

## 间歇运动对肾上腺髓质素特异性受体基因表达的影响

李宏伟

(赣南师范学院 体育学院, 江西 赣州 341000)

**摘 要:** 为了研究间歇运动(intermittent exercise)对肾上腺髓质素受体活性修饰蛋白 2 (Receptor activity modifying protein, RAMP2)和降钙素受体样受体(calcitonin receptor like receptor, CRLR)(两者组成 ADM 特异性受体)基因表达的影响,探讨肾上腺髓质素(Adrenomedullin, ADM)在间歇运动诱导心肌细胞保护中的作用机制。将 SD 大鼠 30 只,分为对照组(C组),间歇运动组(IE组)。IE组进行3周的间歇跑台运动,应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测肾上腺髓质素特异性受体 RAMP2 和 CRLR 的基因表达。结果得到 IE 组大鼠 RAMP2 mRNA 和 CRLR mRNA 表达明显上调。说明间歇运动上调 ADM 特异性受体的基因表达,可使心肌组织中 ADM 特异性受体的含量增加,ADM 对于心脏的作用会因特异性受体的伴随性上调而加强,这对于增强心肌收缩力,扩张冠状动脉,使心肌功能及冠状动脉血流量得以保证,在运动中维持血液动力学稳定和保护心肌细胞起重要的作用。

**关 键 词:** 运动生物化学;间歇运动;肾上腺髓质素;受体活性调节蛋白 2;降钙素受体样受体;基因表达

中图分类号: G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2010)10-0105-04

### Effects of intermittent exercising on the gene expression of particular adrenal medullarin receptors

LI Hong-wei

(School of Physical Education, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, China)

**Abstract:** In order to study the effects of intermittent exercising on the gene expression of adrenal medullarin (ADM) receptor activity modifying protein 2 (RAMP2) and calcitonin receptor like receptors (CRLR), which constitute particular ADM receptors, and to explore the functioning mechanism of ADM in intermittent exercising inducing cardiac muscle cell protection, the authors divided 30 SD rats into a control group (group C) and an intermittent exercising group (group IE), let the rats in group IE do a 3-week intermittent treadmill exercise, applied real time fluorescent quantified reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to test the expression of particular ADM receptors RAMP2 and CRLR, and revealed that the levels of expression of RAMP2 mRNA and CRLR mRNA of the rats in group IE increased significantly, which indicates that intermittent exercising increases the gene expression of particular ADM receptors, can increase the contents of particular ADM receptors in cardiac muscle tissues, and that the functions of ADM on the heart are enhanced by the increase of particular receptors, which plays an important role in strengthening cardiac muscle contraction, dilating coronary arteries, ensuring cardiac muscle functions and coronary artery blood flow, as well as maintaining hemodynamic stability and protecting cardiac muscle cells during exercising.

**Key words:** sports biochemistry; intermittent exercise; adrenal medullarin; receptor activity modifying protein 2; calcitonin receptor like receptor; gene expression

间歇运动(intermittent exercise)的心肌细胞保护作用已被大多数的研究所认可<sup>[1-7]</sup>, 其机制与间歇运动诱导内源性保护物质产生, 提高抗氧化酶活性, 开放线粒体 ATP 敏感的钾通道(mKATP), 改善心功能, 减少心肌酶的漏出, 减小心肌梗塞面积和危险面积, 降低心律失常发生率, 减轻组织脂质过氧化反应有关。研究表明, 运动预适应诱导产生的保护物质与间歇运动的心肌细胞保护关系最为密切, 是研究的热点。目前研究显示, 间歇运动诱导产生的保护物质主要与以下 3 类物质的改变有关: ①抗氧化酶活性的提高; ②应激蛋白的产生; ③内源性保护物质的合成和释放。内源性保护物质主要集中在心血管的活性物质。心血管活性物质是一组对心肌细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及相关细胞的功能调节具有重大影响的物质, 除包括支配心肌、血管的神经释放的神经递质外, 还包括一些小分子物质(NO、PG); 细胞因子和生长因子类以及心血管活性肽。心血管活性肽是该类物质中成员最多、功能最复杂的一些短肽, 在间歇运动中起重要作用。主要包括: ①肾素-血管紧张素系统; ②内皮素系统; ③降钙素/降钙素基因相关肽超家族; ④激肽释放酶-激肽系统和利尿钠肽家族。其中大部分物质在心肌缺血预适应中起的作用已经被证实。这些物质在间歇运动诱导的预适应中是否也起到同样的作用? 尽管在降钙素/降钙素基因相关肽超家族中的降钙素基因相关肽(配体)的作用已被孙晓娟, 潘珊珊等<sup>[8]</sup>的研究证实, 与其同一家族的肾上腺髓质素(配体)也被李宏伟, 潘珊珊等<sup>[9-10]</sup>的研究证实, 但配体与受体结合才能发挥配体的作用, 才能全面阐明保护机制, 因此本研究在复制间歇运动动物模型的基础上, 应用实时荧光定量聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测肾上腺髓质素特异性受体-肾上腺髓质素受体活性修饰蛋白 2(receptor activity modifying protein, RAMP2)和降钙素受体样受体(calcitonin receptor like receptor, CRLR)的基因表达, 以全面阐明肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)在间歇运动诱导心肌细胞保护中的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物及实验模型的建立

