

·运动人体科学·

从 HIF-2a 基因筛选 HiHiLo 实施过程中 预测血象指标变化的分子标记

金溪¹, 胡扬¹, 罗冬梅², 李燕春¹, 衣龙彦¹

(1.北京体育大学 体育科学研究中心, 北京 100084; 2.北京体育大学 运动解剖学教研室, 北京 100084)

摘 要: 通过对 HIF-2a/EPAS1 基因多态性与 HiHiLo 训练前后血象指标进行关联分析, 以期筛选预测 HiHiLo 实施过程中血象指标变化的分子标记。(1)对 72 名健康受试者进行 4 周的 HiHiLo 训练, 在实验前后测量血象指标。(2)采用 PCR-RFLP 方法对 HIF-2a/EPAS1 基因多态位点进行解析。(3)对 HIF-2a/EPAS1 基因多态性与 HiHiLo 训练前后血象指标进行关联分析, 探寻 HiHiLo 训练中评价血象效果的分子遗传学标记。结果发现:(1)WBC 变化量在不同基因型之间差异存在显著性的趋势($P<0.10$), M Retic#变化量差异存在显著性。(2)MCV、MCH 变化量在 rs6715787 多态位点不同基因型之间差异存在显著性($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。结果说明:(1)HIF-2a/EPAS1 基因 rs7598371 多态位点与 HiHiLo 训练前后 WBC 和 M Retic#相关联, 可以作为 HiHiLo 训练中预测 WBC 和 M Retic#变化的分子标记。(2)HIF-2a/EPAS1 基因 rs6715787 多态位点与 HiHiLo 训练前后 MCV 和 MCH 相关联, 可以作为 HiHiLo 训练中预测 MCV 和 MCH 变化的分子标记。

关键词: 运动生物化学; 高住高练低训; 低氧诱导因子 2 基因; 分子标记; 血象指标

中图分类号: G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2010)06-0096-06

From the HIF-2a gene screening out molecular markers that predict the changing of hemogram indexes during the implementation of HiHiLo

JIN Xi¹, HU Yang¹, LUO Dong-mei², LI Yan-chun¹, YI Long-yan¹

(1.Sport Science Research Center, Beijing Sport University, Beijing 100084, China;

2.Department of Anatomy, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

Abstract: The authors intended to screen out molecular markers that predict the changing of hemogram indexes during the implementation of HiHiLo by analyzing the correlation between the polymorphism of the HIF-2a/EPAS1 gene and hemogram indexes before and after HiHiLo training. 1) the authors carried out 4-week HiHiLo training on 72 healthy testees, and measured hemogram indexes before and after the experiment; 2) the authors dissected the polymorphic loci of the HIF-2a/EPAS1 gene by applying the PCR-RFLP method; 3) the authors analyzed the correlation between the polymorphism of the HIF-2a/EPAS1 gene and hemogram indexes before and after HiHiLo training, and probed into molecular genetic markers for evaluating hemogram effects during HiHiLo training. The authors revealed the following findings: 1)there was a significant difference between WBC changes in different genotypes ($P<0.10$), and there was a significant difference between M Retic# changes; 2)there was a significant difference between MCV and MCH changes at the rs6715787 polymorphic locus in different genotypes ($P<0.01$, $P<0.05$). The said findings indicated the followings: 1)the rs7598371 polymorphic locus of the HIF-2a/EPAS1 gene is correlative with WBC and M Retic# before and after HiHiLo training, can be used as a molecular marker to predict WBC and M Retic# changes during HiHiLo training; 2)the rs6715787 polymorphic locus of the HIF-2a/EPAS1

收稿日期: 2009-12-15

基金项目: 科技部奥运攻关课题(2006BAK12B01)。

作者简介: 金溪(1983-), 女, 硕士, 研究方向: 运动分子生物学。

gene is correlative with MCV and MCH before and after HiHiLo training, can be used as a molecular marker to predict MCV and MCH changes during HiHiLo training.

