

下坡跑运动对骨骼肌 $\alpha 7 \beta 1$ 整合素及 FAK 表达的影响

李敏¹, 张林²

(1.商丘师范学院 体育学院, 河南 商丘 476000; 2.苏州大学 体育学院, 江苏 苏州 215021)

摘 要: 通过观察下坡跑运动后 $\alpha 7 \beta 1$ 整合素及 FAK 的表达和 FAK 活性的变化, 探讨 $\alpha 7 \beta 1$ 整合素在运动重复效应中作用机制。将 32 只小鼠随机分为安静对照组, 运动后 3 h 组、24 h 组、8 d 组。小鼠进行一次性下坡跑运动, 速度为 17 m/min, 坡度为 -20° , 时间为 30 min。各组于各时刻点摘眼球取血及取双侧腓肠肌。比色法检测血清 CK 活性, Real-time PCR 检测 $\alpha 7 \beta 1$ 整合素及 FAK 的 mRNA 表达, Western blot 检测 $\alpha 7 \beta 1$ 整合素及 pFAK397 的蛋白表达。结果显示一次下坡跑运动后 CK 活性升高显著, 且在 24 h 增幅增大。 $\alpha 7$ integrin mRNA 在一次运动后 3 h 显著增加, 但在 24 h 变化不明显, 但 8 d 时仍增加显著, 其蛋白水平在运动后 3 h 显著增加, 虽在 24 h 和 8 d 时升高程度逐渐降低但仍呈显著。 $\beta 1$ integrin mRNA 在一次运动后 3 h 显著增加, 24 h 及 8 d 变化不明显, 蛋白水平在一次运动后 3 h 呈显著升高, 24 h 升高程度增加, 在 8 d 时回复。FAK mRNA 在一次运动后 3 h 显著增加, 24 h 及 8 d 变化不明显, pFAK397 水平在一次运动后呈现显著升高, 24 h 升高程度降低, 8 d 时基本回复。结果表明 $\alpha 7 \beta 1$ 整合素-FAK 信号通路介导了运动重复效应。
关键词: 运动生物化学; 下坡跑运动; 骨骼肌; 整合素; 黏附斑激酶; 重复效应; 小鼠
中图分类号: G804.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-7116(2015)01-0134-05

Effects of downhill running on the expression of $\alpha 7 \beta 1$ integrin and FAK in skeletal muscle

LI Min¹, ZHANG Lin²

(1.School of Physical Education, Shangqiu Normal College, Shangqiu 476000, China;

2.School of Physical Education, Soochow University, Suzhou 215021, China)

Abstract: In order to probed into the mechanism of $\alpha 7 \beta 1$ integrin working on the repeated bout effect by observing the changing of the expression of $\alpha 7 \beta 1$ integrin and FAK as well as FAK activity after downhill running, the authors divided 32 mice randomly into a calm control group, a 3 h after running group, a 24 h after running group, and an 8 d after running group, let the mice carry out one-time downhill running at a speed of 17 m/min, on a slope of -20° , for 30 minutes, took the eyeball blood and both-sides gastrocnemius of the mice in various groups at the said times, measured serum CK activity by means of colorimetry, measured the mRNA expression of $\alpha 7 \beta 1$ integrin and FAK by means of real-time PCR, measured the protein expression of $\alpha 7 \beta 1$ integrin and pFAK397 by means of Western blot, and revealed the following findings: after one-time downhill running, CK activity increased significantly, and the increment increased at 24 h; $\alpha 7$ integrin mRNA increased significantly at 3 h after one-time running, but changed insignificantly at 24 h, yet still increased significantly on day 8, its protein level increased significantly at 3 h after running, the degree of increasing was still significantly although it decreased gradually at 24 h and on day 8; $\beta 1$ integrin mRNA increased significantly at 3 h after one-time running, changed insignificantly at 24 h and on day 8, its protein level increased significantly at 3 h after one-time running, the degree of increasing increased at 24 h, but dropped back on day 8; FAK mRNA increased significantly at 3 h after one-time running, changed insignificantly at

收稿日期: 2014-07-07

基金项目: 河南省教育厅项目(2011A890007)。

作者简介: 李敏(1974-), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 运动生理学。E-mail: liminxz74@163.com

24 h and on day 8, pFAK397 level increased significantly after one-time running, the degree of increasing decreased at 24 h, basically dropped back on day 8. The said findings indicate that $\alpha 7\beta 1$ integrin and FAK signal pathway mediated the repeated bout effect.

