

高压氧对急性力竭运动大鼠骨骼肌 Fas-mRNA 表达与细胞凋亡的影响

姜振^{1,2}, 张林¹, 刘鹏程¹, 赵秀斌¹ (1. 苏州大学体育学院, 江苏苏州 215021; 2. 盐城师范学院, 江苏盐城 224002)

摘要 [目的]探讨高压氧对急性力竭运动大鼠骨骼肌 Fas-mRNA 表达与细胞凋亡的影响及其对骨骼肌损伤的恢复作用。[方法]24 只健康雄性大鼠, 随机分为 3 组, 即: 安静对照组(A)、急性力竭运动组(B)、急性运动高压氧恢复组(C); B 组分别进行一次急性力竭运动, C 组于运动后应用高压氧疗法, 应用 HE 染色与 RT-PCR 对各组大鼠骨骼肌细胞凋亡与 Fas-mRNA 的表达进行检测。[结果]与对照组相比, B 组大鼠骨骼肌细胞凋亡数量增多, Fas-mRNA 的表达增多, 经高压氧治疗后细胞凋亡数量减少, Fas-mRNA 的表达降低。[结论]高压氧疗法能抑制 Fas-mRNA 的表达, 减少运动训练大鼠骨骼肌细胞凋亡, 促进运动性疲劳与骨骼肌微损伤的恢复。

关键词 高压氧; 运动; Fas-mRNA; 细胞凋亡

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)22-10520-02

The Influence of Hyperbaric Oxygen with the Apoptosis and Expression of Fas-mRNA after Acute Exercise in Skeletal Muscle of Rats
JIANG Zhen et al (The School of Physical Education and Sports, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215021)

Abstract [Objective] The study aimed to investigate the influence of hyperbaric oxygen with the apoptosis and expression of Fas-mRNA after treadmill training in skeletal muscle of rats and study the mechanism of muscle injury prevention and cure. [Method] 24 rats were selected and randomly divided into 3 groups: control group (A), single bout acute treadmill exercise group (B), exercise with hyperbaric oxygen group (C). Using the methods of HE and RT-PCR to check the issue and the expression of Fas-mRNA. [Result] Compare with the control group, the number of muscle apoptosis and the expression of Fas-mRNA increased on the B group, decreased on the hyperbaric oxygen group. [Conclusion] Applying hyperbaric oxygen can decrease the expression of Fas-mRNA and the number of apoptosis, and accelerate the resume of skeletal muscle injury and fatigue.

Key words Hyperbaric oxygen; Exercise; Fas-mRNA; Apoptosis

长时间、大强度运动引起的肌肉组织损伤与细胞凋亡是影响运动员身体机能, 导致运动能力下降的重要原因^[1-2]。运动后为了加快消除疲劳、促进恢复, 使机体内环境建立新的平衡, 首先要解决组织缺氧和消除代谢产物的问题。研究显示, 高压氧疗法作为一种有效的治疗与康复手段, 对于运动性肌损伤与疲劳恢复等具有较好的效果, 但对细胞凋亡的调节机制仍有待进一步地研究^[3-5]。笔者通过试验观察高压氧对急性力竭运动大鼠腓肠肌 Fas-mRNA 的表达与细胞凋亡变化的影响, 探讨高压氧对运动大鼠骨骼肌细胞凋亡的调控机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 2 月龄雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 160~180 g, 由中国科学院与上海动物实验中心提供。标准啮齿类动物饲料喂食, 自由饮食, 动物室温度控制在 20~26℃。进行一周适应性喂养后随机分为 3 组(每组 8 只), 即: 对照组(A)、急性力竭运动组(B)、急性运动高压氧恢复组(C)。

1.2 运动方案 B 组采用 25 m/min 的速度运动到力竭, C 组于运动后即刻用 0.2 MPa 压力的高压氧恢复 60 min。

1.3 供氧条件 应用山东潍坊锅炉氧舱制造公司 DW-400 型动物氧舱, 纯氧洗舱 10 min, 以 0.01 MPa/min 的速率加压至 0.2 MPa(绝对压), 高压停留 40 min(期间以纯氧通风 10 min, 使舱内氧浓度大于 98%, CO₂ 浓度小于 0.05%, 舱内温度维持在 22~24℃)。暴露结束后, 匀速减压 10 min 至常压出舱。

