



反复力竭运动后大鼠骨骼肌线粒体超微结构改变及维生素E的保护作用

高强度训练可导致肢体肿胀,甚至肌筋膜间室综合征的发生,提示了不适应性运动肌细胞炎性坏死的存在。Daniel [1] 1997年报道了大鼠力竭运动后,运动肌肉组织内有中性粒细胞积聚,髓过氧化物酶(MPO)活性升高,证实了肌肉炎性坏死的存在。

维生素E作为一种抗氧化剂,具有清除自由基的功效,可减轻运动中抗氧化酶所受的自由基损伤,减缓疲劳出现,从而提高运动能力[2][3][4][5]。一些国外学者认为维生素E除了其抗氧化特性外,对运动机体尚有多重保护作用,如通过对生物膜的稳定性和完整性的维持,减少力竭运动动物的骨骼肌细胞损伤,提高运动能力。但以往研究都未进一步揭示运动后骨骼肌形态学的改变情况,本实验建立大鼠股四头肌反复力竭离心收缩模型,通过观察大鼠股四头肌及骨骼肌线粒体超微结构的改变,以探讨反复力竭后运动骨骼肌线粒体损伤及维生素E对骨骼肌的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

实验用雄性SD大鼠30只,8周龄,体质量(200±10)g,由中山医学院实验动物中心提供。大鼠购回后筛选具有正常跑台下坡跑能力的参加分组。标准齿类动物饲料喂食,自由饮食,动物室温度22~28℃,相对湿度45%~55%。30只大鼠随机分为安静对照组、力竭对照组、维生素E组3组,每组10只。给药剂量与方式:维生素E组大鼠每只给予维生素E 6 mg/d,药物配成1 ml混合剂,灌胃方式给药。对照组每天予以生理盐水1 ml灌胃,持续30 d。运动期间继续服药。

1.2 运动模型

给药30 d后,力竭对照组、维生素E组大鼠每日在电动动物跑台上进行持续下坡跑运动力竭模型:力竭训练采用Bedford(1979)据鼠体重/摄氧量回归方程所建立的渐增负荷运动模型(下坡跑)。第一级负荷:0°, 8.2 m/min, 15 min(相当于53%V_{O2}max);第二级负荷:5°, 15 m/min, 15 min(相当于64%V_{O2}max);第三级负荷:10°, 19.3 m/min, 15 min(相当于76%V_{O2}max),持续运动至力竭。运动中使用光、电、声刺激维持运动强度。力竭标准:第三级负荷运动中,动物未能坚持本级复合运动跑速,先后滞跑道后1/3处达三次以上,刺激驱赶无效。行为特征为:呼吸急深,幅度大,腹卧位,垂头,刺激后无反应。参加训练的每只大鼠周一到周五每天训练1次,周六、日休息,训练4周后继续训练2 d,共训练1个月。实验用PT98型电动动物跑台2部,由杭州立泰科技有限公司提供,该跑台可自动记录大鼠训练时间,运动距离和跑动速度,跑台倾斜角度可调。

1.3 实验方法

电镜超薄切片的制备:大鼠末次运动后即刻断头处死,迅速切取左侧股四头肌深层少量肌组织,锐利眼科剪将标本剪成2 mm×2 mm×2 mm左右的骨骼肌组织方块,依次用4℃的2.5%戊二醛专用电镜固定液固定,0.1 mol/L PBS缓冲液洗涤2次,1%锇酸后固定30~60 min,常规电镜样品制备程序脱水、渗透、包埋、

超薄切片、铀铅染色。该过程在广州医学院电镜室指导下完成。

2 结果

在透射电镜下，正常哺乳动物骨骼肌肌丝排列整齐，肌节结构完整(图1)，线粒体成对附于I盘两侧，即成对明带线粒体，在20 000倍透射电镜下，可见正常线粒体呈椭圆形，外膜完整，嵴为隔板状，与线粒体长轴垂直，内膜内基质电子密度均匀(图2)。力竭对照组大鼠肌丝杂乱、溶解，无明显完整的肌节结构(图3)，提示大量坏死，线粒体近圆形，水肿，大量空泡变性，外膜薄、厚度不均，嵴大量缺失，无与线粒体长轴垂直的隔板状嵴，基粒脱落，基室内电子密度不均(图4)。维生素E组骨骼肌超微结构接近于安静对照组，肌丝、肌节整齐完整(图5)，线粒体正常(图6)。

