

运动疲劳恢复期不同时相大鼠丙二醛含量、超氧化物歧化酶活性及相关指标动态变化特征*

陈 万¹ 田诗彬² 吴春燕³ 高 丽¹ 任雷杰²

摘要

目的:探讨大鼠骨骼肌丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性在运动疲劳恢复期不同时相的动态变化特征。

方法:选取雄性健康2月龄SD大鼠32只,分为对照组S组(n=8)、实验组E组(n=24),取材时实验组又分为运动后即刻组(E₀组 n=8)、12h组(E₁组 n=8)、24h组(E₂组 n=8)。对照组正常生长,实验组采用7周递增负荷训练,并最后一次运动至力竭。最后一次运动至力竭后即刻,取S组和E₀组血液及股四头肌,以测血清CK、BUN、睾酮和骨骼肌SOD及MDA;E₁组和E₂组分别于运动后12h、24h进行上述取样。

结果:①大鼠骨骼肌MDA含量:E₀组和E₁组显著性高于S组($P<0.01$),E₁组和E₂组显著性低于E₀组($P<0.05$),E₂组显著性低于E₁($P<0.05$)。②大鼠骨骼肌SOD活性:E₁组显著性低于S组($P<0.05$),E₂组显著性高于E₁组($P<0.05$)。③大鼠骨骼肌SOD/MDA值:E₀和E₁组显著性低于S组($P<0.01$),E₂组显著性高于E₀($P<0.01$)和E₁组($P<0.05$)。

结论:7周递增负荷运动并未次力竭运动后,大鼠骨骼肌MDA含量显著升高,且24h后基本降低至正常水平;骨骼肌SOD活性降低,随时间的延长,SOD活性逐渐降低且下降到一定水平后开始上升,于24h后恢复至正常水平。

关键词 大鼠;运动疲劳;丙二醛;超氧化物歧化酶

中图分类号:R493, R339.4 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-11-1001-05

Dynamic changing features of MDA, SOD and related parameters in rats during different phases of recovery period after exhaustive running/CHEN Wan, TIAN Shibin, WU Chunyan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(11): 1001—1005

Abstract

Objective: To investigate the dynamic changing features of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and related parameters in rats during different phases of recovery period of fatigue.

Method: Thirty-two male SD rats (2 month old) were randomly divided into control group (S group, n=8) and experimental group (E group, n=24). At the sampling time, the experimental group were randomly subdivided into immediate (E₀, n=8), 12h (E₁, n=8) and 24h (E₂, n=8) subgroups. All rats in experimental group were assigned a 7-week training program with different increasing loads and a final exhaustive running. The serum creatine kinase (CK), blood urea nitrogen (BUN) and testosterone were measured from the blood samples. The MDA content and SOD activity were measured from femoral quadriceps muscles.

Result: ①MDA contents of E₀ and E₁ subgroups were significantly higher than that of S group, respectively ($P<0.01$), MDA contents of E₁ and E₂ subgroups were significantly lower than that of E₀ subgroups, respectively ($P<0.05$), and MDA content of E₂ subgroups was significantly lower than that of E₁ subgroups ($P<0.05$); ② SOD activity of E₁ subgroups was significantly lower than that of S group ($P<0.05$) and SOD activity of E₂

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.11.004

*基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2009CQ032)

1 山东体育学院基础理论系,济南,250102; 2 山东体育学院研究生部; 3 山东省体育科学研究中心

作者简介:陈万,男,博士; 收稿日期:2012-12-29

subgroups was significantly higher than that of E₁ subgroups($P<0.05$); ③The ratio of SOD/MDA of E₀ and E₁ subgroups were significantly lower than that of S group, respectively ($P<0.01$),and SOD/MDA of E₂ subgroups was significantly higher than that of E₀ ($P<0.01$) and E₁ ($P<0.05$) subgroups respectively.

