·基础研究·

茶多酚对急性运动后大鼠骨骼肌组织损伤的保护作用

刘 霞[1] 李素云[1] 周春仙[1]

摘要

目的:探讨茶多酚对急性运动后大鼠骨骼肌组织损伤的保护作用。

方法:30只SD大鼠分为对照组(A)、运动组(B)和运动加茶多酚组(C),建立力竭运动模型,1周后测试骨骼肌组织钙离子(Ca^{2+})含量、钠泵(Na^+-K^+-ATP酶)和钙泵(Ca^{2+}-ATP酶)活性,以及在电镜和光镜下观察腓肠肌的形态和超微结构的变化。

结果:运动组与对照组相比,骨骼肌组织Ca^{2+}含量显著升高($P<0.05$),Ca^{2+}-ATP酶和Na^+-K^+-ATP酶的显著下降($P<0.05$),运动加茶多酚组与运动组相比,骨骼肌Ca^{2+}含量显著减少($P<0.05$),Ca^{2+}-ATP酶活性有上升趋势,Na^+-K^+-ATP酶活性显著升高($P<0.05$)。光镜和电镜观察运动组有明显的形态学变化和超微结构的损伤,运动加茶多酚组的超微结构损伤有明显改善。

结论:茶多酚可降低急性运动后骨骼肌组织中钙离子的含量,修复骨骼肌组织的损伤。

关键词 茶多酚;骨骼肌;三磷酸腺苷酶;钙离子;组织结构;力竭运动

中图分类号:R49,R873 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-05-0455-04

The protective effects of tea polyphenol on rats' skeletal muscle tissue injury caused by acute exercise/ LIU Xia, LI Suyun, ZHOU Chunxian//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(5): 455—458

Abstract

Objective: To approach the protection effects of tea polyphenol on rats' skeletal muscle tissue injury caused by acute exercise.

Method: Thirty rats were randomly divided into 3 groups, control group(A), exercise group (B) and exercise with tea polyphenol group(C). The rat model of acute exhausted exercise was established. One week later the content of Ca^{2+}, the activities of Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase in skeletal muscles were measured, and the changes of morphology and altrastructure of gastrocnemius were observed under optical and electric microscopes.

Result: Compared with A group, the content of Ca^{2+} increased($P<0.05$),activities of Ca^{2+}-ATPase and Na^+-K^+-ATPase dropped($P<0.05$) in B group. Compared with B group, the content of Ca^{2+} decreased($P<0.05$), activity of Ca^{2+}-ATPase had rising tendency and activity of Na^+-K^+-ATPase rose($P<0.05$) in C group. Evident morphological changes and ultrastructure injury were observed in B group, but in C group ultrastructure injury was lighter than those in B group.

Conclusion: Tea polyphenol can reduce the content of Ca^{2+} in skeleton muscles after acute exercise and repair the skeletal muscle tissue injury caused by acute exercise.

Author's address Dept. of Nutrition, Shanghai Traditional Chinese Medical University,201203

Key word tea polyphenol;skeletal muscle;Adenosine triphosphatase;tissue structure;exhaustive exercise

急性运动后,骨骼肌组织中自由基产生增多,钙代谢紊乱,抑制ATP合成,造成骨骼肌损伤,引起运动性疲劳[1]。茶多酚(tea polyphenol,TP)是绿茶的主要生理活性成分。大量的研究发现,TP是一种天然

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.05.014

1 上海中医药大学,201203

作者简介:刘霞,女,讲师,硕士; 收稿日期:2010-03-01

的抗氧化剂,具有显著的抗氧化作用,可消除人体内产生过多的自由基,保护细胞膜的结构[2—3]。然而TP对大鼠急性运动后骨骼肌损伤是否具有保护作用及其机制尚不清楚。本实验主要观察TP对大鼠力竭运动后骨骼肌组织Ca^{2+}含量和ATP酶活性的影响,以及组织形态学的变化,探讨TP对急性运动后大鼠骨骼肌损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与药物

日立牌Z-5000型原子吸收光谱仪(上海天美科学仪器有限公司制造),TECNAI-12透射电镜(荷兰Philips-FEI公司制造),日本Olympus显微镜,752紫外光栅分光光度计 (上海),SK-1快速混匀旋涡器(常州),塞多利斯BS110S电子秤(德国塞多利斯公司制造),80-2离心机。

茶多酚由上海复旦大学药学院提供,经农业部茶叶卫生质量检测中心检测,TP纯度为92%。其余均为分析纯试剂,用双蒸水溶解,置-20℃保存。ATP酶测试盒和总蛋白量测试盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 实验动物及分组

