

# 力竭运动诱导的大鼠红细胞氧化应激对谷胱甘肽合成的影响及其机制探讨

王月明<sup>1#</sup> 于振海<sup>1#</sup> 熊艳蕾<sup>2</sup> 安晓静<sup>3</sup> 王卓亚<sup>1</sup> 纪丕友<sup>1</sup> 王志强<sup>1</sup>  
周 阳<sup>1</sup> 石鹏志<sup>1</sup> 赵建涛<sup>1</sup> 赵冬梅<sup>1\*</sup> 熊延连<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>滨州医学院基础医学院, 人体解剖学教研室, 烟台 264000; <sup>2</sup>中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院, 北京 100000; <sup>3</sup>烟台市口腔医院, 烟台 264000)

**摘要** 该文探讨了力竭运动诱导的大鼠红细胞氧化应激损伤对谷胱甘肽合成速率的影响及其机制。将50只雄性SD大鼠随机分为2组, 分别是静坐对照组(sedentary control, C)和力竭运动组(exhaustive running exercise, E), 力竭运动组又分为运动休息0(E0) h、1(E1) h、12(E12) h和24(E24) h组, 每组10只。该研究对各组大鼠红细胞抗氧化物还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)、GSH/GSSG和TFG(total free glutathione)含量进行了检测与分析, 评估了各组红细胞L-半胱氨酸转运能力及三价铁降低抗氧化能力差异, 检测了各组大鼠红细胞TFG合成速率及其与L-半胱氨酸转运速率相关性。该研究构建了黄嘌呤/次黄嘌呤氧化酶体外氧化体系, 观察了各组大鼠红细胞在体外氧化条件下L-半胱氨酸转运速率、TFG和FRAP(ferric-reducing antioxidant power)含量差异。结果显示, 与静坐对照组相比, 力竭运动组大鼠红细胞中GSSG含量增加, GSH、TFG含量下降, GSH/GSSG比值显著降低。力竭运动后大鼠红细胞L-半胱氨酸转运速率显著降低, FRAP水平下降。体外氧化导致大鼠红细胞L-半胱氨酸转运速率显著降低, FRAP水平下降。结果表明, 力竭运动诱导大鼠红细胞严重的氧化应激损伤, 导致红细胞L-半胱氨酸转运速率下降, 使红细胞主要抗氧化物GSH合成效率下降。这些变化导致红细胞抗氧化能力进一步减弱, 从而成为力竭运动损伤的潜在致病因素。

**关键词** 力竭运动; 红细胞; 谷胱甘肽; 氧化应激

## Effects of Exhaustive Exercise Induced Oxidative Stress on Glutathione Synthesis in Rat Erythrocytes and Its Mechanism

Wang Yueming<sup>1#</sup>, Yu Zhenhai<sup>1#</sup>, Xiong Yanlei<sup>2</sup>, An Xiaojing<sup>3</sup>, Wang Zhuoya<sup>1</sup>, Ji Piyou<sup>1</sup>, Wang Zhiqiang<sup>1</sup>,  
Zhou Yang<sup>1</sup>, Shi Pengzhi<sup>1</sup>, Zhao Jiantao<sup>1</sup>, Zhao Dongmei<sup>1\*</sup>, Xiong Yanlian<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Human Anatomy, College of Basic Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264000, China;

<sup>2</sup>Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine  
Peking Union Medical College, Beijing 100000, China; <sup>3</sup>Yantai Stomatological Hospital, Yantai 264000, China)

**Abstract** The main purpose of the present study was to investigate the effects of exhaustive exercise

收稿日期: 2017-09-12 接受日期: 2017-11-27

国家自然科学基金(批准号: 81700760)、山东省自然科学基金(批准号: ZR2014HM009)和山东省医药卫生科技发展计划(批准号: 2017WS042)资助的课题  
\*共同第一作者

\*通讯作者。 Tel: 0535-6913493, E-mail: zhdm76@126.com; Tel: 0535-6913213, E-mail: xyl8807@sina.com

Received: September 12, 2017 Accepted: November 27, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81700760), Shandong Provincial Natural Science Foundation (Grant No.ZR2014HM009) and Shandong Medical and Health Science and Technology Development Plan (Grant No.2017WS042)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding authors. Tel: +86-535-6913493, E-mail: zhdm76@126.com; Tel: +86-535-6913213, E-mail: xyl8807@sina.com

