



微压氧对大强度训练大鼠氧化应激的影响

张冉¹, 赵鹏^{2*}

摘要:目的:围绕氧化应激中自由基的产生和清除来探讨微压氧对于大强度训练后的恢复机制,为微压氧在运动训练后恢复中的应用提供理论依据和实验支持。方法:8周龄雄性SD大鼠40只,经一周的适应性训练后筛选出30只,随机分为对照组(C组)、大强度训练后自然恢复组(HQ组,26.8 m/min,10°坡度)和微压氧恢复组(HM组),每组10只。本实验采用的微压氧仓氧浓度为26%左右,压强为3.6 PSI。训练周期为8周,每周训练5 d,每天1 h。HM组每次训练结束后即刻放入微压氧仓恢复1 h。在第8周最后一次训练结束24 h后进行麻醉,切取左侧腓肠肌用于氧化应激指标的检测和观察腓肠肌组织形态。结果:(1)与HQ组大鼠相比,HM组大鼠跑至力竭时间显著性长于HQ组($P<0.05$)。(2)HQ组肌肉MDA含量高于C组和HM组,具有显著性差异;HM组肌肉超氧化物歧化酶(SOD)活性显著性高于C组;HM组肌肉GSH-PX的活性高于C组和HQ组。(3)与C组相比,HQ组大鼠和HM组大鼠骨骼肌损伤轻微,但是HM组轻于HQ组。结论:大强度训练可造成大鼠骨骼肌氧化应激损伤,使其运动能力下降;而微压氧可提高骨骼肌抗氧化酶活性,减少骨骼肌脂质过氧化反应,提高运动能力。

关键词:微压氧;大强度训练;氧化应激

中图分类号:G804.5 文献标志码:A 文章编号:1006-1207(2018)01-0089-05
DOI:10.12064/ssr.20180111

Effect of Mild-pressure Hyperbaric Therapy on the Oxidative Stress of the Rat Received High-intensity Exercise

ZHANG Ran¹, ZHAO Peng²

(1. SanDa university, Shanghai 201209, China; 2. China Institute of Sport Science, Beijing 100061, China.)

Abstract: Objective: The purpose of this study, focusing on oxidative stress of the production and cleanup of free radical, is to investigate the recovery mechanism of mild-pressure hyperbaric therapy after high intensity training so as to provide theoretical basis and experiment support for the application of mild-pressure hyperbaric therapy to after-training recovery. Method: Thirty male SD rats (8 week old) were selected after the adaptability exercise from forty rats, and they were randomly divided into three groups: control group (C), quiet rest after high intensity exercise group (HQ, 28m/min, 10° slope), mild-pressure hyperbaric therapy after high intensity exercise group (HM), with ten rats in each group. Oxygen concentration of mild-pressure hyperbaric therapy was about 26%, and the pressure was 3.6PSI. The rats did exercise for 1h/d, 5d/week and 8 weeks in total. The rats of HM immediately received mild-pressure hyperbaric therapy for 1h after the exercise. 24h after the last exercise in the 8th week, they were anesthetized and their left gastrocnemius was cut for the test of oxidative stress indicators and the observation of the tissue morphology of gastrocnemius. Result: (1) The time to exhaustion of HM group was significantly longer than that of HQ group ($P<0.05$); (2) The MDA level of HQ group was significantly higher than those of C group and HM group ($P<0.05$). SOD activity of HM group was significantly higher than that of C group ($P<0.05$). GSH-PX activity of HM group was higher than those of C group and HQ group. (3) Compared to C group, the skeletal muscle injury of HM group and HQ group was slighter, and the injury of HM

收稿日期: 2017-11-03

基金项目: 国家体育总局体育科学研究所基本科研业务费资助项目(基本 15-33)。

第一作者简介: 张冉,女,助教。主要研究方向:运动人体科学。E-mail: 1519314332@qq.com。

* 通讯作者: 赵鹏,男,教授,博士。主要研究方向:运动人体科学。E-mail: zhaopeng@ciss.cn。

作者单位: 1.上海杉达学院,上海 201209; 2. 国家体育总局体育科学研究所,北京 100061。



group was even slighter than that of HQ group. Conclusion: High intensity training can lead to skeletal muscle oxidative stress injury and result in poor sport performance. Mild-pressure hyperbaric therapy can enhance the activity of antioxidant enzyme of skeletal muscle, reduce the lipid peroxidation and therefore improve exercise capacity.

