

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.42.020 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
徐莉, 曹颖, 张敏. 线粒体酶活性及线粒体肿胀与不同运动强度的关系[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(42): 7893-7896.

线粒体酶活性及线粒体肿胀与不同运动强度的关系*★

徐莉¹, 曹颖², 张敏³

文章亮点: 中等强度运动可以提高骨骼肌线粒体 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-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。而高强度的运动则会降低骨骼肌线粒体的功能。

关键词: 运动强度; 线粒体; Na⁺, K⁺-ATP 酶; Ca²⁺-ATP 酶; 线粒体肿胀; 组织构建

缩略语: 线粒体通透性转换孔: mitochondrial permeability transition pore, mPTP

摘要

背景: 关于不同运动强度对机体的影响早有研究, 并且取得了不少有价值的成果。但是对于不同运动强度对线粒体 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶活性以及线粒体肿胀程度影响的研究较少。

目的: 观察不同运动强度对大鼠骨骼肌线粒体 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶以及线粒体肿胀的影响。

方法: 将 24 只 SD 大鼠随机分为正常对照组, 中等强度运动组和高强度运动组。正常对照组大鼠正常笼内生活, 不运动。另 2 组游泳训练方式, 分别建立中强度和高强度运动模型, 进行相应的运动锻炼, 训练 4 周。

结果与结论: 中强度运动组线粒体 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶活性与正常对照组相比均增高($P < 0.05$), 线粒体肿胀程度降低($P < 0.05$); 而高强度运动组线粒体 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶活性与正常对照组相比均降低($P < 0.05$), 线粒体肿胀程度增大($P < 0.05$)。实验结果表明中强度运动可以保护线粒体 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶的活性, 提高线粒体功能; 而高强度运动则降低了线粒体的功能。

Effects of different exercise intensities on the activity of mitochondrial enzymes and mitochondrial swelling

Xu Li¹, Cao Ying², Zhang Min³

Abstract

BACKGROUND: There are many studies on the effects of different exercise intensities on the body, but studies about the effects of different exercise intensities on the activity of mitochondrial Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase (ATPase), Ca²⁺-ATPase and mitochondrial swelling are few.

OBJECTIVE: To investigate the effects of different exercise intensities on the activity of mitochondrial Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase, as well as mitochondrial swelling.

METHODS: Twenty-four Sprague Dawley rats were randomly separated into three groups, namely, control, mid-intensity, high-intensity exercise groups. The control rats did not undergo swimming training, while the other two groups were given 4-week swimming exercises of different intensities.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities increased ($P < 0.05$) and the extent of mitochondrial swelling decreased ($P < 0.05$) in the mid-intensity exercise group, but opposite in the high-intensity exercise group. These findings indicate that mid-intensity exercise can protect the activity of mitochondrial Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase and increase the function of mitochondria, but high-intensity exercise can decrease the function of mitochondria.

Xu L, Cao Y, Zhang M. Effects of different exercise intensities on the activity of mitochondrial enzymes and mitochondrial swelling Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(42): 7893-7896.

¹ 天津体育学院, 天津市 300381;
² 天津中医药大学第一附属医院检验科, 天津市 300193;
³ 武警后勤学院生化教研室, 天津市 300162

徐莉★, 女, 1967 年生, 北京市人, 汉族, 1996 年天津体育学院毕业, 硕士, 主要从事体育教育训练学专业方面的研究。
felice@sina.com

通讯作者: 张敏, 硕士研究生, 武警后勤学院生化教研室, 天津市 300162
zhangmin53421@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)42-07893-04

收稿日期: 2012-01-15
修回日期: 2012-02-27
(20111215007/M · W)

¹Tianjin Institute of Physical Education, Tianjin 300381, China; ²Clinical Laboratory, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; ³Biochemistry Department, Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Xu Li★, Master, Tianjin Institute of Physical Education, Tianjin 300381, China
 felice@sina.com

Corresponding author: Zhang Min, Studying for master's degree, Biochemistry Department, Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China
 zhangmin53421@163.com

Supported by: the General Program of Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, No. WYM201101*