网络出版时间: 2018-01-29 17:33:57 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180129.1733.018.html>

induced oxidative stress on glutathione synthesis in red blood cells. Rats were divided into sedentary control (C) and exhaustive running (E) groups. The E group was divided further into four subgroups: exhaustive exercise immediate (E0), exhaustive rest 1 h (E1), exhaustive rest 12 h (E12) and exhaustive rest 24 h (E24). The antioxidant capacity of GSH, GSSG, GSH/GSSG and TFG of red blood cells collected from different group were evaluated. L-cysteine transport and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) value were studied. An oxidation system *in vitro* was constructed to determined the levels of L-cysteine transport, TFG and FRAP, respectively. Compared with control group, the GSH content, TFG content and GSH/GSSG ratio decreased significantly, meanwhile GSSG content increased significantly in E0 group. After exhaustive exercise, the rate of L-cysteine influx rate in red blood cells of rats decreased significantly, and the level of FRAP decreased significantly. Under *in vitro* oxidative conditions, the L-cysteine influx rate and FRAP levels significantly decreased in control group. We present evidence of exhaustive exercise induced oxidative stress in erythrocytes of rats, resulting in a decrease in L-cysteine transport rate and a decrease in the synthesis efficiency of GSH, a major antioxidant in red blood cells. These changes have led to a further decrease in the antioxidant capacity of erythrocytes and thus become a potential causative factor in exhaustive exercise injury.

**Keywords** exhaustive exercise; erythrocyte; glutathione; oxidative stress

合理适度的运动锻炼能够增强机体的免疫力,而力竭、缺氧等极端条件下的运动通常伴随着多种心血管疾病的增加,甚至猝死<sup>[1-2]</sup>。目前,学术界普遍认为,运动导致的冠状动脉痉挛、血栓等现象所引起的心肌局部供血不足是诱导致命性心律失常的最主要病因<sup>[3]</sup>。力竭运动所诱导的自由基爆发对机体产生严重的氧化应激损伤,并成为多器官衰竭的潜在致病因素<sup>[4-5]</sup>。谷胱甘肽( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, glutathione, GSH)作为机体主要的非酶类抗氧化物,其正常代谢过程对内环境氧化-还原平衡的维系有至关重要的作用<sup>[6-7]</sup>。然而,力竭运动过程中谷胱甘肽合成代谢是否变化、运动诱导的氧化应激反应与红细胞(red blood cells, RBCs)氧化-还原平衡之间的关系仍有待研究。

机体代谢过程中会产生大量的自由基,这些自由基从组织细胞中生成后扩散到血浆中,引起红细胞的氧化应激反应。红细胞内血红蛋白浓度极高(5 mmol/L),这些血红蛋白在正常代谢过程中每天有0.5%~3.0%发生自氧化。血红蛋白自氧化生成高铁血红蛋白并伴随自由基的产生。在红细胞血红蛋白自氧化过程中会发生双分子取代和Fe-O<sub>2</sub>键极化反应,使胞内自由基水平进一步增加。谷胱甘肽在体内以还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)两种形式存在,其活性成分为还原型谷胱甘肽,能参与体内氧化还原过程。GSH的结构中含有一个活泼的巯基(SH),易被氧化脱氢,这一特

异结构使其成为体内主要的自由基清除剂,是红细胞非酶抗氧化剂中对细胞内氧化还原的稳定的调控维系贡献最大的抗氧化物<sup>[6]</sup>。在红细胞内谷胱甘肽转移酶的作用下,还原型谷胱甘肽能和过氧化物及自由基相结合,保护细胞膜中含巯基的蛋白质和含巯基的酶不被破坏。当细胞内生成少量H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>时,GSH在谷胱甘肽过氧化物酶的作用下,把H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>还原成H<sub>2</sub>O,其自身被氧化为GSSG,GSSG在红细胞中的谷胱甘肽还原酶作用下,接受H还原成GSH,使体内自由基的清除反应能够持续进行<sup>[8]</sup>。谷胱甘肽是一种含有 $\gamma$ -酰胺键和巯基的三肽,红细胞拥有由谷氨酸、L-半胱氨酸(L-cysteine)及甘氨酸合成谷胱甘肽的能力<sup>[9]</sup>。Rizvi等<sup>[10-11]</sup>研究发现,L-半胱氨酸进入红细胞速度是限制谷胱甘肽合成速度的主要因素。

本研究探讨了一次性力竭运动诱导的大鼠红细胞L-半胱氨酸转运能力的变化及其对红细胞谷胱甘肽含量的影响,并对恢复过程中大鼠红细胞L-半胱氨酸转运能力及谷胱甘肽含量的变化进行了探讨。本研究结果将为运动诱发的休克、缺氧损伤、红细胞凋亡等多种生理和病理现象的探索提供重要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司。其余试剂均为国产试剂(分析

纯)。分光光度计购于Thermo Scientific公司。次黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶购自Sigma公司。GSSG和GSH检测试剂盒均购于武汉艾美捷科技有限公司。

