

毛蕊花苷对递增负荷运动小鼠骨骼肌损伤的保护作用

朱梅菊, 朱洪竹*, 张崇林, 王 卉, 伍人乐

井冈山大学体育学院, 江西 吉安 343009

摘要:本研究采用小鼠跑台训练模型,应用免疫共沉淀等方法,研究毛蕊花苷对递增负荷运动小鼠骨骼肌损伤的保护作用及对谷胱甘肽的影响。90只小鼠随机分为:正常对照组(A)、正常+毛蕊花苷组(B)、单纯运动组(C)、运动+毛蕊花苷低剂量组(D)、运动+毛蕊花苷中剂量组(E)、运动+毛蕊花苷高剂量组(F)。结果表明:与C组比较,D、E、F组小鼠骨骼肌损伤程度依次减轻,F组小鼠骨骼肌形态基本正常。F组小鼠血浆CK水平、骨骼肌组织GSSG含量分别低于C、D、E组;但CK水平高于A、B组,均 $P < 0.01$;GSSG含量与A、B组比较,差异无显著性, $P > 0.05$ 。F组小鼠骨骼肌组织GSH含量、GSH/GSSG比值、GCL和GR酶活性、RyR1复合物中GSH表达水平分别高于C、D、E组,但低于A、B组,均 $P < 0.01$ 。研究结果提示毛蕊花苷能降低递增负荷运动小鼠血浆CK的活性,保护运动鼠骨骼肌的形态;其机理与其提高运动鼠骨骼肌组织GSH含量和GCL、GR酶的活性,降低GSSG/GSH比值;提高RyR1复合物中GSH表达水平有关。

关键词:毛蕊花苷;运动;骨骼肌;谷胱甘肽;RyR1

中图分类号:G804.7;R49

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.2.008

Protective Effect of Verbascoside on Skeletal Muscle Damage Induced by Incremental Load Exercise in Mice

ZHU Mei-ju, ZHU Hong-zhu*, ZHANG Chong-lin, WANG Hui, WU Ren-le

School of Sports Science, Jinggangshan University, Ji an 343009, China

Abstract: Using the training model of mice running and the methods of immunoprecipitation and immunoblotting, this study aimed to investigate the protective effects of verbascoside on skeletal muscle damage by incremental load exercise and glutathione of mice. Ninety mice were divided into six groups including: the normal group (A), the normal + verbascoside treated group (B), the exercise group (C), the exercise + verbascoside treated by the low dosage (D), the exercise + verbascoside treated by the moderate dosage (E), the exercise + verbascoside treated by the high dosage (F). The results showed that the degree of skeletal muscle damage decreased in turn in the three groups of exercise + verbascoside (D, E, F) compared with group C. The skeletal muscle morphology of the mice in group F was almost normal. The plasma CK levels and skeletal muscle tissue GSSG content in group F were lower than those of groups of C, D, E ($P < 0.01$). The plasma CK levels in group F were higher than those of groups of A and B ($P < 0.01$), but there is no significant difference in the skeletal muscle tissue GSSG content among group F, A and B ($P > 0.05$). The GSH contents, GSH/GSSG ratios, the enzyme activities of GCL and GR in skeletal muscle tissue, the levels of protein expression of GSH in RyR1 complexes of mice in group F were higher than those of groups C, D, E, but were lower than those of group A and B ($P < 0.01$). The results suggested that verbascoside can reduce the levels of plasma CK, protect the morphology of the skeletal muscle of mice exercised by incremental load. Its mechanism was related to verbascoside increasing of GSH contents and the enzyme activities of GCL and GR in skeletal muscle, improving the levels of protein expression of GSH in RyR1 complexes and decreasing the ratios of GSSG/GSH in skeletal muscle of mice exercised by incremental load.

Key words: verbascoside; exercise; skeletal muscle; glutathione; RyR1

收稿日期: 2017-09-12 接受日期: 2017-12-04

基金项目: 国家自然科学基金(31360255, 31660291, 31160217); 江西省自然科学基金(20151BAB205070); 井冈山大学博士启动基金(JZB11043)

* 通信作者 Tel: 86-796-8100491; Email: zhuhongzhu2007@163.com

毛蕊花苷是本课题组从马先蒿属植物中提取的苯丙素苷类化合物。研究表明该类化合物具有较明显的体外延缓骨骼肌疲劳作用^[1], 提高大强度递增负荷运动小鼠心肌、骨骼肌和肾组织超氧化物歧化

酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量作用^[2]。但目前止,有关毛蕊花苷对运动鼠骨骼肌损伤的保护作用研究较少。氧自由基增多是导致运动性骨骼肌损伤的关键因素之一^[3,4]。谷胱甘肽(glutathione, GSH)是一种由谷氨酸,半胱氨酸和甘氨酸3个氨基酸组成的短肽,在机体抗氧化系统中起着关键作用^[5]。因此,本研究旨在进一步探讨毛蕊花苷对大强度递增负荷运动小鼠骨骼肌损伤的保护作用及对骨骼肌组织中还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)、GSH合成的限速酶(γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶, glutamate cysteine ligase, GCL)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)和主要钙离子释放通道RyR1(ryanodine receptor 1, RyR1)复合物中glutathione表达的影响,为毛蕊花苷在体育运动实践中的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康、雄性、SPF级的6周龄昆明种小鼠90只,体重 25.67 ± 3.47 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(SCXK(湘)2011-0003)。实验小鼠适应

性喂养3 d后,按安全随机法分为6组:正常对照组(A),正常+毛蕊花苷组(B),单纯运动组(C),运动+毛蕊花苷低剂量组(D),运动+毛蕊花苷中剂量组(E),运动+毛蕊花苷高剂量组(F)。每组15只,分笼饲养,自由饮食,室温 $23 \sim 25$ °C,相对湿度45%~55%,室内空气流通,光照时间12 h,并定期地用紫外线光照进行消毒。

1.2 运动方案

除正常对照组和正常+毛蕊花苷组外,其余各组小鼠均采用跑台运动方式,对小鼠进行递增大强度负荷训练。主要的实验仪器是:ZH-PT动物实验跑台(淮北正华)。并采用电刺激、光刺激、声音刺激对不跑或者消极跑动的小鼠进行驱赶。每天观察并记录小鼠的一般情况。跑台运动方案参照汶希,潘华山等建立的大鼠跑台运动疲劳模型^[6],跑台坡度为 0° ,具体见表1。正常对照组和正常+毛蕊花苷组小鼠在同样的条件下常规喂养,自由活动,但不进行跑台训练。实验第16 d除正常对照组和正常+毛蕊花苷组外,其余各组均进行一次力竭跑台运动。

表1 小鼠运动方案(m/min × min)

Table 1 The treadmill exercise training program of mice(m/min × min)

次 Week	星期一 Monday	星期二 Tuesday	星期三 Wednesday	星期四 Thursday	星期五 Friday	星期六 Saturday	星期日 Sunday
第一周 The first week	15 × 15	15 × 15	18 × 20	18 × 20	18 × 25	18 × 25	20 × 25
第二周 The second week	25 × 25	25 × 25	25 × 30	25 × 30	30 × 30	30 × 30	30 × 30

1.3 药物处理及给药方法

毛蕊花苷购自北京索莱宝科技有限公司,纯度99%。使用前先用生理盐水溶解,用灌胃法,每天灌胃1次。药物剂量换算参照文献^[4]。运动+毛蕊花苷低剂量组,运动+毛蕊花苷中剂量组,运动+毛蕊花苷高剂量组小鼠,分别按照1、5、10 mg/kg,每天灌胃毛蕊花苷,在跑台训练前的两个小时内进行。正常+毛蕊花苷组,按5 mg/kg,每天灌胃毛蕊花苷。正常对照组、单纯运动组用等体积的生理盐水灌胃,实验时间为两周。

1.4 动物取材

小鼠力竭运动结束后即刻,心脏采血,肝素抗凝,然后在冰浴上分离小鼠左后肢比目鱼肌,称重。置液氮速冻,随后转移至-70 °C冰箱,保存待测。

1.5 血浆CK水平和骨骼肌组织GSH和GSSG含量、GCL和GR酶活性的测定

血浆肌酸激酶CK水平、骨骼肌组织GSH和GSSG含量均采用生物化学法,试剂盒均由南京建成提供,日本日立7600全自动生化分析仪测定。GSSG为总GSH减去GSH值。

骨骼肌GCL和GR活性测定均采用ELISA法检测。GR试剂盒由北京华英生物技术研究所提供。GCL试剂盒由苏州科铭生物技术有限公司提供,STAT FAX 2100全自动酶标仪测定。

1.6 免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation, CoIP)法检测RyR1复合物中Glutathione表达水平

1.6.1 膜相关蛋白的提取

将冻存的骨骼肌组织分别称重,低温下仔细剪切、研磨及过200 钼筛后,以1500 rpm低温离心

10 min。弃上清,沉淀物采用全蛋白抽提法提取蛋白。操作步骤严格按试剂盒说明书进行。用 Bradford 方法进行蛋白定量。全蛋白抽提试剂盒和 Bradford 蛋白含量检测试剂盒均购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.6.2 免疫共沉淀

