

网络出版时间:2013-05-31 20:00

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130531.2000.026.html>

运动对大鼠心肌细胞与一氧化氮合酶的影响

蒋 磊,周振茂,夏美燕,杜世全

(安徽医科大学 体育教学部,安徽 合肥 230032)

【摘 要】 【目的】研究运动对大鼠心肌细胞及一氧化氮合酶的影响,探讨运动引起心肌细胞凋亡的可能机制。**【方法】**通过游泳训练建立大鼠有氧训练组和力竭过度训练组模型,以常规饲养大鼠为对照,检测各组大鼠心脏质量与心系数(心脏质量/体质量)的变化,采用 Western blot 检测心肌细胞中 p53 蛋白的表达,DNA ladder 法检测心肌组织细胞的凋亡,并测定各组大鼠心肌与血清中的 NO 含量及结构型 NOS(cNOS)、诱导型 NOS(iNOS)活性。**【结果】**力竭过度训练组大鼠心脏质量和心系数增加,心肌细胞中 p53 蛋白的表达显著增加,与过度训练时大鼠心肌细胞凋亡基因的调控有关。DNA ladder 检测结果显示,有氧训练组大鼠心肌与血清中的 cNOS 活性升高,有少量的 NO 生成,对大鼠心血管系统产生了良性影响,使大鼠心血管系统功能增强;而力竭过度训练组出现了明显的凋亡条带,长期的过度负荷使大鼠心肌与血清中的 iNOS 活性升高,产生的较多 NO 对细胞具有毒性作用。**【结论】**不适宜的运动负荷会促使大鼠心肌细胞凋亡,NO 可能参与了心肌的损害过程。

【关键词】 心肌细胞;细胞凋亡;p53 蛋白;一氧化氮合酶;大鼠

【中图分类号】 G804.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)06-0008-05

Effect of exercise on myocardial cell and nitric oxide synthase in rats

JIANG Lei,ZHOU Zhen-mao,XIA Mei-yan,DU Shi-quan

(Section of PE,Anhui Medical University,Hefei,Anhui 230032,China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the mechanism of myocardial apoptosis and researched the effects of exercise on apoptosis of myocardial cell and nitric oxide synthase in rats. **【Method】** Aerobic exercise group and overtraining group models were established based on swimming training. The rats in regular feeding group were set as control to detect changes of heart weight and heart coefficient in other groups. The expressions of p53 protein were detected by Western blot. The apoptosis of myocardial cell were detected by DNA ladder in tissue sections. Determination of NO content, cNOS and iNOS activity in rats myocardial and serum were measured by kit. **【Result】** The heart weight and heart coefficient of rats in overload training group increased. The expression of p53 protein increased significantly in cardiac muscle cell after overtraining, which might have relation to genetic controls on apoptosis in myocardial cell. DNA ladder results showed that it had noticeably apoptosis strips after overload training. cNOS activity in myocardial and serum of rats in the aerobic exercise group increased, and generate a small amount of NO was generated, positively affecting cardiovascular system, but long term overload training could lead to too much NO, which had toxic effect on cell. **【Conclusion】** Inappropriate exercises load will result in the in-

【收稿日期】 2012-08-28

【基金项目】 安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2012Z170)

【作者简介】 蒋 磊(1981—),男,安徽全椒人,讲师,硕士,主要从事运动生理学研究。E-mail:mahous@126.com

【通信作者】 杜世全(1963—),男,安徽合肥人,教授,主要从事运动人体科学研究。E-mail:190642189@qq.com

crease of myocardial apoptosis, and NO may be involved in the process of myocardial damage.

Key words: myocardial cell; cell apoptosis; p53 protein; nitric oxide synthase; rat

运动强度对心肌的影响是体育界与医学界的重要研究领域。长期适度运动可使心脏的形态结构产生适应性变化,主要表现为心脏质量增加、体积增大、心腔扩大等,能够改善心脏功能,使心力储备增强;然而过度运动可造成多器官功能紊乱的病理状态,对心脏的心肌细胞损伤也不例外^[1-2]。研究表明,心肌细胞受到损伤的同时也存在凋亡现象,对维持心脏的正常形态结构具有重要的影响,与心脏的生理、病理发展过程息息相关^[3]。细胞的凋亡与坏死不同,其发生有重要的生物学意义。本研究探讨了经不同运动负荷训练后大鼠心肌细胞的凋亡程度、一氧化氮含量及其合酶的活性,旨在探索运动引起的心肌细胞凋亡与心脏重塑的可能机制,从而为运动性心肌损伤的预防和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物造模