## 1.2 实验对象和动物模型

雄性SD大鼠50只(3月龄20只, 24月龄20只, 由第三军医大学提供), 国家标准啮齿类动物饲料喂养, 自由进食及饮水。相对湿度45%~55%, 室温(22±3 °C), 光照时间8:00~20:00的条件下饲养。适应性喂养一周后, 大鼠随机分为两组: 静坐对照组(sedentary control, C)和力竭运动组(exhaustive running exercise, E), 力竭运动组又分为运动休息0(E0) h、1(E1) h、12(E12) h和24(E24) h组, 每组10只。各组大鼠均采用心脏取血的方法采集血液。用PBS洗涤4次, 然后3 000 r/min离心3 min, 获取红细胞(red blood cell, RBC), 冷冻备用。大鼠运动参照Davies等<sup>[12]</sup>的运动模型, 大鼠运动前20 min保持5%的坡度和20 m/min的速度, 20 min后调整为15%的坡度和25 m/min的速度, 直至运动力竭, 力竭标准为置于平面后不能完成翻正反射。适度运动组大鼠在5%的坡度和20 m/min的速度下跑40 min。对照组大鼠静坐于跑台中, 不进行运动。

## 1.3 红细胞抗氧化指标检测

在红细胞裂解液中加入全血体积2倍的无水乙醇(2 mL), 在漩涡振荡器上充分混匀30 s。再加全血体积2倍的三氯甲烷(2 mL)漩涡振荡器上充分混匀1 min, 1 500 r/min离心10 min。按照试剂盒操作说明, 样品提取好后, 加入DTNB[5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]反应液后测412 nm处吸光度( $D_{412}$ )值。并通过标准曲线计算GSH、GSSG含量和GSH/GSSG比值, 红细胞游离谷胱甘肽总含量(total free glutathione, TFG)通过GSH+2×GSSG计算。

## 1.4 L-半胱氨酸转运能力检测

L-半胱氨酸流入、流出速度检测按照Xiong等<sup>[13]</sup>的方法进行实验。

L-半胱氨酸流入速度检测。全血用等渗PBS缓冲液(pH7.4)洗涤后, 取0.25 mL压积RBC悬浮于1 mL PBS葡萄糖缓冲液(含10 mmol/L L-半胱氨酸), 37 °C孵育1 h。离心去除上清液, 按照YiLdiz等<sup>[14]</sup>的方法检测自由巯基(free-SH)含量。取100 μL压积红细胞, 加入100 μL 10%三氯乙酸低渗缓冲液, 红细胞裂解液12 000 r/min离心5 min。取上清100 μL, 加入1.9 mL含0.6 μmol/mL DTNB的Tris-EDTA缓冲

液, 孵育5 min, 测412 nm处吸光度( $D_{412}$ )值, 通过标准曲线计算L-半胱氨酸孵育前后free-SH含量。L-半胱氨酸流入速度按照以下公式计算: 流入速率=L-半胱氨酸孵育前free-SH浓度-L-半胱氨酸孵育后free-SH浓度。

L-半胱氨酸流出速度检测。全血用等渗PBS缓冲液(pH7.4)洗涤后, 取0.25 mL压积RBC悬浮于含10 mmol/L L-半胱氨酸的1 mL PBS缓冲溶液中, 将其置于37 °C温水水浴1 h, 使其充分吸收半胱氨酸。水浴后将红细胞离心去除上清液, 再将红细胞置于1 mL新鲜的PBS葡萄糖溶液中, 37 °C孵育1 h。离心取上清, 通过标准曲线计算PBS葡萄糖溶液孵育前后free-SH含量。计算单位时间内L-半胱氨酸流出细胞量, 即为L-半胱氨酸流出速度。流出速率=PBS孵育前free-SH浓度-PBS孵育后free-SH浓度。

## 1.5 三价铁还原抗氧化能力(ferric-reducing antioxidant power, FRAP)检测

Fe<sup>3+</sup>-三吡啶三吡嗪[Fe(III)-TPTZ]在酸性溶液中可以被样品中的还原性物质还原成Fe(II)呈现明显的蓝色, 在593 nm处具有最大吸收。样品溶液的吸光度值越大, 表明生成Fe(II)越多, 样品还原能力越强, 故可以用样品与Fe(III)-TPTZ作用生成Fe(II)的多少来评价样品抗氧化活性的强弱。用FRAP值表示样品抗氧化活性的强弱, FRAP在数值上等于样品与Fe(III)-TPTZ反应后在593 nm处产生的吸光度值所相当的标准FeSO<sub>4</sub>溶液的浓度(μmol/L)。采用Benzie等<sup>[15]</sup>的方法, 取100 μL浓度分别为25、52、100、150和200 μg/mL的红细胞裂解液与1.0 mL FRAP工作液(0.3 mol/L pH3.6乙酸钠缓冲液、10 mmol/L TPTZ和20 mmol/L三氯化铁以体积10:1:1混合), 振动加热炉中(37 °C)反应10 min, 于593 nm处测吸光度( $D_{593}$ )值。实验中选定100 μg/mL的维生素C和2,4-二叔丁基甲基苯酚(butylated hydroxytoluene, BHT)为阳性对照。