取上述蛋白抽提液 1 mL,加入 2 μg RyR1 抗体 (ab2868, abcam), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇 12 h。加入 20 μL Protein G Agarose (碧云天 p2009) 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇过夜, 以 2500 rpm 离心 5 min, 弃上清。PBS 洗涤沉淀 3 次, 以 1XSDS-PAGE 电泳上样缓冲液重悬, 煮沸 5 分钟, 短暂离心, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.6.3 提取物的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

上述样品各取 20 μL , 进行 SDS-PAGE 后, 转移至 PVDF 膜上。分别加入小鼠抗 Glutathione (1:1000, ab19534, abcam) 和小鼠抗 RyR1 (1:2000, ab2868, abcam) 一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。分别加入 1:5000 的羊抗鼠/兔 HRP-IgG (凯基, KGAA37/KGAA35) 二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 于暗室中进行化学发光及显影、定影。使用 Gel-Pro32 软件对结果进行灰度分析。

1.7 荧光免疫组织化学法及组织 HE 染色法

骨骼肌组织样品用 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水透明处理, 石蜡包埋, 纵向连续切片, 厚度约为 4 μm , 荧光免疫组化与 HE 染色选用邻近切片。

选取石蜡切片脱蜡后, 按常规 HE 染色, 光学显微镜观察拍照。荧光免疫组化石蜡切片脱蜡后, PBS 洗三次, 每次 5 min; 抗原修复液煮沸 10 min, 自然冷却至室温, PBS 洗三次, 每次 5 min; 3% 过氧化氢 37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 30 min, PBS 洗三次, 每次 5 min; 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 滴加小鼠抗 RyR1 (1:2000, ab2868, abcam)、小鼠抗 Glutathione (1:1000, ab19534, abcam) 混合一抗, 4 $^{\circ}$ 冰箱过夜; PBST 洗 5 次, 每次 10 min, PBS 洗两次, 每次 10 min; 滴加 FITC/TRITC (1:200) 二抗 50-100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 避光孵育 1 h; PBS 洗 5 次, 每次 10 min, DAPI (1:1000) 染色 30 min; PBS 洗 5 次, 每次 10 min, 最后用抗淬灭剂封片, 荧光显微镜下观察、拍照。

免疫荧光染色结果判定

RyR1 阳性着色主要分布在细胞浆中, 以胞浆出现绿色荧光为阳性细胞信号。Glutathione 阳性着色主要分布在细胞浆中, 以胞浆出现红色荧光为阳性细胞信号。

每组随机抽取小鼠 5 只, 分离小鼠左后肢比目鱼肌, 随机抽取 5 张切片 (相邻切片至少间隔 100 μm), 共计 25 张切片, 进行 Glutathione/RyR1 免疫荧光双标染色, 激光共聚焦显微镜观察拍照。在 40X 物镜下, 采用双盲法分别计数比目鱼肌的双阳性细胞。每张骨骼肌切片随机选取四个高倍镜视野, 分别计数四个高倍镜视野中双阳性细胞数与细胞总数, 并计算出双阳性细胞数占细胞总数的比率。

1.8 数据的处理

数据用 SPSS 10.0 统计软件分析, 以均值 \pm 标准差表示。除百分率的比较用多组卡方检验外, 其余各指标均采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 作为数据差异显著性标准。

2 结果

2.1 毛蕊花苷对运动性疲劳小鼠骨骼肌形态的影响

光镜下: 正常对照组 (A), 正常 + 毛蕊花苷组 (B) 小鼠骨骼肌纤维、细胞形态结构正常。单纯运动组 (C) 小鼠骨骼肌纤维断裂、细胞肿胀、变性、坏死非常明显。而运动 + 毛蕊花苷低剂量组 (D)、运动 + 毛蕊花苷中剂量组 (E)、运动 + 毛蕊花苷高剂量组 (F) 小鼠骨骼肌纤维断裂、细胞肿胀、变性、坏死等损伤依次减轻。F 组小鼠骨骼肌纤维、细胞形态结构基本正常。见图 1。

