

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.17.009

脉冲电流经皮刺激肝区对运动性疲劳大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物活性的影响 *

翟艺宗¹ 黄昌林^{2Δ} 常 祺² 王久清² 张 佳² 郭延岭²

(1 新乡医学院 河南 新乡 453000; 2 中国人民解放军第 150 中心医院 河南 洛阳 471000)

摘要 目的: 探讨脉冲电流经皮刺激肝区对运动性疲劳大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I~IV)活性的影响。**方法:** 选取健康 8 周龄 Wistar 雄性大鼠 80 只为实验对象,将实验动物随机分为安静对照组(A 组)、疲劳对照组(B 组)、疲劳前刺激组(C 组)、疲劳后刺激组(D 组),造模成功后分别在 1、3、5 周末分批处死。采用分光光度法测定 1、3、5 周末各组动物的肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I~IV)活性,大鼠肝脏线粒体蛋白定量用 Bradford 蛋白定量法测定。**结果:** 第 3、5 周末 D 组和 B 组、C 组大鼠游泳力竭时间差异比较具有统计学意义($P < 0.05$)。A 组、C 组及 D 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I~IV)活性水平在第 3、5 周末均高于 B 组($P < 0.05$)。D 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I~IV)活性水平在第 3、5 周末均高于 C 组($P < 0.05$)。**结论:** 脉冲电流经皮刺激运动性疲劳大鼠肝区可以提高其氧化呼吸链酶复合物(I~IV)的活性水平。

关键词: 脉冲电流刺激;运动性疲劳;肝脏线粒体;呼吸链酶复合物活性

中图分类号: Q95-3; Q68; R333.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)17-3236-04

Influence of Percutaneous Impulsive Current Stimulation of Hepatic Region on the Hepatic Mitochondria, Respiratory Chain Enzyme Complex Activity in Exercise-induced Fatigue Rats*

ZHAI Yi-zong¹, HUANG Chang-lin^{2Δ}, CHANG Qi², WANG Jiu-qing², ZHANG Jia², GUO Yan-ling²

(1 Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan, 453000, China;

2 The 150th Hospital of Chinese PLA, Luoyang, Henan, 471000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effects of percutaneous impulsive current stimulation of hepatic region on the hepatic mitochondria, respiratory chain enzyme complex (I~IV) activity in exercise-induced fatigue rats and further investigate the exercise-induced fatigue. **Methods:** Eight-week-old Wistar male rats were selected to be experimental animals which were randomly separated into four groups: control group (group A); fatigue group (group B); stimulation group before fatigue (group C) and stimulation group after fatigue (group D). At the weekend of 1st, 3rd and 5th week after modeling, rats were chosen from each group and sacrificed. We adopted spectrophotometry to determine hepatic mitochondria respiratory chain enzyme complex (I~IV) activity of the rats in each group in 1st, 3rd and 5th week. As for the protein quantification of the hepatic mitochondria in rats, Bradford protein quantification was adopted. **Results:** At the weekend of 3rd and 5th week, the exhausting time of group B was less than that of group C and group D, and the difference among these groups in swimming exhausting time was statistically significant ($P < 0.05$). The level of activity of hepatic mitochondria respiratory chain enzyme complex (I~IV) in group A, group C and group D in the weekend of 3rd week and 5th week was higher than that in group B and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The level of activity of hepatic mitochondria respiratory chain enzyme complex (I~IV) in group D in the weekend of 3rd week and 5th week was higher than that in group C and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions:** Percutaneous impulsive current stimulation of hepatic region in exercise-induced fatigue rats may improve the activity of the oxidant respiratory chain enzyme complex(I~IV).