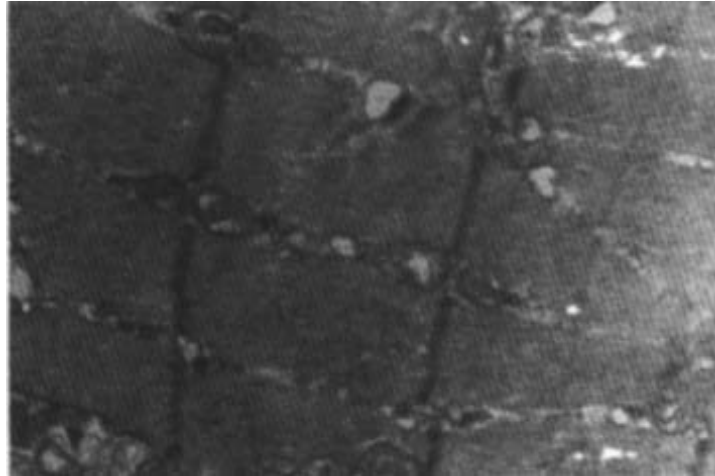


图1 安静对照组，股四头肌纵切，肌节结构正常，肌丝排列有序，并可见成对明带线粒体（原放大倍数： $\times 13\ 000$ ）

Fig.1 Transmission electron microscopic observation of the skeletal muscle cells of rats without exercise (Original magnification: $\times 13\ 000$)

In the longitudinal section of the quadriceps femoris muscle, normal myotomes and myofilaments can be seen with paired I-band mitochondria which are structurally intact

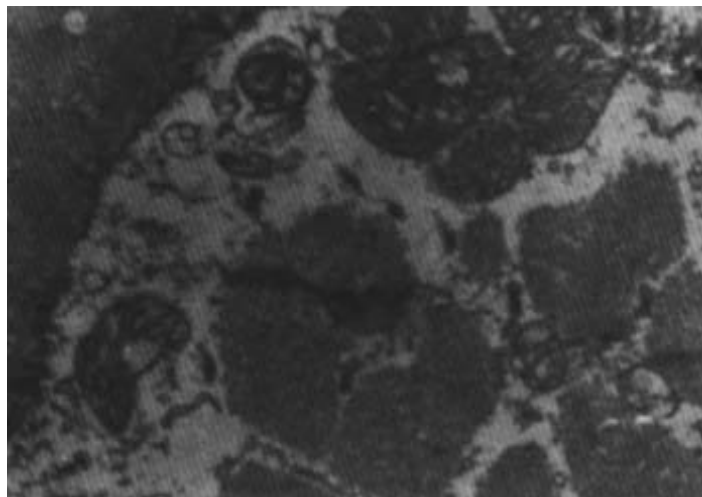


图2 安静对照组，示结构完整的线粒体，外膜完整，嵴为隔板状，与线粒体长轴垂直（原放大倍数： $\times 20\ 000$ ）

Fig.2 Transmission electron microscopic observation of the skeletal muscle cells of rats without exercise (Original magnification: $\times 20\ 000$)

The mitochondria are structurally intact with undisrupted membrane clapboard-like crista perpendicular with the longitudinal axial of the mitochondria