## 1.6 黄嘌呤/次黄嘌呤氧化酶体外氧化体系的建立

力竭运动中组织细胞进行有氧代谢生产ATP的量减少, AMP含量相应增高, 并进而分解成次黄嘌呤。次黄嘌呤可在黄嘌呤氧化酶的催化下生产黄嘌呤和O<sub>2</sub><sup>•-</sup>。此外, 由于产能降低, 红细胞逆浓度梯度跨膜运输能力减弱, Ca<sup>2+</sup>在胞内含量增加, 也会激活O<sub>2</sub><sup>•-</sup>可歧化生成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sub>2</sub><sup>•-</sup>间发生的Haber-Weiss反应或Fenton反应将产生HO<sup>•</sup>。用次黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶(hypoxanthine/xanthine oxidase, HX/XO)

体系构建体外氧化模型。参照Ukeda等<sup>[16]</sup>方法操作,全血用等渗PBS缓冲液(pH7.4)洗涤后,取0.25 mL压积红细胞,加入1.5 mmol/L的次黄嘌呤和0.2 U/mL的黄嘌呤氧化酶,然后将其放于振动加热炉(37 °C)中进行10 min体外孵育,测定470 nm处吸光度( $D_{470}$ )值,作为超氧阴离子的量,评估体外氧化模型构建效果。

### 1.7 统计学分析

所有数据来自三组或三组以上的重复实验中所获得数据,以均值±标准差(mean±S.D.)的形式表示。组间统计学差异通过Origin 7.5软件的One-Way ANOVA分析。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极其显著。

## 2 结果

### 2.1 检测血常规

力竭运动对大鼠血常规参数的影响如表1所示,与静坐对照组相比,力竭运动组大鼠红细胞平均体积(mean corpuscular volume, MCV)和红细胞分布宽度(red cell distribution width, RDW)显著升高,红细胞平均血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin contentration, MCHC)和平均红细胞血红蛋白量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)显著下降。力竭恢复1 h后,大鼠红细胞MCV和RDW继续维持在较高水平, MCHC和MCH维持在较低水平。恢复12 h后,大鼠红细胞MCV和MCHC与对照组仍有显著差异,恢复24 h后,大鼠红细胞各项指标恢复正常。

### 2.2 力竭运动对大鼠红细胞谷胱甘肽含量的影响

对不同运动组大鼠红细胞谷胱甘肽含量检测,结果如图1所示,与静坐对照组相比,力竭组大鼠红细胞GSH含量显著下降[ $3.01\pm 0.34 \mu\text{mol/g Hb(C组)}$  vs

$2.54\pm 0.37 \mu\text{mol/g Hb(E0组)}$ ,  $P<0.05$ ], GSSG含量显著增加[ $64.5\pm 6.6 \text{ nmol/g Hb(C组)}$  vs  $101.4\pm 8.9 \text{ nmol/g Hb(E0组)}$ ,  $P<0.01$ ], GSH/GSSG比值显著降低[ $46.7\pm 4.2(\text{C组})$  vs  $25.0\pm 3.8(\text{E0组})$ ,  $P<0.01$ ], TFG含量[ $3.14\pm 0.40 \mu\text{mol/g Hb(C组)}$  vs  $2.74\pm 0.39 \mu\text{mol/g Hb(E0组)}$ ,  $P<0.05$ ]显著下降。力竭运动恢复1 h后,各项指标均较E0组无显著差异;恢复12 h后, GSSG含量和GSH/GSSG比值仍与静坐对照组存在显著差异( $P<0.05$ );恢复24 h后,各项指标无显著性差异。

### 2.3 力竭运动对大鼠红细胞L-半胱氨酸转运能力的影响

对不同运动组大鼠红细胞L-半胱氨酸转运能力进行检测,结果如图2所示,与静坐对照组相比,力竭运动后大鼠红细胞L-半胱氨酸流入[ $3.11\pm 0.42 \mu\text{mol/(h}\cdot\text{mL)}$  Hb(C组) vs  $2.43\pm 0.39 \mu\text{mol/(h}\cdot\text{mL)}$  Hb(E0组);  $P<0.05$ ]和流出[ $0.65\pm 0.05 \text{ nmol/(h}\cdot\text{mL)}$  Hb(C组) vs  $0.18\pm 0.05 \text{ nmol/(h}\cdot\text{mL)}$  Hb(E0组);  $P<0.01$ ]速度显著下降。力竭运动恢复1 h后,各项指标均较E0组无显著差异;恢复24 h后,各项指标无显著性差异。

