

不同时间电刺激训练对大鼠骨骼肌 IGF-1 不同拼接体 mRNA 表达的时序性影响*

黄力平¹ 曹龙军¹ 周石² 李庆雯¹ 向珩¹

摘要 目的:观察不同时间电刺激训练对肌肉组织 IGF-1 不同变构体 mRNA 表达的时序变化,探讨电刺激促进肌肉生长和修复的机制。**方法:**SD 大鼠 30 只,随机分为 5 组,每组 6 只,分别为对照组和 1、2、3、4 周电刺激组,刺激部位为右侧腓肠肌。训练后采用实时荧光定量 PCR 法对腓肠肌 IGF-1Ea 和 MGF mRNA 表达进行检测。**结果:**各电刺激组 MGF mRNA 表达较对照组分别增长了 3.97 ± 0.86 、 4.05 ± 0.71 、 4.13 ± 0.80 、 4.24 ± 0.77 倍 ($P < 0.01$),但 MGF mRNA 表达在 4 个实验组间依序比较没有显著性差异 ($P > 0.05$),呈现训练后迅速升高并达平台;而 IGF-1Ea 的 mRNA 表达比对照组分别增长了 1.55 ± 0.29 、 3.99 ± 0.83 、 5.11 ± 0.82 、 5.27 ± 0.86 倍 ($P < 0.01$),1、2、3、4 周训练的实验组依序比较显示,随刺激时间延长,表达量逐渐升高,在第 3 周达平台。3 周后两者都达到较高水平。**结论:**①MGF 的 mRNA 受外界机械刺激迅速大量表达至高峰,没有时序性变化,表明 MGF 在启动肌肉生长修复早期事件中起关键性作用;②IGF-1Ea 在促进肌肉生长修复中与 MGF 有序贯性作用;③IGF-1 生长因子变构体是电刺激训练引起的肌肉适应性肥大的分子生物学机制之一,在电刺激训练中需要至少 3 周才能发挥两者共同的功效。

关键词 胰岛素样生长因子-1Ea; 机械力生长因子; 电刺激; 肌肉肥大

中图分类号:R454.1,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-05-0399-04

The expression of two isoforms of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA in rat skeletal muscle induced by one to four weeks of electrical stimulation/HUANG Liping, CAO Longjun, ZHOU Shi, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(5): 399-402

Abstract Objective: To investigate the expression of two alternative splices of IGF-1 mRNA (IGF-1Ea, MGF RNA) in rat's skeletal muscle induced by 1-4 weeks of electrical stimulation training. **Method:** 30 SD rats were randomly divided into five groups: control and 1, 2, 3 and 4 weeks of training. The training consisted of 45min of stimulation at 10Hz, 20mA, and 7 sessions per week. After the designated experimental period, specimens of the gastrocnemius muscle were obtained and immediately frozen in liquid nitrogen then kept at -70°C . The real-time quantitative PCR was used to determine the mRNA expression. **Result:** The expression of MGF mRNA in muscles rapidly increased 3.97 ± 0.86 、 4.05 ± 0.71 、 4.13 ± 0.80 、 4.24 ± 0.77 times after 1, 2, 3 or 4 weeks of training, respectively, compared to the control group. No differences were found between the training groups. It suggested that a significant increase of MGF mRNA splice expression occurred mainly during the first week of training while much less changes occurred in the following weeks. Compared with the control group, the expression of muscles IGF-1Ea mRNA of four groups increased 1.55 ± 0.29 、 3.99 ± 0.83 、 5.11 ± 0.82 、 5.27 ± 0.86 times, respectively, after training. Furthermore, the expression of IGF-1Ea mRNA demonstrated a slower rate of increase as compared with MGF mRNA and reached a plateau after three weeks of training. **Conclusion:** ①Electrical stimulation can induce a rapidly increase in MGF mRNA after 7 sessions of training. However, longer terms of training did not induce further increase in MGF expression. It suggests that MGF plays an signaling role in muscle growth at early stage of training. ②A slower rate of increase and reached a plateau after 21sessions of training. ③At least 3 weeks of training was required for the expression of both isoforms of IGF-1 to reach maximum that might be necessary for muscle hypertrophy.

