

• 运动人体科学 •

## 耐力训练对肌球蛋白重链的影响及 MyoD、Myogenin 的调控作用

苏艳红<sup>1</sup>, 王瑞元<sup>2</sup>, 林 华<sup>1</sup>

(1. 辽宁师范大学 体育学院, 辽宁 大连 116029; 2. 北京体育大学 研究生院, 北京 100084)

**摘 要:** 为了解耐力训练对肌球蛋白重链(MHC)组成及生肌调节因子 MyoD 和 Myogenin 表达的影响, 探讨 MyoD 和 Myogenin 表达与 MHC 转换的关系, 选用雄性 SD 大鼠 20 只, 随机分成安静对照组(10 只)和耐力训练组(10 只)。耐力训练组进行跑台练习: 跑台坡度 10°, 跑速 20 m/min, 每天 1 次, 每次 1 h, 每周训练 6 d, 28 d 后取浅层胫前肌。SDS-PAGE 方法测定 MHC I、IIa、IIx、IIb 蛋白组成; RT-PCR 测定 MHCs 及 MyoD、Myogenin mRNA 表达。结果: 耐力训练没有改变 MHCs 蛋白表达, 耐力训练后 IIx - MHC mRNA 表达显著减少 ( $P < 0.05$ ); 耐力训练使 MyoD、Myogenin mRNA 均显著下降。结果说明耐力训练使快型 MHC 基因表达减少; 快型 MHC IIx 减少可能与 MyoD 表达下降有关, MyoD 和 Myogenin 可能参与 MHC 表达的调节。

**关 键 词:** 肌球蛋白重链; 生肌调节因子; 耐力训练

中图分类号: G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2007)02-0048-05

### The effect of endurance training on heavy chain myosin as well as the regulating function of MyoD and Myogenin

SU Yan-hong<sup>1</sup>, WANG Rui-yuan<sup>2</sup>, LIN Hua<sup>1</sup>

(1. College of Physical Education, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;

2. Graduate School, Beijing Sports University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** In order to gain an insight into the effect of endurance training on the composition of heavy chain myosin (HCM) and the expression of myogenic regulating factors MyoD and Myogenin, and to probe into the relation between the expression of MyoD and Myogenin and the conversion of HCM, the authors selected 20 male SD rats and randomly divided them into a resting control group (10 rats) and an endurance training group (10 rats), put the rats in the endurance training group on a treadmill with a + 10° slope for a running exercise at the speed of 20m/min once a day, 1 hour per time, 6 days a week, extracted the superficial layer of tibial anterior muscle of the rats in the two groups 28 days later, applied the SDS-PAGE method to measure the protein composition of HCM I, IIa, IIx and IIb, applied the RT-PCR method to measure HCMs and the expression of MyoD and Myogenin mRNA, and revealed the following findings: Endurance training did not change the protein expression of HCMs, after endurance training the expression of IIx - HCM mRNA was significantly reduced ( $P < 0.05$ ); endurance training lowered MyoD and Myogenin mRNA significantly, which indicate that endurance training reduce the gene expression of fast HCM, and that the reduction of fast HCM IIx may relate to the reduction of the expression of MyoD, and that MyoD and Myogenin may play a role in the adjustment of the expression of HCM.

**Key words:** heavy chain myosin; myogenic regulating factor; endurance training

肌球蛋白是骨骼肌细胞中表达最多的蛋白, 占总蛋白的 25%。天然的肌球蛋白由 6 条多肽链组成, 这 6 条多肽链包

收稿日期: 2006-08-23

基金项目: 国家自然科学基金: 低氧训练对骨骼肌收缩蛋白代谢影响机理的研究(项目编号/申请代码: 30170448/C030314)

作者简介: 苏艳红(1969-), 女, 满族, 副教授, 博士研究生, 研究方向: 骨骼肌机能评定。

括两条重链和两对不同的轻链。肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MHC)分子质量约为 200 000 u, 两对不同的轻链分别为碱性轻链和调节轻链。肌球蛋白因其具有 ATP 酶活性, 所以又称肌球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATP 酶。

快肌和慢肌的最大缩短速度与肌球蛋白高低的  $Ca^{2+}$ -ATP 酶活性相关<sup>[1]</sup>。这主要由于快慢肌所表达的 MHC 类型不同。快型肌纤维含有快型 MHC 异型体, 表达为高的肌球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATP 酶活性, 同样, 慢型肌纤维含有慢型 MHC 异型体, 表达为低的肌球蛋白  $Ca^{2+}$ -ATP 酶活性。研究肌肉肌球蛋白重链组成对于了解肌肉收缩特性有重要意义。

