

长期有氧运动上调老年大鼠骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路^①

王 兵¹, 段富贵²

1. 西安工业大学 体育学院, 西安 710032; 2. 焦作师范高等专科学校 体育学院, 河南 焦作 454000

摘要:为探讨长期有氧运动对老年大鼠骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路的影响,将实验分为:青年组(Young),老年大鼠组(Old),老年大鼠+运动组(Old+EX),运动为跑台运动,持续 12 周。结果发现:与青年组大鼠相比,老年组大鼠的股骨和 L2-5 段椎骨的骨密度(BMD)明显下降,股骨的极限载荷和刚度明显降低;老年大鼠经过长期有氧运动后,股骨和 L2-5 段椎骨的骨密度、股骨的极限载荷和刚度都得到明显增加。实时定量 PCR 结果显示老年组大鼠的股骨中 Wnt1, Wnt3a, Lrp5, Axin2 和 ctnnb1 的 mRNA 水平明显降低,但长期进行有氧运动的老年组大鼠股骨中 Wnt1, Wnt3a, Lrp5, Axin2 和 ctnnb1 的 mRNA 水平得到明显增加。可以认为长期有氧运动可上调老年大鼠骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路,有助于减轻或延缓老年大鼠的骨质丢失。

关键词:有氧运动,老年大鼠, Wnt/ β -catenin 通路,骨质疏松

中图分类号: G804.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)04-0132-05

我国正逐步进入老龄化社会,到 2050 年将有 4 亿人口超过 65 岁,1 亿 5 千万人口超过 80 岁,年龄相关性退行性疾病正受到医学研究领域愈来愈多的关注^[1]。骨质疏松是一项严重的与年龄相关的公共卫生疾病,其特征是骨质量低下、骨小梁数量减少、骨结构退化以及因此而导致的骨折风险增加^[2-4]。目前,衰老性骨质疏松的治疗手段有钙制剂、促矿化维生素类药物(如维生素 D)、雌激素替代治疗、选择性雌激素受体调节剂以及二磷酸盐等,这些药品均可以在一定程度上延缓和减轻骨量丧失和退化的速度,但是存在治疗周期漫长(需要终身服药)、副作用大以及药物花费昂贵等缺点。大量的动物和临床试验结果显示,有氧运动可以预防衰老性骨质疏松,降低老人的骨折风险^[5-7],然而其中的分子机制至今尚未完全阐明。

本研究以老年大鼠为模型,观察长期有氧运动对大鼠骨质疏松的预防作用,并检测骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路相关基因的表达水平,初步分析运动对老年大鼠骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路的影响,尝试阐明运动预防骨质疏松的潜在分子机制。

1 试验方法

1.1 动物和试剂

雄性 Fisher 344×Brown Norway 大鼠(北京唯尚立德生物科技有限责任公司);RT-PCR 试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司);组织柠檬酸合成酶活性比色法定量检测试剂盒(上海宝曼生物科技有限公司)。

1.2 运动

自制大鼠用跑台,放置于电动跑步机上,倾斜角度设置为 10°。运动设置:第 1 周和第 2 周,每天

① 收稿日期:2016-06-14

作者简介:王 兵(1980-),男,新疆昌吉人,硕士,副教授,主要从事运动保护机制、运动员机能评定与大众健身、大众健身与大众体育文化传播的研究。

30 min, 速度 8 m/min; 第 3 周和第 4 周, 每天 45 min, 速度 12 m/min; 第 5 周至 12 周, 每天 60 min, 速度 20 m/min. 对照组和模型组大鼠仅放置于跑台上, 但不转动跑台, 放置时间与运动治疗组相同.

雄性大鼠(23 月龄)随机分为跑台运动组(Old+EX)和静止组(Old), 12 周之后称体质量, 脱颈处死大鼠, 取材(椎骨, 股骨, 比目鱼肌)用于检测, 2 月龄雄性大鼠作为青年组(Young)视为对照. 分离比目鱼肌, 利用组织柠檬酸合成酶活性比色法定量检测试剂盒检测肌肉中柠檬酸合成酶活性, 从而评价跑台运动的效果.

1.3 骨骼相关参数的检测

脱颈处死大鼠后, 剥离左侧股骨和椎骨, 使用 DEXA 双能 X 线骨密度仪检测大鼠股骨和 L2-5 段椎骨的骨矿密度(BMD); 采用电子万能试验仪检测股骨的极限载荷和刚度.