Conclusion: After a 7-week training program with increasing loads and a final exhaustive running, MDA content in rats significantly increased both in immediate and 12h subgroups post running, and then returned to baseline at 24h of recovery period; SOD activity decreased with the time course and significantly lower at the 12th h, and then returned to baseline at the 24th h of recovery period.

Author's address Shandong Sport University,10600 Century Thoroughfare,Jinan City,Shandong Province,250102

Key word rat;sports fatigue;malondialdehyde; superoxide dismutase

大量研究表明,在大负荷(大强度长时间)或力竭运动后机体组织尤其是骨骼肌组织中自由基会显著性增加,引起脂质过氧化反应,并影响机体组织的结构和功能^[1-4]。丙二醛(malondialdehyde,MDA)是多不饱和脂肪酸过氧化物的降解产物,是自由基作用于脂质发生过氧化反应的终产物;MDA含量的高低能够反映细胞受自由基攻击和损伤的严重程度。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是机体清除自由基体系中重要的抗过氧化酶,对机体细胞具有较好的保护作用;而SOD活性的高低能间接反映机体清除自由基的能力^[1-2,5-6]。

在前人的研究中较少采用7周逐级递增负荷且最后一次力竭运动后,观察运动疲劳恢复期不同时相大鼠骨骼肌MDA含量和SOD活性的变化特征。因此,本实验通过观察7周逐级递增大负荷运动并于最后一次力竭运动后即刻、恢复期12h、恢复期24h不同时相大鼠骨骼肌MDA含量和SOD活性,了解运动后恢复期不同时相骨骼肌细胞受自由基攻击而发生脂质过氧化的严重程度,以及机体清除自由基能力的特点变化特征。

1 对象与方法

1.1 实验对象与分组

健康雄性2月龄SD大鼠 32只,体重(220±10)g,购于山东中医药大学动物中心(实验动物质量合格证号:SCXK鲁20090008)。分笼饲养,每笼4只;普通鼠全价颗粒饲料Ⅱ号,自由饮食、饮水,室温(22±2)℃,相对湿度40%—60%。

按照本实验要求将实验动物随机分为:对照组S组(n=8);实验组E组(n=24),取材前的最后一次运动后又将实验组随机分为运动后即刻(E₀组,n=8)、

运动后12h(E₁组,n=8)、运动后24h(E₂组,n=8)。

1.2 实验方法

1.2.1 运动方案:对照组不施加任何干扰因素,给食给水,置于笼中自然生长。实验组按照制定的运动方案训练。运动速度、时间根据Bedford理论^[7]设计,大鼠体重/摄氧量回归方程所建立的递增速度和时间的运动训练方式,参考国内学者^[8-10]使用过的运动疲劳模型,并根据本实验的实际情况略加修改,取材前最后一次运动至力竭。具体运动速度和时间安排见表1。

表1 疲劳模型运动方案

周次	速度(m/min)	运动时间(min/d)	周训练天数(d/week)	运动距离(m/week)
1	15	20	6	1800
2	22	20	6	2640
3	27	20	6	3240
4	33	20	6	3960
5	35	20	6	4200
6	35	30	6	6300
7	38	30	6	7980

最后一次运动以38m/min速度运动至力竭

1.2.2 动物取材:大鼠经疲劳模型运动后,S组和E₀组立即腹腔注射10%水合氯醛糖浆(0.3ml/100g)麻醉后,打开腹腔腹主动脉取血5ml置于试管中,3500r/min转速离心15min后取上层血清,待测血清肌酸激酶(creatine kinase,CK)、血液尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、睾酮。迅速剥离取出后肢股四头肌,置于冰冷生理盐水中洗净血渍,用滤纸吸干,置于EP管内,放于-80℃超低温冰箱内冷冻以匀浆后待测骨骼肌MDA和SOD。E₁组和E₂组分别于运动后12h和24h做上述同样取材。

1.2.3 试剂盒及仪器:CK试剂盒和BUN测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司),仪器为德国Eppendorf公司生产的ECOM—F6124半自动生化分

