

研究简报

耗竭性运动对大鼠骨骼肌线粒体内膜的影响

颜宜荏

(北京职工医学院生理学教研室, 北京 100036)

张勇

(北京体育大学体育生物科学系, 北京 100084)

摘要 观察 SD 大鼠一次急性运动至力竭后骨骼肌线粒体内膜流动性、NADH-CoQ 还原酶及 ATP 酶活性变化。结果显示, 大鼠骨骼肌线粒体内膜微粘度较安静时显著增高, 线粒体内膜 NADH-CoQ 还原酶和 ATP 酶活性分别较安静时下降 34.2% 和 46.2%。研究提示, 耗竭性运动后大鼠骨骼肌线粒体呼吸链内膜分子动力学和呼吸链酶组分活性变化, 可能是运动性疲劳重要的膜分子特征。

关键词 耗竭性运动, 骨骼肌, 线粒体内膜, 流动性, 复合体

骨骼肌是重要的运动代谢器官。已有研究表明, 急性运动可诱发骨骼肌线粒体过氧化脂质增高, 线粒体以琥珀酸为底物的呼吸控制比(RCR)下降^[1]; 线粒体膜磷脂含量及呼吸链细胞色素 c 氧化酶活性降低^[2]。这些变化可能是运动性疲劳重要的线粒体膜分子机制。我们的实验, 以耗竭性运动为模型, 观察急性运动后骨骼肌线粒体内膜流动性变化对呼吸链内膜复合体 I 和 ATP 酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

牛血清蛋白(BSA)为进口分装; EDTA 为 Serva 产品; 毛地黄皂苷为 Merck 产品; MOPS、CoQ₀、NADH-Na₂、1,6-二甲基-1,3,5-己三烯(DPH)均系 Sigma 产品; ATP(钠盐)为上海东风生化试剂公司生产。其他均为国产分析纯。

1.2 实验动物和运动方式

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 12 只, 体重 230~260 g。随机分为运动组 6 只, 对照组 6 只, 分笼饲养, 自由饮水进食。实验采用文献[3]渐增负荷运动模型, 按以下程序, I: 坡度 0°, 速度 8.2 m/min, 运动 15 min → II: 坡度 5°, 速度 15 m/min, 运动 15 min → III: 坡度 10°, 速度 19.3 m/min, 相当于 76% 最大

摄氧量(VO_{2max})运动至力竭。力竭标准为第 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。

1.3 骨骼肌线粒体内膜制备

运动和对照组动物分别于运动至力竭后即刻和安静时断头处死, 迅速取出完整双侧后肢股外侧肌和比目鱼肌, 于事先预冷的缓冲液中匀浆, 差速离心法提取线粒体。所提取的线粒体悬液再用 0.7 mg 毛地黄皂苷每 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。所制备线粒体内膜按 Scopes 紫外法于 280 nm/205 nm 测定膜蛋白含量, 于 0~4℃ 贮存备用。

1.4 骨骼肌线粒体内膜荧光偏振度测定

以荧光探针 DPH 标记线粒体内膜^[4]。于 Shimadzu RF-540 荧光分光光度计 $\lambda_{ex} = 362$ nm, $\lambda_{em} = 432$ nm 测定样本荧光强度。标记于内膜上的荧光探针的荧光偏振度可反映膜脂区的流动性大小。荧光偏振度越大, 膜微粘度增高, 示膜流动性越小。分别按公式计算偏振度 P 值和膜微粘度 η 值 (泊)。

1.5 线粒体内膜复合体 I 活性测定

按文献[5]紫外动力学法, 测定介质为

40 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.4, 1 mmol/L KCN, 0.1 mmol/L CoQ₀, 0.2 mmol/L NADH-Na₂. 内膜蛋白含量 0.5 mg, 总反应体积 3 ml, 恒温 30℃, 于 Shimatzu-365 红外、紫外、可见光分光光度计测定 340 nm 光吸收下降, 以摩尔消光系数 6220 计算.

1.6 线粒体内膜 ATP 酶活性测定

依文献 [6] 比色测磷法, 于 Beckman DU-7 紫外分光光度计 660 nm 测定光吸收 A 值, 以无机磷标准曲线标定酶活力.

