DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.003

文章编号: 1000-5404(1999)11-0784-04

慢性缺氧大鼠呼吸肌某些代谢酶活性变化

王东林,毛宝龄,钱桂生,郭先健,李淑平 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

【提要】 目的: 观测慢性缺氧大鼠呼吸肌氧化和酵解酶活性变化,探讨其在慢性缺氧适应中的意义。方法: 建立大鼠慢性常压和减压间断缺氧模型,分别测定肋膈肌和脚膈肌已糖激酶(HK)、柠檬酸合成酶(CS)、3羟酰辅酶 A脱氢酶(HADH)和乳酸脱氢酶(LDH)活力,并与肢体肌肉比较。结果: 肋膈肌氧化酶 CS、HK 和 HADH活性均显著增加,脚膈肌和肋间肌也有不同程度增加,腹直肌和肢体无显著变化。所有肌肉 LDH 活性无显著变化。结论: 慢性缺氧适应后,膈肌氧化代谢能力增强,不同肌肉因功能要求不同其适应性变化也有差异。

关键词 缺氧;呼吸肌;酶;组织适应
中图法分类号 R345; R845.22 文献标识码 A

慢性缺氧常见于高原环境和慢性呼吸系统疾病,可使肌肉产生结构、代谢和功能的适应性变化。近年一些研究发现动物肢体肌肉氧化酶活性降低,其原因可能与功能活动减少有关。呼吸肌功能要求不同于肢体肌肉,缺氧条件下呼吸功能增加,功能活动增强,而肢体肌功能活动减少,故呼吸肌与肢体骨骼肌对慢性缺氧的适应性变化可能表现出不同特点,但有关这方面的研究报道较少。本文旨在观测慢性缺氧大鼠呼吸肌氧化和酵解代谢酶活性变化及其特点,并通过与肢体肌肉比较,探讨功能活动对肌肉缺氧适应的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型

健康雄性 Wistar大鼠 36只,体重 245± 53 g,随机分为 4组: ① 常压间断缺氧 1月组(NH1 m,n= 10)。大鼠置密闭舱内,以 2 L/min流速持续充入低氧混合气体(10% O_2+ 90% N_2),使舱内氧浓度为 10%± 1.0%,每天缺氧 8 h,共 1月。大鼠处死前在舱内抽取动脉血,测定血气、血红蛋白浓度(Hb)和血细胞压积(Ht)。② 减压间断缺氧 1月组(HH 1 m,n= 10)。大鼠置减压舱内,减压至模拟海拔 5 000 m,每天 8 h,共 1月。③ 减压间断缺氧 3月组(HH 3 m,n= 6)。按② 法减压 3月。④ 正常对照组(Control,n= 10)。

1.2 待测酶液准备

大鼠处死,分别取肋膈肌(Costal Diaphragm, DIcos)、脚膈肌(Crural Diaphragm, DIcru)、肋间肌(Intercostal, INT)、腹直肌(Rectus Abdominis, RA)、胫前肌(Tibialis Anterior, TA)和比目鱼肌(Soleus, SOL)。肌组织去除脂肪和结缔组织,称重后剪碎,以 1∶20(W/V)比例加入 0.1 mol/L PBS, pH7.4,含 0.05% 牛血清白蛋白(BAS),匀浆,以 400 g离心 10 min,取上清测酶活力。以上步骤均在 0℃~ 4℃。

1.3 酶活性测定

分别测定肌组织已糖激酶(HK, EC 2.7.1.1)、柠檬酸合成酶(CS, EC 4.1.3.7)、3羟酰辅酶 A脱氢酶(HADH, EC1.1.1.35)和乳酸脱氢酶(LDH, EC1.1.1.27)活力,分别作为反映肌组织葡萄糖磷酸化(HK)、三羧酸循环(CS)、脂肪酸β氧化(HADH)和乳酸代谢(LDH)能力的指标。

待测酶液 0.1 ml分别加入下列反应基液中[1]: ① HK: 0.1 mol/L Tris缓冲液(pH 7.6)、8 mmol/L $MgCl_2$、1 mmol/L葡萄糖、0.15 mmol/L $NADP^+$、250 μg G-6-PDH、2 mmol/L ATP; ② CS: 0.1 mol/L Tris缓冲液(pH 8.1)、25 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L NAD^+、1 mmol/L L-苹果酸、0.1 mmol/L乙酰辅酶 A、400 μg MDH; ③ HADH: 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)、0.06 mmol/L EDTA、0.02 mmol/L NADH、0.05 mmol/L S-乙酰辅酶 A; ④ LDH: 0.1 mol/L PBS(pH 7.6)、0.2 mmol/L NADH、1 mmol/L丙酮酸钠。

