

大蒜素预处理对运动大鼠心肌细胞凋亡的影响*

丁海丽^{1,2} 苏全生²

摘要

目的:观察大蒜素预处理对一次性大负荷游泳运动后大鼠心肌细胞凋亡的影响,并分析其可能机制。

方法:将48只大鼠随机分为安慰剂组(A组)和用药组(B组),两组又各分为安静对照(A₀、B₀)、运动后即刻(A₁、B₁)和运动后24h(A₂、B₂)3小组。B组每日定时经口腔灌胃给予大蒜素30mg/kg体重,A组给予相同体重比例的安慰剂(蒸馏水)。两周后,观察各组在安静时及完成一次性大负荷游泳运动后即刻、运动后24h心肌细胞凋亡情况;心肌组织SOD活性、MDA含量及心肌超微结构变化情况。

结果:A、B两组运动后即刻心肌细胞凋亡率都非常显著升高,B组显著低于A组对应时相。心肌SOD运动后明显升高,B组显著高于A组对应时相;MDA变化趋势则与SOD相反。心肌超微结构A₁组表现为线粒体肿胀,染色质趋边固缩,核膜不清晰;胞浆中空泡增多、变大,并且出现凋亡小体;A₂组和B₁组结构改变较轻微,B₂组超微结构已趋于正常。

结论:大蒜素可能抑制运动性大鼠心肌微损伤过程中的心肌细胞凋亡现象。

关键词 大负荷运动;大蒜素;心肌微损伤;细胞凋亡;大鼠

中图分类号:R493,R541.4 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-07-0651-04

Effects of preceding Allicin on cardiomyocyte apoptosis in rat after exercise/DING Haili,SU Quansheng// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(7): 651—654

Abstract

Objective:To observe effects of preceding Allicin on the apoptosis and the changes of ultrastructure of cardiomyocyte in rats after once higher loading swimming and to analyze the mechanism.

Method: Forty-eight SD rats were divided into placebo group(A) and medication group(B) randomly. Rats of group B were feed with Allicin by intragastric administration and the timing dosage was 30mg/kg/d. Rate of group A were feed with placebo(distilled water), which dosage was the same as in group B. After 2 weeks, all groups were observed for apoptosis and ultrastructure changes of heart muscle cells, SOD, MDA of heart muscle cells, before and instant after and 24h after once higher loading swimming.

Result:The apoptosis rate at instant after exercise of group A and B all increased significantly, while the apoptosis rate was lower significantly in group B than in group A at the same phase. The SOD activities of heart muscles after exercise increased apparently,and was higher in group B than in group A significantly at the same phase. While the change trend of MDA was opposite to SOD. Heart muscle cells ultrastructure of group A₁ represented the tumescence of mitochondria, chromatin accumulation in nucleus, and unsharpness of nuclear membrane. The structure changes of A₂ and B₁ were less, and ultrastructure of B₂ almost approached the normal level.

Conclusion: Allicin could inhibit apoptosis in heart muscle with micro-injuries related to exercise in rats.

Author's address Institute of Human Movement Science, Beijing Sport University, 100084

Key word higher loading movement; Allicin; cardiac microdamage; cell apoptosis; rat

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.07.004

*基金项目:国家体育总局运动医学重点实验室资助项目;四川省实验教学示范中心资助项目

1 北京体育大学运动人体科学学院,北京,100084; 2 成都体育学院运动医学系

作者简介:丁海丽,女,博士在读; 收稿日期:2014-07-21

心脏作为对运动强度最敏感的器官,对运动能力的提高起着至关重要的作用。研究显示,虽然在适宜运动中同样存在缺血、缺氧现象,但在自我保护机制的调控下并不引起心肌细胞凋亡的增加,也不会对心脏造成损伤。而一旦运动负荷超出了机体防御的能力与心脏的耐受性,可导致心肌细胞过度凋亡,造成心脏损伤^[1]。有研究发现^[2-4],大蒜素可以抑制细胞缺氧/复氧损伤过程中的细胞凋亡现象。本实验旨在以大蒜素作为预防性药物,通过灌胃给予大鼠药物,观察大蒜素预处理对一次性大负荷游泳运动后大鼠心肌细胞凋亡及心肌超微结构的影响,并分析其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

