

·运动人体科学·

## 急性力竭运动对青少年田径运动员血浆游离 DNA 的影响

王勇<sup>1</sup>, 傅博<sup>2</sup>, 朱荣<sup>3</sup>

(1. 潍坊学院 体育学院, 山东 潍坊 261061; 2. 辽宁省足球运动管理中心, 辽宁 沈阳 110081;  
3. 温州医学院 体育科学学院, 浙江 温州 325035)

**摘 要:** 为探讨急性力竭运动对青少年田径运动员血浆游离 DNA(cf-DNA)的影响, 寻找运动员机能监控的新标记物。安排 16 名青少年田径运动员在电动跑台上进行一次急性递增负荷力竭运动, 于运动前、运动后即刻、运动后 15 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、12 h 和 24 h 分别测定红细胞压积(HCT)、cf-DNA、血浆丙二醛(MDA)、肌酸激酶(CK)和肌红蛋白(Mb)。用心率表监控运动过程并记录运动时间和心率, 推算训练冲量(TRIMPS)。结果显示: HCT 在所有监测时间点均无显著性变化( $P>0.05$ ); cf-DNA 在运动后即刻显著性升高( $P<0.01$ ), 30 min 达峰值( $P<0.01$ ), 4 h 后降至安静水平( $P>0.05$ ); 血浆 MDA、CK 和 Mb 在运动后即刻均显著性升高( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$ ), 并一直持续到运动后 24 h( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。TRIMPS 与运动后 15 min 和 30 min 时 cf-DNA 水平呈显著正相关(分别为  $r=0.55$ ,  $P<0.01$ ;  $r=0.64$ ,  $P<0.05$ )。结果说明: cf-DNA 是组织损伤早期标志物, 可作为运动员机能监控的新指标。

**关 键 词:** 运动生物化学; 力竭运动; 血浆游离 DNA; 机能监控; 运动员

中图分类号: G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2011)05-0127-05

### Effects of acute exhaustive exercising on cell-free plasma DNA of teenage track and field athletes

WANG Yong<sup>1</sup>, FU Bo<sup>2</sup>, ZHU Rong<sup>3</sup>

(1. School of Physical Education, Weifang University, Weifang 261061, China;

2. Liaoning Center of Football Administration, Shenyang 110081, China;

3. School of Physical Education, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

**Abstract:** In order to probe into the effects of acute exhaustive exercising on cell-free plasma DNA of teenage track and field athletes, and to seek for a new marker for athlete performance monitoring, the authors arranged 16 teenage track and field athletes to do an acute exhaustive exercise on a power treadmill, tested their Hematocrit (HCT), Cf-DNA, plasma malondialdehyde (MDA), creatine kinase (CK) and myoglobin (Mb) respectively before exercising, immediately after exercising, at 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 12 h and 24 h after exercising, monitored the exercising process with a heart rate meter, recorded their exercising times and heart rates, calculated their exercising impulses (TRIMPS), and revealed the following findings: there was no significant change to HCT at all test times ( $P>0.05$ ); cf-DNA increased significantly immediately after exercising ( $P<0.01$ ), reached the peak value at 30 min ( $P<0.01$ ), and lowered to the calm level at 4 h ( $P>0.05$ ); plasma MDA, CK and Mb increased significantly immediately after exercising ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ), and maintained up to 24 h after exercising ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); TRIMPS was positively correlative significantly with the cf-DNA level at 15 min and 30 min after exercising ( $r=0.55$ ,  $P<0.01$  and  $r=0.64$ ,  $P<0.05$  respectively). The said findings indicated that cf-DNA is an early marker for tissue damage, can be used as a new index for athlete performance monitoring.