### 2.4 力竭运动对不同年龄大鼠红细胞FRAP的影响

对不同运动组大鼠红细胞FRAP进行检测,结果如图3所示,与静坐对照组相比,力竭运动后大鼠红细胞FRAP水平显著降低[ $1\ 695\pm 103 \mu\text{mol Fe(II)/L(C组)}$  vs  $1\ 104\pm 94 \mu\text{mol Fe(II)/L(E0组)}$ ;  $P<0.05$ ]。力竭恢复12 h内FRAP水平仍显著低于对照组。如图3B~图3E所示,相关性分析发现,力竭运动后各组L-半胱氨酸流入速率与FRAP水平呈现显著正相关。

### 2.5 体外氧化还原处理对不同运动条件大鼠红细胞氧化损伤参数和L-半胱氨酸流入速度的影响

对不同运动组大鼠红细胞黄嘌呤/次黄嘌呤氧化

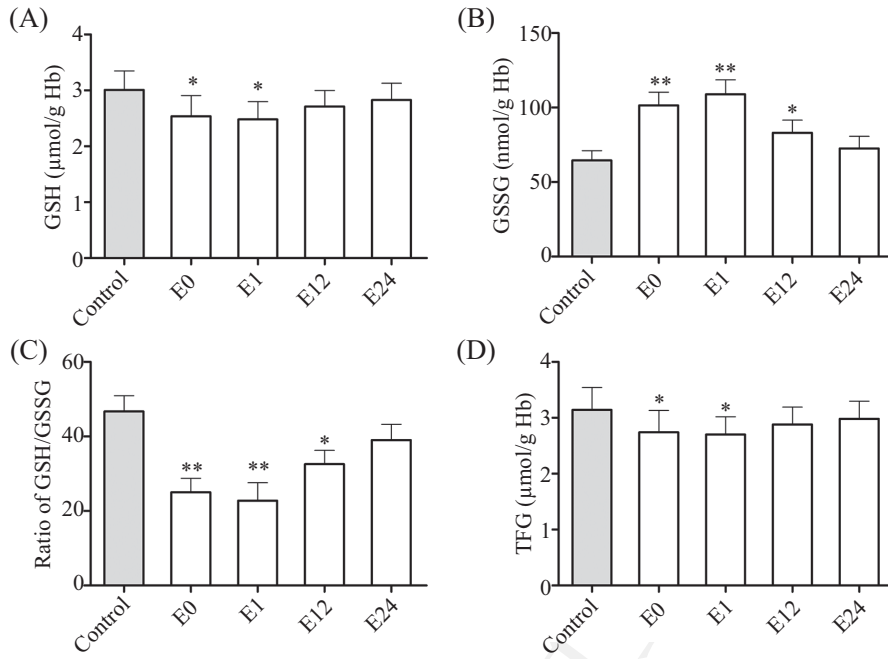
表1 力竭运动对各组大鼠血常规参数的影响

Table 1 Effect of exhaustive exercise on hematological parameter of RBCs in different group

各项指标 Parameter	对照组 Control group	E0组 E0 group	E1组 E1 group	E12组 E12 group	E24组 E24 group
HCT (%)	40.1±0.6	39.6±0.3	39.1±0.2	39.7±0.6	39.2±0.4
MCV (fL)	49.4±1.1	54.8±0.7**	55.6±1.1**	52.2±1.4*	51.9±1.4
MCHC (g/L)	36.4±0.5	30.3±0.6**	29.9±0.7**	32.1±0.9*	33.6±0.9
MCH (pg)	20.9±1.0	18.5±0.8*	18.2±1.1*	19.6±1.1	19.8±0.9
RDW (%)	12.2±0.3	13.5±0.3*	13.4±0.3*	13.6±0.2*	13.1±0.3*

HCT: 血球容积计; MCV: 红细胞平均体积; MCHC: 红细胞平均血红蛋白浓度; MCH: 平均红细胞血红蛋白量; RDW: 红细胞分布宽度。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin contentration; MCH: mean corpuscular hemoglobin; RDW: red cell distribution width. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group.

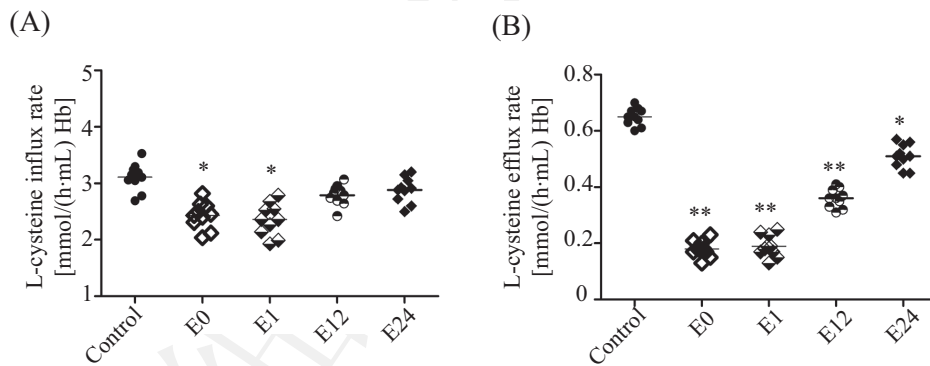


A: GSH含量; B: GSSG含量; C: GSH/GSSG比例; D: TFG水平。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

A: the levels of GSH; B: the levels of GSSG; C: GSH/GSSG ratio; D: the levels of TFG. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group.