1.4 实时定量 PCR 检测

脱颈处死大鼠后, 剥离大鼠右侧股骨, 在液氮中研磨法将股骨磨碎, 加入 Trizol 溶液按照说明书抽提总 RNA, 定量后反转录得到单链 DNA, 按照说明书进行实时定量 PCR 反应, 靶标基因的引物如下: Wnt1: 上游引物 5'-GGGTTTCTGCTACGTTGCTACT-3'; 下游引物 5'-GGAGGTGATTGCGAAGATAAAC-3'. Wnt3a: 上游引物 5'-TGAATTTGGAGGAATGGTCTCT-3'; 下游引物 5'-TGGGCACCTTGAAGTATGTGTA-3'. Wnt5a: 上游引物 5'-TCATGAACTTGCACAACAATGA-3'; 下游引物 5'-CCGTCTTAAACTGGTCATAGCC-3'; Lrp5: 上游引物 5'-CTGCTGGGGGACTTCATCTACTGGAC-3'; 下游引物 5'-GGGAGGAGTGGAACACCAGGATGTC-3'. Axin2: 上游引物 5'-GAGCCTGTCAACCCCTACTATG-3'; 下游引物 5'-TCCAACCTTTTCTTCAGCCTCTC-3'. Ctnnb1: 上游引物 5'-AACGGCTTTCGGTTGAGCTG-3'; 下游引物 5'-TGGCGATATCCAAGGGCTTC-3'. 将 18S 设为内参, 引物为: 上游引物 5'-GTCTGTGATGCCCTTAGATG-3'; 下游引物 5'-AGCTTATGACCCGCACTTAC-3'. 采用 ABI7500 定量 PCR 仪进行检测.

1.5 统计分析

所有结果以平均值±标准差表示, 统计分析采用 SPSS11.0 分析软件处理数据, 组间比较采用方差分析进行差异的显著性检验, 当 $p<0.05$ 时则认为组间有统计学差异.

2 结 果

2.1 长期有氧运动对老年大鼠骨骼的保护作用

如表 1 所示, 与青年组(Young)大鼠相比, 老年组(Old)大鼠体质量明显增加, 而肌肉中的柠檬酸合酶活性没有明显变化; 老年大鼠经过长期有氧运动(Old+EX)后, 体质量明显下降, 肌肉中的柠檬酸合酶活性明显增加.

与青年组大鼠相比, 老年组大鼠的股骨和 L2-5 段椎骨的骨密度(BMD)明显下降, 股骨的极限载荷和刚度明显降低; 老年大鼠经过长期有氧运动后, 股骨和 L2-5 段椎骨的骨密度, 股骨的极限载荷和刚度都得到明显增加.

表 1 长期有氧运动对老年大鼠骨骼的保护作用

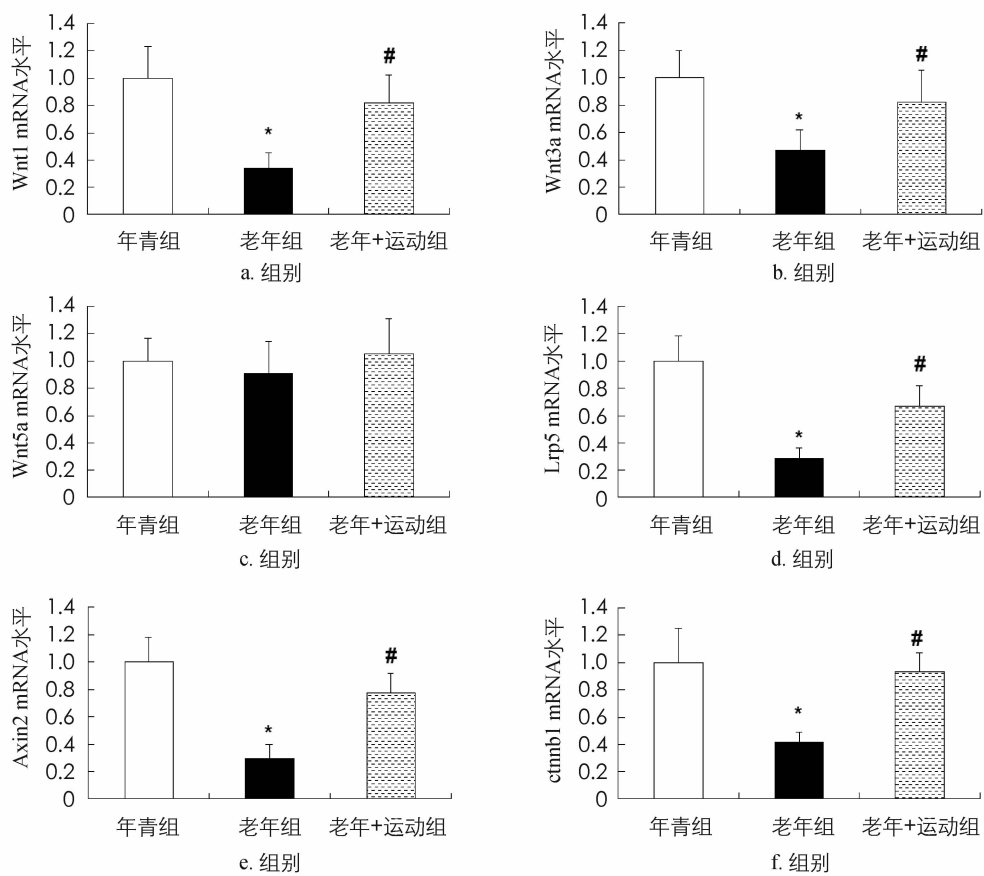
	青年组($n=9$)	老年组($n=8$)	老年+运动组($n=10$)
体质量/g	349±36	570±52 [*]	514±34 [#]
柠檬酸合酶活性/($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	14.8±3.4	14.0±4.1	21.8±4.7 [#]
股骨 BMD/($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	0.188±0.015	0.149±0.015 [*]	0.179±0.016 [#]
L2-5 椎骨 BMD/($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	0.210±0.026	0.170±0.016 [*]	0.191±0.019 [#]
股骨-极限载荷/N	217±32	161±22 [*]	199±28 [#]
股骨-刚度/($\text{N}\cdot\text{mm}^{-1}$)	496±52	384±41 [*]	425±48 [#]