Author's address Dept. of Health & Exercise Science, Tianjin University of Sport, Tianjin, 300381

Key words insulin-like growth factor-1; mechano growth factor; electrical stimulation; muscle hypertrophy

目前人们认识到,调节组织生长和修复不仅需要系统来源的各种因子参与,而且与局部因子密切相关。一些再生能力强的组织靠细胞不断分裂更替坏死、陈旧的细胞维持组织的完整与活力。而像肌肉、神经、心肌这些有丝分裂后组织,生长和修复则

* 基金项目:天津市科委科技发展计划—科技攻关项目(05YFGDSF02100)

1 天津体育学院运动人体科学系,天津,300381

2 澳大利亚南十字星大学

作者简介:黄力平,女,博士,教授,主任医师

收稿日期:2007-01-24

需要干细胞的分裂、增殖和分化来再生修补组织,避免永久的损伤。许多细胞因子是引发这些干细胞变化及其一系列相继的细胞事件的重要环节。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是调节肌肉生长的重要因子之一。它不仅产自肝脏,而且骨骼肌组织自分泌和旁分泌的 IGF-1,在调节肌肉生长、修复中起着更为关键性的作用。骨骼肌在受到机械刺激、损伤等因素的作用,IGF-1基因发生选择性拼接,至少表达两种 IGF-1 变构体,其中一种为机械力生长因子(mechano growth factor, MGF),它来自于 IGF-1 基因,并有与 IGF-1 不同的 3'外显子,在大鼠称为 IGF-1Eb,在外显子 5E 亚单位上插入了 52bp,在人类则称为 IGF-1Ec,在外显子 5E 亚单位上插入了 49bp。主要作用是促进成肌细胞分裂和增殖,补充骨骼肌的卫星(干)细胞池;另一种与肝脏表达的 IGF-1 相似,但与 MGF 肽序列不同,名为肝型 IGF-1(IGF-1Ea),主要作用是促进成肌细胞融合形成原肌管和蛋白的合成^[1]。在体和离体研究表明,骨骼肌细胞在受到损伤、牵拉、电刺激、主动训练等额外机械负荷的作用时,IGF-1 两个选择性拼接体可发生时间上先后的表达,MGF 表达先于 IGF-1 表达^[2-6],但还没有连续观察长期机械负荷作用肌肉后,两个选择性拼接体表达的时序性变化研究,而这些研究对训练参数、方法、疗程、疗效都至关重要。

电刺激肌肉收缩是一种广泛为临床和运动训练接受的治疗方法,可以引起肌肉适应性肥大和力量增长,改善肌肉功能。研究显示,单纯一次性电刺激

家兔腓骨长肌没有引起局部 IGF-1 的变化,而电刺激与牵拉肌肉联合作用则导致 IGF-1mRNA 表达显著提高^[7]。因此,有关电刺激训练对骨骼肌 IGF-1 的影响还需进一步研究。本研究拟通过不同时间电刺激训练大鼠腓肠肌,观察长期电刺激训练对骨骼肌 IGF-1 选择性拼接体影响的时序性变化,以便深入探讨 IGF-1 不同拼接体在肌肉生长与修复过程中作用和电刺激训练增加肌肉力量的机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

2月龄健康雄性 SD 大鼠 30 只,体重 210—220g (解放军军事医学科学院实验动物中心提供),喂养 1 周后随机分为 5 组,每组 6 只,分别为对照组 0 周,1 周,2 周,3 周,4 周电刺激训练组,组间体重无显著差异。饲养环境为 20—28℃,光照 12/12h,动物自由饮食。

1.2 主要试剂及仪器

电刺激训练仪(北京, KD-2A 型经皮神经电刺激仪);引物、TaKaRa 荧光定量 PCR 反应试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ (大连宝生物有限公司);Fermentas 反转录试剂盒 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (晶美公司);超净工作台(苏州);高速低温离心机(Beckman Co, 美国),iCycler 荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD Co, 美国)。

1.3 引物

IGF-1Ea、MGF、18S 核糖体 RNA 基因引物设计(见表 1)。

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	扩增片断长度	基因银行序列	退火温度
IGF-1Ea mRNA	上游:cat tcg gag ggc acc aca ga	154bp	X06043	55.3℃20s
	下游:cac ttg atg ccc aag act cag			
MGF mRNA	上游:gca ttg tgg atg agt gtt gc	163bp	X06108	56.4℃20s
	下游:ctt ttc ttg tgt gtc gat agg			
18S rRNA	上游:tga ggt ttc ccg tgt tga g	190bp	X01117	54.5℃20s
	下游:gac cat aaa cga tgc cga ct			

