

·基础研究·

不同运动方式对青年期和老年期SAMP8小鼠胫骨前肌氧化应激影响的研究*

田 鹏¹ 师捷璇¹ 马 娇¹ 李海鹏²

摘要

目的:研究抗阻运动和有氧运动对青年期和老年期雄性SAMP8小鼠胫骨前肌组织氧化应激水平的影响。

方法:选择青年期(3月龄)和老年期(6月龄)健康雄性SAMP8小鼠随机分为对照组、抗阻运动组和有氧运动组,进行为期8周运动训练后检测各组小鼠胫骨前肌丙二醛(MDA)含量、总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性。

结果:抗阻运动干预后老年期小鼠胫骨前肌中MDA的降低($P < 0.05$),而有氧运动干预可导致青年期小鼠MDA含量降低($P < 0.05$);不同运动方式干预后老年期小鼠T-AOC值均降低($P < 0.05$),而青年期抗阻运动和有氧运动组小鼠T-AOC值均升高($P < 0.05$),增幅分别为22%和44%;有氧运动干预后,老年期和青年期小鼠胫骨前肌SOD和CAT活性均显著高于各自对照组和抗阻运动组($P < 0.05$)。

结论:青年期小鼠以增强抗氧化能力的方式缓解氧化应激,且有氧运动要比抗阻运动效果明显;而老年期小鼠则可能是以激发免疫系统的急性响应为主,但过量的机械负荷导致其总抗氧化能力下调。

关键词 抗阻运动;有氧运动;氧化应激;SAMP8小鼠;自由基

中图分类号:G804.7,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2020)-12-1416-06

Study of different exercises on oxidative stress in anterior tibial muscle of young and aged SAMP8 mice/
TIAN Peng, SHI Jiexuan, MA Jiao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(12):
1416—1421

Abstract

Objective: The resistance exercise and aerobic exercise were carried out on young and aged SAMP8 mice to study the effects of exercises intervention on oxidative stress levels in anterior tibial muscle of mice hindlimb.

Method: Young (three-month-old) and older (six-month-old) healthy male SAMP8 mice were randomly divided into control groups, resistance exercise groups and aerobic exercise groups, respectively. After 8-week exercise training, the levels of malondialdehyde (MDA), the total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) activities, and catalase (CAT) activities in anterior tibial muscle of mice hindlimb were detected.

Result: Decreased MDA levels in anterior tibial muscle of aged mice in resistance exercise groups was observed($P < 0.05$), and the MDA levels of young mice in aerobic exercise groups were significantly downregulated($P < 0.05$). Both exercise intervention modes significantly reduced the T-AOC levels of aged mice($P < 0.05$), but the T-AOC levels of young mice in resistance exercise and aerobic exercise groups were increased significantly by 22% and 44%($P < 0.05$). The detecting of SOD and CAT activities in aged and young mice showed that both enzymes activities of aerobic exercise groups were significantly higher than that of control and resistance exercise groups($P < 0.05$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.12.002

*基金项目:山西省基础研究计划面上项目(201601D021100)

1 山西大学商务学院,山西省太原市,030031; 2 浙江工业大学

第一作者简介:田鹏,男,副教授; 收稿日期:2019-03-20

Conclusion: Young mice relieve oxidative stress mainly by enhancing antioxidant capacity, and aerobic exercise is more effective than resistance exercise. The old mice reduce oxidative damage mainly by stimulating the acute response of immune system, but the excessive exercise still resulted in the decreased total antioxidant capacity.

Author's address School of Commerce, Shanxi University, Shanxi, Taiyuan, 030031

Key word resistance exercise; aerobic exercise; oxidative stress; SAMP8 mice; free radicals

有氧代谢可产生过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(-OH)和超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)等多种氧化性自由基(reactive oxygen species, ROS)。ROS具有较强细胞毒性,可通过诱导细胞发生脂质过氧化作用而引起细胞损伤^[1]。“自由基衰老学说”认为,肌肉中ROS的过量产生是导致其机能退化的重要因素^[2]。较生物体其他组织,胫骨前肌易产生较多ROS,且其水平随生物体年龄增大而升高。ROS诱导产生的有害物质可引起肌肉衰减综合征等多种生理功能障碍^[3]。Capel等^[4]研究认为,胫骨前肌ROS增龄性累积可导致氧化应激水平的改变,进而导致胫骨前肌结构与功能的退化。