清洁级健康雄性SD大鼠30只,由上海中医药大学动物中心提供,体重120 ± 5g。分笼饲养,自由摄水进食,动物室温控制在22℃—24℃,湿度控制在40%—60%,自然光照,所有动物实验前均未进行过游泳运动。根据实验设计随机分为对照组(A)、运动组(B)、运动加茶多酚组(C),每组10只。

1.3 实验方法

动物给药均采用灌胃法, A、B组灌双蒸水1ml/d,C组灌茶多酚溶液300mg/kg·BW,每日1次,连续1周。第7天, B、C两组大鼠分别放入恒温玻璃水槽(100cm×60cm×70cm),水深30cm,水温31 ± 1℃。进行力竭游泳试验力竭判断标准参照Thomas等报道文献[4]。

1.4 指标测定

1.4.1 样本采集:A组安静状态下,B、C组大鼠力竭后即刻,分别脱臼处死,取出左、右后肢腓肠肌肉,用冰生理盐水漂洗后用滤纸吸干,将左后肢腓肠肌切割两部分,一份用滤纸稍吸干后,用分析天平称重,纱布包裹,用试剂纸标记下每份重量,放于-20℃冰箱保存待测组织钙离子含量;剩余部分滤纸吸干后纱布包裹,于液氮中封冻备用,用于检测Ca^{2+}-ATP酶和Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性。右肢腓肠肌[5]用于形态学观察。

1.4.2 测定方法:①Ca^{2+}-ATP酶和Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性采用酶促反应定磷法测定。测得的ATP酶用蛋白含量修正,蛋白定量参照Macart的方法采用考马斯亮蓝法测定[5]。②组织钙离子含量采用原子吸收分光光度计测量[6]。③显微镜切片制备:甲醛溶液固定,通过石蜡包埋,采用Leica超薄切片机,切片厚度为4μm以HE染色制成切片,显微镜下观察[7];④透射电镜制样:A组任选2只,B、C组分别任选3只大鼠,腓肠肌置于2%—2.5%戊二醛固定2h,磷酸缓冲液清洗3次,用1%锇酸固定1—2h,再用磷酸缓冲液清洗3次,脱水,无水丙酮:包埋液浸透4h,包埋分别在37℃、60℃包埋12h、48h,半薄定位超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染法染色,TECNAI-12透射电镜观察并摄片

1.5 统计学分析

所有数据处理均用SPSS13.0统计分析,采用单因素方差分析,数据以均数+标准差表示。显著性水平为$P<0.05$。

2 结果

2.1 绿茶多酚对大鼠力竭运动即刻后骨骼肌组织中总钙含量的影响

由表1可知,经完全单因素方差分析,各组骨骼肌组织Ca^{2+}的含量有显著性差异。B组骨骼肌组织中Ca^{2+}含量较A组明显升高($P<0.05$)。表明力竭运动可导使骨骼肌中Ca^{2+}含量升高,引起骨骼肌组织钙超载现象;而C组骨骼肌中Ca^{2+}含量较B组显著减少($P<0.05$),与A组相比差异无显著性。表明茶多酚可以抑制力竭运动后骨骼肌组织中Ca^{2+}含量的增加,维持钙稳态。B组骨骼肌中Ca^{2+}-ATP酶、Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性较A组显著性下降($P<0.05$),说明力竭运动使骨骼肌能量代谢发生障碍,细胞内外Ca^{2+}、Na^{+}、K^{+}交换失衡,诱使骨骼肌的损伤。而C组Ca^{2+}-ATP酶活性较B组有上升的趋势,但差异无显著性,Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性显著性提高($P<0.05$),与A

组相比差异无显著性意义。表明茶多酚能抑制力竭运动后骨骼肌中Ca^{2+}-ATP酶、Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性的下降,保持骨骼肌细胞内外Ca^{2+}、Na^{+}、K^{+}交换平衡,改善骨骼肌的能量代谢,进而有效地减轻力竭运动对骨骼肌造成的损伤。

表1 茶多酚对大鼠力竭运动后骨骼肌组织中总钙含量以及ATP酶活性的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	钙含量 (μg/g)	Ca^{2+}-ATP酶 (μmol·mg /Pro·h)	Na^{+}-K^{+}-ATP酶 (μmol·mg /Pro·h)
A组	33.15±15.03	2.20±1.41	18.83±3.06(0.03)
B组	69.70±25.14①	0.93±0.60①	15.04±1.46①
C组	46.56±19.57②	2.05±1.23	18.06±2.18②

