动实验方法,研究低氧调节培养人脐静脉内皮细胞 HIF-1 与 VEGF、Flt-1 DNA 结合活性。应用 3'3 析因设计试验,采用递增负荷运动训练方案及低氧和超低氧两种不同程度的递增低氧刺激,在运动中和运动后给予低氧处理,建立大鼠不同运动方式后进行不同程度低氧刺激动物模型,在此基础上,应用血气分析、免疫组织化学、原位杂交及计算机图像分析等方法,研究低氧运动对大鼠动脉血氧合状态的影响,及动脉血氧合程度的下降对肌组织 HIF-1 α 的影响,进而对低氧运动肌组织 VEGF、Flt-1 基因转录的促进作用;应用酶联免疫吸附检测、免疫组织化学及计算机图像分析及体视学等方法,研究 VEGF、Flt-1 对低氧运动肌组织血管生成的促进作用;应用透射电镜研究方法,从形态学角度研究低氧运动肌组织血管生成的方式。

结 论:

采用不同氧含量的混合气体进行脐静脉内皮细胞培养,为低氧训练肌组织血管生成的离体研究提供了低氧细胞培养模型;应用 3'3 析因设计试验方法,采用递增负荷跑台运动训练和递增低氧程度低氧刺激,建立了不同低氧处理及运动方式的低氧训练动物实验模型。

单纯低氧(氧含量由 18.2kPa 逐周下降至 15.2 kPa)或超低氧(氧含量由 17.4 kPa 逐周下降至 11.3kPa)处理,不能增加肌组织微血管密度;常氧训练、低氧训练以及训练后进行低氧处理,可增加肌组织微血

管密度。低氧处理与训练方式两种因素对肌组织微血管密度的增加具有协同交互作用,并且低氧处理、训练方式的主效应有差别。从常氧训练与低氧训练微血管数量变化的差异来看,低氧训练对肌组织微血管的影响优于常氧训练。低氧及运动使心肌、肌骨骼肌组织中微血管密度增加,有利于运动中肌组织对氧、营养物质的摄取,及代谢产物的排出,表明在运动训练中或训练后施以低氧条件刺激,可作为一种增强机体耐缺氧能力的辅助训练手段。

对肌组织毛细血管超微结构的研究发现,低氧运动肌组织血管生成可通过芽生或非芽生的方式进行,这两种血管生成方式中以非芽生方式即套迭式微血管生长方式为主要形式,表明低氧运动可使肌组织在满足能量和代谢方面采用更快、更经济的血管生成方式,促进血管物质交换功能的增强,来提高机体的运动能力。

低氧运动血管生成的转录调节机制为:由于离体情况下,低氧可增加培养人脐静脉内皮细胞中 HIF-1 与血管生成低氧反应基因 VEGF、Flt-1 DNA 结合活性,这种结合活性在一定氧张力范围内(培养液中氧分压不高于 80.50mmHg,此时混合培养气体中的氧含量为 7%)受低氧浓度的调节;在体情况下,低氧及运动可降低动脉血氧合程度,低氧训练是使动脉血氧分压下降的最有效刺激;低氧运动可使 HIF-1 α 蛋白、VEGF mRNA、Flt-1 mRNA 增加。因此受机体氧合程度的下降,低氧运动可增强肌组织中 HIF-1 α 蛋白表达,低氧和运动肌组织 HIF-1 α 蛋白表达的增加可促进 VEGF、Flt-1 的基因转录。

低氧运动促进肌组织血管生成的作用机制为:低氧运动可使肌组织血管生成低氧反应基因 VEGF、Flt-1 的蛋白产物增加,VEGF 蛋白产生后,可通过自分泌或旁分泌的方式与肌组织中血管内皮细胞膜上的 Flt-1 受体结合,参与肌组织血管生成;低氧、运动以及低氧运动都能使血清 VEGF 含量减少,而此时肌组织 VEGF 蛋白含量增加,由于肌组织 Flt-1 受体含量增加,而增加了肌组织对循环中 VEGF 的摄取、利用,减少了血清 VEGF 含量。因此,血清 VEGF 含量可作为反映机体耐低氧能力的指标。

关键词:

缺氧诱导因子-1;缺氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子;fms 样酪氨酸激酶-1;低氧反应基因;低氧;训练

Abstract

Objective:

In order to provide a theoretical basis and applied methods for hypoxic training applied in sports practice, this thesis studied the mechanism of hypoxic training promoting angiogenesis on muscular tissue by exploring the effect of hypoxic training on regulating the hypoxic responsive genes on muscular issue, the effect of the hypoxic responsive genes on boosting angiogenesis on muscular issues, and the angiogenesis mechanism of hypoxic training muscular tissue.