Key words: Impulsive current stimulation; Exercise-induced fatigue; Hepatic mitochondria; Respiratory chain enzyme complex activity

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; Q68; R333.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)17-3236-04

* 基金项目: 全军卫生和疾病防控应用性研究课题计划(13BJYZ18);

新乡医学院 2013 年硕士研究生科研创新支持计划项目(YJSCX201344Y)

作者简介: 翟艺宗(1989-), 男, 医学硕士, 主要研究方向: 骨科疾病的基础与临床研究, E-mail: zhaiyizong007@163.com

Δ 通讯作者: 黄昌林, E-mail: huangchanglin1945@263.net

(收稿日期: 2015-01-06 接受日期: 2015-01-22)

前言

运动性疲劳指身体机能的生理过程不能持续在特定水平或身体不能维持预定的运动强度的机体运动能力下降的现象^[1]。肝脏是人体最大的腺体,在机体物质代谢,维持血糖恒定及供能方面有重要作用。线粒体作为细胞器,是真核细胞功能活动的主要供能单位^[2],通过其内膜呼吸链的氧化与磷酸化反应的偶联为有机体生成 80% 以上的 ATP^[3],在维持肝脏细胞正常的能量代谢和功能方面有重要作用。而肝脏线粒体内膜呼吸链包括 4 个氧化还原复合体酶系^[4],即复合体 I (complex I) 为 NADH-Q 还原酶,复合体 II (complex II) 为琥珀酸-Q 还原酶,复合体 III (complex III) 是 QH₂-细胞色素 C 还原酶,复合体 IV (complex IV) 是细胞色素氧化酶。线粒体呼吸链的基本功能是转化底物的氧化还原势能(ΔE_h)为质子电化学势能($\Delta \mu H^+$),而后者再转化成 ATP 的高能磷酸键能(ΔG_p)^[5,6]。前期有研究表明^[7,8],脉冲电流经皮刺激运动性疲劳大鼠肝区能够延长其游泳力竭时间,减轻运动疲劳所致的肝脏损伤,有抗疲劳作用;不同间动周期中频脉冲电流经皮刺激运动性疲劳士兵肝区,可提高其运动耐力,有缓解运动性疲劳的作用。本研究采用游泳力竭大鼠模型,应用分子生化技术,观察脉冲电流经皮刺激肝区对运动性疲劳大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)活性的影响,了解运动性疲劳后线粒体主要酶的活性改变以及脉冲电流经皮刺激肝区干预方式对肝脏能量代谢的影响,丰富并完善脉冲电流经皮刺激肝区对于缓解疲劳的相关机制研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择健康 8 周龄 Wistar 大鼠 80 只,均为雄性,体重 204 ± 15 g,由河南省实验动物中心提供,饲养室温度 23 ± 2 °C,湿度 $41\% \pm 15\%$,自然光照,分笼饲养,自由摄食及饮水,适应性喂养 1 周,所有动物实验前均未进行过游泳运动。

1.2 主要试剂和仪器

大鼠线粒体呼吸链复合物(I-IV)酶联免疫分析试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司);盐酸氯胺酮注射液(国药准字 H35020148,福建古田药业有限公司);LD5-2A 离心机(北京雷勃尔离心机有限公司);电子天平;上海康金酶标仪;电热恒温水槽等。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组 将实验动物随机分为安静对照组(A组)、疲劳对照组(B组)、疲劳前刺激组(C组)、疲劳后刺激组(D组),每组 18 只,剩余 8 只备用。按组别分笼饲养。实验开始前 3 d,每天每只大鼠学习游泳 30 min,水温 32 ± 1 °C,水深 70 cm,随后连续进行 5 周实验。B 组、C 组及 D 组大鼠每周进行游泳训练 6 d,休息 1 d,游泳 2 次/日,每次均达到力竭,当大鼠浮在水面不运动时用水棒驱赶,维持其运动状态。力竭标准以大鼠下沉后 10 s 不露出水面为准,记录每只大鼠的游泳力竭时间。每组大鼠游泳后换水。B、D 组大鼠在游泳后,C 组大鼠

在游泳前分别给予腹腔注射盐酸氯胺酮注射液 0.25 g/kg 麻醉。C 组大鼠在游泳前,D 组大鼠在游泳力竭后分别给予大鼠肝区频率为 1024 Hz 的脉冲电流刺激,电流强度均为 10 mA,间动周期为 1 s,时间均为 20 min。