Key words: exercise biochemistry; downhill running; skeletal muscle; integrin; FAK; repeated bout effect; mouse

运动产生的骨骼肌损伤一直是运动医学领域中研究的热点和难点,离心运动更易产生骨骼肌损伤,但这种运动形式却是运动过程所必须的。一次离心运动会导致骨骼肌损伤和酸痛,第 2 次同样的运动会导致较小的肌肉损伤,而且这种损伤保护机制可以持续达 6 个月^[1],这就是通常所说的运动重复效应(repeated bout effect, RBE)或者保护效应(protective effect)。有关 RBE 的机制研究很多,神经、机械和细胞(增加肌小节长度、炎症反应等)适应性都可能产生这种重复效应^[2]。目前有研究表明骨架蛋白连接分子整合素可能是运动保护效应的一种机制。

整合素作为膜受体家族,它不仅连接细胞骨架于 ECM(engine control module),而且在机械和化学信号传导中具有重要作用。其 $\beta 1$ 亚基在不同细胞广泛表达,可以和不同 α 亚基形成二聚体,而在骨骼肌中仅和 $\alpha 7$ 亚基形成二聚体,并于肌膜处表达,但在肌腱连接处和神经肌肉连接处的含量最丰富^[3-4]。研究表明 $\alpha 7$ 基因的突变会引起先天性肌病^[5],肌营养不良患者和其模型鼠(mdx mice)的 $\alpha 7\beta 1$ 的含量都会增加^[6],患有严重肌病的鼠转染 $\alpha 7\beta 1$ 整合素后肌腱连接处和神经肌肉连接处的完整性增强^[7],转染 $\alpha 7$ 整合素可以防止运动产生的损伤^[8]。而 $\alpha 7$ 整合素缺失会导致运动后损伤加重^[9]。这些研究表明 $\alpha 7\beta 1$ 整合素对骨骼肌的损伤产生反应,在抗损伤中具有重要作用。虽然已有运动后 $\alpha 7$ 整合素变化的相关研究报道,但关于运动后 $\beta 1$ 亚基是否变化及是否激活相应信号通路还未见报道,本研究通过研究小鼠下坡跑运动后 $\alpha 7\beta 1$ 整合素及其下游关键因子黏附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的表达及磷酸化水平来探讨 $\alpha 7\beta 1$ 整合素介导的运动重复效应的分子机制,以期运动损伤的预防、恢复及肌病的运动康复提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及运动方案

5 周龄健康雌性小鼠 32 只(体重 (20.7 ± 1.4) g,购自徐州医学院动物中心),分笼饲养,室温为 $18 \sim 22^\circ\text{C}$,相对湿度为 $50\% \sim 60\%$ 。适应性喂养 1 周后随机分为 4 组(每组 8 只):安静对照组(C)、运动后 3 h 组(E3h)、运动后 24 h 组(E24 h)和运动后 8 d 组(E8d)。

运动组小鼠进行一次性下坡跑运动,速度为 17

m/min,坡度为 -20° ,时间为 30 min。安静对照组常规饲养,不做任何运动干预。

1.2 取材与指标测试

一次运动小鼠分别于运动后 3 h、24 h、8 d 进行取材。安静对照组于 E3h 组运动后 4 d 同时段取材^[9]。小鼠均以质量分数 10%的水合氯醛溶液腹腔注射进行麻醉(0.004 mL/g)。(1)摘眼球取血约 1.5 mL 左右, 4°C 3 000 r/min 离心 15 min,取血清低温保存,用于血清 CK 活性测试。血清 CK 活性采用南京建成生物制剂公司的试剂盒测定。(2)迅速取腓肠肌,冰生理盐水清洗,滤纸吸干,投入液氮冷冻,然后分组置于 -80°C 冰箱保存备用。

