

运动对心肌细胞凋亡及相关基因表达的影响

蒋磊, 周振茂, 夏美燕, 杜世全*

(安徽医科大学体育教学部, 合肥 230032)

摘要: 通过研究不同运动强度对心肌细胞凋亡基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 的影响, 探讨了运动对心肌细胞凋亡的作用机制。将大鼠分为 3 组 (正常对照组、一般游泳有氧训练组和力竭性过度训练组) 并建立运动模型; 采用实时荧光定量 PCR 技术观察心肌细胞中凋亡基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* mRNA 的表达; 采用 Western blot 方法观察 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* 蛋白表达情况。结果显示, 与对照组相比, 一般游泳有氧训练组大鼠调控基因 *Bcl-2* 表达显著增加, 对细胞的凋亡起到一定的抑制作用; 而力竭过度训练组中心肌细胞相关调控基因 *Bcl-2* 表达下降, *Bax*、*Caspase-3* 的表达升高促进凋亡。因此推定超负荷的运动大会加重大鼠心肌细胞的凋亡, 凋亡的发生可能与调控基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 有关。

关键词: 运动; 凋亡基因; 心肌细胞

中图分类号: G804.7; S865.12

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)01-0090-05

Effects of exercises on apoptotic and related gene expression in myocardium

JIANG Lei, ZHOU Zhen-mao, XIA Mei-yan, DU Shi-quan

(Section of Physical Education, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract: In order to investigate the mechanism of myocardial apoptosis by exercise, we studied the effects of different exercise intensities on apoptotic gene *Bcl-2*, *Bax* and *Caspase-3* in rat myocardium cells. The rats were randomly divided into three groups (control group, aerobic exercise group and overtraining group), the mRNA and protein expressions of apoptotic gene *Bax*, *Bcl-2* and *Caspase-3* were observed in myocardium cells by quantitative fluorescent polymerase chain reaction (qPCR) and western blot. As results, compared with the control group, the mRNA and protein expressions of *Bcl-2* both increased in aerobic exercise group which inhibited myocardial apoptosis. However, the decreased *Bcl-2* expression and the increased expressions of *Bax* and *Caspase-3* in the overtraining group indicated the promoted apoptosis. In conclusion, overtraining exercise can increase apoptosis in rat cardiac myocytes, and the occurrence of apoptosis may be related to the regulation of gene *Bcl-2*, *Bax* and *Caspase-3*.

Key words: exercise; apoptotic gene; myocardium cell

细胞凋亡是指细胞在基因的调控下进行有序的死亡, 它的发生有着积极的生物学意义。*Bcl-2* 家族在控制凋亡信号引起的细胞反应中起重要作用, 从功能上可分为具有抑制细胞凋亡和诱导细胞凋亡的作用。*Bcl-2* 和 *Bax* 同属于 *Bcl-2* 家族。*Bcl-2* 被认为是一种原癌基因^[1], 在细胞中具有抑制凋亡的作用; *Bax* 却恰恰相反, 它具有促进细胞凋亡的作用。*Caspase-3* 在细胞凋亡中作用是不可替代的, 是细胞

凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 是细胞凋亡蛋白级联反应的必经之路^[2]。运动强度对心肌的影响一直是体育界与医学界研究的重要领域。前期已有报道证实^[3]力竭过度运动可造成心肌细胞凋亡, 而运动对心肌细胞相关凋亡调控基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 的影响, 国内外的报道尚少。本试验通过研究不同运动强度对心肌细胞凋亡调控基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 的影响, 探讨运动引起心肌细胞凋

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 安徽省高校省级自然科学基金项目 (KJ2012Z170) 资助。

作者简介: 蒋磊, 男, 讲师。E-mail: mahous@126.com

* 通信作者: 杜世全, 男, 教授。E-mail: 190642189@qq.com

亡的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验试剂 总 RNA 抽提试剂试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; Reverse Transcription System 购自美国 Promega 公司; SYBR Green I Premix Ex Taq 购自大连宝生物公司。抗体: β -actin 鼠单抗购自 Santa cruz, Bax 鼠单抗购自北京中杉金桥生物公司; Bcl-2 兔多抗购自武汉博士德生物工程有限公司; Caspase-3 兔多抗购自武汉 Protein tech 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠, 山羊抗兔的 IgG 购自 Biosharp 公司; ECL 显色试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.1.2 试验动物 雄性 SD (sprague dawley) 大鼠 30 只, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 体重 165~210 g, 饲养环境温度(25±2)°C, 相对湿度 60%±15%, 随机分组, 常规喂养。