1.4 取材方法 将 A、B、C 组于运动后 3 h 分批麻醉处死, 快速取腓肠肌放入液氮, 置于 -80℃ 冰箱, 备用。同时, 取部分腓肠肌 10% 甲醛固定, 用于切片制作。

1.5 指标测试

1.5.1 HE 染色。 组织脱蜡, 水化切片; 放入苏木精染液染色; 用 0.5% 伊红染液染色, 脱水, 封片、烤片、封片。

1.5.2 Fas-mRNA 表达。 骨骼肌组织样品匀浆离心, 上清液备用。用 Trizol 试剂提取骨骼肌组织总 RNA, 反转录和 PCR 扩增同时进行(试验试剂来自 Santa Cruz 公司): 反应液总体积为 25 μl, DEPC 处理的灭菌双蒸水 13 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2.5 μl, 10 pmol/μl RT-PCR 引物 1.5 μl, 15 mmol/L 氯化镁 2 μl, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μl, AMV 反转录酶 0.2 μl, RNA 酶抑制剂 0.3 μl, 5 U Taq DNA 聚合酶 1 μl, 提取的样品 RNA 2 μl, 混匀并作好标记, 在 PCR 扩增仪上进行以下循环: 42℃ 45 min, 95℃ 3 min; 扩增条件 95℃ 30 s, 50℃ 40 s, 72℃ 40 s, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。反应结束后, 将 100 bp DNA 分子量 Marker 及样品与 6 倍的上样缓冲液混合后依次加入样品孔内, 即取 PCR 扩增产物 15 μl 与 3 μl 上样缓冲液混合, 点样于 1.2% 琼脂糖凝胶孔中, 以 5 V/cm 电压进行电泳, 40 min。PCR 产物分析: 紫外凝胶成像分析仪上观察结果。测定每条带的光密度值, 以 GAPDH 为内参对照计算, 并比较各组样本 Fas 的相对表达量。大鼠 Fas 特异 DNA 引物为 Fas-A: 5'-AGC TCC TTT GGC TGC TGA TCC TC-3'; Fas-B: CGT GAG ATT GAT ACC AGC ACT G-3'; mGAPDH-A: 5'-ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'; mGAPDH-B: 5'-CAC CTT CTT GAT GTC ATC ATA CTT G-3'。

1.6 统计学分析 所有统计数据均用 $\bar{X} \pm s$ 表示, 以用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计。采用单因素方差分析(one-way ANOVA) 各组间差异, 检验水准 $P < 0.05$ 认为差值有显著性意义。