在多数发达国家及部分发展中国家,肌肉衰减综合征已逐步发展成为严重影响中老年人正常自理和生活能力的一个严重问题^[5]。生物体内自由基的清除主要依赖抗氧化系统,抗氧化能力是机体抵抗和清除自由基缓解细胞氧化损伤的重要指标^[6]。在骨骼肌衰老过程中,抗氧化酶活性可被诱导上调,从而缓解ROS对衰老骨骼肌的攻击^[2]。此外,长期适量地进行有氧耐力运动并不会导致胫骨前肌产生氧化损伤,反而可增强其对氧化应激的耐受性和适应性^[7]。王文秀等^[8]研究认为,适量运动是防治肌肉衰减综合征的有效手段,但防治效果受运动方式和患者年龄等因素的影响较大。

目前,关于不同运动方式对不同时期小鼠胫骨前肌氧化应激的影响和抗氧化调控效应的研究鲜有报道。本文拟将爬梯运动和有氧跑台运动作为干预手段,对青年期(3月龄)和老年期(6月龄)(Senescence-accelerated mice prone/8, SAMP8)快速老化小鼠胫骨前肌氧化应激及抗氧化水平进行相关研究,探讨胫骨前肌氧化应激的影响因素,以制定合理有效的运动干预措施,为肌肉质量衰减等运动障碍疾病的预防和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

本研究以普通级SAMP8雄性小鼠为研究对象,均购自山西医科大学实验动物中心[实验动物饲养许可证编号:SYXK(晋)2015-0001]。购入后于山西大学生物技术研究所动物饲养室分笼独立送风饲养,以国家标准啮齿类饲料[山西振东制药股份有限公司,许可证号:SYXK(晋)2014-0006]喂养。动物饲养室内温度 $25\pm 2^\circ\text{C}$,湿度 $50\pm 5\%$,自由进食饮水,采光为自然光。

实验动物分组:36只3月龄SAMP8小鼠随机分为:青年期小鼠对照组(YC, $n=12$),青年期小鼠抗阻运动组(YR, $n=12$)和青年期小鼠有氧运动组(YE, $n=12$);6月龄SAMP8小鼠36只随机分为:老年期小鼠对照组(OC, $n=12$),老年期小鼠抗阻运动组(OR, $n=12$)和老年期小鼠有氧运动组(OE, $n=12$)。

1.2 运动模型与训练方案

1.2.1 抗阻运动方案:参照Lee等^[9]训练方法,以小鼠背部穿戴负重爬梯方式进行抗阻运动。适应性饲养一周后开始训练,在动物的明暗周期交界时(17:00—19:00)进行训练,采取逐级递增的方式由小鼠体重25%的起始负荷量逐渐增加至50%,以避免小鼠死亡量过大。负重重量(运动强度)和爬梯的重复次数(运动量)见表1,每组训练时间和间隔时间分别为20s和2min,训练隔天进行。

表1 YR组与OR组爬梯运动训练方案

周次	负重(g)	负重占小鼠体重百分比(%)	训练次数×间隔次数
1	7.5	25	3×3
3	15	50	3×4
4	15	50	3×4
5	15	50	3×4
6	15	50	3×4
7	15	50	3×4
8	7.5	25	3×4

1.2.2 有氧运动方案:参照邱宏军等^[10]跑台训练方案并随动物跑台运动具体情况适时调整建立有氧跑台运动模型。适应性饲养一周后,选择小鼠明暗周期交界时(17:00—19:00)进行,每周训练5天,每天训练1次,采取恒定运动量的方式进行,每次实验后需检查动物是否健康,如实验小鼠受伤需及时调整实验。对照组小鼠在笼内正常饲养,不进行跑台运动干预。见表2。

表2 YE组与OE组跑台运动训练方案

训练周次	速度[m/min(km/h)]	时间(min)
1	15(0.9)	15
2	20(1.2)	25
3	25(1.5)	25
4	25(1.5)	25
5	25(1.5)	25
6	25(1.5)	25
7	25(1.5)	25
8	15(0.9)	15

