

·运动人体科学·

运动性心脏肥大发生过程中心房肌内皮素基因的表达

马延超¹, 常 芸², 张 纭³

(1. 洛阳师范学院 体育学院, 河南 洛阳 471022; 2. 国家体育总局 体育科学研究所, 北京 100061;
3. 北京体育大学 运动人体科学学院, 北京 100084)

摘 要:为进一步探讨运动性心脏肥大发生的机制, 采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术, 对70只SD大鼠进行75 d耐力训练过程中内皮素信使核糖核酸(ET-1 mRNA)的表达量进行观察。以异硫氰酸胍法提取心肌组织总核糖核酸(total RNA), 测定心房肌中ET-1 mRNA, 以肌动蛋白(β -actin)为内参照, 测定ET-1 mRNA与 β -actin mRNA的比值为每个测试样中ET-1 mRNA表达量。结果显示:在5个时相点中, 实验组心房肌组织ET-1 mRNA的表达量与对照组相比差异没有显著性意义。在中等强度运动造成的运动性心脏肥大发生过程中, 心房肌组织的ET-1 mRNA的表达量可能不发生变化。

关 键 词:内皮素; 心房肌组织; 内皮素信使核糖核酸; 运动性心脏肥大; 大鼠

中图分类号:G804.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-7116(2006)03-0047-04

Gene expression of endothelin-1 in atria muscle during the occurrence of kinetic cardiac hypertrophy

MA Yan-chao¹, CHANG Yun², ZHANG Ying³

(1. College of Physical Education, Luoyang Teacher Institute, Luoyang 471022, China;

2. Institute of Sport Science, General Administration of Sport, Beijing 100061, China;

3. College of Sport Science of Human Body, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

Abstract: In order to probe further into the mechanism of the occurrence of kinetic cardiac hypertrophy, the authors observed the expression of endothelin messenger ribonucleic acid (ET-1 mRNA) of 70 SD rats during their 75 d endurance training by applying reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technology, applied isosulfocyanic acid guanidine approach to abstract total RNA in cardiac muscle tissue and measure ET-1 mRNA in atria muscle, based the internal control on β -actin to measure the ratio of ET-1 mRNA/ β -actin mRNA as the express of ET-1 mRNA in each test sample, and revealed that in the 5 time phase points the difference between the expression of ET-1 mRNA in atria muscle tissue of rats in the experimental group and that of rats in the control group had no meaning of significance. During the occurrence of kinetic cardiac hypertrophy caused by medium intensity exercises, the expression of ET-1 mRNA in atria muscle tissue may not be changed.

Key words: endothelin; atria muscle tissue; ET-1 mRNA; exercise cardiac hypertrophy; rat

内皮素(endothelin, ET)是1988年日本学者Yanagisawa^[1]从猪主动脉内皮细胞培养液中分离纯化的一种活性肽, 为血管内皮收缩因子(EDCF)。许多学者采用不同的病理性心脏肥大模型, 研究心脏肥大发生过程中, 心脏中内皮素的含量和ET-1 mRNA的表达量的变化, 探讨内皮素与心脏肥大发生过程中的关系, 得出较一致的结论: 内皮素可能参与了病理性心脏肥大的发生过程。

目前对内皮素参与运动性心脏肥大发生过程的研究较少, 且多是对心室肌中ET-1 mRNA的表达量进行观察。因此, 本研究旨在对运动性心脏肥大大鼠心房肌中ET-

1 mRNA基因表达量的动态变化特征进行研究, 以期从基因水平上探讨心房肌中内皮素在运动性心脏肥大发生过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠70只(维通利华公司提供), 2月龄, 体重(240 $\pm$ 20) g。国家标准啮齿动物饲料喂养, 自由饮食。饲养环境为室温(18 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 光照时间12 h。

收稿日期: 2005-12-09

作者简介: 马延超(1969-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向: 运动生物化学。

1.2 实验动物模型建立

SD 大鼠进动物房后适应 1 周, 然后进行 1 周适应性训练, 运动形式采用跑台训练, 第 1 天训练速度为 15 m/min, 运动时间为 15 min/d, 然后速度每天递增 3 m/min, 时间递增 6 min, 直至速度达到 30 m/min, 时间为 60 min/d, 每周训练 6 d, 周日休息。跑台训练至第 75 天结束。跑台为鼠类水平跑台(杭州生产制造), 运动中使用电刺激大鼠尾部, 激励其运动。

