

· 基础理论研究 · Study of Basic Theory



急性运动心肌缺氧对大鼠心肌纤维 和线粒体膜结构及功能的影响*

EFFECTS OF ACUTE EXERCISE-INDUCED HYPOXIA ON MYOCARDIAL FIBERS
AND STRUCTURE AND FUNCTION OF MYOCARDIAL MITOCHONDRIAL MEM-
BRANE IN RAT

张勇** 张薇 时庆德 李静先 陈家琦

Zhang Yong Zhang Wei Shi Qingde Li Jingxian Chen Jiaqi

摘要 采用递增负荷耗竭运动模型为急性缺氧应激源,观察了 SD 大鼠急性运动至力竭后心肌组织和线粒体膜过氧化脂质含量,线粒体内膜 NADH-CoQ 还原酶活性变化和心肌纤维和线粒体超微结构。结果表明,心肌能量需求过高性缺氧应激后大鼠心肌组织匀浆和线粒体膜过氧化脂含量分别增高 140.9% 和 39.4% ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),线粒体内膜 NADH-CoQ 还原酶活性降低 61.6% ($P < 0.05$),心肌纤维和线粒体超微结构呈缺氧损伤性改变。研究提示,急性运动缺氧应激后心肌组织和心肌线粒体膜结构变化与脂质过氧化作用增强有关。

关键词 耗竭运动 心肌缺氧 线粒体膜 过氧化脂质 NADH-CoQ 还原酶

Abstract The present study investigates lipid peroxide contents of myocardial tissue and mitochondrial membrane, the NADH-CoQ reductase activity of inner mitochondrial membrane and the ultrastructure of myocardial fibers and mitochondria in SD rat after acute exercises to exhaustion adopting an incremental exhausted exercise model as acute hypoxia stress source. Results show that lipid peroxide contents of myocardium and myocardial mitochondrial membrane increase by 140.9% and 39.4% respectively ($P < 0.01$ and $P < 0.05$), the NADH-CoQ reductase activity of inner mitochondrial membrane decreases by 61.1% ($P < 0.05$) and ultrastructures of myocardial fibers and mitochondria present hypoxic pathological changes in rat with high energy demand myocardium after the hypoxia stress. The research suggests that the lipid peroxidation may be responsible for structural changes of myocardium and myocardial mitochondrial membrane during acute exercise-induced hypoxia stress.

* 天津市高教局管理课题(部分工作)

** 博士 天津体育学院运动医学研究所 300381

Key words exhausted exercises myocardium hypoxia mitochondrial membrane lipid peroxides NADH-CoQ reductase

长时间耗竭运动可引起心肌能量需求过高性缺氧损伤^[1]。但是,在运动性心肌缺血/缺氧应激时心肌和线粒体结构损伤和功能的变化与脂质过氧化作用的关系还不十分清楚。为此,我们以递增负荷耗竭运动为急性缺氧模型,观察了急性长时间耗竭运动心肌缺氧时过氧化反应对心肌及线粒体膜结构和功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和运动方式

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 12 只,体重 230~260g。随机分为运动组 6 只,对照组 6 只。实验采用文献^[2]递增负荷运动模型,按以下程序, I: 0°; 8.2m/min, 15min (相当于 53% VO_{2max}) II: 5°; 15m/min, 15min (相当于 64% VO_{2max}) III: 10°; 19.3m/min (相当于 76% VO_{2max}), 跑台运动至力竭。总运动时间为 66 ± 24 min。运动过程中未使用电刺激。力竭标准以第 III 级负荷运动时动物未能坚持本级负荷跑速, 先后滞跑道后 1/3 处达 3 次以上, 体征衰竭, 驱赶无效。