析仪。睾酮测定试剂盒[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司],美国 Beckman Coulter 公司和法国 Pasteur 研究院合作设计生产的 ACCESS 全自动微粒子化学发光免疫分析系统。考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、MDA 测定试剂盒、总 SOD 试剂盒(南京建成科技有限公司),仪器为上海精密科学仪器有限公司 722s 可见分光光度计。具体操作方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 骨骼肌组织匀浆制备:称取洗净血渍并用滤纸吸干的股四头肌 0.3g,剪碎倒入玻璃匀浆管中,加入 2.7ml 冰冷的生理盐水,充分研碎,使组织匀浆化。将制备好的 10% 骨骼肌匀浆用低温离心机 2000r/min 转速离心 15min 后取上清液,待测骨骼肌匀浆液蛋白浓度及 MDA 含量和 SOD 活性。

1.3 统计学分析

对数据的统计和分析采用 SPSS17.0 软件系统,所有数据均以均值 ± 标准差表示。对 S 组、E₀组、E₁组、E₂组四组之间采用单因素方差分析分析,在方差分析前对样本进行齐次性检验,当样本所在总体方差不齐性时,应采用 Tamhane 方法进行后续检验的多重比较;总体方差齐性,采用 LSD 方法进行后续检验的多重比较。显著性差异水平为 P<0.05,极显著

性差异水平为 P<0.01。

2 结果

2.1 大鼠血清 CK、BUN、睾酮测试结果

大鼠血液离心后血清 CK、BUN、睾酮测试结果及统计学分析见表 2。

血清 CK, E₀组显著性高于 S 组(P<0.05); E₁组显著性高于 E₀组(P<0.05); E₁组、E₂组显著性高于 S 组(P<0.01)。血清 BUN, E₀组显著性高于 S 组(P<0.05); E₁组显著性低于 E₀组(P<0.05), E₂组显著性低于 E₀组(P<0.01)。血清睾酮, E₀组显著性低于 S 组(P<0.01)。

2.2 大鼠骨骼肌 SOD 活性、MDA 含量测试结果

取 10% 大鼠骨骼肌匀浆液离心后的上清液,进行骨骼肌 SOD 活性和 MDA 含量测试,结果见表 3。

大鼠骨骼肌 SOD 活性: E₁组显著性低于 S 组(P<0.05), E₂组显著性高于 E₁组(P<0.05)。大鼠骨骼肌 MDA 含量: E₀组和 E₁组显著性高于 S 组(P<0.01); E₁和 E₂组显著性低于 E₀组(P<0.05); E₂组显著性低于 E₁(P<0.05)。大鼠骨骼肌 SOD/MDA 值: E₀和 E₁组显著性低于 S 组(P<0.01), E₂组显著性高于 E₀(P<0.01)和 E₁组(P<0.05)。

表 2 各组大鼠血清 CK、BUN、睾酮测试结果 (x̄±s)

指标	S组(n=8)	E ₀ 组(n=8)	E ₁ 组(n=8)	E ₂ 组(n=8)
CK(U/L)	162.71 ± 67.98	293.25 ± 143.90 ^①	487.63 ± 191.00 ^{②③}	401.57 ± 72.71 ^②
BUN(mmol/L)	4.59 ± 1.01	8.14 ± 3.00 ^①	4.89 ± 1.26 ^③	4.31 ± 1.16 ^④
睾酮(ng/ml)	12.91 ± 0.96	6.49 ± 3.25 ^②	-	-

与 S 组相比,①P<0.05,②P<0.01。与 E₀组相比,③P<0.05,④P<0.01

表 3 大鼠骨骼肌 SOD 活性、MDA 含量 (x̄±s)