Real-time PCR 检测骨骼肌 mRNA 的表达。引物由上海生物工程有限公司合成。目的基因 $\alpha 7$ integrin 引物序列(5' \rightarrow 3' 方向,下同): Forward primer AATGTGTCCGTCGGTGGATCTGA, Reverse primer AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTC, 目的基因 $\beta 1$ integrin: Forward primer AATGTGTTTCAGTGCAGAGCC, Reverse primer TCCTTCTCCTTGCAATGGGT, FAK: Forward primer 5'-CCCTATGCTGAAGGAAGTCG-3', Reverse primer 5'-TGCCATCTCAATCTCTCGGT-3', 内参基因 β -actin: Forward primer GTCCACCGCAAATGCTTCTA, Reverse primer TGCTGTACCTTCACCGTTC。Trizol 法抽提 RNA,取总 RNA 1 μg ,按反转录试剂盒(TOYOBO FSQ 101)操作指南合成 cDNA,实时荧光 PCR 的反应体系为: SYBR Green Mix 10 μL 、上游引物 0.04 μL (50u)、下游引物 0.04 μL (50u)、样品溶液 2 μL 。PCR 循环条件:预变性 [95°C , 60 s]; [95°C , 15 s; 60°C , 30 s; 72°C , 45 s], 45 个循环;再变性 [95°C , 75 s], 退火 [60°C , 60 s], 然后从 60°C 缓慢加热到 95°C , 15 s; 每 1°C 收集荧光。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算样品 RNA 相对含量(倍数)。

Western Blot 法测定蛋白的表达。取适量组织于预冷蛋白抽提试剂中低温匀浆, 20 000 g, 4°C 离心 15 min,取上清。Bradford 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 15% SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上。将膜在一抗中孵育, 4°C 过夜(1:1 000(质量比)稀释, Abcam);用 TTBS 洗 3 次,每次振摇 5 min。在二抗(1:2 000(质量比)稀释, Sigma)中孵育 1 h,用 TTBS 洗 3 次,每次

振摇 5 min。用 ECL 反应液做发光底物,在暗室用 X 线胶片曝光、显影、定影、晾干。采用 Image J 软件对蛋白进行光密度分析,以 β -actin 为内参。目的蛋白相对含量=目的蛋白灰度值/ β -actin 蛋白灰度值。

1.3 统计分析

结果以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS15.0 软件进行单因素方差分析(One Way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准,以 $P < 0.01$ 为差异非常显著性标准。

2 结果及分析

2.1 下坡跑运动对小鼠血清中 CK 活性的影响

如图 1 所示,一次运动后 3 h CK 活性开始升高,具有非常显著性差异($P < 0.01$),表明离心运动使骨骼肌受损,CK 漏出增多。在 24 h 时其活性大幅度升高($P < 0.01$),为安静对照组的 2.56 倍,表明此时损伤严重,运动后 8 d CK 活性基本恢复($P > 0.05$)。

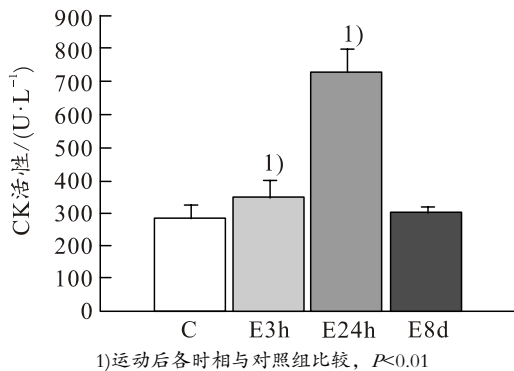


图 1 各组小鼠 CK 活性

2.2 下坡跑运动对 $\alpha 7 \beta 1$ 整合素的影响

如图 2 所示, $\alpha 7$ integrin mRNA 在运动后 3 h 非常显著增加($P < 0.01$),但在 24 h 变化不明显($P > 0.05$),而在运动后 8 d 仍呈现非常显著增加($P < 0.01$),由图 3 可见运动后 3 h $\alpha 7$ 整合素蛋白水平表现为非常显著增加($P < 0.01$),虽在 24 h 时升高程度降低但增加仍呈非常显著($P < 0.01$),8 d 时依然显著升高($P < 0.05$)。

