

静态负荷对大鼠离体骨骼肌能量代谢的影响

徐雷¹, 杨磊², 杜柳涛¹, 陈晓丹³, 刘藏², 吴大伟¹

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080; 2. 华中科技大学同济医学院职业医学研究所, 湖北 武汉 430030; 3. 广州市职业病防治院, 广东 广州 510620)

摘要: 目的 探讨线粒体钙浓度 (MCC) 和能量代谢变化之间的相互关系以及细胞内钙浓度升高的来源。方法 建立不同 Ca^{2+} 浓度 (3 mmol/L、1.5 mmol/L) 及不同培养时间 (2 h、4 h) 条件下大鼠离体骨骼肌被动牵拉培养的模型, 测定线粒体钙浓度 (MCC)、ATP 酶活性和乳酸 (LA) 含量。结果 MCC 在各实验中实验组与对照组相比均有显著性增加 ($P < 0.05$); LA 含量在 3 mmol/L Ca^{2+} 培养液中培养 2 h 条件下有显著增加 ($P < 0.05$), 在其他实验中均无显著性变化。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 亦无显著性变化。结论 MCC 在牵拉负荷条件下有显著增加; 胞内钙平衡紊乱可能发生在能量代谢障碍之前, 并成为肌肉损伤的初始因素。

关键词: 静态负荷; 骨骼肌; 线粒体钙; 能量代谢

中图分类号: R131; Q591.8 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)01-0014-03

Effect of static load on energy metabolism of rat's isolated skeletal muscles

XU Lei¹, YANG Lei², DU Liu-tao¹, CHEN Xiao-dan³, LIU Cang², WU Da-wei¹

(1. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Institute of Occupational Medicine, Tongji Medical College, Huazhong Science & Technology University, Wuhan 430030, China; 3. Guangzhou Municipal Center for Prevention & Treatment of Occupational Diseases, Guangzhou 510620, China)

Abstract: **Objective** The purpose of the study is to explore the correlation between mitochondrial calcium concentration (MCC) and cellular energy metabolism. **Method** 40 rats were divided into 5 groups according to the calcium concentrations and the incubation times, the isolated soleuses in vitro incubated in 3 mmol/L Ca^{2+} buffer for 2 hours (group I) and 4 hours (group II), in 1.5 mmol/L Ca^{2+} buffer for 2 hours (group III), and 4 hours (group IV); the soleuses incubated in Ca^{2+} -free buffer for 2 hours were the controls. all muscles were under stretch conditions. After incubation, measure the levels of mitochondrial calcium (MCC), lactic acid (LA) and the activities of ATPase in the muscles. **Result** The results showed that the MCC level was elevated significantly in all experimental groups ($P < 0.05$ compared with control group), LA level only showed some increase in group I ($P < 0.05$), while $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ activities had no any significant change in all experimental groups. **Conclusion** Stretch load could elevate the MCC of skeletal muscles and the failure of intracellular calcium homeostasis might occur before the malfunction of energy metabolism, that should be the initiating factor of muscle injury according to this study.

Key words: Static load; Skeletal muscles; Mitochondrial calcium concentration (MCC); Energy metabolism

静态作业在流水线和坐位工作等生产方式中占有很高的比重。因此, 静态负荷引起骨骼肌疲劳和损伤成为一个有现实意义的研究课题。研究表明, 骨骼肌损伤可能是由于胞浆钙浓度升高和异常 Ca^{2+} 内流所致^[1,2]。本文通过建立大鼠离体骨骼肌被动牵拉培养模型, 测定线粒体钙浓度 (the concentration of mitochondrial calcium, MCC)、ATP 酶活性 (ATPase) 和乳酸 (lactic acid, LA) 含量, 探讨 MCC 和能量代谢变化间的相互关系, 以便进一步了解骨骼肌损伤的机制, 为防治此类损伤提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 由同济医科大学实验动物中心提供, 体重 150 ~ 200 g。自由饮食, 室温 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。实验前均无剧烈运动史。

1.2 实验方法

1.2.1 实验 1 将 10 只动物处死, 分离比目鱼肌。实验组将每只大鼠的 1 条比目鱼肌以最大牵拉长度固定, 以此造成牵拉负荷; 对照组将另一条比目鱼肌以自然长度固定, 无牵拉负荷。然后置于任氏培养液 (Ringer's solution, 其成分为 CaCl_2 3 mmol/L、 NaCl 137 mmol/L、 KCl 5 mmol/L、 MgCl_2 1 mmol/L、 NaH_2PO_4 1 mmol/L、 NaHCO_3 1 g/L、Glucose 2 g/L), 在恒温 CO_2 培养箱中, CO_2/O_2 为 5/95, 37°C 培养 2 h。取出测定肌肉匀浆 ATP 酶 (ATPase) 活性、线粒体钙浓度 (MCC) 及乳酸 (LA) 含量。

