过度训练对大鼠心肌线粒体游离钙的影响

刘建华*[1]　常　波[2]
（1.山东潍坊学院体育系，山东　潍坊　261061；
2.沈阳体育学院基础部，辽宁　沈阳　110032）

摘要：目的：通过建立大鼠过度训练模型，探讨过度训练对大鼠心肌线粒体游离钙的影响及机制。**方法：**雄性 Wistar 大鼠，随机分为 2 组：安静组，运动组，运动模式为 6 周递增负荷游泳，最后一次运动后 24 小时取样测定各组大鼠心肌线粒体 MDA、SOD、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶和游离钙等指标。**结果：**经过 6 周递增负荷训练，运动组大鼠运动能力下降，心肌线粒体 MDA 含量显著增高（P<0.01），游离钙、SOD 、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶的活性显著下降（P<0.01）。**结论：**经过 6 周递增负荷训练，运动组大鼠呈过度训练状态，心肌线粒体自由基生成增多，抗氧化酶活性下降，导致线粒体膜发生脂质过氧化，Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性下降，线粒体内游离钙下降，影响线粒体的氧化磷酸化过程。

关键词：过度训练　心肌线粒体　自由基　游离钙

The Influence of Overtraining on the Free Calcium in the Rats' Cardiac Muscle Mitochondria

Liu Jian hua　Changbo
（1.P.E.Department of Weifang College,Shandong 261061；
2.Shenyang Sports College,Liaoning 110032）

Abstract: Objective: To research the influence of training on the free calcium in the rats' cardiac muscle mitochondria. **Method:** Male Wistar rats were divided into 5 groups randomly: sedentary control group, training group. The training model was swimming for 6 weeks increasing exercises loads gradually. The indexes such as MDA、SOD、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP enzyme and free calcium of the cardiac muscle mitochondria of rats were measured at 24 hours after last training. **Result:** After 6 weeks' training increasing exercises loads gradually, compared with sedentary control group rats, the ability to do exercises of training group rats dropped clearly, the indexes of cardiac muscle mitochondria showed the following changes: the content of MDA increased significantly（P<0.01）, the activity of SOD、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP enzyme and the concentration of free calcium decreased significantly（P<0.01）.**Conclusion:** After 6 weeks' training increasing exercises loads gradually, training group rats showed the state of overtraining. Because of the generating of free radical and the following membrane's being oxidized, training group rats cardiac mitochondrial was oxidized and the concentration of free calcium decreased.

Key Words: overtraining cardiac muscle mitochondria　free radical　free calcium

前言

线粒体是细胞的重要结构，不仅是三羧酸循环、氧化磷酸化合成高能磷酸化合物的场所，还是钙离子贮存库，是调节细胞内钙稳态的重要细胞器之一。Ca^{2+}参与心肌的兴奋收缩偶联过程，还参与细胞内代谢和生理功能的调节，近年来发现运动性疲劳的出现乃至过量运动引起肌细胞的不可逆变化常与 Ca^{2+}在肌细胞内各细胞结构的分布异常有密切关系[1]。研究发现，过度训练后心肌线粒体内钙总量增加[2]，一次长时间耗竭运动后 大鼠心肌线粒体游离钙下降、总钙增加[3,4]。这些研究还提出线粒体内钙总量的增加、游离钙的下降都与运动中自由基生成增多有关，自由基使线粒体膜氧化损伤，从而影响了线粒体膜对钙离子的转运。那么在过度训练后心肌线粒体内游离钙是如何变化的，其变化是否也同自由基的作用有关，目前还未见报道。

1 对象与方法

1.1 研究对象

* 作者信息：Email: liujian3651@sina.com

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

雄性 Wistar 大鼠 29 只,体重 200g 左右，由沈阳市双义实验动物研究所提供。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂

Fura-2/AM（美国 Sigma 公司出品），SOD 试剂盒、MDA 试剂盒、ATP 酶试剂盒（均由南京建成生物工程研究所提供）。

1.2.2 主要仪器

台式离心机 80-2B，TGL16M 台式高速冷冻离心机，722 可见光分光光度计,荧光分光光度计 650-60, OL-901 漩涡混合器,电热恒温水浴箱 WS2-261-79。