Key words: sports biochemistry; HiHiLo; HIF-2a/EPAS1 gene; molecular marker; hemogram index

在哺乳动物体内细胞中存在一类介导低氧适应性反应的转录因子,它能激活许多低氧反应性基因的表达,是在低氧条件下维持氧稳态的关键性物质,称为低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)^[1]。从1992年发现 HIF-1a 以来,学者们对其做了大量的研究,首先探讨的是在低氧中的各种反应及其机制,于1997年由 Tian 等人在内皮细胞中发现了 HIF-2a(命名为“内皮 PAS 区蛋白 1”即 EPAS1)。

HIF-2a/EPAS1 调节许多基因,包括主动脉体中的酪氨酸羟化酶和活体 II 型肺泡细胞中的 VEGF。Norihiko Takeda 等^[2]发现, HIF-2a/EPAS1 促进 Flt-1 基因的表达,并且诱导 VEGF、Flk-1(Vascular Epidemal growth factor receptor-1, 血管内皮生长因子受体 1)和 Tie2(血管生成素受体)mRNA 的表达,这提示 HIF-2a/EPAS1 在血管生成中起到了重要的作用。同时, Hirota K、Gruber M 等^[3-4]研究发现, HIF-2a/EPAS1 是 EPO 合成的主要调节物,且 Rankin EB 等^[5]认为在肝脏内, EPO 水平优先由 HIF-2a/EPAS1 调控。Melanie JP 等^[6]结合先前的研究表明 PHD2-HIF-2A-VHL 途径是在人体内调节 EPO 产生的核心分子机制。氧充足时, HIF-2a/EPAS1 被脯酰胺羟化酶(PHD2)羟化,使得与 VHL 蛋白结合, HIF-2a/EPAS1 之后成为蛋白酶体的目标。当低氧时, HIF-2a/EPAS1 不再被脯酰胺羟化酶(PHD2)羟化,而是与靶基因的低氧反应元件(HRE)结合^[7]。EPO 就是靶基因之一,它的产生增加了红细胞的数量,从而提高了机体的携氧能力,更有利于机体的运动。Chapman RF 等^[8]研究发现,在海拔 2 500 m 暴露 30 h 后,低氧敏感者源于血清 EPO 的显著升高而导致红细胞数和最大摄氧量的增加。低氧非敏感者虽 EPO 得到升高,但红细胞数却没有改变。因此,目前对于高原训练首要解决的问题就是个体差异性,即根据不同个体对高原低氧反应的敏感性来有针对性地制定个性化训练方案。由于 HIF-2a/EPAS1 在血管发生中所起的必不可少的作用,本研究拟采用 PCR-RFLP 技术,对 HIF-2a/EPAS1 基因多态性进行分析,探讨其与 HiHiLo 训练前后血象指标变化的关联性,为预测 HiHiLo 实施过程中血象指标变化提供分子标记。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选取北京体育大学在校男学生 72 人,年龄(21.10

± 1.37)岁,身高(177.93 ± 5.26) cm,体重(69.80 ± 7.80) kg,运动年限(4.29 ± 2.12)年。分别来自山东、河北和东北三省、内蒙古河套地区等中国北方平原地区,所有受试者中无世居高原者,且实验前 6 个月内均无高原居住史,身体健康。

1.2 HiHiLo 训练方法

1)HiHiLo 训练方案:受试者低氧睡眠+低氧训练+常氧专项训练,共 30 d。低氧睡眠每周 7 d,每晚至少 10 h(晚 21:00 ~ 次日晨 07:00),氧体积分数为 14.8% ~ 14.3%(模拟海拔高度约 2 800 ~ 3 000 m);低氧训练每周 3 次,低氧训练方式为常压低氧环境(氧气体积分数为 15.4% ~ 14.8%,模拟海拔高度约为 2 500 ~ 2 800 m)蹬功率自行车 30 min(60 rpm/min),以个体 75%VO_{2max} 强度为基础,运动过程中调节功率车负荷使受试者 SpO₂ 维持在 87% ~ 93% 范围。