1.2 试验方法

1.2.1 动物分组和训练方案 将购进的大鼠先适应性喂养 2 d, 而后随机分为 3 组: 正常对照组(control group, C); 一般游泳有氧训练组(aerobic exercise group, A); 力竭性过度训练组(overtraining group, O), 每组 10 只。参考胡亚哲等^[4]报道的方法进行造模。C 组常规饲养, 不加干预; A 组和 O 组开始进行游泳训练, 游泳时间从 5 min 开始, 以后每天延长一点训练时间, 直至 A 组游泳时间为 75 min, O

组游泳时间达到 180 min。从第 8 周开始, A 组大鼠保持不变, 每天训练 75 min; O 组大鼠开始尾部负重(重量约为体重的 5%), 第 1 天在训练 180 min 的最后 5 min 开始负重, 负重时间每天增加 10 min, 直至全程负重, 总的训练时间为 16 周。

1.2.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成 大鼠处死后立即取出心脏, 取各组左心室同一位置心肌组织, 并称取 100 mg 组织块置于研钵中, 加入 1 mL Trizol 研磨均匀, 移入离心管中, 冰上孵育 5 min 后加 0.2 mL 氯仿, 震荡后 12 000 g, 4°C 离心 15 min, 取上清液移至新离心管, 加 0.5 mL 异丙醇, 震荡, 冰上孵育 5 min 后 12 000 g, 4°C 离心 10 min, 弃上清液, RNA 沉于管底。向沉淀中加入 1 mL 75%乙醇, 震荡后 8 000 g, 4°C 离心 5 min, 弃上清液后室温下干燥, 加入 10 μ L DEPC 处理水溶解 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测完整性并鉴定总 RNA 纯度, 将总 RNA 按逆转录试剂盒说明书进行反转录, 生成 cDNA 待用。cDNA 合成的逆转录反应体系: 2 μ L 10×缓冲液, 2 μ L dNTPs, 1 μ L AMV 逆转录酶, 0.5 μ L 重组的 RNasin 核糖核酸酶抑制剂, 1 μ L 总 RNA, 加不含核酸酶的水至总体积为 20 μ L。逆转录的反应条件为: 42°C 15 min, 95°C 5 min。逆转录结束后加 30 μ L DEPC 水混匀, -80°C 冻存, 备用。

1.2.3 PCR 引物设计 从 NCBI 的 GenBank 资料库查找大鼠 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* 及 β -actin 基因的序列, 应用 Primer Express 5.0 软件进行引物设计, 引物序列如下表 1 所示。

表 1 引物序列, 退火温度和 PCR 预期产物大小
Table 1 Primer sequences, annealing temperature and expected sizes of PCR products

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp Product size
<i>Bax</i>	F: 5'-ATGGAGCTGCAGAGGATGATT-3' R: 5'-TGAAGTTGCCATCAGCAAACA-3'	60	97
<i>Bcl-2</i>	F: 5'-CCGGGAGAACAGGGTATGATAA-3' R: 5'-CCCACTCGTAGCCCCTCTG-3'	60	81
<i>Caspase-3</i>	F: 5'-CAAGTCGATGGACTCTGGAA-3' R: 5'-GTACCATTGCGAGCTGACAT-3'	60	129
β -actin	F: 5'-CAGTAACAGTCCGCCTAGAA-3' R: 5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTA-3'	60	190

1.2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 *Bax*、*Bcl-2* 和 *Caspase-3* mRNA 表达量 PCR 反应在 ABI7500 型 Real-time PCR 仪上进行, 反应体系中含 10 μ L SYBR Premix ExTaq TM、1 μ L 上游引物、1 μ L 下游引物、2 μ L 目标 cDNA 模板、6 μ L 不含 RNA 酶的双蒸水, 反应总体积 20 μ L。反应条件:

95°C 预变性 30 s; PCR: 95°C×5 s, 60°C×34 s, 共 40 个循环。从 65°C 到 95°C 期间, 每隔 1°C 记录一次荧光值, 获得基因融解曲线。CT 值、 Δ CT 值和 $\Delta\Delta$ CT 值由系统自动测定, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[5]计算各组 mRNA 的表达量, 每组样品重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 各组 *Bax*、*Bcl-2*、