1.4 动物训练

电刺激时,先将大鼠浅麻醉(10%水合氯醛,腹腔注射 0.3ml/100g)后俯卧位固定四肢,右小腿硫化钠(10%)脱毛,以双层生理盐水湿纱布包裹,将电极固定于皮肤表面,正极置于肢体近侧,负极置于远侧,刺激频率 10Hz,脉宽 200ms 电流 20mA,可以见到腓肠肌明显收缩,每次刺激时间 45min。为了消除麻醉和饲养时间带来的系统误差,在此期间对所有实验对象实施麻醉,并俯卧位固定四肢 45min,然后分别进行 4 周、3 周、2 周和 1 周训练,4 周后同时处死,取双侧腓肠肌外侧头,用生理盐水清洗后液氮速

冻,最后-70℃保存,备用。

1.5 RT-PCR 实验

大鼠 IGF-1Ea 和 MGF 的 mRNA 表达水平的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法建立和 RNA 提取按试剂盒说明书操作。RNA 质量由 A260/A280 比值和 0.8%琼脂糖凝胶电泳确定。取 A260/A280 比值在 1.8 以上、电泳至少出现 2 条带的 RNA 进行下一步实验。取 5μg 总 RNA,按 Fermentas 反转录试剂盒以随机 6 核苷酸为引物反转录,反转录产物稀释 10 倍后-20℃保存备用;实时荧光定量 PCR:20μl 体系中含有 10μl SYBR Premix Ex

TaqTMM, 2 μ l cDNA, 0.4 μ l 10pmol的上下游引物, 7 μ l水。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 2min; 95 $^{\circ}$ C 10s, 55—58 $^{\circ}$ C (根据不同引物的退火温度) 20s, 54 $^{\circ}$ C时检测荧光, 共40个循环。扩增完毕进行熔解曲线分析, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析特异性。

1.6 统计学分析

采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行IGF-1两种变构体mRNA相对表达量进行半定量分析^[8], 并对其结果进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 电刺激训练对MGF mRNA表达的影响

1周电刺激训练后MGF mRNA的表达较对照组迅速增加($P < 0.01$), 之后继续训练, MGF mRNA保持该高表达水平(见表2、图1, 见前置彩色插页9), 与1周电刺激训练组相比无显著性增加($P > 0.05$), 表明电刺激训练后迅速使MGF mRNA表达达高峰, 训练时间对其表达的影响不明显。

2.2 电刺激对IGF-1Ea mRNA表达的影响

1周电刺激训练后IGF-1Ea mRNA表达较对照组显著增加($P < 0.01$), 之后随训练时间延长, 表达量持续增加, 各训练组依序比较: 2周组与1周组、3周组与2周组基因表达增加量有显著差异($P < 0.01$), 4周组与3周组间变化不再有显著性($P > 0.05$), 表明IGF-1Ea mRNA表达到第3周达到高峰, 并保持之(见表2、图2, 见前置彩色插页9)。由图3可以看出, IGF-1两种变构体基因表达的时间过程不同, 表达的相对水平也有差异, 在第3周时, 两种变构体表达量都达到高峰。

表2 不同时间的电刺激对肌肉IGF-1不同变构体mRNA表达的影响(相对量) ($\bar{x} \pm s$)

组别	MGF(倍数)	IGF-1Ea(倍数)
对照组	1.03 \pm 0.27	1.03 \pm 0.25
1周电刺激组	3.96 \pm 0.86 ^①	1.55 \pm 0.29 ^①
2周电刺激组	4.05 \pm 0.71 ^①	3.99 \pm 0.83 ^{①②}
3周电刺激组	4.13 \pm 0.80 ^①	5.11 \pm 0.82 ^{①②}
4周电刺激组	4.24 \pm 0.77 ^①	5.27 \pm 0.86 ^①

