•运动人体科学•

白藜芦醇对运动大鼠红细胞膜抗氧化能力、ATP 酶活性和血浆 NO 的影响

张琳[1,2]，武胜奇[2]，熊正英[3]，邓树勋[1]
（1.华南师范大学 体育科学学院，广东 广州 510631；2.南阳师范学院 体育学院，河南 南阳 473061；
3.陕西师范大学 体育学院暨运动生物学研究所，陕西 西安 710062）

摘 要：为探讨大运动量训练对红细胞膜自由基代谢状况发生变化的可能原因及白藜芦醇对其影响。将 30 只雄性 SD 大鼠，随机分为 3 组，分别为对照组(A)、训练组(B)和训练+白藜芦醇组(C)，进行 8 周递增负荷跑台训练，采用分光光度法观察 8 周递增负荷跑台训练和白藜芦醇对红细胞膜 SOD、GSH-Px、CAT、MDA、Na^+，K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase 和血浆 NO 的影响。结果表明：大强度运动后 SOD、CAT 活性的上升不明显，而 MDA、NO 含量明显升高，GSH-Px 活性明显下降。白藜芦醇在一定程度上对训练中增加的氧自由基具有清除作用，提高训练鼠大强度运动后 ATPase 活性，在一定程度上改善内皮细胞 NO 的分泌，有利于大运动量训练后红细胞膜功能的恢复。

关 键 词：白藜芦醇；红细胞膜；抗氧化能力；三磷酸腺苷酶；一氧化氮；跑台训练
中图分类号：G804.2 文献标识码：A 文章编号：1006-7116(2008)03-0101-04

Effects of resveratrol on anti-oxidative ability，ATPase activity and serum NO of erythorocyte of exercising rats

ZHANG Lin[1,2]，WU Sheng-qi[2]，XIONG Zheng-ying[3]，DENG Shu-xun[1]
（1.School of Physical Education，South China Normal University，Guangzhou 510631，China；
2.School of Physical Education，Nanyang Teachers' College，Nanyang 473061，China；
3.Institute of Physical Education and Institute of Exercise Biology，Shanxi Normal University，Xi'an 710062，China）

Abstract: In order to probed into the possible causes for the change of metabolism of free radicals of erythorocyte as a result of high intensity training and the effects of resveratrol on such a change, the authors randomly divided 30 male SD rats into 3 groups, which are respectively the control group (A), training group (B) and training + resveratrol group (C), put these rats on treadmills for 8 weeks of training with gradually increased loads, applied the spectrophotometric method to observe the effects of resveratrol and the 8 weeks of load gradually increased treadmill training on the SOD, GSH-Px, CAT, MDA, Na^+, K^+-ATPase, Ca^{2+}-ATPase and serum NO of erythorocyte, and revealed the following findings: after high intensity exercising the increase and SOD and CAT activities is not significant, while MDA and NO contents increase significantly, and GSH-Px activity decreases significantly. To a certain extent, resveratrol has the function of eliminating oxidation free radicals increased in training, increases ATPase activity of the trained rats after high intensity exercising, improves the secretion of NO of endothelial cells, and facilitates the recovery of erythorocyte functions after high intensity training.

Key words: resveratrol；erythorocyte；anti-oxidative ability；ATPase；NO；treadmill training

运动可引起红细胞自由基代谢异常，抗氧化酶活性改变，严重时可引起红细胞膜流动性下降，细胞结构功能丧失，引起溶血、贫血,致使出现运动性疲劳。白藜芦醇(Resveratrol，Res)是一种多酚类化合物，其药

收稿日期：2007-12-06
作者简介：张琳（1971-），女，讲师，博士研究生，研究方向：运动与心血管功能。

理活性极为广泛，特别是对心血管系统的作用，以及抗氧化、抗癌、抗炎等作用比较明显[1-3]，研究表明该药的作用与其抗氧化特性有关，在运动医学领域有着广阔的应用前景[4-5]。本实验通过白藜芦醇对递增强度训练大鼠红细胞膜抗氧化水平、ATP 酶活性和血浆 NO 含量的研究，旨在探讨红细胞抗氧化系统对运动训练的反应，从一个角度研究疲劳产生的机制及为寻找抗疲劳辅助药物提供一定的参考。

