

·运动人体科学·

同一稳态下自由基平衡系统移动调节因子的推测及实验

潘华山¹, 谭婧², 刘刚¹

(1. 广州中医药大学 体育健康学院, 广东 广州 510006;

2. 广州中医药大学 中药资源与工程研究中心, 广东 广州 510006)

摘 要: 采用中等强度持续性水平跑模型, 研究了不同时相、不同剂量下抗氧化剂摄入大鼠骨骼肌细胞线粒体 MDA、SOD、CAT、GSH-PX 等抗氧化酶活性的变化, 推测引发自由基稳态水平变化的先导性因子。90 只 SD 大鼠, 实验 1 随机分为正常人参皂甙 Rb1 组、7 倍人参皂甙 Rb1 组、生理盐水模型组和生理盐水空白组, 每组 10 只, 检测指标为肌细胞线粒体 SOD、MDA、CAT、GSH-PX; 实验 2 随机分为空白组、中等强度即刻组、中等强度 24 h 组、中等强度 48 h 组、中等强度 72 h 组, 每组 10 只, 运动后即刻、24 h、48 h、72 h 后取材, 检测指标同实验 1。结果发现: 正常剂量人参皂甙组、7 倍剂量人参皂甙组与生理盐水空白组相比抗氧化酶的活性显著增加。提示: 运动应激过程中机体氧化能力的增高伴随着机体抗氧化能力的提高, 但空白刺激条件下机体抗氧化能力的增强没有逆向引发自由基稳态系统反应。进一步推测: 氧化能力是自由基稳态水平移动的先导因素, 而外源性引发抗氧化能力提高对自由基积累无负反馈效应。

关键词: 运动生化学; 运动应激; 自由基; 同稳态; 调节因子

中图分类号: G804.55 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2010)07-0086-04

Inference and experiment of the regulating factor of the movement of the free radical balancing system in the same stable state

PAN Hua-shan¹, TAN Jing², LIU Gang¹

(1. School of Sport and Health, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Chinese Resources and Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: By using a continuous medium intensity horizontal running model, the authors studied the dynamic changes of the activity of anti-oxidation enzymes such as MDA, SOD, CAT and GSH-PX in the mitochondrion of skeletal muscle cells of rats taking in different dosages of antioxidant at different times, and inferred the lead factor that triggered the change of the level of stability of free radicals. The authors randomly divided 90 SD rats into a normal ginsenoside Rb1 group, a septuple ginsenoside Rb1 group, a physiological saline model group, and a physiological saline control group with 10 rats in each group in experiment 1, in which the test indexes were the SOD, MDA, CAT and GSH-PX in the mitochondrion of muscle cells, and into a control group, a medium intensity immediate group, a medium intensity 24h group, a medium intensity 48h group, and a medium intensity 72h group with 10 rats in each group in experiment 2. The author revealed the following finding: as compared with the physiological saline control group, the activity of antioxidant enzymes of rats in the normal ginsenoside group and the septuple ginsenoside group increased significantly, which suggested that during kinetic stressing the increase of the body's anti-oxidation capacity was accompanied by the enhancement of the body's anti-oxidation capacity, but the increase of the body's anti-oxidation capacity under the stimulation free condition did not reversely trigger the reaction of the free radical stabilization system. The author further inferred that oxidation capacity is the lead factor

收稿日期: 2009-08-08

基金项目: 广东省科技厅科技计划项目(2006B35604006)。

作者简介: 潘华山(1968-), 男, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药抗运动疲劳。

for the horizontal movement of free radicals, while the enhancement of anti-oxidation capacity triggered exogenously has no negative feedback effect on the accumulation of free radicals.

