

# 不同运动负荷对大鼠股外肌一氧化氮合酶体系的影响

杨小英<sup>1</sup>, 梁蓓蓓<sup>2</sup>, 黄志平<sup>1</sup>, 刘成艳<sup>1</sup>, 韦蕾<sup>3</sup>, 李建恒<sup>4</sup>, 刘华钢<sup>2\*</sup>

(1. 广西壮族自治区体育科学研究所, 南宁 530031; 2. 广西医科大学, 南宁 530021;  
3. 广西体育高等专科学校, 南宁 530012; 4. 广西体育运动学校, 南宁 530012)

**[摘要]** **目的:**测定不同运动负荷时大鼠股外肌组织中一氧化氮-一氧化氮合酶(NO-NOS)体系的各成分含量或活性的变化,探讨运动训练对股外肌的影响。**方法:**将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组,即安静对照组、中等运动强度组、运动疲劳组,每组 20 只。对安静对照组大鼠进行常规饲养,不加任何干预,对中等运动强度组大鼠进行中等强度游泳训练,对运动疲劳组大鼠建立运动性疲劳模型。采用生化试剂盒测定各组大鼠末次训练后股外肌组织 NO-NOS 体系含量或活性。**结果:**与安静对照组比较,中等运动强度组大鼠股外肌组织中 NO 含量、总一氧化氮合酶(tNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性水平均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );运动疲劳组大鼠的股外肌组织 NO 含量,tNOS,eNOS,nNOS 活性水平均无显著变化,其中 NO 含量,tNOS,nNOS 活性水平有升高趋势。与中等运动强度组比较,运动疲劳组大鼠 iNOS 活性水平显著降低( $P < 0.05$ )。**结论:**股外肌组织中 NO-NOS 体系各成分不同运动负荷作用下会产生不同程度的变化,中等强度运动可导致股外肌组织中的 NO 含量和 tNOS,eNOS,nNOS,iNOS 活性的升高,而疲劳运动则有引起 iNOS,eNOS 活性降低的趋势。

**[关键词]** 不同运动负荷; 股外肌组织; 一氧化氮-一氧化氮合酶体系

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0320-04

## Study of NO-NOS System in the Vastus Lateral Muscle of Rat Under Different Exercise Loads

YANG Xiao-ying<sup>1</sup>, LIANG Bei-bei<sup>2</sup>, HUANG Zhi-ping<sup>1</sup>,  
LIU Cheng-yan<sup>1</sup>, WEI Lei<sup>3</sup>, LI Jian-Heng<sup>4</sup>, LIU Hua-gang<sup>2\*</sup>

(1. Guangxi Sport Science Research Institute, Nanning 530031, China;

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

3. Guangxi Sport College, Nanning 530012, China; 4. Guangxi Sport School, Nanning 530012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determinate the content or activity changes of the nitric oxide-nitric oxide synthase (NO-NOS) system in the vastus lateral muscle of rat under different exercise loads, and to explore the impact of exercise training on vastus lateral muscle. **Method:** Sixty male rats were divided randomly into quiet control group ( $n = 20$ ), moderate exercise intensity group ( $n = 20$ ), exercise fatigue group ( $n = 20$ ). The rats in the quiet control were feeded regularly, and without any intervention, the rats in the moderate exercise intensity group were trained with swimming moderately, the rats in the exercise fatigue group were established to be fatigue model. The content or activity changes of the NO-NOS system in the vastus lateral muscle were determinated by biochemical kits. **Result:** Comared with the quiet control group, the content or activity of NO, total nitric oxide synthase (tNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were significantly increased after moderate intensity. Compared with the moderate-

**[收稿日期]** 20120810(015)

**[基金项目]** 广西自然科学基金项目(桂科青 0832073)

**[第一作者]** 杨小英, 硕士, 研究员, E-mail: yxyshe@163.com

**[通讯作者]** \* 刘华钢, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: hgliu@263.net

intensity group, the activity of iNOS in the exercise fatigue group was significantly decreased. **Conclusion:** The NO-NOS system in the vastus lateral muscle will have varying degrees of change under different exercise loads, moderate-intensity exercise can increase the content or activity of NO, NOS, eNOS, nNOS and iNOS, and high fatigue movement can decrease the activity of iNOS and eNOS.