1.2 心肌组织匀浆和线粒体提取及线粒体内膜制备

运动组动物运动至力竭后立即断头处死, 迅速取出完整心脏, 于事先予冷的缓冲液中匀浆, 依文献^[3]方法, 差速离心提取线粒体。缓冲液含 70mmol/L 蔗糖, 220mmol/L 甘露醇, 0.5mmol/L EDTA, 5mmol/L MOPS, pH7.4。所提取之线粒体悬液再用 0.7mg 毛地黄皂苷/mg 线粒体膜蛋白处理, 离心制备线粒体内膜制剂^[4], 以上所有操作步骤均在 0~4℃ 条件下进行。所制备组织匀浆和线粒体及线粒体内膜均按紫外法于 280nm/205nm 测定膜蛋白含量, 于 0~4℃ 贮存备用。

1.3 心肌组织透射电镜样本制备及超微结构观察

各组随机抽取 2 例定位取心室肌组织, 2.5% 戊二醛固定, 脱水, 环氧树脂 812 包埋, LKB 超薄切片机切片, 醋酸铀—柠檬酸铅复染, 日立 H-500 透射电镜观察心肌和线粒体超微结构。加速电压 75KV。

1.4 心肌组织和线粒体过氧化脂质测定

脂质过氧化代谢产物丙二醛(MDA)测定采用硫代巴比妥酸(TBA)荧光法^[5]。样本均按 0.2mg 膜蛋白定量, 于 Shimadzu RF-540 荧光分光光度计 Ex515nm, Em 535nm 测定样本荧光强度, 以 TEP(1, 1, 3, 3—四乙氧基丙烷)为标准计算 MDA 含量。

1.5 心肌线粒体内膜 NADH—CoQ 还原酶活力测定

按文献^[6]紫外动力学法, 稍加修改。测定介质为 40mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH7.4, 1mmol/L KCN, 0.1mmol/L CoQ₀, 0.2mmol/L NADHn₂。内膜蛋白含量 0.5mg, 总反应体积 3ml, 恒温 30℃, 于 Shimadzu-365 红外、紫外、可见光分光光度计测定 340nm 光吸收下降, 以摩尔消光系数 6620 计算。

1.6 统计学处理

常规方法计算各指标平均数、标准差,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 急性耗竭运动后心肌和心肌线粒体超微结构变化

对照组显示正常心肌电镜超微结构,见清晰I带、A带、Z线、H区和M线。细胞间闰盘呈桥粒连接。肌原纤维间有大量线粒体,其界膜完整,脊明显,排列清晰。

运动后组心肌超微结构局灶性病理变化,部分肌节内肌原纤维断裂甚至溶解,肌纤维排列紊乱,闰盘变形、张裂。部分线粒体呈絮状,基质电子密度下降,内膜脊变性、断裂、排裂紊乱,个别线粒体甚至出现空泡样变化。

2.2 急性耗竭运动后心肌匀浆和心肌线粒体脂质过氧化变化

运动后即刻心肌组织和线粒体MDA含量分别较安静时增高140.9%和39.4% ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。表明心肌组织和线粒体脂质过氧化作用增强(表1)。

2.3 急性耗竭运动对线粒体内膜NADH—CoQ还原酶活性的影响

由表2可见,大鼠运动至力竭后,心肌线粒体内膜NADH—CoQ还原酶活性均较安静时显著降低($P < 0.05$)。表明力竭运动所致线粒体内膜关键酶活性改变。

表1 急性耗竭运动后过氧化脂质(MDA)含量变化(mmol/mg Pr)

	安静时 $\bar{x} \pm s (n=6)$	运动后 $\bar{x} \pm s (n=6)$	(%)
心肌匀浆	0.83 ± 0.31	2.00 ± 0.39**	+140.9
心肌线粒体	1.27 ± 0.16	1.77 ± 0.42*	+39.4

* 较安静时, $P < 0.05$; ** 较安静时, $P < 0.01$ 。

表2 急性耗竭运动对线粒体内膜NADH—CoQ还原酶活性的影响(mU/mg·Pr·min)

	对照组 $\bar{x} \pm s (n=6)$	运动后 $\bar{x} \pm s (n=6)$	(%)
NADH—CoQ还原酶	3.72 ± 2.25	1.43 ± 0.76*	-61.1%