2)血象指标的测试:分别在 HiHiLo 训练第 1 天和第 30 天取样,晨起安静空腹状态下取受试者静脉血,交由北京体科所进行测试,测试指标包括:RBC(红细胞)、HCT(红细胞压积)、HGB(血红蛋白)、Retic(网织红细胞)、WBC(白细胞)、MCV(红细胞平均体积)、MCH(平均红细胞血红蛋白量)、MCHC(平均血球血红蛋白浓度)、CH(红细胞血红蛋白含量)、CHDW(红细胞血红蛋白分布宽度)、RDW(红细胞平均分布宽度)、HDW(血红蛋白分布宽度)、MPV(血小板体积)、M Retic#(中荧光网织红细胞计数)、MCV_r(网织红细胞平均体积)、CHCM_r(单个网织红细胞平均血红蛋白浓度)、CH_r(网织红细胞血红蛋白含量)、Macro%(大红细胞百分比)、Hypo%(低色素红细胞百分比)等。

1.3 基因多态性分析实验

1)多态位点的选择方法: HIF-2a/EPAS1 在已有的关联研究中很少提到,仅发现 Jennifer Henderson 等人做过 HIF-2a/EPAS1 基因多态性在优秀耐力运动员中有氧与无氧的研究,但其多态位点均由 ABI 公司提供,参考 NCBI 数据库中 NT_022184.14 序列,通过 Hapview 软件选择出 3 个标签 SNP,即 rs13419896、rs7598371、rs6715787 作为多态性分析位点。

(1)rs13419896 多态位点:该多态位点位于 1 号内含子,杂合度=0.324。Hapview 分析表明该位点是标签 SNP,标签: rs11125071、rs6758592、rs4953348、rs7582701、rs10193827、rs9679290、rs4952819、rs4953343、rs4953342、rs7598371。

(2)rs7598371 多态位点: 该多态位点位于 11 号内含子, 杂合度=0.364。Hapview 分析表明该位点是标签 SNP, 标签: rs11690951、rs13019268、rs7594278、rs13006131、rs11694193。

(3)rs6715787 多态位点: 该多态位点位于 2 号内含子, 杂合度=0.496。Hapview 分析表明该位点是标签 SNP, 标签: rs4953360、rs17035013、rs17035010、rs6712143、rs6743087、rs7583554、rs2278753、rs6755594、rs7589621。

2)基因分型方法: HIF-2a/EPAS1 基因多态位点引物的设计与合成参考 NT_022184.14 序列, 应用 primer5.0 自行设计引物, 采用 PCR-RFLP 进行基因多态性分析, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

(1)rs13419896 多态位点的分型方法:

引物: 上游: 5' TTCCCTGTTCCCTCCTCCTT 3';

下游: 5' TCCTACCCTGTGGTTGCCTCG 3'。

PCR 反应体系(15 μ L): DNA 模板 0.4 μ L、Taq 酶(0.3 μ L, 5 U/ μ L)、dNTP(0.4 μ L, 10 mmol/L)、 Mg^{2+} (1.2 μ L, 25 mmol/L)、上下游引物(各 2 μ L, 5 μ mol/L)、PCR buffer 2 μ L, 灭菌双蒸水补齐。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 66.5 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 反应产物: 373 bp, 产物通过 2% 的琼脂糖电泳检验。

酶切条件: PCR 产物 3.5 μ L, 内切酶 HaeII: 0.2 μ L, 10 U/ μ L; 37 $^{\circ}$ C 水浴 3~4 h。

酶切产物: 373/306/66 bp。2% 的琼脂糖电泳分型。

(2)rs7598371 多态位点的分型方法:

引物: 上游: 5' CAGGTAGATGGCTGTGGA 3'

下游: 5' AGTGGTATCATTTTCGGTTTTT 3'

PCR 反应体系(15 μ L): DNA 模板 0.4 μ L、Taq 酶(0.3 μ L, 5 U/ μ L)、dNTP(0.4 μ L, 10 mmol/L)、 Mg^{2+} (1.0 μ L, 25 mmol/L)、上下游引物(各 2 μ L, 5 μ mol/L)、PCR buffer 2 μ L, 灭菌双蒸水补齐。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 反应产物: 272 bp, 产物通过 2% 的琼脂糖电泳检验。

酶切条件: PCR 产物 3.5 μ L, 内切酶 TaqI: 0.2 μ L, 10 U/ μ L, TaqI Buffer: 0.8; 65 $^{\circ}$ C 水浴 2~3 h。