1.3 方法

1.3.1 分组及运动方案

购进大鼠后，适应性喂养 6 天，按体重分层，随机分 2 组，安静组 12 只，运动组 17 只，常规分笼饲养，自由饮食水，室内环境温度 23±3℃，自然光照，室内通风干燥。运动组大鼠每周运动 6 次，方式为递增负荷游泳，持续六周。具体情况见表 1：

表 1：大　鼠　运　动　方　案

	星期日	星期一	星期二	星期三	星期四	星期五	星期六
第一周	5min	10min	15min	20min	25min	30min	休息
第二周	35min	40min	45min	50min	55min	60min	休息
第三周	60min	70min	80min	90min	90min	90min	休息
第四周	90min(1%)*	90min(1%)	90min(1%)	90min(2%)	90min(2%)	90min(2%)	休息
第五周	90min(3%)	90min(3%)	90min(3%)	90min(4%)	90min(4%)	90min(4%)	休息
第六周	90min(5%)	90min(5%)	90min(5%)	90min(6%)	90min(6%)	90min(6%)	取样

注：* 括号内为大鼠游泳时的负荷量（体重的百分比）。

大鼠在长 100cm，宽 60cm，高 70cm 的玻璃泳缸中游泳，水深 50cm，每只大鼠游泳面积大于 300cm^2,水温控制在 34±2℃，在大鼠游泳过程中出现力竭时（力竭标准为大鼠从水面下沉，经 10 秒后仍不能返回水面），将其捞出，休息一定时间（5-30 分钟）后，放入泳缸中继续完成游泳负荷。

1.3.2 一般情况观察

每天称一次体重，并记录各笼大鼠所吃饲料的数量，观察大鼠的毛发、神态及游泳状态。

1.3.3 实验方法

1.3.3.1 样本的收集和处理

10%组织匀浆的制备：在大鼠最后一次游泳结束 24 小时后，安静组存活 11 只，运动组存活 12 只，两组各随机抽取 8 只，断头处死大鼠，迅速取出其心脏，制备 10%心肌组织匀浆。

线粒体的提取：取 10%组织匀浆，用普通离心机以 2000 r/min 离心 10 分钟，弃沉淀，取上清液在 4℃以 10000r/min 离心 15 分钟，沉淀物为线粒体。将分离的线粒体用冷的生理盐水制成混悬液备用。

1.3.3.2 测试指标及方法

心肌线粒体 MDA、SOD、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶等指标及心肌线粒体蛋白定量都是用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测试，测试过程严格按其说明书操作。

心肌线粒体游离钙的测定：线粒体用负载介质制成悬浮液，使浓度适度，加入 Ca^{2+}荧光指示剂 Fura-2/AM，37℃水浴振荡 45 分钟，离心去上清后加入 1ml 负载介质，37℃水浴 2-3 分钟，用日本日立公司产的 650－60 荧光分光光度计测定荧光信号，方法是单波长荧光法，即以 340nm 波长激发，448nm 波长发射，根据测得的荧光信号利用公式计算线粒体内游离钙的浓度。

1.4 数据处理

应用 SPSS 软件包对数据进行统计学分析，数据均以 $\overline{X}$±SD 表示，对数据进行组间 t 检验及相关分析。

2 结果

2.1 过度训练大鼠模型的建立

在本实验中，经过 6 周递增负荷的游泳，运动组大鼠目光呆滞，神情疲惫，毛色晦暗，有脱毛现象；在后两周增加负荷后，游泳至力竭的时间缩短，中途休息的时间、次数增加，运动能力下降。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

6 周递增负荷游泳后与安静组相比，运动组血睾酮下降了 73.94%，血睾酮/皮质酮下降了 86.97%，血红蛋白下降了 20.14%，血尿素氮升高了 107.19%，尿蛋白升高了 202.69%，且差异极显著（P<0.01）（见表 2，3）。

我们通过对运动组大鼠一般状况的观察和训练后血尿生化指标的测定，参照冯炜权，朱全、郑陆等[5-7]提出的判断过度训练的标准认为运动组大鼠经过 6 周递增负荷训练已经达到过度训练状态。

