有氧运动对大鼠骨骼肌线粒体Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶及线粒体肿胀的影响***

曹 颖[1]，张 敏[2]，董嘉良[1]，郭彦青[1]，赵晓丽[1]，王丽艳[1]，陈立军[2]，康英姿[1]

Effects of aerobic exercise on the activity of mitochondrial Na^+, K^+-ATPase, Ca^{2+}-ATPase and mitochondrial swelling

Cao Ying[1], Zhang Min[2], Dong Jia-liang[1], Guo Yan-qing[1], Zhao Xiao-li[1], Wang Li-yan[1], Chen Li-jun[2], Kang Ying-zi[1]

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that aerobic exercise can improve mitochondrial function. However, the effect features of aerobic exercise with different periods on bodies remain poorly understood.

OBJECTIVE: To investigate the effects of aerobic exercise with different periods on the activity of mitochondrial Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase, as well as mitochondrial swelling.

METHODS: Sprague Dawley rats were randomly separated into four groups, namely, control, 2-week, 4-week and 6-week aerobic exercise groups. The control mice had not undergone treadmill running. The other 3 groups carried on the corresponding period of exercise in the way of treadmill running, and the aerobic exercise mode was designed by referencing Bedford TG standard. Then the skeletal muscle mitochondria were isolated by differential centrifugation to measure their Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase activities, as well as the extent of mitochondrial swelling.

RESULTS AND CONCLUSION: There were no significant differences between the control group and 2-week aerobic exercise group. However, with the exercise prolonged, the Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase activities increased ($P < 0.05$) and the extent of the mitochondrial swelling decreased ($P < 0.05$). The present findings demonstrate that, aerobic exercise can protect the activity of mitochondrial Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase and increase the function of mitochondria. But it needs some time to adapt.

Cao Y, Zhang M, Dong JL, Guo YQ, Zhao XL, Wang LY, Chen LJ, Kang YZ. Effects of aerobic exercise on the activity of mitochondrial Na^+, K^+-ATPase, Ca^{2+}-ATPase and mitochondrial swelling.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(37): 6971-6974. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景：研究表明有氧运动可提高线粒体功能，但在不同时期的作用特点还不明确。

目的：观察不同周期有氧运动对大鼠骨骼肌线粒体 Na^+，K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶以及线粒体肿胀的影响。

方法：将 SD 大鼠随机分为正常对照组，有氧运动 2，4 和 6 周组。正常对照组不进行有氧运动，其余 3 组则参照 BedfordTG 标准，采用跑台运动方式，建立有氧运动模型进行相应的运动周期锻炼。测定各组大鼠骨骼肌线粒体 Na^+，K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶的活性以及线粒体肿胀程度。

结果与结论：有氧运动 2 周组各指标与对照组比较无差异。有氧运动 4 和 6 周组线粒体 Na^+，K^+-ATP 酶、Ca^{2+}-ATP 酶活性均增高($P < 0.05$)，线粒体肿胀程度降低($P < 0.05$)。实验结果表明，有氧运动可保护线粒体 Na^+，K^+-ATP 酶、Ca^{2+}-ATP 酶的活性，提高线粒体功能，但需要一定的时间积累。

关键词：有氧运动；线粒体；Na^+，K^+-ATP 酶；Ca^{2+}-ATP 酶；线粒体肿胀
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.37.031

曹颖，张敏，董嘉良，郭彦青，赵晓丽，王丽艳，陈立军，康英姿. 有氧运动对大鼠骨骼肌线粒体 Na^+，K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶及线粒体肿胀的影响[J].中国组织工程研究与临床康复，2010，14(37):6971-6974.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

[1]Department of Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; [2]Department of Biochemistry, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Cao Ying★, Studying for master's degree, Department of Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China bulinna09@163.com

Correspondence to: Chen Li-jun, Professor, Department of Biochemistry, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China chenlijun67@eyou.com

Correspondence to: Kang Ying-zi, Associate professor, Department of Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China yingjl9900@yahoo.com.cn

Supported by: the Science Foundation of Tianjin Medical University, No. 2009XK10*; the Key Project of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, No. WKH2009Z02*

Received: 2010-06-05
Accepted: 2010-07-14

0 引言

关于有氧运动对机体的影响早有研究，例如有氧耐力运动[1]、长时间有氧力竭运动等[2]。但是目前关于不同周期有氧运动对机体影响的研究较少

由于线粒体作为适应运动方式最为敏感的细胞器，因此，实验通过建立大鼠跑台运动模型，阐述不同周期有氧运动对骨骼肌线粒体Na^+,K^+-ATP酶、Ca^{2+}-ATP酶活性以及线粒体肿胀程度的影响。