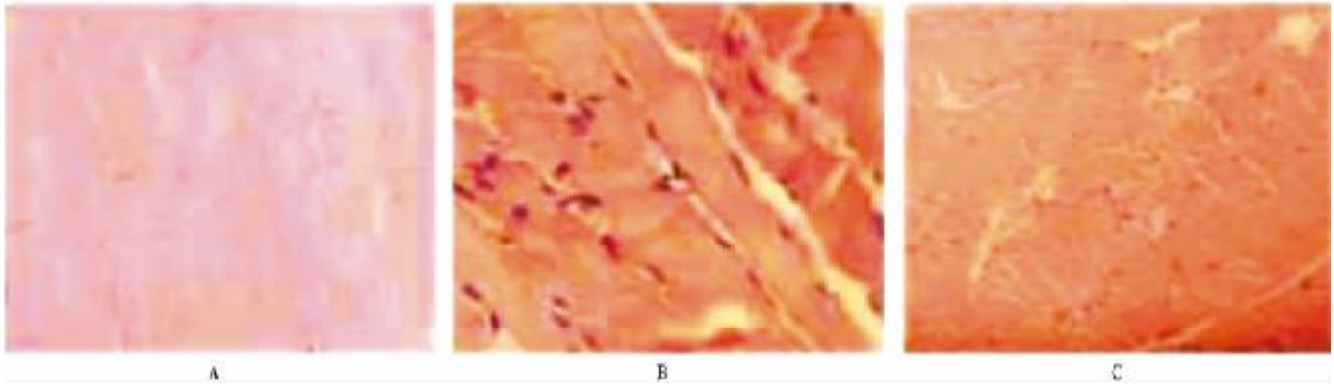
2 结果与分析

2.1 骨骼肌的形态结构 在 HE 染色片中, 显微镜下观察到急性力竭运动大鼠骨骼肌细胞间隙增宽、肌纤维排列不规则, 部分细胞核染色质浓缩靠近核膜、核膜增厚等典型细胞

基金项目 江苏省教育厅研究生科技创新项目基金资助(CX07B_011r)。
作者简介 姜振(1974-), 男, 江苏盐城人, 在读博士, 讲师, 从事运动生理与体育教育训练方面的研究工作。

收稿日期 2009-04-13

凋亡的形态结构改变。高压氧恢复组大鼠骨骼肌细胞间隙与肌纤维接近正常,细胞凋亡数量减少(图 1)。



注:A 为对照组;B 为急性力竭运动组;C 为急性运动高压氧恢复组。

Note: A. Control group; B. Acute exhausting exercise group; C. Acute exercise oxygen recovery group.

图 1 各组大鼠骨骼肌形态结构的变化

Fig. 1 Rphology changes of rat skeletal muscle in each group

2.2 骨骼肌 Fas-mRNA 的表达 应用 GENE GENIUS 型全自动凝胶成像分析仪照相,并测定每条带的光密度值,以衡量 mRNA 表达的多少(图 2)。用目的基因光密度值/GAPDH 光密度值比较各组样本 Fas 基因的 mRNA 相对表达量(表 1)。各组 Fas 基因的 mRNA 的表达:B 组 Fas 基因的 mRNA 表达显著高于 A 组($P < 0.01$),C 组 Fas 基因的 mRNA 表达低于 B 组($P < 0.05$)。

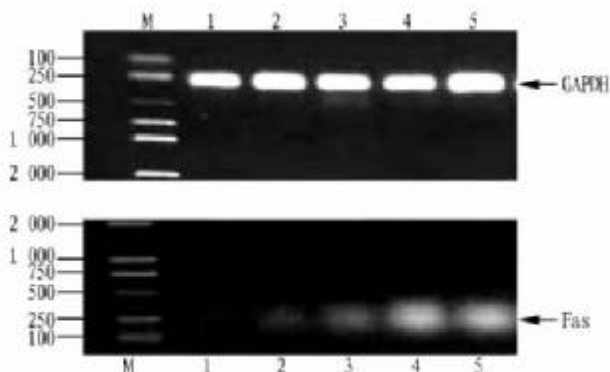
表 1 各组大鼠骨骼肌 Fas-mRNA 表达分析

Table 1 Fas-mRNA expression analysis of rat skeletal muscle in each group

组别	大鼠个数//只	Fas/GAPDH
Group	Rats numbers	
A	8	0.082 ± 0.037
B	8	0.947 ± 0.092 a
C	8	0.433 ± 0.065 a,b

注:与对照组相比,a: $P < 0.01$;与急性力竭运动组相比,b: $P < 0.05$

Note: a: $P < 0.01$ compared with the control group; b: $P < 0.05$ compared with the acute exhausting exercise group.



注:M 为分子量标志 Marker;1 为对照组;2、3 为急性运动高压氧恢复组;4、5 为急性力竭运动组。

Note: 1, Control group; 2, 3, Acute exercise oxygen recovery group; 4, 5, Acute exhausting exercise group.