2.2 毛蕊花苷对运动小鼠血浆 CK 水平、骨骼肌组织 GSH、GSSG 含量、GSH/GSSG 比值和 GCL、GR 活性的影响

本研究结果表明: 单纯运动组小鼠血浆 CK 水平, 与运动 + 毛蕊花苷低剂量组比较, 差异无显著性, $P > 0.05$, 但高于其他各组, 均 $P < 0.01$ 。运动 + 毛蕊花苷高剂量组小鼠血浆 CK 水平分别低于运动 + 毛蕊花苷中剂量和低剂量组, 但高于正常对照组和正常 + 毛蕊花苷组, 均 $P < 0.01$ 。单纯运动组小鼠骨骼肌组织 GSH 含量、GSH/GSSG 比值、GCL 和 GR 酶活性, 与运动 + 毛蕊花苷低剂量组比较, 差异无显著性, $P > 0.05$, 但低于其他各组, 均 $P < 0.01$ 。运动 + 毛蕊花苷高剂量组小鼠骨骼肌组织 GSH 含量、GSH/GSSG 比值、GCL 和 GR 酶活性分别高于运动 + 毛蕊花苷中剂量和低剂量组, 但低于正常对照组和正常 + 毛蕊花苷组, 均 $P < 0.01$ 。单纯运动组小鼠骨骼肌组织 GSSG 含量高于其他各组, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。运动 + 毛蕊花苷高剂量组小鼠骨骼肌组织 GSSG 含量低于运动 + 毛蕊花苷低剂

量组和运动 + 毛蕊花苷中剂量组, $P < 0.01$, 与正常对照组和正常 + 毛蕊花苷组比较, 差异无显著性, $P > 0.05$ 。正常对照组上述各指标与正常 + 毛蕊花苷组比较, 差异无显著性, 见表 2。

>0.05。正常对照组上述各指标与正常 + 毛蕊花苷组比较, 差异无显著性, 见表 2。

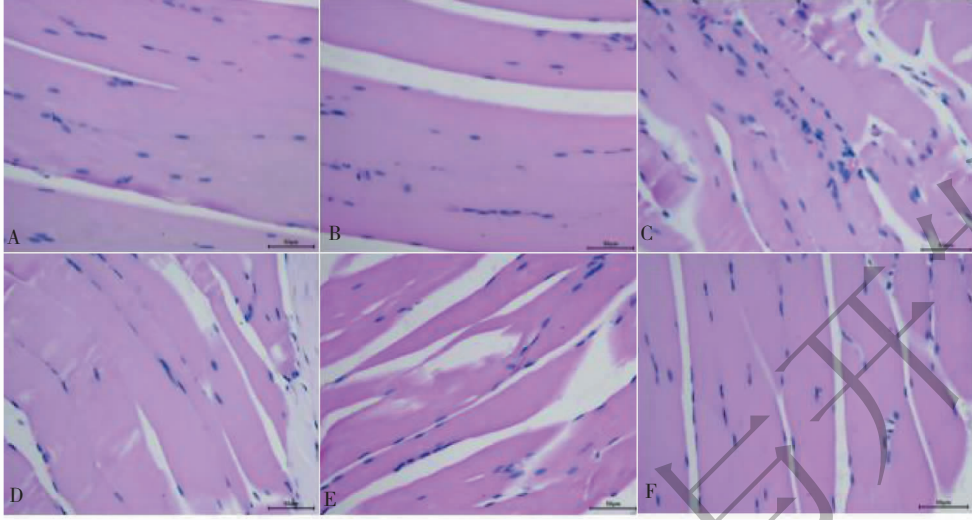


图 1 A-F 组小鼠骨骼肌形态结构, HE 染色, x100

Fig. 1 Morphological structure of skeletal muscle in mice of group A-F, HE staining, x100

表 2 各组小鼠血浆 CK、骨骼肌组织 GSH、GSSG 含量、GSH/GSSG 值和 GCL、GR 活性比较 ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of plasma CK, GSH and GSSG contents, GSH/GSSG value, the activities of GCL and GR in skeletal muscle of mice of six groups ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