运动组大鼠分别于训练(3、10、23、37、75 d)后, 于次日晨安静状态下取材, 对应的对照组大鼠也在当天上午取材。按 100 g 体重 1 mL 剂量经大鼠腹腔注射质量分数 10% 水合氯醛溶液麻醉, 迅速取出心脏, 经预冷灭菌生理盐水清洗后吸干, 称湿重, 投入液氮中待用。测试前样本保存于 -70℃ 低温冰箱中。

1.3 心房肌 ET-1 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

(1) 心房肌总 RNA 的提取: 以异硫氰酸胍法提取心房肌组织总 RNA。采用 Promega 公司总 RNA 提取试剂盒。取 2 μ L 提取的总 RNA, 加入 300 μ L 灭菌去离子双蒸水, 进行吸光度值测定, 分别用波长为 260 nm 和 280 nm D 紫外光进行比色, 计算 A_{260}/A_{280} 的值, 以鉴定所提取的 RNA 的纯度。其比值在 1.7 以上即可认为所提取的 RNA 较纯, 可进行下一步实验。

(2) 逆转录及 PCR 反应: 采用 Promega 公司提供的反转录试剂盒。在 0.5 mL eppendorf 管中加入 Reverse Transcription 10 $\times$ buffer 2 μ L、10 mol/L dNTP Mixture 2 μ L、25 mol/L MgCl₂ 4 μ L、Recombinant RNasin[®] Ribonuclease inhibitor 0.5 μ L、Random primer 1 μ L or Oligo(dT)15 primer 2 μ L、AMV Reverse Transcriptase (High Conc.) 0.625 μ L、1 μ g RNA(2~4 μ L), 加水至 20 μ L。涡旋混匀, 稍微离心, 42℃ 孵育 60 min, 95℃ 变性 5 min, 4℃ 培育 5 min, 然后逆转录产物, -20℃ 保存待用。

通过互联网搜寻基因库, 进行引物设计。内参照 β -actin 为 226 bp。截取的 ET-1 为 350 bp 引物序列如下:

ET1 5'-CAA GGA GCT CCA GAA ACA GO-3'
ET2 5'-GCA GAC AAA GAA CTC CGA GC-3'
B1 5'gaa gtg tga cgt tga cat ccg3'
B2 5'Tgc tga tcc aca tct gct gga3'

在 0.5 mL eppendorf 管中加入 10 $\times$ PCR buffer, 2 μ L、10 mol/L dNTPmi $\times$ 0.4 μ L、Taq DNA polymerase(5u/ μ L) 0.2 μ L、25 mol/L MgCl₂ 1.5 μ L、0.005 μ g/ μ L ET-1 上下游引物 1.5 μ L; β -actin PCR 上下游引物 1.5 μ L、2.5 μ L cDNA、灭菌去离子水补充至反应体积 20 μ L。混匀、短暂离心, 加入矿物油一滴, 94℃ 预热变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 扩增 38 个循环, 末次循环 72℃ 延伸 10 min, 扩增产物接着跑电泳, 剩余部分 -20℃ 保存。

1.4 计量分析

分别称取 0.42 g 琼脂糖粉微波炉中加热, 使其溶于 1 $\times$ TBE 缓冲液中, 同时加入适量溴化乙锭(EB), 配制 1.2% 琼脂糖凝胶。将 PCR 反应产物 6 μ L 和加样缓冲液 1 μ L 充分混匀后, 加入加样孔, 正确连接电泳槽电源(黑的连阴极, 红的连阳极), 设定电压为 120 V, 时间约为 40 min, 电泳后, 将凝胶放在紫外投射灯下, 观察电泳结果, 用宝利来一次成像仪, 飞快 3 000 相纸, 拍摄电泳结果。经 Pharmacia LKB UltroScan XL 扫描仪分别对内参照和 ET-1 mRNA 条带作吸光度扫描, 通过 ET-1 mRNA 与内参照吸光度之比来相对定量。

