

运动性疲劳状态下大鼠心肌线粒体氧化磷酸化偶联的变化

夏云健¹, 时庆德², 蒋春笋¹, 张勇³

摘要: 主要目的: 为了探讨运动性疲劳的线粒体氧化磷酸化偶联机制。方法: 以SD大鼠递增负荷急性力竭跑台运动为疲劳模型, 分别测定了运动后即刻心肌线粒体: (1) 呼吸链复合体 I+III 和 II+ 电子传递与质子泵出比值 ($H^+/2e$); (2) 线粒体呼吸控制。结果: 线粒体苹果酸和谷氨酸为底物启动的呼吸链复合体 I+III 总 $H^+/2e$ 降低了 9.97% ($P < 0.05$); 线粒体以苹果酸+谷氨酸和琥珀酸为底物的态 4 呼吸均显著高于安静时, 呼吸控制比均显著低于安静时 ($P < 0.05$)。结论: 运动性疲劳状态下线粒体氧化磷酸化偶联程度降低与质子漏增加、电子传递与质子泵出脱偶联等有关。

关键词: 心肌线粒体; 呼吸控制; 电子传递与质子转移偶联; 力竭性运动; 大鼠

中图分类号: G 804.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-0000(2002)02-0019-03

The Change of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Rat Heart during Exhaustive Exercise

XIA Yun-jian¹, SHI Qing-de², JIANG Chun-sun¹, ZHANG Yong³

(1. Dept. of Physical Education, Jiangnan University, Wuhan 430012; 2. Beijing University of Physical Education, Beijing 100084; 3. Tianjin Research Institute of Sports Medicine, Tianjin 300381)

Abstract: Rats running with an incremental intensity to exhaustion was used as an experimental model. The experiment was designed to determine the changes of prepared mitochondria immediately after exhaustive exercise: 1. Rate of electron transfer to proton pump of mitochondrial respiratory chain complex I+III and II+III ($H^+/2e$). 2. The mitochondrial respiratory control. The results showed that, in exhausted rats, the parameter of complex I+III total $H^+/2e$ decreased with 9.97% ($P < 0.05$), in the presence of Malate and Glutamate, and Succinate. The rate of state 4 increased significantly in the presence of Malate and Glutamate, in heart ($P < 0.05$). RCR decreased significantly in the presence of Malate and Glutamate and in the presence of Succinate in heart ($P < 0.05$). The present research suggested that the increase of mitochondria proton leak and the decrease of coupling of electron transfer and proton pump may be response for the decrease of mitochondrial coupling of oxidative phosphorylation.

Key Words: heart mitochondria; respiratory control; coupling of electron transfer and proton pump; exhaustive exercise; rats

从能量代谢的观点来看,运动性疲劳的产生与机体能量供应不足有密切关系。线粒体氧化磷酸化是机体的重要能量来源。正常生理状态下,人体 80% 以上的能量由线粒体氧化磷酸化供应^[1]。机体维持长时间运动的能力,也依赖于线粒体内膜氧化磷酸化能力。运动性疲劳状态下线粒体功能改变已被广泛研究,但缺乏对线粒体整体功能及氧化磷酸化偶联状况的考虑。本文从线粒体能量转换功能的角度,测定了心肌的不同底物的线粒体生物力学参数,研究了运动性疲劳状态下线粒体氧化磷酸化偶联程度及其影响因素,探讨了线粒体氧利用率降低的原因,以了解运动性疲劳状态下线粒体呼吸链内膜氧化磷酸化偶联的变化及其影响因素以及这些因素在运动性疲劳中的膜生物学意义和可能的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物及运动模型

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 220~260 g,由中国科学院动物研究所实验动物中心提供。随机分为运动组 6 只,对照组 7 只。运动方式参照 Bedford(1979)根据大鼠体重/摄氧量回归方程所建立的递增负荷运动模型^[2],按以下程序跑台运动,坡度 0°: 8.2 ml/min, 15 min; 5°: 15 ml/min, 15 min; 10°:

19.3 ml/min (相当于 76% VO_{2max} , 次最大强度)运动至力竭,运动时间 123 ± 37 min。

1.2 主要试剂

去脂牛血清白蛋白 (Defatted BSA)、鱼藤酮 (Rotenone)、ADP 等均为 Sigma 产品; HEPES 为 Merck 产品; Mannitol 为 Fluka 产品; 其他为国产分析纯。