选用体质量约 200 g 的健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 30 只(购自安徽医科大学动物研究中心),适应性喂养 3 d 后随机分为 3 组:对照组(Control group, C)、有氧训练组(Aerobic exercise group, A)和力竭过度训练组(Overtraining group, O),每组 10 只,参照 Iemitsu 等^[4]报道的方法造模。各组大鼠先称质量, C 组常规饲养,不进行运动训练; A 组和 O 组进行游泳训练,第 1 天游泳时间均为 5 min, A 组游泳时间每天增加 2 min 直至 75 min, O 组游泳时间每天增加 5 min 直至 180 min; 训练 8 周以后, A 组大鼠保持每天训练 75 min 不变, O 组大鼠每天训练 180 min,并在最后 5 min 开始尾部负重(负重质量约为体质量的 5%),负重时间每天增加 5 min,维持训练 8 周,整个造模时间为 16 周。

1.2 动物取材

大鼠末次训练 24 h 后,称体质量,断头处死,取血,离心收集血清,并快速解剖大鼠,取心脏,于生理盐水中浸泡后取出,滤纸吸干水分称质量。取左心室加生理盐水制成匀浆, 4 ℃ 离心,获取上清液备用。所有样本于 -80 ℃ 冰箱冻存。

1.3 p53 蛋白表达的 Western blot 检测

取各组大鼠同一部位心肌组织,剪碎放入研磨器中,加 RIPA 缓冲液,充分研磨后放入离心管中,

12 000 r/min 离心 30 min,取上清。制备 SDS-PAGE 胶块,每孔加入 20 μL 上述蛋白上清液进行电泳,湿法转膜,质量分数 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加入 p53 兔多抗(1 : 500), 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1 : 8 000),室温孵育 2 h, TBST 洗涤后于暗室中用 ECL 试剂盒显色、显影、定影。以 β-actin 为内参,用各组的 p53 表达量和 β-actin 表达量的比值作为 p53 的相对表达量。

1.4 细胞凋亡的 DNA ladder 检测

用 DNA ladder 试验检测细胞凋亡,按照碧云天的细胞凋亡 DNA ladder 抽提试剂盒说明书抽提 DNA,取部分抽提的 DNA,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 NO 含量及 cNOS、iNOS 活性检测

NO 含量采用硝酸还原酶法检测;结构型 NOS(cNOS)和诱导型 NOS(iNOS)活性采用化学比色法检测;试验所用试剂盒购于南京建成生物工程研究所,所有操作过程均按试剂盒说明进行。

1.6 数据统计

应用 SPSS11.0 统计软件对试验数据进行分析,全部数据均用“平均值±标准差($\bar{x} \pm S$)”表示;分组因素单独效应采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 大鼠心脏质量与心系数的变化

由表 1 可知,力竭过度训练组大鼠的心脏质量和心系数(心脏质量/体质量)均较对照组显著增大($P < 0.05$),但体质量的变化并无显著差异,表明力竭过度训练会导致大鼠心肌梗大;有氧训练组大鼠心脏质量和心系数与对照组相比虽有差别,但并无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 大鼠心肌组织 p53 蛋白表达的 Western blot 检测

由图 1 可以看出,力竭过度训练组大鼠心肌组织中的 p53 蛋白表达水平较对照组和有氧训练组显著升高($P < 0.05$),而有氧训练组大鼠 p53 蛋白表达水平与对照组相比无显著差异,说明力竭过度运动训练可导致大鼠心肌细胞中凋亡调控蛋白 p53 表达水平的显著升高。

表 1 运动对大鼠心脏质量和心系数的影响

Table 1 Effects of exercise on heart mass and the heart coefficient of rats

组别 Group	心脏质量/mg Heart weight	体质量/g Weight	心系数/(mg·g ⁻¹) Heart coefficient
对照组 Control group	1 412.5±116.3	389.3±7.6	3.63±0.24
有氧训练组 Aerobic exercise group	1 399.1±100.7	401.5±5.7	3.48±0.22
力竭过度训练组 Overtraining group	1 653.9±101.6 a	370.7±15.4	4.46±0.47 a

注:数据后标 a 表示与对照组相比差异显著($P<0.05$)。

Note:The letter a after the data indicate significant difference from the control group ($P<0.05$).