1.3.2 取材、标本制备及检测指标 各组大鼠分别在 1、3、5 周末分批处死,处死动物禁食水过夜,断头处死,立即剖腹取肝脏组织,取肝脏标本 1 g,用液氮迅速冷冻保存备用。肝脏标本溶化后仍保持 2-8 °C 的温度,眼科剪剪碎后,加入 9 mL 的 PBS 液(pH7.4),用超声匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 min(3000 转/分)。收集上清液,分装后一份待检测,其余冷冻备用,整个操作过程均在 0-4 °C 中进行。采用分光光度法^[9]测定 1、3、5 周末各组动物的肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)活性,大鼠肝脏线粒体蛋白定量用 Bradford 蛋白定量法测定^[10]。

1.4 统计学处理

本研究所有实验数据均用 SPSS18.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析,所涉及的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,并以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 运动性疲劳大鼠游泳力竭时间的比较

第 1 周末 3 组大鼠游泳力竭时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);第 3 周末 B 组大鼠力竭时间短于 C 组及 D 组,C 组和 D 组大鼠游泳力竭时间差异比较无统计学意义($P > 0.05$),而 D 组和 B 组、C 组大鼠游泳力竭时间差异比较具有统计学意义($P < 0.05$);第 5 周末 B 组大鼠力竭时间短于 C 组和 D 组,B 组和 C 组大鼠游泳力竭时间差异比较无统计学意义($P > 0.05$),而 D 组和 B 组、C 组大鼠游泳力竭时间差异比较具有统计学意义($P < 0.05$)。具体结果详见表 1。

表 1 运动性疲劳大鼠游泳力竭时间($\bar{x} \pm s$, n=6, min)

Table 1 The exhaustive swimming time of exercise-induced fatigue rats ($\bar{x} \pm s$, n=6, min)

Group	Training time(week)		
	1	3	5
B group	94.59 $\pm$ 8.51	101.72 $\pm$ 7.23	111.59 $\pm$ 8.42
C group	93.80 $\pm$ 10.89	105.46 $\pm$ 9.89	119.18 $\pm$ 10.27
D group	97.26 $\pm$ 11.62	115.35 $\pm$ 12.19*	132.39 $\pm$ 9.44**

注:* $P < 0.05$ 和 B 组相比较;# $P < 0.05$ 和 C 组相比较。

Note: * $P < 0.05$ compared with group B; # $P < 0.05$ compared with group C.

2.2 各组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)活性的比较

第 1 周末 4 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)活性的比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。A 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物 I 的活性,在第 3、5 周末分别为(0.826 $\pm$ 0.048)、(0.835 $\pm$ 0.054)高于 B 组的(0.570 $\pm$ 0.044)、(0.510 $\pm$ 0.043);C 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物 I 的活性,在第 3、5 周末分别为(0.618 $\pm$ 0.045)、(0.609 $\pm$ 0.043)高于 B 组的(0.570 $\pm$ 0.044)、(0.510 $\pm$ 0.043);D 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物

I 的活性,在第 3、5 周末分别为 (0.957 ± 0.054) 、 (0.996 ± 0.057) 高于 B 组的 (0.570 ± 0.044) 、 (0.510 ± 0.043) ,且差异比较均具有统计学意义($P < 0.05$)。A 组、C 组及 D 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(II-IV)活性水平在第 3、5 周末均高于 B 组,且差异比较具有统计学意义($P < 0.05$)。D 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)活性水平在第 3 周末分别为 (0.957 ± 0.054) 、 (0.208 ± 0.014) 、 (0.083 ± 0.006) 、 (0.075 ± 0.008) 均高

于 C 组的 (0.618 ± 0.045) 、 (0.159 ± 0.010) 、 (0.030 ± 0.007) 、 (0.023 ± 0.006) ;D 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)活性水平在第 5 周末分别为 (0.996 ± 0.057) 、 (0.224 ± 0.015) 、 (0.091 ± 0.006) 、 (0.083 ± 0.007) 均高于 C 组的 (0.609 ± 0.043) 、 (0.148 ± 0.012) 、 (0.024 ± 0.005) 、 (0.014 ± 0.004) ,且差异比较均具有统计学意义($P < 0.05$)。具体结果详见图 1。

