

肌肉生长抑制素基因多态性与肌肉生长敏感性的关联*

李 晓¹, 刘丽红², 马力宏³

Association of myostatin polymorphism with sensitivity to muscular growth

Li Xiao¹, Liu Li-hong², Ma Li-hong³

Abstract

BACKGROUND: The myostatin plays an important role in the regulation of muscular growth in human body, however, there is few study regarding this gene in Chinese populations.

OBJECTIVE: To elucidate the association of growth differentiation factor 8 (GDF-8) gene polymorphism and human muscles through the observation of the *Alu I* restriction site of GDF-8 gene polymorphism.

METHODS: A total of 92 undisciplined male students, of Han population, received strength training for 8 weeks at Tianjin University of Sport, three days a week. The thickness of the biceps and quadriceps was measured with the ultrasonic B test before and after exercise. The body fat, lean body weight, body weight and height were also measured before and after the exercise, as well as the difference of *Alu I* restriction site of GDF-8 gene polymorphism. The length of fragments containing *Alu I* site was 135 bp after primer amplification, and defined as A. after *Alu I* restriction enzyme digestion, the allele containing *Alu I* site appeared fragments at 80 and 55 bp, defining as T. Thus three genotypes emerged, namely AA, AT and TT.

RESULTS AND CONCLUSION: From the morphologic index, the height, weight, lean body weight, muscle thickness, the biceps and quadriceps muscle diameter of the males at *Alu I* site A/T heterozygote and T/T homozygote were significantly high than those at A/A homozygote ($P < 0.05$ or 0.01). The *Alu I* polymorphism at GDF-8 gene loci is associated with the weight, height and lean body weight. The allele T is the congenital sensitive factor for the muscular growth.

¹Department of Physical Education, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454152, Henan Province, China; ²Basic Medical College of Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China; ³Department of Sport Physiology, Tianjin University of Sport, Tianjin 300381, China

Li Xiao★, Master, Lecturer, Department of Physical Education, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454152, Henan Province, China
jzszlx@gmail.com

Correspondence to: Liu Li-hong, Master, Basic Medical College of Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China
liulihong0416@163.com

Received: 2011-02-05
Accepted: 2011-05-19

¹焦作师范高等专科学校体育系, 河南省焦作市454152; ²大连医科大学基础医学院, 辽宁省大连市116044; ³天津体育学院运动人体科学系, 天津市300381

李晓★, 男, 1979年生, 河南省南阳市人, 汉族, 2006年天津体育学院毕业, 硕士, 讲师。
jzszlx@gmail.com

通讯作者: 刘丽红, 硕士, 大连医科大学基础医学院, 辽宁省大连市116044
liulihong0416@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2011)28-05262-03

收稿日期: 2011-02-05
修回日期: 2011-05-19
(20100902016WJ-Y)

Li X, Liu LH, Ma LH. Association of myostatin polymorphism with sensitivity to muscular growth. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(28): 5262-5264. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 肌肉生长抑制素(growth differentiation factor 8, GDF-8)基因在人类中对于调节肌肉生长起重要的作用。但关于中国人该基因的研究甚少。

目的: 实验从肌肉生长抑制素基因多态性*Alu I* 酶切位点限制性酶切位点入手, 观察GDF-8基因多态性与人体肌肉生长的关联。

方法: 选取天津体育学院无训练汉族学生92名, 进行为期2个月的力量训练, 用B超测定运动前后肱二头肌和股四头肌的肌肉厚度。测试训练前后形态学各指标包括身高、体质量、体脂肪含量、瘦体质量的变化、运动前后肱二头肌和股四头肌的肌肉厚度变化趋势以及在GDF-8 *Alu I* 酶切位点限制性酶切位点上的差异。含*Alu I* 位点片段由引物扩增后长度为135 bp, 定义为A, 经*Alu I* 限制性酶切割后, 含有*Alu I* 酶切位点的等位基因出现80, 55 bp的片段, 定义为T, 这样即出现3种基因型AA, AT和TT。

结果与结论: 从形态学指标上受试者群体在*Alu I* 位点上A/T杂合子及T/T纯合子在身高, 训练前后的体质量, 瘦体质量, 肌肉厚度和肱二头肌及股四头肌直径厚度上均高于A/A纯合子($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果证实, *Alu I* 位点多态性与人体身高, 体质量及瘦体质量关联, 等位基因T为肌肉生长的先天敏感因子。