研究表明, 肌肉 MHC 组成是可以发生改变的, 这些因素包括胚胎发育、神经交叉支配、激素、运动、非活动性因素等等。但调控 MHC 表达的机制一直不很清楚。

最近有报道显示, 生肌调节因子(Myogenic regulatory factors, MRFs)参与胚胎期肌发生过程, 并在成年骨骼肌中选择性表达。因此, 研究 MRFs 对于了解 MHC 转变机制具有积极的意义。

生肌调节因子属于碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)转录调节因子, 可以结合 DNA, 调节基因的转录, 由 MyoD、myogenin、myf<sub>5</sub>、MRF<sub>4</sub> 4 个蛋白组成。MRFs 可与 E 盒(E 蛋白)形成异二聚体, 这个异二聚体反过来结合到 E 盒特异的 DNA 序列上, 转录调节 DNA 的表达。这个 E 盒序列已被检测为 CANNTG (N 为任意碱基), 在几个肌肉表型蛋白的调控区, 如快肌球蛋白的轻链、MHC 和 MHC b<sup>[2]</sup>、肌钙蛋白和 desmin 上都有 E 盒的存在。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

雄性 SD 鼠 20 只, 体重 (232 ± 10) g, 由河北医科大学实验动物中心提供。动物随机分成两组, 安静对照组 10 只 (C)、耐力训练组 10 只 (T), 均分笼饲养, 自由饮水进食, 室内温度 (22 ± 3)。

### 1.2 运动方式

耐力训练组首先熟悉跑台, 每天进行递增的跑台练习 (跑速 10 ~ 20 m/min, 持续时间 10 ~ 60 min/d), 5 d 后正式开始训练。跑台坡度 10°, 跑速 22 m/min, 持续时间 60 min/d, 运动强度约 70% ~ 75%VO<sub>2max</sub>。跑台训练共计 28 d。

### 1.3 主要试剂和仪器

(1) 骨骼肌肌球蛋白重链(MHC)蛋白组成:(SDS-PAGE 方法, 参照 Talmadge<sup>[3]</sup>)

仪器:LKB 2301 Macrodrive 1, Power Supply; LKB 2050 Midget Electrophoresis Unit.

试剂:SDS 为 BIOMOL 公司产品, 优级纯; Tris 为 AUGUS 公司产品, 超级纯; TEMED、巯基乙醇为 SERVA 公司产品, 研究级。

(2) 骨骼肌 MHC、a、x/d、b 4 个亚型及 MyoD、myogenin 的 mRNA 基因表达:(RT-PCR 方法)

试剂:逆转录酶(M-MLV)、Oligo(dt)、dNTP 为 Promega 公司产品, Taq 酶为 Takara 公司产品, PCR 引物由北京奥科生物技术有限责任公司设计、合成。

### 1.4 实验步骤

(1) 肌肉组织提取:训练 28 d 的鼠用戊巴比妥钠实施麻醉(50 mg/kg), 剥离出白色胫前肌浅层(TA)迅速投于液氮中保存待用。

(2) 肌球蛋白提取:1) 快速称取浅层胫前肌 100 mg, 置于 1.9 mL 匀浆液中(匀浆液成分:300 mmol/L KCl、150 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、10 mmol/L ATP、2 mmol/L EDTA、2 mmol/L DTT, pH 6.8)。2) 手动匀浆, 制备好的匀浆轻轻振荡 30 min。3) 以 20 000 r/min 低温离心 20 min。4) 取上清加入饱和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至 33% 饱和度, 静置 20 min。5) 再以 12 000 r/min 离心 15 min, 获得沉淀即为肌球蛋白。6) 收集沉淀于 1 mL 咪唑缓冲液中(600 mmol/L KCl, 10 mmol/L 咪唑 pH 6.8), 1 000 mL 10 mmol/L 咪唑 (pH 6.8) 透析 24 h。所有操作均在 4 条件下进行。

SDS-PAGE 检验肌球蛋白提取情况。

(3) 骨骼肌肌球蛋白重链(MHC)蛋白组成:(SDS-PAGE 法, 参照 Talmadge 1993)