1.3 实验取材

抗阻运动和有氧运动末次训练结束后,从各组受试SAMP8小鼠12只中随机抽取10只进行断颈处死。在冰盘上迅速完整取出小鼠双侧后肢胫骨前肌用于总抗氧化能力和氧化物歧化酶活性等指标检测,称重记录后用锡箔纸包裹标记后置于液氮中,后转移至-80℃超低温冰箱保存备用。

1.4 胫骨前肌氧化损伤和抗氧化能力检测

按重量(g):体积(ml)=1:9的比例加入匀浆介质后使用Teflon杵棒玻璃匀浆器(Wheaton公司)匀化,匀浆速度2000r/min,制备成10%匀浆液后通过低温离心机(Thermo公司,4℃,2000r/min)离心15min后取上清进行检测。组织中总抗氧化能力(T-AOC)、氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量检测按照试剂盒说明书进行。使用BCA法进行蛋白定量。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0软件对实验数据进行统计分析,数据采用平均值±标准差表示。分别采用Kolmogorov-Smirnov和Levene法进行数据分布和方差齐性检验,采用LSD法对各组进行两两比较,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同运动对SAMP8小鼠胫骨前肌MDA的影响

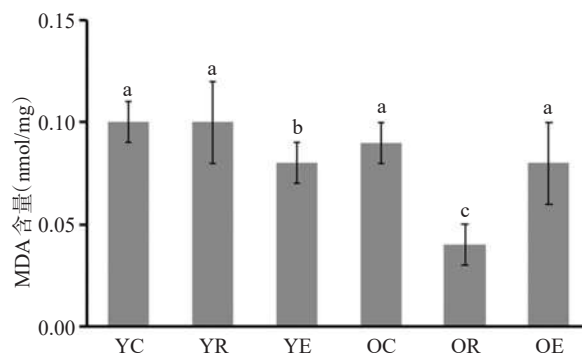
如图1所示,老年期OC组小鼠胫骨前肌MDA含量较青年期YC组小鼠无显著性差异($P > 0.05$),显示随年龄增大小鼠胫骨前肌细胞氧化应激水平无显著升高趋势。不同运动方式干预之后,YC组与YR组、OC组与OE组胫骨前肌MDA含量分别相比均未见显著性差异($P > 0.05$),但YE和OR组MDA含量均显著低于各自对照组($P < 0.05$),表明有氧运动干预可导致青年期小鼠胫骨前肌细胞的氧化应激水平降低,而抗阻运动干预则可导致老年期小鼠胫骨前肌细胞的氧化应激水平降低,显示不同运动方式对不同月龄小鼠胫骨前肌细胞的损伤存在的差异性结果。

2.2 不同运动对SAMP8小鼠胫骨前肌T-AOC活性的影响

如图2所示,老年期OC组小鼠胫骨前肌T-AOC活性显著高于青年期YC组小鼠($P < 0.05$),表明老年期小鼠的总抗氧化能力较青年期小鼠处于较高水平。YR组和YE组小鼠胫骨前肌T-AOC值显著高于YC组小鼠($P < 0.05$),增幅分别达22%和44%;而老年期小鼠则相反,OR组和OE组小鼠胫骨前肌T-AOC值均显著低于OC组($P < 0.05$)。结果表明抗阻运动和有氧运动干预均可诱导青年期小鼠总抗氧化能力升高,而抗阻运动和有氧运动干预则会导致老年期小鼠总抗氧化能力降低。

2.3 不同运动对SAMP8小鼠胫骨前肌SOD的影响

图1 不同运动对SAMP8小鼠胫骨前肌MDA含量的影响



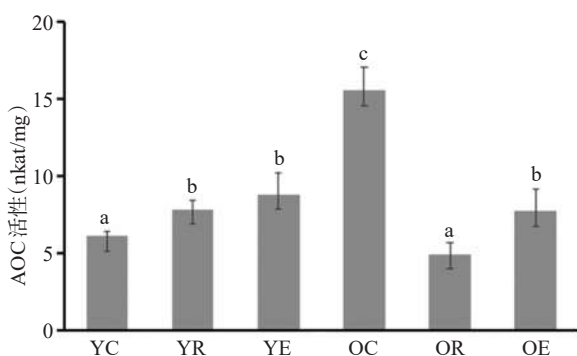
注:相同字母表示组间无显著差异($P > 0.05$),不同字母表示组间有显著差异($P < 0.05$)