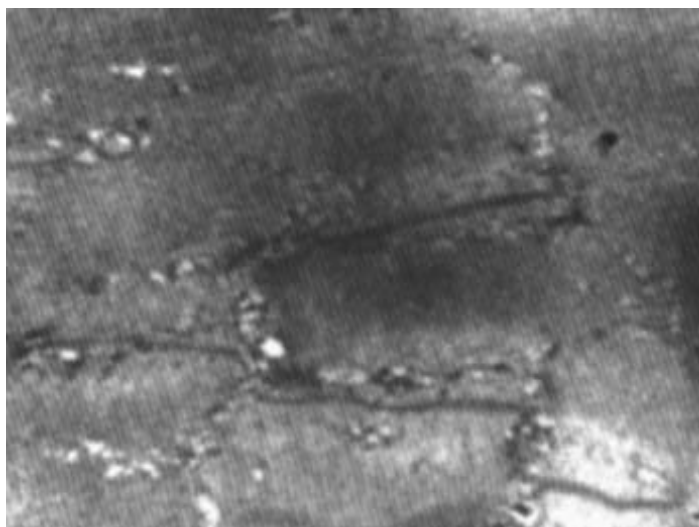


图3 力竭对照组，股四头肌纵切，可见肌节紊乱，溶解（原放大倍数： $\times 13\ 000$ ）

Fig.3 Transmission electron microscopic observation of the skeletal muscle cells of rats with exhausting exercise without vitamin E treatment (Original magnification: $\times 13\ 000$)

In the longitudinal section of the quadriceps femoris muscles, the myotomes are confusing arranged, with some myofilaments undergo lysis

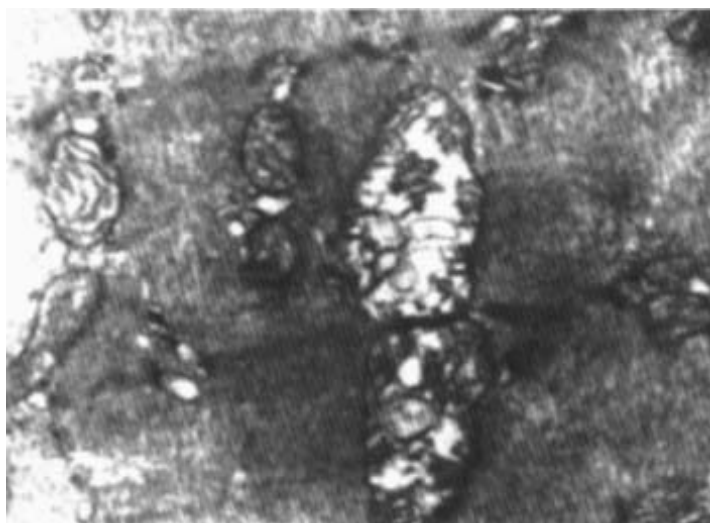


图4 力竭对照组，示线粒体肿胀，水性变及空泡化，内膜、嵴破坏溶解改变（原放大倍数： $\times 20\ 000$ ）

Fig.4 Transmission electron microscopic observation of the skeletal muscle cells of rats with exhausting exercise without vitamin E treatment (Original magnification: $\times 20\ 000$)

Swollen mitochondria that undergo vacuolar changes can be seen with disrupted and lysed intima and crista

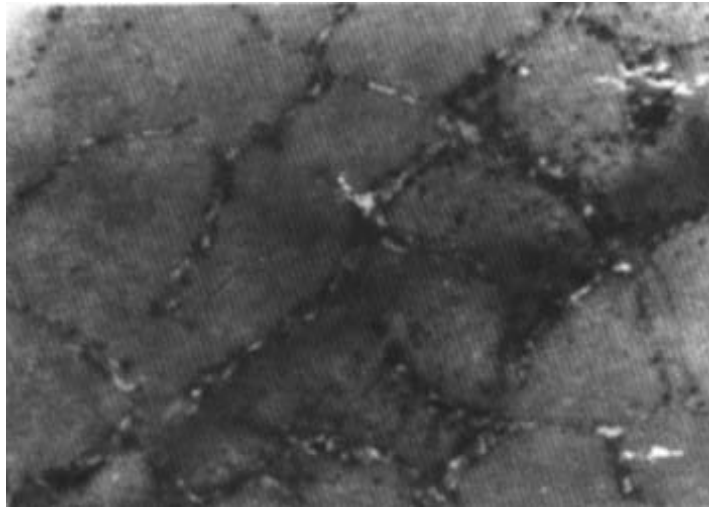


图5 维生素E组，股四头肌纵切，肌节结构基本正常（原放大倍数： $\times 13\ 000$ ）

Fig.5 Transmission electron microscopic observation of the skeletal muscle cells of rats with exhausting exercise and vitamin E treatment (Original magnification: $\times 13\ 000$)
In the longitudinal section of the quadriceps femoris muscle, the myotomes and myofilaments remains roughly normal