1.2.2 实验 2 培养液 Ca^{2+} 浓度为 3 mmol/L, 培养时间

收稿日期: 2004-05-24; 修回日期: 2004-07-02

作者简介: 徐雷 (1972-), 男, 硕士, 讲师, 从事劳动卫生与卫生毒理学教学和科研工作。

为 4 h, 其余同 1.2.1。

1.2.3 实验 3 培养液 Ca^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L, 培养时间为 2 h, 其余同 1.2.1。

1.2.4 实验 4 将 10 只动物的 10 对肌肉, 分别置于 3 mmol/L Ca^{2+} 培养液和无 Ca^{2+} 培养液中均牵拉培养 2 h, 其余同 1.2.1。

1.3 测定指标

1.3.1 匀浆制备 取出肌肉, 小心去除两端肌腱 将其剪成数块, 加入 10% 的介质 (蔗糖 0.25 mol/L、Tris-HCl 0.005 mol/L、EDTA 0.000 1 mol/L) 匀浆。考马斯亮蓝法测定匀浆蛋白含量。

1.3.2 线粒体钙浓度 (MCC) 测定 取肌肉匀浆用差速离心方法在低温高速离心机 (RS-20 II 型) 分离线粒体。考马斯亮蓝法测定线粒体蛋白含量, 采用原子吸收分光光度计 (SpectrAA-40 型) 测定钙离子浓度。线粒体钙浓度以 nmol/mg prot 表示。

表 1 比目鱼肌在 3 mmol/L Ca^{2+} 培养液中培养 2 h、4 h 后 MCC、LA 及 ATPase 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	2 h				4 h			
	MCC	LA	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$	$\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$	MCC	LA	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$	$\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$
实验组	55.08 $\pm$ 5.23 *	0.76 $\pm$ 0.50 *	1.30 $\pm$ 0.29	1.12 $\pm$ 0.47	35.70 $\pm$ 7.50 *	0.90 $\pm$ 0.40	1.35 $\pm$ 0.35	1.27 $\pm$ 0.25
对照组	30.28 $\pm$ 3.03	0.57 $\pm$ 0.51	1.21 $\pm$ 0.35	1.16 $\pm$ 0.55	25.77 $\pm$ 7.35	0.93 $\pm$ 0.53	1.25 $\pm$ 0.34	1.25 $\pm$ 0.17

与对照组比 * $P<0.05$ 下表同。

2.2 1.5 mmol/L Ca^{2+} 培养液中培养 2 h 后, 实验组 MCC 与对照组相比增加了 71.4%, 差异有显著性 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 比目鱼肌在 1.5 mmol/L Ca^{2+} 培养液中培养 2 h 后 MCC、LA 及 ATPase 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	MCC	LA	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$	$\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$
实验组	45.12 $\pm$ 7.46 *	0.79 $\pm$ 0.25	1.36 $\pm$ 0.24	1.27 $\pm$ 0.38
对照组	26.32 $\pm$ 8.52	0.63 $\pm$ 0.13	1.23 $\pm$ 0.18	1.23 $\pm$ 0.13

2.3 3 mmol/L Ca^{2+} 培养液 (S_3 组) 牵拉培养和无 Ca^{2+} 培养液 (S_0 组) 牵拉培养相比, MCC 增加了 84.4%, 差异有显著性 ($P<0.05$), 见表 3。

表 3 比目鱼肌在 Ca^{2+} 和无 Ca^{2+} 培养液中牵拉负荷 2 h 后 MCC、LA 及 ATPase 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	MCC	LA	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$	$\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$
S_3 组	54.46 $\pm$ 8.41 *	0.50 $\pm$ 0.21	1.57 $\pm$ 0.74	1.34 $\pm$ 0.73
S_0 组	29.54 $\pm$ 5.72	0.48 $\pm$ 0.23	1.85 $\pm$ 0.60	1.63 $\pm$ 0.64

3 讨论

目前许多学者认为, 肌细胞内 Ca^{2+} 浓度增高是肌纤维损伤的关键机制, 它可通过激发一系列过程, 导致细胞自身稳定的衰退, 引起肌肉损伤。本研究结果显示, 离体骨骼肌牵拉负荷引起骨骼肌线粒体钙浓度 (MCC) 显著增高。Armstrong 将离体比目鱼肌培养牵拉 2 h 后,