图1 力竭运动对各组大鼠红细胞谷胱甘肽含量的影响

Fig.1 Effects of exhaustive exercise on glutathione level of RBCs in different groups



A: L-半胱氨酸流入速率; B: L-半胱氨酸流出速率。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

A: the rate of L-cysteine influx; B: the rate of L-cysteine efflux. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group.

图2 力竭运动对各组大鼠红细胞L-半胱氨酸转运能力的影响

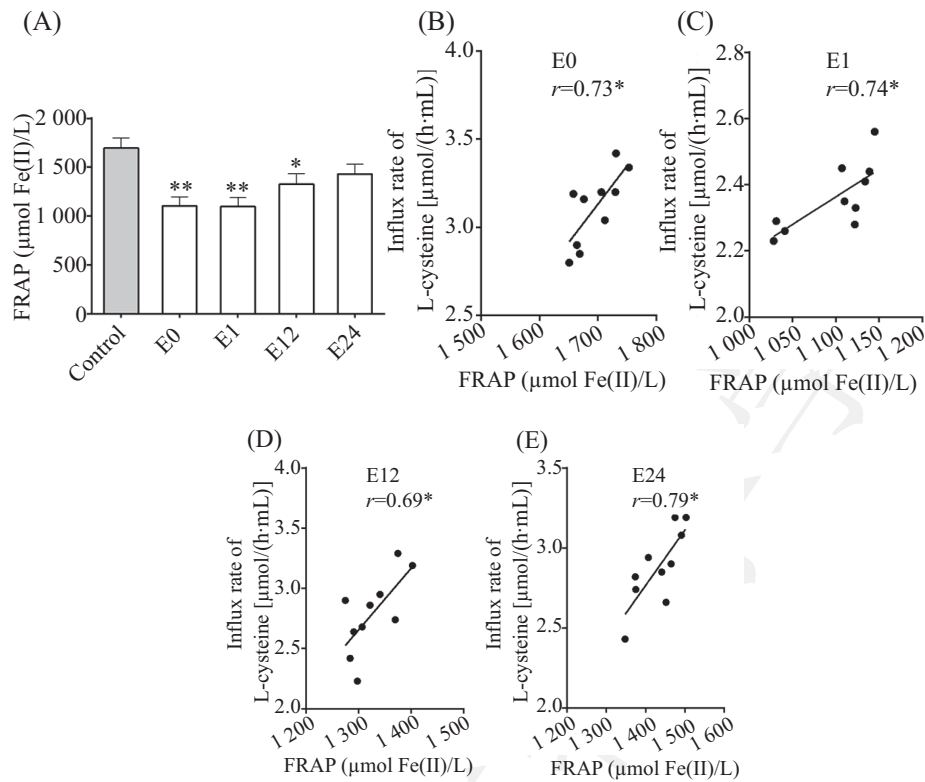
Fig.2 Effects of exhaustive exercise on L-cysteine transport capacity of RBCs in different groups

酶体外氧化体系下氧化损伤程度进行检测。结果如图4所示, 体外氧化条件下, 静坐对照组大鼠红细胞L-半胱氨酸流入速度 $[3.11\pm 0.42 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL}) \text{Hb}(\text{孵育前})$  vs  $2.36\pm 0.31 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL}) \text{Hb}(\text{孵育后})$ ,  $P<0.05$ ]、TFG含量 $[3.14\pm 0.40 \mu\text{mol/g Hb}(\text{孵育前})$  vs  $2.04\pm 0.36 \mu\text{mol/g Hb}(\text{孵育后})$ ,  $P<0.01$ ]和FRAP水平 $[1695\pm 103 \mu\text{mol Fe(II)/L}(\text{孵育前})$  vs  $1054\pm 105 \mu\text{mol Fe(II)/L}(\text{孵育后})$ ,  $P<0.01$ ]均出现显著下降, 脂质过氧化水平显著性升高 $[12.3\pm 3.5 \text{nmol/g Hb}(\text{孵育前})$  vs  $23.4\pm 5.6 \text{nmol/g Hb}(\text{孵育后})$ ,  $P<0.01$ ]。而DTT体外还原处理后力竭运动组大鼠