[**Key words**] different exercise loads; vastus lateral muscle; NO-NOS system

一氧化氮是生物信息分子,活性高,分布于全身各器官组织并发挥多种生物效应。运动能有效的调节一氧化氮(NO)的合成和一氧化氮合酶(NOS)的表达,不同的运动刺激对不同组织中的NO,NOS产生不同的影响,急性运动可以引起机体分泌NO增多,但 Gleim<sup>[1]</sup>发现,进行最大强度的力竭性系统运动训练的运动员,血清中的NO含量会相应降低。金其贯<sup>[2]</sup>等发现,内皮细胞分泌NO在适量的运动训练后会增多,但在长时间、大运动量的运动训练后分泌减少。不同运动刺激对股外肌NO-NOS体系各成分产生的影响报道尚少。本文拟探讨大鼠股外肌组织中的NO,NOS活性及NOS各亚型活性在不同运动负荷后的变化。探讨一氧化氮对机体运动训练的影响及寻找到更新的促进人体运动能力的手段。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康SD大鼠60只,SPF级,雄性,6周龄,购自广西医科大学实验动物中心,动物生产许可证号SCXK(桂)2003-0003。

**1.2 药品与试剂** 三氯乙醛,广西医科大学药理学教研室馈赠;NO试剂盒(批号20100619);总一氧化氮合酶(tNOS)试剂盒(批号20100715);内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性测定试剂盒(货号A014-1),均购自南京建成生物工程研究所。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 大鼠适应性饲养[自由饮食,室温控制在(18±2)℃,光照时间7:00~19:00]1周后随机分为3组,即安静对照组、中等运动强度组和运动疲劳组,每组20只。

**2.2 运动方式**<sup>[3]</sup> 对安静对照组大鼠进行常规饲养,不加任何干预。对中等运动强度组大鼠进行中等强度游泳训练,每周游泳5次,1次/d,具体方案为:第1次下水游泳10 min,以后逐日增加,至第1周末时游泳时间增至30 min,第2周末时增至60 min,此后维持此运动量至第8周末。对运动疲劳组大鼠建立运动性疲劳模型<sup>[3]</sup>,具体方案为:各鼠每周游泳5次,1次/d;第1次下水游泳10 min,以后

逐日增加,至第1周末时游泳时间增至60 min,第2周末时增至90 min,第3周起进行高强度训练,各鼠尾部负重1%体质量重物,游泳时间为90 min·d<sup>-1</sup>,第4周开始各鼠尾部负重2%体质量重物,游泳时间为90 min·d<sup>-1</sup>,第5周开始各鼠尾部负重3%体质量重物,游泳时间为90 min·d<sup>-1</sup>,第6周开始各鼠尾部负重3%体质量重物,游泳时间为120 min·d<sup>-1</sup>,此后维持第6周的运动量至第8周末。

**2.3 样本收集** 安静对照组大鼠于安静状态、中等运动强度组和运动疲劳组大鼠于末次游泳训练后24 h,分别以10%水合氯醛溶液为麻醉剂,按10 mL·kg<sup>-1</sup> ip对大鼠进行麻醉。腹主动脉取血,处死动物,迅速取股外肌组织,放入0~4℃冰生理盐水中,洗净血液,用滤纸吸干水分,装入塑料样品管(内径4 mm)中,-20℃冰冻保存待用。组织匀浆制备:称取适量组织(0.1~1 g),按1:9的比例加入预冷的匀浆介质(0.8% NaCl溶液、pH 7.4,0.01,0.000 1 mol·L<sup>-1</sup> EDTA-2Na,0.01 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液)于研钵中,用眼科剪迅速剪碎组织块(以上操作全部在冰水浴中进行)。手工研磨后倒入试管中,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10~15 min,提取上清液于-20℃冰冻备用。