1 材料和方法

设计：随机对照动物实验。

时间及地点：于2009-08/2010-07在武警医学院生物化学实验室和天津医科大学生物化学实验室完成。

材料：健康雄性SD大鼠，普通级，体质量175~225 g，由北京大学医学部实验动物科学部提供(动物许可证号：SCXK2002-0001)。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意

[1] 天津医科大学生物化学教研室，天津市 300070；
[2] 武警医学院生物化学教研室，天津市 300162

曹颖★，女，1985年生，江西省人，天津医科大学在读硕士，主要从事生物化学教学与研究工作。
bulinna09@163.com

通讯作者：陈立军，教授，武警医学院生物化学教研室，天津市 300162
chenlijun67@eyou.com

并列通讯作者：康英姿，副教授，武警医学院生物化学教研室 天津市，300162
yingjl9900@yahoo.com.cn

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2010)37-06971-04

收稿日期: 2010-06-05
修回日期: 2010-07-14
(20100605001/WJ ·Z)

见》[3]。

试剂和仪器：

试剂及仪器	来源
蔗糖、咪唑、甘露糖、	美国 Sigma 公司
KCl，KH_2PO_4	天津市化学试剂六厂
Folin-酚蛋白定量试剂盒	北京鼎国生物技术有限责任公司
超微量 ATP 酶试剂盒	南京建成生物科技公司
FT-200 三通道大鼠跑步机	成都泰盟科技有限公司
UV-2450 紫外/可见分光光度计	日本岛津公司

实验方法：

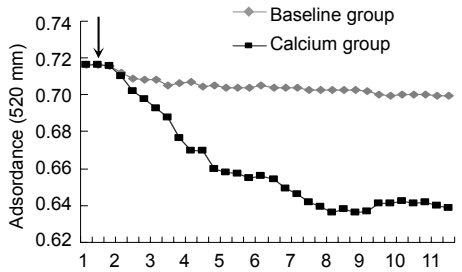
分组和建模：大鼠适应性饲养1周，然后进行3 d适应性跑台训练(坡度为0°，速度8.2 m/min，10 min/d)后，按体质量随机分为4组：正常对照组、有氧运动2，4，6周组，每组8只。

参照Bedford TG标准[4]，有氧运动2，4，6周组以跑台方式，建立有氧运动模型，进行相应的运动周期锻炼。锻炼模式为：一星期连续训练6 d。其初始速度为15 m/min，每间隔5 min，速度增加3 m/min，当增至20 m/min时将跑台坡度变为5%，训练60 min。训练过程中使用电刺激或毛刷刺激，维持大鼠在跑台跑道前1/3处，以保证运动强度恒定。正常对照组大鼠正常笼内生活，不运动。

骨骼肌线粒体的提取：4组大鼠用差速离心法提取骨骼肌线粒体[5]。在冰上迅速将大鼠处死，取跖肌组织1 g，置于0.3 mol/L蔗糖7 mL，10 mmol/L 咪唑(pH 7.4)溶液中，使用电动玻璃匀浆器匀浆，组织匀浆液在4 ℃条件下800 *g*离心10 min，弃沉淀，上清液再离心，4 ℃，8 700 *g*，20 min，弃上清，得到的少量沉淀用洗液(成分为25 mmol/L蔗糖，75 mmol/L甘露糖，50 μmol/L EGTA，0.1 mol/L KCl，pH 7.4，4 ℃)洗1遍，再次8 700 *g*，离心20 min，弃上清，沉淀物即为线粒体。线粒体蛋白含量用Folin-酚蛋白定量试剂盒(Lowry法)测定[6]，结果用mg/mL表示。

线粒体Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶的活性测定：用超微量ATP酶试剂盒测定各组大鼠骨骼肌线粒体Na^+，K^+-ATP酶、Ca^{2+}-ATP酶的活性。应用UV-2450 紫外/可见分光光度计检测其吸光度值(*A*)，波长636 nm，结果用μkat/g表示。

线粒体肿胀实验：线粒体肿胀源于线粒体膜电位的缺失及线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore，mPTP)的开放，表现在波长520 nm处吸光度值的下降，而钙超载可导致mPTP的开放[7]。反应体系为：120 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris，20 mmol/L MOPS，5 mmol/L KH_2PO_4(pH 7.4)，线粒体蛋白浓度为0.25 mg/mL。加入$CaCl_2$使其终浓度为50 μmol/L即200 nmol Ca^{2+}/mg线粒体蛋白，可在520 nm波长处观察到吸光度值(*A*)的下降。每隔20 s测1次*A*值，监测10 min，见图1。以其下降幅度(*A*值变化的量Δ*A*与初始*A*值之比，即Δ*A* /*A*，结果用百分数表示)来评价。