1.3 心肌线粒体提取

动物分别于安静和运动至力竭后即刻断头处死,并迅速取出心脏,加入介质 (0.25 M Sucrose, 3.0 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 7.4) 20 ml,用 Teflon 电动匀浆器 (B. Braun 公司, USA) 匀浆,600 g 离心 5 min。弃沉淀,上清于 10 000 g 离心 10 min。沉淀用 5 ml 介质 (0.25 M Sucrose, 2.0 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 7.4) 悬浮, Teflon 手动匀浆器匀浆。加入 20 ml 介质, 10 000 g 离心 10 min。沉淀悬浮在 0.5 ml 介质 (0.25 M Sucrose, 2.0 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 7.4) 中。分离操作均在 0~4°C 条件下进行。线粒体蛋白含量用双缩脲法测定,以 280 nm 下校正的 BSA 作标准。

1.4 线粒体电子传递与质子泵出比值 ($H^+/2e$) 的测定^[3]

收稿日期: 2001-03-01; 录用日期: 2002-04-22

作者简介: 夏云健 (1955-), 男, 湖北黄陂人, 江汉大学体育系体育保健学副教授。

作者单位: 1. 江汉大学体育系, 武汉 430012; 2. 北京体育大学人体运动科学系, 北京 100084; 3. 天津体育学院运动医学研究所, 天津 300381。

依铁氰化钾脉冲法测定线粒体复合体 I + III 和 II + III 的电子传递和质子转位。测定体系含 Mannitol 220 mmol/L, 蔗糖 70 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Hepes 2 mmol/L, MgCl₂ 4 mmol/L, KCN 2 mmol/L, BSA 1.5 mg/ml, Rotenone 4 μmol/L, pH 7.4。反应温度为 25 ℃, 反应体积 2 ml。测定线粒体复合体 I + III 和 II + III 的总 H⁺/2e, 分别加入苹果酸 0.1 mmol/L + 谷氨酸 1 mmol/L, 琥珀酸 3.3 mmol/L。线粒体蛋白浓度为 1 mg/ml。在丹麦产 pHM84 Research pH 计上测定并记录样品以 Fe³⁺ 作为人工电子受体, 氧化 M + G 和 S 过程中介质 pH 值的变化情况。以 120 μmol/L 精确定量的 K₃Fe(CN)₆ 启动反应, 随质子被呼吸链跨膜泵出, 使介质 pH 降低, 降低幅度由记录仪记录。待 Fe³⁺ 完全被还原后, 介质 pH 趋于稳定或回升, 加入 1 μl 0.1010N 标准盐酸进行浓度标定, 重复两次以确定 pH 变化。H⁺/2e 按下列公式计算: 总 H⁺/2e = (Fe³⁺ 引起的 pH 下降 × 标准盐酸摩尔浓度 × 2 / 标准盐酸引起的 pH 下降) / Fe³⁺ 摩尔数。

1.5 线粒体呼吸控制的测定

极谱法测定苹果酸 + 谷氨酸及琥珀酸为呼吸底物的态 4 呼

表 1 力竭运动后肝脏线粒体呼吸链 I + III 和 II + III 电子传递与质子泵出比(H⁺/2e)变化(X ± S)

	Control (n = 6)	Exercise (n = 7)	%
Complexes I + III	3.21 ± 0.27	2.89 ± 0.29 *	- 9.97
Complexes II + III	2.71 ± 0.07	2.65 ± 0.08 ^{n.s.}	- 2.21

注: * 与对照相比, P < 0.05; n.s. 与对照相比, 无显著性差异

表 2 运动性疲劳状态下大鼠心肌线粒体苹果酸 + 谷氨酸为底物的呼吸控制的变化(X ± S)

	Control (n = 6)	Exercise (n = 7)
State 4 (nmolO ₂ /min. mgpro.)	5.87 ± 0.67	6.79 ± 0.95 *
State 3 (nmolO ₂ /min. mgpro.)	36.59 ± 5.52	38.05 ± 5.42 ^{ns}
RCR	6.22 ± 0.57	5.62 ± 0.45 *

注: * 与对照相比, P < 0.05; n.s. 与对照相比, 无显著性差异

2.3 大鼠心肌线粒体以琥珀酸为底物的呼吸控制

运动性疲劳状态下大鼠心肌线粒体以琥珀酸为底物的态 4

表 3 运动性疲劳状态下大鼠心肌线粒体琥珀酸为底物的呼吸控制的变化(X ± S)

	Control (n = 6)	Exercise (n = 7)
State 4 (nmolO ₂ /min. mgpro.)	44.99 ± 7.54	54.86 ± 7.68 *
State 3 (nmolO ₂ /min. mgpro.)	114.07 ± 13.73	128.08 ± 22.09 ^{ns}
RCR	2.56 ± 0.21	2.33 ± 0.13 *

