

# 运动预适应对急性运动性损伤后心肌组织氧化应激及凋亡的影响

公 雪 李晓燕 张红明

**【摘要】** 目的:观察运动预适应对急性运动性损伤后大鼠心肌组织氧化应激及凋亡的影响,探讨运动预适应对急性运动性心肌损伤的保护作用。 方法:30 只健康成年雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组(每组 10 只):安静对照组(C 组)、急性力竭运动组(E 组)、预适应急性力竭运动组(EP 组)。C 组不进行任何运动训练,直接处死;E 组与 EP 组通过力竭游泳运动建立大鼠急性运动性心肌损伤模型,并于力竭后立即处死,EP 组于力竭运动前进行运动预适应训练。检测各组心肌线粒体超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)水平和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;RT-PCR 及免疫组织化学法检测心肌组织凋亡相关蛋白基因 Bax 和 Bcl-2 的表达水平,原位缺口末端标记法(TUNEL 法)检测大鼠心肌细胞凋亡率。 结果:(1)氧化应激水平:与 C 组相比,E 组和 EP 组心肌细胞 SOD 及 GSH-Px 活性均显著降低,且 E 组降低更多;MDA 水平均升高,且 E 组升高更多( $P$  均 $<0.01$ )。(2)凋亡水平:与 C 组相比,E 组和 EP 组 Bax mRNA 表达水平明显升高,Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低,且与 E 组相比,EP 组变化程度较小( $P$  均 $<0.01$ );TUNEL 检测结果显示,与 C 组相比,E 组和 EP 组大鼠心肌细胞凋亡率明显升高,但 EP 组较 E 组明显降低( $P$  均 $<0.01$ )。 结论:运动预适应可减轻力竭运动后大鼠心肌组织氧化应激水平,减少心肌细胞凋亡,对心肌组织具有保护作用。

**【关键词】** 运动预适应;运动性心肌损伤;氧化应激;凋亡

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.02.014

**Effect of exercise preconditioning on oxidative stress and apoptosis of myocardial tissue after acute sports injury** GONG Xue, LI Xiaoyan, ZHANG Hongming. *Department of Cardiology, General Hospital of Jinan Military Area, Shandong 250031, China*

**【Abstract】** **Objective:** To observe the effect of exercise preconditioning on oxidative stress and apoptosis of myocardial tissue after acute sports injury, and explore the protective effect of exercise preconditioning on acute myocardial injury in sports. **Methods:** Thirty healthy adult male Wistar rats were randomly divided into three groups (10 in each group): quiet control group (C), exhaustive exercise group (E), exercise preconditioning and exhaustive exercise group (EP). Acute sports injury model was established by one-time acute exhaustive swimming exercise and the rats were killed immediately after exhaustive exercise. The group EP had the exercise preconditioning training before acute exhaustive exercise. The concentration of MDA, the activity of SOD and GSH-Px in mitochondria of myocardial cell were detected. RT-PCR and immunohistochemical method were used to detect the expression of apoptosis related gene BAX and BCL-2 in myocardial tissue. TUNEL method was used to detect the apoptosis rate of rat myocardial cell. **Results:** (1)Oxidative stress: The SOD and GSH-px activity of group E and EP significantly reduced compared with group C, and the group E reduced more

(all  $P < 0.01$ ). The MDA concentration of group E and EP increased, and the E group increased more (all  $P < 0.01$ ). (2) Apoptosis: Compared with group C, the expression of BAX mRNA in group E and EP was significantly higher, while the expression of BCL-2 mRNA was significantly lower, in addition the group EP changed less (all  $P < 0.01$ ). TUNEL test results showed that the apoptosis rates of myocardial cell in group E and EP significantly increased compared with group C, but the group EP significantly decreased compared with group E (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Exercise preconditioning can reduce the oxidative stress level and myocardial cell apoptosis of rats after exhaustion exercise, which plays a protective role in myocardial tissue.