(4) 骨骼肌 MHC、a、x、b 4 个亚型及 MyoD、myogenin 的 mRNA 基因表达。

总 RNA 提取参照 Trizol 说明书。引物设计见表 1。

### 1.5 统计分析

采用 SPSS11.5 统计软件, 利用多因素方差一般线性模型(GLM) LSD 方法检验各组间的差异, P < 0.05 具有统计学的显著性意义。

表 1 引物序列

名称	上游引物(Upper Stream)	下游引物(Lower Stream)
MHC I	5' AGGAGGCGGTGCAGGAGTGT 3'	5' TCCTCATGCCCTTCACCGAC 3'
MHC II a	5' AGCGGAATGTTGAGGCTGTCA 3'	5' TGAACCTCGCGGCTCTTCAC 3'
MHC II x	5' GAGGCCAGGGTCCGTGAACT 3'	5' TTCACCCGACGCTTGTGAC 3'
MHC II b	5' CTGATCACCACCAACCCATAT 3'	5' GTGACCATCCACAGGAACATC 3'
MyoD	5' GAAAAGACGAAGTCTGGTTG 3'	5' ATGCCTCGGAGATAAATACA 3'
Myogenin	5' TGGCTTGTGGCAGCCAGGG 3'	5' AGTGAATGCAACTCCACAGCGCT 3'
β-actin	5' TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCG 3'	5' CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG 3'

## 2 结果与讨论

### 2.1 运动对浅层胫前肌肌球蛋白重链蛋白组成的影响

由表 2 所见, SDS-PAGE 方法结果显示耐力练习组(T)

与对照组(C)比较, I、IIa、IIx 和 IIb MHC 蛋白表达的百分比没有明显差异, 即耐力训练不改变 MHC 的蛋白组成百分比。

表 2 不同条件下 MHC 各亚型蛋白百分比 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n/只	I	IIa	IIx	IIb
C	6	15.74±3.97	71.37±4.29	7.76±1.56	2.75±0.67
T	6	14.94±4.61	73.69±7.07	7.90±1.91	3.49±0.42

耐力训练是一种增加负荷的训练, 学者们通常认为耐力训练会引起快型 MHC 向慢型转化。如有观察大鼠跑台 4 周比目鱼肌型 MHC 显著增加。Demirel 等<sup>[4]</sup>对于 SD 大鼠 75% 强度跑台训练 10 周的实验注意到训练时间 60 min 时比目鱼肌 MHC 显著增加, 同时 MHC a 下降。Wistar 鼠耐力练习 (20 m/min, 60 min/d) 的研究显示, 4 周的耐力练习足底肌 MHC b 下降的同时 MHC a 明显增加<sup>[5]</sup>。

也有研究显示, 耐力训练不改变肌纤维和 MHC 组成。Perhonen 等<sup>[6]</sup> Wistar 跑台训练, 肌原纤维 ATPase 方法测得的趾长伸肌和比目鱼肌肌纤维组成无明显改变。Wistar 鼠的游泳训练不影响比目鱼肌肌纤维类型分布。Demirel 等的实验中, 当训练时间为每天 30 min 和 60 min 时, 没有观察到足底肌 MHC 蛋白组成的改变, 但训练时间延长至 90 min 时观察到 MHC 组成的改变。Gollnick 等<sup>[7]</sup>提出耐力训练后, 人骨骼肌氧化潜能增加, 但肌原纤维 ATPase 染色显示的快慢肌纤维比例没有改变。

本实验观察到跑台的耐力训练没有影响 SD 大鼠胫前肌 MHC 蛋白组成。

耐力训练对 MHC 的影响可能既取决于特异的肌肉又依赖于训练的量。不同肌肉肌纤维组成不同, 运动中募集顺序不同<sup>[8]</sup>。随着训练时间的延长, 会有越来越多的快运动单位被募集来补偿肌肉收缩的疲劳。短时间的次最大强度跑练习中, 比目鱼肌较足底肌和趾长伸肌血流量更多也能说明运动过程中慢肌首先被动员, 因而耐力训练对快慢肌的影响会存在差异。

肌球蛋白转换需最小的训练持续时间, 这一观点已被 Salmons<sup>[9]</sup>详细阐述过, 这一理论简单说是活动水平必须超过肌球蛋白异型体发生的变化。我们的耐力训练的实验没有观察到 MHC 的改变, 这可能与训练强度和持续时间都有关, 如果适当提高跑台速度、延长训练时间也许会观察到 MHC 快型向慢型的转化。

### 2.2 运动对骨骼肌 MHC I、IIa、IIx、IIb 4 个亚型 mRNA 表达的影响

RT-PCR 图象如图 1 所示:

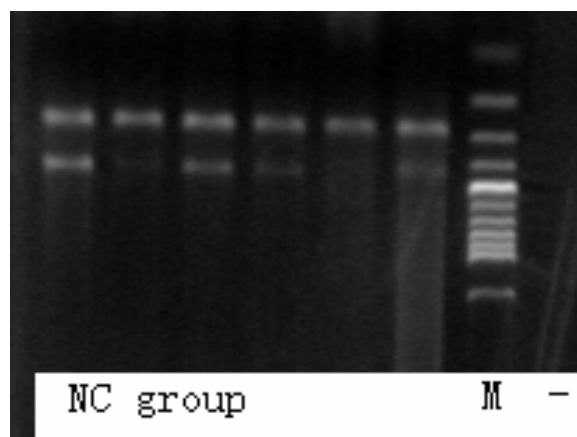


图 1 RT-PCR 结果 (M 为 Marker 条带)

表 3 可知, RT-PCR 方法显示耐力训练使 MHC - x mRNA 表达减少 ( $P < 0.05$ ), MHC - a mRNA 表现为不显著增加, MHC - b mRNA 表现不显著下降。

表 3 不同条件下 MHC 各亚型 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ ) (MHCs /  $\beta$ -actin 内参)

组别	n/只	I	IIa	IIx	IIb
C	6	0.55±0.11	0.63±0.07	0.62±0.18	1.16±0.12
T	6	0.40±0.22	0.78±0.12	0.40±0.09 <sup>1)</sup>	1.12±0.11

1) 与 C 组比较,  $P < 0.05$

关于耐力训练影响 MHC 组成的研究多集中于 SDS-PAGE 测得的蛋白水平的报道, 或者肌原纤维 ATP 酶方法检验肌纤维组成的改变。本文 RT-PCR 方法测定的各种 MHC mRNA 是在转录水平观察 MHC 的变化。转录是蛋

白合成的前提, 转录水平的变化为蛋白水平的改变提供可能性。本实验 RT-PCR 结果显示, 耐力训练使 MHC - x mRNA 表达显著下降, MHC - a mRNA 表达不显著增加。MHC mRNA 的这种变化趋势与以往对 MHC 蛋白组成的报道一致

<sup>[10]</sup>。但本研究中 MHC 蛋白水平和 mRNA 水平的改变不一致。原因可能在于 mRNA 的增加能在刺激的即刻发生，其半衰期约为 2~3 d，而相应蛋白的半衰期为 2~3 周<sup>[11]</sup>，MHC 表型的表达可能是 MHC mRNA 与蛋白不同时机上调和下调的结果。因而 MHC 表型表达与 MHC mRNA 间会出现错配的现象。除此之外，翻译或翻译后机制的调控也妨碍 mRNA 准

确地表达蛋白活性。

### 2.3 运动对骨骼肌 MyoD 和 myogenin mRNA 表达的影响

本研究结果显示耐力训练使 myogenin 和 MyoD mRNA 表达均显著下降 ( $P<0.01$ )；myogenin/MyoD 由于样本量少，且个体差异大，两组间没有显示出统计学上的显著差异(见表 4)。

表 4 不同分组条件下 MyoD 和 myogenin mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ ) (MyoD、myogenin /  $\beta$ -actin 内参)

组别	n/只	myogenin	MyoD	myogenin/MyoD
C	6	0.52±0.09	1.54±0.16	0.41±0.24
T	6	0.31±0.03 <sup>1)</sup>	0.40±0.04 <sup>1)</sup>	0.65±0.30

1) 与 C 组比较,  $P<0.01$

特异表型蛋白在不同收缩活动水平的协调表达,存在着共同的调节机制。一些研究证实,生肌调节因子(MRFs)在其中起重要作用。MRFs 参与原始肌细胞的分化,在成年骨骼肌纤维的表达中也起重要作用。特别是 MyoD 与 Myogenin 的相对表达是肌肉表型表达的决定因素。快肌纤维中 MyoD 表达相对较高,慢肌纤维中水平较低;Myogenin 情况正好相反。MyoD 与 Myogenin 的相对表达也表现在收缩引起肌肉表型改变的调节上。

体外刺激培养的肌管细胞,Myogenin 表达增加的同时伴有 MyoD 表达下降,同时与快型肌肉相关的蛋白如肌浆网  $Ca^{2+}$ -ATPase 蛋白快型亚型、肌球蛋白重链表达受抑制<sup>[2]</sup>。

28 d 后肢悬垂后,与对照鼠的比目鱼肌相比,后肢悬垂鼠 MHC- $\alpha$  明显下降,MHC- $\beta$  增加,高敏感的 RT-PCR 方法测得后肢悬垂 14 d 后 MyoD 增加<sup>[13]</sup>。后肢悬垂引起慢肌向快肌转化的同时 Myogenin 表达不受影响。因此,作者认为 MyoD mRNA 或 Myogenin mRNA/MyoD mRNA 可能在失重引起的肌肉萎缩及肌纤维的转换中起重要作用。