**2.4 测试指标与方法** 股外肌组织NO,tNOS,nNOS,eNOS,iNOS活性测定,测试方法参照试剂盒内的操作说明进行。

**2.5 统计学处理** 采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理,实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

## 3 结果

不同运动负荷对大鼠股外肌组织NO,tNOS,nNOS,eNOS,iNOS含量的影响 与安静对照组比较,中等运动强度组大鼠股外肌组织中NO含量,tNOS,eNOS,nNOS,iNOS活性水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );运动疲劳组大鼠的股外肌组织NO含量,tNOS,eNOS,nNOS活性水平均无显著变化,其中NO含量,tNOS,nNOS活性水平有升高趋势,eNOS,iNOS活性水平有降低趋势。与中等运动强度组比较,运动疲劳组大鼠iNOS活性水平显著降低( $P < 0.05$ )。见表1。

表 1 不同运动负荷对大鼠股外肌组织 NO 含量, tNOS, nNOS, eNOS, iNOS 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	tNOS/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	eNOS/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	nNOS/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	iNOS/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
安静对照	1.93 $\pm$ 0.78	1.839 $\pm$ 0.021	0.793 $\pm$ 0.172	0.971 $\pm$ 0.106	0.715 $\pm$ 0.089
中等运动强度	2.53 $\pm$ 0.52 <sup>1)</sup>	2.398 $\pm$ 0.037 <sup>1)</sup>	1.115 $\pm$ 0.158 <sup>1)</sup>	1.233 $\pm$ 0.157 <sup>2)</sup>	0.983 $\pm$ 0.116 <sup>1)</sup>
运动疲劳	2.01 $\pm$ 0.65	1.926 $\pm$ 0.025	0.745 $\pm$ 0.218	1.034 $\pm$ 0.102	0.639 $\pm$ 0.102 <sup>3)</sup>

注:与安静对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与中等强度运动组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

运动后,骨骼肌组织中的 NO 会发生改变。NO 既有提高运动能力的正面效用,又有减少运动能力的负面作用,为提高其正面作用而减少其负面作用,必须使机体 NO 含量控制在适当的范围内,NO 的合成减少,可能对机体起到保护的作用<sup>[5]</sup>。熊正英等<sup>[6]</sup>发现:股四头肌组织中的 NOS 活性在大强度耐力训练后升高,NO 的生成相应地有所增高,两者升高的趋势一致。本实验结果显示大鼠进行中等强度后,股外肌组织中的 NO 含量、tNOS 活性较安静对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ),疲劳运动组的股外肌组织中的 tNOS 较安静对照组比较,具有升高趋势,但差异不显著,与现有报道基本一致。

现有研究表明<sup>[6]</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  和钙调蛋白是激活 nNOS 和 eNOS 的两种物质, iNOS 的激活不需要  $\text{Ca}^{2+}$  或钙调蛋白,钙调蛋白是 iNOS 静息水平  $\text{Ca}^{2+}$  的调节的必需物质。NOS 易受磷酸化、硝基化(半胱氨酸和铁离子)和氧浓度改变而易使发生转录后水平。多数研究者发现用  $\text{K}^+$  通道阻断剂可以下调 eNOS 的基因表达,细胞膜  $\text{K}^+$  通道可能是使耐力训练上调股外肌 eNOS 基因表达水平的原因,  $\text{K}^+$  通道的开放及其促进 eNOS 基因的表达可能是受到了长期耐力训练中反复存在的动作电位的影响而导致。徐建方发现<sup>[7]</sup> 股外肌 nNOS 基因表达在耐力训练组和大剂量耐力训练组后均较安静对照组显著上调。毛雁报道<sup>[8]</sup>,大鼠骨骼肌组织中的 eNOS 活性在运动后有明显的下降趋势,说明 eNOS 在长时间的力竭性运动后会失活。其可能机制为脑组织脂质过氧化程度在长时间耐力运动后明显提高,超氧阴离子大量产生,并与 eNOS 快速作用,从而使骨骼肌组织 eNOS 活性减少;NO 合成的底物  $L\text{-Arg}$  在长时间耐力运动中分解代谢加速,导致体内  $L\text{-Arg}$  供给不足,使 eNOS 合成的减少。毛雁<sup>[8]</sup> 同时发现,大鼠股四头肌组织的 T-NOS 在运动后即刻显著升高,其原因可能是 NOS 的各分型的活性在长时间大强度的运动训练后发生改变。股四头肌组织的 T-NOS 的显著升高,可通过改善运动肌的血液供应,从而延缓外周