图 2 各组骨骼肌组织 Fas 与 GAPDH 的 mRNA 表达 RT-PCR 结果

Fig. 2 RT-PCR results of mRNA expression of Fas and GAPDH in skeletal muscle tissue in each group

3 讨论

(1) Fas 基因为凋亡刺激基因,其蛋白表达物 Fas 抗原为细胞膜表面的一种 45 kD 膜受体蛋白(I 型膜蛋白),属于肿瘤坏死因子(TNF)受体家庭成员之一,Fas 蛋白胞浆区有一段 80 个氨基酸组成的肽链,在细胞凋亡过程中发挥着细胞凋亡信号的作用,称为“死亡区域”^[5-6]。Zalewska R 等研究显示,在视神经轴突的 Fas 基因表达增加,引起细胞凋亡数量增多^[7]。Weerapong P 等与 Navalta J W 等研究发现,在运动导致 Fas 基因、Caspase 的表达,参与了骨骼肌细胞凋亡与损伤恢复的调控^[8-9]。Fas 介导的细胞凋亡信号传导过程较为复杂,涉及 Fas 配体、蛋白激酶(PK)、神经酰胺(SP)、P53、Bcl-2 等, Fas 基因表达诱导产生神经酰胺,通过某种途径,激活内源性核酸内切酶,引起细胞凋亡,Bcl-2 具有抑制细胞凋亡的效应,可阻断 Fas 基因的细胞凋亡。其机制可能是 Fas 与 Fas 配体(FasL)结合从而转导凋亡信号进入靶细胞并激活 Caspase 级联反应,进而诱导细胞凋亡^[10-11]。试验观察到运动导致大鼠骨骼肌 Fas-mRNA 的表达增加,组织学观察到骨骼肌存在微细损伤,伴有细胞凋亡的发生,说明长时间、大强度运动导致的运动性肌损伤、疲劳与细胞凋亡有着密切的关系。

(2) 高压氧疗法是通过吸入高压氧气,提高血液中的氧分压而达到对机体各系统器官功能和代谢的调节。长时间的剧烈运动可以造成机体缺氧,即吸氧量与需氧量之间的不平衡,从而使机体利用氧的能力受到限制。高压氧能够提高机体的运动耐受性,改善组织缺血与缺氧现象。彭兆云等与 Catherine 等研究发现,高压氧预处理可提高小鼠运动耐力,且具有增强乳酸清除能力及抗疲劳作用^[12-13]。高压氧对运动员急性疲劳的恢复过程有明显促进作用,运动员血液中的血尿素氮(BUN)和血乳酸(BL)的清除明显加快^[14-16]。经高压氧处理后,使力竭运动后小鼠的血清酶、硫化巴比妥酸反应物、亚硝酸根含量改变的程度相对减轻,高浓度氧能促进运动性骨骼肌微损伤的恢复^[17]。经高压氧恢复后 Fas-mRNA 的表达显著减少,其机制可能与高压氧诱导抗氧化酶系统的活性增加、抑制自由基的产生、增加微循环血量、改善机体缺氧状态等因素有关^[18]。

(下转第 10538 页)

泌细胞,即催乳素(PRL)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、生长激素(GH)、促黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)、促黑色素细胞刺激激素(MSH)、生长乳素 α (SL α)和生长乳素 β (SL β)分泌细胞。不同鱼类垂体激素分泌细胞的位置存在较大的差异。大眼鳊PRL细胞和ACTH细胞分布于腺垂体前外侧部,这在鱼类中较为一致^[7-15]。大眼鳊GH细胞仅分布于中外侧部,与鲈鱼^[8]相同,而与高体鳊^[12]GH细胞主要位于中外侧部,在中间部也有零星分布,南方鲇^[14]GH细胞在前外侧部、中外侧部和中间部均有分布不同。GH细胞的排列方式与鲈鱼^[8]、鳊鱼^[9]、赤点石斑鱼^[10]和高体鳊^[12]相似,围绕神经分枝呈沟回状分布,构成中外侧部小岛状细胞团的边界,可能与这几种鱼中外侧部神经分枝发达有关,而与大黄鱼^[11]GH细胞围绕神经纤维呈簇状分布,南方鲇^[14]GH细胞分散在GTH细胞和TSH细胞间不同。Heidenhain-Azan染色大眼鳊GTH细胞质中具被染成蓝色和红色2种分泌颗粒,而TSH细胞质中分泌颗粒呈蓝色,这与鳊鱼^[9]和南方鲇^[14]相同。大眼鳊GTH细胞主要位于中外侧部,鲈鱼^[8]GTH细胞除分布于中外侧部外,垂体中间部边缘的少数嗜碱性细胞对鲑鱼GTH抗体也呈免疫阳性反应,为GTH细胞。大眼鳊垂体中间部腹侧的PAS阳性细胞是否为GTH细胞尚有待研究。大眼鳊部分GTH细胞中出现大量空泡,与试验鱼处于繁殖季节,GTH大量释放有关。与已有报道不同,大眼鳊MSH细胞排列成整齐的3~5层,将后腺垂体神经部包围。