酶切产物: 272/222/50 bp。2% 的琼脂糖电泳分型。

(3)rs6715787 多态位点的分型方法:

引物: 上游: 5' TCAGTTGAGCATCCCTAACCC 3'

下游: 5' CCAGCCCTTGTCAGCATCTTT 3'

PCR 反应体系(15 μ L): DNA 模板 0.4 μ L、Taq 酶(0.2 μ L, 5 U/ μ L)、dNTP(0.4 μ L, 10 mmol/L)、 Mg^{2+} (0.6 μ L, 25 mmol/L)、上下游引物(各 2 μ L, 5 μ mol/L)、PCR buffer 2 μ L, 灭菌双蒸水补齐。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60.7 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 反应产物: 359 bp, 产物通过 2% 的琼脂糖电泳检验。

酶切条件: PCR 产物 3.5 μ L, 内切酶 ECOR1: 0.2 μ L, 10 U/ μ L, Buffer ECOR1: 0.8; 37 $^{\circ}$ C 水浴 2~3 h。

酶切产物: 359/261/98 bp。2% 的琼脂糖电泳分型。

1.4 数据统计

数据由 SPSS13.0 for Windows 软件包进行统计分析, 数据以平均值和标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用卡方检验(Chi-Square, χ^2)以确认所选人群不同基因型的分布是否符合基因平衡定律(Hardy-Weinberg, H-W 平衡), 以检验是否具有群体代表性, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。不同基因型之间各指标实验前的基础值采用独立样本 T 检验, 不同基因型之间各指标训练敏感性的差异以基础值为协变量, 采用协方差分析。显著性差异定为 $P < 0.05$, 极显著性差异定为 $P < 0.01$ 。

2 结果及分析

2.1 HIF-2a/EPAS1 基因多态位点解析

1)HIF-2a/EPAS1 rs13419896 多态位点解析。

HIF-2a/EPAS1 rs13419896 多态位点经 PCR 扩增后得到片段长度为 373 bp 的条带产物, PCR 产物经 HaeII 内切酶消化后通过 2% 琼脂糖电泳得到 3 条带: 有酶切位点的纯合型 GG(66、306 bp), 没有酶切位点的纯合型 AA(373 bp)和杂合型 AG(306、66、373 bp)(如图 1)。

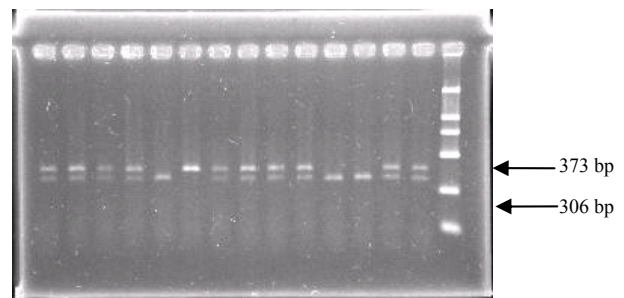


图 1 rs13419896 多态位点酶切后基因分型图

基因型经 χ^2 检验, $\chi^2 = 3.29$, $P > 0.05$, 符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 即本研究所选的研究对象

具有群体代表性。通过基因分型发现, 携带 AA 基因型受试者 4 人, 占 5.6%; 携带 AG 基因型受试者 38 人, 占 52.8%; 携带 GG 基因型受试者 30 人, 占 41.6%。由于 AA 基因型人数小于 5, 故将 AA 基因型与 AG 基因型合并分析。

2)HIF-2a/EPAS1 rs7598371 多态位点解析。

HIF-2a/EPAS1 rs7598371 多态位点经 PCR 扩增后得到片断长度为 272 bp 的条带产物, PCR 产物经 TaqI 内切酶消化后通过 2% 琼脂糖电泳得到 3 条带: 有酶切位点的纯合型 CC(50、222 bp), 没有酶切位点的纯合型 GG(272 bp)和杂合型 CG(272、50、222 bp)(如图 2)。基因型经 χ^2 检验, $\chi^2=2.52$, $P>0.05$, 符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 即本研究所选的研究对象具有群体代表性。通过基因分型发现, 携带 CC 基因型受试者 3 人, 占 4.2%; 携带 CG 基因型受试者 14 人, 占 19.4%; 携带 GG 基因型受试者 55 人, 占 76.4%。由于 CC 基因型人数小于 5, 故将 CC 基因型与 CG 基因型合并分析。