Key Words: mild-pressure hyperbaric therapy; high intensity training; oxidative stress

随着世界竞技水平的提高,运动员训练强度也在不断地增大,运动员训练后或比赛期间的恢复越来越受到关注。不充分的恢复不仅会导致疲劳、运动表现下降,甚至还会增加运动损伤的可能性^[1]。因此,实现运动训练、比赛应激以及恢复之间的适当平衡对于提高运动员的运动表现是非常重要的。

微压氧疗法 (Mild-pressure Hyperbaric Therapy, mHBT)是指吸入压力在 1~2 绝对大气压 (Absolute Atmosphere, ATA) 之间、氧浓度大于 35% 的环境气体的过程^[2]。近年来微压氧在优秀运动员中使用变得越来越流行,最近在普通大众中已成为改善疲劳、增强整体健康、恢复运动相关损伤以及抗衰老的方式。但是对于微压氧的治疗效果以及机制的研究甚少。Kim 等研究了微压氧对氧化应激及疲劳的影响^[2]。所有参与者在微压氧前后进行指标测评。结果活性氧代谢物 (Reactive Oxygen Metabolites, ROMs) 和疲劳类推视觉量表在微压氧前后有显著性差异,而生物抗氧化能力 (Biological Antioxidant Potential, BAP) 没有显著性差异。结果揭示微压氧可以有效地减少氧化应激,而主观指标的变化可能与微压氧的安慰剂效果有关。因此,微压氧是否能促进运动后机体的恢复还有待于进一步研究。

氧化应激是指自由基的产生和清除之间不平衡,自由基的产生大于自由基的清除。为了保持体内自由基产生和清除之间的平衡,身体的抗氧化系统被激活以保护细胞。但是当抗氧化防御系统不够强壮和有效消除加速产生的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 和活性氮 (Reactive Nitrogen Species, RON) 时,氧化应激就会发生,而氧化应激的发生会干扰细胞信号通路。长久的氧化还原平衡的改变也会对细胞结构带来损害,如核酸、脂质、蛋白质甚至是通过凋亡引起细胞死亡^[3]。机体可以通过自身的抗氧化防御系统来抵抗自由基造成的细胞损伤,主要包括酶促系统和非酶促系统。酶促系统主要包括,超氧化物歧化酶 (Super Oxide Dismutase, SOD), 过氧化氢酶 (Catalase, CAT), 谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathion Peroxidase, GSH-PX) 等。

1 材料和方法

1.1 实验对象

8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 40 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号为 SCXK(京)2012-0001。体重(230±7) g。于 SPF 级实验室内进行实验。大鼠常规分笼饲养,每笼 5 只,自由饮水饮食,专人定期更换饲料和垫料,室温 23~25℃,相对湿度 45%~55%,每天光照时间 12 h。饲养室、用具等定期消毒灭菌。

1.2 实验动物分组和运动干预

大鼠购入后进行适应性喂养 3 d,使大鼠适应动物房环境。3 d 后所有的大鼠进行 7 d 的适应性跑台训练,训练方案为每天训练 15 min,跑台速度为 15 m/min,跑台坡度为 0°。适应性训练后,选取适应跑台训练的大鼠 30 只,随机分为 3 组:对照组 (Control, C)、大强度训练后自然恢复组 (Quiet Rest after High Intensity Training, HQ)、大强度训练后微压氧恢复组 (Mild-pressure Hyperbaric Therapy after High Intensity Training, HM),每组 10 只。大强度训练后 HQ 在大强度运动后自然恢复,大强度训练后 HM 组在大强度训练后放入微压氧仓恢复 1 h。

采用 Bedford 训练方案,对 HQ 组和 HM 组大鼠进行大强度跑台训练^[4]。每天上午的 8:00~12:00 之间进行训练,训练周期为 8 周,每周训练 5 d,每天 60 min,运动强度为 26.8 m/min,坡度为 10° (最大摄氧量约为 $81.00\% \pm 3.5\dot{V}O_{2max}$)。在训练的开始前先以 15 m/min 速度跑 5 min,随后在 5 min 内逐渐增至 26.8 m/min,维持直至训练结束。最后一次跑至力竭,记录力竭时间。HM 组每次训练结束后立即放入微压氧仓 (型号:OBI-IF),购自氧沐国际高新技术(北京)股份有限公司,恢复 1 h。微压氧仓氧浓度为 26% 左右,压强为 3.6 PSI。力竭标准:(1)动物跟不上预定的跑速,先后滞跑道后 1/3 处达 6 次以上,声、光、电刺激驱赶均无效;(2)停止跑台运动后俯卧位,呼吸深急、幅度大,神情倦怠、腹卧位跑、垂头等,对刺激反应迟钝,翻正反射消失。