**Key words:** sports biochemistry; exhaustive exercise; cell-free plasma DNA; performance monitoring; athlete

收稿日期: 2011-01-25

基金项目: 浙江省教育厅科研计划项目(Y201017123)。

作者简介: 王勇(1979-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向: 体育教育与健康。通讯作者: 朱荣副教授。

机能监控是运动训练的关键组成部分,是运动员取得良好训练效果和优异比赛成绩的重要保障。科研人员和教练员不断探索新的方法和标记物,以便更科学地监控运动训练<sup>[1-2]</sup>。近年来,由于 PCR 及其相关分子生物学技术的发展,可在体液中定量并分析含量极少的游离 DNA,称为循环 DNA(circulation DNA),即存在于血浆或血清、脑脊液及滑膜液等体液中的细胞外 DNA,其中存在于血浆中的游离 DNA 称为血浆游离 DNA(cell-free plasma DNA, cf-DNA)<sup>[3-4]</sup>。凋亡以及坏死细胞的 DNA 释放入血即形成 cf-DNA,它已成为临床医学中多种疾病(包括肿瘤、创伤、妊娠相关疾病、感染性疾病、心肌梗死等)早期诊断、病情监测、疗效及预后评估的一种重要的分子标志物<sup>[3-4]</sup>。由于 cf-DNA 是一项无创性检测指标,因此有望在运动医学中得到应用。本研究旨在探讨一次急性力竭运动对青少年田径运动员 cf-DNA 的影响,同时将其与传统机能监控指标丙二醛(malondialdehyde, MDA)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)和肌红蛋白(myoglobin, Mb)进行比较,以期寻找运动员机能监控的新的敏感标记物。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 研究对象

16 名温州体育运动学校的男子田径运动员自愿参加本实验,年龄( $11.6 \pm 2.6$ )岁,身高( $1.74 \pm 0.14$ ) cm,体重( $68.6 \pm 5.4$ ) kg,训练年限( $4.1 \pm 0.8$ )年。所有运动员身体健康,无心血管疾病、急慢性感染、骨关节疾病及其他疾病史,无吸烟、饮酒等不良嗜好。

### 1.2 运动方案

实验前 72 h 内受试者均未进行过剧烈运动,实验前一晚至少睡眠 8 h。清晨空腹采静脉血 5 mL 后休息 15 min,然后在电动跑台上进行递增负荷实验,起始负荷为 5 km/h,持续 3 min,之后每 3 min 递增 1 km/h,直至力竭。整个过程用遥测心率表(Polar, S810, 芬兰)记录心率和运动时间。运动后即刻以及运动后(休息)15 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、12 h 和 24 h 静脉采血 5 mL, EDTA 抗凝。

### 1.3 运动负荷的量化——训练冲量(TRIMPS training impulses)

采用 Banister 等<sup>[5-6]</sup>提出的计算运动冲量的方法,公式为:运动冲量= $D \times X \times K$ 。其中, $D$ =运动时间(min), $X$ =训练强度=(运动时平均心率-安静心率)/(最高心率-安静心率), $K$ =训练强度加权指数= $e^{-\alpha}$ ( $e$  为欧拉常数,是自然对数的底 $\approx 2.718 28$ ;  $\alpha=1.92$ )。

运动时间、安静心率、运动时平均心率和最高心率均可通过心率表获得。

### 1.4 MDA、CK 和 Mb 的测定

取 300  $\mu$ L 全血,测定 HCT(红细胞压积)(全血分析仪, MICROS60, 美国);其余全血在低温下( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )离心 15 min( $3\ 000\ \text{r/min}$ ),取血浆测试各生化指标。MDA、CK 和 Mb 使用试剂盒(南京建成生物工程研究所)并严格按照操作说明进行,测试仪器:MD-100 半自动生化分析仪(日本)。

### 1.5 cf-DNA 的测定<sup>[7-9]</sup>

#### 1)血浆 DNA 提取和纯化。

取离心后的血浆 400  $\mu$ L,严格按照 QIAamp DNA Blood Mini Kit(Qiagen, 德国)的操作步骤进行 cf-DNA 的提取,然后用 50  $\mu$ L 双蒸水(不含 RNA 酶和 DNA 酶)进行洗脱。