成年SD雄性普通级大鼠48只,体重(246±24.2)g,由四川大学华西医学中心实验动物服务站提供,室温28—31℃,相对湿度40%—60%,自然光照。大蒜素购自浙大药业有限公司,批号:20080802。大鼠用药溶解成浓度3mg/ml。

1.2 动物分组及处理因素

实验大鼠适应性喂养2d后,随机分为安慰剂组(A组,n=24)和用药组(B组,n=24)两大组。两组又各分为安静对照(A₀,n=8、B₀,n=8)、运动后即刻(A₁,n=8、B₁,n=8)和运动后24h(A₂,n=8、B₂,n=8)3小组。B组两周内每日定时经口腔灌胃给药30mg/kg体重,A组以同样方式给予相同体重比例的安慰剂(蒸馏水)。

正式实验前,所有动物进行适应性游泳训练,时间为10min。两周后,除A₀、B₀组外其余各组进行一次大负荷游泳运动。采用驱赶法使大鼠负重游泳至运动终止,负重量为大鼠自身体重的5%,水温30±1℃,水深60cm。终止运动标准:大鼠沉入水下无法返回水面超过10s,捞出休息2min后继续运动,如此反复3次后终止运动。

1.3 指标检测及仪器方法

各组取大鼠心肌组织,TUNEL—AP(原位末端标记法)法进行心肌细胞凋亡定性检测并计算细胞凋亡阳性率=阳性细胞数占视野中所有细胞的百分比×100,每张切片取5个高倍镜(4.0×100倍)视野,取其平

均值。黄嘌呤氧化酶法检测心肌SOD、TBA(硫代巴比妥酸法)法检测心肌MDA,试剂盒由南京建成生物工程研究所出品,仪器为法国SP500型半自动生化分析仪。H-600IV型透射电镜观察心肌超微结构,并进行拍照。

1.4 统计学分析

统计分析使用SPSS 17.0统计软件进行,用方差分析和组间两两显著性 t 检验;显著性差异水平为 $P<0.05$,非常显著性差异水平为 $P<0.01$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠游泳时间比较

A₁、A₂、B₁、B₂组的游泳时间分别为(89.0±23.5)min、(87.5±17.5)min、(87.0±21.0)min、(91.0±11.5)min,各组间比较无显著性差异。

2.2 大鼠心肌细胞凋亡检测结果

TUNEL检测各组大鼠心肌细胞凋亡照片见图1。安慰剂组运动后即刻和运动后24h心肌细胞凋亡阳性率均非常显著升高;用药组运动后即刻心肌细胞凋亡阳性率非常显著高于安静时,而运动后24h心肌细胞凋亡阳性率非常显著低于运动后即刻。用药组运动后即刻心肌细胞凋亡阳性率显著低于安慰剂组对应时相;而用药组运动后24h非常显著低于安慰剂组运动后24h对应时相(表1)。

2.3 大鼠心肌超微结构变化

安慰剂组运动后即刻可见肌纤维溶解及横纹不清晰;线粒体肿胀,嵴断裂或消失,出现空泡变性;染色质趋边固缩,核膜不清晰;胞浆中空泡增多、变大,并且出现凋亡小体。24h后可见肌纤维排列整齐;线粒体结构较清晰,但有轻度肿胀,包膜及嵴较完整;胞核内染色质轻度聚集,核膜较完整。用药组运动后即刻肌纤维排列较整齐;线粒体轻度肿胀,出现小面积空泡变性;胞核内染色质轻度聚集,核膜较完整。用药组运动后24h结构趋于正常,可见肌纤维

表1 两组大鼠运动前后心肌细胞凋亡率变化情况($\bar{x}\pm s$,%)

