

热处理对大鼠骨骼肌内质网应激的影响及对骨骼肌适应性的保护作用

李焕春¹, 许小刚², 肖国强¹

(1.华南师范大学 民族体质与健康研究中心/体育科学学院, 广东 广州 510006;

2.黄淮学院 体育系, 河南 驻马店 463000)

摘 要: 为了研究热处理对大鼠骨骼肌内质网应激影响及对骨骼肌的保护作用, 采用递增的热处理为研究手段, 将 SD 大鼠被随机分成安静对照组(C)和热处理组(H), 其中热处理组按照热处理完成后的时间再分为热处理即刻组(H₁)、热处理 24 h 组(H₂)、热处理 48 h 组(H₃)和热处理 6 d 组(H₄), 每组 8 只。结果显示: 热处理后 H₁、H₂、H₃ 组 CK、LDH 浓度都比 C 组低, 但差异无显著性意义; 热处理 H₂ 组 SOD 活性最高, 与 C 组比较呈显著性差异($P < 0.05$), 且 H₂ 组 MDA 浓度显著低于 C 组 ($P < 0.05$), 其余各组低于 C 组, 但无显著性差异; 热处理后 H₁、H₂、H₃ 组骨骼肌中 GRP78 的表达量与 C 组呈显著增加。结果表明: 热处理后大鼠骨骼肌产生应激蛋白, 发生内质网应激反应, 并使大鼠骨骼肌产生了适应性保护, 从而避免骨骼肌的损伤。

关 键 词: 运动生物化学; 热处理; 骨骼肌; 内质网应激; 适应性保护; 大鼠

中图分类号: G804.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1006-7116(2013)03-0130-04

Effects of heat treatment on the endoplasmic reticulum stress of skeletal muscles of rats and its function in protecting the adaptability of skeletal muscles

LI Huan-chun¹, XU Xiao-gang², XIAO Guo-qiang¹

(1.Center for National Physical Fitness and Health, School of Physical Education, South China Normal University, Guangzhou 510006, China; 2.Department of Physical Education, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China)

Abstract: In order to study the effects of heat treatment on the endoplasmic reticulum stress of skeletal muscles of rats and its functions in protecting skeletal muscles, by using incremental heat treatment as their research means, the authors divided SD rats randomly into a calm control group (C) and a heat treatment group (H), further divided the heat treatment group into an immediate after heat treatment group (H₁), a 24 h after heat treatment group (H₂), a 48 h after heat treatment group (H₃) and a 6d after heat treatment group (H₄) according to the times after heat treatment was finished; each group contained 8 rats. The results showed the followings: after heat treatment, the CK and LDH concentrations of the rats in groups H₁, H₂ and H₃ were lower than those of the rats in group C, but the differences were not significant; the SOD activity of the rats in heat treatment group H₂ was the highest, significantly different from that of the rats in group C ($P < 0.05$), and the MDA concentration of the rats in group H₂ was significantly lower than that of the rats in group C ($P < 0.05$), the MDA concentrations of the rats in other groups were lower than that of the rats in group C, but the differences were not significant; after heat treatment, the level of expression of GRP78 of the rats in groups H₁, H₂ and H₃ increased significantly as compared with that of the rats in group C. The results indicated the followings: after heat treatment, the skeletal muscles of the rats produced stress proteins, endoplasmic reticulum stress reaction occurred, which caused the skeletal muscles of the rats to produce adaptive protection, thus preventing skeletal muscle damage.

Key words: sports biochemistry; heat treatment; skeletal muscle; endoplasmic reticulum stress; adaptive protection; rat

研究证实,热应激能明显改善心肌缺血再灌注所受损伤^[1],机体细胞这种经历应激状态后改变细胞表型增强抵抗所受损伤的能力称之为预适应,这种热应激的保护作用与热休克蛋白的增加密切相关。内质网在受到长时间应激会发生内质网应激反应产生应激蛋白,对细胞发挥保护作用,其中某些应激蛋白属于热休克蛋白,如 GRP78/Bip,因此推测热应激对机体的作用可能通过内质网应激反应来实现,而目前从内质网应激的角度去探讨热应激的文献非常少。本研究旨在从内质网应激的角度,研究热处理对大鼠骨骼肌内质网应激的影响,并从内质网应激的角度探讨热应激内源性抗损伤的适应性保护作用机制,为热应激处理在运动医学中的应用提供依据。