表 2：6 周递增负荷游泳后各组大鼠血睾酮、皮质酮、睾酮/皮质酮值

组　别 (group)	血睾酮 (ng/ml)	皮质酮 (ng/ml)	睾酮/皮质酮
安静组	1.877±0.717	24.18±3.88	0.0806±0.0331
运动组	0.488±0.104△△	47.81±7.31△△	0.0105±0.0029△△

注：△△为与安静组比较 P<0.01。

表 3：6 周递增负荷游泳后各组大鼠血尿素氮、尿蛋白和血红蛋白值

组　别 (group)	血尿素氮 (mg/L)	尿蛋白 (mg/L)	血红蛋白 (g/L)
安静组	103.72±20.18	53.92±8.16	148.38±3.74
运动组	214.90±20.59△△	163.21±7.77△△	118.50±3.59△△

注：△△为与安静组比较 P<0.01。

2.2 过度训练后大鼠心肌线粒体各指标

过度训练后大鼠心肌线粒体各指标及其相关分析见表 4，表 5。

MDA：运动组显著高于安静组（P<0.01）；SOD：运动组显著低于安静组（P<0.01）；Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶:运动组显著低于安静组（P<0.01）；游离钙：运动组显著低于安静组（P<0.01）.

相关分析：游离钙与 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶低度正相关（P<0.01），与 MDA 中度负相关（P<0.01），与 SOD 低度正相关（P<0.01）；Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶与 MDA 低度负相关（P<0.01），与 SOD 低度正相关（P<0.01）。

表 4：6 周递增负荷游泳后各组大鼠心肌线粒体 MDA、SOD、Free Ca^{2+} 及 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶值

组　别 (group)	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)	Free Ca^{2+} (nmol/L)	Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP (μmolPi/mgprot/hour)
安静组	12.34±0.99	354.89±60.87	312.14±26.71	28.32±7.41
运动组	19.59±2.51△△	235.32±37.46△△	220.82±22.91△△	17.52±4.30△△

注：△△为与安静组比较 P<0.01。

表 5：各 指 标 间 相 关 分 析

	Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP	MDA	SOD
Free Ca^{2+}	0.461**	-0.636**	0.498**
Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP		-0.447**	0.490**

注：**为显著性水平为 0.01。

3．分析和讨论

3.1 过度训练对大鼠心肌线粒体自由基代谢的影响

长时间疲劳运动可引起心肌线粒体自由基生成增多，这已是不争的事实[8]。刘铁民实验[2]证实过度训练可引起大鼠心肌细胞线粒体 MDA 含量增加,SOD 活性下降。MDA 是自由基攻击膜不饱和脂肪酸使之发生脂质过氧化反应的代谢产物，其含量和脂质过氧化反应平行，通过测定 MDA 可以反映自由基的生成情况。超氧化物歧化酶（SOD）是生物体内对抗氧自由基最重要的抗氧化酶，对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用，它的作用是将氧自由基歧化，将一分子氧自由基氧化成为 O_2，另一分子氧自由基还原为 H_2O_2，因而，SOD 活性的高低是机体抗氧化能力强弱的标志。本实验中，过度训练后运动组大鼠心肌线粒体 MDA 的含量显著升高，SOD 活性显著降低，与以往实验结果一致。由此可知过度训练后运动组大鼠心肌线粒体内自由基生成增加，抗氧化能力下降，其原因可能在于：首先，线粒体不仅是 ATP 生成的场所，而且还是机体内源性自由基的主要产生部位之一，过度训练中，心肌细胞代谢加强，氧耗增加，线粒体电子传递系统异常活跃，以产生更多

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的 ATP 来满足大强度运动对能量的需求。与此同时，线粒体呼吸链中的氧化型泛醌向还原型泛醌转换的速率加快，该过程可以产生泛半醌自由基，还原型泛醌还可以通过泛醌-细胞色素 C 还原酶的作用，将电子传递给细胞色素 C，又可以产生半醌自由基，半醌自由基与氧作用可以产生氧自由基[9]；其次，过度训练中，心肌代谢加强、耗氧量增加，对供血、供氧要求提高，冠脉供血量相对不足可引起心肌能量需求过高性缺氧，运动后复氧则可引起由黄嘌呤氧化酶催化氧分子生成氧自由基的反应[10-11]；SOD 活性的降低可能与过度训练时产生的自由基对 SOD 消耗过多有关，而且 SOD 歧化氧自由基生成的 H_2O_2 对 SOD 本身也有杀伤作用。