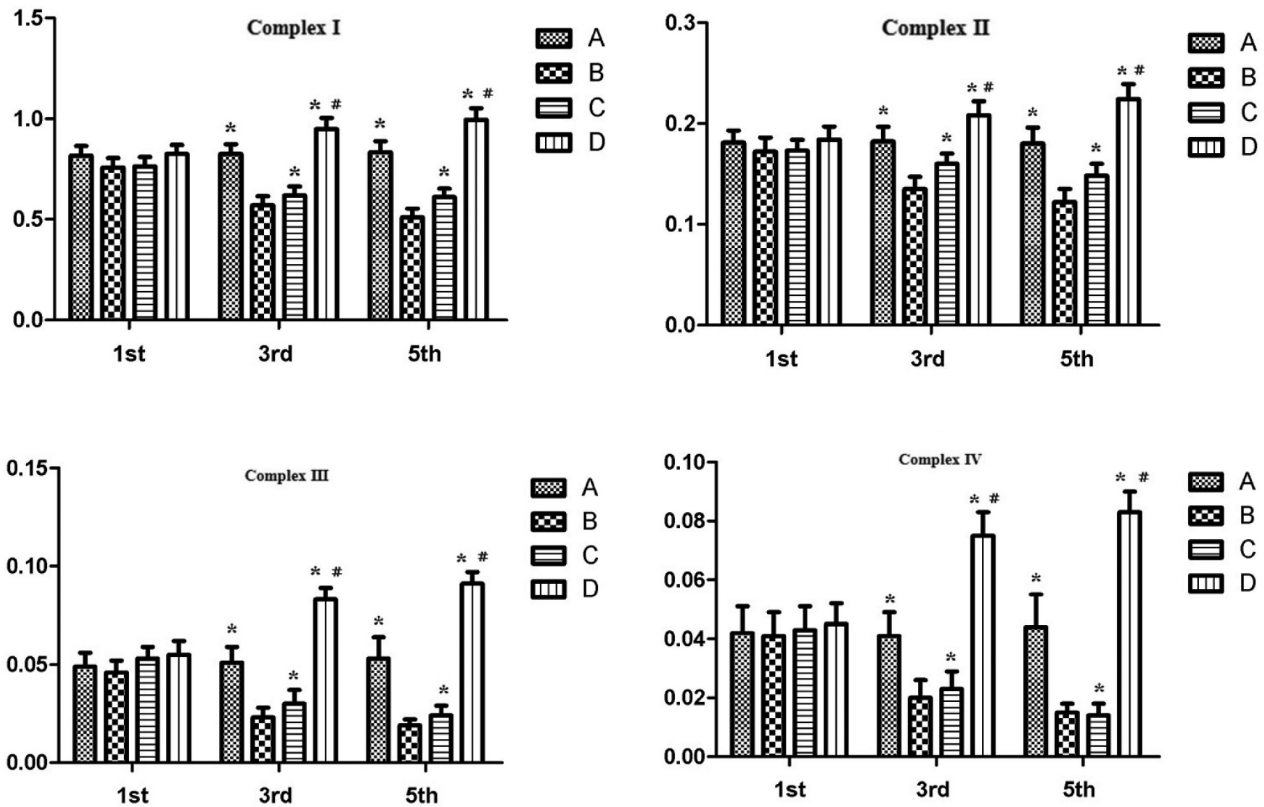


图 1 各组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)活性的比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$, 活性单位: $\text{Amol} \cdot \text{mgpro}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

注: * $P < 0.05$ 和 B 组相比较; # $P < 0.05$ 和 C 组相比较。

Fig. 1 The comparison of the hepatic mitochondrial respiratory chain enzyme complex(I-IV) activity of the rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=6$, Activity units: $\text{Amol} \cdot \text{mgpro}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

Note: * $P < 0.05$ compared with group B; # $P < 0.05$ compared with group C.

