论著

文章编号:1000-5404(2007)08-0678-03

# 缺氧复合运动大鼠心肌线粒体功能的变化

蔡明春,高文祥,陈 建,黄庆愿,高钰琪 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

**提 要:目的** 观察缺氧及缺氧复合运动条件下大鼠心肌线粒体功能的变化。**方法** 将Wistar大鼠分为4组:平原对照组、缺氧组、平原运动组和缺氧复合运动组。缺氧复合运动组大鼠持续暴露于模拟海拔5 000 m高原5周,每天降至4 000 m的高原进行游泳运动1 h(6 d/周),运动结束后回升至5 000 m;缺氧组大鼠同时在低压舱内相同海拔高度饲养,但不进行游泳运动;平原运动组和平原对照组在舱外同时饲养,其中平原运动组每天进行游泳运动1 h(6 d/周)。在末次运动结束后24 h处死大鼠,分离心室肌提取线粒体。用clark氧电极法测定线粒体呼吸功能。**结果** 与单纯缺氧组比较,缺氧复合运动后心肌线粒体ST3、ST4显著增加,呼吸控制率降低;各组线粒体膜电位无显著改变;与平原对照组比较缺氧组大鼠心肌线粒体ATP合成酶α亚基表达显著下降;与单纯缺氧组比较,缺氧复合运动组线粒体ATP合成酶α亚基表达显著增加。**结论** 结果表明缺氧复合运动可改善心肌线粒体3态呼吸,ATP合成酶α亚基表达增加。提示缺氧复合运动后心肌ATP产生效率增加,有氧氧化代谢增强。

**关键词:** 缺氧;运动;心脏;线粒体;呼吸控制率

**中图法分类号:** R322.11;R329.25;R364.4 **文献标识码:** A

# Effects of training under hypobaric hypoxia on rat myocardial mitochondrial function

CAI Ming-chun, GAO Wen-xiang, CHEN Jian, HUANG Qing-yuan, GAO Yu-qi (Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of training under hypobaric hypoxia on rat myocardial mitochondrial function. **Methods** Thirty-two Wistar rats were randomized into 4 groups: normal control (C), hypoxic group (H), exercise group (E), hypoxia combined with exercise group (HE). Rats of H and HE groups were subjected to hypobaric hypoxia simulating 5 000-meter altitude for 5 weeks (24 h/d), and the rats in HE group were descended to 4 000 m to swim ceaselessly (1 h/d, 6 d/week). The rats in C group and E group were kept under normobaric conditions. The swimming program for E group was the same as HE group. Twenty-four hours after the last bout of exercise training, the rats were sacrificed at simulated 4 000-meter condition (H and HE groups) or at 500 m over sea level (C and E groups). Myocardium from ventricles was collected and mitochondria were isolated. Mitochondrial oxidative respiratory function was measured by Clark oxygen electrode and the protein expression of ATP synthase α subunit was detected by Western blotting. **Results** Compared with H group, the expressions of ST3 and ATP synthase α subunit increased in HE group. **Conclusion** The exercise training at high altitude induced the increase of ATP production capacity, which may be a mechanism of mitochondrial acclimation to high-altitude hypoxia.

**Key words:** hypoxia; exercise; heart; mitochondria; respiratory control rate

平原人进入高原后劳动能力降低,是对高原低氧环境习服不良在整体水平的表现,积极寻找促进高原习服的措施是当前高原医学与生物学研究的前沿和热点。近年研究表明,在高原低氧环境中进行适当的运动锻炼可有效地促进机体对高原低氧环境的习服,其机制与缺氧复合运动促进组织毛细血管增生、改善心功能和组织细胞对氧的利用等因素有关[1,2]。关于缺

**基金项目:** 国家自然科学基金(30393131,30200130,30300123)
Supported by the Natural Science Foundation of China (30393131, 30200130, 30300123)

**作者简介:** 蔡明春(1970-),男,苗族,重庆市彭水县人,博士,讲师,主要从事缺氧的病理生理学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752335-8203,E-mail: caimingc@mail.tmmu.com.cn

**通讯作者:** 高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail: gaoy@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2006-07-17;**修回日期:** 2006-11-10