关键词: 肌肉肥大; 肌肉生长抑制素; 力量训练; 基因多态性; 关联研究
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.28.033

李晓, 刘丽红, 马力宏. 肌肉生长抑制素基因多态性与肌肉生长敏感性的关联[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5262-5264. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肌肉生长抑制素 (growth differentiation factor 8, GDF-8) 属转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)超家族^[1-4]。Markus等^[5]提供了大量证据来说明myostatin基因在人类中对于调节肌肉起着重要的作用。

实验在群体水平上, 观察普通高校无训练组GDF-8 *Alu I* 酶切位点的不同等位基因分布频率的差异, 以期验证普通人群在调控肌肉生长抑制素蛋白表达的DNA序列是否具有特异

性; 在个体水平上, 探究运动后GDF-8基因是否与人体肌肉的关联性。

1 对象和方法

设计: 基因多态性, 关联研究。

时间及地点: 于2005-09/2006-05在天津体育学院运动医学研究所实验室完成。

对象: 选取天津体育学院本科汉族学生92名, 年龄18~22岁。

纳入标准: 受试者近1年内无力量训练史。无其他身体疾病。

排除标准: 近1年内进行过力量锻炼者。

根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》^[6], 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。

实验方法: 通过对92名中国高校汉族学生进行8周力量训练, 并测定训练前后体成分及运用B超测定运动前后左测肱二头肌和股四头肌的肌肉厚度, 观察肌肉生长抑制素基因 Alu I 酶切位点与力量训练对肌肉生长敏感度之间是否存在某种关联。

GDF-8基因多态性的RT-PCR检测: 收集受试者静脉血, 提取白细胞制备模板DNA: 由大连宝生物公司全血总DNA提取专用试剂盒提取。引物序列由大连宝生物公司合成。

引物序列: F1, 5' -CCT GTT TAT GCT GAT TGT TG-3'; F2, 5' -TAC TGA GGA TTT GTA CTT AAT AG -3'。GDF-8基因 Alu I 酶切位点分析: 30 μ L反应体系: 引物各10 pmol, 基因组DNA 2 μ L, Taq DNA聚合酶1 U, 10 \times buffer 3 μ L, $MgCl_2$ 3 μ mol/L, dNTPs各0.01 μ mol, 补灭菌双蒸水至 30 μ L。

扩增参数: 预变性96 $^{\circ}C$ 10 min, 变性94 $^{\circ}C$ 1 min, 退火55 $^{\circ}C$ 1 min, 延伸72 $^{\circ}C$ 30 s, 循环30次, 终末延伸72 $^{\circ}C$ 7 min。酶切产物检测: 将酶切产物加于含有质量浓度0.5 mg/L溴化乙锭的3%琼脂糖凝胶胶孔内, 以100 V电压电泳50 min, 以50 bp DNA Ladder Markers作为片段长度标志, 于凝胶成像仪下观察结果并拍照。

实验抗阻训练组运动: 准备活动采用跑步机热身, 强度不易过大, 整理活动采用放松走。前2周运动量和强度稍低, 并分别测试和制定出参加抗阻训练的受试者各自合适的训练负荷。每次抗阻训练包括3个不同动作, 前4周每个动作重复8~12次为一组, 后4周组每个动作重复4~8次为一组, 间歇一两分钟。如果受试者在每次运动的最后一组中能完成某动作12 RM以上, 则考虑增加此动作的训练负荷, 每次增加2.5%~5.0%的负荷量。

主要观察指标: 受试者训练前后形态学各指标包括身高、体质量、体脂肪含量及瘦体质量的变化趋势, 运动前后肱二头肌和股四头肌的肌肉厚度变化。

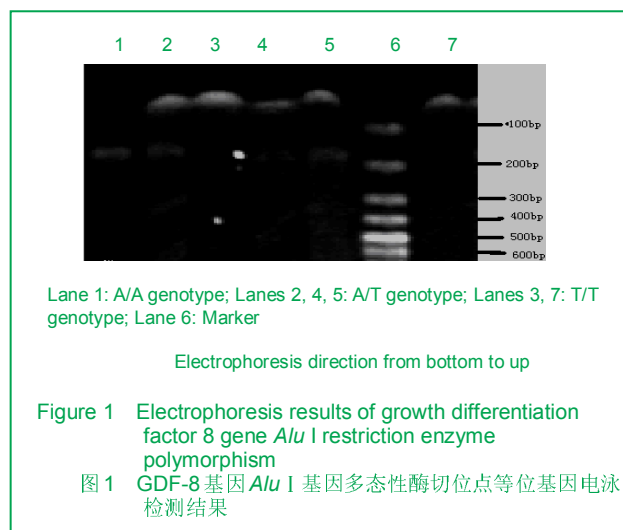
统计学分析: 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用SPSS 11.5统计学软件进行数据分析, 等位基因频率、基因型频率经过Hardy-Weinberg平衡检测, 确定所选受试者的群体代表性。组间数据差异比较采用单因素方差分析。组间等位基因频率基因型分布差异采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 受试者数量分析 纳入对象92人, 均进入结果分