指标 Indexes 分组 Groups	正常对照组 Control	正常 + 毛蕊花苷组 Control + verbascoside (5 mg/kg)	单纯运动组 Exercise	运动 + 毛蕊花 苷低剂量组 Exercise + verbasco-side-L (1 mg/kg)	运动 + 毛蕊花苷 中剂量组 Exercise + verbasco-side- M(5 mg/kg)	运动 + 毛蕊花 苷高剂量组 Exercise + verbasco-side- H(10 mg/kg)
肌酸激酶(CK) (U/ml)	1.87 ± 0.05	1.82 ± 0.09 ** .§ §	3.09 ± 0.16 ++	3.08 ± 0.09 ++ .§ §	2.48 ± 0.19 ++ .*** .§ §	2.08 ± 0.11 ++ .***
谷胱甘肽(GSH) (mol/g)	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01 ** .§ §	0.13 ± 0.09 ++	0.12 ± 0.06 ++ .§ §	0.16 ± 0.01 ++ .*** .§ §	0.21 ± 0.07 ++ .***
氧化型谷胱甘肽 (GSSG) (mol/g)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01 **	0.80 ± 0.02 ++	0.77 ± 0.02 ++ .*** .§ §	0.48 ± 0.07 ++ .*** .§ §	0.13 ± 0.02 **
谷胱甘肽/氧化型 谷胱甘肽比值 GSH/GSSG value	2.48 ± 0.17	2.34 ± 0.44 ** .§ §	0.16 ± 0.01 ++	0.15 ± 0.01 ++ .§ §	0.35 ± 0.06 ++ .§ §	1.66 ± 0.25 ++ .***
γ-谷氨酰半胱氨 酸连接酶(GCL) (U/g)	3.74 ± 0.09	3.74 ± 0.03 ** .§	2.11 ± 0.04 ++	2.14 ± 0.04 ++ .§ §	2.92 ± 0.05 ++ .*** .§ §	3.68 ± 0.06 ++ .***
谷胱甘肽还原酶(GR) (U/g)	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01 ** .§ §	0.12 ± 0.01 ++	0.13 ± 0.01 ++ .§ §	0.25 ± 0.01 ++ .*** .§ §	0.35 ± 0.02 ++ .***

注:与正常对照组比较, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$;与单纯运动组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与运动 + 毛蕊花苷高剂量组比较, § $P < 0.05$, § § $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compare with control, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$; Compare with exercise, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compare with exercise + verbascoside-H, § $P < 0.05$, § § $P < 0.01$. The following conditions are the same.

2.3 毛蕊花苷对运动小鼠骨骼肌细胞肌浆网 RyR1 复合物中 Glutathione 表达水平的影响

小鼠骨骼肌细胞肌浆网 RyR1 复合物中 Glutathione 表达水平见图 2。由图 2 可知,单纯运动组 (B) Glutathione / RyR1 值显著低于其他各组,均 $P < 0.01$ 。运动 + 毛蕊花苷高剂量组 (F) Glutathione / RyR1 值高于运动 + 毛蕊花苷低、中剂量组 (D, E),但低于正常对照二组 (A, B),均 $P < 0.01$ 。正常对照组 (A) Glutathione / RyR1 值与正常 + 毛蕊花苷组比较,差异无显著性, $P > 0.05$ 。进一步的免

<0.01。运动 + 毛蕊花苷高剂量组 (F) Glutathione / RyR1 值高于运动 + 毛蕊花苷低、中剂量组 (D, E),但低于正常对照二组 (A, B),均 $P < 0.01$ 。正常对照组 (A) Glutathione / RyR1 值与正常 + 毛蕊花苷组比较,差异无显著性, $P > 0.05$ 。进一步的免

疫荧光双标记实验可知 Glutathione 定位在 RYR1 附近,其研究结果与免疫共沉淀和免疫杂交方法得到的研究结果一致,见图 3。

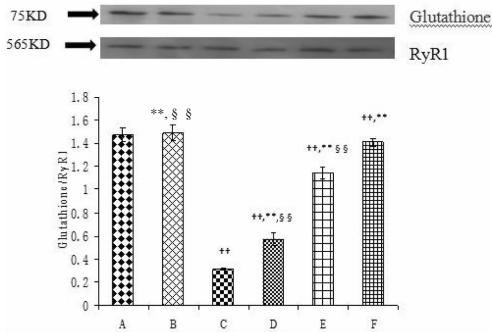


图 2 各组小鼠比目鱼肌细胞肌浆网 RyR1 复合物中的 Glutathione 表达水平比较

Fig. 2 Comparison of the levels of protein expression of glutathione in the RyR1 complexes of soleus muscle cells in mice of six groups

3 讨论

本项研究表明毛蕊花苷能降低递增负荷运动小鼠血浆 CK 的活性,有效保护运动鼠骨骼肌的形态;并能提高骨骼肌组织 GSH 水平和 GCL、GR 酶的活性和 RyR1 复合物中 GSH 表达水平,降低 GSSG/GSH 比值。

毛蕊花苷是马先蒿属植物中含量较多的苯丙素苷类化合物,具有多种生物活性。但有关毛蕊花苷对运动引起骨骼肌损伤的研究尚无。又研究表明 CK 测试简便,敏感性也较高,是评价运动性骨骼肌损伤的最实用指标^[7]。本项研究表明运动组小鼠血清 CK 值显著高于正常对照组,与文献报道一致^[8]。毛蕊花苷能有效降低递增负荷运动小鼠血清 CK 值,并呈一定的剂量依赖作用。对骨骼肌的形态学研究结果表明:单纯运动组小鼠骨骼肌肌纤维断裂,核溶解,而运动 + 毛蕊花苷各组小鼠骨骼肌的损伤明显减轻,呈一定的剂量依赖性。提示毛蕊花苷能有效抵抗递增负荷运动对骨骼肌的损伤,并呈一定的剂量依赖性。