1.5 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 SPSS 统计软件包进行 Independent-samples *T* test 分析。两变量间进行差异分析。以 $P<0.05$ 作为差异有显著性水平, 以 $P<0.01$ 表示差异性非常显著。

2 实验结果

2.1 心脏重量及重量变化率

在中等强度耐力运动后第 3、10、23、37、75 d 运动组大鼠心脏的绝对质量(m)在第 2 个时相点与对照组相比显著升高($P<0.05$), 在其余时相点呈逐步增加趋势(见表 1); 心脏相对重量(心脏绝对质量/体质量, HW/BW)实验组与对照组相比, 除第 1 时相点没有差别外, 其余 4 个时相点差异都有显著性(见表 1, 图 1); 心脏重量变化率[(实验组心脏质量-对照组心脏质量)/对照组心脏质量 $\times$ 100%]5 个时相点分别提高了 4.4%、10.4%、13.9%、15.2%、14.6%(见表 1)。

表 1 实验组、对照组大鼠心质量($\bar{x}\pm s$)及质量变化率

组别	心脏绝对质量/mg				
	3 d	10 d	23 d	37 d	75 d
对照组	1 113.0 $\pm$ 41.53	1 210.7 $\pm$ 128.9	1 248.2 $\pm$ 150.3	1 307.2 $\pm$ 204.6	1 624.3 $\pm$ 214.4
实验组	1 102.7 $\pm$ 88.53	1 319.5 $\pm$ 70.0 ³⁾	1 337.4 $\pm$ 166.7	1 442.9 $\pm$ 95.6	1 644.4 $\pm$ 189.6
组别	心脏相对质量 ²⁾ /(mg $\cdot$ g ⁻¹)				
	3 d	10 d	23 d	37 d	75 d
对照组	334.2 $\pm$ 16.6	326.1 $\pm$ 26.4	297.4 $\pm$ 18.5	284.8 $\pm$ 33.7	294.5 $\pm$ 16.7
实验组	349.1 $\pm$ 23.4	359.9 $\pm$ 23.1 ⁴⁾	338.6 $\pm$ 24.3 ⁴⁾	328.1 $\pm$ 21.0 ⁴⁾	337.4 $\pm$ 13.0 ⁴⁾
心肌质量变化率 ¹⁾ /%	4.4	10.4	13.9	15.2	14.6

1)心脏质量变化率=(实验组心脏绝对质量-对照组心脏绝对质量)/对照组心脏绝对质量 $\times$ 100%;2)心脏相对质量=心脏绝对质量/体质量;3)与对照组比较 $P<0.05$;4)与对照组比较 $P<0.01$

2.2 总 mRNA 提取结果

用紫外线分光光度计,分别用波长为 260 nm 和 280 nm 的紫外光进行吸光度值测定,计算 A_{260}/A_{280} 的值,鉴定所提取的 RNA 的纯度,实验测得的 A_{260}/A_{280} 的值都在 1.7 以上,

电泳检测结果见图 1。

2.3 心房肌组织 ET-1 mRNA 的表达

各个时相点心房肌组织 ET-1mRNA 的表达见表 2,图 2。

表 2 各个时相点心肌组织中 ET-1 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	10 d	23 d	37 d	75 d
实验组	$0.6524 \pm 0.11^{1)}$	0.7020 ± 0.18	$0.7418 \pm 0.09^{1)}$	$0.7346 \pm 0.20^{1)}$	$0.7500 \pm 0.12^{1)}$
对照组	0.7111 ± 0.06	0.6911 ± 0.15	0.7107 ± 0.02	0.7282 ± 0.05	0.7345 ± 0.08

