

补充抗氧化剂对老年运动小鼠骨骼肌抗氧化水平的影响

卢 健, 陈彩珍, 许永刚, 赖荣兴

(广州体育学院 科研所, 广东 广州 510075)

摘 要: 为了解抗氧化剂(维生素 E、维生素 C 和硒)对老年运动小鼠抗氧化能力的影响, 给老年运动小鼠补充抗氧化剂(每 5 mL 饮用水中含 VitE 0.25 IU, VitC 0.5 mg、亚硒酸钠 0.005 mg)5 个月, 测定小鼠骨骼肌线粒体及胞浆抗氧化酶活性。结果表明, 补充抗氧化剂后运动小鼠骨骼肌 CuZnSOD 及 MnSOD 活性下降, 胞浆 GSH-px 活性明显升高, 而线粒体 GSH-px 及胞浆 Cat 活性无显著性变化, 补充抗氧化剂的小鼠骨骼肌线粒体脂褐素含量明显降低。抗氧化剂可适度减轻运动鼠的氧化应激水平。

关 键 词: 抗氧化剂; 运动小鼠; 抗氧化酶; 骨骼肌

中图分类号: G804.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7116(2003)04-0058-03

Effect of antioxidant on lipid peroxidation in skeletal muscle of exercise training aged mice

LU Jian, CHEN Cai-zhen, XU Yong-gang, LAI Rong-xing

(Scientific Search Section, Guangzhou Institute of Physical Education, Guangzhou 510075, China)

Abstract: To investigate the effect of antioxidant (Vitamin E, Vitamin C and Selenium) on the antioxidant ability of exercise training aged mice, the present experiment detected antioxidant enzymes activities in mitochondria and cytol of skeletal muscle after antioxidant supplementation for 5 months. The results showed that compared with control group, CuZnSOD and MnSOD activities in mitochondria decreased, GSH-px in cytol increased, while GSH-px in mitochondria and Catalase in cytol were no significant changes, and the level of Lipofuscin in mitochondria decreased significantly. The results suggested that the oxidant and antioxidant system were in a status of a dynamic equilibrium after antioxidant supplementation.

Key words: antioxidant; exercise mice; antioxidant enzyme; skeletal muscle

有研究提出衰老过程源于自由基对细胞及组织的损害, 不同年龄机体抗氧化剂水平随年龄增加而下降^[1], 老年人血液中硒及硫醇水平降低, 血浆、血小板、白细胞的维生素 C 水平显著低下, 这些抗氧化剂水平的下降反映了老年机体对自由基的抵御能力下降。如果健康和寿命显著受氧化应激影响的话, 那么内源性酶性和外源性非酶性抗氧化剂应能影响健康和寿命。如果内源性酶性抗氧化剂不能有效清除 O₂⁻ 和氧自由基, 那么外源性非酶性抗氧化剂的补充可能提供第 2 条防御线。本研究试图观察几种抗氧化剂(维生素 E、维生素 C 和硒)对老年运动小鼠在增加抗氧化能力和减少氧化应激方面的协同作用。

1 材料和方法

(1) 实验动物运动模型的建立: 本研究选择近交系 C57BL/6J 雄性小鼠为实验对象, 2 月龄小鼠购自第一军医大学实验动物中心, 所有动物均在相同环境下饲养。小鼠 5 月龄后开始运动训练, 训练的方式为跑转笼, 将小鼠放进直径

为 17 cm 的带轴承转笼, 让其主动跑笼, 第 1 d 跑 10 min, 以后每天增加 10 min, 直至每天 1 h, 每周运动 5 d。本研究设组别为运动训练组(20 月龄, 训练 15 个月), 安静组(20 月龄, 未经运动训练), 运动加药组(20 月龄, 训练 15 个月, 同时补充 VitE、VitC 和硒, 补充量为每 5 mL 饮用水中含 VitE 0.25 IU, VitC 0.5 mg, Se 0.005 mg), 加药组、青年组(5 月龄, 未经训练)。每组各 10 只小鼠。

(2) 主要试剂和仪器: GSH、DTNB、TEP、TBA 购自 Sigma 公司, 其余试剂均为国产分析纯。主要仪器有: 731 型紫外分光光度计及 970 荧光分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