#### 2)cf-DNA 定量分析。

取 10  $\mu$ L cf-DNA 置于透明载板,与 1:3 000 荧光染料 SYBR green I 等比例稀释并充分混匀后置于紫外及可见光成像分析系统(Bio-Rad, 美国)中,在激发光波长为 345 nm、吸收波长 500 nm 条件下,读取其发光强度。将检测所得不同样本 DNA 的发光强度代入根据标准含量 DNA 的发光强度所作的回归方程中,分别计算相应的 DNA 质量浓度。如果样本发光强度超过标准 DNA 发光强度范围,则将样本稀释后再进行定量检测,直到所测值在标准质量浓度范围内。每次对同一血浆样本检测 3 次,取其平均值,单位为  $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

### 1.6 统计方法

所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示,指标各时间点的比较采用重复测量的方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验。对 TRIMPS 和 cf-DNA 进行简单相关分析并计算 Pearson 相关系数 $\rho$ 。 $P<0.05$  为显著性水平, $P<0.01$  为非常显著水平。用 SPSS 14.0 统计软件进行数据处理。

## 2 结果及分析

### 2.1 各指标的时程变化

HCT 在所有监测时间点均无显著性变化( $P>0.05$ )(图 1),因此,运动干预与取血测试并没有造成机体的明显血浆丢失和血液浓缩,所有浓度指标均可较为准确反映其实际变化。

cf-DNA 在运动后即刻显著性升高( $P<0.01$ ),30 min 达峰值( $P<0.01$ ),随后逐渐下降,运动后 3 h 仍高于基础水平( $P<0.01$ ),运动后 4 h 降至基础值( $P>0.05$ ),并一直维持到 24 h( $P>0.05$ )(图 2)。

MDA 在运动后即刻明显升高( $P<0.05$ ),随后继续升高,并在运动后 24 h 出现峰值( $P<0.01$ )(图 3)。

CK 的变化与 MDA 相似,即运动后即刻升高

( $P<0.01$ ), 运动后 24 h 出现峰值( $P<0.05$ )(图 4)。

Mb 在运动后即刻升高( $P<0.01$ ), 运动后 4 h 出现峰值( $P<0.05$ ), 随后逐渐下降, 但在运动后 24 h 仍高于基础水平( $P<0.01$ )(图 5)。

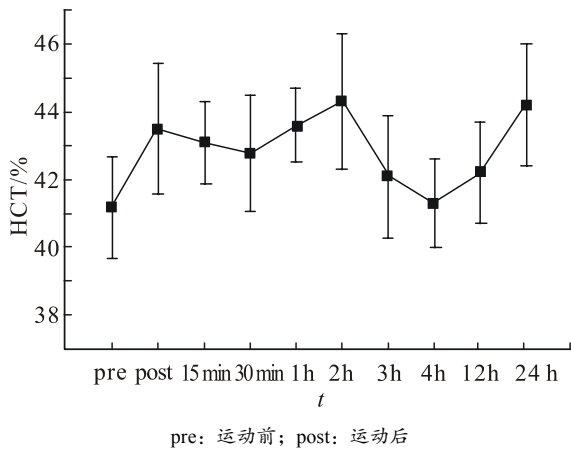
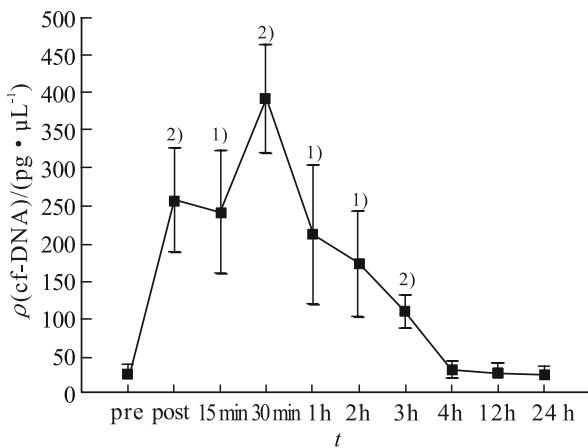
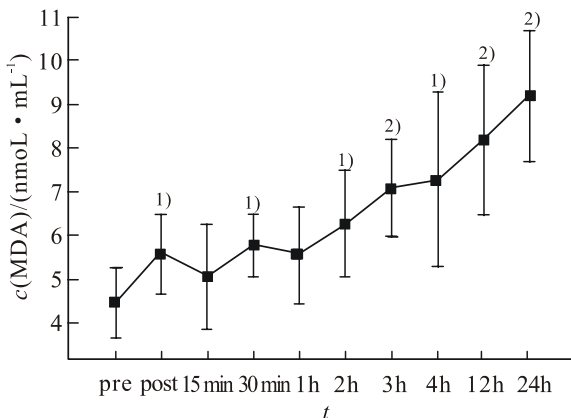