1.3 取材

各运动实验组大鼠均在运动实验后恢复 24 h 取材。大鼠腹腔注射 10%水合氯醛,按 40mg/100g 体重剂量注射麻醉。麻醉好后迅速剥离右侧腓肠肌,用生理盐水清洗、滤纸吸干后分为两部分,其中一部分放在冻存管中保存于 -80℃ 冰箱中,用于骨骼肌氧化应激指标的检测,一部分放置于盛有 4% 多聚甲醛的广口瓶中常温保存,用于石蜡切片病理学检查。

1.4 测试指标及方法

1.4.1 氧化应激指标检测

MDA 含量采用 TBA 法测定,SOD 活性采用 WST-1 法,CAT 的测定采用可见光法,GSH-PX 的测定采用比色法。SOD 活性使用酶标仪(赛默飞,Wellscan)检测,其余使用分光光度计(Unico,7200)检测。试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4.2 骨骼肌组织学制备

将固定好的大鼠腓肠肌依次经脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、水化、苏木素染色、分化、伊红染色、脱水、透明、封片,制成 HE 染色切片,光学显微镜下观察、摄取图像。

1.5 统计学分析

所有数据应用 SPSS19.0 统计软件处理,每组数据用均数±标准差($\bar{X}\pm SD$)表示,力竭时间的比较采用独立样本 t 检验,其他指标采用单因素方差分析法比较组间差异,以 $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。

2 实验结果

2.1 大鼠的一般状况

经过 8 周的实验,对照组大鼠神态安静,状态良好,饮食饮水正常,皮毛光亮整洁,反应敏捷,眼睛有神;HQ 组和 HM 组大鼠出现懒动倦怠,饮食饮水减少,毛发无光泽,双眼暗淡无光,个别大鼠出现便溏,自主活动减少,反应能力降低,这些表现以 HQ 组大鼠尤为明显。

2.2 微压氧对大鼠力竭时间的影响

运动耐力是评估抗疲劳效果的重要参数,运动至力竭时间的长短可以作为评估运动耐力和疲劳的指标。由表 1 可见,HM 组大鼠与 HQ 组大鼠比较,大鼠在跑台上跑至力竭的时间有明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明微压氧可以增强大鼠运动耐力和抗疲劳的效果。

表 1 不同恢复方式大鼠力竭时间的比较($\bar{X}\pm SD$)

Table I Comparison between the Time to Exhaustion of Rats Using Different Recovery Methods ($\bar{X}\pm SD$)

组别	HQ	HM
时间/min	92.97±23.21	123.01±34.41*

注:* 与 HQ 组相比 $P < 0.05$

2.3 微压氧对大鼠腓肠肌中 MDA 含量及抗氧化酶活性的影响

2.3.1 微压氧对丙二醛(MDA)含量的影响

MDA 是细胞脂质过氧化的一个重要产物,是衡量体内自由基代谢和机体受损程度的一个重要指标。由表 2 可知,HQ 组大鼠 MDA 含量显著高于 C ($P < 0.05$),HM 组 MDA 含量低于 HQ 组,具有显著性差异 ($P < 0.05$),而大强度训练后 HM 组大鼠 MDA 含量与 C 相比没有显著性差异,表明大强度训练可以引起 MDA 含量升高,而微压氧可以减少 MDA 含量,减少脂质过氧化反应。

表 2 各组大鼠腓肠肌中 MDA 含量及抗氧化酶活性测试结果($\bar{X}\pm SD$)

Table II MDA Content in the Gastrocnemius of the Different Group Rats and the Test Result of the Activity of Antioxidant Enzyme ($\bar{X}\pm SD$)

组别	C	HQ	HM
MDA/nmol-mgprot ⁻¹	3.43±0.91	8.50±2.11*	4.56±1.55#
SOD/U-mgprot ⁻¹	33.65±7.60	40.48±9.77	50.27±8.05*
CAT/U·ml ⁻¹	6.86±1.81	8.35±1.53	7.66±3.19
GSH-PX/U	40.71±10.20	52.19±14.69	70.60±5.39*#

注:* 与对照组相比 $P < 0.05$,# 与自然恢复组相比 $P < 0.05$ 。

2.3.2 微压氧对抗氧化酶活性的影响

机体抵抗自由基造成的细胞损伤主要靠自身的抗氧化防御系统,包括酶促系统和非酶促系统。酶促系统主要包括:超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等。

由表 2 可知,HM 组与 G 组相比 SOD 活性显著性增高($P < 0.05$),而 HQ 组与对照组相比没有显著性差异。结果表明微压氧可促进 SOD 活性增加。