运动会致骨骼肌自由基的大量产生,谷胱甘肽是关键的参与者之一^[9]。谷胱甘肽是谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸缩合形成的寡肽,分为还原型 GSH 和氧化型 GSSG。还原型谷胱甘肽 GSH,因为其所含的巯基(-SH),使其具有超强的抗氧化能力,能够保护体内细胞不被氧化损伤。研究表明运动会致

组织和线粒体的氧化损伤,降低组织 GSH 含量^[10-12]。补充谷胱甘肽能降低运动导致的线粒体损伤^[13]。本项研究表明递增负荷跑台运动后小鼠比目鱼肌组织 GSH 含量和 GSH/GSSG 比值与正常对照组比较,显著下降;而 GSSG 含量明显升高。与文献报道一致^[14]。毛蕊花苷能显著提高运动鼠骨骼肌组织 GSH 含量和 GSH/GSSG 比值,降低 GSSG 含量,并呈一定的剂量剂量依赖作用。提示毛蕊花苷能明显改善递增负荷跑台运动小鼠骨骼肌谷胱甘肽氧化还原状态。

体内 GSH 的生成主要通过合成和还原两种途径。 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶(γ -glutamylcysteine ligase, γ -GCL)是 GSH 合成的限速酶^[15]。在 NADPH 和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase,GR)作用下,氧化型 GSSG 又可被生成还原型 GSH^[5]。过量运动致 L-半胱氨酸转运功能失调而抑制 GSH 的合成^[16]。本项研究表明:单纯运动组小鼠 γ -GCL 酶活性显著低于正常对照组,提示运动还可能通过抑制 γ -GCL 酶活性,引起 GSH 的合成减少。又研究表明随着运动强度的增加,GSH 和 GR 酶活性降低^[17],运动后 GR 酶的活性显著低于对照组^[18]。本项研究表明:单纯运动组小鼠骨骼肌组织 GR 酶活性明显低于正常对照组,与文献报道一致。运动 + 毛蕊花苷各组小鼠骨骼肌组织 γ -GCL 和 GR 酶活性与单纯运动组比较,有不同程度的增加。提示毛蕊花苷可能通过增加运动鼠骨骼肌组织 γ -GCL 酶活性,增加骨骼肌组织 GSH 的合成;并通过增加 GR 酶的活性,促进氧化型 GSSG 转化为还原型 GSH,从而提高运动鼠骨骼肌组织 GSH 含量,降低 GSSG 水平,稳定 GSH/GSSG 比值。

又研究表明在 GSH 出现时,骨骼肌兴奋-收缩偶联所必须的主要钙离子释放通道 RyR1(ryanodine receptor 1, RyR1)与该通道稳定蛋白 FKBP12(the small FK506 binding protein 12 subunit)的结合亲和力显著增加,而在 GSSG 出现时,促使 RyR1 与 FKBP12 解离,导致该通道的稳定性下降^[19]。运动能导致 RyR1 通道稳定性下降,从而引起运动能力的下降和骨骼肌的损伤^[20]。但有关运动对 RyR1 复合物中 GSH 表达影响的研究尚无。我们运用免疫共沉淀和免疫荧光技术,研究了运动及其毛蕊花苷对 RyR1 复合物中 GSH 表达的影响。结果表明:运动后小鼠骨骼肌肌浆网中 RyR1 复合物中 GSH 表达显著降低,毛蕊花苷能提高运动鼠骨骼肌肌浆网