Key words: sports biochemistry; kinetic stress; free radical; the same stable state; regulating factor

自由基是需氧生物在生物氧化过程中利用分子氧作为电子受体而产生的一类特殊的小分子(或离子)基团,它对正常的生物大分子蛋白质、核酸及生物膜脂类等产生破坏性过氧化作用^[1],同时需氧生物体内也产生超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等抗氧化酶清除过量的自由基,使自由基的存在达到一个适量的水平,从而形成同一稳态下的自由基平衡机制。

探索与发现同一稳态下的自由基平衡系统变化的调节因子,将为研究外源性物质特异性抗氧化,特别是精确抑制某些危害性较大自由基堆积提供更为清晰的理论假说基础,因此了解调节自由基与抗氧化酶稳态系统的先导因子具有重要的基础性意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象与分组

实验 1: 5 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只(实验动物使用许可证号: SYXK(粤)2008-0085, 广州中医药大学实验动物中心, 体重 180~220 g)。随机分为正常剂量人参皂甙 Rb1 组($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、7 倍人参皂甙 Rb1 组($350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、生理盐水运动组($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 生理盐水)和生理盐水空白组($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 生理盐水), 每组 10 只, 常规分笼喂养, 自由饮水进食, 动物室内温度 21~24 °C, 相对湿度 40%~55%, 室内空气流通, 光照时间 12 h。

实验 2: 5 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只(同实验 1)。随机分为空白对照组、运动中等强度即刻组、运动中等强度 24 h 组、运动中等强度 48 h 组、运动中等强度 72 h 组, 每组 10 只, 喂养及其他条件同实验 1。

所有动物实验前均未进行过跑台跑运动。实验过程对动物的处置符合山内钟平^[2]所著《实验动物的环境与管理》要求。

1.2 动物模型

实验 1: 仅生理盐水运动组进行中等强度持续性水平跑运动。运动强度根据 Bedford 的最大摄氧量确定, 运动强度超过 90%最大摄氧量为大强度运动, 运动强度相当于 60%~70%最大摄氧量为中等强度运动。速度 16 m/min, 20 min, 坡度 0°, 间歇 40 min, 灌胃后 1 h 开始运动, 每次 20 min, 每天 1 次, 连续 4 d。运动中采用声音刺激或毛刷机械刺激鼠尾部, 以防止大鼠停止运动。但实验过程中, 未使用该刺激。造模

过程中 1 只大鼠死亡。

实验 2: 所有组别均进行中等强度持续性水平跑运动。速度 16 m/min, 20 min, 坡度 0°, 间歇 40 min, 灌胃后 1 h 开始运动, 每次 20 min, 每天 1 次, 连续 14 d。其他做法同实验 1。

1.3 用药情况

实验 1: 灌胃剂量依据王华等^[3]制定的药理实验设计中剂量确定的方法和原则, 并参考唐晖等^[4]相关研究中的给药剂量而确定, 50 mg/kg , 1 日 1 次。其余 2 组同等剂量生理盐水灌胃。大鼠 2 d 称重 1 次, 按照新的体重确定灌胃剂量。

实验 2 生理盐水灌胃剂量同实验 1。

1.4 动物取材及标本制备

各组运动结束后, 腹腔注射戊巴比妥钠溶液麻醉动物, 麻醉剂量为 $0.25\sim 0.5 \text{ g/kg}$ 。迅速取出右侧肱三头肌, 剔除筋膜等结缔组织, 冰冷生理盐水清洗, 并迅速放入液氮冷冻, 后放入 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱储存待测。

线粒体制备: 称取 1.5 g 肌组织, 在冰浴上剪成碎块, 按质量体积比 $1 \text{ g} : 4.5 \text{ mL}$ 的比例加入事先预冷的缓冲液(0.25 mol/L 蔗糖+ 0.01 mol/L Tris)制备成组织匀浆($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$)。匀浆液在高速冷冻离心机(SIGMA 6K 15, Germany)内经 500 g 离心 20 min 去除胞核碎片后, 取上清液在高速冷冻离心机(SIGMA 3K 30, Germany)内以 $3\ 500 \text{ r/min}$ 离心 15 min, 得到组织上清液和线粒体两部分。将线粒体悬于 0.5 mL 的缓冲液(0.25 mol/L 蔗糖+ 0.01 mol/L Tris)中待测。以上步骤均在 $0\sim 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中进行。