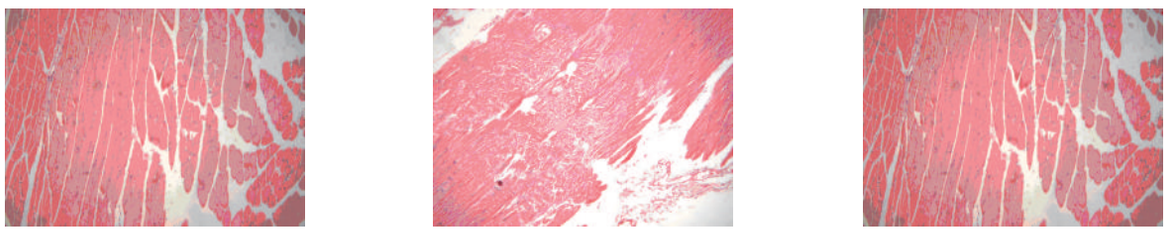
①与A组相比$P<0.05$; ②与B组相比$P<0.05$

2.2 肌肉形态学研究结果

2.2.1 光镜观察结果:见图1—2。A组:骨骼肌肌原纤维排列整齐且有规则;B组:肌原纤维结构紊乱,粗细不均匀,肌纤维两侧的结缔组织排列不规则,有皱曲现象;C组:肌原纤维排列偶见紊乱,接近正常。

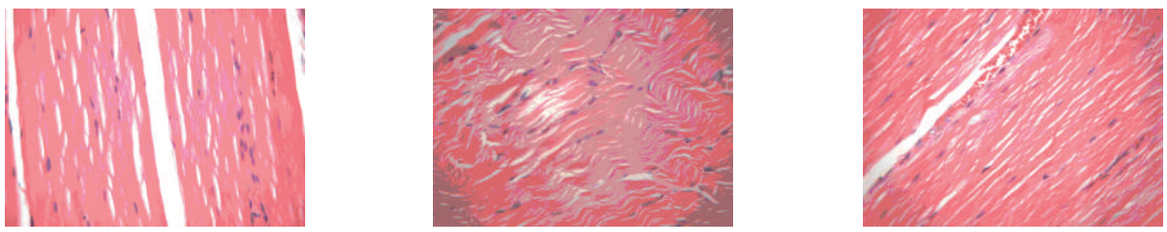
2.2.2 电镜观察结果:见图3。A组:肌丝排列正常,肌节规律,Z带清晰可见,形态正常。B组:肌丝散乱无序,肌节模糊,Z带出现异常,线粒体肿胀、嵴紊乱、出现空泡变性。C组:正常肌原纤维束间,杂有少量异常肌原纤维,线粒体空泡现象明显减少。

图1 急性运动后大鼠骨骼肌组织损伤的各组光镜观察 (HE,×100)



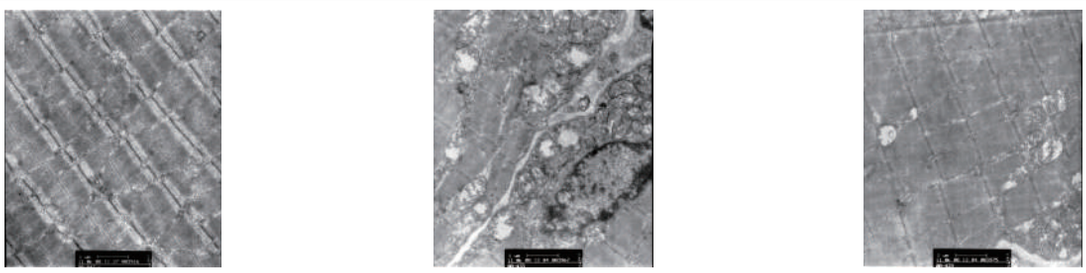
对照组　运动组　运动加茶多酚组

图2 急性运动后大鼠骨骼肌组织损伤的各组光镜观察 (HE,×400)



对照组　运动组　运动加茶多酚组

图3 急性运动后大鼠骨骼肌组织损伤的各组骨骼肌超微结构 (电镜,×11000)



对照组　运动组　运动加茶多酚组

3 讨论

运动性骨骼肌损伤是医学实践中比较普遍出现的现象[8],也一直是运动医学研究的热点。本研究是以力竭运动为实验模型来研究急性运动后骨骼肌损伤情况。实验结果发现,急性运动后骨骼肌出现明显的组织形态结构和超微结构的异常变化,说明骨骼肌发生了损伤。而本实验结果又表明,力竭运动后骨骼肌组织出现钙超载现象,证实了钙超载可

引起骨骼肌损伤。目前关于钙超载损伤机制主要有以下几种[9—12]：①激活细胞膜磷脂酶A2，引起肌膜损伤，肌浆酶外流和骨架蛋白水解；②激活中性蛋白水解酶，引起肌原纤维蛋白和胞内内骨架蛋白等发生水解，影响溶酶体的功能，促进溶酶体膜分解、破裂，导致酸性磷酸酶释放增多，引起细胞损伤；③引起线粒体肿胀和嵴断裂，抑制线粒体内氧化磷酸化过程，减少ATP生成，使细胞能量供应不足，加重细胞损伤。