组别	运动前 (A ₀ 、B ₀)	运动后即刻 (A ₁ 、B ₁)	运动后24h (A ₂ 、B ₂)
安慰剂组(A)	0.77±0.20	9.37±1.23 ^①	6.35±0.67 ^①
用药组(B)	0.85±0.28	5.86±0.80 ^{②④}	2.52±0.46 ^{③⑤}

注:与A₀相比:① $P<0.01$;与B₀相比:② $P<0.01$;与B₁相比:③ $P<0.01$;与A₁相比:④ $P<0.05$;与A₂相比:⑤ $P<0.01$ 。

排列整齐;线粒体结构清晰,大小正常、包膜及嵴完整;胞核内染色质均匀,核膜完整(见图2)。

2.4 各组心肌组织SOD和MDA变化

安慰剂组心肌SOD活性运动后即刻非常显著低于安静状态,运动后24h有所回升但仍显著低于安静时;心肌MDA含量的变化与SOD相反,为运动后即刻非常显著高于安静状态,运动后24h有所下降但仍显著高于安静时。用药组运动后SOD和MDA的变化趋势与安慰剂组相似。两组对应时相比较发现,用药组心肌SOD活性在运动后即刻和运动后24h均显著高于安慰剂组,MDA含量则非常显著降低(见表2,表3)。

3 讨论

本实验采用TUNEL—AP(原位末端标记法)法

表2 两组大鼠运动前后心肌组织SOD活性变化情况 ($\bar{x}\pm s$, U/ml)

组别	运动前(A ₀ 、B ₀)	运动后即刻(A ₁ 、B ₁)	运动后24h(A ₂ 、B ₂)
安慰剂组(A)	116.18±5.76	94.20±3.52 ^①	102.90±3.34 ^②
用药组(B)	117.34±7.23	105.68±8.38 ^{③④}	114.03±3.12 ^⑤

注:与A₀相比:①P<0.01,②P<0.05;与B₀相比:③P<0.05;与A₁相比:④P<0.05;与A₂相比:⑤P<0.05。

表3 两组大鼠运动前后心肌组织MDA含量变化情况 ($\bar{x}\pm s$, nmol/ml)

组别	运动前(A ₀ 、B ₀)	运动后即刻(A ₁ 、B ₁)	运动后24h(A ₂ 、B ₂)
安慰剂组(A)	4.08±0.60	7.50±0.94 ^①	5.76±0.82 ^{②③}
用药组(B)	3.71±0.64	5.15±0.74 ^④	3.81±0.93 ^⑤

注:与A₀相比:①P<0.01,②P<0.02;与A₁相比:③P<0.05,④P<0.01;与A₂相比:⑤P<0.01。

检测各组大鼠心肌细胞凋亡,结果发现安慰剂组大鼠运动后即刻和运动后24h心肌细胞凋亡率均非常显著高于安静状态,电镜结果显示运动后即刻染色

图1 各组大鼠心肌细胞凋亡情况 (TUNEL, ×400)