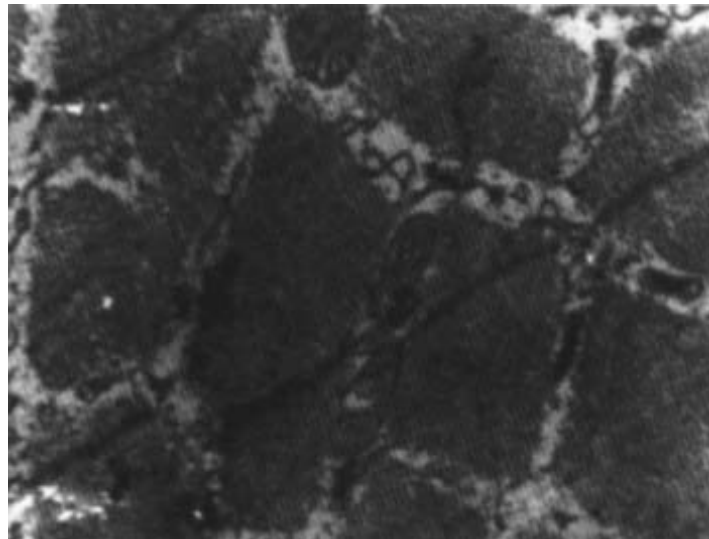


图6 维生素E组，示结构完整的线粒体，肌丝完整，肌原纤维排列整齐，分布正常（原放大倍数： $\times 16\ 000$ ）

Fig.6 Transmission electron microscopic observation of the skeletal muscle cells of vitamin E-treated rats with exhausting exercise (Original magnification: $\times 16\ 000$)
The mitochondria, myotomes and myofilaments are roughly normal

3 讨论

高强度训练，特别是反复力竭离心收缩可导致骨骼肌细胞坏死丢失。运动致骨骼肌损伤的机制是多因素的，目前的研究并未完全阐明这些机制，其中既有生理生化环境改变的影响，也有机械力学对骨骼肌细胞的直接损伤作用[1][6][7]。急性运动可诱发内源性的自由基产生增加和脂质过氧化反应增强，造成对生物膜包括线粒体膜结构的损伤，这可能与运动性损伤和疲劳的形成有关。运动机体为适应环境，可产生较多的清除活性氧自由基的酶类，较为典型的有SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等，其中最关键的酶为SOD。余斌等[8]报道，口服维生素E可显著提高大鼠骨骼肌SOD活性，降低脂质过氧化水平和线粒体游离钙浓度，提高线粒

体膜稳定系数, 进一步增加骨骼肌质量、大鼠体重和提高运动能力, 说明维生素E可增强细胞线粒体抗氧化酶活性, 有效减轻氧化应激对骨骼肌细胞的损伤, 国内外一些学者认为维生素E的抗氧化作用抑制了运动中自由基的生成而间接保护了细胞膜的稳定性, 从而减少了Ca²⁺的内流[9]。