* 较安静时, $P < 0.05$

3 讨论

尽管长时间剧烈运动是否造成机体缺氧一直存有争议,但不同强度、不同持续时间运动时心肌对氧的依赖程度应该是不同的。急性运动应激,尤其是长时间耗竭性运动时由于心肌需氧量增加,冠脉供血量相对不足可引起心肌能量需求过高性缺氧损伤。有研究表明,运动应激时由于血管紧张度增加引起的血管切应力增高和湍流可能导致冠脉内皮细胞损伤^[1],受损的内皮细胞产生的和释放的内皮舒张因子(EDGF)减少^[7],又可能反过来增加冠脉血管痉挛使供血不足而形成长时间耐力性运动时缺血的恶性循环^[8]。内皮细胞损伤和血栓生成时的缺血可

引起纤维变性样局部心肌坏死^[9], 实验中我们观察到, 耗竭运动大鼠心肌组织呈一定程度的缺血性超微结构损伤, 心肌线粒体出现类似于急性缺血实验时缺血/缺氧病理性改变^[10], 表明耗竭运动造成心肌和心肌线粒体结构缺氧损伤。这些与以往研究报道相似^[11]。

线粒体是心肌细胞内三羧酸循环、呼吸及合成高能磷酸化合物最旺盛部位, 对缺血、缺氧也最敏感。Davies 等^[12]首次用 ESR 技术记录到大鼠急性运动后肝脏和骨骼肌的自由基信号, 提示运动内源性自由基生成增多及脂质过氧化反应增强可能与线粒体膜结构的损伤有关。这一结果也被其他的研究所证实。我们的实验结果表明, 急性耗竭运动后心肌组织匀浆和线粒体膜过氧化脂质含量显著增高。根据本实验的运动模式, 心肌线粒体膜脂质过氧化反应可能具有运动强度依赖性。运动初期, 心肌氧供应相对充足, 有氧代谢过程加强。随负荷强度递增, 心肌耗氧量增加线粒体 ATP 生成与组织对能量的需求逐渐呈失衡状态。那么, 心肌能量需求过高性缺血/缺氧可能是次最大运动强度(如本实验第 III 级运动负荷)的主要代谢特征。心肌缺血加速了 ATP 向 AMP 的转化。ATP 生成的缺乏尚需通过线粒体 CK 和 AK 激活达到平衡^[13]。随 AK 激活增加了由 ADP 生成 ATP, 而导致心肌次黄嘌呤增高。如果此时 Ca^{2+} 跨膜梯度因 ATP 依赖性 Ca^{2+} 泵功能不足而不能维持时, 胞浆 Ca^{2+} 浓度增加则激活黄嘌呤氧化酶作用于次黄嘌呤的反应, 分子氧单电子还原为超氧自由基 O_2^- , 引发线粒体膜过氧化反应, 而损害线粒体氧化磷酸化使 ATP 生成不足。

研究还发现, 耗竭运动后线粒体膜脂质过氧化水平增高的同时, 线粒体内膜 NADH-CoQ 还原酶(呼吸链复合体 I)活性并行性显著降低。Chandwaney 等^[14]发现, 运动训练可缓解由外源性自由基引发脂质过氧化反应所致 NADH 呼吸链呼吸控制比(RCR)下降程度, 未发现过氧化脂质对以琥珀酸为底物的线粒体呼吸功能的损害。提示运动性线粒体呼吸链损伤与复合体 I 活性改变有关。我们的研究证实, 急性力竭运动后线粒体内膜 NADH-CoQ 还原酶活性显著降低。表明呼吸链起始端复合体 I 存在一定程度的损害。缺血对线粒体呼吸链影响的实验证实呼吸链复合体 I 为脆弱易损部位^[15]。我们认为, 耗竭运动所致线粒体内膜 NADH-CoQ 还原酶活性的降低可能与以下有关: (1) 递增负荷力竭性运动时心肌缺血可能是一个重要因素; (2) 过氧化脂质对膜蛋白组分的损害。