注: * 与对照相比, P < 0.05; n.s. 与对照相比, 无显著性差异

3 讨论

H⁺/2e 是质子氧化还原势能 (Eh) 转化为质子电化学势能 (P, μH⁺) 的能量偶联量程度, 反映电子传递与质子泵出偶联程度^[5]。本实验观察到力竭运动后心肌线粒体呼吸链复合体 I + III 电子传递与质子泵出比值 (H⁺/2e) 明显降低, 表明线粒体 NADH 呼吸链的电子传递与质子泵出偶联程度均下降。力竭运动后线粒体呼吸链复合体活性降低已在大鼠肝脏、心肌和骨骼肌中观察到^[6]。复合体活性降低的原因可能和疲劳时自由基生成及脂质过氧化损伤增加^[7]、线粒体膜流动性的改变^[8]、线粒体膜磷脂含量下降^[9]有关。虽然目前力竭运动后线粒体内膜呼吸链复合体 (CoQ - Cytc 还原酶) 的功能变化尚未见报道, 但推测上述因素亦将在一定程度上影响其活性, 降低其质子泵功能, 使 H⁺/2e 下降。线粒体呼吸链电子传递与质子泵出偶联程度降低, 直接导致线粒体合成 ATP 的质子电化学势

吸速率 (state 4)、态 3 呼吸速率 (state 3) 及呼吸控制比 (respiratory control rate, RCR)。采用 Clark 氧电极测定密闭反应体系中氧饱和度的变化, 以确定线粒体耗氧速率^[5]。

1.6 统计学处理

实验数据由 SPSS 统计软件处理, 以 X ± S 表示, t 检验。显著性水平为 P < 0.05。

2 结果

2.1 线粒体电子传递与质子泵出偶联状况 (H⁺/2e)

以 M + G 为呼吸底物的总电子传递与质子泵出比值, 运动后即刻分别较运动前安静值下降 9.97% (P < 0.05), 而以 S 为底物的总电子传递与质子泵出比值无显著性变化。表明, 心肌线粒体复合体 I 参与电子传递与质子转移偶联程度降低, 见表 2。

2.2 大鼠心肌线粒体以苹果酸 + 谷氨酸为底物的呼吸控制

运动性疲劳状态下大鼠心肌线粒体以苹果酸 + 谷氨酸为底物的态 4 呼吸显著高于安静时, 呼吸控制比显著低于安静时, 态 3 呼吸无显著性变化 (表 2)。

呼吸显著高于安静时, 呼吸控制比显著低于安静时, 态 3 呼吸无显著性变化 (表 3)。

能下降, 从而降低了线粒体合成 ATP 的效率。

本实验中观察到运动性疲劳状态下大鼠心肌线粒体以苹果酸 + 谷氨酸为底物和以琥珀酸为底物的呼吸控制比显著下降, 线粒体呼吸控制比的下降是由态 4 呼吸增加引起的 (见表 2、3)。呼吸控制比是评价线粒体完整性和氧化磷酸化偶联程度的灵敏指标, 其下降表明线粒体氧化磷酸化偶联程度降低, 线粒体功能受损。Groen 等人的研究认为态 4 呼吸受跨线粒体内膜的质子漏控制^[9], 运动性疲劳状态下态 4 呼吸速率增加表明线粒体质子漏增加。从目前的研究来看, 运动性疲劳状态下态 4 呼吸速率加快, 质子漏增加的可能原因包括线粒体膜通透性改变^[10]、体温升高^[11]、电子漏增多引起的质子漏^[12]。

线粒体在通过氧化磷酸化, 将底物的氧化还原势能转变为质子电化学势能再转变为 ATP 中所含磷酸能的过程中, 电子传递与质子泵出脱偶联、质子电化学势能经非 ATP 合成途径的消耗以及 ATP 合成酶系的损伤都将使线粒体氧化磷酸化偶联程

度降低。本研究的结果提示运动性疲劳下心肌线粒体氧化磷酸化偶联程度降低,无效氧耗增多,这可能是线粒体氧利用率下降的重要机制。运动性疲劳状态下线粒体氧化磷酸化偶联程度降低与质子漏增加,电子传递与质子泵出脱偶联(线粒体O环功能障碍)等有关。

参考文献:

- [1] Papa S. Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiological implications[J]. Biochim Biophys Acta, 1996,1276:87 - 105.
- [2] Bedford TG. Maximal oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. J Appl Physiol, 1979,47: 1278 - 1283.
- [3] 魏影允,焦选茂,刘树森. 线粒体呼吸链复合体 + 的电子传递与质子转移的偶联. 生物化学杂志[J], 1995,11(5):593 ~ 598.
- [4] Sherrat HSA, Watmough NJ, Johnson MA, et al. Methods for study of normal and abnormal skeletal muscle mitochondria[A]. In: David G. Methods of biochemical analysis[C]. Amsterdam: Elsevier, 1982,33:264.
- [5] Marten, W. and Matti, S. The mitochondrial respiratory chain[M]. In: Bioenergetics. Ernster. Elsevier Science Publishers. B. V.

1984: 49 ~ 56.

- [6] 张勇,李静先,陈家琦,等. 运动性疲劳状态下线粒体膜生物学特征的研究 力竭运动后大鼠心和骨骼肌线粒体膜脂质过氧化水平变化[J]. 体育科学, 1994,14(4):67 - 70.
- [7] Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA. Free radicals and tissue damage produced by exercise[J]. Biochem Biophys Res Commu, 1982,107:1198 ~ 1205.
- [8] 丁树哲,许豪文,程德基. 运动性内源自由基对大鼠心肌线粒体膜的影响[J]. 生物化学与生物物理学报, 1991,23(4):305 - 309.
- [9] Groen AK, Wanders RJA, Westerhoff HV, et al. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration[J]. J Biol Chem, 1982, 257, 2754 - 2757.
- [10] 曹兆丰,程德基,林克椿. 运动性内源自由基对大鼠肝线粒体的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 1993,9(1):25 - 28.
- [11] Wills WT and Jackman MR. Mitochondrial function during heavy exercise[J]. Med Sci Sports Exerc, 1994,26:1347 - 1356.
- [12] 聂金雷,蒋春笋,张勇等. 运动性疲劳运动性疲劳的线粒体膜分子机理研究 IV: 线粒体质子跨膜势能、质子漏与运动性内源性氧生成的相互关系[J]. 中国运动医学杂志, 2001, 17(2):137 - 141.

(上接第 11 页)

创新的价值依据。因此,在新的社会经济发展背景下,体育制度的改革与创新将有利于经济增长,同时也必然有利于高效率地发展体育事业,从而更有效地实现奥运争光的目标。这样,在理论上双重目标于一个新的层面上达到了均衡。而实践中,制度的创新还将是一个不同利益集团动态博弈的复杂过程。

参考文献:

- [1] 李敦厚. 体育产业发展的现状和问题[M]. 见:国家体育总局政策法规司. 体育产业现状、趋势与对策. 北京:人民体育出版社,2001. 96.
- [2] 张发强. 对我国体育产业化的战略思考[C]. 见:国家体委政策法规司. 走向 21 世纪的思想:全国体委系统领导干部论文集. 1996. 23,34.
- [3] 张昊. 关于我国体育产业化的几点思考[J]. 北京体育师范学院学报,1999,11(4):1 - 4.
- [4] 周振华. 体制变革与经济增长. 体制变革与经济增长——中国经验与范式分析[M]. 上海:上海三联书店、上海人民出版社,1999. 17 - 19,13.

- [5] 卢现祥. 西方新制度经济学[M]. 北京:中国发展出版社,1999. 9, 174.
- [6] 鲍明晓. 我国体育产业的形成和发展[J]. 北京体育师范学院学报. 1999,11(4):21 - 28.
- [7] 李敦厚. 中国体育产业发展现状与前景[Z]. 见:国家体育总局政策法规司. 中国体育市场研究. 2000. 10.
- [8] 肖天. 关于体育改革的断想[Z]. 见:体育改革与发展的思索:1997 年国家体委领导干部部虚会文稿汇编. 1998. 128 - 129.
- [9] 刘伟. 经济改革与发展的产权制度解释[M]. 北京:首都经济贸易大学出版社,2000. 200 - 201
- [10] 石磊. 市场经济条件下的各国体育政策[Z]. 国家体育总局体育信息研究所,1998.
- [11] 方福前. 公共选择理论:政治的经济学[M]. 北京:人民大学出版社,2000. 32 - 33.
- [12] 俞可平. 治理与善治[M]. 北京:社会科学文献出版社,2000. 8 - 10.
- [13] 国务院发展研究中心“经济全球化与政府作用”课题组. 为迎接入世我国应在十大方面进行改革[Z]. 国研网,2001 - 08 - 07.