采用雄性健康 SD 大鼠 40 只, 随机分为对照组(C 组), 间歇运动组(IE 组)。EP 动物模型的运动方案参照文献[1-5, 7]制定, 即 IE 组大鼠以速度 30 m/min, 坡度为 0°, 持续时间为 60 min, 共 3 周的运动负荷进行跑台训练。在 60 min 的间歇跑台训练中, 大鼠运动 15 min, 休息 5 min, 重复 3 次。C 组大鼠放在跑台上

同样时间, 但不运动。淘汰运动能力差的大鼠。

### 1.2 取材

建模结束后, 各组大鼠均以质量分数为 0.4%戊巴比妥钠(100 g 体重 1 mL)腹腔麻醉后, 取仰卧位固定, 打开胸腔, 暴露心脏, 从心尖处插入灌注针头, 缓慢注入质量分数为 1%肝素 2 mL, 再快速滴注质量分数为 0.85%的生理盐水 400 mL, 并迅速剪断后腔静脉。待生理盐水滴完后, 迅速取整心-80 °C 冰箱保存。

### 1.3 实时荧光定量 RT-PCR 实验

取 100 mg 大鼠心脏, 用电动匀浆器进行匀浆; 两相分离, RNA 沉淀, RNA 清洗, 振荡溶解, RNA 沉淀。根据 GenBank 进行引物设计: GAPGH(内参基因)CRLR、RAMP2 的引物序列(表 1), 制备用于绘制标准曲线的梯度稀释 DNA 模板, 针对每一需要测量的基因和管家基因, 选择一确定表达该基因的 cDNA 模板进行 PCR 反应。设置 PCR 反应: 95 °C 变性 3 min; 40 个 PCR 循环(94 °C 20 s; 59 °C 20 s; 72 °C 30 s); 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物与 100 bp DNA Ladder 在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 检测 PCR 产物为单一特异性扩增条带。将 PCR 产物进行 10 倍梯度稀释: 设定 PCR 产物浓度为 1, 分别稀释为  $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-9}$  等梯度浓度的 DNA。这几个梯度稀释的 DNA 模板以及所有 cDNA 样品分别配置 Realtime PCR 反应体系。PCR 反应溶液置于 Light Cycler System 荧光 PCR 仪(RG-3000, Roche Diagnostics, Switzerland)上进行反应。GAPDH: 95 °C 5 min; 35 个 PCR 循环(95 °C 10 s; 59 °C 15 s; 72 °C 20 s; 84 °C(收集荧光), 5 s); RAMP2: 95 °C 5 min; 40 个 PCR 循环(95 °C 10 s; 59 °C 15 s; 72 °C 20 s; 85 °C(收集荧光), 5 s); CRLR: 95 °C 5 min; 40 个 PCR 循环(95 °C 10 s; 59 °C 15 s; 72 °C 20 s; 80 °C(收集荧光), 5 s)。计算各样品的目的基因和管家基因分别进行 Realtime PCR 反应。根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线, 各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度, 即为此样品此基因的校正后的相对含量。

### 1.4 统计学处理

实验数据采用 SPSS12.0 软件处理, 所有数据均用平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用两样本均数 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果及分析

各因子引物序列设计(表 1)、实时定量 PCR 时各样品加样量均为 1  $\mu$ L, 然而由于受 RNA 浓度定量误

差和 RNA 逆转录效率误差等的影响, 每个样品的 1  $\mu$ L 体积的 cDNA 其含量并不完全相同, 为校正此差异, 我们使用管家基因 GAPDH(不同样品间表达量基本

恒定)作为内参, 以样品待测基因的值除以样品内参的值, 最终得到的比值为样品的待测基因相对含量(表 2)。

表 1 各因子引物序列设计

基因	双向引物序列(5'-3')	延伸温度/°C	模板/bp
GAPDH	F:5'AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC3' R:5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'	59	203
CRLR	F:5'CCTAAGTTGCCAACGGATT3' R:5'ACCTTGACAGCTCACAGGATT3'	59	138
RAMP2	F:5'ACCTGCGGTATTGCTTGAG3' R:5'GCGTAACGAGGAAAGGGATG3'	59	204