以上这些似乎暗示着 MyoD、Myogenin mRNA 或 Myogenin/MyoD 与肌肉表型间存在着因果关系。

本实验耐力训练条件下,Myogenin 和 MyoD mRNA 均显著下降,同时,观察到 MHC- $\beta$  mRNA 显著下降 ( $P<0.05$ ),MHC- $\alpha$  mRNA 下降虽然不具统计意义但趋势也较明显。有证实 MyoD 在含  $\beta$  和 (或)  $\alpha$  型肌纤维的快肌肉区选择性表达,Myogenin 在  $\alpha$  型慢肌肉区选择性表达,改变 MHC 基因表达的几个方法同时也引起了 Myogenin 和 MyoD mRNA 表达的改变<sup>[14]</sup>。本实验中 MHC- $\beta$  和 MHC- $\alpha$  表达下降可能与 Myogenin 和 MyoD mRNA 的下降直接相关。但 Myogenin/MyoD 由于样本差异大,两组间没有显示出统计学的显著意义。如果适当增加样本量,可能会有些有意义的结果。

肌球蛋白重链组成影响肌肉收缩特性,因而有必要对于影响肌球蛋白重链表达的因素作一系统研究。本研究表明,

耐力训练引起快型肌球蛋白重链基因表达减少。此外,本文欲从转录水平寻找可能调控 MHCs 表达的因素,因而,研究了 MyoD、Myogenin 这一对转录调节因子对于耐力训练的的反应,但由于样本数量的限制,没能得到 MyoD 或 MyoD/Myogenin 调控 MHC- $\alpha$  或 MHC- $\beta$  表达的结论。虽然有研究显示,快肌中 MyoD 表达高,慢肌中 Myogenin 表达高,本人曾有同样的实验结果,但若想证实 MyoD 和 (或)Myogenin 参与 MHCs 转录的调节,本实验尚不能提供可靠的证据,还需要增加样本量,同时增加实验模型,来探讨 MHCs 转变的可能机制。

### 参考文献:

- [1] Gary M, Robvert E, Kenneth M, et al. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension[J]. Am J Physiol, 1991, 260: C528-C534.
- [2] Robert J Talmadge. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms[J]. Muscle Nerve, 2000, 23: 661-679.
- [3] Robert J Talmadge, Roland R Roy. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms[J]. J Appl Physiol, 1993, 75(5): 2337-2340.
- [4] Haydar A Demirel, Scott K Powers, Hisashi Naito, et al. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship[J]. J Appl Physiol, 1999, 86(3): 1002-1008.
- [5] Takao Sugiura, Akio Morimoto, Naotoshi Murakami. Effects of endurance training on myosin heavy-chain isoforms and enzyme activity in the rat diaphragm [J]. Pflügers Arch, 1992, 421: 77-81.
- [6] Merja Perhonen, Timo E S Takala, Vuokko Kovanen. Effects of prolonged exposure to and physical training in hypobaric conditions on skeletal muscle morphology and metabolic

- enzymes in rats[J]. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*, 1996, 432:50-58.
- [7] Gollnick P D, Armstrong R B, Saltin B, et al. Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol*, 1973, 34:107-111.
- [8] Delp M D, Duan C. Composition and size of type I, II A, II D/X, and II B fibers and citrate synthase activity of rat muscle[J]. *J Appl Physiol*, 1996, 80:261-270.
- [9] Salmons S. Exercise. Stimulation and type transformation of skeletal muscle[J]. *Int J Sports Med*, 1994, 15:136-41.
- [10] O'Neill D, Sean, Zheng Dong-hai, et al. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle[J]. *Am J Physiol*, 1999, 276: R414-R419.
- [11] Darryn S Willoughby, Matthew J Nelson. Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2002, 34(8):1262-1269.
- [12] Alice Muller, Marc H M Thelen, Marian J, et al. Expression of MyoD in cultured primary myotubes is dependent on contractile activity: correlation with phenotype-specific expression of a sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase isoform[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229: 198-204.
- [13] Mozdziak P E, Greaser M L, Schultz E. Myogenin, MyoD, and myosin heavy chain isoform expression following hindlimb suspension[J]. *Aviat Space Environ Med*, 1999, 70:511-516.
- [14] Simon M Hughes, Jane M Taylor, Stephen J Tapscott, et al. Selective accumulation of MyoD and Myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones[J]. *Development*, 1993, 118: 1137-1147.

[编辑: 郑植友]