1.3.3 肌肉匀浆 ATP 酶活力测定 采用南京建成生物工程研究所的 ATP 酶测试盒。ATP 酶活力单位以 $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg prot} \cdot \text{h})$ 表示。

1.3.4 乳酸含量测定 采用南京建成生物工程研究所的乳酸测试盒, 以 nmol/mg prot 表示。

1.4 统计方法

计算指标的均值、标准差, 并进行配对资料 t 检验。

2 结果

2.1 3 mmol/L Ca^{2+} 培养液中 2 h 培养后, 实验组与对照组相比 MCC 增加了 81.9%, LA 增加了 33.3%, 差异均有显著性 ($P<0.05$); 而 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 及 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 在两组间差异均无显著性 ($P>0.05$)。3 mmol/L Ca^{2+} 培养液中 4 h 牵拉负荷培养后, 实验组 MCC 与对照组相比增加了 38.5%, 差异有显著性 ($P<0.05$), 而 LA、 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 差异均无显著性 ($P>0.05$), 见表 1。

MCC 增加 56%^[1]。活体实验也证实, 运动后大鼠比目鱼肌 MCC 较运动前有明显增加^[2,3]。线粒体 Ca^{2+} 浓度正常情况下保持稳定, 只有在胞浆 Ca^{2+} 浓度异常增加时线粒体才大量摄取 Ca^{2+} , MCC 可作为肌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度的指标^[3]。因此, 牵拉负荷能导致肌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度显著增加。在我们以前的研究中, 对肌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度增高的可能机制进行了探讨, 认为胞外 Ca^{2+} 是胞内 Ca^{2+} 浓度增高的主要来源^[4]。

$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 是存在于生物膜上的一种蛋白质, 其活力的大小是细胞能量代谢及功能有无损伤的重要指标。二者均参与调节细胞内 Ca^{2+} 平衡, 当胞浆内 Ca^{2+} 浓度升高时, $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 酶通过 $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交换来调节, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 酶则直接将 Ca^{2+} 泵出细胞或转移至亚细胞器, 如线粒体、肌浆网等。在本研究中, $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 酶均未发生显著性变化。但田野等的实验证实, 令大鼠下坡跑运动至力竭, 发现运动后即刻比目鱼肌 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 酶活性显著下降; 运动后 24 h, 酶活性已基本恢复, 而线粒体钙含量却保持在峰值水平。研究认为力竭运动使能量代谢发生障碍, $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 酶活性显著下降, 但 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 酶活性恢复快, 而线粒体钙释放是一缓慢过程, 即使酶活性恢复, 通过 $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ 交换增加 Ca^{2+} 外 (下转至第 18 页)

低剂量脉冲超声波刺激达到一定时间 (60 min) 后, 可以引起皮肤成纤维细胞和肿瘤细胞的凋亡, 其凋亡数量和程度与超声波的刺激时间有关, 刺激时间越长, 凋亡细胞数越多, 其凋亡程度也越严重。见表 2。

表 2 低剂量脉冲超声波不同刺激时间组
成纤维细胞、肿瘤细胞凋亡情况

US 刺激 时间 (min)	平行 孔	细胞总数 (个)	成纤维细胞		肿瘤细胞	
			凋亡细胞 总数(个)	凋亡细胞百 分率($\bar{x} \pm s$)	凋亡细胞 总数(个)	凋亡细胞百 分率($\bar{x} \pm s$)
0	3	1 000×3	26	8.7±5.69	19	6.3±4.93
45	3	1 000×3	33	11.0±2.65	21	7.0±2.65
60	3	1 000×3	51*	17.0±4.58*	54*	18.0±2.65*
80	3	1 000×3	197*	82.3±5.86*	132*	44.0±8.00*
100	3	1 000×3	322*	107.3±8.14*	276*	92.0±6.24*

注: 凋亡细胞百分率为三平行孔的凋亡细胞均值所占总细胞数的百分率。

3 讨论

低剂量脉冲超声波是一种使用频率为 1~3 MHz、剂量为 30 mW/cm² 左右的超声波。尽管这种波传递给组织的能量不大, 但研究提示, 其有利的非致热性细胞生物学效应却不可忽视^[3]。Xavier 和 Duarte 等最早于 1983 年研究了低剂量脉冲超声波在骨不连合中的临床治疗作用, 报道治愈率可达 68%。1994 年 Heckman 等^[4]采用双盲试验法, 对 67 位闭合式或一级开放性胫骨体骨折的病人应用低剂量脉冲超声波 (1.5 MHz, 30 mW/cm²) 治疗。结果表明, 与对照组比较, 骨折的临床恢复时间显著性缩减。上述研究结果说明, 一旦低剂量脉冲超声波的生物学效应得以确证, 将为临床创口的加速愈合及难愈性骨不连合等诸多疾病的治疗带来极大的帮助。

