

游泳训练对大鼠腓肠肌铁代谢相关蛋白表达的影响

刘玉倩¹ 常彦忠¹ 钱忠明^{1,2} 刘建国³ 段相林¹

1 河北师范大学生命科学学院动物细胞生物学研究室(石家庄 050016)

2 香港理工大学应用生物及化学科技学系 3 河北师范大学体育学院

摘要 目的:研究游泳训练后大鼠腓肠肌二价金属离子转运体 1(divalent metal transporter 1, DMT1)、转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)及膜铁转运蛋白 1(ferroportin1, FPN1)表达的变化,探究运动对腓肠肌铁代谢的影响机制。方法:40 只雌性 SD 大鼠随机分为对照组和游泳训练组,分别于游泳训练 5 周及 10 周后取材,测定血清铁状态、腓肠肌非血红素铁含量,采用 Western Blot 方法检测腓肠肌铁代谢相关蛋白表达的变化。结果:(1)游泳训练 5 周及 10 周组大鼠血清铁、Hb 及 RBC 均较对照组显著升高,游泳运动 10 周组大鼠腓肠肌非血红素铁含量显著增加($P < 0.01$);(2)游泳训练组大鼠腓肠肌 DMT1(IRE)和 TfR 表达增加,FPN1 表达减少($P < 0.05$),而 DMT1(non-IRE)表达无明显变化。结论:游泳训练可以增加腓肠肌非血红素铁含量,促进机体铁动员。这可能与腓肠肌细胞膜上向胞内转运铁的 TfR 和 DMT1(IRE)蛋白表达增加,而向胞外转运铁的 FPN1 表达下降有关。

关键词 腓肠肌;非血红素铁;膜铁转运蛋白 1;二价金属离子转运体 1;大鼠

Effects of Swim Training on the Expression of Gastrocnemius' Iron Transport Proteins in Rats

Liu Yuqian¹, Chang Yanzhong¹, Qian Zhongming^{1,2}, et al.

1 Department of Animal Cytobiology, College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang, China 050016

2 Laboratory of Iron Metabolism, Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, Hong Kong, PRC

Abstract Objective To investigate the effects of swim training on the expression of divalent metal transporter 1 (DMT1), transferrin receptor (TfR) and ferroportin 1 (FRN1) in rats' gastrocnemius. **Methods** 40 female SD rats were randomly divided into two groups: control group (CG) and exercise group (EG), and were sampled after 5 and 10-week swimming. Determined serum iron status and non-heam iron of gastrocnemius. Observed the expression of TfR, DMT1 and FPN1 by Western Blot. **Results** (1) The serum iron, Hb and RBC were significantly higher than those in control group. The gastrocnemius' non-heam iron of exercise group were significantly increased after 10-week training ($P < 0.01$). (2) The expression of DMT1 (IRE) and TfR of exercise group was increased, but FPN1 expression was decreased, and DMT1 (non-IRE) had no change. **Conclusion** Suitable training could improve body iron homeostasis, increase gastrocnemius' non-heam iron. The mechanism of changes were that the expression of DMT1 (IRE) and TfR were increased but that of FPN1 was decreased.

Key words gastrocnemius, non-heam iron, ferroportin 1, divalent metal transporter 1, rats

铁广泛参与机体的各种生理反应,可直接影响 O_2 的运输和肌肉的有氧氧化能力及 ATP 的形成,进而影响运动能力。多年来运动对铁代谢的影响,以及铁稳态变化对运动能力的影响一直是相关领域的

研究热点,同时也存在许多争议。随着分子生物学技术的不断发展和对体内铁稳态调节机制的深入研究,转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFR), 铁调节蛋白 (iron regulatory proteins, IRP), 铁反应元件 (Iron responsive element, IRE), 二价金属离子转运体 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) 和膜铁转运蛋白 1 (ferroportin1, FPN1) 以及肝脏抗菌多肽 (hepcidin)^[1-4] 等新的蛋白不断被发现,为探讨运动对铁代谢的影响提供了分子生物学基础。目前有关运动对铁代谢的影响多集中在运动性贫血的研究,而运动训练对机体铁代谢相关蛋白表达的影响及其机制报道较少,鉴此,本研究通过探讨游泳训练对大鼠腓肠肌中非血红素铁含量、血清铁状态以及腓肠肌铁代谢相关蛋白 DMT1、TFR 和 FPN1 的影响,以阐明游泳训练改变机体铁代谢的分子生物学机制,为科学健身及合理训练提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