析, 无中途退出者。

2.2 GDF-8基因 Alu I 酶切位点分析 GDF-8基因多态性位点位于GDF-8基因第1外显子 Alu I 位点。含 Alu I 位点片段由引物扩增后长度为135 bp, 定义为A, 经 Alu I 限制性酶切割后, 含有 Alu I 酶切位点的等位基因出现80 bp, 55 bp的片段, 定义为T, 这样出现3种基因型AA、AT和TT, 见图1。



Alu I 位点等位基因频率: A: 0.926, T: 0.074; 基因型: A/A: 81人, A/T: 12人, T/T: 1人。经计算 Alu I 位点等位基因和基因频率分布在所选无训练人群中的分布符合Hardy-Weinberg平衡, 结果说明: 所选受试者具有群体代表性。 Alu I 位点: 在整个群体AA纯合子群体占86.17%, AT杂合子群体占12.77%, TT纯合子群体占1.06%。等位基因A占92.6%, 等位基因A占7.4%。经计算整个群体 $\chi^2=0.159$, $P=0.92$ 。

2.3 GDF-8基因 Alu I 酶切位点与形态学指标的关联见表1。

表1 GDF-8基因 Alu I 基因多态性与形态学指标比较
Table 1 Comparison of anthropometric phenotypes and growth differentiation factor 8 gene Alu I genotypes ($\bar{x}\pm s$)

Index	Genotype		P
	A/A (n=18)	A/T T/T (n=13)	
Height (cm)	172.52 \pm 6.47	176.63 \pm 6.63 ^a	0.037
Age (yr)	22.05 \pm 2.05	22.31 \pm 1.75	0.668
Weight (kg)	Pre-test	65.26 \pm 7.10	76.15 \pm 9.96 ^b
	Post-test	65.32 \pm 7.15	75.74 \pm 9.16 ^b
BF (%)	Pre-test	8.00 \pm 0.03	7.00 \pm 0.02
	Post-test	9.00 \pm 0.02	7.00 \pm 0.05
LBW (kg)	Pre-test	60.21 \pm 6.56	70.62 \pm 8.24 ^b
	Post-test	59.74 \pm 4.32	71.66 \pm 2.81 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. genotype A/A. BF: percent of body fat; LBW: lean body weight

A/T杂合子及T/T纯合子在身高, 训练前后体质量及瘦体质量方面显著高于A/A纯合子($P < 0.05$ 或

$P < 0.01$)。

2.4 GDF-8基因多态性与训练前后肌肉生长横截直径增长指标的关联 A/T杂合子及T/T纯合子在训练前后肌肉厚度增加上显著高于A/A纯合子($P < 0.05$)，其在训练前后肱二头肌及股四头肌直径厚度上AT杂合子及TT纯合子非常显著高于AA纯合子($P < 0.01$)。见表2。

表2 GDF-8 基因 *Alu* I 多态性与训练前后肌肉生长横截直径增长指标的关联
Table 2 Association of *Alu* I polymorphism and muscular diameter ($\bar{x} \pm s$, cm)

Index	Genotype		P
	A/A (n=81)	A/T T/T (n=13)	
Biceps Pre-test	1.83±0.33	2.30±0.37 ^a	0.000
Biceps Post-test	1.98±0.34	2.59±0.32 ^a	0.000
Quadriceps Pre-test	3.76±0.70	4.58±0.76 ^a	0.000
Quadriceps Post-test	3.90±0.70	4.83±0.68 ^a	0.000
Biceps difference	0.15±0.09	0.29±0.21 ^b	0.030
Quadriceps difference	0.14±0.08	0.25±0.20	0.067

