

心房钠尿肽对游泳力竭小鼠腓肠肌抗运动性 疲劳及其机制研究

李大勇¹, 洪兰², 于丽², 李海雁², 刘丽萍^{2*}

(1. 延边大学体育学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学医学部基础医学院
生理学与病理生理学教研部, 吉林 延吉 133002)

[摘要] **目的:**观察和探讨心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)对小鼠的抗疲劳作用及其机制。**方法:**观察 ANP 13.10, 6.55 ng·kg⁻¹ iv 对小鼠负重游泳时间及对游泳力竭小鼠腓肠肌 MDA 含量的影响;离体试验观察 ANP 高质量浓度 13.10 ng·kg⁻¹ 对 H₂O₂ (0.2 mol·L⁻¹) 诱导小鼠腓肠肌 MDA 含量的影响。**结果:**ANP 13.10 ng·kg⁻¹ 能够明显延长小鼠的游泳力竭时间 ($P < 0.01$); 并能使小鼠腓肠肌 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$); ANP 13.10 μg·L⁻¹ 对 H₂O₂ 致小鼠腓肠肌组织损伤有保护作用 ($P < 0.001$), 而蛋白激酶 G 的阻断剂 LY83583 可阻止这种保护作用 ($P < 0.01$)。**结论:**ANP 具有抗运动性疲劳的作用, 其作用与 ANP-环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G (ANP-cGMP-PKG) 信号转导途径有关。

[关键词] 心房钠尿肽; 力竭; 腓肠肌; 抗疲劳

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0221-03

Anti-fatigue Effect and Mechanism of Atrial Natriuretic Peptide on Gastrocnemius in Swimming-Induced Fatigue Mice

LI Da-yong¹, HONG Lan², YU Li², LI Hai-yan², LIU Li-ping^{2*}

(1. Physical Education College of Yanbian University, Yanji 133002 China; 2. Department of
Physiology and Pathophysiology, Yanbian University College of Medicine, Yanji 133002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-fatigue effect and mechanism of atrial natriuretic peptide (ANP) on mice. **Method:** We observed the effect of ANP (13.10, 6.55 ng·kg⁻¹, iv) on the weight-loaded swimming time of the mice and the changes of gastrocnemius malonaldehyde (MDA). *In vitro* experiment, we observed the effect of high dose ANP (13.10 ng·kg⁻¹) on H₂O₂ (0.2 mol·L⁻¹) induced mice gastrocnemius MDA. **Result:** ANP (13.10 ng·kg⁻¹) could significant increase weight-loaded swimming time ($P < 0.01$) and reduced the contents of MDA ($P < 0.05$) compared with control group; ANP (13.10 μg·L⁻¹) had the protective effect on H₂O₂ induced tissue injury of gastrocnemius ($P < 0.001$), but the blocker LY83583 of protein kinase G prevented the protective effect. **Conclusion:** ANP has the anti-fatigue effect, its role relevant to the signal transduction pathway of ANP-cGMP-protein kinase G (ANP-cGMP-PKG).

[Key words] atrial natriuretic peptide; fatigue; gastrocnemius; anti-fatigue

心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 是 对心脏、血管、肾脏和中枢神经系统具有重要作用之
主要由心房肌细胞合成并释放的肽类激素。ANP 除 外, 还具有抑制细胞增殖、细胞分泌及影响精子活力

[收稿日期] 2011-07-06

[基金项目] 吉林省科技厅项目(20100590); 吉林省教育厅项目[吉教科合字(2008)第4号]

[第一作者] 李大勇, 讲师, 从事跆拳道教学工作, Tel: 18744337778, E-mail: ldy2132@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 刘丽萍, 博士, 副教授, 从事运动生理学教学工作, Tel: 0433-2435133, E-mail: liuliping@ybu.edu.cn

等作用。目前, ANP 作为一种快速反应型激素在运动中所起的作用已经引起了人们的广泛关注。Makoto Shono 等^[1]发现 ANP 参与心力衰竭时的抗氧化过程, 具有减轻心力衰竭氧化损伤的作用; Adrienne Laskowski 等^[2]研究表明, ANP 对乳鼠心肌细胞具有保护作用。但 ANP 是否对运动模型具有抗疲劳作用及其机制还不甚清楚。本研究采用小鼠在体和离体模型观察 ANP 抗氧化作用, 并探讨其作用机制, 从抗氧化的角度探讨抗疲劳, 为研究 ANP 分泌及其抗运动性疲劳作用提供必要的实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 ANP(北京北方生物技术研究所), LY83583 蛋白激酶 G 的阻断剂(美国 Sigma 公司), 丙二醛(malondialdehyde, MDA)及蛋白测试盒(南京建成生物工程研究所, 批号 20100128)。