线粒体作为细胞的能量工厂, 是内源性自由基的主要产生部位, 也是自由基的主要攻击部位之一, 其功能状态对细胞功能有着重要影响, 线粒体膜受损后, 线粒体发生肿胀, 水性变, 空泡化, 并不可避免地向坏死转化, 细胞的死亡和凋亡一般都始于线粒体的改变[10]。实验中的电镜图片显示: 正常的骨骼肌线粒体外膜完整, 基质均匀, 嵴为隔板状, 与线粒体长轴垂直, 在骨骼肌纵向切片上可表现为特征的明带成对线粒体, 同时骨骼肌肌丝排列整齐, 肌节结构完整, 而力竭对照组大鼠的股四头肌细胞线粒体出现肿胀, 水性变及空泡化, 内膜、嵴破坏溶解改变, 肌细胞大量坏死, 肌丝杂乱、溶解, 无明显完整的肌节结构, 充分说明了反复力竭运动对骨骼肌线粒体的损伤作用, 同时维生素E组大鼠并未出现力竭对照组的这种线粒体的改变, 同时保持完整的肌细胞结构, 充分说明了口服维生素E对骨骼肌的保护作用, 维生素E保护大鼠线粒体膜的稳定性的原因可能是增强线粒体SOD活性, 消除了更多的自由基, 减少了运动中的氧化应激, 从而减轻了脂质过氧化; 脂质过氧化作用的减弱使线粒体膜更加稳定, 线粒体膜的稳定抑制了骨骼肌线粒体游离钙的聚积, 进一步抑制脂质过氧化作用。而脂质过氧化作用的减弱对维持线粒体膜的正常通透性和线粒体的正常生理功能是非常重要的, 因此, 维生素E通过保持线粒体的正常功能状态, 减少了运动中因氧化应激导致骨骼肌细胞的坏死丢失, 这对维持大鼠的肌肉质量和运动能力, 延缓运动性疲劳的产生, 具有重要意义。

一般认为, 维生素E具有抗氧化及促进蛋白质的合成和防止肌肉萎缩等生物作用, 可提高肌肉力量和运动能力[11]。余斌等[8]的实验表明口服维生素E进行反复力竭运动的大鼠体质量和单侧股四头肌湿质量均显著高于力竭对照组, 但这并不能充分说明维生素E的摄入增加促进了蛋白质的合成, 进而提高运动能力。国外一些学者认为维生素E的衍生物普遍参与了质膜的组成, 维生素E可增强肌纤维膜、线粒体膜和肌浆网的完整性、稳定性, 防止肌浆网内Ca²⁺的大量溢出引发骨骼肌的损伤[12], 运动中抗氧化物质的大量消耗使维生素E处于负代偿, 因此补充维生素E可减少运动损伤。

本实验从形态学上证实了反复力竭运动后大鼠骨骼肌细胞发生坏死, 口服维生素E可有效防止运动骨骼肌这种坏死丢失, 这可能与骨骼肌细胞对线粒体抗氧化功能的提高作用和对线粒体的保护作用有关, 维生素E对运动机体保护的具体机制, 还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Daniel AR, Timothy S, Booker AN, et al. Striated muscle calcium- stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise [J]. Pflügers Arch Eur J Physiol, 1998, 435(8): 804-9.

[2] 杜 华, 丁振华. 紫外线B抑制人角质细胞生长及维生素E的保护作用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 326-8.

Du H, Ding ZH. Human keratinocyte growth inhibition by ultra- violet B and the protective effect of vitamin E [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 326-8.

[3] 冀亚琦, 朱 平, 童 健, 等. 缺血预适应对未成熟大鼠心肌线粒体及能量代谢的影响[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 22-4.

Ji YQ, Zhu P, Tong J, et al. Protective effects of ischemic preconditioning on mitochondria and energy metabolism in immature rat myocardial cells against subsequent ischemia and reperfusion [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(1): 22-4.

[4] 林劲秋, 李亚洁. 维生素及其临床营养治疗[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(12): 947-9.

[5] 周 筠, 叶仁清, 蔡德鸿, 等. 雌、孕激素对去卵巢大鼠肝脏维生素D受体mRNA表达的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 521-3.

Zhou Y, Ye RQ, Cai DH, et al. Effect of estrogen and progesteron on the expression of

1, 25-dihydroxyvitamin D receptors mRNA in the liver of ovariectomized rats[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 521-3.

[6] Marco S. Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophic-deficiency muscle of mice [J]. J Neu Exp Neurol, 1997, 56(1): 45-57.