1 实验动物与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,平均体质量为(140.25 ± 12.34) g,购自南方医科大学实验动物中心,置于温度为(22.0 ± 0.3) °C,湿度 50%~60%下清洁级动物房中喂养,所有动物自由饮食、饮水。大鼠在适应性喂养 3 d 后随机分成对照组(C)(8 只)和热处理组(H)(32 只)。其中热处理组在热适应完毕后,再按具体宰杀时间进行分组:预处理即刻组(H₁)、热处理 24 h 组(H₂)、热处理 48 h(H₃)以及热处理后 6 d(H₄)组。

1.2 实验方案

热处理模型在参照 Currie R W^[2]和 Diana A^[3]热模型的基础上建立。本实验设定热处理的温度坚持以下原则,避免热处理时大鼠所受其他刺激的影响,采用非麻醉方式进行;保证大鼠热处理后不会因温度原因而死亡。大鼠置于恒温桑拿环境中加热,并监测肛温。热干预 4 d 为一个周期,3 d 热处理,1 d 休息。一共 4 个周期,热处理温度依次递增,湿度控制在 50%,监测大鼠直肠温度达到预期值以后维持 15 min。每次热处理总时间约为 30~35 min。热处理期间,严格控制温度和湿度,并观察大鼠行为,整个热处理期间温度及湿度控制如表 1。

表 1 热处理期间的温度和相对湿度($\bar{x} \pm s$)

周期	干球温度/°C	湿球温度/°C	相对湿度/%	直肠温度/°C
1	41.0±0.5	33.0±0.5	50	39.0±0.5
2	43.0±0.5	34.0±0.5	50	39.5±0.5
3	44.5±0.5	35.5±0.5	50	40.5±0.5
4	45.5±0.5	36.5±0.5	50	41.5±0.5

1.3 动物取材

热处理大鼠在完成热处理后宰杀。宰杀时采用质

量分数为 7%水合氯醛(每 100 g 体重 0.4 mL)腹腔注射麻醉。腹主动脉取血后放入抗凝管,分离血清后置于 -70 °C 冰箱中保存待用;取血后进行腓肠肌分离,所得腓肠肌用 4 °C 预冷的生理盐水清洗后用滤纸吸干,铝纸包裹置于液氮中保存。

1.4 测试方法

采用酶动力法并利用 721 分光光度计测试血清 CK、LDH 浓度,试剂由上海沪峰生物科技有限公司提供;采用黄嘌呤氧化酶法测试血清 SOD,硫代巴比妥酸(TBA)法测试 MDA,试剂由南京建成生物工程研究所提供,检测方法严格按照试剂盒所说明进行;GRP78 测定通过蛋白免疫印迹 Western-Blotting 检测,一抗由 Santa Cruz Biotechnology 公司提供,采用 Image-proplus 软件进行分析,并以靶蛋白条带积分光密度值(Integrated Absorbance, IA=平均光密度值×蛋白条带面积)除以 β -actin 条带积分光密度值的结果作为蛋白表达的相对水平。

1.5 实验数据统计

实验数据采用 SPSS10.0 软件包处理,实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,采用两样本均数 *T* 检验分析, *P*<0.05 显著性, *P*<0.01 非常显著性。

2 结果及分析

2.1 热处理对大鼠血清 CK、LDH 活性的影响

热处理后不同时相 CK、LDH 活性变化的结果显示, H₁、H₂、H₃ 组的值都比 C 组低, H₄ 组值高于 C 组,但各时相所测值与 C 组都无显著性差异(见表 2)。

表 2 热处理后各组大鼠 CK、LDK 酶活性($\bar{x} \pm s$)比较 U/L

组别	CK	LDK
C	964.45±123.41	840.57±120.31
H ₁	939.28±104.15	815.37±224.81
H ₂	952.46±207.47	825.25±101.07
H ₃	935.54±101.67	837.90±153.08
H ₄	970.07±101.34	846.75±143.34