1: 0 s; 2: 60 s; 3: 120 s; 4: 180 s; 5: 240 s; 6: 300 s; 7: 360 s; 8: 420 s; 9: 480 s; 10: 540 s; 11: 600 s. At arrow, 5 μL of swelling buffer (Baseline) or 5 mL of $CaCl_2$ were added. And the final $CaCl_2$ concentration was 50 μmol/L (200 nmol/mg mitochondrial protein). Now the A declined at 520 nm. Baseline means changes in A without Ca^{2+}, that is in nature. The extent of the mitochondrial swelling was calculated through the change in A with Ca^{2+}

Figure 1 Delineation of mitochondrial swelling
图 1 线粒体肿胀示意图

主要观察指标：差速离心法提取各组大鼠骨骼肌线粒体，测定线粒体Na^+，K^+-ATP酶、Ca^{2+}-ATP酶的活性以及线粒体肿胀的程度。

设计、实施、评估者：设计为第一作者、实施为第二作者、评估者为第三作者，均受过正规培训，未使用盲法评估。

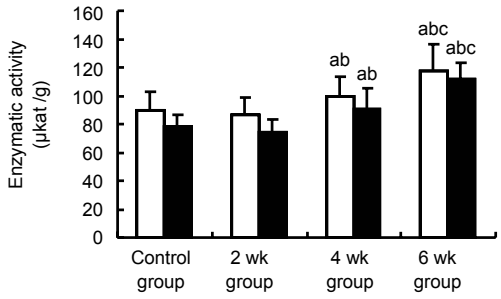
统计学分析：实验计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS 16.0统计学软件对数据进行统计学分析，数据差异比较采用单因素方差分析和SNK-*q*检验，$P < 0.05$为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析定 大鼠32只均进入结果分析，无死亡和感染，无脱落。

2.2 不同训练周期鼠骨骼肌线粒体Na^+，K^+-ATP酶活性比较 有氧运动2周组与对照组骨骼肌线粒体Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶活性差异均无显著性意义，而有氧运动4，6周组Na^+，K^+-ATP酶活性和Ca^{2+}-ATP酶活性均高于

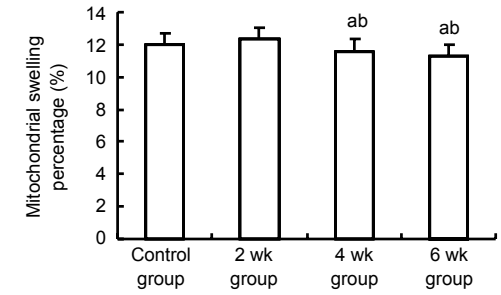
对照组($P < 0.05$)。有氧运动各组之间，6周组 Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶活性均高于4周组($P < 0.05$)，且4周组均高于2周组。见图2。



$^aP < 0.05$, *vs*. control group; $^bP < 0.05$, *vs*. 2 wk group; $^cP < 0.05$, *vs*. 4 wk group

Figure 2 Activity of mitochondrial Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase
图 2 线粒体 Na^+，K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性

2.3 不同训练周期鼠骨骼肌线粒体肿胀程度比较 有氧运动2周组线粒体肿胀程度与对照组之间无显著性差异，有氧运动4周组、6周组线粒体肿胀程度较对照组小($P < 0.05$) 。有氧运动组之间，4周组、6周组线粒体肿胀程度较2周低($P < 0.05$)，见图3。此外，基线A值下降程度差异无显著性意义($P > 0.05$)。



$^aP < 0.05$, *vs*. control group; $^bP < 0.05$, *vs*. 2 wk group

Figure 3 Mitochondrial swelling percentage
图 3 线粒体肿胀百分比

3 讨论

实验中选取的模型为严格参照Bedford TG标准而设立的有氧运动模型，即根据运动强度(包括跑台的坡度和速度等)的大小确定最大氧消耗量以确保机体以有氧代谢为主。与人体有氧运动相对应，具有一定的实践指导意义。另外，在动物分组前，选择适应性饲养和适应性跑台运动，可减少组间因营养、和基础活动量的不同而造成的偏倚，具有一定的稳定性和有效性。在选取指标上，线粒体为适应运动方式最为敏感的细胞器，而线粒体Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶位于线粒体内膜中[8]，可维持线粒体膜电化学梯度[9]，是线粒体结构、功能变化的灵敏指标。线粒体肿胀源于线粒体膜电位的缺失及线粒体通透性转换孔的开放[10]。而线粒体通透性转换孔开放可引起线粒体基质蛋白的渗透压升高，导致基质水肿，进而线粒体外膜破裂，线粒体失功能，可评价线粒体对抗外界应激的能力。