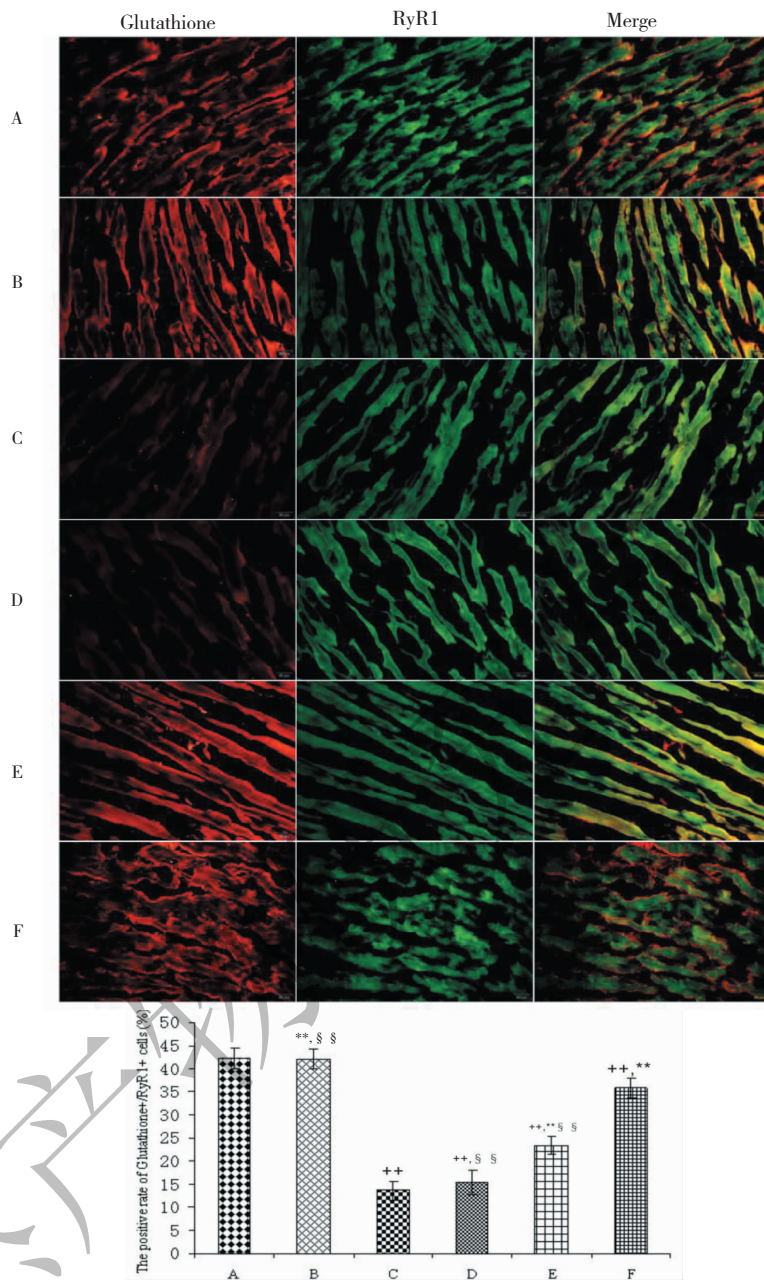


图3 Glutathione/RyR1 在小鼠比目鱼肌中共表达情况 (标尺 = 50 μm)

Fig. 3 The co-expression of glutathione/RyR1 in the soleus muscles of mice in six groups (ruler = 50 μm)

中 RyR1 复合物中 GSH 表达水平,并呈一定的剂量依赖性。提示毛蕊花苷还可能通过提高运动鼠骨骼肌肌浆网中 RyR1 复合物中 GSH 表达水平,改善该通道的氧化还原状态,从而显示出一定的抗运动鼠骨骼肌损伤作用。有关毛蕊花苷对该通道功能影响的研究将另文报道。

抗氧化作用是毛蕊花苷最重要的药理作用之一。研究表明:毛蕊花苷能显著降低力竭运动小鼠骨骼肌氧自由基和脂质过氧物的浓度^[21],是低毒的黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)抑制剂^[22],

能提高海洛因注射小鼠脑组织 GSH/GSSG 比值^[23]。且其清除氧自由基和抗氧化的能力依赖于分子中羟基的数目,羟基越多,其清除氧自由基和抗氧化的能力就越强^[24]。本项研究表明毛蕊花苷能通过提高运动鼠骨骼肌组织 γ -GCL 和 GR 酶活性,增加 GSH 含量,降低 GSSG 水平,稳定 GSH/GSSG 比值;并能提高运动鼠骨骼肌肌浆网中 RyR1 复合物中 GSH 表达水平,改善运动小鼠骨骼肌及 RyR1 的氧化还原状态,从而显示出较明显的抗运动小鼠骨骼肌损伤作用。有关毛蕊花苷抗运动鼠骨骼肌损伤和对谷