^b $P < 0.01$, ^a $P < 0.05$, vs. genotype A/A. Difference: difference of post-test diameter to pre-test diameter

3 讨论

实验对于GDF-8两个多在位点进行在年龄身高体质量等形态学指标上进行研究，并发现在*Alu* I位点上A/T杂合子及T/T纯合子在身高显著高于A/A纯合子；体质量在训练前后A/T杂合子及TT纯合子非常显著于A/A纯合子；并且在训练前后瘦体质量A/T杂合子及T/T纯合子也非常显著于A/A纯合子。以上结果表明：*Alu* I位点多态性与人体身高体质量以及瘦体质量相关联。另外，由于实验所选群体均为青年人，正处于骨骼发育基本完成阶段。从另一个侧面反映出*Alu* I位点多态性与峰骨密度关联。*Alu* I位点多态性与人体瘦体质量关联。LBW指标可相对反映出人体肌肉质量，依据实验结果A/T杂合子及T/T纯合子也非常显著高A/A纯合子群体。实验由此推测，人体骨骼肌形态特征可能受控于GDF-8基因^[7-11]。

实验在群体水平上，观察普通高校学生GDF-8 *Alu* I酶切位点限制性酶切位点的不同等位基因分布频率是否存在显著性差异，以其验证普通人群在调控肌肉生长抑制素蛋白表达的DNA序列是否具有特异性。得出了相对而言*Alu* I酶切位点A/T杂合子及T/T纯合子在整体水平上肌肉的厚度显著高于A/A纯合子，表明等位基因T为肌肉生在先天敏感因子，可以作为肌肉型运动员初期选材的候选基因^[7-11]。

实验首次证实，中国汉族人群GDF-8基因多态性与训练对肌肉生长影响的关联。实验虽未发现GDF-8基因

多态性与人体的肌肉生长有着关联，但是从肌肉先天厚度而言，等位基因T可为敏感因子，此位点很可能成为运动员选材候选基因。从实验结果可以看出，对于健美运动员及力量型运动员的选材方面将是一个很好的参考指标，若GDF-8基因多态性与人体肌肉生长确实存在着某种关联，这将对肌肉萎缩患者提供一种更先进的治疗理念，即基因疗法，当然这些必然依靠于对GDF-8基因多态性进一步地深入研究。

4 参考文献

- [1] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*. 1997; 387(6628):83-90.
- [2] Massagué J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.
- [3] Szabó G, Dallmann G, Müller G, et al. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mammalian Genome*. 1998;9(8):671-672.
- [4] Langley B, Thomas M, McFarlane C, et al. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res*. 2003;286(2):263-275.
- [5] Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2682-2688.
- [6] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.
- [7] He ZH, Ma LH, Cheng L, et al. *Zhongguo Yundong Yixue Zazhi*. 2001;20(3):236-239.
何子红, 马力宏, 程林, 等. 单纯性肥胖儿童最大有氧能力与Fg基因多态性的关联研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2001, 20(3):236-239.
- [8] Li L, Ma WL. *Zhongguo Shengwuxuaxue yu Fenzishengwu Xuebao*. 2000;16(2):151-155.
李凌, 马文丽. DNA芯片技术研究进展[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(2):151-155.
- [9] Yang Z, Zhang J, Cong H, et al. A retrovirus-based system to stably silence GDF-8 expression and enhance myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *J Gene Med*. 2008;10(8):825-833.
- [10] Qiao C, Li J, Jiang J, et al. Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. *Hum Gene Ther*. 2008;19(3):241-254.
- [11] Foster K, Graham IR, Otto A, et al. Adeno-associated virus-8-mediated intravenous transfer of myostatin propeptide leads to systemic functional improvements of slow but not fast muscle. *Rejuvenation Res*. 2009;12(2):85-94.

来自本文课题的更多信息一

作者贡献: 李晓进行实验设计, 实验实施为李晓, 实验评估为马力宏, 资料收集为刘丽红, 刘丽红和李晓对文章负责。

致谢: 天津体育学院陈家琦教授、张勇教授、文立老师等对实验提出了宝贵的意见和建议, 在此表示衷心的感谢。实验是在天津体育学院运动人体科学实验室张薇老师、徐冬青老师、赵斐老师的指导和协助下完成的, 同时得到了体育学院实验中心刘亚军老师、刘庆凯老师、万发桃老师和张燕君老师的大力协助, 在此对他们提供的诸多便利条件和帮助一并致谢。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》, 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。