Material and Methods:

Hypoxia cell culture and electrophoretic mobility shift assay were applied to study the protein—DNA binding activity of hypoxia induced factor—1 and vascular endothelium growth factor gene, and fms—like tyrosine kinase—1 of human umbilicus vein endothelial cell under hypoxia. 3'3 factorial experiment, progressive treadmill exercise, hypoxia and super—hypoxia increasing by degree were used to establish animal model with different training pattern and different hypoxic stimulus. Thereafter, Blood — gas analysis, in situ hybridization, immunohistochemical technology and computer image processing methods were used to study the effect of hypoxic training on the oxygen binding status of arterial blood, the effect of oxygen binding status of arterial blood on hypoxia induced factor—1 α of muscular tissue, and then the promoting effect of hypoxic training on genes transcription of vascular endothelium growth factor and fms—like tyrosine kinase—1. In addition, Enzyme linked immunosorbent assay, Stereology, immunohistochemical technology and computer image processing methods were used to study the accelerating effect of vascular endothelium growth factor and fms—like tyrosine kinase—1

on hypoxic training angiogenesis of muscular tissue. In the end, transmission electron microscope was applied to study the morphological mode of angiogenesis of hypoxic training muscular tissue.

Conclusions:

Different Oxygen content mixed gases were administered to culture human umbilical vein endothelium cell to found hypoxia cell culture model for ex vivo study of hypoxic training, and an animal model of hypoxic training was successfully established by progressive treadmill exercise and hypoxic stimulus with progressive hypoxia.

Simple hypoxia (hypoxia content from 18.2kPa to 15.2 kPa) and super-hypoxia (hypoxia content from 17.4 kPa to 11.3kPa) could not increase density of micro-blood vessel. Normoxic training, hypoxic training, and hypoxic administration after training could increase density of micro-blood vessel. Interaction occurred between hypoxic administration and training pattern, and hypoxic administration and training pattern had different main effects. From the changing of micro-blood vessel, hypoxic training was found to be better than normoxic training to micro-blood vessel on muscular tissue.

In vivo, hypoxia could increase binding activity of HIF-1 of culture human umbilical vein endothelium cell and VEGF, Flt-1 DNA. The binding activity was regulated by oxygen content within a certain range. Ex vivo, hypoxia could decrease arterial blood oxygen binding; hypoxic training was the most efficient stimulus to decrease arterial partial pressure of oxygen, while it could decrease arterial blood oxygen binding to a large degree. The transcription regulation mechanism of angiogenesis of hypoxic training muscular tissue was; affected by the degree of oxygen binding, hypoxic training could increase the protein expression of HIF-1 α on muscular tissue and the increase could promote the genes transcription of VEGF and Flt-1.

The mechanism of hypoxia responsive genes promoting the angiogenesis of hypoxic training muscular tissue was; hypoxic training could increase the protein of angiogenesis hypoxia responsive genes VEGF and Flt-1,

and after VEGF protein was produced, it could secrete by autocrine or by paracrine, combine with Flt-1 receptor on the vascular endothelium cell membrane, and participate in the angiogenesis of muscular tissue. Hypoxia, training, and hypoxic training all could reduce the content of serum VEGF, meanwhile, the proteins of VEGF on muscular tissue increased and the Flt-1 receptors also increased. Therefore, ingestion and utilization of VEGF from circulation was increased on muscular tissue.

Angiogenesis on muscular tissue could be performed by means of sprouting and no-sprouting, among which no-sprouting angiogenesis pattern, i. e. intussusceptive microvascular growth, was the major way, suggesting that muscular tissue could take faster and more economical angiogenesis pattern to satisfy the demands of energy and metabolization.

Key words:

hypoxia induced factor-1; hypoxia induced factor-1 α ; vascular endothelium growth factor; fms-like tyrosine kinase-1; hypoxia responsive genes; hypoxia; exercise

缩略词

缩写	英文全称	中文全称
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附检测
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	凝胶迁移率变动实验
Flt-1	fms-like tyrosine kinase-1	fms 样酪氨酸激酶-1
HBS	HIF-1 binding site	HIF-1 DNA 结合序列位点
HIF-1	hypoxia induced factor-1	缺氧诱导因子-1
HIF-1 α	hypoxia induced factor-1 α	缺氧诱导因子-1 α
HIF-1 β	hypoxia induced factor-1 β	缺氧诱导因子-1 β
HiHi	live high-train high	高住高练
HiLo	live high-train low	高住低练
HREs	hypoxia response elements	缺氧反应元件
HRGs	hypoxia responsive genes	低氧反应基因
HUVEC	human umbilical vein endothelium cell	人脐静脉内皮细胞
IMG	intussusceptive microvascular growth	套迭式微血管生长
LoHi	live low-train high	低住高练
O ₂ cont	oxygen content	血氧含量
O ₂ sat	oxygen saturation	血氧饱和度
PaO ₂	arterial partial pressure of oxygen	动脉血氧分压
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸缓冲液
RPM	rotation per minute	转/分
SSC	Sodium chloride & sodium citrate buffer	氯化钠-柠檬酸钠缓冲液
TBS	Tris buffer saline	Tris 盐缓冲液
VEGF	vascular endothelium growth factor	血管内皮生长因子