①与对照组比 $P < 0.01$, ②与前1周训练组比 $P < 0.01$

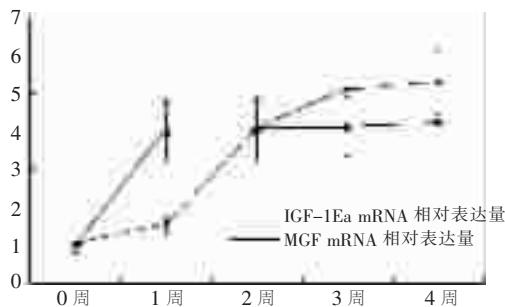


图3 IGF-1两种不同变构体IGF-1Ea和MGFmRNA相对表达量的时序性变化

3 讨论

Goldspink 近年来研究发现IGF存在三种亚型, 其中IGF-1Ea即系统型的IGF-1, 来源于肝脏, 存在于多种组织中, 通常所说的IGF-1是指IGF-1Ea, 可在血液里检测出。第二中亚型是IGF-1Eb, 只存在于人类肌肉中, 但目前研究较少, 生物学作用不清楚。第三种亚型是IGF-1Ec, 它主要是肌肉在受到机械刺激, 牵拉和损伤时通过自分泌产生的, 也称为MGF^[2]。MGF和IGF-1Ea都高度保存着IGF-I基因中的外显子3和4, 能产生同样的成熟肽, 却有不同外显子5产生的E肽, 此外, MGF没有被糖基化, 半衰期更短, 状态也不稳定, 有与IGF-1Ea不同的蛋白结合力与受体亲和力, 这可能与其相对独立的功能有关^[3]。Hill等^[4]在动物实验中研究表明, 当肌肉受到机械损伤后, MGF基因的表达在损伤24h后达到最高峰, 随后表达量会减少, 到第7天时, 与未损伤侧及正常对照组的表达量无明显差别; 而IGF-1Ea基因表达量在损伤24h后也增加, 之后逐步增高, 在第7天时才达到最高峰。Goldspink等通过对C2/12培养的细胞进行机械刺激研究发现, MGF在一次强的刺激后表达量明显增加, 而对于持续重复刺激只有IGF-1Ea表达增加。一次急性大强度伸膝运动训练后2.5h导致青年人股外侧肌MGF mRNA显著升高, 而不伴有IGF-1Ea mRNA水平改变, 表明肌肉在受到机械力刺激后局部IGF-1不同变构体表达存在时序性变化, 反映了两者的功能不同。

本结果显示, 在1—4周不同时间的电刺激训练中, 大鼠腓肠肌IGF-1Ea和MGF mRNA表达都有显著增加($P < 0.01$); MGF mRNA在第1周就迅速增加并达高峰, 之后几周持续保持在此水平, 与继续电刺激训练无时序关系; 而IGF-1Ea mRNA增加与电刺激训练存在时序关系, 从第1周增多, 之后逐步增加, 到第3周时达到高峰, 4周后无继续增加呈现平台期。该实验结果与前人的研究是一致的^[4], 电刺激训练过程中, IGF-1基因首先迅速变构为MGF, 然后才有另一个变构体IGF-1Ea的表达, 它们达到峰值的时间也不同, 变构体MGF首先达到高峰, 2周训练之后, 变构体IGF-1Ea再升高到顶峰。提示它们对机械负荷刺激的反应和在肌肉生长/修复过程中的功能不同。

许多实验研究表明, 在肌肉发育、再生、修复过程中IGF-1Ea和MGF担负不同的功能。MGF主要参与成肌细胞分裂与增殖, 而IGF-1Ea促进肌细胞的分化和蛋白质的合成。Yang等^[5]采用哺乳动物骨骼肌C2/C12细胞培养过程中研究发现, 当转染

MGF的cDNA或用E区多肽时,成肌细胞的数量增加,但仍保持单核,在电镜下观察也未见融合形成原肌管;而当转染IGF-1Ea的cDNA或肽时,肌肉干细胞体积会增加并且融合成原肌管;研究还发现MGF与IGF-1Ea的作用信号通路不同,当选择性地加入IGF-1Ea受体抗体时,MGF仍能够促进卫星细胞分裂成成肌细胞,但不能使之融合成原肌管,这说明MGF的羧基肽是有自己特有信号通路的生长/修复因子。通过质粒转导的方法转入MGF cDNA,在2周后肌肉体积增加了20%^[9];而同样转入IGF-1Ea cDNA时,在4个月后肌肉的体积才增加了25%,充分说明MGF在肌肉再生与修复过程中比IGF-1Ea起着更重要的作用^[10]。