1.7 统计学处理

计算各指标平均数、标准差, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示.

2 实验结果

2.1 运动后线粒体内膜流动性变化

耗竭性运动后心肌线粒体内膜荧光偏振度

P 值、膜微粘度 η 值均较安静时显著增高 ($P < 0.01$), 表明内膜流动性下降 (表 1).

表 1 运动后线粒体内膜流动性变化

指标	安静时 $\bar{x} \pm s$	运动后即刻 $\bar{x} \pm s$
荧光偏振值(P)	0.1090 ± 0.0145	0.1470 ± 0.0164 ¹⁾
膜微粘度(η)	0.6248 ± 0.1084	0.7800 ± 0.3554 ¹⁾

¹⁾ $n = 6$.

2.2 运动对线粒体内膜复合体活性的影响

由表 2 可见, 大鼠运动至力竭后, 骨骼肌线粒体内膜 NADH-CoQ 还原酶活性较安静时下降, 但未观察到显著性改变 ($P > 0.05$); ATP 酶活性较安静时显著降低 ($P < 0.05$). 表明耗竭运动不同程度影响线粒体内膜关键酶活性.

表 2 运动对线粒体内膜复合体活性的影响

指标	安静时 $\bar{x} \pm s (n=6)$	运动后即刻 $\bar{x} \pm s (n=6)$	t	P	%
NADH-CoQ 还原酶/ $\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	3.39 ± 1.68	2.23 ± 0.59	2.122	>0.05	-34.2
ATP 酶/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$	0.52 ± 0.23	0.28 ± 0.10	2.327	<0.05	-46.2

3 讨 论

生物膜的各种重要功能, 如能量转换、物质运输、受体识别和信息传递等都与膜的流动性密切相关. 膜流动性是生物膜结构的基本物理特征. 合适的流动性对维持生物膜的正常生理功能具有十分重要的作用. 有关急性运动对线粒体膜流动性影响的研究仍鲜见. 丁树哲等^[7]曾报道, 力竭运动后大鼠心肌线粒体膜脂质过氧化水平增高, 线粒体膜流动性降低. 在研究的另一项实验中, 我们也观察到力竭性运动后大鼠心肌线粒体内膜流动性显著降低^[8]. 我们的实验结果表明, 递增负荷耗竭性运动后大鼠骨骼肌线粒体内膜荧光偏振度和膜微粘度均较安静时显著增高, 膜流动性下降, 膜磷脂分子活动度降低, 意味着内膜分子动力学改变. 我们以 DPH 直接标记于线粒体

内膜脂区, 避免了荧光探针可能标记于内外膜所造成的定性评价上的误差, 客观地反映了呼吸链内膜脂双层的分子动力学变化. 依照“扩散”和“碰撞”假说, 耗竭性运动后线粒体内膜流动性下降, 有序性增高, 将改变膜蛋白(如酶复合体)侧向运动的微环境, 限制内膜电子传递过程中磷脂-磷脂、磷脂-膜蛋白的相互作用, 减弱呼吸链成分与 ATP 酶的碰撞, 从而改变内膜脂双层分子动力学特征, 影响呼吸链电子传递和磷酸化过程.

Gollnick 等^[9]报道, 马剧烈运动后经肌肉活检发现细胞色素 c 氧化酶活性降低, 同时肌肉呼吸能力下降 55%. 曹兆丰等^[2]观察到大鼠耗竭性游泳后骨骼肌线粒体膜心磷脂含量下降伴随细胞色素 c 氧化酶活性改变. 急性运动是否也构成对呼吸链始端的复合体 I 损害尚不清楚. 我们的研究初步证实急性耗竭运动后骨

骨骼肌线粒体内膜 NADH-CoQ 还原酶活性下降, 虽未观察到呈显著性改变, 仍表明呼吸链始端复合体 I 存在一定程度的损害. 这一改变的确切机制仍不清楚. 我们认为, 复合体 I 活性变化可能与呼吸链内膜流动性下降有关. 膜蛋白与膜磷脂的影响是相互的, 许多改变膜脂流动性的因素都可能是通过影响膜蛋白而发挥作用^[10]. 当膜脂流动性降低, 嵌入的膜蛋白暴露于水相的部分会相应增加而改变其功能活性的微环境. 另外, 还可能与已报道的作为复合体活性成分必需的膜心磷脂含量下降有关^[2]. 线粒体氧利用最为敏感的指标是 NAD 氧化还原状态. 复合体 I 活性的改变可能阻断由三羧酸循环 NADH 还原当量进入呼吸链的电子传递过程. 而底物利用的降低, 在疲劳性运动中将直接危及肌肉胞浆的能量状况^[11].