1.4 肌肉蛋白含量测定

用 Lowry法测定,蛋白含量用每克肌肉含蛋白 mg表示。

1.5 统计学处理

数据 $\bar{x}\pm s$ 表示,用完全随机设计资料方差分析进行显著性检验。

2 结果

2.1 酶活性变化,见表 1~ 4

缺氧膈肌氧化酶活性不同程度增加,其中 DIcos变化幅度较 DIcru大,辅助呼吸肌(INT和 RA)及肢体肌(TA和 SOL)无显著性变化,但辅助呼吸肌氧化酶活性呈增加趋势,肢体肌呈降低趋势。所有肌肉酵解酶(LDH)无显著变化(P> 0.05)。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39370302)
作者简介: 王东林,男,35岁,副主任医师,副教授,博士
收稿日期: 1999-06-08;修回日期: 1999-09-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　HK活性变化(U/g蛋白)

Tab 1　Changes of HK activities (U/g protein)

	DIcos	DIcru	INT	RA	TA	SOL
Control	12.8± 3.2	10.4± 2.5	5.6± 1.4	6.3± 1.3	7.8± 1.5	7.2± 1.6
NH1 m	16.2± 3.0※	12.1± 2.5	6.2± 1.3	7.0± 1.8	7.6± 1.3	6.9± 1.6
HH1 m	15.9± 3.4※	11.7± 2.6	5.9± 1.2	6.6± 1.4	7.9± 1.8	6.8± 1.4
HH3 m	18.9± 4.1△	13.6± 2.7※	6.5± 1.5	6.8± 1.6	7.0± 1.9	6.4± 1.5

※: $P < 0.05$,△: $P < 0.01$ *vs* Control

表 2　CS活性变化(U/g蛋白)

Tab 2　Changes of CS activities (U/g protein)

	DIcos	DIcru	INT	RA	TA	SOL
Control	51.2± 9.8	42.1± 8.7	19.5± 4.6	23.8± 6.5	27.2± 5.3	28.3± 7.0
NH1 m	59.7± 8.6※	47.0± 9.4	22.7± 6.8	23.5± 6.4	24.2± 4.8	25.1± 5.2
HH1 m	62.4± 11.7※	48.6± 10.3	23.1± 5.6	24.3± 5.9	25.4± 4.7	26.5± 4.9
HH3 m	76.6± 15.9△	54.5± 10.8※	25.3± 6.1※	26.1± 6.8	23.9± 5.2	25.7± 5.9

※: $P < 0.05$,△: $P < 0.01$ *vs* Control

表 3　HADA活性变化(U/g蛋白)

Tab 3　Changes of HADA activities (U/g protein)

	DIcos	DIcru	INT	RA	TA	SOL
Control	28.3± 5.1	23.7± 4.8	10.5± 2.7	17.8± 3.8	14.2± 2.6	16.4± 2.9
NH1 m	29.8± 5.5	24.6± 4.3	11.1± 2.8	17.9± 3.4	13.8± 2.0	15.9± 2.8
HH1 m	30.5± 5.3	24.0± 4.4	10.8± 3.0	18.1± 3.1	14.0± 2.3	16.5± 3.2
HH3 m	34.7± 6.9※	25.9± 4.7	11.3± 2.5	18.5± 3.7	12.4± 3.6	14.7± 3.3

※: $P < 0.05$ *vs* Control

表 4　LDH活性变化(U/g蛋白)

Tab 4　Changes of LDH activities (U/g protein)

	DIcos	DIcru	INT	RA	TA	SOL
Control	429± 67	488± 83	618± 106	455± 97	673± 155	422± 86
NH1 m	416± 59	480± 78	614± 99	451± 88	698± 148	427± 79
HH1 m	411± 63	481± 82	624± 112	463± 91	683± 135	434± 88
HH3 m	407± 74	471± 92	606± 108	460± 94	688± 138	443± 93

$P > 0.05$ *vs* Control

2.2　肌肉蛋白变化,见表 5

缺氧肌肉总蛋白含量有不同程度增加,其中 DIcos和 DIcru增加幅度较大。

表 5　肌肉总蛋白含量变化

Tab 5　Changes of total proteins concentration in muscles

	Control	NH1 m	HH1 m	HH3 m
DIcos	113.6± 21.4	123.9± 26.3	124.1± 25.8	136.6± 31.5※
DIcru	115.2± 19.7	122.4± 24.6	121.7± 34.3	134.7± 24.1※
INT	109.8± 22.1	115.2± 18.4	114.9± 21.7	125.2± 33.2
RA	111.3± 29.8	115.6± 25.8	116.0± 24.2	119.8± 21.7
TA	112.0± 23.8	116.4± 23.0	115.8± 25.1	118.2± 28.0
SOL	112.4± 21.9	117.0± 27.9	116.2± 28.6	120.1± 25.6

※: $P < 0.05$ *vs* Control

3　讨论

本实验结果表明,慢性缺氧大鼠膈肌氧化酶活性显著增强,其中以 DIcos变化幅度最大,辅助呼吸肌 INT和 RA氧化酶活性虽然无显著性变化,但总体呈增加趋势,而肢体肌酶活性呈下降趋势。所有肌肉酵解酶活性无显著变化。