2.2 热处理对大鼠血清 SOD 活性及 MDA 浓度的影响

结果显示,热处理后 H₂ 组 SOD 活性最高,与 C 组比较呈显著性差异(*P*<0.05); H₁、H₃ 及 H₄ 组 SOD 活性都比 C 组高,但不呈显著性差异; H₂ 组 MDA 浓度显著低于 C 组(*P*<0.05),其余各组低于 C 组,但不表现显著差异性(见表 3)。

表 3 热处理后各组大鼠血清 SOD 活性及 MDA 浓度($\bar{x} \pm s$)结果比较

组别	SOD 活性/(U·mL ⁻¹)	c(MDA)/(mmol·mL ⁻¹)
C	93.01±10.24	6.12±0.86
H ₁	127.21±14.41	5.24±0.15
H ₂	138.04±24.81 ¹⁾	4.02±0.13 ¹⁾
H ₃	101.21±21.54	5.13±0.43
H ₄	96.05±4.76	6.03±0.27

1)与 C 组比较, *P*<0.05

2.3 内质网驻留分子伴侣 GRP78 在热处理后大鼠骨骼肌中表达的变化

采用 GRP78 特异性抗体进行免疫印迹检测, 分别以 β -actin 蛋白条带 IA 值反映其表达水平。结果显示, 热处理结束后 H₁ 组、H₂ 组、H₃ 组骨骼肌中 GRP78 的表达量较 C 组非常显著增加 ($P < 0.01$), 之后出现表达下调(见图 1)。

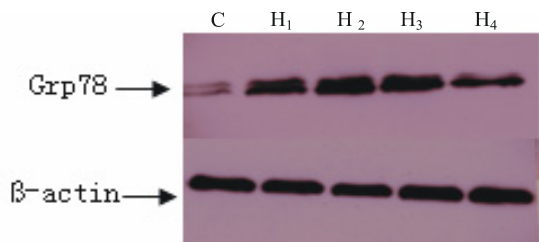


图 1 热处理对 GRP78 蛋白表达的影响

3 讨论

机体在热应激下产生的反应是一种非特异性表达, 生物体在高温刺激后都可产生应激反应, 并产生热适应, 以提高热耐受力, 提高细胞抗损伤能力, 因此热通常用来作为提高机体保护和耐受力的刺激因素。一次性的热刺激只提供暂时的保护作用, 而长时间热刺激产生的保护作用持续时间长。研究表明, 两个星期的热处理可明显提高机体在细胞、器官水平以及整体水平上的对氧化应激、长时间缺血以及耐热能力等其他应激的耐受能力^[4-5], 这种保护作用可以维持终止热处理后 3~4 周, 使热应激生物机体在某些功能上发生适应的改变, 本实验方案中采用了两周左右的热刺激。

研究表明, 机体细胞内质网的稳定对维持细胞功能起着重要作用^[6]。机体在低氧、糖缺乏、自由基堆积和钙失衡等不利环境下会导致内质网应激, 激活未折叠蛋白反应, 使蛋白折叠能力提高、蛋白合成抑制, 以适应不利应激^[7-8]的刺激, 并通过内质网应激蛋白 GRP78、CHOP/GADD153 及 ERP72 等应激蛋白反映出来。GRP78 属于内质网驻留蛋白, 为特异性的内质网分子伴侣, 是内质网应激的经典标志物。大量研究证明, 热休克蛋白的诱导表达是介导缺血预适应、热处理、低氧预处理以及代谢预处理等延迟保护作用的关键的效应分子^[9], 而内质网驻留蛋白 GRP78 与热休克蛋白中的 HSP70 家族具有高度同源性, 因此属于热休克蛋白中的 HSP70 家族。本实验中, 大鼠在经过 2 周左右的热刺激后, H₁、H₂、H₃ 组中的大鼠骨骼肌内质网驻留蛋白 GRP78 较安静对照组显著增加, 内质网驻留蛋白 GRP78 的大量生成, 预示大鼠在热应激过程中产生了内质网应激反应, 以抵御热刺激对骨骼肌带