1 实验对象和方法

1.1 实验对象

雄性 SD 大鼠 30 只，2 月龄，体质量 180~220 g，由陕西中医研究所实验动物饲养中心购入，同时购入基础饲料，适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 实验设计

将实验大鼠随机分为对照组（A）、运动组（B）、运动+白藜芦醇组（C），每组 10 只。动物饲养室内温度 22~26°C，湿度 44%~72%，自然光照明。动物训练模型根据文献[5]略加改动：A 组安静笼饲养，自由饮食摄水；B、C 组于动物跑台上先进行 5 周的适应性训练，然后进行 3 周的大强度耐力训练。适应性训练期间每天训练 25 min，每周 6 d，坡度为 0°，跑速每周分别以 15、22、27、31 和 35 m/min 递增，共 5 周；大强度训练期间每天训练 35 min，每周 6 d，坡度为 0°，速度为 38 m/min，共 3 周，C 组每天按 50 mg/kg 的剂量灌胃白藜芦醇，白藜芦醇购自西安天行健生物工程公司，灌胃剂量按每周大鼠体重变化作适当调整。A、B 组分别灌胃相同体积的生理盐水作对照。训练实验结束后次日麻醉处死，股动脉取血，肝素抗凝。

1.3 红细胞膜制备

取肝素抗凝血，2 000 r/min 4°C离心 5 min，除去血浆和灰白色的白细胞层，按 1∶2（*V*/*V*）左右的比例加入 150 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris-HCl 配置成 pH 为 7.4~7.5 的缓冲液，将沉淀的红细胞悬浮，继而以 2 000 r/min 离心 5 min，除去上清液。如此重复洗涤 3 次。沉积的红细胞按 1∶10（*V*/*V*）加入预冷的双蒸水，均匀搅拌 2 min，待完全溶血后，8 000~10 000 r/min 4°C离心 20 min，将沉淀重复上法再洗涤 3 次，即可得到沉淀的乳白色的红细胞膜样品。

1.4 测试方法

膜蛋白含量测定：考马斯亮蓝染色法；ATP 酶的测定：定磷法；超氧化物歧化酶（SOD）活性测定：黄嘌呤氧化酶法；谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性测定：DTNB 法；过氧化氢酶（CAT）活性测定：可见光法；MDA 含量测定：TBA 法；NO 测定：硝酸还原酶法（以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所）

1.5 统计处理

全部数据处理在计算机 Excel 中进行，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间 *t* 检验进行统计分析。

2 实验结果

2.1 白藜芦醇对大强度耐力训练大鼠红细胞膜抗氧化水平的影响

表 1 结果显示，运动组同对照组相比较：大鼠红细胞膜 SOD、CAT 活性都略有升高，差异均无显著性（$P>0.05$），GSH-Px 活性有显著降低（$P<0.05$），MDA 质量摩尔浓度有显著升高（$P<0.05$），运动+Res 组与运动组比较，大鼠红细胞膜 SOD 活性、CAT 活性、GSH-Px 活性，均呈显著性升高（$P<0.05$），MDA 质量摩尔浓度显著下降（$P<0.05$）；运动+Res 组与对照组相比较，SOD、CAT 活性均有显著性升高（$P<0.05$），其余各指标均略有升高，差异均无显著性（$P>0.05$）。

表 1 白藜芦醇对大强度耐力训练大鼠红细胞膜抗氧化能力（$\bar{x} \pm s$）水平的影响

组别	*n*/只	SOD/(nU·mg^{-1})	CAT/(U·mg^{-1})	GSH-Px/(U·mg^{-1})	*b*(MDA)/(nmol·mg^{-1})
对照组	10	12.46±2.35	1.48±0.31	21.49±3.57	2.63±0.64
运动组	10	13.16±1.31	1.57±0.69	16.64±4.72$^{1)}$	3.79±0.48$^{1)}$
运动+Res	10	17.52±1.42$^{1)2)}$	1.91±0.36$^{1)2)}$	22.71±3.62$^{2)}$	2.93±0.17$^{2)}$