体重 90~100g 的 Sprague-Dawley 雌性大鼠 40 只,购自河北医科大学动物养殖中心,选用国家标准啮齿类动物饲料喂养,自由饮水。环境温度 22℃~24℃,相对湿度为 45%~55%。实验大鼠随机分为对照组(安静)和游泳训练组(根据文献报道及相关实验确定强度为每天连续游 90min^[5,6]),每组 20 只,分别于训练 5 周及训练 10 周后取材。不锈钢游泳池规格为 130cm×90cm×70cm,水温 32℃±1℃。

1.2 取材

末次运动后 36h 取材,以消除急性运动的影响。0.4%戊巴比妥钠(1ml/100g)麻醉后剪开右心耳,EP 管内加抗凝剂 EDTA-K₂ 测血常规;于另一 EP 管中取血 1.5ml,845g/min,4℃离心 20min 取上清,-70℃保存以备测血清铁。左心室插管,用去离子水(Mill-Q, France)配的 4℃生理盐水快速灌流,剪取腓肠肌约 80~100mg,滤纸吸干水分,锡箔纸包好迅速投入液氮中,以备进行相关蛋白的测定。同时取腓肠肌,生理盐水冲洗后,110℃烤 4h,于-70℃保存以备测组织非血红素铁。

1.3 血常规测定:采用 Beckman Coulter AC Tdiff 2 型血液自动分析仪测定。

1.4 血清铁状态的测定:采用 Iron and Iron-binding Capacity 试剂盒(SIGMA, USA),严格按说明书操作。

1.5 组织非血红素铁的测定:

将 110℃烤干的腓肠肌称重后,分别加入 12.5 倍体积的由浓 HCl、饱和三氯乙酸及去离子水配成的混合酸,65℃消化 20h,12000g/min,离心 10min,

取 0.025ml 上清液及标准液(1μg/ml),加入染色剂 1.25ml,10min 后 540nm 比色。

非血红素铁(μg/g)=[(测试管吸收值/标准管吸收值)×标准铁量×样品稀释倍数]/样本重(g)

1.6 Western Blot^[7]方法:

提取腓肠肌总蛋白:腓肠肌中加入裂解液(1ml/100mg);1mlTBS(pH8.0)中加入 10μl NP-40,1μl Pepstatin(1μg/ml),1μl Leupeptin(1μg/ml),1μl Aprotinin(1μg/ml),5μl PMSF(phenyl methylsulfonyl fluoride)(100μg/ml)。冰浴超声破碎,离心(4℃,12000g/min,20min),取上清于-70℃保存。Bradford 法测蛋白浓度(Eppendorf Biophotometer)。SDS-PAGE(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis):Tris base, glycine, acrylamide, N, N'-methylene-bisacrylamide, 2-mercaptoethanol 及 ammonium persulfate 等试剂均购自 SIGMA。10%分离胶,4%浓缩胶,上样量为 50μg,同时加入 Marker (Molecular weight standards Amersham Pharmacia Biotech),恒压电泳(Bio-Rad)100V,20min,再 200V,45min;恒流转至 NC 膜(Trans-Blot[®] Transter Medium Pure Nitrocellulose Membrane, Bio-RAD, 0.45μm)300mA,45min。5%的脱脂奶粉室温封闭 2h,分别加入 1:5000 兔抗大鼠 FPN1、DMT1(IRE)、DMT1(non-IRE)及 TFR (ADI, San Antonio, TX)的一抗,4℃过夜;TBST(20mM Tris-Cl, pH 7.6, 137mM NaCl, 0.1% Tween-20)洗膜后加入 1:5000 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(山羊抗兔 IgG(H+L)),室温摇动孵育 1h;加入化学发光底物(Super Signal[®] West Pico Trial Kit, PIERCE, USA)发光;用凝胶成像系统(Chemiluminescence imaging system, Ω MEGA12ic, USA)扫描图像, Gel-Pro Analyzer[®](MEDIA CYBERNETICS, USA)分析软件进行分析。TBST 洗膜后奶粉室温封闭,再加入 β-actin 抗体(anti-actin, Sigma-Aldrich, MO)再进行发光。最终统计每一种目的蛋白与 β-actin 的 OD 比值。