如图3所示,与T-AOC结果类似,OC组小鼠胫骨前肌SOD活性显著高于YC组($P < 0.05$),表明老年期小鼠的活性氧清除水平要高于正常青年期小鼠。抗阻运动和有氧运动组小鼠胫骨前肌SOD活性均显著高于各自对照组小鼠($P < 0.05$),且YE组和OE组小鼠胫骨前肌SOD活性均显著高于各自抗阻运动组($P < 0.05$)。结果表明,抗阻运动和有氧运动干预均可诱导青年期和老年期小鼠SOD活性增强,且有氧运动干预后小鼠SOD活性要高于抗阻运动组。

2.4 不同运动对SAMP8小鼠胫骨前肌CAT的影响

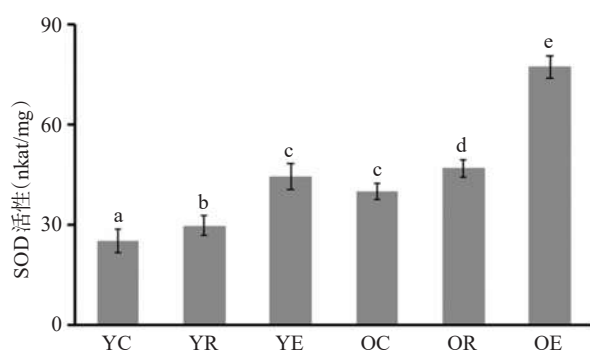
如图4所示,OC组小鼠胫骨前肌CAT活性显著高于YC组($P < 0.05$)。随小鼠年龄升高,CAT活性变化显示出与T-AOC和SOD相同趋势,表明老年期小鼠的活性氧清除能力要高于正常青年期小鼠。

图2 不同运动对SAMP8小鼠胫骨前肌T-AOC的影响



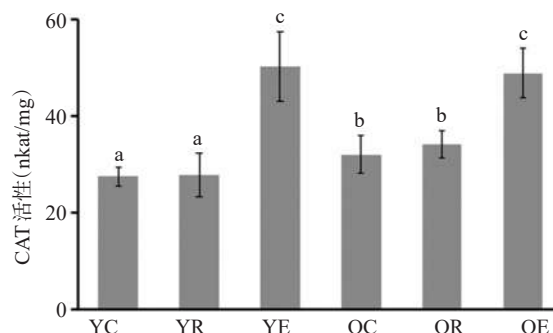
注:相同字母表示组间无显著差异($P > 0.05$),不同字母表示组间有显著差异($P < 0.05$)

图3 不同运动对SAMP8小鼠胫骨前肌SOD活性的影响



注:相同字母表示组间无显著差异($P > 0.05$),不同字母表示组间有显著差异($P < 0.05$)

图4 不同运动对SAMP8小鼠胫骨前肌CAT的影响



注:相同字母表示组间无显著差异($P > 0.05$),不同字母表示组间有显著差异($P < 0.05$)

YE和OE组小鼠CAT活性均显著高于各自正常对照组小鼠($P < 0.05$),增幅分别达82.6%和52.3%,但YR组和OR组小鼠CAT活性较对照组无显著差异($P > 0.05$)。结果表明,有氧运动干预可诱导青年期小鼠和老年期小鼠CAT活性升高,但抗阻运动干预对青年期和老年期小鼠CAT活性无显著影响。

3 讨论

ROS作为细胞代谢过程的中间产物,对生物体的影响具有双重性。一方面,ROS可直接与脂肪、核酸等反应而引起脂质过氧化作用,从而对机体的组织器官产生毒性作用。丙二醛(malondialdehyde, MDA)作为脂质过氧化的产物,常作为细胞氧化损伤的一个重要检测指标^[11]。本研究通过测定MDA含量,研究了负重爬梯和动物跑台两种运动方式对不同时期SAMP8小鼠胫骨前肌细胞氧化损伤的影响程度。研究发现,有氧运动可导致青年期小鼠胫骨前肌细胞MDA含量降低,而抗阻运动干预则可引起老年期小鼠胫骨前肌细胞的MDA含量降低。另一方面,ROS可被机体用于诱导某些酶活力的提升或某些活性物质(如凝血酶原和胶原蛋白等)的合成以增强抗氧化防御系统并强化细胞修复功能等^[12]。晁敏等^[13]研究发现,有氧运动可促进骨骼肌代谢增强,自由基的利用也相应增加。当生物体对活性氧自由基的利用速率大于其生成速率时,就会出现脂质过氧化产物减少这一现象。此外,抗阻运动引发老年期小鼠胫骨前肌MDA含量显著下降,可能是衰老肌肉线粒体对促进自由基产生的损伤较