目 录

摘要	(1)
英文摘要	(3)
缩略词	(6)
 1 前 言	(1)
1.1 研究背景	(1)
1.2 研究意义与目前研究状况	(3)
1.3 研究内容	(4)
1.4 研究总体思路	(5)
1.4.1 基本理论	(5)
1.4.2 细胞培养实验流程	(6)
1.4.3 动物实验流程	(6)
 2 低氧调节培养人脐静脉内皮细胞 HIF-1 与 VEGF、 Flt-1 DNA 结合活性的研究	(7)
2.1 材料与方法	(8)
2.1.1 实验仪器	(8)
2.1.2 主要实验试剂及配制	(9)
2.1.2.1 主要实验试剂	(9)
2.1.2.2 主要实验试剂的配制	(10)
2.1.3 细胞的培养及低氧处理	(11)
2.1.3.1 人脐静脉内皮细胞培养	(11)
2.1.3.2 低氧处理	(11)
2.1.4 实验方法	(11)
2.1.4.1 核蛋白抽提	(11)
2.1.4.2 凝胶迁移率变动实验	(12)



低氧运动促进肌组织血管生成的机制

2.1.4.3 转膜	(13)
2.1.4.4 检测	(13)
2.1.4.5 凝胶迁移率变动实验结果的凝胶图像分析	(14)
2.2 研究结果	(14)
2.2.1 不同低氧条件下培养液中氧分压检测结果	(14)
2.2.2 HIF-1 蛋白与 VEGF 增强子序列的 EMSA 实验 观察结果	(14)
2.2.3 HIF-1 蛋白与 Flt-1 启动子序列的 EMSA 实验 观察结果	(15)
2.2.4 HIF-1 蛋白与 VEGF 增强子、Flt-1 启动子序列的 EMSA 凝胶图像分析结果	(15)
2.3 分析与讨论	(16)
2.4 小结	(19)

3 低氧及运动促进 HIF-1 α 表达对大鼠肌组织 VEGF、 Flt-1 mRNA 的影响

(20)

3.1 材料与方法	(21)
3.1.1 实验仪器	(21)
3.1.2 实验试剂及药品	(22)
3.1.3 实验对象及分组	(23)
3.1.4 运动训练安排	(23)
3.1.5 低氧处理	(24)
3.1.6 实验取材	(24)
3.1.7 实验方法	(25)
3.1.7.1 动脉血气分析	(25)
3.1.7.2 HIF-1 α 免疫组织化学标本制作	(25)
3.1.7.3 VEGF、Flt-1 mRNA 原位杂交标本制作	(26)
3.1.7.4 免疫组织化学及原位杂交显微图像分析	(27)
3.1.8 统计分析	(27)
3.2 实验结果	(28)
3.2.1 大鼠动脉血气指标检测	(28)
3.2.1.1 动脉血气指标 PaO ₂ 、O ₂ sat、O ₂ cont 检测结果	(28)

3.2.1.2	PaO ₂ 析因试验结果的方差分析	(29)
3.2.2	大鼠肌组织 HIF-1 α 免疫组织化学及显微 图像分析结果	(29)
3.2.2.1	心肌组织 HIF-1 α 免疫组织化学观察结果	(29)
3.2.2.2	心肌组织 HIF-1 α 免疫组织化学染色的显微 图像分析结果	(31)
3.2.2.3	心肌组织 HIF-1 α 免疫组织化学染色析因 试验结果的方差分析	(31)
3.2.2.4	骨骼肌组织 HIF-1 α 免疫组织化学观察结果	(32)
3.2.2.5	骨骼肌组织 HIF-1 α 免疫组织化学染色显微 图像分析结果	(32)
3.2.2.6	骨骼肌组织 HIF-1 α 免疫组织化学染色析因 试验结果的方差分析	(33)
3.2.3	大鼠肌组织 VEGF mRNA 原位杂交及显微图像 分析	(34)
3.2.3.1	心肌组织 VEGF mRNA 原位杂交观察结果	(34)
3.2.3.2	心肌组织 VEGF mRNA 原位杂交显微图像 分析结果	(35)
3.2.3.3	心肌组织 VEGF 原位杂交染色析因试验结果的 方差分析	(36)
3.2.3.4	骨骼肌组织 VEGF mRNA 原位杂交观察 结果	(36)
3.2.3.5	骨骼肌组织 VEGF mRNA 原位杂交显微 图像分析结果	(37)
3.2.3.6	骨骼肌组织 VEGF mRNA 原位杂交染色析因 试验结果的方差分析	(38)
3.2.4	大鼠肌组织 Flt-1 mRNA 原位杂交及显微图像 分析	(39)
3.2.4.1	心肌组织 Flt-1 mRNA 原位杂交观察结果	(39)
3.2.4.2	心肌组织 Flt-1 mRNA 原位杂交染色显微图像 分析结果	(40)
3.2.4.3	心肌组织 Flt-1 mRNA 原位杂交染色析因试验 结果的方差分析	(40)