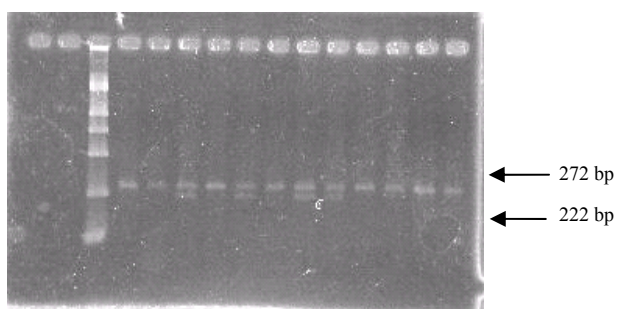


图 2 rs7598371 多态位点酶切后基因分型图

3)HIF-2a/EPAS1 rs6715787 多态位点解析。

HIF-2a/EPAS1 rs6715787 多态位点经 PCR 扩增后得到片断长度为 359 bp 的条带产物, PCR 产物经 ECORI 内切酶消化后通过 2% 琼脂糖电泳得到 3 条带:

有酶切位点的纯合型 CC(98、261 bp)、没有酶切位点的纯合型 GG(359 bp)和杂合型 CG(359、261、98 bp)(如图 3)。基因型经 χ^2 检验, $\chi^2=0.89$, $P>0.05$, 符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 即本研究所选的研究对象具有群体代表性。通过基因分型发现, 携带 CC 基因型受试者 3 人, 占 4.2%; 携带 CG 基因型受试者 30 人, 占 41.6%; 携带 GG 基因型受试者 39 人, 占 54.2%。由于 CC 基因型人数小于 5, 故将 CC 基因型与 CG 基因型合并分析。

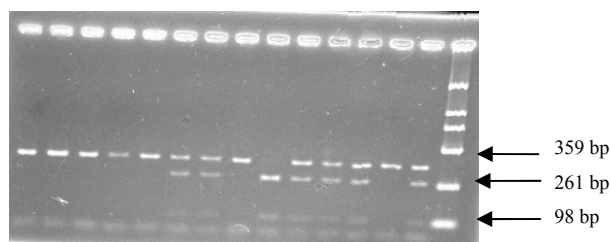


图 3 rs6715787 多态位点酶切后基因分型图

2.2 HIF-2a/EPAS1 基因多态位点与 HiHiLo 训练前后血象指标的关联

研究表明: rs13419896 多态位点在 HiHiLo 训练前后所有血象指标的变化量在不同基因型之间差异不存在显著性。

rs7598371 多态位点在 HiHiLo 训练前后, WBC 指标的变化量在不同基因型差异之间存在显著性的趋势 ($P<0.10$), 表现为携带 CC+CG 基因型的群体在训练后 WBC 下降, 而携带 GG 基因型的群体在训练后 WBC 上升。并且在训练后 M Retic# 的变化量在不同基因型之间差异也存在显著性的趋势 ($P<0.10$), 表现为携带 CC+CG 基因型的群体在训练后 M Retic# 上升的趋势显著大于携带 GG 基因型的群体。其他血象指标的变化量在不同基因型之间差异不存在显著性(见表 1)。