**【Key words】** Exercise preconditioning; Exercise-induced myocardial damage; Oxidative stress; Apoptosis

运动预适应(exercise preconditioning, EP)是指预先进行反复短暂的大强度运动,使心肌在后续的持续性缺血缺氧状态下得到保护的现象,是减轻心肌缺血损伤的有效途径之一。激烈运动或超负荷体力劳动时,易出现心肌缺血缺氧,引发心肌超微结构的应激性改变。其中氧化应激是造成心肌损伤的关键环节,氧自由基可攻击细胞膜生成脂质过氧化物,导致心肌损伤。线粒体是产生氧自由基的主要场所<sup>[1]</sup>,检测心肌线粒体的氧化应激水平可了解心肌氧化应激的损伤程度。

有研究发现力竭运动会造成凋亡基因表达失衡<sup>[2]</sup>,使凋亡调节相关基因表达变化,促进细胞凋亡,EP可通过调节 Bcl-2 和 Bax 平衡来减少力竭运动诱导的大鼠海马细胞凋亡<sup>[3]</sup>。本研究拟通过检测凋亡调节蛋白 Bax、Bcl-2 的表达及原位检测心肌细胞的凋亡率和氧化应激水平,探讨 EP 对运动性心肌损伤的保护机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组与模型建立

选用清洁级健康成年雄性 Wistar 大鼠 30 只(由山东大学齐鲁医院心血管研究中心动物房提供),12 周龄,体质量( $200 \pm 40$ ) g。大鼠分笼饲养,采用标准实验大鼠饲料喂养,纯净水自由饮用,自然光照,动物室内温度( $20 \pm 2$ )℃,相对湿度为( $50 \pm 5$ )%。适应性饲养 6 d,每天进行 15 min 适应性游泳运动,再随机分为 3 组,每组 10 只,分别为安静对照组(C 组)、急性力竭运动组(E 组)、预适应急性力竭运动组(EP 组)。

利用游泳运动建立 EP 模型,泳池体积  $100 \text{ cm} \times 70 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$ ,水深 50 cm,水温( $32 \pm 3$ )℃,每次游泳前均换水,游泳运动结束后立即用吹风机将大鼠吹干。分组后,C 组不进行游泳训练;E 组平时不运动,最后直接与 EP 组一起游泳至力竭;EP 组在力竭运

动前进行游泳训练。参照 Margonato 等<sup>[4]</sup>的方法建立 EP 动物模型,即运动持续 2 周,每周 6 d,60 min/d;在 60 min 的游泳运动中,游泳 15 min,休息 5 min,重复 3 次,以模拟反复多次短暂的心肌相对缺血。然后 E 组和 EP 组大鼠进行一次力竭游泳运动。

根据 Thomas 力竭标准判定力竭时间,即大鼠沉入水底超过 10 s 或游泳运动明显不协调,捞出后无逃避反应且无法完成翻正反射。C 组不运动,直接断头处死,其余 2 组均于力竭运动后即刻处死,留取心肌组织。每个标本取少量心尖部组织浸泡于 4%多聚甲醛中固定,其余组织均立即放入液氮中冷冻保存。

记录并比较 E 组和 EP 组大鼠从下水到力竭所用时间。

### 1.2 心肌组织线粒体氧化应激指标检测

取 100 mg 心肌组织,用预冷的 PBS 液冲洗漂去浮血,放入玻璃匀浆器在冰浴上进行匀浆,然后用差速离心法分离心肌线粒体,利用 BCA 蛋白质定量法测定各样本线粒体蛋白浓度。检测各组心肌组织线粒体中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)水平、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。所有操作均按照相应试剂盒说明书进行。

### 1.3 RT-PCR 法检测心肌组织 Bax、Bcl-2 mRNA 表达

采用 Trizol 法提取心肌组织总 RNA,OD260/OD280 测试 RNA 纯度。根据 cDNA 反转录试剂盒操作说明书进行反转录,以  $\beta$ -action 为内参,SYBR Green 法荧光定量分析各组目的基因表达情况,基因的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。PCR 引物: Bax 正向 5'-GACGCATCCACCAAGAAG-3',反向 5'-TAGAAAAGGGCAACCACC-3'; Bcl-2 正向 5'-TTCTCTCGTCGCTACCG-3',反向 5'-AGT

TCACCCCATCCCTG-3';内参  $\beta$ -action 正向 5'-TG GCACCCAGCACAATGAA-3',反向 5'-CTAAGT CATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。所有引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。扩增条件:95℃变性 30 s,60℃退火 20 s,72℃延伸 1 min,共 40 个循环,最后 72℃延伸 5 min。

1.4 免疫组织化学法检测心肌组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达

石蜡切片常规脱蜡,PBS 冲洗后置入 3%过氧化氢甲醛溶液中,37℃封闭 30 min,加 0.1%胰蛋白酶,37℃抗原修复 20 min,加羊血清 37℃ 30 min,后加一抗(浓度均为 1:300),4℃过夜。37℃复温 60 min,加二抗 37℃ 30 min,加辣根酶标记的链霉卵白素工作液 37℃ 30 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,用中性树胶封片。阴性对照用 PBS 代替一抗。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对 200 倍光镜下的图像进行分析。每个样本选 4 个视野,求阳性表达面积比和平均光密度,并取平均值表示目标蛋白的相对表达量。