为敏感,进而激发免疫系统反应的急性响应^[14]。

为缓解活性氧对机体的氧化损伤,生物体在长期的进化过程中形成并完善了一套抗氧化系统以清除过多的ROS,其中T-AOC是生物体防御氧化损伤能力强弱的重要指标。通过对小鼠胫骨前肌T-AOC进行检测,有利于从整体上监测胫骨前肌总抗氧化能力。结果表明,T-AOC表现为年龄依赖性,且与运动方式密切相关。8周运动干预后,青年期小鼠胫骨前肌参与有氧代谢的酶活性增强。细胞代谢处于较为旺盛阶段,细胞氧化磷酸化水平增强诱导小鼠SOD和CAT活性升高,导致细胞对运动干预出现适应性发展^[15-16]。虽然老年期有氧运动组小鼠SOD等酶活性得到上调,但由于其胫骨前肌的退行性变化导致其代偿机能减弱,较强的机械负荷仍导致其总抗氧化能力下调,表明有氧运动虽可提高老年期小鼠部分抗氧化酶类的活性但无法完全缓解过量ROS所导致的氧化损伤。提示适当的有氧运动可通过上调机体氧化应激诱导细胞抗氧化酶的增加以削弱自由基对机体的氧化损伤和延缓与年龄相关的退行性变的发生,但长期较高强度的运动则会导致机体总抗氧化能力减弱。SOD在生物体氧化与抗氧化平衡中起着至关重要的作用,其可通过清除ROS保护细胞免受氧化损伤^[17-18]。本研究发现抗阻运动和有氧运动干预均可诱导青年期和老年期小鼠SOD活性增强,且有氧运动干预后小鼠SOD活性要高于抗阻运动组。此外,CAT是生物体组织中对氧化过程发挥重要作用的另一重要因子。CAT可直接分解H₂O₂以降低其在组织中的浓度,抑制H₂O₂与O₂反应生成有害的·OH^[19]。研究发现,各有氧运动干预组小鼠CAT活性均显著高于对照组,究其原因可能在于抗阻运动和有氧运动均可促使能量消耗增多,氧利用率和代谢产物的增加诱导过氧化氢酶对底物H₂O₂的分解,释放出的O₂被生物体利用,增加了氧的利用效率^[20]。Allan等^[21]和张慧等^[22]认为,肌肉退行性变化是生物体衰老过程中生物体骨骼肌T-AOC、SOD和CAT等活性上升的重要内部诱因。研究发现,衰老的肌肉可能处于一种炎症状态,其自由基水平被显著提高^[23],而作为外部诱因的运动干预则通过诱发抗氧化剂(如锰超氧化物歧化酶^[24])等蛋白的表达上调介导了老年期小鼠抗氧化防御能力

增强的保护性反应^[25]。

本研究通过负重爬梯和动物跑台模型,验证了不同时期的SAMP8小鼠在不同运动方式干预下其胫骨前肌氧化损伤程度及抗氧化酶活性变化。结果表明不同年龄小鼠对氧化损伤的缓解策略不同,其中青年期小鼠是以增强抗氧化能力为主的方式降低氧化胁迫,且有氧运动要比抗阻运动效果明显;而老年期小鼠则可能是以激发免疫系统的急性响应为主的方式减少氧化损伤。对于青年期小鼠,两种运动方式均有利于抗氧化能力的增强,但抗阻运动诱发的氧化损伤程度要显著高于有氧运动。提示,青年人群的运动方式也应以有氧运动为主,中老年人群进行适度有氧运动可激活免疫系统的急性响应,坚持长期适量的有氧运动有利于增强机体抗氧化酶的活性以降低机体的氧化损伤。