Caspase-3 蛋白的表达量 取各组部分心肌组织剪碎放入研磨器中, 加入 RIPA 缓冲液, 充分研磨后放入 1.5 mL 离心管中, 14 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清。采用 BCA 法进行蛋白定量。SDS-PAGE 电泳每孔蛋白上样量为 15 μl, 转膜, 封闭, 孵一抗 Bax(1:600)、Bcl-2(1:300)、Caspase-3(1:200)、β-actin (1:1 000), 4℃孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗涤后用 ECL 试剂盒于暗室显色, 曝光, 显影, 定影。结果用 Quantity One 软件进行分析。

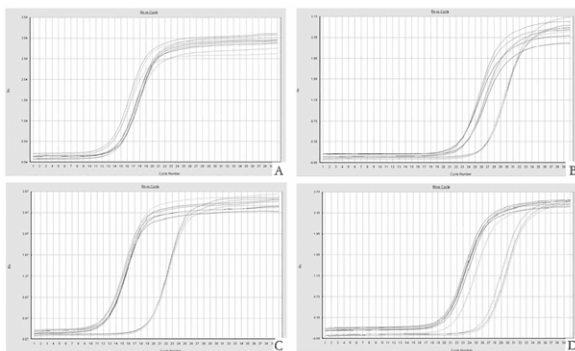
1.3 统计学处理

数据应用统计软件 SPSS 11.0 进行分析, 均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析进行各组间差异比较。

2 结果与分析

2.1 Real-time PCR 验证差异基因 mRNA 的表达水平

3 组大鼠经过不同训练强度的训练 16 周后, Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 基因的扩增曲线见图 1; 熔解曲线见图 2; mRNA 的表达量见表 2 和图 3。力竭过度训练组中 Bax 基因 mRNA 的表达量与对照组相比升高 2.639 倍, 一般游泳有氧训练组与对照组 Bax 基因 mRNA 表达量无显著性差异; 在一般游泳有氧训练组中 Bcl-2 基因 mRNA 的表达量是对照组的 1.735 倍; 力竭过度训练组中 Caspase-3 基因 mRNA 的表达量是对照组的 2.17 倍。



A:β-actin 扩增曲线; B:Bax 扩增曲线; C:Bcl-2 扩增曲线; D:Caspase-3 扩增曲线

A: β-actin amplification curve; B: Bax amplification curve; C: Bcl-2 amplification curve; D: Caspase-3 amplification curve

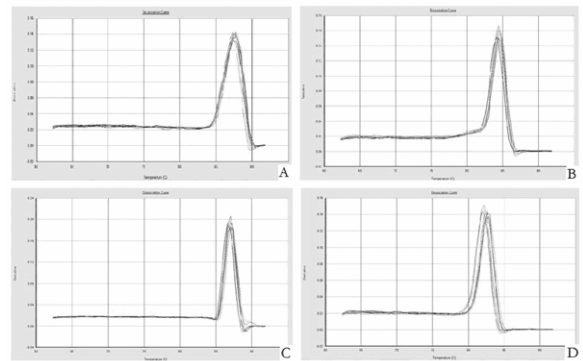
图 1 4 种基因的扩增曲线

Figure 1 Four kinds of gene amplification curves

2.2 Western blot 检测各组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达

Western blot 结果显示表达趋势与 Real-time

PCR 基本相同, 见图 4A。对其结果进行扫描, 灰度分析, 得出蛋白的相对表达量与对照组比较, 实验组的相对表达量具有统计学意义, 见图 4B。一般游泳有氧训练组大鼠心肌细胞中 Bcl-2 蛋白的表达最高, 显著高于对照组和力竭过度训练组 ($P<0.05$); 力竭过度训练组大鼠心肌细胞中凋亡调控基因 Bcl-2 蛋白表达最低, 与对照组之间比较无显著性差异 ($P>0.05$)。说明一般游泳有氧训练运动可引起大鼠心肌细胞凋亡调控基因 Bcl-2 蛋白的表达明显增加, 而力竭过度运动心肌细胞中 Bcl-2 蛋白表达有下降的趋势。凋亡调控基因 Bax 和 Caspase-3 在力竭过度训练组大鼠心肌细胞中蛋白表达显著升高, 与对照组和一般游泳有氧训练组相比有显著性差异 ($P<0.05$); 而一般游泳训练组 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达情况和对照组比较无显著性差异。说明力竭过度训练可促进大鼠心肌细胞凋亡调控基因 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的升高。