表 2 各组大鼠 CRLR mRNA 及 RAMP2 mRNA 表达的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n/只	受体	基因的相对含量
对照组	15	CRLR	5.48 $\pm$ 0.25
		RAMP2	1.96 $\pm$ 0.21
运动预适应组	15	CRLR	9.75 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>
		PAMP2	5.84 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>

1)与对照组比较,  $P < 0.01$ ; 2)与对照组比较,  $P < 0.01$

荧光定量 RT-PCR 扩增结果发现, 达到额定荧光阈值的循环次数( $C_t$ )介于 20~30 次。根据标准曲线, 可以推测 CRLR mRNA 及 RAMP2 mRNA 的起始拷贝数均在  $10^2 \sim 10^6$ , 处于线性范围内。由表 2 可以看出, 运动预适应组大鼠 CRLR mRNA 及 RAMP2 mRNA 基础表达量(以校正后的基因拷贝数的相对含量表示)显著高于对照组( $P < 0.01$ ), 提示运动预适应后, CRLR mRNA 及 RAMP2 mRNA 基因表达水平上调。表明运动预适应提高了大鼠 ADM 特异性受体基因表达的调控能力。

### 3 讨论

目前有多种受体可与 ADM 作用, 主要有 CGRP1 受体和孤儿 G-蛋白偶联受体(Orphan G protein coupling receptor, oGPCR)的 RDC-1、L1 及降钙素受体样受体(calcitonin receptor like receptor, CRLR)等<sup>[11]</sup>。近年发现 ADM 受体表型不仅取决于受体本身结构, 还取决于一种受体活性修饰蛋白(Receptor activity modifying protein, RAMPs)的调控<sup>[12-13]</sup>, RAMPs 有 3 个成员, 即 RAMP1、RAMP2、RAMP3, 其中 RAMP1 与 CRLR 结合并转运至细胞膜成为功能性降钙素基因相关肽受体(CGRP1R), 而 RAMP2 与 CRLR 结合则为特异性 ADM 受体(RAMP2/CRLR), RAMP3 功能还不清楚。可见, RAMP2 与 CRLR 的同时变化才是 ADM 发挥作用的关键所在。

关于运动对 ADM 特异性受体基因 mRNA 表达的

研究非常有限。袁铭等<sup>[14]</sup>应用 Boster 公司生产的 ADM 受体原位杂交试剂盒, 探讨 ADM 受体的表达, 结果显示在培养的血管内皮细胞出现棕黄色颗粒, 说明血管内皮细胞有 ADM 受体 mRNA 的表达, 但该实验未区分 RAMP2 和 CRLR, 因此特异性不强。贺杰等<sup>[15]</sup>让 SD 大鼠无负重游泳适应训练 1 周后进行 5 周递增负荷游泳训练, 5 次/周, 50 min/次, 以后的每周游泳训练递增 10 min, 直至 90 min/次, 并保持此强度到训练结束。结果提示, 长时期进行低强度的有氧游泳训练能在不同程度上引起心脏 RAMP2 mRNA 表达显著上调, 反映出长期低强度有氧运动在分子水平上的良好适应, 而长时期进行低强度有氧游泳训练对主动脉的影响是 RAMP2 mRNA 表达无显著变化, 但该实验没有同时测定 CRLR, 因此不能全面反映 ADM 特异性受体的调控机制。本实验通过实时荧光定量 PCR 对 ADM 的特异性受体 RAMP2 和 CRLR 的基因表达同时进行了研究。结果显示, 间歇运动同时上调 ADM 的特异性受体 RAMP2 和 CRLR 的基因表达, 说明间歇运动促使心肌细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞合成和释放 ADM 作用于心肌局部, 同时通过上调 RAMP2 和 CRLR 的基因表达, 上调 RAMP2 和 CRLR, 然后作用于心肌细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞, 通过信号转导而发挥其调节心血管功能的作用及在运动中维持血液动力学稳定和心肌细胞免受损伤。

研究表明, 心肌受到伤害性刺激后, 如缺血、缺氧, 机械压性应力增强、心肌细胞的伸长, 炎性因子如白细胞介素-1、肿瘤干扰因子、脂多糖、血管紧张素-II、内皮素-1 等分泌增加, ADM mRNA 表达显著增加。这些因素同样也可以使心肌细胞上的 ADM 受体发生质和量的变化称为 ADM 受体调节, 受体调节可以使心肌更好地适应内外环境的变化, 但如受体反应性减弱可保护细胞免受过量或长期刺激而导致生理功能紊乱, 但受体过度则又会引起一系列病理性后果。