氧复合运动改善心脏功能的机制目前尚不清楚。由于线粒体是细胞内在氧的参与下最后将能源物质氧化并产生能量的主要场所，是进行氧化磷酸化的重要结构。因此我们推测，在高原低氧环境中进行适当运动锻炼可导致线粒体功能的适应性改变，改善心功能。为此，本研究观察了模拟高原缺氧及缺氧复合运动条件下大鼠心肌线粒体功能的变化，为深入揭示缺氧复合运动促进高原习服的机制提供实验依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　动物分组

成年雄性健康 Wistar 大鼠 32 只，体质量（217 ± 23）g（本校实验动物中心提供），分为 4 组：①平原对照组（C 组），②单纯缺氧组（H 组），③平原运动组（E 组），④缺氧复合运动组（hypoxia combined with exercise group，HE 组），每组 8 只。H 组和 HE 组大鼠置低压氧舱内连续缺氧 5 周。HE 组大鼠持续暴露于模拟海拔 5 000 m 的高原 5 周，每周 6 d 降至 4 000 m 的高原连续游泳运动 1 h，游泳池大小为 100 cm × 80 cm × 70 cm，水深50 cm，水温 33 ~ 35 ℃，运动结束后回升至 5 000 m；H 组大鼠同时在低压舱内相同海拔高度饲养，但不进行游泳运动；E 组和 C 组在舱外同时饲养，其中 E 组每周 6 d 进行连续游泳运动 1 h，共 5 周。HE 组大鼠在末次游泳结束 24 h 后与 H 组大鼠一起在模拟海拔 4 000 m 的低压舱内进行取材。E 组大鼠在末次游泳结束 24 h 后与 C 组大鼠一起在平原进行取材。

### 1.2　线粒体提取

参考 Cunningham 等[3]的方法分离心室肌线粒体。大鼠称重，0.03% 的戊巴比妥钠麻醉（3 mg/100 g），开胸分离心脏，立刻置于冰冷的生理盐水中，取心室肌组织约 0.5 g，按 1∶10（质量体积分数）加入 0 ~ 4 ℃ 的线粒体分离介质（0.25 mol/L 蔗糖，10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4，0.5 mmol/L $K^+$-EDTA），组织剪碎后匀浆。1 500 × $g$ 离心 3 min，去掉上面白色脂质层，取上清 12 000 × $g$ 离心 10 min。清洗 1 次（上清 12 000 × $g$ 离心 10 min），最后将沉淀用适量分离介质悬浮，调整蛋白浓度在 10 ~ 20 mg/ml。取新鲜的线粒体悬液测量呼吸活性和膜电位，剩余的 -20 ℃ 保存用于 Western blotting 分析 ATP 合成酶（ATP synthase，ATPase）α 亚基表达变化。以上操作均在 0 ~ 4 ℃ 下完成。

### 1.3　线粒体呼吸功能测定

采用 clark 氧电极法测定线粒体呼吸功能。反应总体积 1.6 ml，温度 28 ℃。将 1.5 ml 反应介质（75 mmol/L 甘露醇，25 mmol/L 蔗糖，0.05 mmol/L $K^+$-EDTA，10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4，5 mmol/L 磷酸-Tris，pH 7.4，100 mmol/L KCl）加入反应池中孵育 2 min，以空气饱和，然后加入线粒体悬液 0.1 ml，预温 1 min 后，依次加入反应底物（0.5 mol/L 苹果酸钠和 0.5 mol/L 谷氨酸钠的混合物）10 μl、ADP（0.1 mol/L）5 μl，观察线粒体呼吸态的变化，记录氧耗曲线，计算在 ADP 加入后（3 态呼吸，ST3）和 ADP 耗尽后（4 态呼吸，ST4）的氧耗量。线粒体呼吸活性以消耗线粒体蛋白表示（nmol · $min^{-1}$ · $mg^{-1}$），呼吸控制率（RCR）以 3，4 态耗氧之比（ST3/ST4）表示。

### 1.4　线粒体膜电位的检测

参照文献[4,5]的方法采用罗丹明 123（Rhodamine123）作为荧光探针测定。吸取 2 ml 反应介质（150 mmol/ L 蔗糖、5 mmol/L 氯化镁、5 mmol/L 琥珀酸钠、2.5 μmol/L 鱼藤酮、5 mmol/L磷酸钾缓冲液 pH 7.4、1 μmol/L Rhodamine123、20 mmol/L Hepes）于试管中，荧光分光光度计（日立 HITACHIF-2500）上设定激发波长 500 nm、发射波长 525 nm，检测基础荧光值 F1，测定后将液体吸入原试管中，加入 100 μl 线粒体悬液，25 ℃ 孵育 15 min；5 000 × $g$ 离心 10 min，取上清，测定荧光值 F2，计算 △F = （F1 - F2）/ mt protein（mg），通过测定 Rhodamine123 结合到线粒体基质的多少，反应线粒体平均膜电位的高低。