1.5 原位缺口末端标记法(TUNEL)法检测心肌细胞凋亡

心肌组织切片常规脱蜡水化,按试剂盒操作进

行 TUNEL 染色,DAB 显色,普通光学显微镜下观察,细胞核染成棕褐色的为阳性细胞。在高倍视野( $\times 400$ )下每个标本随机观察 6 个视野,计算细胞总数和阳性细胞数,均取平均值。

凋亡指数(AI) =  $\frac{\text{凋亡细胞核数}}{\text{总细胞核数}} \times 100\%$

1.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验,以  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠力竭时间

E 组力竭时间为( $5.2 \pm 0.4$ ) h,EP 组力竭时间为( $6.6 \pm 0.7$ ) h,EP 组较 E 组力竭时间明显延长( $P < 0.01$ )。

2.2 各组心肌细胞线粒体氧化应激指标

与 C 组相比,E、EP 组心肌细胞线粒体 SOD、GSH-Px 活性降低,MDA 水平升高( $P$  均  $< 0.01$ )。与 E 组相比,EP 组心肌细胞线粒体的各项指标变化程度较小( $P$  均  $< 0.01$ ),见表 1。

表 1 各组心肌细胞线粒体氧化应激指标结果比较

组别	<i>n</i>	SOD/U · mg <sup>-1</sup>	MDA/nmol · mg <sup>-1</sup>	GSH-Px/U · mg <sup>-1</sup>
C 组	10	72.60 $\pm$ 0.92	3.09 $\pm$ 0.09	5 046.45 $\pm$ 16.11
E 组	10	28.68 $\pm$ 1.17 <sup>(1)</sup>	8.89 $\pm$ 0.15 <sup>(1)</sup>	2 461.23 $\pm$ 23.34 <sup>(1)</sup>
EP 组	10	51.81 $\pm$ 1.30 <sup>(1)(2)</sup>	7.90 $\pm$ 0.14 <sup>(1)(2)</sup>	3 072.61 $\pm$ 29.52 <sup>(1)(2)</sup>

注:与 C 组比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.01$ ;与 E 组比较,<sup>(2)</sup> $P < 0.01$

2.3 各组 RT-PCR 结果

与 C 组相比,E 组和 EP 组 Bax mRNA 表达水平明显升高,Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低( $P$  均

$< 0.01$ );与 E 组比较,EP 组 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达水平变化程度较小( $P$  均  $< 0.01$ ),见表 2。

表 2 各组心肌组织 Bax、Bcl-2 基因 mRNA 相对表达量比较

组别	<i>n</i>	Bax	Bcl-2
C 组	10	1.00	1.00
E 组	10	5.62 $\pm$ 0.72 <sup>(1)</sup>	0.36 $\pm$ 0.06 <sup>(1)</sup>
EP 组	10	1.67 $\pm$ 0.34 <sup>(1)(2)</sup>	0.67 $\pm$ 0.12 <sup>(1)(2)</sup>

注:与 C 组比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.01$ ;与 E 组比较,<sup>(2)</sup> $P < 0.01$

2.4 各组免疫组织化学结果

Bax 及 Bcl-2 蛋白阳性产物均为分布于细胞质中的棕褐色颗粒。E 组和 EP 组的 Bax 蛋白阳性产物的面积比及平均光密度均较 C 组升高,但

EP 组明显低于 E 组( $P$  均  $< 0.01$ )。E 组和 EP 组的 Bcl-2 蛋白阳性产物的面积比及平均光密度均较 C 组降低,但 EP 组明显高于 E 组( $P$  均  $< 0.01$ )。见表 3、图 1、图 2。

表 3 各组免疫组织化学检测结果比较

组别	Bax		Bcl-2	
	阳性表达面积比	平均光密度	阳性表达面积比	平均光密度
C 组	7.67±1.03	0.336±0.081	18.87±1.12	0.555±0.067
E 组	28.57±3.45 <sup>(1)</sup>	0.634±0.114 <sup>(1)</sup>	8.02±1.67 <sup>(1)</sup>	0.349±0.096 <sup>(1)</sup>
EP 组	15.41±2.16 <sup>(1)(2)</sup>	0.414±0.092 <sup>(1)(2)</sup>	14.35±2.14 <sup>(1)(2)</sup>	0.490±0.075 <sup>(1)(2)</sup>