线粒体氧利用最为敏感的指标是 NAD 氧化还原状态。呼吸链起始端复合体 I 活性的降低, 将阻断由三羧酸循环 NADH 进入线粒体呼吸链的电子传递过程。推测, 由于复合体 I 损伤, 使线粒体氧利用率下降, 可能会造成线粒体内未有效地被还原氧增多, 又反过来为膜脂质过氧化提供了潜在条件, 加剧膜过氧化而成为一种恶性循环。但这一可能的机制还有待于从膜酶活性改变和膜脂质过氧化的时相关系角度加以证实。

心肌缺血时最早发生的变化是代谢性的, 继发机能的变化一定程度时才出现形态学改变。结合实验的超微结构变化结果, 我们认为急性耗竭运动心肌能量需求过高性缺氧时内源性自由基的产生和脂质过氧化反应, 对包括线粒体膜在内的心肌损伤可能是一个早期触发、后期加剧的因素。

已有研究表明, 黄嘌呤氧化酶生成自由基与心肌缺血性损伤有关。我们推测, 本实验模型中心肌过氧化反应主要由黄嘌呤氧化酶作用介导, 而非由于线粒体呼吸作用增强。然而, 运动终止后随心肌能量需求过高性缺氧的解除, 是否也会因复氧(类似与再灌注氧合期)而产生心肌氧矛盾而持续过氧化反应进一步造成心肌或心肌线粒体损伤? 这还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Rowe W J. Endurance Exercise and Injury to Heart Sports Med, 1993, 16(2): 73~ 79
- 2 Bedford TG, Tipton C M, Wilson C N. Maximal Oxygen Consumption of Rats and its Changes with Various Experimental Procedures J Appl Physiol, 1979, (47): 1278~ 1283
- 3 Schnaitman C, Groomwalt J W. Enzymatic Properties of Inner and Outer Membranes of rat liver mitochondria J Cell Biol, 1968, (38): 158~ 163
- 4 程德基, 等. 呼吸链底物抑制剂对线粒体内膜流动性的影响 生物化学杂志, 1986, 2(3): 38
- 5 Yagi K. Simple Fluorimetric Assay for Lipoperoxide Biochem Med, 1979, (15): 212~ 217
- 6 刘林, 等. 鼠肝线粒体内膜与脂质的融合 生物化学与生物物理学报, 1990, 22(1): 47~ 55
- 7 Furchgott RF. Role of Endothelium in Responses of Vascular Smooth Muscle Circ Res, 1983, (53): 557~ 573
- 8 Vita JA, Treasure CB, Young AC, et al. Patients with Evidence of Coronary Endothelial Dysfunctions Assessed by a Acetylcholine Infusion Demonstrate Marked Increase in Sensitivity to Constrictor Effects of Catecholamines Circulation, 1992, (85): 1390~ 1393
- 9 Factor SM, Sonnenblick EH. The Pathogenesis of Clinical and Experimental Congestive Cardiomyopathies: Recent Concepts Prog Cardiovas Dis, 1985, (27): 395~ 420
- 10 Genko S. Detection of Mitochondrial Membrane in Myocardial Ischemia with ESR Spin Labeling Technique J Mol Cell Cardiol, 1989, (21): 1029 ~ 1036
- 11 黄利长, 等. 耐力训练对心肌超微结构的影响 中国运动医学杂志, 1988, 7(3): 155~ 160
- 12 Davies K J A, Quintanilha A T, Brooks G A et al. Free Radicals and Tissue Damage Produced by Exercise Biochem Biophys Res Commun, 1982, (107): 1198~ 1205
- 13 Connett RJ, Gayeski TEJ, Hong CR. Energy Sources in Fully Aerobic Rest-work Conditions: a New Role for Glycolysis Am J Physiol, 1985, (248): H922~ 927
- 14 Chandwane R H, Ji I I. Exercise Training Attenuates Muscle Mitochondrial Damage by Oxygen Free Radical Med Sci Sports Exerc, 1992, 24(5) Sup S17: 97
- 15 Rouslin W. Canine Myocardial Ischemia: Defect in Mitochondrial Electron Transport Complex I J Mol Cell Cardiol, 1980, (12): 639~ 645

(收稿: 1996- 05- 07)

本文责任编辑 杨有为