指标	S组(n=8)	E ₀ 组(n=8)	E ₁ 组(n=8)	E ₂ 组(n=8)
SOD 活性(U/mgprot)	148.49 ± 23.39	129.23 ± 19.97	121.70 ± 13.33 ^①	142.18 ± 16.82 ^⑤
MDA 含量(nmol/mgprot)	0.93 ± 0.27	1.95 ± 0.18 ^②	1.59 ± 0.33 ^{②③}	1.19 ± 0.30 ^{④⑤}
SOD/MDA 比值	174.67 ± 63.76	67.38 ± 14.88 ^②	79.25 ± 16.61 ^②	127.54 ± 40.00 ^{④⑤}

与 S 组相比,①P<0.05,②P<0.01。与 E₀组相比,③P<0.05,④P<0.01。与 E₁组相比,⑤P<0.05

3 讨论

3.1 运动疲劳模型

本实验运动疲劳模型采用大鼠 7 周大强度递增负荷跑台运动方式,运动方案根据 Bedford 大鼠体重/摄氧量回归方程所建立的递增速度或时间的运动训练方式设计^[7,9]。第 1 周运动速度 15m/min、时间 20min, <60% VO₂max; 第 2—6 周运动速度 22—35m/

min、时间 20—30min, 70%—95% VO₂max; 第 7 周运动速度 38m/min、时间 30min, >95% VO₂max^[7-8];取材前最后一次运动至力竭(运动速度 38m/min 运动时间 50—60min, 根据 Bedford 理论推断属于 100% VO₂max)。经过该疲劳模型运动后,测得大鼠血清及骨骼肌相关指标见表 2—3 显示,运动后即刻 BUN、MDA 显著性高于对照组、血清睾酮显著性低

于对照组、SOD 低于对照组。该结果表明疲劳模型已成功建立,也完全符合前人相关研究的结论——力竭运动后血清BUN 显著性高于安静对照组、血清睾酮显著性低于安静对照组、MDA 显著性高于安静对照组、SOD 低于安静对照组^[2-3, 10-11]。

3.2 恢复期不同时相血清CK、BUN、睾酮变化特征

CK是与细胞内能量运转、肌肉收缩、ATP再生有直接关系的重要激酶,大约90%存在于骨骼肌中。正常情况下,血液中的CK很少,只有在大强度运动或是力竭运动后肌细胞膜受到损伤,膜的通透性增大后,CK通过细胞膜渗透到血液中,使血液中的CK升高^[10,12],它与运动强度和运动时间有密切关系,CK能反映运动损伤情况。

本实验结果显示,与对照组相比,血清CK在运动后即刻、恢复期12h、恢复期24h都显著升高;与运动后即刻比较,恢复期12h显著升高。本实验大鼠经过7周递增负荷的大强度运动,并在最后一次运动至力竭,肌细胞膜受到严重损伤,膜的通透性增大,CK渗透到血液中,导致运动后12h CK值达到最高。此外,由于本实验的疲劳模型为逐级递增负荷运动,在7周运动过程中机体对逐渐递增负荷有了一定的适应性,肌细胞膜抗张力的能力也有一定程度提高,致使在运动后24h CK值呈现下降趋势,肌细胞膜的通透性开始恢复。

以往研究表明,通常在30min以内的运动时,BUN含量的增加幅度不大,而运动时间超过30min后BUN含量的增加才具有显著性^[2,10]。本实验结果显示血清BUN与对照组比较,运动后即刻显著升高;与运动后即刻相比,恢复期12h和恢复期24h显著下降。长时间大强度运动后即刻BUN显著性高于对照组,表明肌肉能量供应平衡遭到破坏,肌糖原消耗过多,动用蛋白质分解代谢供能,蛋白质、氨基酸分解代谢显著升高,此时,BUN显著升高^[2,10]。随着恢复时间的逐渐延长,肌糖原供能恢复,蛋白质分解代谢显著降低,BUN逐渐降低,并于运动后24h恢复至正常值范围。研究表明血睾酮降低是由于长时间大强度运动或是过度训练所引起的^[13],而本实验研究结果显示,经7周递增大负荷运动后即刻血睾酮明显低于对照组,完全符合上述结论。