由表 2 可知,C 组、大强度训练后 HQ 组和 HM 组大鼠 CAT 活性没有显著性差别。

由表 2 可知,大强度训练后 HM 组 GSH-PX 活性高于 C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 HQ 组虽有升高,但与 C 组相比不具有统计学意义。HM 组与 HQ 组相比,GSH-PX 活性显著性升高 ($P < 0.05$)。结果表明,微压氧可显著提高 GSH-PX 的活性。



2.4 腓肠肌组织形态学改变

根据图 1 我们可以看到对照组大鼠骨骼肌结构正常,在纵切片上可见排列紧密、规律的纵向肌纤维,肌纤维粗细均匀,肌间隙大小基本一致。明暗相间的肌横纹清晰、整齐。大强度训练后 HQ 组骨骼肌肌间隙变大,横纹消失,肌核分布不均,细胞核聚集;大强度训练后 HM 组与安静恢复相比,症状得到改善,间质水肿轻,肌核分布较均匀,损伤明显低于 HQ 组。

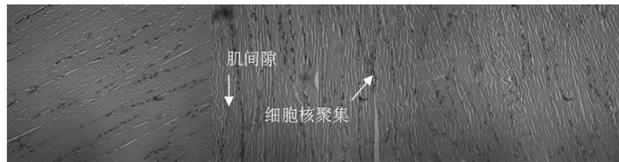


图 1 腓肠肌纤维 HE 染色结果($\times 200$)

Figure 1 HE Staining Result of Gastrocnemius Fibre ($\times 200$)

3 分析讨论

3.1 力竭时间的比较

运动至力竭的时间是机体运动能力的综合表现,其不仅反映机体抗疲劳的能力,也反应机体的抗应激能力及对不良环境的适应能力。本实验研究发现:HM 组与 HQ 组比较,大鼠跑至力竭时间明显延长,具有显著性差异($P < 0.05$)。说明大强度训练后微压氧恢复能够显著提高大鼠力竭运动时间,增强大鼠的运动能力。我们的研究结果与彭兆云等^[5]的研究结果一致,他们发现高压氧预处理可以延长小鼠的游泳力竭时间,郭洋琴^[6]、滕进忠等^[7]的研究结果也证实高压氧可以延长大鼠游泳至力竭时间,提高大鼠运动耐力。我们推测可能是与通过加强机体清除自由基的能力,促进毛细血管增生、从而改善骨骼肌缺血缺氧有关。

3.2 微压氧对大鼠腓肠肌中 MDA 含量及抗氧化酶活性的影响

长时间、力竭运动会造成机体抗氧化能力下降,自由基生成与清除失去平衡,致使机体自由基产生过多,在体内堆积。过多的自由基会加剧细胞的脂质过氧化反应,导致细胞的结构和功能受到损害,引起生物膜的功能障碍,使细胞内外离子转运发生紊乱,导致运动性疲劳。大多数研究中以代谢过程中的脂质过氧化产物为测定物和体内的酶类抗氧化物质等来评价体内的抗氧化状态。

许多研究显示,高强度运动和力竭运动都会导

致体内氧化应激反应,造成体内自由基生成增多。Patlar 等的研究中,健康男性采用 Bruce 方案进行每周一次的力竭运动,运动前和后采集血样,发现与静止状态相比,力竭运动导致 MDA 上升,并具有显著性差异^[8]。赵越越的研究中,大强度游泳运动会造成运动员体内自由基增多,抗氧化能力下降,出现脂质、蛋白质和 DNA 氧化损伤^[9]。Jówko 等的研究中,运动员进行重复的冲刺跑测试(4×15 s,间歇 1 min),发现在冲刺跑后 5 min 以及 24 h 后,血清中 MAD 显著性升高^[10]。本研究与上述研究结果一致,大强度力竭运动导致骨骼肌 MDA 含量显著上升,而 HM 组 MDA 含量与 C 组没有显著性差异。HM 组 SOD 活性显著性高于 C 组,GSH-PX 活性显著高于 C 组和 HQ 组。研究结果表明微压氧可以调节肌肉抗氧化酶的活性,减少氧化应激反应,从而起到减少骨骼肌损伤,提高运动能力的作用。Gregorevic 等研究了高压氧对于抗氧化酶活性的影响^[11]。他们发现重复性吸入高压氧可以上调趾长伸肌肌肉和比目鱼肌抗氧化酶的活性。Kim 等研究了微压氧对氧化应激及疲劳的影响^[12]。所有参与者在微压氧前后进行指标测评。结果活性氧代谢物(ROM)在微压氧前后有显著性差异。结果揭示微压氧可以有效的减少氧化应激。然而,在本研究中,HM 组 CAT 活性与 C 组和 HQ 组没有显著性差别,可能是 CAT 发挥作用具有一定的阶段性和条件性。综上所述,大强度运动造成骨骼肌氧化应激反应,而微压氧可上调抗氧化酶活性,从而维持自由基生成与清除之间的平衡。其机制可能是微压氧可减少酸性代谢产物的堆积;提高组织血氧含量,促进线粒体氧化功能;提高机体的抗氧化系统,加强清除自由基的能力。