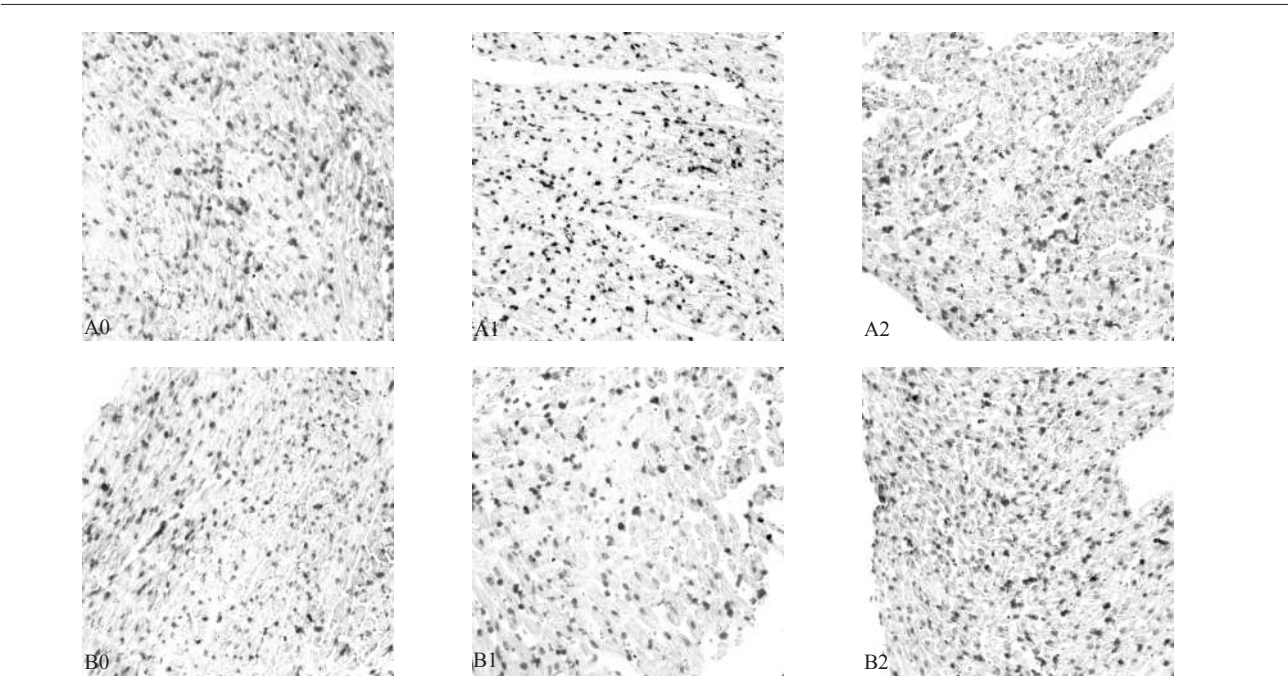
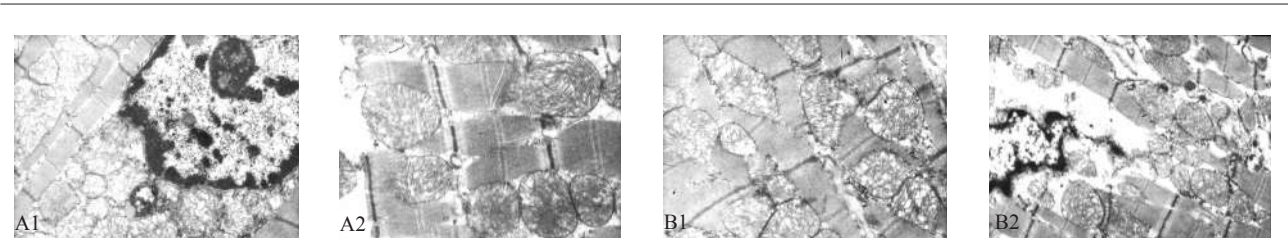


图2 TUNEL法检测心肌细胞凋亡情况 (×10,000)



质趋边固缩,核膜不清晰;胞浆中空泡增多、变大,并且出现凋亡小体;运动后24h核内染色质仍有聚集,表明大负荷游泳运动可引起心肌细胞凋亡数目增加。这可能与心肌细胞凋亡加心脏实质细胞的丢失有关,提示心肌细胞凋亡参与由于运动超负荷而致的病理性失代偿心脏转变过程,并在此过程中起重要作用。而运动后24h仍然显著高于安静状态则可能说明,大负荷运动导致的心肌细胞凋亡增加不仅在心肌缺血/缺氧过程中较为明显,而且在运动后的复氧和再灌注损伤中同样明显。

有研究发现^[5-6],自由基可以作为氧化应激的结果触发细胞凋亡,也可是其他药剂引起凋亡的中间步骤之一,加入活性氧或耗竭细胞内抗氧化剂,可导致凋亡。本实验中安慰剂组大鼠心肌细胞凋亡率与MDA含量的变化趋势相似,与SOD活性的变化趋势则相反,这与上述研究相一致。现代医学表明,大蒜素具有清除自由基、抗菌消炎、提高免疫功能和减轻钙超载介导的细胞损伤等作用。近年来,已有研究证实大蒜素具有一定的抗氧化活性和清除自由基功能,并对运动后氧自由基介导的骨骼肌损伤具有一定的保护作用^[7-10]。