1.2 动物 昆明种小鼠, 雄性, 体重为 20 ~ 22 g, 由延边大学医学部实验动物科提供, 合格证号 SCXK(吉)2003-0005, 饲养环境温度 25 ℃, 湿度 70%。

1.3 仪器 721 分光光度计(上海第三仪器厂)。

2 方法

2.1 负重游泳力竭运动实验 小鼠先进行游泳训练, 共游泳 2 次, 2 次间隔 3 d, 每次游泳 30 min。然后在小鼠尾部负重(体重的 5%)记录游泳基础时间, 共测 3 次, 每次间隔 3 d, 计算 3 次的 $\bar{x} \pm s$, 选择标准差 < 10 min 的小鼠 36 只随机分成 ANP 低、高剂量(6.55, 13.10 ng·kg⁻¹)组和对照组(生理盐水), 尾 iv 后立即尾部负重(10%体重)游泳, 记录小鼠游泳力竭时间。小鼠游泳力竭后立即脱颈, 细心分离出腓肠肌, 冷生理盐水冲洗, 滤纸吸干后称质量, 冰浴下制备成 15% 匀浆。匀浆液 MDA 及蛋白含量测量采用化学比色法, 严格按试剂盒说明书操作, 测定吸光度, 并根据公式计算 MDA 及蛋白含量。

2.2 对 H₂O₂ 诱导小鼠腓肠肌 MDA 含量的影响 将 20 只小鼠脱颈处死, 立即取出腓肠肌, 制备成腓肠肌组织匀浆液(同 2.1)。实验分为对照组、H₂O₂(模型)组、ANP + H₂O₂ 组、LY83583 + ANP + H₂O₂ 组。H₂O₂ 浓度为 0.2 mol·L⁻¹, ANP 浓度为 13.10 μg·L⁻¹, LY83583 为 0.3 mmol·L⁻¹。试管冰浴, 匀浆液分装, 每管 200 μL。实验时所有试管均置于 37 ℃ 恒温水浴中, 先将 LY83583 + ANP + H₂O₂ 组预处理 20 μL LY83583, 其他试管均加等量生理盐水, 震荡恒温水浴中孵育 15 min; 然后 ANP + H₂O₂ 组和

LY83583 + ANP + H₂O₂ 组分别处理 20 μL ANP, 其它试管均加等量生理盐水, 孵育 15 min; 最后 H₂O₂ 组、ANP + H₂O₂ 组、LY83583 + ANP + H₂O₂ 组分别给予 H₂O₂ 20 μL, 对照组给等量生理盐水, 孵育 15 min; MDA 及蛋白含量测定同 2.1。

2.3 统计学分析 采用 Prism(3.0 版)统计软件进行统计学处理。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析。P < 0.05 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠负重游泳时间及腓肠肌 MDA 含量的影响 高剂量 ANP 明显延长小鼠的游泳力竭时间, 与对照组比较差异显著(P < 0.01); 低剂量 ANP 有延长游泳力竭时间的趋势。高剂量 ANP 使小鼠腓肠肌 MDA 含量显著降低, 与对照组比较差异显著(P < 0.05)。低剂量 ANP 有降低 MDA 含量的趋势, 见表 1。

表 1 ANP 对负重游泳小鼠游泳时间及腓肠肌 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /ng·kg ⁻¹	游泳时间/s	MDA 含量 /nmol·mg ⁻¹
对照	-	41	21.66 ± 3.02
ANP	6.55	50	15.88 ± 2.06
	13.10	79 ²⁾	13.41 ± 1.46 ¹⁾

注: 与对照组比较¹⁾P < 0.05²⁾P < 0.01。

2.2 对 H₂O₂ 诱导腓肠肌 MDA 含量的影响 模型组 MDA 含量与对照组比较明显升高(P < 0.001); 预处理 ANP 组的 MDA 含量与模型组比较显著降低(P < 0.001), 接近对照组水平。而 LY83583 组预处理与 ANP 组比较 MDA 含量又明显升高(P < 0.01), 见表 2。

表 2 ANP 对 H₂O₂ 诱导离体腓肠肌 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/μg·L ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
对照	-	13.96 ± 1.38 ¹⁾
模型	0.2	18.91 ± 0.337
ANP	13.10	13.93 ± 1.276 ^{1,2)}
LY83583 ³⁾	0.3 × 10 ⁻³	15.38 ± 0.749

注: 与模型组比较¹⁾P < 0.001; 与 LY83583 组比较²⁾P < 0.01; ³⁾LY83583 的剂量单位为 mmol·L⁻¹。

4 讨论

自从 1981 年 De Bold 等首次发现 ANP 以来, ANP 的生物学作用及其产生机制被国内外学者所关注。近年来, 其抗氧化作用也成为热门课题。有研究^[3]表明, 外源性的 ANP 对大鼠肾缺血-再灌注损