3.2.4.4 骨骼肌组织 Flt-1 mRNA 原位杂交观察结果	(41)
3.2.4.5 骨骼肌组织 Flt-1 mRNA 原位杂交显微图像分析结果	(42)
3.2.4.6 骨骼肌组织 Flt-1 mRNA 原位杂交染色析因试验结果的方差分析	(42)
3.2.5 大鼠肌组织 HIF-1 α 免疫组织化学染色阳性指数与 PaO ₂ 相关分析	(43)
3.2.6 大鼠肌组织 VEGF mRNA、Flt-1 mRNA 与 HIF-1 α 相关分析	(43)
3.2.6.1 心肌组织 VEGF mRNA、Flt-1 mRNA 与 HIF-1 α 相关分析结果	(43)
3.2.6.2 骨骼肌组织 VEGF mRNA、Flt-1 mRNA 与 HIF-1 α 相关分析	(44)
3.3 分析与讨论	(45)
3.3.1 低氧及运动对大鼠动脉血氧合状态的不同作用	(45)
3.3.2 低氧及运动大鼠动脉血氧合状态的改变对肌组织 HIF-1 α 蛋白表达的影响	(46)
3.3.3 低氧及运动对大鼠肌组织 VEGF、Flt-1 mRNA 的影响	(48)
3.3.4 HIF-1 α 对肌组织 VEGF、Flt-1 mRNA 的促进作用	(50)
3.4 小结	(51)

4 VEGF、Flt-1 促进低氧及运动大鼠肌组织血管生成的作用

(52)

4.1 材料与方法	(53)
4.1.1 实验仪器	(53)
4.1.2 实验试剂及药品	(53)
4.1.3 实验动物饲养及分组	(53)
4.1.4 运动训练安排	(54)
4.1.5 低氧处理	(54)

4.1.6	取材及制备	(55)
4.1.7	实验方法	(55)
4.1.7.1	血清 VEGF 含量的酶联免疫吸附检测	(55)
4.1.7.2	VEGF、Flt-1、CD34 免疫组织化学标本制作 ...	(56)
4.1.7.3	VEGF、Flt-1、CD34 免疫组织化学显微 图像分析	(56)
4.1.7.4	微血管密度参数的测算方法	(57)
4.1.8	统计分析	(58)
4.2	实验结果	(58)
4.2.1	大鼠血清 VEGF 含量的酶联免疫吸附检测	(58)
4.2.1.1	血清 VEGF 含量的酶联免疫吸附检测结果	(58)
4.2.1.2	血清 VEGF 含量析因试验结果的方差分析	(59)
4.2.2	大鼠肌组织 VEGF 免疫组织化学染色及图像分析	(59)
4.2.2.1	心肌组织 VEGF 免疫组织化学染色观察结果	(59)
4.2.2.2	心肌组织 VEGF 免疫组织化学染色的图像 分析结果	(61)
4.2.2.3	心肌组织 VEGF 免疫组织化学染色析因试验 结果的方差分析	(61)
4.2.2.4	骨骼肌组织 VEGF 免疫组织化学染色观察结果 ...	(62)
4.2.2.5	骨骼肌组织 VEGF 免疫组织化学染色的图像 分析结果	(62)
4.2.2.6	骨骼肌组织 VEGF 免疫组织化学染色析因试验 结果的方差分析	(64)
4.2.3	大鼠肌组织 Flt-1 免疫组织化学染色及图像分析	(64)
4.2.3.1	心肌组织 Flt-1 免疫组织化学染色观察结果	(64)
4.2.3.2	心肌组织 Flt-1 免疫组织化学染色的图像 分析结果	(65)
4.2.3.3	心肌组织 Flt-1 免疫组织化学染色析因试验 结果的方差分析	(66)
4.2.3.4	骨骼肌组织 Flt-1 免疫组织化学染色观察结果 ...	(66)
4.2.3.5	骨骼肌组织 Flt-1 免疫组织化学染色的图像 分析结果	(67)
4.2.3.6	骨骼肌组织 Flt-1 免疫组织化学染色析因试验	