注: ^{*} $p<0.05$ 与青年组对比; [#] $p<0.05$ 与老年组对比.

2.2 长期有氧运动激活股骨中 Wnt/ β -catenin 通路

如图 1 所示, 与青年组大鼠相比, 老年组大鼠的股骨中 Wnt1, Wnt3a, Lrp5, Axin2 和 ctnnb1 的 mRNA 水平明显降低, Wnt5a 的 mRNA 水平变化不明显; 老年大鼠经过长期有氧运动后, 股骨中 Wnt1,

Wnt3a, Lrp5, Axin2 和 ctnnb1 的 mRNA 水平得到明显增加.



注: * $p < 0.05$ 与青年组对比; # $p < 0.05$ 与老年组对比.

图 1 长期有氧运动上调股骨中 Wnt/ β -catenin 通路

3 讨 论

本研究发现老年大鼠骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路的诸多基因表达下调. 有研究发现^[8]老年人血清中 sclerostin (Wnt/ β -catenin 通路抑制剂) 水平相较于年轻人明显增加, 大鼠海马中衰老也可以诱导 Wnt/ β -catenin 通路进行性地下调^[9]. 同样在老年小鼠心脏组织中, 也发现 Wnt/ β -catenin 通路表达下调, 同时给予老年小鼠“限制饮食”治疗或者“白藜芦醇”治疗可以恢复心脏中 Wnt/ β -catenin 通路的表达^[10].

Wnt 蛋白家族由 19 种高度保守的分泌蛋白组成, 其组织分布颇为广泛, 在神经、骨骼、循环、消化、呼吸、生殖以及肌肉中均有表达, 参与器官发生、胚胎形成等过程; 而该通路的异常表达也参与了许多疾病的发生发展^[11]. 除了在衰老性骨质疏松中表达下调, Wnt/ β -catenin 通路的表达下调也出现在骨质疏松的相关疾病中, 包括绝经引起的骨质疏松^[12]、脊髓损伤诱导的下肢骨骨质丢失^[13]、神经切断术引起的骨质疏松^[14]、糖尿病伴发的骨质疏松^[15], 以及长期卧床引起的骨质疏松^[16]. Wnt/ β -catenin 通路作用机制为: Wnt 蛋白与细胞表面特异性受体卷曲蛋白 (frizzled, Fz) 和“辅助受体”-低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/6) 结合, 活化 Fz 受体, 通过骨架蛋白和酪蛋白激酶 1 传递信号, 活化由轴蛋白 (Axin)、结肠腺瘤性息肉病蛋白和糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 组成的复合物, 继而拮抗 GSK-3 β 对 β -catenin 的磷酸化和蛋白降解作用, 使胞质内 β -catenin 蛋白水平增加并移至核内, 调节下游靶基因的转录和表达^[17]. 在生长中的小鼠中, 激活 Wnt/ β -catenin 可以促进骨生成并抑制破骨细胞的发生^[18]. Wnt/ β -catenin 通路可以通过促进 OPG 的合成与分泌从而促进间质干细胞向成骨细胞分化并减少破骨细胞的分化^[19-20]. 而脂质体的 Wnt3a 可以重新恢复从年老动物取出的骨移植体的成骨能力^[21].