注:与 C 组比较,<sup>(1)</sup>*P*<0.01;与 E 组比较,<sup>(2)</sup>*P*<0.01

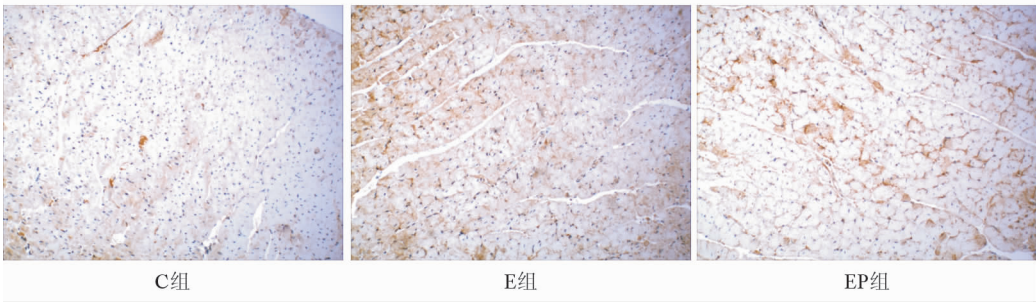


图 1 免疫组织化学检测各组大鼠心肌组织 Bax 蛋白表达情况(×200)

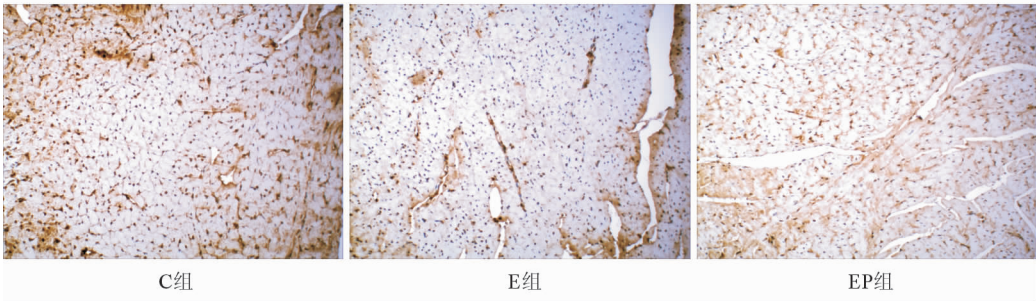


图 2 免疫组织化学检测各组大鼠心肌组织 Bcl-2 蛋白表达情况(×200)

2.5 TUNEL 检测凋亡结果

C 组、E 组和 EP 组心肌细胞凋亡率分别为 (5.1±1.66)%、(19.2±2.57)%、(11.3±1.49)%。与 C 组相比,E 组和 EP 组大鼠心肌细胞凋亡率明显升高(*P* 均<0.01),但 EP 组较 E 组明显降低(*P*<0.01)。

3 讨论

急性大强度运动训练可造成心肌组织结构及功能损伤,其可能机制包括氧化应激、细胞凋亡、钙离子超载及能量代谢障碍等<sup>[5-7]</sup>。研究发现 EP 可提高心肌对缺血、缺氧的耐受力<sup>[8]</sup>。EP 可以使心率增快,心输出量增加,运动至缺血的时间延长,从而改善心功能,减少心律失常的发生,增强心肌对大强度运动的抵抗能力,发挥对心脏的保护作用<sup>[9]</sup>。

力竭运动可加重心肌组织氧化应激水平,导致心肌细胞膜及细胞器膜破坏,是运动性心肌损伤的重要机制。本实验发现 E 组和 EP 组抗氧化酶 SOD 及 GSH-Px 活性均明显降低,同时氧化产物 MDA 水平明显升高,证实了力竭运动可加重心肌氧化损伤。已有研究发现 EP 可使心肌锰超氧化物

歧化酶(MnSOD)活性增强<sup>[10]</sup>。本实验也证实,EP 可通过减轻急性运动损伤后心肌组织的氧化应激水平,保护心肌。

EP 提高急性力竭运动后心肌组织抗氧化酶活性,可能与 EP 可激活心肌细胞中多种信号转导通路有关。EP 能激活心脏蛋白激酶 C(PKC),PKC 激活后可通过磷酸化激活下游效应蛋白,如激活三磷酸腺苷(ATP)敏感性钾通道等,发挥缺血预适应的心脏保护作用<sup>[11-12]</sup>。PKC 是 MnSOD 活性升高的中间信号分子<sup>[13]</sup>,可上调 SOD 水平。