3.3 微压氧对大鼠骨骼肌组织形态学的影响

苏木精-伊红染色简称 HE 染色,是生物学和医学的细胞与组织学最广泛应用的染色方法。染色结果为细胞核呈蓝色,细胞浆、肌肉、结缔组织等呈不同程度的红色。通过 HE 染色可以观察骨骼肌组织的结构,如肌外膜、肌核、肌纤维的形态及间质小管、炎症细胞等。本研究中,C 组大鼠骨骼肌结构正常,肌纤维排列紧密、规则、粗细均匀,肌间隙大小基本一致。肌核呈扁椭圆形,均匀分布在纤维周围的肌膜下。大强度训练后 HQ 组肌纤维肿胀,肌核分布不均,出现核聚集,肌间质水肿、炎症细胞浸润、小血管扩张。大强度训练后 HM 组与 HQ 组相比,症状得到改善,损伤明显低于 HQ 组。郭洋琴等的研究中,观察了高压氧对于游泳力竭大鼠肝脏、骨骼肌和肾脏



组织形态结构,发现高压氧恢复组肝脏、骨骼肌和肾脏损伤程度均轻于疲劳组^[6]。滕进忠等的研究也发现高压氧对于疲劳大鼠肾脏具有保护作用,明显改善肾脏组织的病理变化,起到保护疲劳大鼠肾脏组织的作用^[7]。微压氧对骨骼肌组织的保护作用可能是通过提高机体抗氧化酶活性,加强机体清除自由基的能力,减轻自由基对于细胞膜的损害,从而保持细胞的完整结构,维持身体的机能。

4 结论

4.1 大强度训练可造成骨骼肌氧化应激损伤,造成运动能力下降。

4.2 微压氧可提高骨骼肌抗氧化酶活性,减少骨骼肌脂质过氧化反应,提高运动能力。

参考文献:

- [1] Reilly T., Ekblom B. The use of recovery methods post-exercise[J]. *J. Sport Sci.*, 2005, 23(6): 619-27.
- [2] Kim S., Yukishita T., Lee K., et al. The Effect of Mild-Pressure Hyperbaric Therapy (Oasis O2) on Fatigue and Oxidative Stress[J]. *Health*, 2011, 3(7):432-436.
- [3] Sun Y., Cui D., Zhang Z., et al. Attenuated Oxidative Stress following Acute Exhaustive Swimming Exercise Was Accompanied with Modified Gene Expression Profiles of Apoptosis in the Skeletal Muscle of Mice[J]. *Ox-*

id Med Cell Longev, 2016,(1):1-8.

- [4] Bedford T. G., Tipton C. M., Wilson N. C., et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. *J. Appl. Physiol.*, 1979, 47(6):1278-1283.
- [5] 彭兆云,杜晶,孙学军,等.高压氧预处理对小鼠运动耐力的影响[J].*第二军医大学学报*,2006,(01):62-64.
- [6] 郭洋琴.高压氧抗大鼠运动性疲劳的效应及机制研究[D].江西科技师范大学,2012.
- [7] 滕进忠,袁春华,郭洋琴,等.高压氧对疲劳大鼠肾损伤的保护作用研究[J].*中国运动医学杂志*,2013,(06):525-528.
- [8] Patlar S., Baltaci A. K., Mogulkoc R. Effect of vitamin A administration on free radicals and lactate levels in individuals exercised to exhaustion [J]. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2016, 29(5):1531-1534.
- [9] 赵越越.不同时相补充氩水对游泳运动员大强度运动后自由基代谢的影响[D].苏州大学,2014.
- [10] Jowko E., Dlugolecka B., Makaruk B., et al. The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters[J]. *Eur. J. Nutr.*, 2015, 54(5):783-791.
- [11] Gregorevic P., Lynch G. S., Williams D. A. Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscles[J]. *Eur. J. Appl. Physiol*, 2001, 86(1):24-27.

(责任编辑:何聪)