(3) 实验方法: 1) 线粒体的制备。将小鼠断头放血, 迅速剥取腓肠肌并称重, 按 1:10 的比例(即 1 g 腓肠肌放入 10 mL 缓冲液中)将肌肉放入预冷的缓冲液中剪碎, 电动玻璃匀浆器中匀浆, 然后将匀浆液离心(3 000 r/min, 10 min), 去沉淀, 上清液再次离心(10 000 r/min, 10 min), 得沉淀, 用缓冲液将所得沉淀洗两次, 加入一定量缓冲液制备成线粒体悬液。2) SOD 活性的测定。改良的连苯三酚自氧化法^[2]; 谷胱甘肽过

收稿日期: 2002-12-05

基金项目: 国家体育总局局管课题(编号: 97060), 广东省高等学校基础研究课题(编号: 9746)。

作者简介: 卢 健(1962-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 运动生物化学。

氧化物酶(GSH-px)和过氧化氢酶 CAT 活性的测定:参照文献[3]的方法;脂褐素测定:氯仿甲醇抽提后测其荧光强度(激发波长 360 nm,发射波长 455 nm);蛋白质含量的测定:考马斯亮兰法。

(4)统计处理:所有实验数据用 Excel 97 软件处理,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,t 检验。

2 实验结果

由表 1 可见,老龄运动小鼠骨骼肌的线粒体 MnSOD 活性下降,而 CuZnSOD 活性却显著高于青年鼠;补充抗氧化剂可使骨骼肌 MnSOD 和 CuZnSOD 活性显著下降。

表 1 补充抗氧化剂对小鼠骨骼肌

MnSOD、CuZnSOD 活性的影响¹⁾ $\bar{x} \pm s, U/mg$

组别	MnSOD	CuZnSOD
青年组①	8.792 2 \pm 2.639 7	19.530 6 \pm 4.227 8
运动训练组②	3.661 0 \pm 1.114 2	25.825 3 \pm 3.879 6
老年不运动组③	4.990 1 \pm 1.279 3	20.332 2 \pm 3.587 9
运动+药组④	2.472 0 \pm 0.941 7	20.739 6 \pm 3.587 1
老年不运动+药组⑤	2.226 9 \pm 1.002 9	19.502 6 \pm 3.404 4

1)经 t 检验, MnSOD:①与②、①与④、①与⑤比较;③与⑤比较 $P < 0.05$; CuZnSOD:①与②比较、②与③比较、②与④比较 $P < 0.05$

由表 2 可见,各老龄组小鼠线粒体 GSH-px 活性与青年鼠比较无显著性差异,而胞浆 GSH-px 活性随年龄增高而升高,运动训练对 GSH-px 活性均无显著影响,补充抗氧化剂可明显升高胞浆 GSH-px 活性。

表 2 补充抗氧化剂对小鼠骨骼肌线粒体及胞浆 GSH-px 活性的影响¹⁾ $\bar{x} \pm s, U/mg$

组别	线粒体 GSH-px	胞浆 GSH-px
青年组①	2.238 5 \pm 0.881 6	1.123 5 \pm 0.223 9
运动训练组②	2.403 6 \pm 0.745 8	3.584 7 \pm 0.879 3
老年不运动组③	2.045 0 \pm 0.901 4	3.868 2 \pm 0.898 1
运动+药组④	2.366 0 \pm 0.763 9	6.763 4 \pm 1.975 2
老年不运动+药组⑤	2.631 2 \pm 0.658 2	5.330 5 \pm 1.058 7

1)经 t 检验,线粒体 GSH-Px:③与⑤比较;胞浆 GSH-Px:①与②、①与③、①与④、①与⑤、②与④比较 $P < 0.05$ 。

由表 3 可见,老龄小鼠骨骼肌线粒体脂褐素含量明显高于年青鼠。运动训练对线粒体脂褐素含量影响不大。不管是运动训练鼠还是不运动鼠,补充抗氧化剂均使骨骼肌线粒体脂褐素含量明显下降,差别具有显著意义。