本次实验结果表明,在电刺激训练过程中MGF和IGF-1Ea的表达动力学不同,也提示它们在骨骼肌损伤与修复过程中的功能不同。骨骼肌创伤后修复再生过程包括:组织创伤和坏死,坏死组织的细胞浸润和吞噬作用,再血管化,骨骼肌卫星细胞的激活、增生、分化、融合形成肌管,神经再生。其中,卫星细胞的激活、增生、分化、融合成肌管,参与骨骼肌的修复^[11]。MGF的重要功能是激活卫星细胞,促进卫星细胞的分裂,补充卫星细胞池;然后IGF-1Ea促进卫星细胞与损伤的肌纤维融合成肌管^[6]。肌肉的生长和修复首先是卫星细胞的激活、增生;然后融合形成肌管,它们表达时间的差异,与它们在肌肉再生与修复过程中功能不同是一致的,其中MGF是启动肌肉再生的重要因子。

本实验新的发现是,持续电刺激训练在3周后MGF和IGF-1Ea始终保持在高水平,这有利于肌肉干细胞的激活与肌肉蛋白质的形成,从而增强肌肉体积和改善肌肉功能。研究显示,电刺激训练后一般需4—6周可见明显的适应性肌肉肥大,该结果与此时间是基本相吻合的,提示IGF-1生长因子变构体是电刺激训练引起的肌肉肥大、力量增长的分子生物学机制之一,电刺激训练要达到肌肉肥大的目的其疗程至少应不少于3周。Haddad研究电刺激训练大鼠肌肉力量的频率时发现,间隔48h对肌肉肥大相关的分子细胞学反应影响更深刻^[12],提示在以循证医学为基础的康复治疗中,进一步深入进行电刺激训练方法的分子生物学研究实属必要。

4 小结

①MGF的mRNA表达受外界机械刺激迅速大量表达;继续训练,MGF基因表达一直保持在此高水平,在分别为1—4周的电刺激训练中MGF

mRNA表达无显著时序性增加。表明MGF在启动肌肉生长修复早期事件起关键性作用;机械刺激是其启动因素。②IGF-1Ea mRNA随电刺激训练的时间增加表达逐渐增多,而在3周后IGF-1Ea的mRNA表达增加达平台,在此之后维持于较高水平,提示长期电刺激训练引起肌肉IGF-1Ea mRNA表达增加较MGF mRNA延迟,可能与肌肉细胞分化和蛋白质合成有关。③在电刺激训练3周后IGF-1选择性拼接体的基因表达都保持在较高水平,提示IGF-1生长因子变构体是电刺激训练引起的肌肉适应性肥大的分子生物学机制之一,电刺激训练大鼠肌肉增长力量至少应持续3周为一疗程。

参考文献

- [1] 曹龙军, 黄力平, 周石. 胰岛素样生长因子-1对骨骼肌生长和修复研究进展[J]. 天津体育学院学报, 2006,21(3):242—245.
- [2] Goldspink G. Gene expression in muscle in response to exercise[J]. Journal of Muscle Research and Cell Motility, 2003,24: 121—126.
- [3] Adams GR. Exercise Effects on muscle insulin signaling and action—Invited review: autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation[J]. Appl Physiol, 2002,93 (3): 1159—1167.
- [4] Hill M, Goldspink G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage [J]. Physiology, 2003, 549 (2): 409—418.
- [5] Yang SY, Goldspink G. Different roles of the IGF-I E peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation[J]. FEBS Letters, 2002, 522 (1-3): 156—160.
- [6] Goldspink G. Impairment of IGF-I gene splicing and MGF expression associated with muscle wasting [J]. IJBCB, 2006,38: 481—489.
- [7] Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload[J]. J Anat, 1999,194(pt 3): 323—334.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001,25(4): 402—408.
- [9] Goldspink G. Method of treating muscular disorders [J]. United States Patent 6, 2001, 221,842B1.
- [10] Musaro A, McCullagh K. Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle[J]. Nat Gene, 2001, 27:195—200.
- [11] 申传安. 骨骼肌卫星细胞的生物学特征 [J]. 解放军医学杂志, 2002,27(4):373—374.
- [12] Haddad F, Adams GR. Exercise effects on muscle insulin signaling and action selected contribution: Acute cellular and molecular responses to resistance exercise [J]. Appl Physiol, 2002, 93:394—403.