红细胞L-半胱氨酸流入速度 $[2.43\pm 0.39 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL}) \text{Hb}(\text{孵育前})$  vs  $2.98\pm 0.36 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL}) \text{Hb}(\text{孵育后})$ ,  $P<0.05$ ]、TFG含量 $[2.74\pm 0.39 \mu\text{mol/g Hb}(\text{孵育前})$  vs  $2.97\pm 0.38 \mu\text{mol/g Hb}(\text{孵育后})$ ,  $P<0.05$ ]和FRAP水平 $[1104\pm 94 \mu\text{mol Fe(II)/L}(\text{孵育前})$  vs  $998\pm 89 \mu\text{mol Fe(II)/L}(\text{孵育后})$ ,  $P<0.01$ ]均出现显著恢复。

### 3 讨论

力竭运动伴随着机体自由基的爆发, 导致包括肌肉、心血管损伤在内的多种运动性氧化应激性损

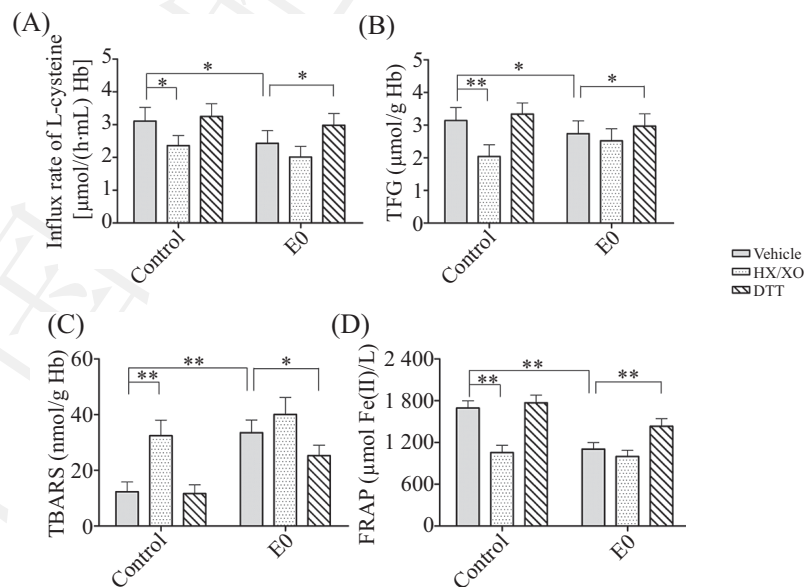


A: FRAP水平; B-E: L-半胱氨酸流入速率与FRAP水平相关性分析。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

A: the levels of FRAP; B-E: Pearson correlation analysis between L-cysteine influx rate and FRAP level. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group.

图3 不同运动条件下大鼠红细胞FRAP水平及与L-半胱氨酸流入速率相关性分析

Fig.3 FRAP value and correlation analysis with L-cysteine influx rate in RBCs from different exercise groups



A: L-半胱氨酸流入速率; B: TFG水平; C: 脂质过氧化水平; D: FRAP水平。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

A: the rate of L-cysteine influx; B: the levels of TFG; C: the levels of TBARS; D: the levels of FRAP. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图4 体外氧化条件下力竭运动对不同大鼠红细胞的影响

Fig.4 Effects of exhaustive exercise on RBCs in different groups under *in vitro* oxidation conditions

伤<sup>[1-3]</sup>。红细胞作为循环系统主要组分,在维系机体内环境酸碱平衡、渗透压平衡和氧化还原平衡的过程中起着至关重要的作用<sup>[17-18]</sup>。本研究通过对力竭运动后大鼠红细胞L-半胱氨酸转运速率的检测,探讨了红细胞内主要抗氧化物谷胱甘肽在力竭运动过程中的氧化还原变化及其潜在分子机制。

机体在运动过程中会产生大量的活性氧类(ROS),组织生成ROS后会迅速释放至血浆。尽管红细胞拥有非常完善的抗氧化机制,能够迅速地清除来自胞内外的ROS<sup>[16]</sup>。但当机体处于氧化应激状态时,持续、大量产生的ROS被释放至血浆,使红细胞的氧化-还原平衡被打破。本研究对力竭运动大鼠红细胞检测,结果表明,力竭运动后大鼠红细胞还原型GSH含量显著降低,GSH/GSSG比值也出现显著下降。这表明,力竭运动大鼠体内红细胞内的氧化-还原平衡与静坐相比偏向氧化方向转移。TFG含量的检测结果表明,力竭运动大鼠红细胞内谷胱甘肽总量显著低于静坐大鼠。一方面,这是由于力竭运动后大鼠体内较高的氧化水平导致的谷胱甘肽含量下降;另一方面,则可能是由于力竭运动组大鼠中GSH的合成速度低于对照组。在力竭运动恢复过程中,大鼠红细胞GSH和TFG含量仍维持在较低水平,GSSG含量仍显著高于静坐对照组,这意味着力竭后机体产生的大量自由基在机体内堆积,氧化损伤产物如高铁血色原、脂质过氧化物等会通过链式反应进一步诱发自由基产生。我们此前的研究发现力竭运动诱导的红细胞膜脂质、膜蛋白和血红蛋白的氧化损伤现象<sup>[9]</sup>。膜脂质受到自由基攻击通过抽氢反应生成脂过氧自由基后,脂质自由基能够从邻近一个脂分子抽氢形成新的脂质自由基,从而产生一系列的自由基。一旦这种循环形成,脂质过氧化链式反应就进入了扩展阶段。链式反应生成的脂质自由基再同活性氧反应生成另一个脂质自由基,进而断裂生成各种短链羧和醛类物质。普通的ROS寿命极短,不能到达其他亚细胞部位或者邻近细胞,但这些非自由基的醛式产物则能将自由基的损伤潜能从生成部位扩散到其他细胞或者亚细胞结构。此外,严重的氧化应激反应导致的高铁血红蛋白衍生物也具有极强的催化效能,可进一步诱导膜蛋白和膜脂质的氧化。