目前，有研究表明有氧运动可以提高骨骼肌细胞膜Na^+，K^+-ATP酶活性[11]以及提高肌细胞钙调控的能力，其中包括肌浆网Ca^{2+}-ATP酶活性升高等[12]。而对线粒体ATP酶影响的研究较少。实验对线粒体ATP酶活性进行观察，发现有氧运动可以提高线粒体Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶活性。可见有氧运动对线粒体、细胞膜及其它细胞器上ATP酶活性的改变具有一定的对应性。另外，有氧运动能否降低骨骼肌线粒体肿胀的程度，目前还存在争议。在本次线粒体肿胀实验中，基线吸光度值下降程度无显著性差异，而钙组的却存在差异，可知吸光度下降程度的不同主要由线粒体肿胀引起。实验结果表明有氧运动可以降低线粒体肿胀程度，其原因可能在于线粒体ATP酶可以维持线粒体膜电化学梯度，而线粒体肿胀可源于膜电位的缺失。提高线粒体ATP酶活性可以稳定膜电位，从而在一定程度上降低线粒体肿胀。此外，线粒体Na^+，K^+-ATP酶活性增高可以增加钠排出，减少线粒体钠水潴留，降低线粒体肿胀。Na^+，K^+-ATP酶除维持跨膜的电化学钠、钾离子梯度[13]外，由于线粒体内膜上存在Na^+/Ca^{2+}、Na^+/H^+以及H^+/Ca^{2+}交换体[14-15]，其还可降低线粒体内游离钙浓度，减少线粒体钙超载。而钙超载是线粒体通透性转换孔开放最基础的刺激因子，减少钙超载可减少线粒体通透性转换孔的开放，从而降低线粒体肿胀程度。可见，有氧运动可以保护线粒体功能。线粒体的主要功能是为机体能量代谢提供ATP。钙在调控线粒体功能和ATP合成过程中起着重要的作用[16]。其中最基本的功能就是刺激氧化磷酸化。线粒体Ca^{2+}-ATP酶可通过水解ATP主动将胞浆中的钙离子转运至线粒体，使线粒体游离钙$[Ca^{2+}]_m$的升高，上调整个氧化磷酸化机制，加快呼吸链速率和增加ATP的合成，为有氧运动提供的大量能量。可见，有氧运动也可以提高线粒体功能。另外，Hardie等[17]研究认为，阻断线粒体Ca^{2+}-ATP酶活性可导致胞浆内钙离子浓度升高，从而激活磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶，增加糖酵解，并使得乳酸生成增加。线粒体Ca^{2+}-ATP酶活性增高可延缓运动带来的疲劳。

然而，规律的有氧运动对骨骼肌线粒体的保护作用并非一蹴而就。Green等[18]在研究有氧运动对骨骼肌肌膜和T管Na^+，K^+-ATP酶的影响中发现，经过6 d的有氧训练可以提高酶的含量和活性，而为期3 d的有氧运动却与对照组无显著性差异。在本实验中，虽然运动的方式有所不同，指标的选择也有一定差异，但也得到类似

结果。本实验结果中，有氧运动2周组的Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶活性以及线粒体肿胀程度与对照组相比，无显著性差异。而4周、6周组Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶活性较对照组高，线粒体肿胀程度较对照组低。可见，有氧运动对线粒体ATP酶和肿胀程度的影响需要一定时间积累。此外，有氧运动6周组Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶活性比4和2周组高，而4周组又比2周组高，即随着运动时间的延长，Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶活性逐渐增高。在线粒体肿胀程度方面，虽然4和6周组较2周组低，但两组差异无显著性意义。可见，有氧运动可以降低线粒体肿胀的程度，但却很有限。

实验结果表明，有氧运动可以提高骨骼肌线粒体Na^+，K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶活性，以及降低线粒体肿胀的程度。对保护和提高线粒体功能以及延缓运动带来的疲劳有一定的作用，然而此作用需要一定时间的积累。但是，再延长训练时间或者是增大训练强度对大鼠骨骼肌线粒体Na^+，K^+-ATP酶、Ca^{2+}-ATP酶的活性以及线粒体肿胀程度有何影响，将值得进一步研究探讨。

4 参考文献

[1] Liu YX, Zhou L, Fan P, et al. Xian Tiyuxueyuan Xuebao. 2010; 27(2):198-201.
刘远新,周里,范鹏,等.有氧运动对肥胖大鼠心肌脂肪酸代谢干预作用的研究[J].西安体育学院学报,2010,27(2):198-201.