有氧氧化和无氧酵解提供肌细胞功能活动所需能量,酶活性变化是代谢能力变化的直接反映。缺氧环境下,细胞可通过代谢酶活性的调整维持适当的 ATP水平。

代谢酶谱变化是肌肉适应性变化的重要特征,外

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

环境刺激所产生的肌肉适应性变化,包括代谢酶活性谱的重新调整[2~5]。如 Pette[7]采用慢性电刺激大鼠 TA,参与有氧氧化代谢途径的酶活性均有不同程度增高,一般数倍或数十倍于刺激前。HK是变化最早的酶,电刺激两周后,可升高达 14倍,甚至有报道,电刺激后 3羟基丁酸脱氢酶上升达 30倍。CS一般上升 3~6倍。本文观察的酶活性变化没有上述电刺激酶活性变化幅度大,说明刺激方式不同,肌肉适应性变化可表现出很大的差异。酶蛋白表达增加是酶活性增强的重要原因,在酶活性变化的同时甚至在此之前,可检测到相应酶的 mRNA表达增加[7]。本实验观察到肌肉总蛋白含量均有不同程度增加,特别是缺氧 3月组膈肌变化显著,可能与酶等一些蛋白表达增加有关。

从实验结果可以看出,不同肌肉酶活性变化幅度不同,特别是膈肌与肢体肌肉之间有较大差异,膈肌氧化酶活性明显增强,而肢体肌酶活性无显著变化甚至呈下降趋势,这种结果的差异可能与其功能要求不同有关。缺氧条件下,呼吸功增加,膈肌功能活动增强,而肢体肌肉为降低全身氧耗,功能活动明显减少。资料表明,耐力训练可明显增强呼吸肌的氧化能力,如 Powers报道[8],大鼠耐力训练后,膈肌氧化酶 CS和 HADH等活性显著增加,DIcos SDH活性增加 29%。静息状态下,膈肌氧耗仅占全身 1%~2%,而在耐力训练时,可增至 30%以上,故呼吸运动增强可能是导致膈肌氧化酶活性增加的重要原因之一。

DIcos与 DIcru之间的差异也可能与两者的功能要求不同有关。过去认为膈肌是单一的功能实体,但近年的研究表明,DIcos和 DIcru在结构和功能上均有较大差别,被认为是两块不同的肌肉。因两者功能要求不同,其慢性缺氧适应性变化也不同。因此,本文认为,肌肉对慢性缺氧的适应性变化,除低氧这一直接刺激因素外,功能活动也有非常重要的影响。

参考文献

[1] 蒋传葵,金承德,吴仁龙,等.工具酶活力测定[M].上海:上海科技出版社,1982.11-131.

[2] Powers S K, Coombes J, Demirel H. Exercise training-induced changes in respiratory muscles[J]. Sports Med, 1997, 24(2): 120-131.

[3] Parra J, Pette D. Effects of low-frequency stimulation on soluble and structure-bound activities of hexokinase and phosphofructokinase in rat fast-twitch muscle[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1251(2): 154-160.

[4] Skorjanc D, Heine G, Pette D. Time-dependent increase of succinate dehydrogenase activity in low-frequency stimulated rabbit muscle: a comparison between microphotometric and biochemical methods[J]. Histochem Cell Biol, 1997, 107(1): 47-55.

[5] Helge J W, Kiens B. Muscle enzyme activity in humans: Role of substrate availability and training[J]. Am J Physiol, 1997, 272(5142): R1620-R1624.

[6] Weber F E, Pette D. Changes in free and bound forms and total amount of hexokinase isoenzyme II of rat muscle in response to contractile activity[J]. Eur J Biochem, 1990, 191(1): 85-90.

[7] Pette D, Vrbova G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation[J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1992, 120: 115-202.

[8] Annex B H, Kraus W E, Dohm G L, *et al*. Mitochondrial biogenesis in striated muscles: Rapid induction of citrate synthase mRNA by nerve stimulation[J]. Am J Physiol, 1991, 260(2 pt 1): C266-C270.

[9] Powers S K, Lawer J, Criswell, *et al*. Endurance training induced cellular adaptations in respiratory muscles[J]. J Appl Physiol, 1990, 68(5): 2114-2118.

(编辑 谢义霞)

Changes of the activity of metabolic enzymes in respiratory muscles after exposure to chronic hypoxia in rats

WANG Dong-lin, MAO Bao-ling, QIAN Gui-sheng, GUO Xian-jian, LI Shu-ping (Research Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

Abstract Objective: To study the changes of the activity of oxidative and glycolitic enzymes in the costal and crural diaphragm and intercostal muscles after exposure to hypobaric and normobaric hypoxia respectively in rats. Methods: Rats were exposed to hypobaric or normobaric hypoxia 8 hours per day for 1 or 3 months respectively. The activity of hexokinase (HK), citrate synthetase (CS), 3-hydroxy-1-CoA dehydrogenase (HADH) and lactate dehydrogenase (LDH) in the costal and crural diaphragm and the intercostal muscles were determined with biochemical techniques. Results: There was an increase of the activity of CS,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net