疲劳。NOS 是 NO 生成的关键限速酶<sup>[9]</sup>,NO 在一定运动强度训练下,可由神经细胞持续合成的 eNOS 催化  $L\text{-Arg}$  而生成<sup>[10]</sup>。本实验研究发现:大鼠进行中等强度运动后股外肌的 eNOS 活性水平较安静对照组显著上升 ( $P < 0.01$ ),nNOS 活性较安静对照组显著上升 ( $P < 0.01$ );大鼠进行疲劳训练后与安静对照组比较,股外肌组织的 eNOS 活性水平有下降的趋势,提示中等强度运动能升高 eNOS 及 nNOS 活性,有利于运动训练。

生理状态下, iNOS 在人体内部不大量的表达,但在白细胞介素-1、干扰素、脂多糖等某些细胞因子的诱导下,则会大量的表达。iNOS 一经诱导生成后,其活性持续的时间较长,而且可以催化产生大量的 NO,引起机体组织一系列的反映,如引起强烈的血管舒张和血压降低,最终除导致休克发生以外,还生成过氧化亚硝酸阴离子  $\text{ONOO}^-$ ,其可引起机体组织器官损伤。而研究证实:在长期的运动训练后,机体骨骼肌组织会出现暂时性供血不足,大强度训练中可能使 iNOS 过度激活;另外,在运动过程中,大量致炎细胞因子的产生,可诱导 iNOS 基因表达,从而产生大量的 iNOS。毛雁<sup>[8]</sup> 等发现:运动后大鼠骨骼肌组织中的 iNOS 活性有明显的升高趋势;本实验大鼠进行中等强度运动后股外肌的 iNOS 活性水平明显升高 ( $P < 0.05$ );运动疲劳组大鼠的股外肌组织 iNOS 活性水平无明显改变。可能与运动后股外肌组织损伤和运动产生的炎性细胞因子等因素有关。运动疲劳组大鼠的股外肌组织 iNOS 活性水平无明显改变,较中等强度运动组则明显下降,这方面的研究还有待深入研究其可能的机制。

本研究表明,不同运动负荷对大鼠股外肌的 NO-NOS 体系各成分产生不同程度的影响;大鼠进行中等强度运动后,股外肌的 NO 含量、tNOS 和 NOS 各亚型的活性均明显升高。

#### [参考文献]

[1] Geim G W. Venous nitric oxide decreases in highly trained endurance athletes during maximal exercise[J]. Circulation, 1994, 90:695.