在抗阻运动与耐力运动这两种代表不同类型运动形式的对比研究中, 学者发现^[22]耐力运动相对于抗

阻运动对 Wnt 通路靶基因的表达效果更加明显,但是抗阻运动在对 β -catenin 影响过程中发挥作用更显著并能得到更多的理论支持和倾向。

在下坡跑与游泳运动对比研究中,学者发现^[23]二者都能够有效促进骨的形成,但是下坡跑的作用效果比游泳运动更加效果显著,其促进的机制是运动有效地上调了 Wnt/ β -catenin 信号通路中各类因子的 mRNA 表达,但是对于不同的运动形式对于 Wnt/ β -catenin 信号通路中各类因子基因表达的上调差异性尚没有清晰的、准确的和定论的研究。目前研究成果当中对于离心运动与 β -catenin 的结果显示^[24],一次性的离心运动能够降低 β -catenin 的磷酸化水平,该研究成果为骨骼肌的运动损伤康复措施奠定了新的理论基础。

在成年和老年小鼠中,跑台运动可以上调骨骼肌中 Wnt/ β -catenin 通路的表达,促进骨骼肌卫星细胞的转化^[25]。长期有氧运动也可以促进大鼠海马中 Wnt/ β -catenin 通路的活化^[26]。而本研究发现长期有氧运动可以恢复骨组织中 Wnt1, Wnt3a, Lrp5, Axin2 和 ctnnb1(即 β -catenin 的基因)的表达。我们的结果提示,有氧运动可以通过上调骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路的表达,最终有助于减轻由于衰老诱导的骨质疏松,该研究至少部分解释了在衰老性骨质疏松中长期有氧运动骨保护作用的潜在分子机制。

根据本文实验结果及前人研究成果,我们认为,长期有氧运动可以上调老年大鼠骨组织中 Wnt/ β -catenin 通路,最终有助于减轻或延缓老年大鼠的骨质丢失。

参考文献:

- [1] FANG E F, SCHEIBYE-KNDSSEN M, JAHN H J, et al. A Research Agenda for Aging in China in the 21st Century [J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 24(Pt B): 197—205.
- [2] KASSEM M, MARIE PJ. Senescence-Associated Intrinsic Mechanisms of Osteoblast Dysfunctions [J]. *Aging Cell*, 2011, 10: 191—197.
- [3] MARIE PJ, KASSEM M. Osteoblasts in Osteoporosis: Past, Emerging, and Future Anabolic Targets [J]. *Eur J Endocrinol* 2011; 165: 1—10.
- [4] MARIE PJ, KASSEM M. Extrinsic Mechanisms Involved in Age-Related Defective Bone Formation [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96: 600—609.
- [5] YEATER RA, MARTIN R B. Senile Osteoporosis. The Effects of Exercise [J]. *Postgrad Med*, 1984, 75: 147—159.
- [6] BODNAR M, SKALICKY M, VIIDIK A, et al. Interaction Between Exercise, Dietary Restriction and Age-Related Bone Loss in a Rodent Model of Male Senile Osteoporosis [J]. *Gerontology*, 2012, 58: 139—149.
- [7] SHANB A A, YOUSSEF EF1. The Impact of Adding Weight-Bearing Exercise Vversus Nonweight Bearing Programs to the Medical Treatment of Elderly Patients with Osteoporosis [J]. *J Family Community Med*, 2014, 21: 176—181.
- [8] ROFORTH M M, FUJITA K, MCGREGOR U I, et al. Effects of Age on Bone mRNA Levels of Sclerostin and Other Genes Relevant to Bone Metabolism in Humans [J]. *Bone*, 2014, 59: 1—6.
- [9] ORELLANA A M, VASCONCELOS A R, LEITE J A, et al. Age-Related Neuroinflammation and Changes in AKT-GSK-3 β and WNT/ β -CATENIN Signaling in Rat Hippocampus [J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7: 1094—111.
- [10] LI Q, HANNAH S S. Wnt/ β -Catenin Signaling is Downregulated But Restored by Nutrition Interventions in the Aged Heart in Mice [J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2012 Nov-Dec, 55: 749—754.
- [11] CLEVERS H1, NUSSE R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease [J]. *Cell*, 2012, 149: 1192—1205.
- [12] ZHENG X, WU G, NIE Y, et al. Electroacupuncture at the Governor Vessel and Bladder Meridian Acupoints Improves Postmenopausal Osteoporosis Through Osteoprotegerin/RANKL/RANK and Wnt/ β -catenin Signaling Pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10: 541—548.
- [13] WANG H D, SHI Y M, LI L, et al. Treatment with Resveratrol Attenuates Sublesional Bone Loss in Spinal Cord-Injured Rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170: 796—806.
- [14] LV J, SUN X, MA J, et al. Involvement of Periostin-Sclerostin-Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in the Prevention of Neurectomy-Induced Bone Loss by Naringin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468: 587—593.
- [15] PORTAL-NÚÑEZ S, LOZANO D, DE CASTRO L F, et al. Alterations of the Wnt/beta-Catenin Pathway and Its Target Genes for the N-and C-terminal Domains of Parathyroid Hormone-Related Protein in Bone from Diabetic Mice [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584: 3095—3100.
- [16] GAUDIO A, PENNISI P, BRATENGEIER C, et al. Increased Sclerostin Serum Levels Associated with Bone Formation