过量的自由基使线粒体膜发生脂质过氧化反应：一方面使线粒体膜流动性下降，刚性增加，影响了膜上酶的功能的发挥，从而影响电子传递和偶联磷酸化的进行[12]；另一方面，自由基可攻击膜内巯基，膜内蛋白质分子发生链式聚合反应，自由基还能增加磷脂酶 A_2 的活性，使膜磷脂分解，这些都可使线粒体膜通透性转运受到影响，释放诸如 Ca^{2+}、细胞色素 C 等物质[13]。

3.2 过度训练对大鼠心肌线粒体游离钙的影响

Ca^{2+}不仅参与心肌兴奋收缩偶联过程，还参与细胞内代谢和生理功能的调节。静息时胞质内 $[Ca^{2+}]\leq10^{-7}$mol/L, 细胞外液$[Ca^{2+}]\geq10^{-3}$mol/L, 细胞内外浓度差 10000 倍左右，细胞内钙离子大部分储存于线粒体和肌质网内[14]。线粒体是细胞钙的缓冲器,具有摄取、释放 Ca^{2+}以及调节胞浆$[Ca^{2+}]$的能力，线粒体内钙占细胞内钙含量的 30%左右，其含量比胞浆高 500 倍[15]。线粒体中游离钙可激活三羧酸循环中的丙酮酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶等，促进电子传递，激活 F_1-ATP 酶和嘌呤核苷酸转位酶[16-17]。

近年来发现运动性疲劳的出现乃至过量运动引起肌细胞的不可逆变化也常与 Ca^{2+}在肌细胞内各细胞结构的分布异常有密切关系[1]。丁树哲等报道长时间有氧运动后大鼠心肌线粒体总钙增加，游离钙减少[18]。刘铁民报道[2]过度训练后心肌线粒体总钙增加，游离钙如何变化并未报道。本实验中，过度训练后运动组大鼠心肌线粒体游离钙显著降低，与丁树哲实验结果一致。丁树哲、刘铁民等认为运动后大鼠心肌线粒体钙发生的变化是由于运动导致自由基生成增加，自由基对线粒体膜进行攻击使其发生脂质过氧化从而影响了膜对钙离子的转运。过度训练后大鼠心肌线粒体游离钙的下降是否也是自由基作用所致呢？

线粒体通过 3 种机制转运钙[16]：（1）耗能的内流机制，即通过 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶将钙离子从胞浆摄入到线粒体中；（2）耗能的外流机制，包括钠依赖外流和非钠依赖外流（钙-氢交换）；（3）可通透性转换通道。线粒体游离钙的下降必然是过度训练对线粒体钙转运机制产生了影响。

首先，Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶是线粒体膜上调节胞浆 Ca^{2+}浓度的酶，其活性能够反映线粒体摄入 Ca^{2+}的能力，酶的活性越大，单位时间内线粒体通过 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶摄入的 Ca^{2+}量越多。本实验结果表明经过过度训练后，单纯运动组大鼠心肌线粒体膜上的 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性显著下降，且经相关分析发现 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性与 MDA 呈显著负相关，与 SOD 呈显著正相关，提示 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性亦与线粒体膜脂质过氧化水平和抗氧化能力有关。其活性下降的原因可能在于过度训练引起的线粒体脂质过氧化一方面损伤线粒体膜，使膜的流动性降低，影响了膜上酶的功能，或是酶因交联聚合而失去活性；另一方面长时间大负荷运动引起能源物质耗竭、代谢产物堆积等导致 ATP 含量减少，Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性降低。本实验经过相关分析表明：线粒体游离钙与 MDA 呈显著的负相关，与 SOD 呈显著的正相关，与 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶呈显著的正相关，推测线粒体游离钙的下降可能是由于过度训练导致自由基生成增加，线粒体膜脂质过氧化水平升高、抗氧化能力下降，膜 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性下降，线粒体调节胞浆钙离子浓度的功能受到影响，线粒体钙摄取减少，线粒体游离钙下降。