胱甘肽的影响是否与分子中羟基数目有关有待进一步的研究。

参考文献

- Liao F, Zheng RL, Gao JJ, et al. Retardation of skeletal muscle fatigue by the two phenylpropanoid glycosides; Verbascoside and martynoside from *Pedicularis plicata* Maxim [J]. *Phytother Res*, 1999, 13: 621-623.
- Zhu MJ (朱梅菊), Tan NH (谭宁华), Tan NH (朱洪竹), et al. Effects of verbascoside and martynoside on exercise-induced fatigue and their effects on free radical metabolism in the rats [J]. *Chin J Sports Med* (中国运动医学杂志), 2009, 28(3): 310-312.
- Zeng FX (曾凡星). Research development of mechanism of exercise induced muscle damage [J]. *J Jingzhou Teachers Coll, Nat Sci* (荆州师专学报, 自科版), 1994, 17(5): 73-76.
- Gou X, Yu TY, Zhou X, et al. Review of the mechanism of muscle fatigue and injury [J]. *CJTCMP* ((中华中医药杂志(原中国医药学报)), 2016, 31: 2720-2724.
- Hua N (华楠), Zhang H (张华), Zhang Y (张纓). Changes of glutathione redox in skeletal muscles of AMPK α 2 over-expression mice after hypoxia training [J]. *J Beijing Sport Univer* (北京体育大学学报), 2013, 36(12): 73-76, 81.
- Xi W (汶希), Pan HS (潘华山), Feng YC (冯毅翀). Establishment of a rat model of exercise-Induced fatigue [J]. *Acta Laboratorium Animalis Sci Sinica* (中国实验动物学报), 2009, 17: 368-372.
- Zhou Y (周越), Li Y (李扬), Wang Y (王瑞元), et al. Comparison of evaluating indicators for exercise-induced muscle damage [J]. *Chin J Sports Med* (中国运动医学杂志), 2008, 27: 206-207.
- Cao QL (曹庆雷), He JW (何建伟), Yang JL (杨金龙). Effects of far infrared ceramic microspheres on indexes CK, CK-MM, LDH of the skeletal muscles of rats going through one time exhaustive exercising [J]. *J Physical Education* (体育学刊), 2013, 20: 125-128.
- Polotow TG, Vardaris CV, Mihaliuc AR, et al. Astaxanthin supplementation delays physical exhaustion and prevents redox imbalances in plasma and soleus muscles of Wistar rats [J]. *Nut*, 2014, 6: 5819-5838.
- Boyarskaya LA, Turchaninov DV, Efremenko ES, et al. Study of glutathione and enzymes of its metabolism under the influence of enriched dairy products for prophylactic use in conditions of oxidative [J]. *Gig Sanit*, 2015, 94(8): 52-56.
- Peternelj TT, Marsh SA, Strobel NA, et al. Glutathione depletion and acute exercise increase O-GlcNAc protein modification in rat skeletal muscle [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 400: 265-275.
- Carfagna S, Napolitano G, Barone D, et al. Dietary supplementation with the microalga *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) reduces prolonged exercise-induced oxidative stress in rat tissues [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 732090.
- Golbidi S, Botta, Gottfred, et al. Glutathione administration reduces mitochondrial damage and shifts cell death from necrosis to apoptosis in ageing diabetic mice hearts during exercise [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171: 5345-5360.
- Li Q (李靖). Effects of sprint training on glutathione expression in liver and skeletal muscle [J]. *J Yichun College* (宜春学院学报), 2012, 34: 124-126.
- Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase and GSH formation and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2013, 437(1): 7-11.
- Xiong Y, Xiong Y, Zhou S, et al. Inhibition of glutathione synthesis induced by exhaustive running exercise via the decreased influx rate of L-cysteine in rat erythrocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40: 1410-1421.
- Aydin CI, Sonat F, Sahin SK, et al. Long term dietary restriction ameliorates swimming exercise-induced oxidative stress in brain and lung of middle-aged rat [J]. *Indian J Exp Biol*, 2009, 47(1): 24-31.
- Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, et al. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272: 363-369.
- Mei Y, Xu L, Kramer HF, et al. Stabilization of the skeletal muscle ryanodine receptor ion channel-FKBP12 complex by the 1, 4-benzothiazepine derivative S107 [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e54208.
- Bellinger AM, Reiken S, Dura M, et al. Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: A molecular mechanism for decreased exercise capacity [J]. *PNAS*, 2008, 105: 2198-2202.
- Li JX, Xin D, Li H, et al. Effect of verbascoside on decreasing concentration of oxygen free radicals and lipid peroxidation in skeletal muscle [J]. *Acta Phar Sin*, 1999, 20: 126-130.
- Wan Y, Zou B, Zeng H, et al. Inhibitory effect of verbascoside on xanthine oxidase activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93(Pt A): 609-614.
- Qiusheng Z, Yuntao Z, Rongliang Z, et al. Effects of verbascoside and luteolin on oxidative damage in brain of heroin treated mice [J]. *Pharmazie*, 2005, 60: 539-543.
- Wang PF, Kang JH, Zheng RL, et al. Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxyl radical by the spin trapping method(95) 02255-4 [J]. *Biochem Pharm*, 1996, 51: 687-691.