来的不利影响, 维护骨骼肌细胞功能的正常。

机体应激反应是细胞应激反应的综合体现, 现已证实, 内质网应激反应发生在线粒体应激和细胞核应激之前, 是应激发生在细胞中的最初反应, 并通过 GRP78 等特征蛋白体现^[10]。GRP78 属于葡萄糖调节蛋白, 在应激反应调节时其基因的转录活性可提高 10~25 倍, 表达量显著增高, 通过表达上调可缓解内质网内未折叠蛋白负荷, 并与内质网中错误折叠和未折叠蛋白结合, 可以作为分子伴侣参与蛋白质的折叠和转运过程, 从而恢复蛋白质正确结构, 从而维持了内质网钙稳态及内环境的稳定^[11]。有实验证明, 生物体保护性预热应激后其体内热应激蛋白合成增加, 并且应激蛋白的保护能力随着应激后恢复时间的推移而增强, 且与 HSP70 高表达有关。当恢复到一定时间, 动物获得最强的保护能力, 此时组织的 HSP70 将达到高峰或是处于很高水平, 而在此之后, 保护能力又会随着 HSP70 的下降而降低^[12-13]。本实验中, 在热适应结束后的 48 h 骨骼肌内质网驻留蛋白 GRP78 仍然处于很高的值也证实了这种保护能力。

研究表明, 细胞具有内源性的抗损伤机制, 帮助其从可逆性的损伤中恢复和适应, 预防下一次损伤, 适当的预热处理可以有效调动动物机体内的保护机制^[14-15], 这种作用机制可能与抗氧化能力的变化有关, 心肌细胞能够在热应激预适应后 24~48 h 内, 通过改变细胞表型以抵抗随后的损伤, 进行自我保护^[16]并增加大鼠心肌抗氧化酶 Mn-SOD 表达^[17-18]。除心肌外, 肝脏及其他器官在热应激后也能获得抵抗随后氧自由基损害的能力^[19], 并且这种能力与热休克蛋白有关。本实验热适应结束后 H₂ 组 SOD 活性最高, 与安静对照组比较呈显著性差异, 虽然 H₁、H₃ 及 H₄ 组 SOD 活性与安静对照组相比都不呈显著性差异, 但仍比对照组的值要高, 同时 H₂ 组 MDA 浓度显著低于安静对照组, 同时大鼠热适应后各时相血清 CK 和 LDH 活性比安静组低, 表明大鼠在经过一段时间的预热适应后, 机体的抗氧化能力得到了改善, 提高对抗应激的能力。有研究发现, 过度热应激可能给机体带来损伤, 长时间高温会促使机体 SOD 活性降低, MDA 浓度增加^[20], 而本实验采取的热适应方案并没给大鼠带来骨骼肌等组织的损伤, 可能是本实验大鼠热适应的温度不高、时间不长, 并且热适应的温度逐渐提高, 因而可能避免这一影响。

热适应处理能够有效调节动物器官组织和细胞的保护功能, 表明机体内存在有一个启动内源性保护机制的反馈通路, 预热适应产生的作用主要通过细胞信号转导机制来完成。内质网应激是细胞内一种自我保护

性应激机制的体现,与细胞内多种信号转导通路和调控有关。热环境下机体新陈代谢的加快,改变了细胞内环境状态,诱导细胞产生内质网应激反应,生成内质网应激相关蛋白,启动细胞应激反应信号转导通路,并可能通过反馈作用促进机体内源性抗氧化酶蛋白的生成,增加抗氧化物活性,减少氧自由基的产生,阻止细胞损伤,增强细胞耐受力,同时激活机体的免疫机制,增强机体对外界损伤的抗御能力^[21]。

本实验通过热处理使大鼠骨骼肌产生内质网应激反应并诱导大鼠骨骼肌功能发生适应性改变,同时增加了骨骼肌抗损伤能力,有利于骨骼肌的保护。由于内质网应激是维持细胞功能的重要手段,因此可以利用热适应提前诱导骨骼肌细胞产生内质网应激,从而提高骨骼肌细胞抵御未来不利环境的刺激,为从内质网应激的角度探讨运动性损伤的防治提供新的可能途径和依据。