表 1 HIF-2a (EPAS1) 基因多态位点与 HiHiLo 训练前后血象指标 ($\bar{x} \pm s$) 变化的关联

| 多态位点 | 基因型 | WBC 计数 ($10^9 \cdot L^{-1}$) | RBC 计数 ($10^{12} \cdot L^{-1}$) | ρ (HGB)/ ($g \cdot L^{-1}$) | HCT/% | MCV/fL | MCH/pg | M Retic#/个 |
|-----------|-------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| rs7598371 | CC+CG | -0.15 \pm 1.10 | -0.11 \pm 0.20 | -4.47 \pm 5.59 | -1.35 \pm 1.68 | 0.78 \pm 1.23 | 0.20 \pm 0.51 | 25.24 \pm 32.52 |
| | GG | 0.03 \pm 1.05 | -0.13 \pm 0.22 | -5.20 \pm 6.91 | -1.36 \pm 1.91 | 0.39 \pm 1.40 | 0.25 \pm 0.35 | 12.18 \pm 25.47 |
| <i>P</i> | | 0.10 | 0.98 | 0.73 | 0.97 | 0.37 | 0.41 | 0.09 |
| rs6715787 | CC+CG | 0.01 \pm 0.90 | -0.08 \pm 0.23 | -4.24 \pm 7.19 | -1.21 \pm 1.88 | 0.96 \pm 1.11 | 0.34 \pm 0.36 | 16.06 \pm 31.91 |
| | GG | -0.04 \pm 1.18 | -0.16 \pm 0.20 | -5.69 \pm 6.06 | -1.47 \pm 1.83 | 0.07 \pm 1.44 | 0.15 \pm 0.39 | 14.59 \pm 23.81 |
| <i>P</i> | | 0.34 | 0.18 | 0.48 | 0.49 | 0.01 | 0.04 | 0.83 |

rs6715787 多态位点在训练前后, MCV 指标的变化量在不同基因型之间差异存在极显著性 ($P<0.01$), 表

现为携带 CC+CG 基因型的群体 MCV 指标的增加幅度大于携带 GG 基因型的群体。MCH 指标变化量在不同

基因型之间差异存在显著性($P<0.05$), 表现为携带 CC+CG 基因型的群体在训练后 MCH 指标的上升幅度大于携带 GG 基因型的群体, 其他血象指标的变化量在不同基因型之间差异不存在显著性(见表 1)。

3 讨论

本研究发现, 在 HiHiLo 训练前 WBC 在不同基因型之间差异存在显著性($P=0.10$)。张缨等^[9]认为, 在生理情况下, 外周血中白细胞数量可有个体差异。这与本研究结果一致, 即在 HiHiLo 训练后 WBC 变化量在不同基因型之间差异存在显著性的趋势。有报道表明, HiHiLo 训练时, 在缺氧环境下运动, 机体对免疫功能的影响更加明显。张缨等研究发现, 低氧暴露第 2 周与急性暴露相比白细胞总数非常显著性下降, 第 3 周出现回升, 第 4 周又出现显著性下降。虽然 4 周高住低训中白细胞总数等指标的变化仍在正常范围内波动, 但由于白天训练和晚上低氧暴露的双重刺激, 对机体免疫功能的影响比单纯训练或低氧暴露刺激影响更大。同时, 随着低氧时间的延长, 白细胞数量下降, 造血功能受到影响, 推测机体免疫功能可能降低, 提示 HiHiLo 训练可能对机体免疫力产生了不利的影响。但是, 关于 WBC 与 HIF-2a/EPAS1 之间的关联未见报道, 其中的机制还需深入研究。在本研究发现, WBC 变化量在不同基因型之间差异存在显著性的趋势($P=0.10$), 表现为携带 CC+CG 基因型的群体在训练后 WBC 数量降低, 而携带 GG 基因型群体在训练后 WBC 数量升高, 提示携带 CC+CG 基因型的群体可能更适合 HiHiLo 训练。因此, 可以考虑将 rs7598371 多态位点作为 HiHiLo 训练前后 WBC 指标的分子遗传学标记, 以期在 HiHiLo 训练前后对 WBC 变化敏感型受试者采取一定的保护措施。

网织红细胞是介于晚幼红细胞与成熟红细胞之间的尚未完全成熟的红细胞, 它是反映骨髓造血功能活跃的敏感指标。有研究表明, 运动可加速红细胞衰老, 使红细胞破坏增多, 另一方面, 运动又可刺激骨髓造血, 从这两方面看, 运动增加了红细胞的更新^[10]。M Retic#是中荧光网织红细胞的计数, 它与高荧光网织红细胞的计数共同反映了红细胞生成的开始, 是红系活动性显示的参数。Mairbaurl、Klausen K 等^[11]研究发现, 运动和低氧能够促进 EPO 的增加, 进而增加网织红细胞的生成, 也有报道表明, 在成年动物中, HIF-2a/EPAS1 是 HIF- α 中调节 EPO 水平的主要物质。这提示 HIF-2a/EPAS1 基因在低氧的刺激下, 诱导 EPO 生成, 从而使网织红细胞增多, 因此 M Retic#差异存在显著性, 但本研究中, H Retic#差异并无显著性,