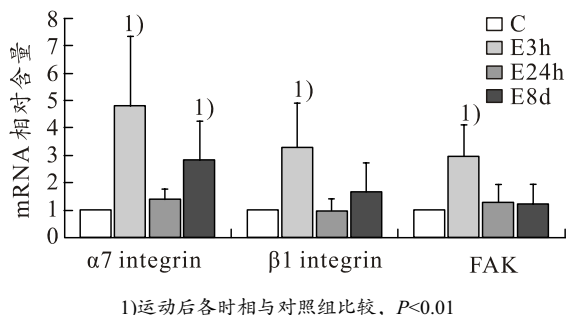


图 2 各组小鼠 $\alpha 7$ integrin、 $\beta 1$ integrin、FAK mRNA 比较

由图 2 可见 $\beta 1$ integrin mRNA 在运动后 3 h 非常显著增加($P < 0.01$),24 h 变化及 8 d 较运动前变化不明显($P > 0.05$),由图 3 可见其蛋白水平在运动后呈现显著升高($P < 0.05$),24 h 升高程度增加($P < 0.01$),在 8 d 时回复到运动前水平($P > 0.05$)。

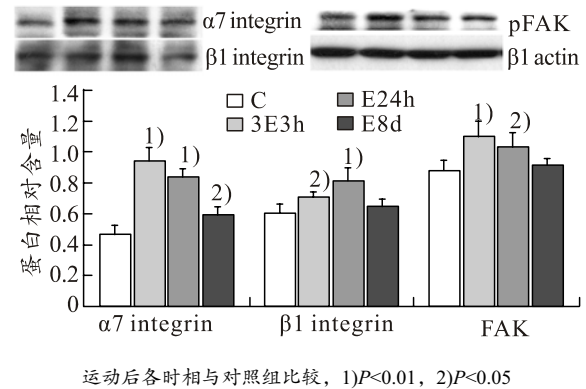


图 3 各组小鼠骨骼肌 $\alpha 7$ integrin、 $\beta 1$ integrin、pFAK 蛋白含量比较

2.3 下坡跑运动对 FAK mRNA 和 pFAK397 水平的影响

由图 2 可见 FAK mRNA 水平在一次运动后 3 h 非常显著增加($P < 0.01$),在 24 h 及 8 d 变化不明显($P > 0.05$),但由图 3 可见 pFAK397 水平在运动后呈现非常显著升高($P < 0.01$),24 h 升高程度降低($P < 0.05$),8 d 时已回复($P > 0.05$)。

3 讨论

小鼠一次下坡跑运动后 $\alpha 7$ 整合素 mRNA 和蛋白表达显著升高,表明离心运动可同时在基因和蛋白水平上调 $\alpha 7$ 整合素的表达,运动后 $\alpha 7$ 整合素在 mRNA 水平增加的幅度大大高于蛋白水平的增加,可能是蛋白质作为基因表达的最终产物,还需要一系列的翻译及加工过程,蛋白水平增加程度相对低也是合理的。 $\alpha 7$ 整合素的 mRNA 表达在 24 h 与安静对照组相比变化不大,而此时蛋白水平表达仍呈显著上升,这可能由于运动后 24 h 是骨骼肌损伤严重阶段,一些分解酶表达和活性增加, mRNA 水平下降可能与其降解增多有关,也可能由于 mRNA 被翻译的增多。下坡跑运动后 CK 显著升高,骨骼肌产生损伤,同时 $\alpha 7$ 整合素在 mRNA 和蛋白水平均表现出增加,表明 $\alpha 7$ 整合素和骨骼肌损伤之间存在一定关系。研究发现比目鱼肌横断后 $\alpha 7$ mRNA 表达增加^[10], $\alpha 7$ 整合素缺失鼠进行 2 次下坡跑后保护效应消失^[11],肌肉损伤更加严重,而转染 $\alpha 7$ 整合素鼠 2 次运动后较未转染鼠损伤显著减轻^[8]。因此,重复运动后损伤减轻可能一定程度上得