1）与对照组比较，$P<0.05$；2)与运动组比较 $P<0.05$

2.2 白藜芦醇对运动大鼠红细胞膜 ATP 酶活性和血浆 NO 的影响

表 2 结果显示，运动组同对照组相比较：大鼠红细胞膜 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}-ATPase 活性均略有降低，差异无显著性（$P>0.05$）；运动+Res 组与运动组比较，大鼠红细胞膜 Na^+，K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase 活性都呈显著性升高（$P<0.05$）。运动组血浆 NO 浓度极显著高于对照组血浆 NO 浓度（$P<0.01$）；运动+Res

组血浆 NO 浓度与对照组无显著性差异（$P>0.05$），与运动组差异有极显著性（$P<0.01$）。

表 2　白藜芦醇对运动大鼠红细胞膜 ATP 酶活性和血浆 NO 浓度（$\bar{x}\pm s$）的影响

组别	n/只	Na^+，K^+-ATP_{ase}/(μ mol·mg^{-1}·h^{-1})	Ca^{2+}-ATP_{ase}/(μ mol·mg^{-1}·h^{-1})	c(NO)/(mol·L^{-1})
对照组	10	0.214±0.062	0.317±0.025	64.78±5.88
运动组	10	0.186±0.027	0.294±0.042	80.24±5.51[3)]
运动+Res	10	0.351±0.073[2)]	0.415±0.015[2)]	68.56±3.90[4)]

1)与对照组比较，$P<0.05$；2）与运动组比较，$P<0.05$；3）与对照组比较，$P<0.01$；4）与运动组比较 $P<0.01$

3　分析讨论

3.1　白藜芦醇对运动训练大鼠红细胞膜抗氧化能力的影响

白藜芦醇具有较强的抗氧化、抗自由基作用。白藜芦醇可直接清除 $O_2^{\cdot-}$、$^{\cdot}OH$、$LO^{\cdot}$、$LOO^{\cdot}$[7]。白藜芦醇为两亲分子，易透过细胞膜，还可进一步穿过胞浆进入细胞核，更好地发挥抗氧化作用。实验表明，白藜芦醇在水相中（即膜外）起清除自由基的作用，防止多聚不饱和脂肪酸过氧化，而且如果在脂颗粒形成前加入白藜芦醇，其有效浓度约为脂颗粒形成后再加入的 7 倍，说明部分白藜芦醇掺入了脂质膜结构并在膜内发挥清除自由基，防止脂质过氧化的作用[8]。Jang M.等[9]报道白藜芦醇还能减少 H_2O_2 产生，使髓过氧化酶和氧化型谷胱甘肽还原酶的活性正常化，恢复 GSH 水平和 SOD 活性，从而增强机制的抗氧化、自由基防御系统，间接发挥其抗氧化、抗自由基作用。

本实验结果显示，递增强度运动后红细胞膜 SOD 活性略有升高，这可能是由于训练中采用的运动强度逐渐加大，红细胞内氧合血红蛋白氧化为高铁血红蛋白的速率加快，氧自由基的生成不断增加；氧自由基的大大增加会刺激红细胞中的 SOD 产生适应性反应以便不断地将氧自由基快速地转化。随着 SOD 被大量地激活用以催化 $O_2^{\cdot-}$ 的歧化反应，与此同时，这一反应的产物 H_2O_2 也迅速增加，而 H_2O_2 可以破坏 SOD 酶的活性中心金属配位结构，使得 SOD 活性受到抑制，因此 SOD 活性表现为训练后不显著升高。GSH-Px 是以 H_2O_2 为底物的抗氧化酶，GSH-Px 能使 H_2O_2 还原为 H_2O 和 O_2。因此，H_2O_2 的升高，消耗了一定量的 GSH-Px 使其活性降低。运动后，大鼠体内 CAT 活性变化不明显，提示 CAT 活性在运动中的变化有其特异性，它的升高或下降可能与运动时的强度和时间密切相关，此机理尚不清楚，还需要有大量的实验来加以证明。