[7] Jyrki K, Timo ES, Takala HK, et al. The disruption of myofibril structures in rat skeletal muscle after forced lengthening contractions[J]. Pflügers Arch Eur J Physiol, 1998, 436(6): 735-41.

[8] 余斌, 覃承诃, 罗吉伟, 等. 抗氧化维生素对大鼠运动能力的影响[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 892-4.

Yu B, Qin CH, Luo JW, et al. Effect of antioxidant vitamins on the exercise performance of rats[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 892-4.

[9] 张宜龙, 陈吉棣. 牛磺酸对大鼠急性运动后自由基代谢、膜流动性及钙转运变化的影响[J]. 中国运动医学杂志, 1999, 18(1): 17-21.

Zhang YL, Chen JD. Effects of taurine on free radicals metabolism, membrane fluidity and calcium transfer after acute exercise in rats[J]. Chin Sports Med J, 1999, 18(1): 17-21.

[10] 程时. 生物膜与医学 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 11-2.

[11] 林文弢. 运动生物化学[M]. 北京: 人民体育出版社, 1999. 39-43.

[12] Amelink WA, van der Wal JH, Wokke BS, et al. Exercise-induced muscle damage in the rat: the effect of vitamin E deficiency[J]. Pflügers Arch Eur J Physiol, 1991, 419(3): 304-9.

参考文献:

[1] Daniel AR, Timothy S, Booker AN, et al. Striated muscle calcium-stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise [J]. Pflügers Arch Eur J Physiol, 1998, 435(8): 804-9.

[2] 杜华, 丁振华. 紫外线B抑制人角质细胞生长及维生素E的保护作用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 326-8.

Du H, Ding ZH. Human keratinocyte growth inhibition by ultra-violet B and the protective effect of vitamin E [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 326-8.

[3] 冀亚琦, 朱平, 童健, 等. 缺血预适应对未成熟大鼠心肌线粒体及能量代谢的影响[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 22-4.

Ji YQ, Zhu P, Tong J, et al. Protective effects of ischemic preconditioning on mitochondria and energy metabolism in immature rat myocardial cells against subsequent ischemia and reperfusion [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(1): 22-4.

[4] 林劲秋, 李亚洁. 维生素及其临床营养治疗[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(12): 947-9.

[5] 周筠, 叶仁清, 蔡德鸿, 等. 雌、孕激素对去卵巢大鼠肝脏维生素D受体mRNA表达的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 521-3.

Zhou Y, Ye RQ, Cai DH, et al. Effect of estrogen and progesteron on the expression of 1, 25-dihydroxyvitamin D receptors mRNA in the liver of ovariectomized rats[J]. J First

[6] Marco S. Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophic-deficiency muscle of mice [J]. J Neu Exp Neurol, 1997, 56(1): 45-57.

[7] Jyrki K, Timo ES, Takala HK, et al. The disruption of myofibril structures in rat skeletal muscle after forced lengthening contractions[J]. Pflügers Arch Eur J Physiol, 1998, 436(6): 735-41.

[8] 余 斌, 覃承诃, 罗吉伟, 等. 抗氧化维生素对大鼠运动能力的影响[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 892-4.

Yu B, Qin CH, Luo JW, et al. Effect of antioxidant vitamins on the exercise performance of rats[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 892-4.

[9] 张宜龙, 陈吉棣. 牛磺酸对大鼠急性运动后自由基代谢、膜流动性及钙转运变化的影响[J]. 中国运动医学杂志, 1999, 18(1): 17-21.

Zhang YL, Chen JD. Effects of taurine on free radicals metabolism, membrane fluidity and calcium transfer after acute exercise in rats[J]. Chin Sports Med J, 1999, 18(1): 17-21.

[10] 程 时. 生物膜与医学 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 11-2.

[11] 林文弢. 运动生物化学[M]. 北京: 人民体育出版社, 1999. 39-43.

[12] Amelink WA, van der Wal JH, Wokke BS, et al. Exercise-induced muscle damage in the rat: the effect of vitamin E deficiency[J]. Pflügers Arch Eur J Physiol, 1991, 419(3): 304-9.