- and Resorption Markers in Patients with Immobilization-Induced Bone Loss [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: 2248—2253.
- [17] MACDONALD B T, TAMAI K, HE X. Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17: 9—26.
- [18] CHEN J, LONG F. β -Catenin Promotes Bone Formation and Suppresses Bone Resorption in Postnatal Growing Mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28: 1160—1169.
- [19] RODDA S J, MCMAHON A P. Distinct roles for Hedgehog and Canonical Wnt Signaling in Specification, Differentiation and Maintenance of Osteoblast Progenitors [J]. *Development*, 2006, 133: 3231—3244.
- [20] GLASS D A 2nd, BIALEK P, AHN J D, et al. Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation [J]. *Dev Cell*, 2005, 8: 751—764.
- [21] LEUCHT P, JIANG J, CHENG D, et al. Wnt3a Reestablishes Osteogenic Capacity to Bone Grafts from Aged Animals [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95: 1278—1288.
- [22] 许迎迎. 运动对 PS1/PS2 敲除小鼠骨骼肌 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响探究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2015.
- [23] 朱 鹤. 不同方式运动对生长期小鼠 Wnt/ β -catenin/Runx2 信号通路的影响研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2013.
- [24] 史冀鹏, 徐红旗, 张学林, 等. 一次性离心运动及针刺对大鼠骨骼肌 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. *北京体育大学学报*, 2012, 35(10): 56—62.
- [25] FUJIMAKI S, HIDAKA R, ASASHIMA M, et al. Wnt Protein-Mediated Satellite Cell Conversion in Adult and Aged Mice Following Voluntary Wheel Running [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 7399—7412.
- [26] BAYOD S, MENNELLA I, SANCHEZ-ROIGE S, et al. Wnt Pathway Regulation by Long-Term Moderate Exercise in Rat Hippocampus [J]. *Brain Res*, 2014, 1543: 38—48.

Chronic Aerobic Exercise Training Activates Skeletal Wnt/ β -catenin Pathway in Aged Rats

WANG Bing¹, DUAN Fu-gui²

1. School of Physical Education, Xi'an Technological University, Xi'an 710032, China

2. Physical Education Department of Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo Henan 454000, China

Abstract: The aim of this paper is to investigate the role of Wnt/ β -catenin pathway in chronic aerobic exercise-induced attenuation of osteoporosis in aged rats. Male rats have randomly been divided into three groups as follows: 1) sedentary young group (Young, as control group); 2) sedentary old group (Old); and 3) exercised-trained old group (Old+EX). Exercise for the treadmill exercise for 12 weeks. In this work, chronic aerobic exercise training in aged rats prevented the reduction of bone mineral density of femurs and L2-5 vertebra and preserved mechanical strength including ultimate load and stiffness in femurs. Interestingly, chronic aerobic exercise in aged rats unregulated mRNA expression of Wnt1, Wnt3a, Lrp5, Axin2, and ctnnb1 in femurs. It is concluded that chronic aerobic exercise training ameliorated senior osteoporosis in aged rats via activating Wnt/ β -catenin pathway, at least in part.

Key words: aerobic exercise, aged rats, Wnt/ β -catenin pathway, senior osteoporosis

责任编辑 胡 杨