1)与对照组相比 $P > 0.05$

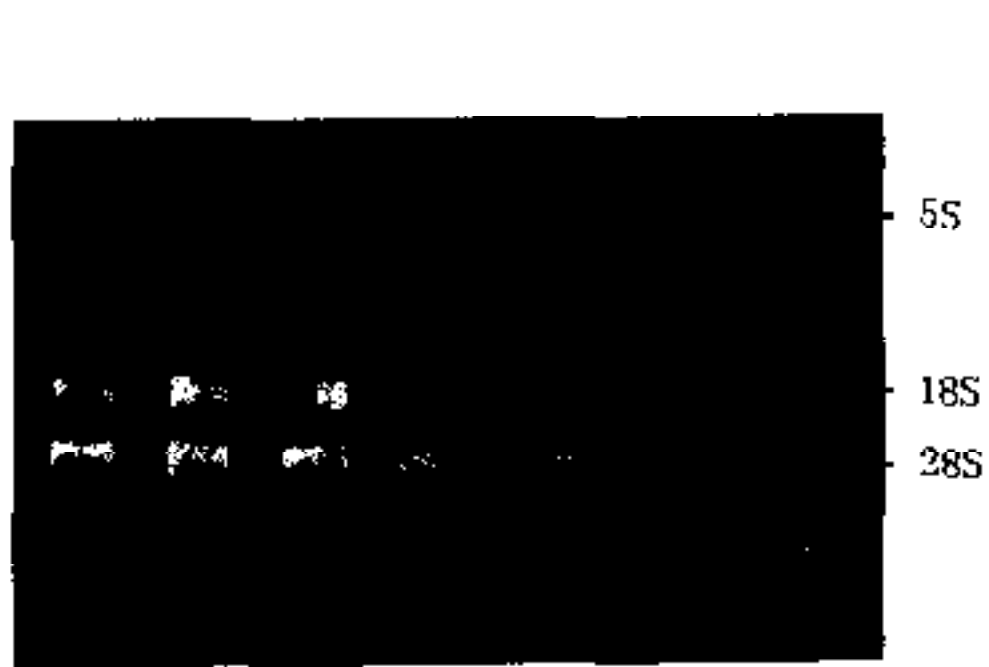


图 1 心房肌总 RNA 的电泳图

图 2 显示:心房肌 ET-1 mRNA 扩增后的电泳图。但在整个训练过程中,训练组大鼠心房肌 ET-1mRNA 的表达与对照组相比没有显著性差异($P > 0.05$)(见表 2)。

3 分析与讨论

3.1 内皮素与病理性心脏肥大

许多学者采用不同的病理性心脏肥大模型,研究心脏肥大发生过程中,心脏中内皮素的含量和 ET-1mRNA 的表达量的变化,探讨内皮素与心脏肥大发生过程中的关系,得出较一致的结论:内皮素可能参与了病理性心脏肥大的发生过程。

3.2 内皮素在运动性心脏肥大中的基因表达

我们的研究观察到训练组大鼠心脏绝对重量在第 2 个时相点与对照组相比差异有显著性($P < 0.01$),其余时相点有升高趋势(10 d 后大鼠对运动适应,其心脏肥大趋势减弱($P < 0.05$)),心脏相对重量实验组与对照组相比在第 2 到第 5 个时相点差异都有非常显著性($P < 0.01$),说明训练造成了运动组大鼠心脏肥大(见表 1)。但我们没有观察到实验组心房肌 ET-1mRNA 的表达量与对照组相比差异有显著性($P > 0.05$)(见表 2)。根据 Ueno M^[2]的研究,引起心脏肥大的刺激是增加心房、心室壁的紧张度,当心房、心室壁的紧张度达到某一阈值时才能使心房、心室中 ET-1mRNA 的表达量升高。本实验可能是由于运动强度小,对心房壁的紧张度刺激弱,而使实验组心房中 ET-1 mRNA 的表达量与对照组相比没有明显差异。

同样,2001 年,Iemitsu M 等^[4]用 4 周龄的 WKY 大鼠进行游泳运动,建立运动性心脏肥大模型,每天游泳 75 min,13 周后取出心脏,采用聚合酶链式技术,对心室肌中 ET-1mRNA 的表达量进行定量分析,观察到运动训练组与安静对照组之