由于白藜芦醇所具有的清除自由基的作用，服药训练鼠受较少氧自由基攻击，使训练后细胞内的 $O_2^{\cdot-}$ 通过 SOD 转化的量减少，产物 H_2O_2 的堆积相对减少，说明 SOD 受 H_2O_2 的抑制作用减少，所以运动后 SOD 活性出现了上升趋势。随着 H_2O_2 的减少，消耗的 GSH-Px 也减少，其活性随之升高。因此训练后 GSH-Px 活性也出现显著升高趋势。由于白藜芦醇使运动过程中细胞内部分自由基已经被抗氧化系统清除，脂质过氧化反应造成的破坏程度降低，运动大鼠红细胞膜 MDA 生成量减少。本实验结果提示，白藜芦醇对训练鼠红细胞膜抗氧化水平起到一定的促进及恢复的辅助作用。

3.2　白藜芦醇对运动训练大鼠红细胞膜 ATP 酶活性的影响

运动产生自由基攻击细胞膜，降低膜流动性继而影响到细胞膜上的三磷酸腺苷酶（ATPase）。研究报道，青少年进行次极限强度训练后，红细胞膜 Ca^{2+}-ATPase 活性下降和 Na^+，K^+-ATPase 活性升高。力竭游泳后大鼠肠组织 Na^+，K^+-ATPase 活性下降[10]。一次急性运动后由于 ATP 大量消耗，红细胞膜内 ATP 浓度下降 7%，膜上 Na^+，K^+-ATPase 就不能正常工作[11]。

本实验中递增负荷训练并未使大鼠红细胞膜 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}-ATPase 活性发生显著变化，提示可能由于红细胞内 SOD、GSH-Px 快速地参与清除细胞内所生成的氧自由基，避免了自由基对膜上功能蛋白的攻击，削减了对 ATP 酶的影响。研究表明，白藜芦醇明显改善 Na^+，K^+-ATPase 活性，最大改善率在 60% 以上，其作用与强的松相当或更优[12]，白藜芦醇还可有效抑制脊髓损伤后受损局部的 Ca^{2+}-ATPase 活性下降[13]。本实验服药训练鼠运动后 Na^+，K^+-ATPase 和 Ca^{2+}-ATPase 活性升高，可能提示，白藜芦醇起了一定的作用。服药鼠训练后 ATPase 活性有较大提高，有利于运动开始后 ATPase 不被大量自由基氧化，运动后此酶又能较快得以恢复。表明白藜芦醇 ATP 酶活性影响是显著的，保护了膜免受损伤,但是其药理学机制需要有更多的实验加以支持。

3.3　白藜芦醇对运动训练大鼠血浆 NO 的影响

一氧化氮(NO)作为一种活性氮自由基，是继活性

氧自由基之后生物自由基领域的又一新的研究前沿。NO 作为重要的生物信使，广泛参与细胞间与细胞内的信息传递。但 NO 生成过多，将通过与机体内蛋白质、脂肪、核酸等生物分子相互作用损伤组织细胞，对机体产生毒性作用。运动训练对 NO 的影响随运动的强度和时间不同而不同。短时间运动后即可激活内皮与骨骼肌的 NOS，增加 NO 的生成[14]，而持久锻炼则能使 NOSmRNA 的表达上调，提高 NOS 的数量，从而增加内皮和骨骼肌产生 NO 的能力[15]。Roberts CK 等[16]的实验表明大鼠在 45 min 的力竭性跑台训练后即刻肌肉 NOS 活性提高了 37%，而且 Manukhina EB[14]等也发现急性运动后大鼠心、肝、脾、肾、肠道的 NO 生成量均增加。运动中 NO 生成量增加，可能是由于运动强度的增加，血浆中儿茶酚胺的浓度逐渐增加，并与血管内皮细胞上的 α-肾上腺素能受体结合，可以刺激内皮细胞释放 NO；同时在运动过程中，随着心输出量的增加和血液重新分配，导致骨骼肌和心肌血流量增加，血流速度加快，必然增加血流对内皮细胞的切压力，增加 NOS 活性，从而促进内皮细胞分泌 NO，运动中产生的大量 NO 是一种重要的氮自由基，对组织细胞有伤害作用[17]。