A: β-actin 熔解曲线; B: Bax 熔解曲线; C: Bcl-2 熔解曲线; D: Caspase-3 熔解曲线

A: β-actin fusion curve; B: Bax fusion curve; C: Bcl-2 fusion curve; curve D: Caspase-3 fusion curve

图 2 4 种基因的熔解曲线

Figure 2 Four kinds of gene fusion curves

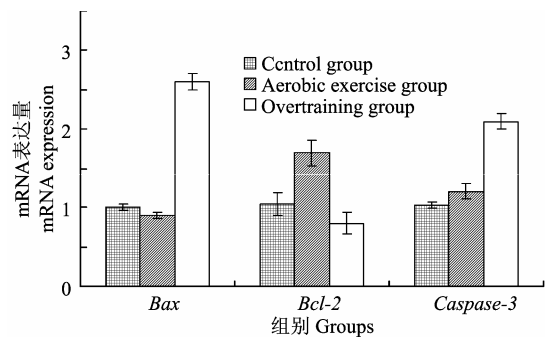


图 3 各组 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达量变化 (与对照组相比, * $P<0.05$)

Figure 3 The changes of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA expression level in each group (Compare with control group, * $P<0.05$)

表 2 运动对大鼠心肌细胞中凋亡调控基因 *Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3* 表达的影响Table 2 The impact of exercise on apoptosis genes of *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-3* expression in rat cardiomyocytes

分组 Group	<i>Bax</i> (Δ CT)	<i>Bcl-2</i> (Δ CT)	<i>Caspase-3</i> (Δ CT)
正常对照组 Control group	7.263 \pm 0.066	4.032 \pm 0.162	5.496 \pm 0.035
训练有氧组 Aerobic exercise group	7.413 \pm 0.085	4.827 \pm 0.197*	5.210 \pm 0.143
力竭性过度训练组 Overtraining group	5.863 \pm 0.148*	4.292 \pm 0.132	4.333 \pm 0.142*

与正常对照组相比, * P <0.05。Compare with control group, * P <0.05.

2.3 运动对大鼠心肌细胞中凋亡调控基因 *Bcl-2/Bax* 比值的影响

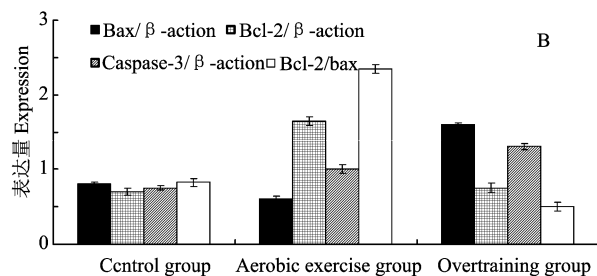
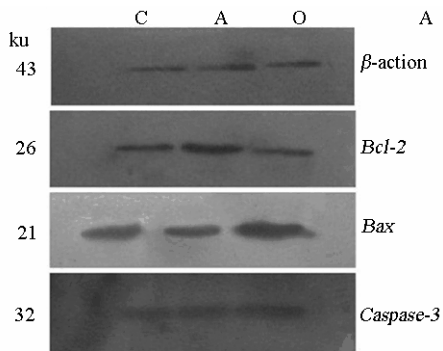
在力竭过度训练组中, 大鼠心肌细胞的凋亡调控基因 *Bcl-2/Bax* 的比值与一般游泳训练组相比有显著性差异(P <0.01), 见图 4B; 比值的显著下降说明过度运动训练组可造成大鼠心肌组织 *Bax* 的过表达而 *Bcl-2* 不相应增多, 形成的 *Bcl-2/Bax* 同二聚体占优势, 最终诱发细胞凋亡。

或协同谷胱甘肽等其他抗氧化剂作用, 抑制谷胱甘肽降低, 来改变细胞的氧化还原状态, 进一步抑制细胞凋亡^[6]; (2) *Bcl-2* 在线粒体形成离子通道, 调节线粒体膜通透性和促进线粒体凋亡蛋白前体的释放, *Bcl-2* 过表达能抑制线粒体膜通透性的改变, 影响孔道形成, 凋亡诱导因子等不能自由通透, 从而抑制细胞凋亡^[7]; (3) *Bcl-2* 能将凋亡肽酶激活因子 (Apaf-1) 等定位在线粒体膜上, 阻止其引发细胞凋亡作用^[8]; (4) *Bcl-2* 可通过调节细胞内 Ca^{2+} 的浓度, 促进质子外流, 保持基质的 pH 值稳定, 维持线粒体膜电位平衡, 保护膜的完整, 从而抑制细胞凋亡^[9]。