益于一次运动后 $\alpha 7$ 整合素表达的升高。

骨骼肌细胞内成分与细胞外基质相互作用主要是通过抗萎缩蛋白-糖蛋白复合物(dystrophin-glycoprotein complex, DGC)和整合素。研究表明 $\alpha 7$ 基因[ITGA7]突变引起人类的先天性肌病^[5],肌营养不良患者和其模型鼠中 $\alpha 7$ 整合素 2 倍增加^[6], $\alpha 7$ 整合素缺失导致的肌萎缩表现为随着年龄增长和机械应力作用下肌腱连接处和神经肌肉接头处完整性的逐渐丢失^[12], $\alpha 7$ 整合素和抗萎缩蛋白的双缺失会导致病情的进一步加重,而转染 $\alpha 7$ 整合素后肌腱连接处的完整性增强^[7],因此,研究者认为额外增加的 $\alpha 7$ 整合素可能部分代偿了肌萎缩蛋白复合物的缺失,从而调节疾病的程度和进展。抗萎缩蛋白作为离心运动后最早和易丢失的蛋白,运动后 $\alpha 7$ 基因表达的增加可能如同肌病中一样部分代偿了抗萎缩蛋白的功能。但是也有研究认为 $\alpha 7\beta 1$ 整合素作为基底膜层黏连蛋白(laminin, LN)-1, -2, -3 的特殊受体,是肌纤维和细胞外基质之间必不可少的连系,独立于 DGC 介导的肌肉基膜和细胞骨架之间的相互作用^[12]。 $\alpha 7\beta 1$ 整合素分布于肌纤维膜,于肋节、肌腱连接处和神经肌肉连接处含量丰富^[3-4]。肋节是把肌原纤维固定于 Z 线上的一组蛋白,肌腱连接处是把肌肉产生的力传递给骨骼从而引起肢体运动的特殊结构,位于此处的整合素在接受力和传递力过程中具有重要的作用。 $\alpha 7$ 缺陷导致了骨骼肌肌腱连接处结构变形、皱折减少、肌丝回缩、肌肉耐力及收缩力(前肢握力)下降^[13]。转染 $\alpha 7$ 后可使运动后的承载较高力的肌腱连接处保持完好,肌力提前回复^[7-8]。因此,离心运动后增加的 $\alpha 7$ 整合素可能发挥着抵抗 2 次运动的机械力的作用。

$\beta 1$ 亚基是骨骼肌中唯一可以和 $\alpha 7$ 链形成二聚体的亚基^[14],它们分别由独立的基因编码。 $\alpha 7$ 亚基决定了各个肌纤维的基膜上 LN 配体的特异性,而 $\beta 1$ 亚基通过一些肌动蛋白结合蛋白,如踝蛋白(Tal)、桩蛋白(Pax)、黏附斑蛋白(Vin)等以及黏附斑激酶(FAK)与肌动蛋白等相连而介导信号传递^[15]。本研究中运动后增加的 $\beta 1$ 整合素可能介导了运动后骨骼骨的损伤、修复及再生。通常整合素二聚体在内质网内形成,在高尔基器内翻译后达到细胞膜,当一个亚基超过另一个亚基时,多余的亚基和伴侣蛋白以未成熟形式保留在内质网内等待和其它亚基聚合^[16],至于运动后 $\beta 1$ 亚基未和 $\alpha 7$ 亚基同等程度变化而是变化程度低于 $\alpha 7$ 亚基的具体原因还需要进一步探讨。此外,值得注意的是在本研究中 $\beta 1$ 亚基蛋白水平在运动后 24 h 增加大于 3 h,而此时为损伤严重时期,这可能也提示 $\beta 1$ 亚基表达除负载外还对一些炎症因子作出反应。总

之, $\beta 1$ 亚基与 $\alpha 7$ 亚基在运动后均表达升高表明了两亚基表达与机械负载之间的直接联系及在抗损伤作用中的协同作用。

整合素作为一种重要的信号转导分子,由于本身不具有酶的活性,因此,必须激活一些下游分子。FAK 是一个胞浆酪氨酸激酶,在整合素介导的信号传导中起着关键作用,而其中 FAK 的 Tyr397 位点的磷酸化是其激活的关键一步, Tyr397 位点自身磷酸化,继而通过磷酸化 Src-家族激酶,导致 Tyr576、Tyr577 及整个酶区的 FAK 活化,从而介导肌细胞的黏附、增殖及存活等生理过程。本研究中下坡跑运动上调了 FAK 的表达和 FAK 的磷酸化水平, FAK 信号通路被激活。FAK 活化位点 Tyr397 的磷酸化主要依赖于整合素聚集成簇,整合素聚集或胞浆区构象的改变可增强 FAK 的 N-末端结构域和 β 整合素尾部的结合, FAK 构象的变化会使 FAK 活化位点 Tyr397 暴露出来而产生自身磷酸化。本研究中 FAK 的表达及其 Tyr397 位点的磷酸化位点增加及整合素表达变化的相对一致性表明一次离心运动后黏着斑增加从而使 FAK 的 Tyr397 位点自身磷酸化增多, $\alpha 7\beta 1$ 整合素-FAK 信号通路被激活。