本实验中递增负荷运动使大鼠血浆 NO 水平显著升高，由此证明，此强度运动确实刺激机体产生过量的 NO 自由基,影响机体 NO 的浓度及代谢。而服药训练鼠运动后 NO 水平明显下降，说明白藜芦醇在一定程度上改善内皮细胞 NO 的分泌。白藜芦醇在动物体内是如何减少 NO 过量生成及与其他相关因素的关系还有待于更多的实验证明。

参考文献：

[1] Candelario-Jalil E，De Oliveira A C，Gräf S，et al. Resveratrol potently reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide- activated primary rat microglia[J].J Neuroinflammation，2007，10：4-25.

[2] Shen M Y，Hsiao G，Liu C L，et al. Inhibitory mechanisms of resveratrol in platelet activation：pivotal roles of p38 MAPK and NO/cyclic GMP[J].Br J Haematol，2007，139(3)：475-85.

[3] Ahn J，Lee H，Kim S，Ha T.Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes[J].Biochem Biophys Res Commun，2007，364(4)：972-977.

[4] 张琳，武胜奇，熊正英.白藜芦醇的生物学作用及其在运动医学中的应用前景[J].体育学刊，2005，12(3)：57-60.

[5] 张琳，李坤贤.白藜芦醇、自由基与运动[J].南阳师范学院学报，2006，5(12)：73-76.

[6] 徐晓阳，张爱芳，武桂新，等.抚正理气中药对大强度耐力训练大鼠代谢某些指标的影响[J].中国运动医学杂志，1998，17(3)：220-223.

[7] 张小轶，朱振勤，陈季武，等.白藜芦醇清除自由基、抗脂质过氧化及对 DNA 保护作用的研究[J].自由基生命科学进展，1999(7)：110-115.

[8] Belguendouz L，Fremont L，Gozzelino M T. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins[J]. Biochem Pharmacol，1998，55：811-816.

[9] Jang M，Pezzuto J M.Cancer chemopreventive activity of resveratrol[J].Drug Exp Clin Res，1999，25(2-3)：65-77.

[10] 衣雪洁，常波，胡红军.力竭游泳训练对大鼠肠组织 MDA、Free-SH 含量和 Na^+，K^+-ATPase 活性的影响[J]中国体育科技，2000，36(8)：39-40，42.

[11] 辛东，李晖，陈家琦，等.运动与红细胞膜[J].天津体育学院学报，1996，11(4)：1-6.

[12] 杨迎暴，朴英杰.白藜芦醇对脊髓损伤后继发性脊髓水肿、乳酸脱氢酶及 ATP 酶活性的影响[J].中国药理学通报，2002，18(5)：539-543.

[13] 杨迎暴，朴英杰.白黎芦醇对大鼠脊髓损伤后受损局部 Ca^{2+}，Mg^{2+}-ATP 酶活性的影响[J].中药材，2002，25(12)：882-885.

[14] Manukhina E B.The effect of adaptation to a physical load on the endothelium-mediated reactions of isolated vessels and NO Prduction in rats[J].Fiziol Zh Im I M Sechenova，1996，82：54-60.

[15] Brock R W.Effects of acetylcholine and nitric oxide on forearm blood flow at rest and after a single muscle contoction[J].J Appl Physiol，1998，85：2249-2254.

[16] Roberts C K.Acute execise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle[J].Am J Physiol，1999：390-394.

[17]Poveda J J，Riestra A，Salas E，et al. Contribution of nitric oxide to exercise-induced changes in healthy volunteers：effects of acuts exercise and long-term physical training[J].Eur J Clin Invest，1997，27：967-971.

[编辑：郑植友]