# 益智仁挥发油对大鼠快动眼睡眠剥夺恢复后脑组织 氨基酸类神经递质含量及其受体表达的影响

崔开宇, 王平, 游秋云\*

(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的:观察益智仁挥发油对大鼠快动眼(REM)睡眠剥夺恢复后脑组织氨基酸类神经递质 L-谷氨酸(Glu)及  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)含量及其受体表达的影响。方法:将 Wistar 大鼠随机分为空白对照组(等容生理盐水),REM 睡眠剥夺恢复组(等容生理盐水),阳性对照组(安定  $0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),益智仁挥发油低、高剂量组( $9, 27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。各组灌胃给药 2 周后,除空白对照组外其余各组用自制改良多平台法剥夺大鼠睡眠 48 h 制作 REM 睡眠剥夺模型,睡眠恢复 6 h 后采用高效液相色谱法检测各组大鼠大脑皮质及下丘脑氨基酸类神经递质 Glu 及 GABA 含量变化,采用免疫组化染色和 mRNA 半定量 RT-PCR 法检测大脑皮质及海马部位  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体(GABA<sub>A</sub>R) $\alpha_1$  和  $\gamma_2$  亚单位的表达变化,并观察益智仁挥发油对这些指标的影响。结果:与空白对照组比较,REM 睡眠剥夺恢复组大鼠大脑皮质及下丘脑 Glu 含量显著升高,而 GABA 含量显著降低( $P < 0.01$ ),大脑皮质及海马部位的 GABA<sub>A</sub>R $\alpha_1$  和  $\gamma_2$  亚单位免疫化学累积吸光度明显较低( $P < 0.01$ ),皮质部位 GABA<sub>A</sub>R $\alpha_1$  和  $\gamma_2$  mRNA 的表达均显著下调( $P < 0.01$ ),经益智仁挥发油干预后各指标明显趋于正常状态改变( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。结论:REM 睡眠剥夺恢复可改变皮质及下丘脑部位氨基酸类神经递质 Glu, GABA 的释放,并使皮质及海马部位 GABA<sub>A</sub>R $\alpha_1$  和  $\gamma_2$  亚单位表达明显下调,益智仁的益智健脑作用机制与其调节神经递质含量及上调大脑皮质及海马部位 GABA<sub>A</sub>R $\alpha_1$  和  $\gamma_2$  亚单位的表达有关。

**[关键词]** REM 睡眠剥夺; 益智仁挥发油; 氨基酸类神经递质

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0223-05

**[收稿日期]** 20121107(022)

**[基金项目]** 湖北省科技厅 2010 年研究与开发计划项目(2010BCB004)

**[第一作者]** 崔开宇, 本科生, 从事中药药理学研究

**[通讯作者]** \* 游秋云, Tel: 15337237059, E-mail: youqiuyun@126.com

- [ 2 ] 金其贯. 运动与内皮细胞内皮素和一氧化氮分泌的研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(3): 292.
- [ 3 ] 杨小英, 梁蓓蓓, 黄志平, 等. 不同运动负荷大鼠主要器官各型 NOS 表达水平的研究[J]. 现代预防医学, 2011, 38(13): 2550.
- [ 4 ] 朱全, 浦宗, 张敏. 游泳方法建立大鼠模拟过度训练模型[J]. 中国运动医学杂志, 1998, 17(2): 137.
- [ 5 ] 赵彩霞, 付静波. 亚极量、极量负荷运动状态下人体血中一氧化氮的变化[J]. 现代康复, 2000, 4(9): 1354.
- [ 6 ] 熊正英, 刘海斌, 曲洪刚.  $\alpha$ -硫辛酸对大强度耐力运动大鼠不同组织 NO 含量、NOS 活性的影响[J]. 天津体育学院学报, 2008, 23(1): 31.
- [ 7 ] 徐建方, 张漓, 冯连世, 等. 耐力训练与补充不同剂量 L-Arg 对大鼠股外肌 NOS 基因表达的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2004, 23(3): 142.
- [ 8 ] 毛雁, 韩晓燕, 熊正英, 等. 黄精提取物对耐力训练大鼠骨骼肌组织 NO-NOS 体系影响的实验研究[J]. 北京体育大学学报, 2008, 31(9): 1225.
- [ 9 ] 金玉祥, 陈嘉峰, 胡波, 等. 应激性防御反应过程中脑内 NO 合酶阳性神经元分布的变化[J]. 神经解剖学杂志, 2000, 16(1): 29.
- [ 10 ] 李倩虹. NO 合成酶 mRNA 在中枢和外周组织中的表达和分布[J]. 北京医科大学学报, 1994, 26: 1.

[责任编辑 聂淑琴]