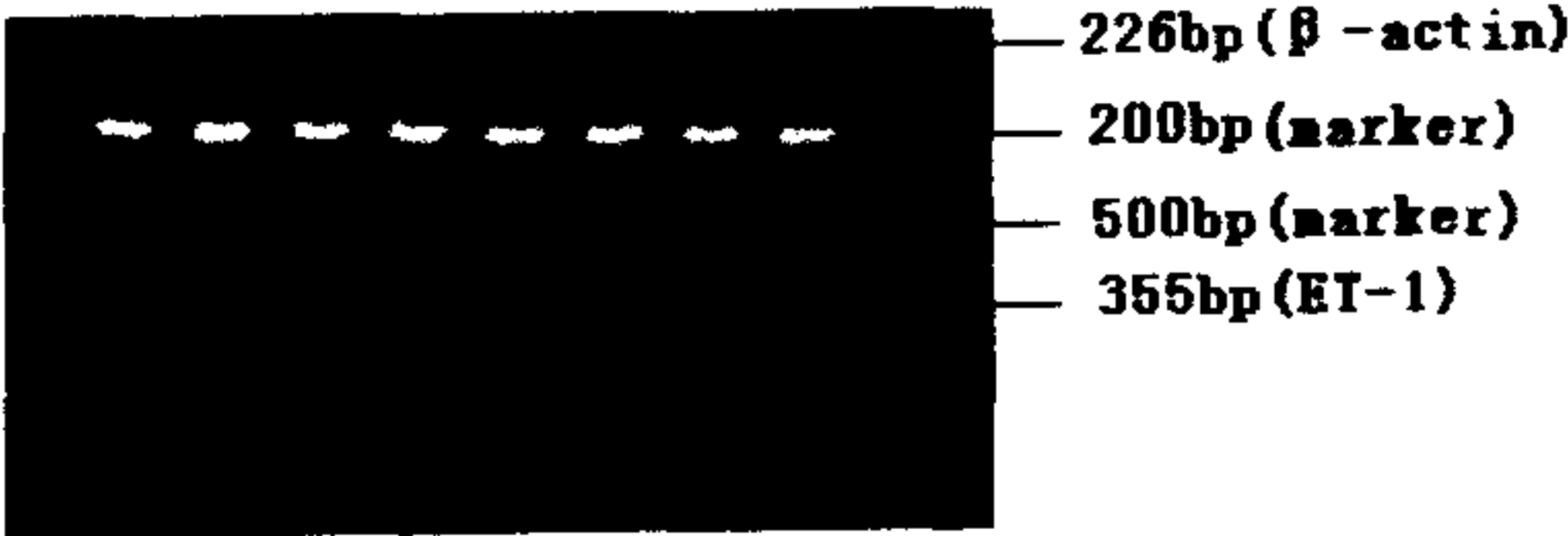


图 2 心房肌 ET-1mRNA 的表达电泳图

间心室肌 ET-1mRNA 的表达量没有差异。但 2002 年,Iemitsu M 等^[5]研究观察到老龄静坐组大鼠心室肌 ET-1mRNA 的表达量与年轻静坐组大鼠相比显著升高,老龄运动组大鼠心室肌 ET-1mRNA 的表达量与老龄静坐组大鼠相比显著升高,故认为内皮素可能对病理性心脏和由于年龄增大而功能性下降的心脏具有调节作用,认为随着年龄增大和运动训练,机体可能适应性地使心脏中的 ET-1mRNA 的表达量升高,从而提高心脏中的 ET 含量,提高心脏机能。1998 年, Maeda S 等^[7]报道耐力性运动可使心室肌中 ET-1 mRNA 表达量与安静对照组相比显著升高,同时观察到心室肌中 ET 含量与对照组相比明显升高,因而认为 ET-1 可能参与运动性心脏肥大的重塑过程。

从目前看到的文献中,还没有看到运动对心房肌 ET-1 mRNA 表达量变化的影响,可能是由于心房肌材料少,实验困难,对其研究较少。本实验过程中没有观察到运动性心脏肥大过程中心房肌中 ET-1 mRNA 表达量的明显变化,而运动性心脏肥大发生过程心室肌中 ET-1 mRNA 的变化却报道不一,有的报道升高^[5,7],有的报道不变^[4],故在运动性心脏肥大发生过程中心房肌中 ET-1 mRNA 表达量的变化还需要进一步的研究证实。

在中等强度运动造成的运动性心脏肥大发生过程中,心房肌组织中 ET-1mRNA 的表达量可能不发生变化。

参考文献:

[1] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells[J]. Nature, 1988, 332: 411 - 415.
[2] Ueno M, Miyauchi T, Sakai S, et al. Effects of physiological or

pathological pressure load in vivo on myocardial expression of ET-1 and receptors[J]. Am J Physiol, 1999, 277(5 Pt 2): R1321 - 1330.