其次，线粒体膜还通过钙离子通道调节线粒体内钙的含量。钙离子通道是一类贯穿脂质双层的、中央带有亲水性孔道的膜蛋白，孔道在一定条件下可开放，当其开放时，钙离子经孔道跨膜流出。研究报道[12]，长时间力竭运动后心肌线粒体自由基产生增加，攻击膜蛋白，使蛋白聚合、交联、膜蛋白构型发生改变；自由基还可直接作用于磷脂酶 A_2，增加其活性，促使膜磷脂分解，造成膜结构的改变，这些都可导致线粒体膜上钙离子通道的打开，释放钙离子，使游离钙下降。本实验中过度训练后心肌线粒体自由基产生增加，所以推测自由基也可通过上述途径对线粒体膜结构发生影响，从而改变钙离子通道的转运，致使游离钙下降。

最后，过度训练时心肌细胞相对缺氧，ATP 消耗增加，线粒体内无机磷增加，使游离钙和磷结合形成磷酸钙沉积增加，游离钙下降。线粒体内游离钙的下降影响了三羧酸循环中关键酶的活性，影响还原当量的生成，最终影响 ATP 的合成。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4. 结论

经过 6 周的递增负荷训练，运动组大鼠呈过度训练状态，运动能力下降，心肌线粒体受到了氧化损伤，游离钙下降。其原因在于过度训练使大鼠心肌线粒体自由基生成增加，线粒体抗氧化酶活性下降，使线粒体膜发生脂质过氧化，影响了线粒体内钙离子的正常转运，导致线粒体内游离钙下降。

5. 参考文献

[1] 许豪文.运动生物化学概论[M].高等教育出版社，2001：298,307,339.
[2] 刘铁民，许豪文,等.过度训练对大鼠心肌组织损害的实验研究[J].中国体育科技，2003，2:31-34.
[3] 王文信,丁树哲,许豪文,等.耗竭性游泳对大鼠心肌线粒体膜功能的影响[J].生物化学与生物物理学报,1994,26(2):243-245.
[4] 张钧,等.力竭运动对大鼠心肌线粒体游离钙及磷脂酶 A_2 的影响[J].中国运动医学杂志,1998,17(1):26-27,40.
[5] 朱全，浦钧宗，张敏.游泳方法建立大鼠模拟过度训练模型[J].中国运动医学杂志，1998，2：137-140.
[6] 步彬，张希彬,等.过度训练对心肌影响的病理和酶组织化学研究[J].成都体育学院学报，1998，24(3)：72-77.
[7] 冯炜权.过度疲劳及过度训练的生化诊断—运动生物化学动态之三[J].北京体育大学学报,2002,23(4):498-502.
[8] DAVIES J.Free radical and tissue damage produced produced by exercise[J].J Biophy Res Comm,1982,107:198-205.
[9] 陈彩珍,等.丹参对疲劳性游泳大鼠心肌线粒体对氧化损伤的保护作用[J].广州体育学院学报,1995,15(2):6-10.
[10] 时庆德,张勇,等.运动性疲劳的线粒体膜分子机制研究 II.运动性氧自由基代谢途径再探讨[J]. 中国运动医学杂志,2000,19(1):43-44,55.
[11] 张勇,等.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[J].天津体育学院学报,1997,12(1)18-22.
[12] 赵海军,徐晓阳,等.力竭运动对线粒体结构、功能的影响[J].成都体育学院学报,2000，26(6):63-66.
[13] 毛丽娟,等.有氧运动对线粒体膜通透性转运通道的影响[J].成都体育学院学报,2000,26(6):25-27.
[14] 齐鹰，苏静怡.心肌肌质网钙转运障碍在缺血-再灌注损伤中的意义[J].生理科学进展，1992，23（4）：348-351.
[15] 周锦琳，田野,等.急性运动对大鼠骨骼肌线粒体 Ca2+-ATP 酶和 H+-ATP 酶活性的影响[J].北京体育大学学报，2001，24(3):320-322,346.
[16] 丁树哲.长时间运动中线粒体钙运输的作用[J].现代康复,2000,4(3):394-395.
[17] 常波.运动、氧化应激与 DNA 损伤和修复[J].沈阳体育学院学报,2004,23（6）：756-757,788.
[18] 丁树哲，王文信，许豪文，等.力竭游泳对大鼠心肌线粒体钙运输的影响[J].生物化学杂志,1995, 11(3):336.

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net