一次离心运动后即可在转录水平和翻译水平上调 $\alpha 7\beta 1$ 整合素,这种表达的升高可以延续到第 8 天,可抵抗重复运动时带来的机械牵拉。不仅如此, FAK 的转录水平和磷酸化水平升高表明了一次运动也激活了整合素信号通路。因此,这种机械敏感性蛋白在离心运动后不会象其它膜蛋白那样丢失而是升高,不仅起到增加黏附去抵抗机械力还起到激活其下游因子而提高细胞存活、再生和修复等能力,从而介导了重复运动效应中抗损伤作用。

参考文献:

- [1] Nosaka K, Sakamoto K, Newton M, et al. How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last?[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2001, 33(9): 1490-1495.
- [2] McHugh M P. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2003, 13(2): 88-97.
- [3] Collo G, Starr L, Quaranta V. A new isoform of the laminin receptor integrin alpha 7 beta 1 is developmentally regulated in skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 1993, 68(25): 19019-19024.

- [4] Martin P T, Kaufman S J, Kramer R H, et al. Synaptic integrins in developing, adult, and mutant muscle: selective association of $\alpha 1$, $\alpha 7A$, and $\alpha 7B$ integrins with the neuromuscular junction[J]. *Dev Biol*, 1996, 174(1): 125-139.
- [5] Vachon P H, Xu H, Liu L, et al. Integrins ($\alpha 7\beta 1$) in muscle function and survival. Disrupted expression in merosin-deficient congenital muscular dystrophy[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(7): 1870-1881.
- [6] Hodges B L, Hayashi Y K, Nonaka I, et al. Altered expression of the $\alpha 7\beta 1$ integrin in human and murine muscular dystrophies[J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(Pt22): 2873-2881.
- [7] Burkin D J, Wallace G Q, Nicol K J, et al. Enhanced expression of the $\alpha 7\beta 1$ integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice[J]. *J Cell Biol*, 2001, 152(6): 1207-1218.
- [8] Boppart M D, Burkin D J, Kaufman S J. $\alpha 7\beta 1$ -integrin regulates mechanotransduction and prevents skeletal muscle injury[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(6): 1660-1665.
- [9] Lueders T N, Zou K, Huntsman H D, et al. The $\alpha 7\beta 1$ -integrin accelerates fiber hypertrophy and myogenesis following a single bout of eccentric exercise[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(4): C938-C946.
- [10] Kaariainen M, Nissinen L, Kaufman S, et al. Expression of $\alpha 7\beta 1$ integrin splicing variants during skeletal muscle regeneration[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(3): 1023-1031.
- [11] Boppart M D, Volker S E, Alexander N, et al. Exercise promotes $\alpha 7$ integrin gene transcription and protection of skeletal muscle[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 295(5): 1623-1630.
- [12] Mayer U, Saher G, Fassler R, et al. Absence of integrin $\alpha 7$ causes a novel form of muscular dystrophy[J]. *Nat Genet*, 1997, 17(3): 318-323.
- [13] Welser J V, Rooney J E, Cohen N C, et al. Myotendinous junction defects and reduced force transmission in mice that lack $\alpha 7$ integrin and utrophin[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(4): 1545-1554.
- [14] Burkin, D J, Kaufman S J. The $\alpha 7\beta 1$ integrin in muscle development and disease[J]. *Cell Tissue Res*, 1999, 296(1): 183-190.
- [15] 刘红岩. 整合素激活 FAK 介导的信号传导研究进展[J]. *国外医学免疫学分册*, 2000, 23(1): 1-5.
- [16] Lenter M, Vestweber D. The integrin chains $\beta 1$ and $\alpha 6$ associate with the chaperone calnexin prior to integrin assembly[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(16): 12263-12268.