表 3 补充抗氧化剂对小鼠骨骼肌胞浆 CAT 活性、线粒体及胞浆脂褐素含量的影响¹⁾ $\bar{x} \pm s$

组别	$10^3 \times$ 胞浆 CAT(活性/ $U \cdot mg^{-1}$)	线粒体脂褐素/(光强度 $\cdot mg^{-1}$)	胞浆脂褐素/(光强度 $\cdot mg^{-1}$)
青年组①	5.061 7 \pm 2.032 1	0.428 3 \pm 0.040 1	0.157 1 \pm 0.033 1
运动训练组②	4.851 8 \pm 0.916 7	1.626 1 \pm 0.033 9	0.182 9 \pm 0.032 6
老年不运动组③	4.786 6 \pm 1.102 5	1.867 0 \pm 0.110 5	0.199 0 \pm 0.045 0
运动+药组④	4.591 3 \pm 1.101 3	1.204 8 \pm 0.445 2	0.218 7 \pm 0.033 9
老年不运动+药组⑤	4.439 6 \pm 1.166 7	0.714 2 \pm 0.082 8	0.203 4 \pm 0.055 8

1)经 t 检验,线粒体脂褐素①与②、①与③、①与④及③与⑤比较均 $P < 0.05$ 。

3 讨论

氧自由基与衰老过程有密切的关系^[4]。线粒体是细胞氧化磷酸化的场所,其耗氧量占细胞耗氧量的 90%,其中绝大部分在线粒体呼吸链中被转化为 H_2O ,但即使在正常的生理条件下,也有 2%的氧通过分步的单电子还原形成了各种活性氧,如 $O_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 、 OH^{\cdot} 等,这些活性氧化学活性极高,能导致细胞的广泛损伤,如脂质过氧化、酶活性的抑制、细胞内氧化-还原状态的改变、DNA 损伤等^[5,6]。因此,衰老被认为是细胞氧化性损伤累积相关的不可逆变化的一个长期过程。衰老的自由基理论认为寿命是由机体抵抗自由基损伤的能力所决定的^[4-6]。衰老动物的各组织中抗氧化酶活性较低,提示老龄动物组织细胞中可能没有足够的抗氧化剂以防御氧化应激。为此,笔者在研究长期运动训练对小鼠衰老过程中骨骼肌的抗氧化状态影响的同时,在小鼠 16 月龄时给其饮水中加入 VitE、VitC 和亚硒酸钠,持续到 20 月龄,观察补充抗氧化剂的效果。

本实验发现骨骼肌线粒体 GSH-px 未随月龄发生明显变化, MnSOD 活性却下降,骨骼肌线粒体脂褐素随增龄显著积累,而细胞质内脂褐素含量只有增多的趋势。这说明衰老时线粒体内抗氧化水平的全面下降。Ji^[7]研究认为 MnSOD 是唯一可被诱导的 SOD 形式。MnSOD 基因的表达既可因细胞受到辐射、氧化或还原试剂、细胞因子、病毒感染等因素的刺激而显著提高,也可随细胞的癌变而大幅降低。但当细胞由于氧化应激受损严重,线粒体 ATP 合成能力下降时,线粒体分裂受抑,线粒体数目减少,蛋白质的合成和细胞功能下降,此时, MnSOD 的诱导也就很有限了。因此,可以推测,老龄小鼠骨骼肌线粒体内自由基产生已大大超过对它的清除能力,致线粒体产能受挫,蛋白合成受阻,表现为抗氧化酶活性的全面下降。