参考文献

- [1] Choi YK, Por ED, Kwon YG, et al. Regulation of ROS production and vascular function by carbon monoxide[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012(7):794237.
- [2] Kuwahara H, Horie T, Ishikawa S, et al. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(9):1252—1262.
- [3] 李海鹏, 王立丰, 关尚一, 等. Sarcopenia关联的线粒体介导的细胞凋亡信号通路的增龄性变化及爬梯运动对其的影响[J]. *体育科学*, 2010, 30(7):56—61.
- [4] Capel F, Rimbart V, Lioger D, et al. Due to reverse electron transfer, mitochondrial H₂O₂ release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved[J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(4):505—511.
- [5] Voeikov VL. Reactive oxygen species (ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems[J]. *J Altern Complement Med*, 2006, 12(2):111—118.
- [6] Steinbacher P, Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle[J]. *Biomolecules*, 2015, 5(2):356—377.
- [7] 陈彩珍, 卢健, 许豪文, 等. 有氧运动对老年小鼠骨骼肌抗氧化能力的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2000, 19(3):273—274.
- [8] 王文秀. 蛋白质饮食、运动与Sarcopenia预防[J]. *当代体育科技*, 2012, 2(24):19.
- [9] Lee S, Farrar RP. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat[J]. *Journal of Exercise physiology*, 2003, 6(2):80—87.

- [10] 邱宏军, 赵永寿, 田振军, 等. 运动训练大鼠长期停训后海马神经元NSE的表达变化[J]. 北京体育大学学报, 2009, 32(11):57—60.
- [11] Luño V, Gil L, Olaciregui M, et al. Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa[J]. *Andrologia*, 2015, 47(9):1004—1011.
- [12] Ferguson G, Bridge W. Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: the therapeutic potential of gamma-glutamylcysteine[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 593:12—23.
- [13] 晁敏, 梁丰, 王尊, 等. 单次高强度抗阻训练与间歇有氧运动对中年人基础代谢率的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30(10): 1021—1024.
- [14] Jiang HK, Miao Y, Wang YH, et al. Aerobic interval training protects against myocardial infarction-induced oxidative injury by enhancing antioxidant system and mitochondrial bio-synthesis[J]. *Clin Exp Pharmacol*, 2014, 41(3):192—201.
- [15] Jiang SF, Gao YF, Zhang YM, et al. The research on the formation mechanism of extraordinary oxidative capacity of skeletal muscle in hibernating ground squirrels[J]. *Zoological Studies*, 2015, 54(1):46—51.
- [16] Jiang SF, Guo SP, Xue W, et al. Seasonal oxidative capacity of skeletal muscles in hibernating daurian ground squirrels[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2015, 93(8): 593—598.
- [17] Lin DC, Hershey JD, Mattoon JS, et al. Skeletal muscles of hibernating brown bears are unusually resistant to effects of denervation[J]. *J Exp Biol*, 2012, 215(12):2081—2087.
- [18] 罗琳, 何诗依, 严露, 等. 4周有氧训练诱导AMPK α 2对小鼠骨骼肌Nrf2-ARE结合活性的影响[J]. 中国体育科技, 2017, 53(6):90—94.
- [19] Yang CX, He Y, Gao YF, et al. Changes in calpains and calpastatin in the soleus muscle of daurian ground squirrels during hibernation[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2014, 176(1):26—31.
- [20] Forman HJ. Glutathione: from antioxidant to post-translational modifier[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 595:64—67.
- [21] Allan ME, Storey KB. Expression of NF- κ B and downstream antioxidant genes in skeletal muscle of hibernating ground squirrels, *spermophilus tridecemlineatus*[J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(2):166—174.
- [22] 张慧, 苏全生. 联合抗氧化剂对一次大强度运动后运动员T-AOC、SOD、GSH-Px及MDA的影响[J]. 北京体育大学学报, 2008, 31(4):483—485.
- [23] 毛雅芸, 刘雨佳, 张纓. 8周耐力训练介导Nrf2对骨骼肌谷胱甘肽抗氧化系统的影响[J]. 北京体育大学学报, 2017, 40(2): 51—55.
- [24] Koubaa A, Triki M, Trabelsi H, et al. Changes in antioxidant defense capability and lipid profile after 12-week low-intensity continuous training in both cigarette and hookah smokers: a follow-up study[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): 130—136.
- [25] Park SY, Jin ML, Ko MJ, et al. Anti-neuroinflammatory effect of emodin in LPS-stimulated microglia: involvement of AMPK/Nrf2 activation[J]. *Neurochem Res*, 2016, 307(4): 138—149.