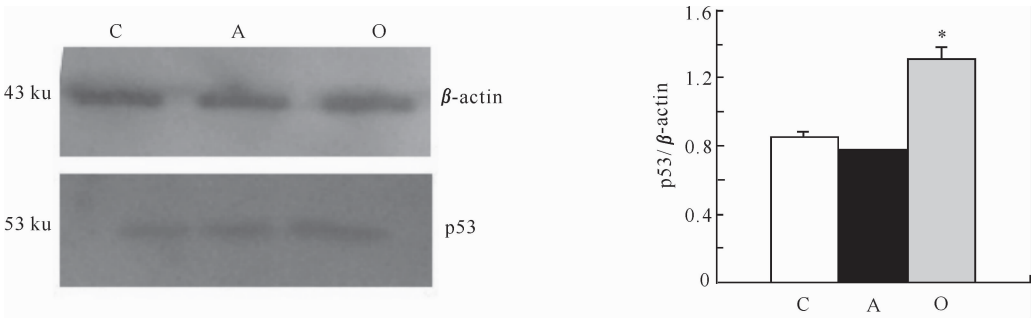


图 1 运动对大鼠心肌组织中 p53 蛋白表达的影响

C. 对照组;A. 有氧训练组;O. 力竭过度训练组; * 表示与对照组相比差异显著($P<0.05$)

Fig.1 Effects of exercise on the expression of p53 protein in myocardium of rats

C. Control group;A. Aerobic exercise group;O. Overtrainine group;
* indicate significant difference from the control group ($P<0.05$)

2.3 大鼠心肌细胞凋亡的 DNA ladder 检测

DNA ladder 的形成与细胞凋亡密不可分,其同时也是判断细胞凋亡的重要标准。由图 2 可见,力竭过度训练组大鼠心肌样品有典型的梯形 DNA 凋亡条带,该结果从 DNA 分子角度证实,长期力竭性过度训练可导致大鼠心肌组织细胞发生凋亡。



图 2 运动对大鼠心肌细胞凋亡的影响

C. 对照组;A. 有氧训练组;O. 力竭过度训练组

Fig.2 The impact of exercise on myocardial apoptosis

C. Control group;A. Aerobic exercise group;O. Overtraining group

2.4 大鼠 NO 含量及 cNOS、iNOS 的活性

由表 2 可知,有氧训练组、力竭过度训练组大鼠的血清 NO 含量均较对照组极显著增加($P<0.01$),而有氧训练组与力竭过度训练组大鼠的血清 NO 含量之间无统计学差异;有氧训练组大鼠血清的 cNOS 活性显著高于对照组和力竭过度训练组($P<0.05$),力竭过度训练组稍高于对照组,但二者之间并无统计学差异;力竭过度训练组大鼠血清的 iNOS 活性极显著高于对照组和有氧训练组($P<0.01$),有氧训练组稍高于对照组,但二者之间也无统计学差异。

表 3 显示,有氧训练组大鼠心肌的 NO 含量较对照组、力竭过度训练组大鼠显著增加($P<0.05$),而对照组与力竭过度训练组之间无显著;有氧训练组大鼠心肌的 cNOS 活性显著高于对照组和力竭过度训练组($P<0.05$),力竭过度训练组稍低于对照组,但二者之间无统计学差异;力竭过度训练组大鼠心肌的 iNOS 活性极显著高于对照组和有氧训练组($P<0.01$),有氧训练组稍低于对照组,但二者之间亦无统计学差异。

表 2 运动对大鼠血清 NO 含量和 cNOS、iNOS 活性的影响

Table 2 Effects of exercise on serum NO content and cNOS,iNOS activity of rats

组别 Group	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	cNOS/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	iNOS/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照组 Control group	8.857 $\pm$ 0.116	7.833 $\pm$ 0.485	4.863 $\pm$ 0.748 B
有氧训练组 Aerobic exercise group	12.563 $\pm$ 0.341 A	9.827 $\pm$ 0.397 ab	5.292 $\pm$ 0.832 B
力竭过度训练组 Overtraining group	11.864 $\pm$ 0.335 A	8.211 $\pm$ 0.943	9.333 $\pm$ 0.142 A

注:与正常对照组比较,数据后的 a 表示差异显著($P<0.05$),A 表示差异极显著($P<0.01$);与力竭过度训练组比较,b 表示差异显著($P<0.05$),B 表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note:Compared with control group,a indicate significant difference($P<0.05$),A indicate extremely significant difference($P<0.01$);Compared with the overtraining group,b indicate significant difference($P<0.05$),B indicate extremely significant difference($P<0.01$). The same below.