1.5 药品、主要试剂与仪器

人参皂甙 Rb1 由上海同田生物技术有限公司提供。MDA 含量测定试剂盒, SOD、GSH-Px、CAT 活性测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。主要仪器: 高速冷冻离心机(SIGMA, Germany)、ZH-PT 动物实验跑台。

1.6 指标测定

丙二醛(MDA)采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定; SOD 采用黄嘌呤氧化酶法测定; GSH-Px 采用 DTNB 法测定。对各项指标的测定严格按照试剂盒说明书进行, 测定完毕后按说明书计算所测指标浓度、活性。

1.7 统计学分析

实验数据均采用 SPSS16.0 统计软件进行处理,采用单因素方差分析进行各组间的差异显著性检验,显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果及分析

2.1 抗氧化剂摄入后骨骼肌线粒体 MDA 浓度,抗氧化酶活性变化

生理盐水运动组与生理盐水空白组比较,MDA

浓度, SOD、GSH-PX 活性明显增高,差异具有显著性意义($P<0.05$);CAT 活性有所升高,但差异无显著性意义;正常剂量组、7 倍剂量组与生理盐水空白组比较,空白组 MDA 浓度略微高于正常剂量组和 7 倍剂量组,但这些差异均没有显著性意义,正常剂量组、7 倍剂量组与生理盐水空白组比较抗氧化酶的活性显著增加,差异具有显著性(见表 1)。

表 1 抗氧化剂摄入后骨骼肌线粒体 MDA 浓度与抗氧化酶活性 ($\bar{x} \pm s$) 的变化

组别	n/只	SOD 活性/(U·mL ⁻¹)	CAT 活性/(U·mL ⁻¹)	GSH-PX 活性/(U·mL ⁻¹)	c(MDA)/(nmol·mL ⁻¹)
正常剂量	10	7 873.55±428.16 ¹⁾²⁾	1 197.56±286.35 ¹⁾²⁾	490.12±55.37 ¹⁾²⁾	4.22±1.03 ²⁾
7 倍正常剂量	10	8 496.35±546.79 ¹⁾²⁾	1 355.42±357.24 ¹⁾²⁾	539.19±47.53 ¹⁾²⁾	4.46±0.58 ²⁾
生理盐水+运动	10	5 756.39±531.78 ¹⁾	825.86±17.45	460.75±60.72 ¹⁾	19.53±1.32 ¹⁾
生理盐水空白	10	3 443.50±901.61	814.23±76.09	330.37±26.19	4.69±0.11

1)与生理盐水空白组比较 $P<0.05$; 2)与生理盐水+运动组比较 $P<0.05$

2.2 各组不同时相骨骼肌线粒体 MDA 浓度, SOD、CAT、GSH-PX 酶活性变化

大鼠在中等强度运动后即刻应激氧化产物 MDA 浓度达到峰值,与空白组相比明显增高,差异具有显

著性意义,而 SOD、CAT、GSH-PX、GSH 活性在 24 h 达到峰值,72 h 后 MDA 浓度、SOD、CAT、GSH-PX、GSH 活性恢复,72 h 组与空白组比较,差异无显著性(见表 2)。

表 2 不同时相骨骼肌线粒体 MDA 浓度, SOD、CAT、GSH-PX 酶活性变化

组别	n/只	SOD 活性/(U·mL ⁻¹)	CAT 活性/(U·mL ⁻¹)	GSH-PX 活性/(U·mL ⁻¹)	c(MDA)/(nmol·mL ⁻¹)
空白组	10	3 204.96±678.38	834.37±86.35	340.12±15.78	4.32±0.19
即刻组	10	4 206.37±894.29 ¹⁾³⁾	1 076.38±259.96 ¹⁾³⁾	399.19±77.23 ¹⁾³⁾	19.49±1.52 ¹⁾³⁾
24 h 组	10	4 995.77 ± 1 031.78 ¹⁾²⁾	1 207.36 ± 109.6 ¹⁾²⁾	480.28 ± 90.45 ¹⁾²⁾	11.86 ± 2.33 ¹⁾²⁾
48 h 组	10	4 352.84±501.61 ¹⁾²⁾³⁾	1 176.56±69.11 ¹⁾²⁾³⁾	436.42±55.19 ¹⁾²⁾³⁾	4.53±0.32 ¹⁾²⁾³⁾
72 h 组	10	3 348.75±884.69 ²⁾³⁾	854.23±76.09 ²⁾³⁾	350.76±44.21 ²⁾³⁾	4.41±0.29 ²⁾³⁾