1.7 数据统计:结果数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异具有高度显著性。

2 结果

2.1 游泳训练对大鼠机体铁状态的影响(表 1)

与对照组相比,5 周游泳训练后大鼠 Hb、Hct 及转铁蛋白饱和度显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),未饱和铁结合力显著降低($P < 0.05$)。

10 周游泳训练后大鼠 Hct 及 Hb 比对照组明显

增加 ($P < 0.05$), 血清铁、转铁蛋白饱和度均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 未饱和铁结合力比对照组显著降低。

游泳训练 5 周对腓肠肌中非血红素铁含量无明显影响 ($P > 0.05$)。游泳训练 10 周组大鼠腓肠肌中非血红素铁含量比对照组显著增加 ($P < 0.01$)。

表 1 游泳训练对大鼠血常规、血清铁状态及腓肠肌非血红素铁含量的影响 ($n = 10$) ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of swim training on rats' blood iron status and non-hem iron in gastrocnemius

	5 周		10 周	
	对照组 control	游泳训练组 exercise group	对照组 control	游泳训练组 exercise group
红细胞压积 Hct (%)	30.17 ± 1.56	34.73 ± 2.84 ^{**}	32.58 ± 3.23	35.04 ± 3.55 [▲]
血红蛋白 Hb (g/dl)	13.33 ± 0.63	14.23 ± 0.37 [*]	13.55 ± 0.85	14.46 ± 0.52 [▲]
血清铁 SI (μg/dl)	207.41 ± 25.61	225.56 ± 17.54	193.95 ± 8.58	219.14 ± 6.31 ^{▲▲}
未饱和铁结合力 UIBC (μg/dl)	256.47 ± 21.36	223.89 ± 30.91 [*]	295.99 ± 11.74	260.72 ± 23.03 [▲]
总铁结合力 TIBC (μg/dl)	463.95 ± 26.35	449.45 ± 46.10	489.89 ± 17.34	479.86 ± 33.43
转铁蛋白饱和度 TS (%)	44.61 ± 4.38	50.31 ± 2.24 ^{**}	38.86 ± 2.59	45.67 ± 3.67 ^{▲▲}
腓肠肌非血红素铁 gastrocnemius' non-hem iron (μg/g)	103.2 ± 18.07	125.95 ± 38.09	66.92 ± 15.39	125.16 ± 20.91 ^{▲▲}

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 5 周对照组比较, compared with control group after 5-week swim training.

▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, 与 10 周对照组比较, compared with control group after 10-week swim training.

2.2 游泳训练对大鼠腓肠肌铁代谢相关蛋白表达的影响

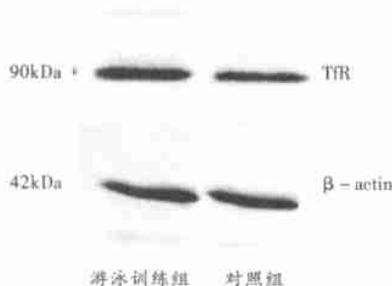


图 1 10 周游泳训练对腓肠肌 TFR 表达的影响

Fig.1 Effects of 10-week swim training on the expression of gastrocnemius' TFR

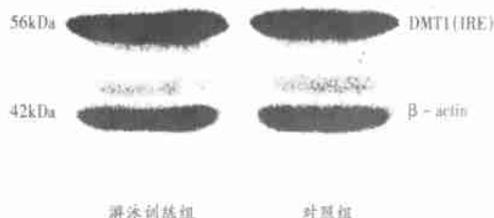


图 2 10 周游泳训练对腓肠肌 DMT1(IRE) 表达的影响

Fig.2 Effects of 10-week swim training on the expression of gastrocnemius' DMT1(IRE)