本实验中一次性大负荷游泳运动导致的心肌损伤主要表现在心肌细胞超微结构的破坏、心肌细胞凋亡数目增加及自由基代谢变化等。实验结果提示:大蒜素对安静状态下心肌纤维超微结构、心肌细胞凋亡及心肌组织自由基代谢并无显著影响,但在一次性大负荷游泳运动后则起到明显的保护作用。电镜结果显示大蒜素对一次性大负荷游泳运动导致的心肌超微结构损伤起到了一定的保护作用,即用药组运动后即刻、运动后24h心肌组织结构损伤情况与安慰剂组对应时相比,相对较轻。

我国史春志^[4]等将培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤模型进行预处理后与对照组相比较,首次发现大蒜素具有抗心肌细胞凋亡的作用。在本研究中,用药组大鼠心肌细胞凋亡率的变化趋势与安慰剂组基本一致,但两组相比较,用药组大鼠运动后即刻和运动后24h心肌细胞凋亡率均非常显著低于安慰剂组对应时相,用药组大鼠心肌细胞凋亡率与MDA含量的变化趋势相似,与SOD活性的变化趋

势则相反。提示大蒜素可以在一定程度上抑制运动性心肌损伤过程中的细胞凋亡现象,这可能与大蒜素通过清除心肌组织氧自由基,从而抑制氧自由基介导的心肌细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] 常芸,袁箭峰,祁永梅,等. 运动心脏重塑与微损伤发生中的细胞凋亡现象[J]. 中国运动医学杂志,2003,22(4):344—349.
- [2] SHI Chun-zhi,ZHANG Hui-li,WU Shi-yao,Allitridum attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2, Bax and NF- κ B[J]. Chin Heart J,2010(6):814—820.
- [3] 傅俊英,史载祥,刘秀华,等. 大蒜素对乳鼠心肌细胞延迟预处理保护作用及其信号转导机制的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2004,10(5):37—41.
- [4] 史春志,谷翔,冯义柏,等. 大蒜素对培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤细胞凋亡的影响[J]. 江苏医药,2006,1(32):554—565.
- [5] Skemiene K,Jablonskiene G,Liobikas J,et al. Protecting the heart against ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis: the effect of anthocyanins[J]. Medicina (Kaunas),2013,49(2):84—88.
- [6] 刘艳霞,刘佳妮,沈明志,等. EDRV和DIDS对急性缺血再灌注心肌组织活性氧水平的影响[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(4):648—652.
- [7] Su QS,Tian Y,Zhang JG,et al. Effects of allicin supplementation on plasma markers of exercise-induced muscle damage, IL-6 and antioxidant capacity[J]. Eur J Appl Physiol,2008,103:275—278.
- [8] 王东辉,孙君志,苏全生,等. 大蒜素对大鼠离心运动后不同时相血清自由基代谢的影响[J]. 中国体育科技,2007,43(1):138—141.
- [9] 赵广高,苏全生,李新建,等. 大蒜素与联合抗氧化剂对一次大强度离心运动后运动员血清T-AOC等水平的影响[J]. 首都体育学院学报,2012,24(2):189—192.
- [10] 赵广高,苏全生,付近梅,等. 大蒜素防治运动性疲劳的研究进展[J]. 现代预防医学,2014,41(5):797—800.
- [11] 李建钢,蔡文丽. 大蒜素对一次大强度运动后心肌钙蛋白及抗氧化能力的影响[J]. 武汉体育学院学报,2012,46(4):89—92.
- [12] Ezemonye L, Ikpesu T. Changes in carbohydrate metabolism,oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of Oreochromis niloticus exposed in vitro to endosulfan[J]. Toxicol Ind Health,2013,29(4):325—333.
- [13] 潘月顺,仇琪. 不同负荷运动对慢性心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国运动医学杂志,2013,32(12):1082—1087.