1)与空白组比较差异具有显著性意义($P<0.05$); 2)与即刻组比较差异具有显著性意义($P<0.05$); 3)与 24 h 组比较差异具有显著性意义($P<0.05$)

3 讨论

1)假说基础。

运动过程中随着机体对氧的需求加大,并通过加大、加深呼吸的方式摄入更多氧,在这一过程中必然伴随着电子泄漏转化为自由基离子,引起自由基离子聚集^[5],并由于这一过程与运动需氧的共生性,该过程几乎是不可分离的。同时机体调节抗氧化酶表达与活性,通过抗氧化酶的催化反应,将自由基转化为某些无害或低害物质,缓冲运动应激过程中自由基聚集对细胞质膜流动性等产生某些功能性损害,从而形成自由基堆积的内源性对抗体系。

Ji LL 等^[6]在机体存在自由基的产生与对抗现象的基础上提出氧化-还原内稳态概念,我国学者刘承宜等^[7-8]开创性地提出了运动训练领域中的内稳态理论,该理论的提出首次从宏观角度将运动能力的维持与体内内稳态联系起来,同时从代谢组学等微观角度证明了运动能力存在内稳态的现象^[9]。刘承宜等^[7]研究将氧

化-还原内稳态分为不同层次的稳态水平,认为运动成绩是由 SESH 的品质决定的。SESH 的品质越高,运动水平越高。从自由基平衡系统稳态纵向跃迁的角度而言,高层次(高品质)的平衡稳态较低层次(低品质)的稳态有着更好的运动能力,整体上机体能够更快更好地达到氧化能力与还原能力的平衡,这个移动是属于纵向的。

而同一稳态下机体氧化能力与还原能力本身是一个相对稳定的对抗体系,表现为微观上机体氧化能力与还原能力在不同条件下两种能力的不同变化。即自由基平衡系统同一稳态下的水平移动(不是低层次到高层次的纵向移动)。

本文的假说也是在同一稳态条件下作为基础的。

2)不同剂量抗氧化剂摄入后骨骼肌线粒体 MDA 浓度, SOD、CAT、GSH-PX 酶活性变化。

实验 1 表明:生理盐水+运动组较生理盐水空白组,MDA 浓度增高,差异具有统计学意义, SOD、

GSH-PX 活性显著升高, CAT 活性有所增高, 提示机体运动应激过程中自由基大量聚集, 机体氧化能力增强; 与之对抗的抗氧化酶活性提高, 抗氧化能力增强, 可以认为, 自由基平衡系统中机体氧化能力提高对机体还原能力(抗氧化酶活性)有正向调节作用。

正常剂量人参皂甙组、7 倍剂量组与生理盐水空白组比较抗氧化酶的活性显著增加, 提示外源性抗氧化剂增强了机体还原能力。而正常剂量组、7 倍剂量组与空白组比较, 正常剂量、7 倍剂量人参皂甙组与生理盐水空白组 MDA 浓度差异不具显著性, 机体氧化能力没有增强。提示机体抗氧化能力的增强没有反向引起机体氧化产物 MDA 浓度的升高, 即机体抗氧化能力的增强没有逆向引发自由基稳态系统反应。

据此可推测, 伴随着体内各种抗氧化酶活性的提高是机体自我调节对自由基聚集的应答表现, 自由基平衡系统中机体还原能力提高对机体氧化能力无逆向调节作用。运动应激过程中机体氧化能力可能是同一稳态层次下自由基平衡系统水平移动的关键调节因子, 同一稳态层次下自由基平衡系统可能是一个单向调节系统。

3) 不同时相骨骼肌线粒体 MDA 浓度, SOD、CAT、GSH-PX 酶活性变化。

为进一步证明运动应激过程中机体氧化能力可能是同一稳态层次下自由基平衡系统水平移动的调节因子的推测, 本课题组测试了运动刺激后不同时相机体氧化产物 MDA 及各种抗氧化酶等相关指标。