图 1 HCT 在运动前后的时程变化



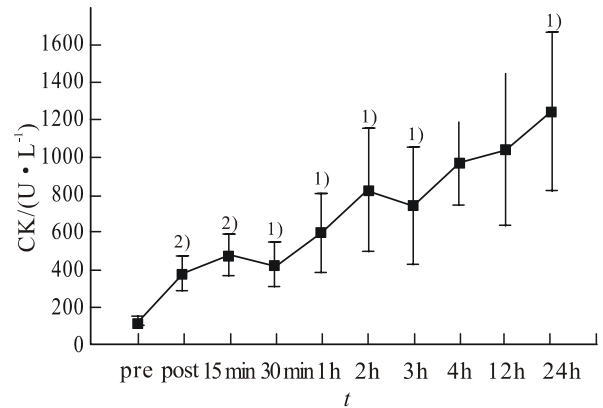
pre: 运动前; post: 运动后; 与 pre 比较, 1) $P<0.05$ , 2) $P<0.01$

图 2 cf-DNA 在运动前后的时程变化



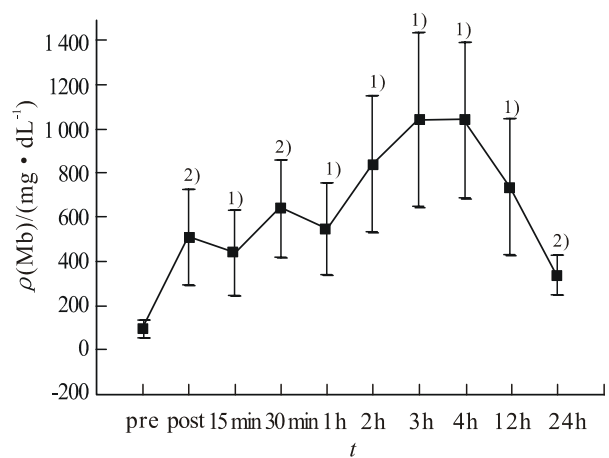
pre: 运动前; post: 运动后; 与 pre 比较, 1) $P<0.05$ , 2) $P<0.01$

图 3 MDA 在运动前后的时程变化



pre: 运动前; post: 运动后; 与 pre 比较, 1) $P<0.05$ , 2) $P<0.01$

图 4 CK 在运动前后的时程变化



pre: 运动前; post: 运动后; 与 pre 比较, 1) $P<0.05$ , 2) $P<0.01$

图 5 Mb 在运动前后的时程变化

## 2.2 相关分析

相关分析显示, TRIMPS 与运动后 15 min 和 30 min 时 cf-DNA 水平呈显著正相关(分别为  $r=0.55$ ,  $P<0.01$ ;  $r=0.64$ ,  $P<0.05$ )。运动之前与其他的时间点相关均无显著性。

## 3 讨论

剧烈运动时肌肉暂时性缺血, 运动后恢复期血流再灌注(缺血-再灌注), 可出现细胞内钙超载、炎症细胞浸润以及自由基产生增多, 继而发生 DNA 的氧化损伤和降解<sup>[9-10]</sup>。同时, 运动还通过机械作用造成肌纤维的损伤, 表现为肌痛、无力、血清肌肉蛋白升高等。上述代谢机制和机械机制可导致肌细胞的凋亡甚至坏死<sup>[11]</sup>。本研究中 MDA 在运动后显著性升高, 证实机体产生自由基增多; 运动后 CK、Mb 升高, 表明肌细胞受到运动诱导的缺血再灌注损伤使其破坏增加<sup>[12]</sup>, 其原因可能是自由基攻击 DNA、蛋白质和脂质(特别是膜的脂质双层), 从而产生氧化损伤所致<sup>[13]</sup>。DNA 损伤(核