参考文献

- [1] 陈军,郑文彪,伍育源,等. 鳊鱼和大眼鳊鱼年龄生长和繁殖力的比较研究[J]. 华南师范大学学报:自然科学版,2003(1):110-114.
- [2] 谢从新. 三道河水库大眼鳊的年龄和生长[J]. 水利渔业,1995,15(1):12-15.
- [3] 王广军,谢骏,庞世勋,等. 珠江水系大眼鳊的繁殖生物学[J]. 水产学报,2006,30(1):50-55.
- [4] 李红敬. 珠江水系大眼鳊的食性研究[J]. 水利渔业,2008,28(4):66-68.
- [5] 蒲德永,王志坚,张耀光,等. 大眼鳊胚胎发育的观察[J]. 西南农业大学学报,2006,28(4):651-655.
- [6] 蒲德永,王志坚,周传江,等. 大眼鳊幼鱼的发育和生长[J]. 西南大学学报:自然科学版,2007,29(8):118-122.
- [7] 汪小东,严安生,秦玉丽,等. 保安湖鳊鱼垂体周年变化的组织学观察[J]. 华中农业大学学报,1996,15(5):470-474,T002.
- [8] 戴燕玉,陈蕾,方永强. 鲈鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞与性腺发育的关系[J]. 台湾海峡,1998,17(2):139-142.
- [9] 叶华,林浩然. 鳊鱼脑垂体的组织化学研究[J]. 宜宾师专学报:自然科学版,1998(2):69-74.
- [10] 方永强. 赤点石斑鱼脑垂体组织生理学的研究[J]. 台湾海峡,1990(9):69-72.
- [11] 翁幼竹,方永强,周晶,等. 大黄鱼脑垂体组织学与免疫组织化学[J]. 中国水产科学,2003,10(1):1-5.
- [12] GARCIA-HERNANDEZ M P, GARCIA-AYALA A, ELBAL M T, et al. The adenohypophysis of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study[J]. Tissue & Cell, 1996, 28(5):577-585.
- [13] SHABANA M, MOSTAFA M. Immunocytochemical and histological studies on the hypophyseal-gonadal system in the freshwater Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), during sexual maturation and spawning in different habitats[J]. Journal of Experimental Zoology, 1999, 284:343-354.
- [14] 谢碧文,岳兴建,张耀光. 南方鲇成鱼垂体的组织学和组织化学[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2006,31(5):148-153.
- [15] 鲁双庆,刘少军. 草鱼性成熟前后垂体组织学和超微结构[J]. 湖南师范大学学报:自然科学版,1996,19(3):76-83.