Received: 2012-01-15
 Accepted: 2012-02-27

0 引言

关于不同运动强度对机体的影响早有研究, 并且取得了不少有价值的成果。但是对于不同运动强度对线粒体Na⁺, K⁺-ATP酶, Ca²⁺-ATP酶活性以及线粒体肿胀程度影响的研究较少。线粒体作为适应运动方式最为敏感的细胞器^[1], 可维持线粒体膜电化学梯度^[2], 是线粒体结构、功能变化的灵敏指标。线粒体肿胀又可作为评价线粒体对抗外界应激能力的指标之一。因此, 实验通过建立大鼠游泳训练模型, 阐述不同运动强度对骨骼肌线粒体Na⁺, K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶活性以及线粒体肿胀程度的影响, 以了解不同运动强度对骨骼肌线粒体结构功能的变化与运动疲劳的关系。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2010年8至10月在天津体育学院实验室完成动物模型的建立, 于2010年11月至2011年4月在天津医科大学生物化学实验室完成各指标的测定。

材料:

实验动物: 雄性SD大鼠, 体质量175-225 g, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 许可证号: SCXK2002-0001。

试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
蔗糖、咪唑、山梨醇、BSA、EGTA、Tris、MOPS	Sigma 公司
KCl、KH ₂ PO ₄	天津市化学试剂六厂
Folin-酚试剂盒	天津鼎国试剂公司
超微量 ATP 酶试剂盒	南京建成生物科技公司
低温超速离心机	BACKMAN
电动玻璃匀浆器	宁波新芝科器研究所
UV-2450 紫外/可见分光光度计	日本岛津

实验方法:

分组和建模: 大鼠购进后适应性饲养1周, 然后进行3 d适应性游泳训练, 游泳池规格为150 cm(长)×70 cm(宽)×60 cm(高), 水温(35±2) °C, 室温(23±2) °C。适应性游泳训练为自

由游泳, 1次/d, 持续时间逐日递增, 分别为15, 20, 30 min。随后按体质量随机分为3组: 正常对照组, 中等强度运动组和高强度运动组, 8只/组。正常对照组: 大鼠正常笼内生活, 不运动。中等强度运动组: 每天训练1次, 初始训练时间为30 min/d, 后逐日增加10 min至1 h后不再增加, 以后每日训练1 h, 无外加负荷, 训练4周。高强度运动组: 从第1周起游泳30 min/d, 负3%体质量; 第2周起游泳时间每日增加10 min直至1 h, 负4%体质量; 第3周每天游泳60 min, 负5%体质量; 第4周每天游泳60 min, 负6%体质量^[3]。训练结束后吹干毛发, 返回鼠笼。

骨骼肌线粒体的提取: 3组大鼠用差速离心法提取骨骼肌线粒体^[4]。在冰上迅速将大鼠处死, 取跖肌组织1 g, 置于10 mL溶液AT(0.075 mol/L蔗糖, 0.225 mol/L山梨醇, 1 mmol/L EGTA, 0.1%BSA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 4 °C)中, 使用电动玻璃匀浆器匀浆, 组织匀浆液在4 °C条件下1 000×g离心5 min, 弃沉淀, 上清液再离心, 4 °C, 9 000×g, 10 min, 弃上清, 得到的少量沉淀溶于5 mL溶液AT中, 分装于4个1.5 mL的EP管, 4 °C, 15 000×g, 2 min, 弃上清, 沉淀物即为线粒体。线粒体蛋白含量用Folin-酚试剂盒(Lowry法)测定^[5], 结果用g/L表示。

线粒体Na⁺, K⁺-ATP酶和Ca²⁺-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, Ca²⁺-ATP酶的活性。应用岛津UV-2450 紫外/可见分光光度计检测, 检测波长为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520 nm吸光度的下降。而钙超载可导致mPTP的开放^[6]。反应体系为: 120 mmol/L KCl、10 mmol/L Tris、20 mmol/L MOPS、5 mmol/L KH₂PO₄(pH 7.4)。反应体系中加入线粒体, 使之终质量浓度为0.25 g/L。随即加入CaCl₂, 其终浓度为50 μmol/L即200 nmol Ca²⁺/mg线粒体蛋白。此时, 可在520 nm波长处观察到吸光度值(A)的下降。每20 s测1次A值, 监测10 min。以其下降幅度(A值变化的量ΔA与初始A值之比, 即ΔA/A, 结果

用百分数表示)来评价。

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。

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, 数据分析采用单因素方差分析和 q 检验, 显著性水平为0.05。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入大鼠24只, 均进入结果分析, 无死亡和感染。