苷酸氧化、双链断裂或 DNA 交联)后“事件”为 DNA 缺陷修复、凋亡和坏死<sup>[14-15]</sup>。DNA 缺陷修复会造成 DNA 序列发生改变,引起代谢紊乱甚至癌症<sup>[16]</sup>。非特异性 DNA 修复酶切除损伤部位并释放 DNA 片段<sup>[17]</sup>,碱基特异性的修复酶切除相应的碱基<sup>[18]</sup>,这些产物释放入血形成 cf-DNA。

cf-DNA 最早发现于癌症患者的血循环中<sup>[19]</sup>,随后证实与多种临床疾患相关联。因此,cf-DNA 已成为预测和诊断多种疾病的分子标志物。例如,创伤后发生多器官功能紊乱综合征的患者往往在创伤发生 15~30 min 后 cf-DNA 即显著升高,并持续数天;而无创伤并发症的患者 cf-DNA 往往出现较晚、升高幅度较低、持续时间较短<sup>[20]</sup>。癌症患者基因发生突变,血液中出现相应的突变 DNA、癌基因扩增产物以及肿瘤相关的病毒 DNA<sup>[21]</sup>。尽管 cf-DNA 与疾病关系的具体机制尚不明确,但诸多研究已证实,cf-DNA 来自于凋亡或坏死的组织细胞<sup>[4]</sup>。在本研究中,力竭运动后 cf-DNA 急剧增加同时伴随血清 CK 与 Mb 升高,提示骨骼肌细胞凋亡、DNA 片段的释放可能是 cf-DNA 的主要来源,但不是唯一来源。一些研究表明,运动后发生凋亡的肾小管细胞<sup>[22]</sup>和白细胞<sup>[23]</sup>均是 cf-DNA 的来源。因此,运动后 cf-DNA 的升高是多种类型细胞凋亡的结果。

cf-DNA 在运动后的时程变化规律罕有报道。Atamaniuk 等<sup>[23]</sup>观察了一次力量训练对 cf-DNA 的影响,结果发现训练后即刻 cf-DNA 显著升高,2 h 后显著下降;Fatouros 等对 17 名普通人进行为期 12 周的力量训练干预,cf-DNA 在训练后 72 h 仍高于安静水平。这可能与不同的研究对象、运动方式、运动周期和测试时间等有关,但上述研究未检测运动后即刻至运动后 2 h 这段时间内 cf-DNA 的变化。

本研究以田径运动员为受试对象,采用力竭运动模型,运动后的测量时间点较为密集,从而揭示了 cf-DNA 在力竭运动后的变化规律。cf-DNA 在运动后即刻显著升高,30 min 达峰值,随后逐渐下降,运动后 3 h 仍高于基础水平,运动后 4 h 降至基础值,时间上比 Atamaniuk 等的研究结果稍滞后,可能与本研究采用的力竭模型有关。cf-DNA 在运动后即迅速消除,这与传统机能监控指标 MDA、CK 和 Mb 在运动后显著升高并一直持续到 24 h 的时程变化规律不同,可能与肝脏和肾脏对 cf-DNA 的快速代谢有关<sup>[4]</sup>,也可能是降解的 DNA 片段从凋亡或坏死细胞释放入血的机制不同<sup>[23]</sup>,具体原因尚不清楚。上述现象提示 cf-DNA 可能是监测肌细胞损伤的早期、敏感、特异的预测与监控指标。

TRIMPS 与 cf-DNA 正相关,说明 cf-DNA 除了可

用于监测身体机能状态,还能反映训练负荷,即负荷越大,cf-DNA 水平越高,可能是不同训练负荷造成机体损伤程度不同所致。Lo 等<sup>[24]</sup>和 Rainer 等<sup>[25]</sup>分别证实了创伤与中风患者组织损伤的程度与 cf-DNA 呈正相关关系,本研究在一定程度上也验证了上述结论。TRIMPS 与运动后 30 min cf-DNA 的相关系数最高( $r=0.64$ ),而且 cf-DNA 在运动后 4 h 迅速消退,提示训练后的测试时间是一个关键因素,因此用此指标监控训练负荷时,应在运动后 30 min 左右取血测定较为合理。