EP 可通过多种途径减轻心肌缺血缺氧时的心肌凋亡水平。有研究发现,EP 可以通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,降低转录因子激活蛋白-1(AP-1)的表达,显著减少心肌细胞凋亡<sup>[14]</sup>。另外,EP 还可通过 Janus 激酶 2/信号传导转录活化物 3(JAK2/STAT3)信号通路,诱导心脏 STAT3 表达增加,下调心脏胱天蛋白酶-3(caspase-3)的表达,减少心肌细胞凋亡<sup>[15]</sup>,JAK2 蛋白磷酸化增加可加强脂肪酸氧化,保证能量供应<sup>[16]</sup>。

本实验发现,EP 可减轻力竭运动后 Bax 表达

的升高和 Bcl-2 表达的降低。Bcl-2 是从小鼠的 B 细胞淋巴瘤中分离出的原癌基因,可通过抑制线粒体外膜通透转运孔道复合体的开放,减少凋亡相关因子的释放,从而阻断凋亡过程<sup>[17]</sup>。Bax 作为 Bcl-2 的同源体,可抑制后者表达。Bax 和 Bcl-2 蛋白水平的高低与凋亡调控直接相关,两者的比例决定细胞在受到凋亡刺激后的生存能力。本实验发现,EP 可维持力竭运动后两者比例的平衡,提示 EP 可抑制力竭运动后心肌细胞的凋亡。EP 组心肌细胞凋亡率较 E 组明显降低,提示 EP 可通过抑制细胞凋亡,对急性力竭运动后的大鼠心肌起到保护作用。

本实验还发现 EP 组较 E 组力竭运动时间明显延长,说明 EP 使机体耐受缺血缺氧的程度增强,提高了运动耐力。

EP 可以减轻力竭运动后氧化应激反应,抑制力竭运动后心肌细胞凋亡,对心肌组织起保护作用,但其具体的触发机制仍待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Indo HP, Davidson M, Yen HC, et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage [J]. Mitochondrion, 2007, 7(1-2):106-118.
- [2] Oláh A, Németh BT, Mátyás C, et al. Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model[J]. Int J Cardiol, 2015, 182:258-266.
- [3] 王 璐,袁琼嘉.运动预处理对力竭运动诱导的大鼠海马细胞凋亡的影响[J]. 体育科学, 2009, 29(3):52-57.
- [4] Margonato V, Milano G, Allibardi S, et al. Swim training improves myocardial resistance to ischemia in rats[J]. Int J Sports Med, 2000, 21(3):163-167.
- [5] De Giusti VC, Caldiz CI, Ennis IL, et al. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules of intracellular pathways triggered by the cardiac renin-angiotensin II-aldosterone system (RAAS) [J]. Front Physiol, 2013, 4:126.
- [6] 孟 可,李晓燕.力竭运动时心肌线粒体解偶联蛋白 2 介导的心肌损伤[J]. 国际心血管病杂志, 2015, 42(3):162-164.

- [7] Huang CC, Lin TJ, Chen CC, et al. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats [J]. Eur J Appl Physiol, 2009, 107(6):697-706.
- [8] Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, et al. Mechanisms of exercise-induced cardioprotection [J]. Physiology (Bethesda), 2014, 29(1):27-38.
- [9] Parra VM, Macho P, Domenech RJ. Late cardiac preconditioning by exercise in dogs is mediated by mitochondrial potassium channels [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 56(3):268-274.
- [10] French JP, Hamilton KL, Quindry JC, et al. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain[J]. FASEB J, 2008, 22(8):2862-2871.
- [11] 孙晓娟,侯 娜.长期运动预适应模型大鼠心脏蛋白激酶 C 和热休克蛋白 70 的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5185-5188.
- [12] Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, et al. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat[J]. J Physiol, 2005, 569(Pt 3):913-924.
- [13] 侯云英,马志勇,范秀珍.短期运动对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 苏州大学学报:医学版, 2010, 30(1):50-53.
- [14] 刘 瑛.运动预适应对一次性力竭大鼠心肌 c-fos 和 c-jun 基因表达的作用[J]. 成都体育学院学报, 2009, 35(11):63-66.
- [15] 孙晓娟.力竭运动损伤模型大鼠运动预适应后心脏 STAT3 和 Caspase-3 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(40):6450-6454.
- [16] Zhao J, Tian Y, Xu J, et al. Endurance exercise is a leptin signaling mimetic in hypothalamus of Wistar rats[J]. Lipids Health Dis, 2011, 10:225.
- [17] Karch J, Kanisicak O, Brody MJ, et al. Necroptosis interfaces with MOMP and the MPTP in mediating cell death [J]. PLoS One, 2015, 10(6):e0130520.

(收稿:2016-05-27 修回:2016-08-30)

(本文编辑:丁媛媛)