而高荧光更能反应网织红细胞的幼稚性, 且 HGB 也无显著性差异, 可能 HIF-2a/EPAS1 基因并不在网织红细胞形成初期过程中起作用, 仅在形成过程中对其产生作用, 其中的机制尚不明确, 还需探讨。在 HiHiLo 训练前后 M Retic#($P=0.09$)变化量在不同基因型之间差异存在显著性的趋势, 表现为携带 CC+CG 基因型的群体变化量大于携带 GG 基因型群体, 提示携带 CC+CG 基因型的群体可能对 HiHiLo 有更高的敏感性, 可以考虑将 rs7598371 多态位点作为 HiHiLo 实施过程中预测 M Retic#变化的分子标记。

MCV 表现了红细胞的平均体积, 本研究表明, 在 HiHiLo 训练前后, MCV 增加, 且在不同基因型之间差异具有显著性。Carfo Brgunara^[12]研究发现, 成熟红细胞体积与网织红细胞体积的比值约为 1:1.3, 从一定程度而言, MCV 的高低也反映了红细胞的成熟度。运动员长期生活在高原低氧环境中, 主要靠增加 RBC 数目和 HGB 含量, 减小 MCV 来提高血液携氧和运氧能力的。在一定范围内, RBC 数目增多, 体积减小, 可以扩大红细胞膜的总表面积, 有利于红细胞内外氧的交换。然而, 运动员高原训练期间, 因承受的运动负荷加大, RBC 的破坏大于生成, 造成 MCV 升高。惠小阳等^[13]观察中长跑一次有氧与无氧训练对血细胞的影响, 发现训练前两组间红细胞各项参数变化差异无显著性, 训练后 RBC 和 HGB 都有一定程度的上升, MCV 增大、MCHC 减低、MCH 变化不大。洪雷^[14]对专业运动员进行 4 周系统训练, 其中有氧训练占 60%~70%, 无氧训练占 40%~30%。训练后较训练前 HCT、MCV 上升, RBC 下降, MCHC、MCH 下降, 认为红细胞的体积增大可能提示红细胞的功能下降。根据临床研究结果发现, 溶血使游离血红蛋白增加, 导致 MCH、MCHC 升高。训练或比赛初期, 机体对负荷不适应, 在血液有形成分中, 细胞稳定性降低, RBC 减少, MCV、MCH、MCHC 异常变化, 提示红细胞功能异常。随着运动过程的进展, 如果机体对负荷适应了, 这些参数会逐渐恢复到安静时状态; 如果机体不能适应所承受负荷, 这些参数的异常会继续存在, 这提示运动性疲劳的发生^[15]。以上研究结果表明, MCV 的上升很可能与受试者 RBC 的破坏和功能异常有关, 作者认为此结果可能是机体对 HiHiLo 训练的一种适应。在 HiHiLo 训练后, MCV 的变化量在不同基因型之间差异存在极显著性($P=0.01$), 表现为携带 CC+CG 基因型的群体变化量大于 GG 基因型群体, 提示携带 GG 基因型的群体可能对 HiHiLo 有更高的敏感性, 可以考虑将 rs6715787 多态位点作为 HiHiLo 实施过程中预测 MCV 变化的分子标记。

MCH 是红细胞内血红蛋白数量的评价指标。本研究结果表明, 高原训练后 MCH 水平增加, MCH 的提高有助于红细胞携氧能力的增强, 从而提高耐力。且 MCH 的变化量在不同基因型之间差异存在显著性, 这可能与 HIF-2a/EPAS1 促进 EPO 的生成有关, 有报道表明 EPO 是 HIF-2a/EPAS1 调节的靶基因, 在低氧条件下, HIF-2a/EPAS1 刺激 EPO 的表达, EPO 又能促进红细胞增加, 从而提高了血红蛋白的数量。在本实验中, HiHiLo 训练前后 MCH 的变化量在不同基因型之间差异存在显著性($P=0.04$), 表现为携带 CC+CG 基因型的群体变化量大于携带 GG 基因型的群体, 提示携带 CC+CG 基因型的群体可能对 HiHiLo 有更高的敏感性, 因此, 可以考虑将 rs6715787 多态位点作为 HiHiLo 训练前后 MCH 指标的分子遗传学标记。