3 讨论

线粒体是机体细胞有氧代谢的重要场所^[12],其氧化磷酸化是机体内重要的能量来源,由线粒体内膜的呼吸链完成。而线粒体内膜呼吸链是由 4 个酶复合体(I-IV)组成的一个酶系,在机体的能量代谢方面起着重要的作用,4 个酶复合体活性的改变可以直接或者间接地反映机体线粒体呼吸功能的变化^[13-16]。而线粒体呼吸能力的下降是机体运动性肌肉疲劳产生的重要原因^[12]。线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)在以 Q 为辅酶的电子传递过程中有重要的作用,运动性疲劳可导致呼吸链功能下降,从而加速机体自由基的生成^[17],可导致机体衰老加快^[18],而长期规律的运动则会增强线粒体的功能^[19-21]。因此,通过了解运动性疲劳状态下,肝脏线粒体氧化呼吸链酶复合物(I-IV)活性的变化及脉冲电流经皮刺激肝区对其活性的影响,可进一步探讨运

动性疲劳的发生机制及脉冲电流经皮刺激肝区干预方式对肝脏能量代谢的影响。

我们前期研究表明,脉冲电流经皮刺激运动性疲劳大鼠肝区能够降低肝组织 Bax 的表达,提高肝脏 Bcl-2 的表达,维护肝组织的正常结构^[7]。采取频率为 1024 Hz 的脉冲电流刺激,电流强度为 10 mA,间动周期为 1 s,可以加速乳酸代谢,提高运动耐力,减轻运动性疲劳导致的肝损伤^[9]。本次实验结果表明: D 组和 B 组、C 组大鼠游泳力竭时间差异比较具有统计学意义($P < 0.05$),提示:实验干预措施能够提高其运动耐力及运动成绩。A 组、C 组及 D 组大鼠肝脏线粒体呼吸链酶复合物(I-IV)活性水平在第 3、5 周末均高于 B 组,且差异比较具有统计学意义($P < 0.05$),表明:实验干预措施能够提高其氧化呼吸链酶复合物(I-IV)的活性水平,提高线粒体氧化磷酸化水平,使 ATP 合成增加,增强机体的运动能力,从而缓解运动性疲劳。但要注

意的是,疲劳前刺激组的力竭时间及线粒体氧化呼吸链酶复合体(I-IV)活性的水平均较疲劳后刺激组的偏低,可能与疲劳前机体肝脏能量代谢正常、线粒体氧化呼吸链酶复合体(I-IV)活性较高有关。

综上所述,运动性疲劳可以降低肝脏线粒体呼吸链酶复合体(I-IV)的活性水平,脉冲电流经皮刺激运动性疲劳大鼠肝区可以提高其氧化呼吸链酶复合体(I-IV)的活性水平,提高运动耐力及运动成绩,加速机体运动性疲劳的消除。此外,运动性疲劳的发生及消除是一个非常复杂的过程,尽管目前的研究已经取得了较大的进展,但对于肝脏线粒体和运动性疲劳之间确切、全面的作用机制还需要进一步的探讨和研究。

参考文献(References)