2.2 不同训练周期鼠骨骼肌线粒体 Na^+ , K^+ -ATP酶和 Ca^{2+} -ATP酶活性比较 由表1可知, 中等强度运动组骨骼肌线粒体 Na^+ , K^+ -ATP酶和 Ca^{2+} -ATP酶活性高于正常对照组和高强度运动组, 而高强度运动组 Na^+ , K^+ -ATP酶和 Ca^{2+} -ATP酶活性均低于正常对照组($P < 0.05$)。

表1 各组线粒体 Na^+ , K^+ -ATP酶, Ca^{2+} -ATP酶以及线粒体肿胀百分数比较
Table 1 Comparison of mitochondrial Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase (ATPase), Ca^{2+} -ATPase and mitochondrial swelling ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	Na^+ , K^+ -ATPase ($\mu\text{kat/g}$)	Ca^{2+} -ATPase ($\mu\text{kat/g}$)	Mitochondrial swelling (%)
Control	89.85 \pm 13.17	78.35 \pm 8.34	11.95 \pm 0.71
Mid-intensity exercise	99.35 \pm 14.34 ^a	91.02 \pm 14.00 ^a	11.59 \pm 0.79 ^a
High-intensity exercise	80.64 \pm 14.88 ^{ab}	71.59 \pm 12.38 ^{ab}	12.64 \pm 0.73 ^{ab}

^a $P < 0.05$, vs. control group; ^b $P < 0.05$, vs. mid-intensity exercise group

2.3 不同训练周期鼠骨骼肌线粒体肿胀程度比较 由表1可知, 中等强度运动组线粒体肿胀程度较正常对照组、高强度运动组小, 而高强度运动组则较正常对照组大。图1为钙触发线粒体肿胀示意图。

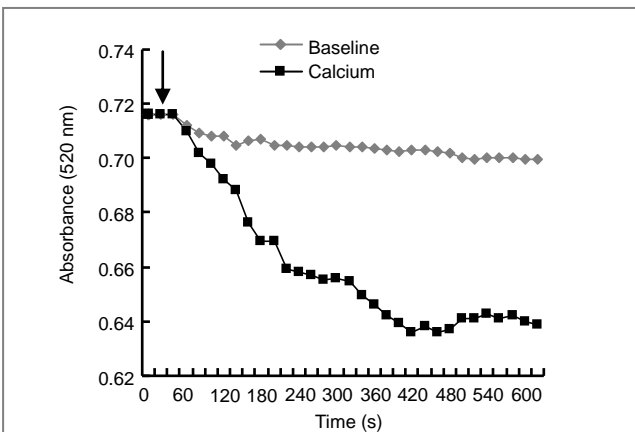


Figure 1 Delineation of mitochondrial swelling
图1 线粒体肿胀示意图

图1中, 箭头指加入5 μL 的肿胀缓冲液(基线)或5 μL 的 CaCl_2 (钙组)。加入的 CaCl_2 使得体系中游离钙终浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ (即200 $\text{nmol Ca}^{2+}/\text{mg}$ 线粒体蛋白)。可见520 nm处吸光度值下降。各组线粒体肿胀基线下降的百分数经方差分析比较, 差异均无显著性意义($P > 0.05$)。通过钙组吸光度值的变化可知线粒体肿胀程度。

3 讨论

近些年来, 随着研究的日益深入, 人们发现不同运动强度的锻炼对机体具有不同的影响, 并非所有的运动对机体都是有益的。在探求其中的机制时也获得了不少有价值的成果。线粒体为适应运动方式最为敏感的细胞器, 线粒体 Na^+ , K^+ -ATP酶和 Ca^{2+} -ATP酶位于线粒体内膜中^[1], 可维持线粒体膜电化学梯度^[2], 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mPTP的开放^[7]。而mPTP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。

在本实验中, 中等强度运动组线粒体 Na^+ , K^+ -ATP酶和 Ca^{2+} -ATP酶活性较正常组高, 而高强度运动组有所下降。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^[8]。线粒体游离钙 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 的升高, 可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。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 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 升高, 以满足细胞新陈代谢之所需。另外, Hardie^[9]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 (adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK), 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。有研究表明提高骨骼肌细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP酶活性也可以提高肌细胞钙调控的能力^[10-11]。

此外, 在本实验中, 中强度运动组线粒体肿胀程度较对照组下降, 而高强度运动组则升高。线粒体肿胀, 源于线粒体膜电位的缺失及mPTP的开放, 钙超载是mPTP开放最基础的刺激因子。有许多因素可使PTP变得敏感, 更易于开放, 例如, 氧化应激^[12]。目前, 有大量实验表明, 低强度的锻炼可以降低骨骼肌细胞内的氧化应激或者增加抗氧自由基的酶生成^[13-14]。而高强度耐力训练会导致机体内大量内源性的自由基增加^[15]。而自