中等强度运动后即刻组与空白对照组比较: 应激氧化产物 MDA 浓度、抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性持续增高具显著性, 24 h 组与即刻组相比, 应激氧化产物 MDA 浓度下降, 抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性上升, 大鼠在中等强度运动后即刻应激氧化产物 MDA 浓度达到峰值, 而 SOD、CAT、GSH-PX、GSH 活性在 24 h 达到峰值、72 h 后 MDA 浓度, SOD、CAT、GSH-PX、GSH 活性恢复至空白组水平, 差异不具显著性。该现象提示, 在运动应激过程中, 自由基离子的积累相对于机体抗氧化能力的提高具有前导性, 运动应激过程中自由基离子的生成速率大于机体抗氧化酶清除自由基的速率, 认为抗氧化酶活性提高作为机体应答自由基聚集的主要反应具有一定滞后性。进一步证明同一稳态层次下自由基平衡系统水平移动的调节因子这一推测。

从自由基引发的机信号通路激活角度来看, 有证据显示在细胞基因表达调控中存在一些对氧化还原敏感的转录因子在氧化胁迫条件下被氧化而活化的过程^[10]。

自由基与抗氧化酶之间的平衡存在一个保守的氧化胁迫感应机制, 在这个感应机制中, 自由基大量积累, 氧化胁迫信号通过巯基/二硫键转换反应使转录因子活化, 激活抗氧化基因的表达。可以认为自由基的大量积累导致氧化能力的增强, 当机体氧化能力到达一个阈值时, 巯基/二硫键转换开关开启, 调高抗氧化酶的转录活性, 增强机体抗氧化能力, 支持了氧化能力是自由基平衡系统水平移动调节因子的推测。

综上所述, 机体自由基堆积, 机体氧化能力增强, 抗氧化酶活性提高, 但当机体抗氧化酶活性提高、机体抗氧化能力增强时, MDA 基本不变化, 机体抗氧化能力的增强没有逆向引发自由基稳态系统反应; 机体还原能力较氧化能力具有一定的滞后性, 因此可认为: 运动应激过程中机体氧化能力可能是同一稳态下自由基平衡系统的调节因子, 且同一稳态下自由基平衡系统的调节可能是单向的。

参考文献:

- [1] Takamiya M, Kunii R, Nakayashiki N, et al. A study on mRNA expressions of fibronectin in dermal and cerebral wound healing for wound age estimation[J]. *Leg Med(Tokyo)*, 2006, 8(4): 214-219.
- [2] 山内钟平. 实验动物的环境与管理[M]. 上海: 上海科学普及出版社, 1989.
- [3] 王华, 魏伟, 岳莉, 等. 白芍总苷对卡介苗加脂多糖引起的小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(8):
- [4] 唐晖, 魏源, 贺洪, 等. 人参活性成分对运动时能量代谢的影响[J]. *现代康复*, 2001(2): 137.
- [5] 丁树哲. 疲劳运动条件下对大鼠心肌线粒体膜结果的研究[J]. *中国运动医学杂志*, 1992, 11(1): 22-26.
- [6] Ji L L, Gomez-Cabrera M C, Vina J. Exercise and-hormesis: Activation of cellular antioxidant signaling-pathway[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1067: 425-35.
- [7] 刘承宜, 袁建琴, 付德荣, 等. 以赛带练的内稳态研究[J]. *体育学刊*, 2008, 15(5): 81-84.
- [8] 刘承宜, 袁建琴, 陈少华. 科学训练、健康传播与奥运的平民化战略[J]. *体育学刊*, 2007, 14(3): 33-36.
- [9] 李江华, 刘承宜, 徐晓阳. 第 15 届亚运会优秀男游泳运动员代谢组学研究[J]. *体育科学*, 2008, 28(2): 42-46.
- [10] 郭书巧, 徐鹏, 倪万潮. 细菌的氧化应激及基因表达调控[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 24(4): 5-8.