表 3 运动对大鼠心肌 NO 含量和 cNOS、iNOS 活性的影响

Table 3 Effects of exercise on myocardial NO content and cNOS,iNOS activity of rats

组别 Group	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	cNOS/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	iNOS/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照组 Control group	5.654 $\pm$ 0.427	0.453 $\pm$ 0.145	0.363 $\pm$ 0.144 B
有氧训练组 Aerobic exercise group	6.768 $\pm$ 0.231 ab	0.887 $\pm$ 0.096 ab	0.292 $\pm$ 0.230 B
力竭过度训练组 Overtraining group	5.964 $\pm$ 0.635	0.416 $\pm$ 0.193	0.973 $\pm$ 0.244 A

3 讨 论

心系数是反映心肌肥大的指标,一般将心肌肥大分为运动性肥大和病理性肥大。运动性肥大是在运动强度适宜时心脏对运动的适应性反应,是心脏重塑的过程。运动强度过大则会使心脏发生比较明显的病理性改变。本试验结果显示,力竭过度训练组大鼠心脏的质量和心系数均有所增加,表明过度运动最终会导致心肌的肥大。心肌细胞是一种高度分化的终末细胞,成熟的心肌细胞一般不具有分化、繁殖的能力而处于收缩状态。不适当运动易造成心肌损伤,且与心肌细胞凋亡导致的心肌实质细胞数目减少关系密切^[5]。

细胞凋亡是由内外环境变化或者死亡信号的触发而在基因调控下引起的细胞主动死亡过程。p53 基因作为“基因组的卫士”,具有调节细胞周期的功能,在细胞损伤修复与不可修复细胞的清除过程中发挥着重要作用。DNA 受损时,细胞内的 p53 蛋白被激活,使细胞周期停滞在 G1 期,DNA 的复制随即中断,从而修复损伤的 DNA 或引起细胞凋亡^[6-7]。本试验结果显示,与对照组相比,力竭过度训练组大鼠心肌细胞的 p53 蛋白表达水平升高,而有氧训练组大鼠心肌细胞的 p53 蛋白水平并不增加,其可能机制是因为力竭过度训练造成心肌细胞的 DNA 损伤,继而引起细胞中心肌细胞的 p53 水平增高所致。氧自由基和心肌细胞缺氧同样可引起

p53 表达的增加,从而介导心肌细胞凋亡。因此,心肌细胞凋亡与细胞中的 p53 表达增加紧密相连^[8]。在凋亡时,心肌细胞的 DNA 也会发生有序降解,琼脂糖凝胶电泳会出现梯状条带^[9]。

NO 是由一氧化氮合酶催化 L-精氨酸生成的不稳定气体,是重要的气体第二信使,参与多种生物过程。有报道证实^[10-11],血管应切力和搏动性血流是调节释放 NO 的 2 个重要因素。血流对心血管内皮细胞机械作用的改变,会引起剪切应力的改变,从而导致胞膜上的 Ca^{2+} 依赖型 K^{+} 通道开放, Ca^{2+} 内流,通过钙调素(CaM) 激活 NOS,使 NO 分泌增加。本研究结果显示,大鼠经不同程度游泳训练后,有氧游泳训练可以提高大鼠血清与心肌的 NO 水平,使该组大鼠心血管系统发生适应性变化。

结构型 NOS(cNOS)是神经原型 NOS 和内皮型 NOS 的合称。cNOS 活性需 Ca^{2+} /CaM 复合物存在,受胞浆 Ca^{2+} 浓度调节,当两者结合时,cNOS 便会被激活。cNOS 在正常状态呈低水平表达,催化生成量很少,持续时间较短,但接受刺激时作用非常迅速。诱导型 NOS(iNOS)主要存在于平滑肌、血管内皮细胞和心肌细胞中。血液中的炎性细胞因子大量合成和释放时,可以促进心肌、血清中 iNOS 基因的转录和表达。血浆中 NO 前体 L-Arg 可诱导激活 iNOS,超负荷运动会引起 L-Arg 生成增加,同时提高 iNOS 活性,进而使 NO 合成过量,产生许多毒性产物,最终造成细胞损伤^[12-13]。NO 是一种