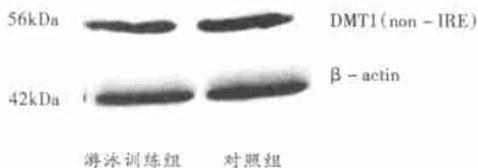


图 3 10 周游泳训练对腓肠肌 DMT1(non-IRE) 表达的影响

Fig.3 Effects of 10-week swim training on the expression of gastrocnemius' DMT1(non-IRE)

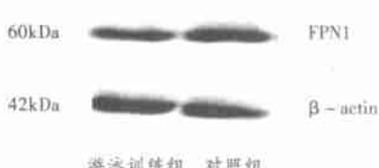


图 4 10 周游泳训练对腓肠肌 FPN1 表达的影响

Fig.4 Effects of 10-week swim training on the expression of gastrocnemius' FPN1

图 1—4 为腓肠肌组织匀浆后铁代谢相关蛋白的 Western Blot 结果。利用化学发光法检测蛋白条带亮度, Gel-Pro Analyzer[®] 分析软件进行分析。CG 为对照组, EG 为游泳训练组。相关蛋白的分子量分

别为 TFR ~ 90kDa, DMT1 ~ 56kDa, FPN1 ~ 60kDa, β-actin ~ 42kDa。各条带与 β-actin 的比值进行统计 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) (图 5)。

Western Blot 结果显示, 游泳运动 10 周组腓肠肌

TfR 及 DMT1 (IRE) 均比对照组显著增加 (TfR: CG 为 0.743 ± 0.071 , EG 为 0.854 ± 0.033 ; DMT1 (IRE): CG 为 1.069 ± 0.102 , EG 为 1.258 ± 0.048 , $P < 0.05$); DMT1 (non-IRE) 两组相比无显著变化 (CG 为 1.157 ± 0.111 , EG 为 1.276 ± 0.106), 而游泳运动 10 周组 FPN1 表达比对照组显著降低 (CG 为 1.174 ± 0.117 , EG 为 0.953 ± 0.133 , $P < 0.05$) (图 5)。

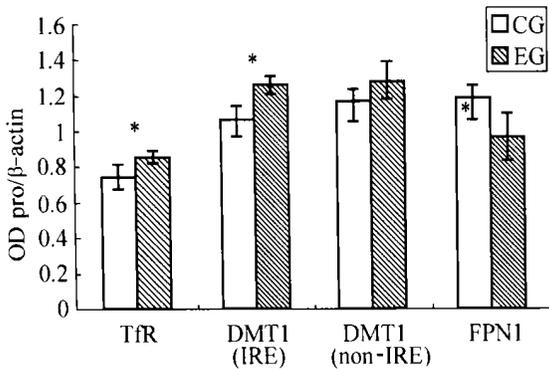


图 5 10 周游泳训练对大鼠腓肠肌铁代谢相关蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of 10-week swim training on the expression of gastrocnemius' iron transport proteins in rats

* $P < 0.05$ 与对照组相比, compared with controls

3 讨论

3.1 游泳训练对机体血常规及铁状态的影响

游泳训练 5 周及 10 周组 Hct 及 Hb 均高于对照组。Hct 和 Hb 的增加确保了机体从肺部结合和运输更多的 O_2 到身体各部, 尤其是参与运动的组织和器官, 使其合成较多的 ATP 满足运动所需。游泳训练组血清未饱和铁结合力低于对照组, 转铁蛋白饱和度显著高于对照组, 说明游泳运动组血液中与 Tf 结合的铁增多, 可以运送更多的铁到参与运动的器官组织。同时血液中游离的铁减少, 避免游离铁对机体的过氧化损伤。游泳训练 5 周组与对照组间血清铁无明显差别, 而游泳运动 10 周组血清铁显著高于对照组, 保证了通过血液循环系统给运动器官提供充足的铁, 以合成 Mb 及电子传递链中的各种酶, 是对运动产生的良好生理适应。

3.2 游泳训练对腓肠肌组织非血红素铁含量的影响

游泳训练 5 周组与对照组相比腓肠肌中非血红素铁的含量无明显差异, 而游泳运动 10 周组的腓肠肌中非血红素铁含量显著高于对照组, 这与 Kaptanoglu 及 Navas 的报道是一致的^[5,9]。此结果说明为了满足运动器官的能量需求, 腓肠肌从血液中摄