急性长时间运动时骨骼肌线粒体 ATP 的再合成对于工作肌维持足够能量需求至关重要. 实验观察到, 耗竭运动后在线粒体内膜流动性下降和呼吸链复合体 I 活性改变的同时, 线粒体内膜 ATP 酶活性显著降低. 表明经过长时间较大强度运动后骨骼肌线粒体内膜功能改变, ATP 再合成障碍. 这可能是运动性疲劳重要的线粒体膜特征之一. 其机理可能是: a. 膜分子动力学改变. 线粒体内膜有序性增高、流动性降低减弱了呼吸链组分与 ATP 酶的相互作用; b. NADH 呼吸链损害. 按照 Mitchell 氏“化学渗透理论”, 线粒体 ATP 合成的驱动力为跨线粒体内膜的质子转运, 其直接依赖于电子传递和氧的摄取^[12]. 复合体 I 活性的改变可能使在这一部位已建立起的跨膜质子梯度丧失, 破坏磷酸化通过质子梯度的偶联而降低 ATP 酶的活性. 另外, 是否还涉及琥珀酸呼吸链等其他质子梯度跨膜部位酶组分的功能改变? 这些研究正在进行中.

参 考 文 献

- 1 Davies K J A, Quintanilha A T, Brooks G A *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1982; **107**: 1198
- 2 曹兆丰, 程伯基, 林克椿. *北京医科大学学报*, 1991; **23**: 435

- 3 Bedford T G, Tipton C M, Wilson C N. *J Appl Physiol*, 1979; **47**: 1278
- 4 程伯基, 聂松青, 程昆蓉. *生物化学杂志*, 1986; **2** (3): 38
- 5 刘 林, 吴如丹, 林其谁. *生物化学与生物物理学报*, 1990; **22** (1): 47
- 6 徐有涵, 宋铨华. *生物化学与生物物理进展*, 1986; (4): 64
- 7 丁树哲, 许豪文, 程伯基. *生物化学与生物物理学报*, 1991; **23** (4): 305
- 8 张 勇, 李静先, 陈家琦等. *生物化学与生物物理学报*, 1995; **27** (3): 337
- 9 Gollnick P D, Bertocci L A, Kelso T B *et al.* *Eur J Appl Physiol*, 1990; **415**: 407
- 10 刘福安, 唐朝枢. *生理科学进展*, 1989; **20**: 78
- 11 Wills W T, Jackman M R. *Med Sci Sports Exerc*, 1994; **26**: 1347
- 12 Nicholls D G, Fergusom S J. *Bioenergetics*, 2. London: Academic, 1992: 65

Influence of Exhaustive Exercise on Inner-mitochondrial Membrane of Skeletal Muscle in Rats. Yan Yichai (*Department of Physiology, Beijing Medical Staff College, Beijing 100036, China*); Zhang Yong (*Department of Sports Biological Science, Beijing University of Physical Education, Beijing 100084, China*).

Abstract Rats running with an incremental intensity to exhaustion were used as an experimental model to investigate the effect of acute exhaustive exercise on inner-mitochondrial membrane of skeletal muscle. It was found that, in exhausted rats, fluorescence polarization and membrane microviscosity of inner mitochondrial membrane increased significantly and the activities of NADH-CoQ reductase and ATPase in respiratory chain declined by 34.2% and 46.2%, respectively. The result suggested that the functional alterations in mitochondrial membranes such as the changes on membrane dynamic and activities of respiratory chain enzyme may be one of membrane molecular characteristics for exercise induced fatigue.

Key words exhaustive exercise, skeletal muscle, inner-mitochondrial membrane, fluidity, complex