长期运动除了骨骼肌 CuZnSOD 活性有所升高外,对衰老机体的其它抗氧化酶水平影响不明显。有关运动训练对骨骼肌抗氧化酶影响的报导很多,但结论很不一致。对这些

不一致的结果目前尚无法解释。可能与研究对象的种类、年龄、训练时间长短、运动强度、不同类型的肌纤维以及测试的方法都有关系^[7]。Oh-ishi等人^[10]研究耐力运动训练后的比目鱼肌 MnSOD 和 CuZnSOD 活性、酶蛋白含量以及它们的 mRNA 含量时发现,在安静状态下,CuZnSOD 活性明显增加,但酶蛋白含量和 mRNA 没有变化,而 MnSOD 活性和酶蛋白含量有显著性增加,mRNA 也没有明显改变,这些结果提示,耐力训练引起的 MnSOD 和 CuZnSOD 活性和含量的变化表现在转录后的调控水平上不一致。Hollander 等人^[11]研究发现,10 周的耐力训练 MnSOD 活性和酶蛋白含量都明显增加,CuZnSOD 活性和酶蛋白含量都没有增加,安静状态下,它们的 mRNA 都没有显著性变化。在大强度的运动过程中,机体耗氧量增加,自由基的生成量增多这一现象已被许多实验所证实^[8],毫无疑问,运动训练将引起细胞内抗氧化酶水平产生急性的或慢性的适应性变化。一些研究发现运动后骨骼肌和红细胞中抗氧化酶活性升高^[9],这种抗氧化酶活性的升高是否是由于运动中酶被激活,还是酶蛋白合成更新率增加,目前还不十分清楚。此外一些研究还发现,一些抗氧化酶能对运动训练产生适应性变化^[9,13]。骨骼肌抗氧化酶对运动训练的适应性反应是运动训练产生的功能性变化之一。

补充 VitE、VitC 和 Se 可明显升高老年鼠骨骼肌胞浆 GSH-px 活性及降低 SOD 活性。脂溶性的 VitE、水溶性的 VitC 以及微量元素硒是重要的外源性非酶性的抗氧化剂,脂溶性的 VitE 和水溶性的 VitC 的搭配将有助于保护生物膜的结构和功能的正常^[12]。硒的生物化学功能在于它和硒酶 GSH-px 的活性部位有关。而且有证据表明,微量元素硒可以在分子水平上影响基因表达。当大鼠体内硒缺乏时,GSH-px 的基因表达则出现缺失或障碍,致使 GSH-px 的活性下降。Tessier 等报导,在训练的同时补充硒,可使骨骼肌 GSH-px 活性升高^[13]。Ji 等发现硒的缺乏致肝和骨骼肌中 GSH-px 耗竭,但对 SOD 或 CAT 活性几无影响^[9]。本研究发现补充硒明显提高了骨骼肌胞浆 GSH-px 活性也再一次证实了酶与其辅因子的关系,而且发现可能是由于抗氧化酶之间的协同或调剂作用,补硒鼠 SOD 活性下降。补充抗氧化剂最明显的效果是使骨骼肌线粒体脂褐素含量显著下降,这表明老年小鼠补充适量抗氧化剂有利于提高抗氧化能力,延缓氧自由基随增龄而增多从而引发的各种老年退行性变的发生。

参考文献:

- [1] Ji L L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 1993, 25: 225 - 231.
- [2] 邓碧玉. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18: 163 - 164.
- [3] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [4] Harman D. Free radical theory of aging[J]. *Muta Res*, 1992, 275: 257 - 266.
- [5] 童坦君, 张宗玉. 医学老年学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- [6] Sen C K. Oxidants and antioxidants in exercise[J]. *J Appl Physiol*, 1995, 79: 675 - 686.
- [7] Ji L L. Antioxidants and oxidative stress in exercise[J]. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 1999, 222: 283 - 292.
- [8] Jenkin R R. Free radical chemistry: relationship to exercise[J]. *Sport Med*, 1988, 5: 156 - 170.
- [9] Ji L L. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver[J]. *Am J Physiol*, 1990, 258: R916 - R923.
- [10] Oh - Ishi S, Kizaki T, Nagaswa J. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content, and mRNA expression in rat muscle[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1997, 24: 326 - 332.
- [11] Hollander J, Fiebig R, Gore M, et al. Superoxide dismutase gene expression: Fiber - specific adaptation to endurance training[J]. *Am J Physiol*, 1999, 277: R856 - 862.
- [12] Adams A K, Best T M. The role of antioxidants in exercise and prevention[J]. *The Physician and Sportsmedicine*, 2002, 30: 5.
- [13] Higuchi M. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise[J]. *J Gerontol*, 1985, 40: 281 - 286.
- [14] Tessier F, Hida H, Favier A, et al. Muscle GSH-px activity after prolonged exercise, training and selenium supplementation[J]. *Biol Trace Element Res*, 1995, 47: 279 - 285.

[编辑: 郑植友]