rs7598371 和 rs6715787 多态位点分别位于 11 号和 2 号内含子, 尽管不直接参与氨基酸编码, 但内含子功能可能会影响 mRNA 的拼接, 从而影响基因序列的转录翻译。有研究表明, HIF-2a/EPAS1 基因第 2 外显子是 DNA 与异二聚体结合的关键^[16]。rs6715787 多态位点与第 2 外显子的距离十分接近, 推测由于此多态位点的存在, 在一定程度上可能影响了 DNA 与异二聚体结合, 使得 HIF-2a/EPAS1 诱导其靶基因的表达发生改变, 如 EPO、VEGF、Flk-1 和 Tie2 等, 进而改变了红细胞的生成和血管的形成, 最终导致以上所述血象指标在不同基因型之间产生显著性的差异。

4 小结

1)HIF-2a/EPAS1 基因 rs7598371 多态位点与 HiHiLo 训练前后 WBC 和 M Retic#相关联, 可以作为 HiHiLo 训练中预测 WBC 和 M Retic#变化的分子标记。

2)HIF-2a/EPAS1 基因 rs6715787 多态位点与 HiHiLo 训练前后 MCV 和 MCH 相关联, 可以作为 HiHiLo 训练中预测 MCV 和 MCH 变化的分子标记。

参考文献:

[1] Wang G L, Semenza G L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.[J]. Biol Chem, 1995, 270: 1230-1237.
[2] Norihiko T, Koji M. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1[J]. Molecular Medicine, 2004: 146-153.
[3] Hirota K, Semenza G L. Regulation of angiogenesis

by hypoxia-inducible factor 1[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 59: 15-26.

[4] Gruber M, Hu C J, Johnson R S, et al. Acute postnatal ablation of Hif-2a results in anemia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 2301-2306.

[5] Rankin E B, Biju M P, Liu Q, et al. Hypoxia-inducible factor-2(HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo[J]. Clin Invest, 2007, 117: 1068-1077.

[6] Melanie J P. Familial erythrocytosis arising from a gain-of-function mutation in the HIF2A gene of the oxygen sensing pathway[J]. Ulster Med J, 2008, 77(2): 86-88.

[7] Melanie J P, Paul W F. A Gain-of-function Mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis[J]. N Engl J Med, 2008, 358(2): 162-168.

[8] Chapman R F, Stray G J, Levine B D. Individual variation in response to altitude training[J]. J Appl Physiol, 1998, 85: 1448-1456.

[9] 张纓, 周帆扬. 四周高住低训对外周血白细胞计数的影响[J]. 北京体育大学学报, 2004, 27(9): 1213-1214.

[10] 黄园, 陈志庆, 邱卓君, 等. 运动对红细胞老化与生成的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(5): 458-461.

[11] Klausen T, Mohr T, Ghisler U, et al. Maximal oxygen uptake and erythropoietic responses after training at moderate altitude[J]. Eur J Appl Physiol, 1991, 62: 376-379.

[12] Carlo Brugnara. A new approach in the diagnosis of anemia and monitoring of erythropoietic function[J]. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2000, 37(2): 93-130.

[13] 惠小阳, 李闻捷, 徐玉莲, 等. 中长跑有氧与无氧训练对血细胞的影响[J]. 现代临床医学生物工程杂志, 2003, 9(6): 505-506.

[14] 洪雷. 运动训练对血象影响初探[J]. 安徽体育科技, 1995(2): 53-54.

[15] 王晶. 血液有形成分和血尿素变化对足球运动员有氧能力的影响及在联赛疲劳监测中的作用[D]. 武汉: 武汉体育学院, 2006.

[16] O'Rourke J F, Tian Y M, Ratelife P J, et al. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia inducible factor 1 alpha[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 2060-2071.