3.3 恢复期不同时相骨骼肌MDA含量变化特征

本实验大鼠经递增负荷并最后一次运动至力竭,会导致机体内自由基增多,引起脂质过氧化作用加强,产生大量MDA。运动后12h MDA含量显著下降,但仍高于对照组;运动后24h与对照组无显著性差异。造成骨骼肌MDA显著升高的原因是机体运动时骨骼肌直接参与收缩,其大量耗能,造成局部骨骼肌缺氧以及代谢产物的堆积,影响肌细胞线粒体氧化供能;同时通过线粒体呼吸链中辅酶Q的氧化还原循环,使超氧阴离子自由基生成增多^[2]。或是大强度并力竭运动过程中骨骼肌组织暂时性缺氧,能量代谢过程中生成大量乳酸,而乳酸的存在又会抑制清除自由基酶的活性,降低了清除自由基的速度,导致MDA含量升高^[2,14]。

本实验大鼠在第2、3周运动负荷为中等强度的有氧运动,在此过程中大鼠骨骼肌SOD的活性得到增强,增加了清除自由基的速率^[4],从而减少了MDA的含量,所以采用此疲劳模型运动的大鼠MDA恢复相对较快。运动后12h和24h MDA呈下降趋势可能是因为经过长时间的恢复,机体内的抗氧化系统作用逐渐加强,并将运动过程中生成的自由基大量清除,运动后24h基本达到SOD清除自由基的速率大于脂质过氧化反应生成MDA的速率,MDA的含量减少,所以机体疲劳得以恢复至正常状态。

3.4 恢复期不同时相骨骼肌SOD含量变化特征

本实验结果显示,大鼠骨骼肌SOD活性与对照组相比,大强度并力竭运动后恢复期12h时显著下降;与恢复期12h相比,恢复期24h显著升高。

研究表明,力竭运动后机体骨骼肌SOD活性呈下降趋势^[2,15],本实验结果显示运动后即刻SOD低于对照组,但不具有显著性意义,这符合前人研究结果。但本实验运动后即刻和运动后12h骨骼肌的SOD活性都呈下降趋势,与一些研究不一致^[2,16-17]。主要是因为本实验大鼠在设定的运动方案运动过程中,4—7周为中大强度运动,尤其是6、7周为大于95% VO_{2max} 的大强度运动,使机体产生大量自由基,自由基就会很大程度攻击骨骼肌组织细胞,使细胞结构和功能发生变化。此时,抗氧化系统消除自由基的能力相对减弱,表现为抗氧化酶以及合成抗氧化酶所必须的物质被大量消耗(如,铁、铜、锌、锰等)致使抗氧化酶活性下降^[18];运动后24h SOD活性

显著性高于运动后12h,可能是由于经过24h的恢复,合成抗氧化酶的物质得到有效补充,使SOD的活性得以恢复。

3.5 骨骼肌SOD/MDA比值变化特征

本实验结果显示,与对照组比较,大强度力竭运动疲劳后即刻骨骼肌MDA含量显著升高、SOD/MDA显著降低;与运动后即刻比较,运动后恢复期12h骨骼肌MDA含量显著下降,SOD/MDA开始上升;恢复期24h骨骼肌MDA含量显著降低,SOD活性开始上升,SOD/MDA显著升高,且同时高于运动后即刻和恢复期12h;运动后恢复期24h各项指标与对照组没有显著性差异。