[2] He J, Luo YL, Qi ZT. Tianjin Tiyu Xueyuan Xuebao. 2005;20(4): 5-7.
贺杰,罗艳蕊,漆正堂.长时间低强度游泳运动对大鼠心血管系统肾上腺髓质素及其受体活性修饰蛋白mRNA表达的影响[J].天津体育学院学报,2005,20(4):5-7.

[3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.

[4] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. J Appl Physiol. 1979;47(6):1278-1283.

[5] Kang SP, Li XG, Dong JL, et al. Zhongguo Shiyo Ngneike Zazhi. 2008;12(28 Suppl 2):40-42.
康少平,李旭光,董嘉良,等.心肌缺血后处理抑制线粒体通透性转换孔开放的研究[J].中国实用内科杂志,2008,12(28 Suppl 2):40-42.

[6] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-275.

[7] Starnes JW, Barnes BD, Olsen ME. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca2+-induced dysfunction. J Appl Physiol. 2007;102(5): 1793-1798.

[8] de Meis L, Arruda AP, da Costa RM. Identification of a Ca2+-ATPase in brown adipose tissue mitochondria: regulation of thermogenesis by ATP and Ca^{2+}. J Biol Chem. 2006;281(24): 16384-16390.

[9] Venkatraman M, Konga D, Peramaiyan R, et al. Reduction of mitochondrial oxidative damage and improved mitochondrial efficiency by administration of crocetin against benzo[a]pyrene induced experimental animals. Biol Pharm Bull. 2008;31(9): 1639-1645.

[10] Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ, et al. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36(12):2463-2472.

[11] Murphy KT, Nielsen OB, Clausen T, et al. Analysis of exercise-induced Na^+-K^+ exchange in rat skeletal muscle in vivo. Exp Physiol. 2008;93(12):1249-1262.

[12] Ferreira JC, Bacurau AV, Bueno CR Jr, et al. aerobic exercise training improves Ca^{2+} handling and redox status of skeletal muscle in mice. Exp Biol Med (Maywood). 2010;235(4):497-505.

[13] Yang FY. Beijing:Science Press. 2005.
杨福愉.生物膜[M].北京:科学出版社, 2005.

[14] Motegi K, Tanonaka K, Takenaga Y, et al. Preservation of mitochondrial function may contribute to cardioprotective effects of Na+/Ca2+ exchanger inhibitors in ischaemic/reperfused rat hearts. Br J Pharmacol. 2007;151(7):963-978.

[15] Nikolaeva MA, Mukherjee B, Stys PK, et al. Na+ Dependent Sources of Intra-Axonal Ca2+ Release in RatOptic Nerve during In Vitro Chemical Ischemia. J Neurosci. 2005;25(43):9960-9967.

[16] Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, et al. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. Front Biosci. 2009;14: 1197-1218.

[17] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. J Cell Sci. 2004;117(23): 5479-5487.

[18] Green HJ, Barr DJ, Fowles JR, et al. Malleability of human skeletal muscle Na^+,K^+-ATPase pump with short-term training. J Appl Physiol. 2004;97(1):143-148.

来自本文课题的更多信息--

基金资助：天津医科大学科学基金(2009XK10)，项目名称：抗氧化活性多肽 IAAICA 在缺血后处理保护机制中的作用；武警医学院重点项目(WKH2009Z02)，项目名称：不同训练负荷条件下身体机能的代谢评定及机制探讨。

利益冲突：课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点/意义：本课题设计选择多种运动强度和多个运动周期节点对机体机能代谢评定及机制探讨，总结机体机能应激适应规律，确保训练安全，为训练提供科学依据。

课题评估的"金标准"：线粒体功能繁多，各酶类在承担相应功能时又相辅相成。在评价线粒体功能时并未有一定的"金标准"。本实验选取的线粒体 Na^+，K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶以及线粒体肿胀等指标，一方面就目前而言有氧运动对线粒体 ATP 酶研究较少，另一方面也可在一定程度上对有氧运动与线粒体肿胀影响进行解释。

设计或课题的偏倚与不足：由于本实验中选取的大鼠均为雄性，因此可能存在性别上的偏倚。

提供临床借鉴的价值：本实验结果表明有氧运动对保护和提高线粒体功能以及延缓运动带来的疲劳等作用需要一定时间的积累，提示在日常体育锻炼中应该保持一定的运动时间和运动量。