Bax 具有拮抗 *Bcl-2* 的保护细胞作用, 促进细胞凋亡。试验证明, *Bax* 能在较为广泛的 pH 范围内形成孔道, 允许一些离子和小分子, 如细胞色素 C 等凋亡激蛋白通过线粒体膜, 进入胞浆中, 从而诱发细胞凋亡^[10]。*Bcl-2* 和 *Bax* 的比例是决定细胞是否发生凋亡的重要调控因素, 在细胞中它们相互竞争形成同源或异源二聚体, 通过调控线粒体变化, 双向调节细胞凋亡, 具有促进和抑制细胞凋亡的双重效应。如若 *Bcl-2* 和 *Bax* 的表达量相互平衡, 形成的 *Bcl-2/Bax* 异二聚体占优势, 则细胞的存活期延长; 如 *Bax* 过表达而 *Bcl-2* 不相应增多, 形成的 *Bcl-2/Bax* 同二聚体占优势, 则会诱发细胞凋亡^[11]。

Caspase-3 是 *Caspase* 酶系家族的成员之一, 广泛表达于正常人体组织及肿瘤组织中, 是一类介导细胞凋亡的蛋白水解酶, 是各种凋亡通路的枢纽。*Caspase-3* 也是 *Caspase* 家族中两种凋亡途径的主要效应因子^[12]。在大多数引发细胞凋亡的因素中, 都需要通过 *Caspase-3* 介导的信号传导途径发生细胞凋亡, 故 *Caspase-3* 是细胞凋亡的主要执行者。

综上所述, 在经过不同运动强度训练后, 适度的运动负荷不会引起心肌细胞凋亡, 但超负荷量的运动会引起凋亡调控基因 *Bcl-2* 表达下降、*Bax* 和 *Caspase-3* 基因的表达上升, 进而促进了大鼠心肌细胞凋亡; 心肌细胞中凋亡调控基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 在各试验组的不同表达, 暗示了凋亡的发生可能与调控基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 有关。



与正常对照组相比, * P <0.05; 与一般游泳训练组相比, ** P <0.01

Compare with control group, * P <0.05. Compare with aerobic exercise group, ** P <0.01

图 4 各组心肌组织中 *Bax*、*Bcl-2* 和 *Caspase-3* 表达的 Western blot 分析

Figure 4 *Bax*, *Bcl-2* and *Caspase-3* protein expression in each group myocardial tissue by Western blot analysis

3 讨论

在细胞凋亡现象的研究过程中, *Bcl-2* 家族起着决定性的作用, *Bcl-2* 和 *Bax* 又是 *Bcl-2* 家族中调控细胞凋亡的两个重要基因。*Bcl-2* 能够抑制细胞凋亡可能与以下几个方面有关: (1) *Bcl-2* 作为抗氧化剂

参考文献:

- [1] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. *Science*, 1998, 281 (5381): 1322-1326.
- [2] Pop C, Salvesen G S. Human caspases: activation, specificity and regulation[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 21777-21781.
- [3] Thomas D P, Marshall K I. Effects of repeated exhaustive exercise on myocardial subcellular membrane structures[J]. *Int J Sports Med*, 1988, 9(4): 257-260.
- [4] 胡亚哲, 程邦昌, 王和平, 等. 运动性心脏肥大心肌细胞超微结构改变及意义[J]. *中华心血管病杂志*, 2005, 33(10): 936-939.
- [5] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [6] 季红斌, 翟琦巍, 刘新垣, 等. bcl-2 基因的转录调控[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2000, 32(2): 95-99.
- [7] Ross T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome C[J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496-499.
- [8] Reed J C. Bcl-2 family proteins and mitochondria[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366(1-2): 127-137.
- [9] Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, et al. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(4): 1455-1459.
- [10] Mayer B, Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis[J]. *News Physiol Sci*, 2003, 18(3): 89-94.
- [11] Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619.
- [12] Chung T K H, Cheung T H, Lo W K, et al. Expression of apoptotic regulations and their significance in cervical cancer[J]. *Cancer Lett*, 2002, 180(1): 63-68.