由基的减少或增加可影响到mPTP敏感性的提高或降低。可见, 本文结果与前人结论有一定的一致性。另外, 线粒体ATP酶可以维持线粒体膜电化学梯度, 从而提高线粒体ATP酶活性可以稳定膜电位, 在一定程度上降低线粒体肿胀。线粒体Na⁺, K⁺-ATP酶活性增高可减少线粒体钠水滞留, 降低线粒体肿胀。Na⁺, K⁺-ATP酶除维持跨膜的电化学钠、钾离子梯度外^[16], 另外线粒体内膜上存在Na⁺/Ca²⁺交换体、Na⁺/H⁺交换体以及H⁺/Ca²⁺交换体^[17-18], 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mPTP开放最基础的刺激因子, 减少钙超载可减少mPTP的开放, 从而降低线粒体肿胀程度, 提高线粒体对抗外界应激的能力。

综上所述, 本实验结果表明, 不同运动强度对骨骼肌线粒体的结构、功能的影响是不同的。中等强度运动可以提高骨骼肌线粒体Na⁺, K⁺-ATP酶和Ca²⁺-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。而高强度的运动则会降低骨骼肌线粒体的功能。因此, 在运动锻炼中, 应注意控制运动的强度和时间, 达到生理性适应目的, 从而实现科学锻炼、提高运动成绩, 并防止运动性损伤。

4 参考文献

- [1] de Meis L, Arruda AP, da Costa RM, et al. Identification of a Ca²⁺-ATPase in brown adipose tissue mitochondria: regulation of thermogenesis by ATP and Ca²⁺. J Biol Chem. 2006;281(24):16384-16390.
- [2] 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.
- [3] Yuan QJ, Su QS, Xiong RH, et al. Chengdu Tiyu Xueyuan Xuebao. 2009;12(35):71-73.
袁琼嘉, 苏全生, 熊若虹, 等. 不同强度运动对大脑皮质血管内皮细胞生长因子 (VEGF)的影响[J]. 成都体育学院学报, 2009, 12(35):71-73.
- [4] Fernández-Vizarrá E, Ferrín G, Pérez-Martos A, et al. Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. Mitochondrion. 2010;10(3):253-262.
- [5] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-275.
- [6] 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.
- [7] Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36(12):2463-2472.
- [8] Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, et al. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. Front Biosci. 2009; 14: 1197-1218.
- [9] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. J Cell Sci. 2004;117 (Pt 23): 5479-5487.
- [10] Murphy KT, Nielsen OB, Clausen T. Analysis of exercise-induced Na⁺-K⁺ exchange in rat skeletal muscle in vivo. Exp Physiol. 2008;93(12):1249-1262.
- [11] Ferreira JC, Bacurau AV, Bueno CR Jr, et al. Aerobic exercise training improves Ca²⁺ handling and redox status of skeletal muscle in mice. Exp Biol Med (Maywood). 2010;235(4): 497-505.
- [12] Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. Physiol Rev. 1999; 79(4):1127-1155.
- [13] Kaczor JJ, Hall JE, Payne E, et al. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. Free Radic Biol Med. 2007;43(1):145-154.
- [14] Wenz T, Diaz F, Hernandez D, et al. Endurance exercise is protective for mice with mitochondrial myopathy. J Appl Physiol. 2009;106(5):1712-1719.
- [15] Ma LJ, Mao Y, Xiong ZY. Shandong Tiyu Xueyuan Xuebao. 2008, 24(2):57-59.
马兰军, 毛雁, 熊正英. 茶多酚对高强度耐力训练大鼠心肌线粒体抗氧化能力及ATP酶活性影响的实验研究[J]. 山东体育学院学报, 2008, 24(2):57-59.
- [16] Yang FY. Beijing: Science Press. 2005:182-187.
杨福愉. 生物膜[M]. 北京: 科学出版社, 2005:182-187.
- [17] 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.
- [18] Nikolaeva MA, Mukherjee B, Stys PK. Na⁺-dependent sources of intra-axonal Ca²⁺ release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. J Neurosci. 2005;25(43):9960-9967.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 武警后勤学院面上项目(WYM201101)。

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

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。