Ca^{2+}-ATP酶是肌肉收缩能力的重要生化指标[11]，Na^{+}-K^{+}-ATP酶对自由基非常敏感[13]，此酶失活成为Ca^{2+}内流的主要因素[14]。本研究中发现骨骼肌中钙超载现象与Ca^{2+}-ATP酶和Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性有关，实验结果提示力竭运动后骨骼肌组织中Ca^{2+}-ATP酶和Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性显著下降，钙含量明显增加，能量代谢障碍，肌肉收缩能力下降。这可能是与力竭运动引起骨骼肌中自由基代谢旺盛，产生脂质过氧化反应有关[15]。而大量的脂质过氧化物会使肌膜通透性改变，细胞外Ca^{2+}内流，同时细胞Ca^{2+}-ATP酶失活，胞内钙外流障碍，Na^{+}-K^{+}-ATP酶失活，胞内Na^{+}含量增加，刺激Na^{+}- Ca^{2+}交换，使Ca^{2+}内流增加[16]，出现骨骼肌组织钙离子大量聚集的现象。

本实验结果显示，茶多酚干预后能提高力竭运动即刻后骨骼肌组织中Ca^{2+}-ATP酶和Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性，有效抑制Ca^{2+}含量的升高。这是与茶多酚的强抗氧化性是密切相关的[3]，茶多酚通过抑制自由基作用来减轻膜脂质过氧化反应，保护组织中ATP酶活性，从而减轻组织中钙超载。再结合电镜和光镜观察，可知茶多酚可改善骨骼肌组织形态结构和超微结构的异常变化，出现明显好转，接近正常。由此可见，茶多酚能够减轻急性运动造成的骨骼肌损伤程度。

参考文献

[1] 周锦琳，田野. 急性运动对大鼠骨骼肌线粒体 Ca^{2+}-ATP酶和H^{+}-ATP酶活性的影响[J].北京体育大学学报，2001，24(3)：320—322,346.

[2] Zhao BL. Antioxidant effects of green tea polyphenols[J]. Chin Sci Bull，2003，48(4)：315-319.

[3] 周彤，熊丽萍，杨绍虞. 茶叶的抗氧化作用研究[J].世界元素医学，2005，12(2)：42—45.

[4] Thomas DP, Marshall KI. Effects of repeated exhaustive exercise on myocardial sub cellular membrane structures[J]. Int J Sports Med，1998，9(4)：257—260.

[5] 高宝勤，王拥军，孙异临，等. A型肉毒毒素对痉挛性瘫痪大鼠腓肠肌作用的实验研究[J].中国康复医学杂志，2008，23(8)：683—686.

[6] 刘霞，路新国. 茶多酚对运动小鼠心肌钙离子、ATP酶及自由基代谢的影响[J].中国康复医学杂志，2007，22(12)：1062—1063,1068.

[7] 彭峰林，陆艳玲，张林，等. 间歇运动训练对缺血再灌注损伤大鼠心脏的保护作用[J].中国康复医学杂志，2009，24(10)：910—913.

[8] 郭刚，赵海燕，宋吉锐. 白藜芦醇对离心运动后骨骼肌微损伤的修复[J].中国组织工程研究与临床康复，2009，13(24)：4677—4681.

[9] 李善妮，夏君玫，王瑜娟. 急性力竭运动对大鼠肝细胞损伤的影响[J].武汉体育学院学报，2006，40(1)：61—65.

[10] Vissing K, Overgaard K, Nedergaard A, et al. Effects of concentric and repeated eccentric exercise on muscle damage and calpain-calpastain gene expression in human skeletal muscle[J]. Eur J Appl Physiol，2008，103(3)：323-—332.

[11] Mortensen OH, Andersen K, Fischer C, et al. Calprotection is released from human skeletal muscle tissue during exercise [J]. Physiol，2008，586(14)：3551—3562.

[12] 童涛，易定国，王娅丹. 运动训练对骨骼肌三磷酸腺苷酶活性的影响[J].咸宁学院学报，2008，28(3)：139—141.

[13] 李爽，王蕾，冯云辉，等. 黄芪总苷对一次性力竭游泳大鼠脑组织三磷酸腺苷酶活性的影响[J].中国康复医学杂志，2009，24(7)：641—643.

[14] Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, et al. Immunosuppressant FK506 enhance phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1993，90(21)：9808—9812.

[15] 张继红，焦晓明，曹芳洪，等.地黄丸对运动大鼠心肌和骨骼肌损伤的影响[J].中国康复医学杂志，2009，24(4)：342—344.

[16] Kaminish T, Matsvoka T, Yana Gish Ita T, et al. Increase vs. decrease of calcium uptake by isolated heart cells induced by H_2C_2 vs. HOCl[J]. Am J Physiol，1989，256(3)：598—607.