(上接第10521页)

4 小结

该研究结果显示,急性力竭运动大鼠骨骼肌Fas-mRNA表达与细胞凋亡增加,经高压氧恢复后Fas-mRNA的表达降低,抑制细胞凋亡的发生。运动引起机体内分泌、氧化应激、组织代谢等一系列内环境变化,可能是运动性肌损伤与细胞凋亡的重要原因,而这些影响与运动刺激的强度和持续时间等相关^[19-20]。高压氧疗法能够促进抗氧化酶系统的活性增加、抑制自由基、增加微循环血量、改善机体缺氧状态,对运动性骨骼肌微损伤的恢复具有促进作用。

参考文献

- [1] BRUNELLE J K, CHANDAL N S. Oxygen deprivation induced cell death: an update[J]. Apoptosis, 2002, 7:475-482.
- [2] SUKOFF M H. Effects of hyperbaric oxygenation[J]. J Neurosurg, 2001, 95(3):544-546.
- [3] BARNETT A. Using recovery modalities between training sessions in elite athletes: does it help? [J]. Sports Med, 2006, 36(9):781-796.
- [4] 胡柏平,王小梅. 运动性疲劳与高压氧疗法[J]. 军事体育进修学院学报, 2006, 25(1):104-106.
- [5] KOÇTÜRK S, KAYATEKİN B M, RESMİ H, et al. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats [J]. Eur J Appl Physiol, 2008, 102(5):515-524.
- [6] CATHERINE R, CÉLINE C, NICOLAS P, et al. Bcl-2/Bax protein expression in heart, slow-twitch and fast-twitch muscles in young rats growing under chronic hypoxia conditions[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2001, 226:9-16.
- [7] ZALEWSKA R, ZALEWSKI B, RESZEC J, et al. The expressions of Fas and caspase-3 in human glaucomatous optic nerve axons [J]. Med Sci Monit, 2008, 14(12):274-278.
- [8] WEERAPONG P, HUME P A, KOLT G S. The mechanisms of massage

- and effects on performance, muscle recovery and injury prevention [J]. Sports Med, 2005, 35(3):235-256.
- [9] NAVALTA J W, HRNCIR S P. Core stabilization exercises enhance lactate clearance following high-intensity exercise [J]. J Strength Cond Res, 2007, 21(4):1305-1309.
- [10] MOR G, STRASZEWSKI S, KAMSTEEG M. Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: survival and apoptosis [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(9):1305-1315.
- [11] YONEYAMA K, GOTO T, MIURA K, et al. The expression of Fas and Fas ligand, and the effects of interferon in chronic liver diseases with hepatitis C virus [J]. Hepatol Res, 2002, 24(4):327-337.
- [12] 彭兆云. 高压氧诱导低氧耐受的分子机制 [D]. 上海:上海第二军医大学, 2005:25-48.
- [13] CATHERINE RIVA, CÉLINE CHEVRIER, NICOLAS PASQUAL, et al. Bcl-2/Bax protein expression in heart, slow-twitch and fast-twitch muscles in young rats growing under chronic hypoxia conditions [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2001, 226:9-16.
- [14] SUEBLINVONG T, EGTASAENG N, SANGUANGRANGSIRIKUL S. Hyperbaric oxygenation and blood lactate clearance: study in sixty male naval cadets [J]. J Med Assoc Thai, 2004, 87(S1):218-222.
- [15] 金其贵,邓荣华,李宁川,等. 过度训练对大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2000, 19(4):356-358.
- [16] MCKENZIE M J, GOLDFARB A H. Aerobic exercise bout effects on gene transcription in the rat soleus [J]. Med Sci Sports Exerc, 2007, 39(9):1515-1521.
- [17] RADOM-AIZIK S, ZALDIVAR F J R, LEU S Y, et al. Effects of 30 min of aerobic exercise on gene expression in human neutrophils [J]. J Appl Physiol, 2008, 104(1):236-243.
- [18] ASLAN S, ERDEM S, SIVRI A, et al. Exercise-induced apoptosis of rat skeletal muscle and the effect of meloxicam [J]. Rheumatol Int, 2002, 21(4):133-136.
- [19] 邢良美,王建密. 运动状态下的线粒体与细胞凋亡 [J]. 南京体育学院学报:自然科学版, 2006, 5(2):15-19.
- [20] KERKSICK C, TAYLOR L, HARVEY A, et al. Gender-related differences in muscle injury, oxidative stress, and apoptosis [J]. Med Sci Sports Exerc, 2008, 40(10):1772-1780.