[3] 李维根, 李昭波, 高云秋, 等. 运动性与高血压性心肌肥大时心源性活性肽变化比较[J]. 中国运动医学杂志, 2000, 19(1): 27 - 28.

[4] Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 281(6): R2029 - 2036.

[5] Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Effects of aging and subsequent exercise training on gene expression of endothelin-1 in rat heart[J]. Clin Sci (Lond), 2002, 103 Suppl48: 152S - 157S.

[6] 常 芸, 孙 迎, 陈小同, 等. 运动心脏内分泌功能可复性的研究[J]. 中国运动医学杂志, 1999, 18(1): 3 - 6.

[7] Maeda S, Miyauchi T, Sakai S, et al. Prolonged exercise causes an increase in endothelin-1 production in the heart in rats[J]. Am J Physiol, 1998, 275(6 Pt 2): H2105 - 2112.

[编辑: 郑植友]

《体育学刊》来稿格式与撰写要求(修订版)

1 文体类别

《体育学刊》是报道体育学科研究方面内容的学术理论刊物, 而体育学科是属于人文社会科学与自然科学的综合学科, 体育研究的内容有的属于人文社会科学, 有的属于自然科学。不同学科的论文要用不同的文体和格式来表达。一般来说, 属于体育人文社会科学内容的论文要用议论文(也称论说文)的体裁, 即以议论、说理为主要表达方式的文体, 这类论文不必设置“研究对象”和“研究方法”等章节, 不必把查阅文献、通常的调查了解过程写出来, 如果有影响到论文内容表达的重要材料非交代不可, 可简要写进“前言”段中; 属于体育自然科学内容的论文, 大多数属于实验性、实证性的, 就要用科技论文的体裁与格式来表达, 文章内容应包括“研究对象与方法”、“研究结果”(或“结果与分析”)、“讨论”或“结论”等章节。

2 论文题目

论文题目要准确得体、简短精炼(一般不宜超过 20 个汉字)、便于检索(有助于选定关键词)、容易认读(避免使用非公知公用的缩略语、首字母缩写字、字符代号等)。论文题目在文字上一定要符合汉语语法、逻辑和修辞规则, 决不能出现语病, 尽量做到给人以美感。

3 作者署名

作者署名只限于那些参与选定课题和制定方案, 直接参加全部或主要部分研究工作并做出主要贡献, 以及参加论文撰写并能对论文负责, 同时对论

文具有答辩能力的人员。仅参加部分工作的合作者、某一项测试任务的承担者, 以及接受委托进行分析检验和观察的辅助人员等, 均不应署名, 但可将他们作为参加工作的人员一一列入“致谢”段, 或排于篇首页脚注。

4 作者工作单位

作者工作单位应写全称, 一般应写到系(所、部)一级, 如“华南师范大学体育科学学院 体育系”。工作单位后边加“,”号隔开, 写上所属省市名及邮政编码。多个单位时, 用阿拉伯数字排序, 序号后加下圆点, 并相应在作者姓名右上角标上阿拉伯数字的序号。整个作者单位加圆括号后置于作者署名下方。例: (1. 华南师范大学 体育科学学院 体育系, 广东广州 510631; 2. 北京体育大学 田径系, 北京 010000)

5 中文摘要

摘要是对“论文内容不加注释和评论的简短陈述”。摘要的内容一般包括研究工作的目的、方法、结果与结论, 而重点是结果和结论。摘要用第三人称撰写, 要求简短精炼, 明确具体, 一般要求 50 ~ 300 字。格式要规范, 用规范术语, 不用非公知公用的符号和术语; 不得简单重复标题中的信息; 不与前言雷同。摘要一般不出现插图、表格, 以及参考文献序号; 不用数学公式和化学结构式。摘要不分段。语言要通顺, 结构要严谨, 标点符号要准确。

(下转第 53 页)