### 1.5　Western blotting 检测

取 -20 ℃ 冻存线粒体反复冻融破碎后，加入上样缓冲液，100 ℃ 煮沸 3 min 后置冰上冷却，900 × $g$ 离心 30 s，取上清含线粒体蛋白 50 μg 上样，12% SDS PAGE 电泳。常规 Western blotting 方法测定 ATP 合成酶 α 亚基表达变化。用图像分析系统（复日 FR-980）对蛋白条带进行半定量分析。

### 1.6　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

## 2　结果

### 2.1　缺氧和缺氧复合运动大鼠心肌线粒体呼吸功能的变化

与 C 组比较，H 组和 E 组线粒体 ST3、ST4 和 RCR 无显著性差异（$P > 0.05$）。HE 组 ST3 与 H 组比较显著增加（$P < 0.05$），ST4 与 C 组和 E 组比较显著增加（$P < 0.05$），RCR 与 C 组比较显著降低（$P < 0.05$）（表 1）。

**表 1　大鼠心肌线粒体呼吸功能的变化（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）**

| 组别 | ST3（nmol·$min^{-1}$·$mg^{-1}$） | ST4（nmol·$min^{-1}$·$mg^{-1}$） | RCR |
|---|---|---|---|
| 平原对照组 | 14.66 ± 3.39 | 1.46 ± 0.74 | 12.01 ± 5.10 |
| 单纯缺氧组 | 13.14 ± 4.06 | 1.74 ± 0.75 | 8.21 ± 2.55 |
| 平原运动组 | 15.00 ± 1.22 | 1.56 ± 0.53 | 11.08 ± 5.33 |
| 缺氧复合运动组 | 16.65 ± 2.08[b] | 2.62 ± 0.99[ac] | 7.11 ± 2.68[a] |

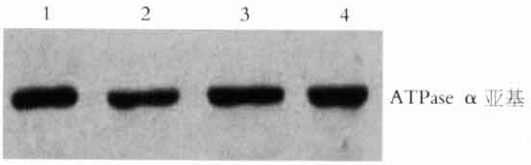
a：$P < 0.05$，与平原对照组比较；b：$P < 0.05$，与单纯缺氧组比较；c：$P < 0.05$，与平原运动组比较

### 2.2　缺氧和缺氧复合运动大鼠心肌线粒体膜电位变化

C、H、E、HE 各组线粒体膜电位的相对荧光强度分别为（23.23 ± 5.25）、（21.39 ± 4.76）、（19.65 ± 2.77）、（22.20 ± 7.06），无显著差异（$P > 0.05$）。

### 2.3　缺氧和缺氧复合运动大鼠心肌线粒体 ATPase α 亚基表达变化

H 组线粒体 ATPase α 亚基表达显著低于平原对照组（$P < 0.05$）；E 组和 HE 组线粒体 ATPase a 亚基表达显著高于 H 组（$P < 0.05$），结果见图 1。




1:平原对照组;2:单纯缺氧组;3:平原运动组;4:缺氧复合运动组

**图1 大鼠心肌线粒体 ATPase α 亚基表达变化**

## 3 讨论

在平原进行运动训练可显著增强心脏功能,但在高原特别是进入高原后的早期阶段进行适当的运动训练,能否增强心脏功能国内外研究较少。我室通过对人体和大鼠的研究表明,在低氧习服过程中进行适当的运动锻炼,可显著增强左、右心室舒缩速度,提高心输出量[2,6,7],说明在低氧条件下进行适当的运动锻炼,可增强心脏功能。这对于促进机体习服高原低氧环境、提高其劳动能力具有重要的意义。

线粒体是独特而重要的细胞器。ST3、ST4、RCR是反应线粒体氧化磷酸化状态的重要指标,ST3 为加入 ADP 时氧耗速率,代表 ADP 对氧化磷酸化刺激效应,与电子传递链、线粒体基质的氧化底物、ATP 合成酶活性等有关;ST4 为无 ADP 时的氧耗速率,不伴有磷酸化过程和 ATP 的合成,反应质子漏状况;RCR 反应氧化磷酸化偶联程度。线粒体膜电位作为衡量线粒体功能的一个重要指标已被广泛应用[8,9]。线粒体膜电位的大小直接反映线粒体功能的变化,膜电位的维持可保证 ATP 的顺利合成。