生物自由基,在低浓度时能够调节生理功能,浓度过高时会诱导和加重细胞组织损伤。本试验结果显示,适宜负荷的游泳训练可使大鼠心肌与血清中的 cNOS 活性提高并生成少量的 NO,可能对大鼠心血管系统产生良性影响,使大鼠心血管系统功能增强;而长期的过度负荷使大鼠心肌与血清中的 iNOS 活性升高,同时产生较多的 NO,半衰期短的 NO 供体能诱导凋亡细胞死亡,导致细胞毒作用产生,对大鼠心血管系统产生负面影响。另外,NO 诱导细胞凋亡常伴有 p53 蛋白的过表达。Forrester 等^[14]研究发现,NO 能在翻译后水平修饰 p53 蛋白,延长其半衰期,增加其稳定性。同时 NO 诱发的 DNA 损害也能引起 p53 上调,可提高促凋亡蛋白的表达。

综上所述,过度运动强度越大、时间越长,心肌细胞发生凋亡的可能性越明显。有氧运动时,心肌细胞凋亡参与心脏的重塑过程,这可能是心脏重塑的条件之一,但力竭过度运动是引起心脏损害的重要原因之一,运动中产生的过多 NO 也可能是心肌细胞凋亡的一个诱因。

[参考文献]

[1] Thompson P D. Historical concepts of the athlete's heart [J]. Med Sci Sports and Exerc,2004,36(3):363-370.

[2] 胡亚哲,程邦昌,王和平,等. 运动性心脏肥大心肌细胞超微结构改变及意义 [J]. 中华心血管病杂志,2005,33(10):35-37.

Hu Y Z,Cheng B C,Wang H P,et al. Ultrastructural changes and significance of exercise-induced cardiac hypertrophy of myocardial cells [J]. Journal of Cardiology,2005,33(10):35-37. (in Chinese)

[3] 孙绪德,柴伟,高昌俊,等. 高氧液对家兔心肌缺血/再灌注细胞凋亡的影响 [J]. 中国临床康复,2003,7(17):2434-2435.

Sun X D,Cai W,Gao C J,et al. Effects of hyperoxia liquid on apoptosis by ischemia/reperfusion injury in rat [J]. Journal of Chinese Clinical Rehabilitation,2003,7(17):2434-2435. (in Chinese)

[4] Iemitsu M,Miyauchi T,Maeda S. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2001,

281:2029-20361.

[5] Carraro U,Franceschi C. Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise [J]. Aging(Milano),1997,9(1/2):19-34.

[6] Lane D P. p53,guardian of the genome [J]. Nature,1992,258:15-16.

[7] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide [J]. Science,1995,267:1445-1449.

[8] Von Harsdorf R,Li P F,Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induce cardiomyocyte apoptosis [J]. Circulations,1999,99(22):2934-2941.

[9] 赵红卫,寿好长,闫福岭. 细胞凋亡 [M]. 郑州:河南医科大学出版社,1997:7-8.

Zhao H W,Shou H C,Yan F L. Cell apoptosis [M]. Zhengzhou:Henan Medical University Press,1997:7-8. (in Chinese)

[10] Niebauer J,Cooke J P. Cardiovascular effects of exercise:Role of endothelial shear stress [J]. J Am Coll Cardiol,1996,28:1652-1660.

[11] 侯丽. 一氧化氮与运动训练 [J]. 天津体育学院院报,1999,14(3):13-16.

Hou L. Nitric oxide and exercise training [J]. Tianjin Institute of Physical Education Institute,1999,14(3):13-16. (in Chinese)

[12] 刘永涛,米春娟,田振军. 运动训练对大鼠心肌细胞一氧化氮合酶表达的影响 [J]. 北京体育大学学报,2006,29(11):1501-1503.

Liu Y T,Mi C J,Tian Z J. The impact of exercise training on the nitric oxide synthase expression in rat cardiomyocytes [J]. Beijing Sport University,2006,29(11):1501-1503. (in Chinese)

[13] 李宁川,颜军,陈炳猛,等. 不同负荷运动训练对大鼠脑组织中一氧化氮合酶活性的影响 [J]. 中国运动医学杂志,2001,20(4):367-369.

Li N C,Yan J,Chen B M,et al. Different loaded exercise training on nitric oxide synthase activity in rat brain tissue [J]. Journal of Chinese Sports Medicine,2001,20(4):367-369. (in Chinese)

[14] Forrester K,Amb S,Lupold S E,et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53 [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93:2442-2447.