本研究探讨了力竭运动后 cf-DNA 的变化规律以及与训练负荷的关系,但仍有诸多问题尚未解决。今后的研究需要进一步探讨运动诱导的 cf-DNA 的细胞来源和具体机制,不同运动方式、不同竞技项目以及不同机能状态对 cf-DNA 的影响,揭示 cf-DNA 对运动反应和适应的规律,从而为运动员机能监控提供敏感、无创的标志物,为运动员取得良好训练效果和优异比赛成绩提供科研保障。

cf-DNA 是组织的损伤早期标志物,可作为运动员机能监控的新指标,但其时程变化规律不同于 MDA、CK 和 Mb 等传统指标。

## 参考文献:

- [1] 何子红,胡扬. 体能训练个性化新指标——基因标记[J]. 中国运动医学杂志, 2010, 29(5): 597-606.
- [2] 郭兴明,杨勇,肖守中,等. 运动员心功能评估新方法和新指标的研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2010, 26(3): 380-383.
- [3] 孙群,王德生. 游离 DNA 与临床肿瘤的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(9): 1348-1350.
- [4] Saukkonen K, Lakkisto P, Pettila V, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock[J]. Clin Chem, 2008, 54(6): 1000-1007.
- [5] Banister E W, Calvert T W. Planning for future performance: implications for long term training[J]. Can J Appl Sport Sci, 1980, 5(3): 170-176.
- [6] Manzi V, Castagna C, Padua E, et al. Dose-response relationship of autonomic nervous system responses to individualized training impulse in marathon runners[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(6): H1: 733-1740.
- [7] 刘丽荣. 上皮性卵巢癌患者血浆中的 cDNA 水平变化及意义[J]. 山东医药, 2010, 50(34): 93-94.
- [8] 今毅,郑晖,韩冰. 循环 DNA 定量分析在乳腺癌

- 诊断中的应用[J]. 微循环学杂志, 2007, 17(4): 62-63.
- [9] Wohlgemuth S E, Seo A Y, Marzetti E, et al. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise[J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(2): 138-148.
- [10] 张桂忠, 姜宁, 张勇. 急性运动中骨骼肌线粒体氧化应激机制研究[J]. 内蒙古师范大学学报: 自然科学汉文版, 2009, 38(3): 337-340.
- [11] Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2010, 48(6): 757-767.
- [12] Goodman C, Henry G, Dawson B, et al. Biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after a twenty-one kilometre run[J]. *Aust J Sci Med Sport*, 1997, 29(4): 95-98.
- [13] Guachalla L M, Rudolph K L. ROS induced DNA damage and checkpoint responses: influences on aging?[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(20): 4058-4060.
- [14] Chevion S, Moran D S, Heled Y, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(9): 5119-5123.
- [15] Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, et al. The effects of moderate-strenuous-and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain[J]. *Neurochem Int*, 2005, 46(8): 635-640.
- [16] Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins[J]. *Exerc Immunol Rev*, 2001, 7: 66-89.
- [17] Kruger K, Frost S, Most E, et al. Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 296(5): R1518-1527.
- [18] Leshner D T, Pommier Y, Stewart L, et al. 8-Oxoguanine rearranges the active site of human topoisomerase I[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(19): 12102-12107.
- [19] Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. *Cancer Res*, 1977, 37(3): 646-650.
- [20] Lam N Y, Rainer T H, Chan L Y, et al. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(8): 1286-1291.
- [21] 杨英俊, 陈辉. 循环DNA的临床应用[J]. 生命的化学, 2009, 26(6): 822-825.
- [22] Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Murawska-Cialowicz E, et al. Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat[J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2004, 63(2): 213-216.
- [23] Atamaniuk J, Stuhlmeier K M, Vidotto C, et al. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro-and anti-apoptotic genes in mononuclear cells[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2008, 104(4): 711-717.
- [24] Lo Y M, Rainer T H, Chan L Y, et al. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients[J]. *Clin Chem*, 2000, 46(3): 319-323.
- [25] Rainer T H, Wong L K, Lam W, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(4): 562-569.