本文研究结果显示, 低剂量脉冲超声波刺激在一定时间内能促进细胞增殖, 细胞增殖随刺激时间延长而增

加, 在刺激 15 min 时细胞增殖达到高峰; 而刺激时间超过 60 min 后, 细胞生长反而受到抑制, 甚至出现了细胞凋亡率的增多, 刺激时间越长, 凋亡细胞数越多, 凋亡程度也越严重。这种发现可以给临床治疗肿瘤提供一定的参考。

本研究测定细胞增殖所采用的 MTT 法的原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶作用于 MTT, 使之变成深紫色产物。该方法不需要染色、洗板、固定、干燥、裂解细胞等, 操作步骤简便, 操作时间短, 方法易掌握, 检测试剂费用低^[4]。而应用 Annexin V 法测细胞凋亡的机制则是检测凋亡细胞的“膜外化”, 此“膜外化”是细胞膜上的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由胞膜内侧转移到胞膜外侧引起, 是细胞凋亡的早期表现。Annexin V 法是目前检测细胞凋亡的最敏感可靠的方法^[5]。本实验所用的低剂量脉冲超声波发生仪所发射的是固定频率和剂量的超声波, 但对于我国外科将来应用低剂量脉冲超声波治疗骨折及难愈性骨不连合等诸多疾病时, 建议应同时考虑剂量和刺激时间等因素。

参考文献:

- [1] Ryaby JT, Bachner EJ. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures [J]. Trans Orthop Res Soc, 1989, 14: 15.
- [2] Hedman J D, Ryaby J P, McCabe J, et al. Acceleration of tibial fracture healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound [J]. J Bone joint Surg Am, 1994, 76 (1): 26-34.
- [3] 孔璐, 赵进顺. 低剂量脉冲式超声波的生物学效应研究概况 [J]. 中国公共卫生, 2002, 18 (12): 1515-1516.
- [4] 陈杰, 曹雅明, 刘军, 等. 细胞毒性试验测定麻痹性贝毒素的检测方法 [J]. 中国公共卫生, 2001, 17 (11): 994-995.
- [5] 彭黎明, 江虹, Chris Bradley. 细胞凋亡和继发性坏死的 Annexin 法定量检测 [J]. 华西医科大学学报, 2001, 32 (4): 602-604.

(上接第 15 页) 流时, 线粒体钙含量也不能立即恢复^[5]。

本研究在离体骨骼肌培养条件下, 在 3 mmol/L Ca²⁺ 培养液培养 2 h 乳酸含量牵拉组较对照组有显著增加, 说明线粒体供能有所减少, 糖酵解增加以迅速提供能量; 而在其他实验中未见乳酸有显著变化。Armstrong 在相似条件下离体培养比目鱼肌 2 h, 发现 ATP、肌酐及乳酸含量均未发生显著变化, 认为肌细胞内 Ca²⁺ 浓度增加不是由于能量代谢障碍所致^[1]。我们认为能量代谢障碍可能发生在钙平衡紊乱之后。在本实验条件下, 细胞能量供应可能尚能满足需要, 线粒体聚钙尚未到引起能量代谢障碍的程度, 因此 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性未发生明显变化, 提示钙泵功能正常, 胞浆 Ca²⁺

泵出障碍在胞内钙平衡紊乱发生过程中 (至少在早期) 不起主要作用。

参考文献:

- [1] Armstrong RB, Duan G, Delp MD, et al. Elevations in rat soleus muscle [Ca²⁺] with passive stretch [J]. J Appl Physiol, 1993, 74: 2990-2996.
- [2] Duan G, Delp MD, Hayes DA, et al. Rat skeletal muscle mitochondrial [Ca²⁺] and injury from downhill walking [J]. J Appl Physiol, 1990, 68: 1241-1251.
- [3] 田野, 王义润, 杨锡让, 等. 运动性骨骼肌结构、机能变化的机制研究——II 力竭运动对线粒体钙代谢水平的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 1993, 12: 31-33.
- [4] 徐雷, 杨磊. 静态负荷对大鼠离体骨骼肌生化指标的影响 [J]. 中国职业医学, 2001, 28 (3): 8-10.
- [5] 田野, 何其华, 罗爱民, 等. 运动性骨骼肌疲劳亚细胞机制探讨 [J]. 中国应用生理学杂志, 1994, 10: 238-240.