取的铁增多, 说明运动会促使铁在各个器官重新分布, 以满足运动时功能活跃组织对铁的需求。腓肠肌中增多的铁用来合成 Mb 及电子传递链中的各种酶, 产生更多的 ATP, 为运动提供充足的能量。

3.3 游泳训练对腓肠肌铁代谢相关蛋白表达的影响

TfR 是细胞膜表面铁转运蛋白, 具有两个转铁蛋白结合位点的跨膜糖蛋白二聚体, 由两个相同的分子量为 95kDa 的亚单位经两条二硫键联结成, 主要功能是参与受体介导的三价铁转运蛋白的内吞作用^[8,9]。DMT1 是迄今为止所克隆的第一个哺乳动物跨膜铁转运体。DMT1 是一种具有 12 个跨膜域的糖蛋白, 在机体各组织广泛分布。根据 DMT1 mRNA 序列, DMT1 有两种异构体, 3' 末端非翻译区含铁反应元件 (iron regular element, IRE) 的称为 DMT1 (IRE), 无 IRE 的称为 DMT1 (non-IRE), 两种异构体在分布、表达等方面性质近似。细胞膜上 DMT1 的主要功能是将非血红素铁转运入细胞内, 组织细胞中内吞小体膜上的 DMT1 可将内吞小体中已解离的铁转入胞浆, 供细胞利用^[10,11]。FPN1 是 2000 年 Donvoan 等^[1] 采用定位克隆方法从斑马鱼中分离出一个能使铁从细胞内释放出来的蛋白质编码基因, 并命名为 ferroportin 1。FPN1 具有使铁从细胞内释放出来的功能, 在亚铁氧化酶 (hephaestin) 和/或铜蓝蛋白的协助下, 可将细胞内的铁释放到血液中。本实验中, 游泳训练 10 周组腓肠肌膜上 TfR 和 DMT1 (IRE) 表达增加, 有助于腓肠肌从血液中摄取更多的铁。而 FPN1 表达比对照组降低, 说明腓肠肌细胞向血液中释放的铁减少。这均有助于为肌细胞合成 Mb 及 ATP 提供足够的铁, 是对运动的一种适应。

3.4 大鼠腓肠肌铁代谢相关蛋白表达变化的分子机制

在参与铁代谢的许多蛋白 mRNA 的非翻译区 (untranslated region, UTR) 均含有 IRE, 可根据获得铁的多少而改变铁调节蛋白 (iron regulation protein, IRP) 与 IRE 的结合活性在转录水平调节蛋白的表达。DMT1 (IRE) 与 TfR 的 IRE 均位于 mRNA 3' 端非翻译区, 当细胞内铁含量充足时, IRP 与 mRNA 3' 端的 IRE 解离, mRNA 加速降解, DMT1 (IRE) 与 TfR 蛋白表达减少。当细胞内缺铁时, IRP 与 IRE 的亲合力增强, mRNA 稳定性增加, 蛋白表达增多, 增加细胞对铁的摄取^[13]。而 FPN1 的 IRE 位于 mRNA 5' 端非翻译区, 当细胞内铁缺乏时, IRE/IRP 复合体阻止 mRNA 的翻译, 蛋白表达降低, 从而减少细胞内铁向

血液中转运。如果, IRE 位于 mRNA 的 5' 末端, 形成的 IRE/IRP 复合体, 通过阻止 mRNA 与小的核糖体亚单位结合而抑制其翻译; 如果 IRE 位于 mRNA 的 3' 末端, 与 IRE 的亲和力增强, 通过保护 mRNA 避免降解, 从而增加其稳定性, 导致蛋白表达增多^[4]。本实验中适度运动 10 周组腓肠肌细胞膜上 DMT1 (IRE) 的表达比对照组显著增加, 而 DMT1 (non-IRE) 无显著变化。进一步说明运动后腓肠肌铁转运蛋白表达的变化可能与 IRE 与 IRP 的结合活性有关。游泳运动 10 周组腓肠肌 TfR 及 DMT1 (IRE) 表达比对照组显著增加, FPN1 比对照组显著减少 ($P < 0.05$), 使腓肠肌从血液中摄取更多的铁, 而细胞内铁向外转运减少, 导致腓肠肌细胞内非血红素铁含量显著增加。