- [1] 冯炜权, 谢敏豪. 运动生物化学研究进展[M]. 北京体育大学出版社, 2007
Feng Wei-quan, Xie Min-hao. Exercise Biochemistry Research [M]. Beijing Sport University Publishing House, 2007
- [2] 孙飞, 周强军, 孙吉. 线粒体呼吸链膜蛋白复合体的结构[J]. 生命科学, 2008, 20(4): 566-578
Sun Fei, Zhou Qiang-jun, Sun Ji. Structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2008, 20(4): 566-578
- [3] Papa S. Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the lifespan: Molecular aspects and physiological implications [J]. Biochimbiophys Acta, 1996, (1276): 87-105
- [4] 李洁, 王玉侠. 运动性疲劳状态下大鼠骨骼肌线粒体呼吸链还原酶活性的研究[J]. 中国科技体育, 2009, 43(2): 80-82
Li Jie, Wang Yu-xia. Rat skeletal muscle exercise-induced fatigue state reductase activity of mitochondrial respiratory chain [J]. China Sport Science and Technology, 2009, 43(2): 80-82
- [5] Marten W, Matti S. The mitochondrial respiratory chain [M]. In: Bioenergetics. Ernster B V: Elsevier Science Publishers, 1984: 49-56
- [6] Capaldi RA. Arrangement of proteins in the mitochondrial innermembrane[J]. Biochim Biophys Acta, 1982, 694(4): 291-306
- [7] 黄昌林, 朱履刚. 脉冲电流经皮刺激运动疲劳大鼠肝区对肝细胞 Bcl-2、Bax 表达及超微结构的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(6): 743-745
Huang Chang-lin, Zhu Lv-gang. Anti-fatigue effect of percutaneous stimulation with different frequency pulse current on hepatic region: an experimental study with rats [J]. Med J Chin PLA, 2009, 34(6): 743-745
- [8] 代朋乙, 黄昌林. 不同间动周期中频脉冲电流经皮刺激肝区对运动性疲劳士兵的抗疲劳作用观察 [J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(1): 66-69
Dai Peng-yi, Huang Chang-lin. Impact of mid-frequency pulse current in different dia dynamic cycles to hepatic region on restorability of exercise-induced fatigue in soldiers[J]. Med J Chin PLA, 2012, 37(1): 66-69
- [9] 朱履刚, 黄昌林. 不同频率脉冲电流经皮刺激大鼠肝区增强抗疲劳能力的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(6): 740-742
Zhu Lv-gang, Huang Chang-lin. Anti-fatigue effect of percutaneous stimulation with different frequency pulse current on hepatic region: an experimental study with rats [J]. Med J Chin PLA, 2009, 34(6): 740-742
- [10] Galina V yatlina, Vandanajay Bhatia, Arpad Gerstner, et al. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development[J]. Biochimicaet Biophysica Acta, 2004, 52 (1689): 162-173
- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quabition of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 21(72): 248-254
- [12] 季宇彬, 李睿, 汲晨锋. 运动性疲劳与线粒体功能 [J]. 亚太传统医药, 2008, 4(9): 8-12
Ji Yu-bin, Li Rui, Ji Chen-feng. Sports fatigue and mitochondrial function[J]. Asia, Pacific Traditional Medicine, 2008, 4(9): 8-12
- [13] 郭彦青, 张敏, 赵晓丽. 不同运动方式和时间对大鼠骨骼肌线粒体呼吸链复合体酶 I 和 IV 活性的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2): 317-320
Guo Yan-qing, Zhang Min, Zhao Xiao-li. Effects of different movement pattern and time on skeletal muscle mitochondrial respiratory chain complexes I and IV enzyme activity in rats [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2011, 15 (2): 317-320
- [14] Hirst J. Towards the molecular mechanism of respiratory complexI [J]. Biochem J, 2012, 425(2): 327-339
- [15] Hosler JP, FERGUSON-mills DA. Energy transduction: protontrans-fer through the respiratory complexes[J]. Annu Rev Biochem, 2010, 13(75): 165-187
- [16] Rnstin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies [J]. Clin Chim Acta, 2014, (228): 35-51
- [17] Borisov VB. Mutations in respiratory chain complexes and human disease[J]. Ital J Biochem, 2014, 53(1): 333-341
- [18] Drew B, Leeuwenburgh C. Ageing and subcellular distribution of mitochondria role of mitochondrial DNA deltions and energy production[J]. Acta Physiol Scand, 2014, 182(4): 333-341
- [19] Bo H, Zhang Y, Ji LL. Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, (1201): 121-128
- [20] Hood DA. Mechanisme of exercise-induced mitochondria biogenesis in skeletal muscle[J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2009, 34(3): 465-472
- [21] Castle JD. Purification of organelles from mammalian cells [J]. Currprotoc Protein Sci, 27(5): 152-155