大强度运动是一种伤害性刺激,可以显著提高交感-肾上腺髓质系统活动,极大增加心率和血压,造成血流动力学稳态失衡,心肌发生缺血缺氧,进而可能发生心肌顿抑,甚至心源性运动猝死。因此,机体为了抵御这种损伤调动了各种机制,间歇运动是其中重要的机制之一。间歇运动实施心脏保护主要是通过调动和激发内源性保护物质。本实验结果提示,间歇运动的刺激能显著启动心脏 CRLR 和 RAMP2 的基因转录,或者说引起心脏 CRLR mRNA 和 RAMP2 mRNA 量的积累,因而可对心肌组织中 CRLR 和 RAMP2 含量会有显著影响。经过间歇运动训练后,心脏 CRLR mRNA 和 RAMP2 mRNA 表达上调可使心肌组织中 CRLR 和 RAMP2 含量增加。同时 ADM 对于心肌的作用可能会因为 CRLR 和 RAMP2 的伴随性上调而加强。在 EP 中 ADM 增强心肌收缩力,扩张冠状动脉,这样使心肌功能及冠状动脉血流量得到保证。ADM 对心脏的作用必须通过和心脏相应的 ADM 特异性受体结合并通过受体的调节来完成。本实验 CRLR mRNA 和 RAMP2 mRNA 上行调节的结果提高了心脏局部的 ADM 的水平,增强 ADM 对心脏的作用。间歇运动刺激的 ADM 受体正向调节作用是适度的反应性增强调节,能增强心脏对运动的适应,如运动的强度或方式的改变可能会导致调节过度或受体失敏。这从另一个侧面反映了间歇运动对心肌细胞的保护作用是机体对间歇运动这种运动形式产生了良好的生物学适应。

间歇运动上调 ADM 特异性受体 CRLR 和 RAMP2 的基因表达,可使心肌组织中 CRLR 和 RAMP2 的含量增加,ADM 对于心脏的作用会因 CRLR 和 RAMP2 的伴随性上调而加强,这对于增强心肌收缩力、扩张冠状动脉,使心肌功能及冠状动脉血流量得到保证,在运动中维持血液动力学稳定和保护心肌细胞起重要的作用。

### 参考文献:

- [1] Domench R J, Macho P, Schwarze H, et al. Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55(3): 561-566.
- [2] Hoshida S, Yamashita N. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40(4): 826-831.
- [3] Paraskevaidis I A, Iliodotis E K, Mavrogeni S, et al. Repeated exercise stress testing identifies early and late preconditioning[J]. *Int J Cardiol*, 2005, 98(2): 221-226.
- [4] Ding Y H, Young C N, Luan X, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion[J]. *Acta Neuropathol*, 2005, 109(3): 74-84.
- [5] Ding Y H, Mrizek M, Lai Q, et al. Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF-alpha receptor expression after hypoxia/reoxygenation: an in vivo and in vitro study[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2006, 3(4): 263-271.
- [6] Domench R J. Preconditioning: a new concept about the benefit of exercise[J]. *Circulation*, 2006, 113(1): 1-3.
- [7] 翟庆峰, 刘洪涛, 李媛媛, 等. 血红素氧合酶-1 对心肌相对缺血/再灌注损伤的延迟保护作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2008, 24(1): 50-54.
- [8] 孙晓娟, 潘珊珊. 不同强度运动对大鼠心脏降钙素基因相关肽的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2006, 25(4): 416-419.
- [9] 李宏伟, 潘珊珊. 短期和长期间歇运动对大鼠心肌和冠状血管肾上腺髓质素的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2009, 28(4): 395-397.
- [10] 李宏伟, 潘珊珊. 肾上腺髓质素在运动预适应诱导心肌细胞保护中的作用[J]. *上海体育学院学报*, 2009, 33(6): 45-49.
- [11] Benitez-paez A. Sequence analysis of the receptor activity-modifying proteins family, new putative peptides and structural conformation inference[J]. *In Silico Biol*, 2006, 6(6): 467-483.
- [12] Yanagawa B, Nagaya N. Adrenomedullin: molecular mechanisms and its role in cardiac disease[J]. *Amino Acids*, 2007, 32(1): 157-164.
- [13] Qi T, Christopoulos G, Bailey R J, et al. Identification of N-terminal receptor activity-modifying protein residues important for calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and amylin receptor function[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(4): 1059-1071.
- [14] 袁铭. 肾上腺髓质素对血管内皮细胞的生物学作用及机制[D]. 西安: 第四军医大学, 2002.
- [15] 贺杰, 罗艳蕊, 漆正堂. 长时间低强度游泳运动对大鼠心血管系统肾上腺髓质素及其受体活性修饰蛋白 mRNA 表达的影响[J]. *天津体育学院学报*, 2005, 20(4): 5-7.