参考文献:

- [1] Plumier J C, Kru A M, Currie R W, et al. Mice expressing the humanpocampal neuron resistant toinducible HSP70 ischemic injury. *Transgenic hsp[J]. Cell Stress Chaperones*, 1997, 2(3): 162.
- [2] Currie R W, Currie R W, Tanguay R M, et al. Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion reperfusion in rabbit hearts[J]. *Circulation*, 1993, 87: 963-971.
- [3] Diana A L, John V H, Alastair S, et al. Prior heat stress improves survival of ischemic-perfused skeletal muscle in vivo *Muscle[J]. Nerve*, 2000, 23: 1847-1855.
- [4] Hickey M J, Hurley J V, Morrison W A. Temporal and spatial relationship between no-reflow phenomenon and oste ischemic necrosis in skeletal muscle[J]. *Am J Physiol*, 1996, 271: 1277-1286.
- [5] Mestral R, Giordano F, Conde AGWD. Adenovirus-mediated gene transfer of a heat shock protein 70 (hsp70) protects against simulated ischemia[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28: 2351-2358.
- [6] 李焕春,肖国强. 内质网应激蛋白介导运动后骨骼肌钙稳态调节的研究[J]. *体育科学*, 2009, 29(10): 38-40.
- [7] Paschen W, Mengesdorf T. Cellular abnormalities linked to endoplasmic reticulum dysfunction in cerebrovascular disease-therapeutic potential[J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 108(3): 362-375.
- [8] Yatvin M B, Cramp W A. Role of cell membranes in hyperthermia, some observations and theories reviewed [J]. *Int J Hyperthermia*, 1993, 9(2): 165.
- [9] 凡启为,肖国强. 运动对骨骼肌、心肌中热休克蛋白表达影响的研究进展[J]. *体育学刊*, 2005, 12(5): 13-125.
- [10] 李焕春,肖国强. 内质网应激和热休克与运动[J]. *体育学刊*, 2009, 16(1): 110-112.
- [11] Yang G H, Li S Pestka J J. Own-regulation of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/Bip by vomitoxin (Deoxynivalenol)[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 162(3): 207-217.
- [12] Niashita N, Hoshida S, Nishida M, et al. Time course of tolerance to sepsis-reperfusion injury and induction of heat shock protein 72 by heat stress in the rat heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(7): 1815-1821.
- [13] Hotchkiss R, Nunnally L, Lindquist S, et al. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin[J]. *Am J Physiol*, 1993, 265(6): 1447-1457.
- [14] Bond U, Schlesinger M J. Heat shock proteins and development[J]. *Adv Genet*, 1987, 24(1): 10-19.
- [15] Hotchkiss R, Nunnally I, Lindquist S, et al. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin[J]. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 1993, 265: 1447-1457.
- [16] Joyeux M, Lagneux C, Bricca G, et al. Heat stress-induced resistance to myocardial infarction in the isolated heart from transgenic(mREN-2)27 hypertensive rats [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 40(1): 124-130.
- [17] Yamashita N, Hoshida S, Tanihuchi N, et al. Whole-body hyperthermia provides biphasic cardio protection against ischemia-reperfusion injury in the rat[J]. *Circulation*, 1998, 98: 1414-1421.
- [18] Knowlton A A. The role of heat shock proteins in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27: 121-131.
- [19] 孔垂辉,徐玉明,李俊平,等. 预热处理对大强度运动后大鼠肝脏 HSP70 和 SOD、MDA、GSH、GPT 的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2008, 27(5): 360-363.
- [20] 李权超,何英强,谭终意. 湿热应激对小鼠脂质过氧化反应的影响[J]. *解放军预防医学杂志*, 1997, 15(5): 353-355.
- [21] Buss R, Fleming I. Regulation and functional consequence of endothelial nitric oxide formation[J]. *Ann Med*, 1995, 27: 331-334.