我们在以往的研究中发现,急性缺氧线粒体呼吸功能降低,而慢性缺氧线粒体呼吸功能恢复。缺氧 40 d与缺氧 3 d 大鼠线粒体相比,反映线粒体内膜质子漏状况的 ST4 明显降低、呼吸控制率明显改善,P/O 值升高[10]。Tonkonogi 等[11]研究人体经过耐力训练 6 周后取肌肉活检测定呼吸功能发现,线粒体 ST3 和 ST4 都显著增加,RCR 无显著变化。王长青等[11]研究显示训练疲劳后肌、肝细胞线粒体膜电位降低,线粒体氧化磷酸化的功能降低。提示线粒体膜电位的改变是评定肌疲劳的重要指标。本研究结果显示,缺氧复合运动后心室肌线粒体 ST3 显著高于 H 组;缺氧复合运动后 ST4 显著增加,RCR 显著降低。各组线粒体膜电位无显著差异,提示经过长时间缺氧及缺氧复合运动后,心肌组织线粒体未发生显著的损伤性改变,线粒体氧化磷酸化功能维持相对恒定。H 组 ATPase α 亚基表达降低,E 组和 HE 组线粒体 ATPase α 亚基表达显著高于 H 组。提示缺氧复合运动后心肌 ATP 产生效率增加,有氧氧化代谢增强。缺氧复合运动 ST4 增加,线粒体呼吸控制率下降,提示缺氧复合运动后,大鼠在静息条件下,心肌线粒体质子漏增加。其机制可能与静息时,组织细胞 ATP 利用减少,在线粒体电子传递无明显降低情况下,为了维持线粒体膜电位的稳定,线粒体质子漏增加。这是由于心肌组织的能量需求在静息和运动时相差巨大,为了缓冲能量的产生和利用的差距,静息时在上游物质代谢无明显减少的情况下,通过下游的"泄洪"即增加质子漏保持代谢稳定性。其作用机制值得进一步研究。

总之,结果表明缺氧复合运动可改善心肌线粒体 3 态呼吸,ATPase α 亚基表达增加,线粒体膜电位保持稳态。提示缺氧复合运动后心肌 ATP 产生效率增加,有氧氧化代谢增强。这可能是缺氧复合运动促进高原习服的线粒体适应机制。

## 参考文献:

[1] 黄庆愿, 高钰琪, 孙秉庸. 缺氧及缺氧复合运动大鼠骨骼肌组织化学观察[J]. 中国运动医学杂志, 2000, 19(4): 351-352, 372.

[2] 刘福玉, 黄庆愿, 高钰琪, 等. 模拟高原游泳运动对大鼠血液粘滞度及心功能的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2004, 20(1): 7-10.

[3] Cunningham O, McElligott A M, Carroll A M, *et al*. Selective detection of UCP 3 expression in skeletal muscle: effect of thyroid status and temperature acclimation[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1604(3): 170-179.

[4] Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, *et al*. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis? [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1606(1-3): 137-146.

[5] 郑文建, 肖 南, 田昆仑, 等. 失血性休克及复苏后大鼠肠上皮 UCP2 变化及其线粒体功能损伤的研究[J]. 创伤外科杂志, 2002, 4(S1): 32-35.

[6] 蔡明春, 黄庆愿, 高钰琪, 等. 模拟高原运动大鼠心肌重塑与肌球蛋白重链的适应性变化[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(21): 2128-2130.

[7] 王长青, 刘丽萍, 郑师陵, 等. 运动性疲劳时 $Ca^{2+}$、线粒体膜电位的改变与细胞凋亡[J]. 体育科学, 2000, 20(3): 59-62, 65.

[8] Duchen M R. Roles of mitochondria in health and disease[J]. Diabetes, 2004, 53(Suppl 1): S96-S102.

[9] Caro A A, Cederbaum A I. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44: 27-42.

[10] 高文祥, 柳君泽, 吴利平, 等. 急、慢性缺氧对大鼠脑线粒体能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 879-882.

[11] Tonkonogi M, Walsh B, Svensson M, *et al*. Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress[J]. J Physiol, 2000, 528 Pt 2: 379-388.

(编辑 汪勤俭)