IRE 与 IRP 结合活性的改变, 目前认为可能有以下两种原因: (1) 运动时 NO 的增多会提高 IRE 与 IRP 结合活性^[14-17]。(2) Heparidin 的整体调控作用^[18]: 肝细胞产生的 Heparidin 可以通过血液循环到达机体各部位, 主要是在十二指肠, 通过改变 IRE 与 IRP 的结合活性, 改变 DMT1、肠细胞色素 B、膜铁转运辅助蛋白 (hephaesin, HP) 和 FPN1 等的表达, 从而调节铁的吸收和转运。但由于在 Heparidin 基因转录中没有 IRE 参与, 所以 Heparidin mRNA 随铁状态而改变的机制还不清楚。同时运动对 Heparidin 表达的影响以及 NO 与 Heparidin 的关系还需要做进一步的实验研究。

4 总结

(1) 游泳运动增加血清铁及 Hb 含量, 提高转铁蛋白饱和度, 促进机体铁的动员, 使贮存铁重新分布, 使机体对运动产生有益的生理适应。(2) 腓肠肌细胞膜上 TfR 和 DMT1 (IRE) 的表达增加, FPN1 表达降低, 可能是引起游泳训练 10 周组腓肠肌非血红素铁增加的主要原因。

5 参考文献

[1] Donovan A, Brownline A, Zhuo Y, et al. Positional cloning of Zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 2000, 403(6771): 776~781.

[2] 刘玉倩, 钱忠明, 常彦忠, 等. 运动对铁代谢影响的研究. *体育科学*, 2004, 24 (1): 27~30, 34.

[3] Portal S, Epstein M, Dubnov G. Iron deficiency and anemia in female athletes—causes and risks. *Harefuah*, 2003, 142(10): 698~703, 717.

[4] Schumacher RO, Schmid A, Grathwohl D, et al. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and per-

formances. *Med Sci Sports Exerc*, 2002, 34(5): 869~875.

- [5] Kaptanoglu B, Turgut G, Genc O, et al. Effects of acute exercise on the levels of iron, magnesium, and uric acid in liver and spleen tissues. *Biol Trace Elem Res*, 2003, 91(2): 173~178.
- [6] Navas FJ, Cordova A. Iron distribution in different tissues in rats following exercise. *Biol Trace Elem Res*, 2000, 73 (3): 259~268.
- [7] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2003. 1044~1428.
- [8] Zhongming Qian, Desheng Xiao, Paklai Tang, et al. Increased expression of transferrin receptor on membrane of erythroblasts in strenuously exercised rats. *Appl Physiol*, 1999, 87(2): 523~529.
- [9] Schumacher YO, Schmid A, Konig D, et al. Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of iron status. *Br J Sports Med*, 2002, 36 (2): 195~200.
- [10] Zoller H, Koch RO, Theurl I, et al. Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter1 and ferroportin1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology*, 2001, 120 (6): 1412~1419.
- [11] Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, 388(6641): 482~488.
- [12] Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, et al. Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice. *Gut*, 2002, 51 (5): 648~653.
- [13] Ya Ke, Yin-yin CHEN, Yan-zhong Chang, et al. Post-transcriptional expression of DMT1 in the heart of rat. *Journal of Cellular Physiology*, 2003, 196 (1): 124~130.
- [14] Tatchum-Talom R, Schulz R, McNeill JR, et al. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279 (4): H1757~1766.
- [15] Sangwon Kim, Prem Ponka. Nitric oxide-mediated modulation of iron regulatory proteins: Implication for cellular iron homeostasis. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2002, 29 (3): 400~410.
- [16] Qian ZM. Nitric oxide and changes of iron metabolism in exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2002, 77 (4): 529~536.
- [17] Galen M, Pieper Nadine L N, Halligan, et al. Non-heme iron protein: A potential target of nitric oxide in acute cardiac allograft rejection. *PNAS*, 2003, 100 (6): 3125~3130.
- [18] Gael Nicolas, Lydie Viatte, Myriam Bennoun, et al. Heparidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2002, 29 (3): 327~335.

(2004. 07. 26 收稿; 2004. 08. 24 修回)