伤具有一定的抗氧化保护作用。Makoto Shono 等发现 ANP 参与心力衰竭时的抗氧化过程,具有减轻心力衰竭氧化损伤的作用。Robert Fürst 等^[4] 研究表明,ANP 通过激活还原型辅酶 2(NADPH)氧化酶和 NADPH 氧化酶 2(NOX2)诱导人内皮细胞的蛋白激酶磷酸化,认为 ANP 参与氧化应激过程。另有很多学者观察了运动状态下 ANP 的变化。多数研究表明,人和动物在运动时心房或心室 ANP 基因表达增加,血浆 ANP 含量明显增加^[5-6]。

本实验结果发现,外源性 ANP 能使小鼠负重游泳力竭时间明显延长,并使小鼠腓肠肌 MDA 含量显著降低。离体实验进一步证实,ANP 预处理能够抑制由 H₂O₂ 诱导的腓肠肌组织中 MDA 含量的升高。本结果表明 ANP 具有抗疲劳作用,并进一步证实了 Makoto Shono 等人在病理状态下的研究结果,即 ANP 参与了机体组织细胞的抗氧化过程。体外实验显示了蛋白激酶 G 的阻断剂 LY83583 能够明显阻断 ANP 对疲劳细胞的保护作用。以往的研究表明,ANP 在体内发挥生物学作用时与心脏、血管、中枢神经系统、淋巴组织、生殖器官及肾脏组织等以结合形式存在的钠尿肽受体(NPR)结合而发挥其作用。NPR 种类有 NPR-A, NPR-B, NPR-C, ANP 主要与 NPR-A 结合。NPR-A 的膜内部分与鸟苷酸环化酶(GC)相耦联。当 ANP 与 NPR-A 受体结合时,通过 G 蛋白激活与其耦联的鸟苷酸环化酶,促进细胞内环一磷酸鸟苷(cGMP)的生成^[7-9]。因此,在运动状态下 ANP 生成增多或增加外源性的 ANP,均可使细胞内 cGMP 生成增多,而 cGMP 增加会激活蛋白激酶 G,从而产生舒张血管、降低血压、利钠利尿、抑制细胞增殖^[10]、调节免疫和保护细胞^[11]以及参与脂质代谢^[12]等作用。因此,本研究用了蛋白激酶 G 阻断剂 LY83583 做了预处理,结果发现 ANP 的抗疲劳作用消失,说明 ANP 抗疲劳也是通过增加蛋白激酶途径实现的。

综上,外源性 ANP 明显延长小鼠游泳力竭时间,并显著降低腓肠肌组织 MDA 含量,其作用与 ANP-环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G(ANP-cGMP-PKG)信号转导途径有关。

[参考文献]

[1] Shono M, Yoshimura M, Nakayama M, et al. Predominant effect of A-type natriuretic peptide on

reduction of oxidative stress during the treatment of patients with heart failure [J]. *Circ J*, 2007, 71(7): 1040.

- [2] Laskowski A, Woodman O L, Cao A H, et al. Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(1): 112.
- [3] 李英顺, 申东洙. 心房钠尿肽在大鼠肾缺血再灌注损伤中的体外抗氧化作用研究[J]. *中国西部科技*, 2009, 11(8): 31.
- [4] Fürst R, Brueckl C, Kuebler W M, et al. Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells via racl and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation[J]. *Circ Res*, 2005, 96: 43.
- [5] Edwards J G. Swim training increases ventricular atrial natriuretic factor (ANF) gene expression as an early adaptation to chronic exercise[J]. *Life Sci*, 2002, 70(23): 2753.
- [6] Gutkowska J, Paquette A, Wang D, et al. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 293(1): R267.
- [7] Brenner B M, Ballermann B J, Gunning M E, et al. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide [J]. *Physiol Rev*, 1990, 70(3): 665.
- [8] Chinkers M, Garbers D L. Signal transduction by guanylyl cyclases [J]. *Annu Rev Biochem*, 1991, 60:553.
- [9] Maack T. Receptor of atrial natriuretic factor [J]. *Annu Rev Physiol*, 1992, 54:11.
- [10] Calderone A, Thaik C M, Takahashi N, et al. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(4): 812.
- [11] Vollmar A M, Kierner A K. Immunomodulatory and cytoprotective function of atrial natriuretic peptide[J]. *Crit Rev Immunol*, 2001, 21(6): 473.
- [12] Lafontan M, Berlan M, Stich V, et al. Recent data on the regulation of lipolysis by catecholamines and natriuretic peptides[J]. *Ann Endocrinol*, 2002, 63(2 Pt 1):86.

[责任编辑 何伟]