以往的研究中系统观察疲劳后即刻以及恢复期不同时相的变化规律不多见,多数是观察运动疲劳后即刻的变化^[19-20]。力竭运动疲劳后即刻骨骼肌SOD/MDA比值显著下降,主要由于肌肉组织产生大量自由基,而清除自由基的SOD活性降低或不变造成,从而脂质过氧化反应加强^[19-20]。本实验运动后即刻骨骼肌SOD/MDA比值的变化与过去的研究结果相近^[19-20],说明运动中或运动后即刻已有肌细胞发生凋亡并导致疲劳。恢复期12h骨骼肌SOD的活性开始升高,MDA含量显著下降,导致SOD/MDA值开始呈现上升趋势;恢复期24h骨骼肌SOD/MDA值显著高于运动后即刻和运动后12h,且与对照组没有显著性差异,说明力竭运动后随着恢复时间的延长,骨骼肌SOD的活性逐渐增加到最大,自由基逐渐被SOD清除,MDA含量减少。骨骼肌SOD/MDA值基本恢复至正常水平,自由基的产生和清除达到正常的动态平衡,从而机体疲劳基本得到恢复。

3.6 骨骼肌MDA和BUN相关性特征

在本实验的研究结果中发现,运动后恢复期大鼠骨骼肌MDA和BUN有一定的正相关性(相关系数 $r=0.69$, $P<0.01$)。探究其机制主要有三方面原因,①经过7周递增负荷并最后一次力竭运动后,机体自由基的增加以及抗氧化作用减弱,使机体内环境发生变化,影响蛋白质合成酶的活性,同时由于糖元和脂肪供能不足,增加了蛋白质的分解速度,使尿素含量增加,从而BUN值升高^[2,21]。②因为大强度并力竭运动使机体内谷胱甘肽(GSH)含量减少,对活性蛋白的保护作用减弱,同时自由基的增加使细胞

膜氧化损伤加剧,导致膜蛋白的完整性和正常生理功能遭到破坏,蛋白质分解加速,尿素含量增加,BUN值升高^[2,21]。③大强度并力竭运动使自由基链式反应加强,增加了自由基对脂质、蛋白质等的氧化损伤,破坏了机体细胞以及糖、脂肪酸代谢过程中有关酶的功能完整性,降低了糖、脂肪酸的代谢功能,增加蛋白质和氨基酸的分解,尿素的生成也相对增多,BUN含量升高^[2,21]。

4 结论

经本实验疲劳模型7周递增负荷并最后一次力竭运动,大鼠骨骼肌MDA含量显著性升高,随着恢复时间的延长,MDA含量逐渐下降,且24h后基本降低至正常水平;骨骼肌SOD活性降低,随恢复时间的延长,SOD活性逐渐降低且下降到一定水平后呈上升趋势,于24h后恢复至正常水平。

参考文献

- [1] Gastrogiovanni P, Imbesi R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise[J]. *Ital J Anat Embryol*, 2012, 117(2): 107—117.
- [2] 熊正英. 运动自由基生物学研究[M]. 北京: 科学出版社, 2010. 1—325.
- [3] Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(1): 287—332.
- [4] 任绮. 不同方式的急性运动和慢性运动对自由基代谢的影响[J]. *体育科学*, 2004, 24(4): 22—25.
- [5] 黄文聪, 阮利民, 王安利. 不同负荷游泳训练对大鼠骨骼肌HSP70应答及其脂质过氧化的影响[J]. *体育科学*, 2008, 28(3): 63—66.
- [6] 许豪文. 运动生物化学概论[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001, 1—426.
- [7] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. *J Appl Physiol*, 1979, 47(6): 1278—1283.
- [8] 杨道宁, 李丽. 运动性疲劳动物模型制备的研究进展[J]. *沈阳体育学院学报*, 2011, 30(3): 80—85.
- [9] 武露凌, 刘钢. 关于运动性疲劳动物模型建立的综述[J]. *体育与科学*, 2007, 28(3): 73—76.
- [10] 于文兵, 梁红秀, 许衍菊. 蒺藜皂甙对大强度训练大鼠血清ALT、AST、CK、LDH、BUN及睾酮的影响[J]. *南京体育学院学报:自然科学版*, 2007, 6(3): 38—40.

(下转第1014页)