谷胱甘肽在人体的生化防御系统中占有重要的地位,具有相当广泛的生理功能。除了能消除代

谢产生的自由基,还可以提高人体的免疫功能<sup>[20]</sup>。人体红细胞内的GSH绝大部分维持还原态,其半衰期为4 d。在正常代谢过程中,机体会持续地产生氧化物质,红细胞内大量存在的还原型谷胱甘肽可以及时地清除这些氧化物,保护细胞膜中含巯基的酶和蛋白质不被氧化,对维持细胞的正常状态和机体内环境的稳定有重要作用。谷胱甘肽是一种含有 $\gamma$ -酰胺键和巯基的三肽,红细胞拥有由谷氨酸、L-半胱氨酸及甘氨酸合成GSH的能力。Rizvi等<sup>[10]</sup>和Davies等<sup>[11]</sup>研究发现,L-半胱氨酸进入红细胞速度是限制谷胱甘肽合成速度的主要因素。本研究发现,力竭运动后大鼠红细胞L-半胱氨酸流入和流出速率均出现显著下降。这提示,力竭运动导致的L-半胱氨酸转运速率下降是运动后红细胞TFG含量降低的潜在因素。降低的TFG含量使红细胞的抗氧化潜能持续降低,从而使机体在力竭运动结束后受到氧化损伤的风险继续增加。我们对红细胞抗氧化能力FRAP水平的检测也印证了此推测,力竭运动后12 h内大鼠红细胞FRAP水平都显著低于对照组,且与L-半胱氨酸流入速率呈现显著相关性。

为了探讨力竭运动诱导的氧化应激反应是否是红细胞L-半胱氨酸流入速率改变继而影响细胞氧化-还原平衡的原因,我们对各组红细胞进行了体外氧化还原处理。结果表明,在相同的体外氧化条件下,力竭运动组和静坐对照组大鼠均出现显著氧化损伤,并导致L-半胱氨酸流入速度的显著下降,TFG含量和FRAP水平也呈现出相似的变化趋势。而体外还原处理后,力竭运动大鼠红细胞L-半胱氨酸流入速度的显著升高,TFG含量和FRAP水平也恢复到正常水平。

运动(尤其力竭运动)过程中机体产生大量自由基,导致包括肌肉、心血管损伤在内的多种运动性氧化应激损伤。在对运动性氧化损伤的研究过程中,红细胞因其在机体内清除自由基、维系氧化还原平衡过程中所起的重要作用逐渐受到人们的关注。本研究发现,力竭运动诱导的氧化应激反应通过降低红细胞L-半胱氨酸转运能力来降低细胞GSH含量,从而减弱细胞抗氧化潜能。

## 参考文献 (References)

- 1 Maron BJ, Pelliccia A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation* 2006; 114(15): 1633-44.
- 2 Corrado D, Zorzi A. Sudden death in athletes. *Int J Cardiol* 2017;

- 237: 67-70.
- 3 Corrado D, Migliore F, Basso C, Thiene G. Exercise and the risk of sudden cardiac death. *Herz* 2006; 31(6): 553-8.
  - 4 Xiong Y, Li Y, Xiong Y, Zhao Y, Tang F, Wang X. Cluster of erythrocyte band 3: a potential molecular target of exhaustive exercise-induced dysfunction of erythrocyte deformability. *Can J Physiol Pharmacol* 2013; 91(12): 1127-34.
  - 5 Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian J Sports Med* 2015; 6(1): e24898.
  - 6 Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 2001; 8(7): 829-38.
  - 7 Xiong Y, Xiong Y, Zhou S, Sun Y, Zhao Y, Ren X, *et al.* Vitamin C and E supplements enhance the antioxidant capacity of erythrocytes obtained from aged rats. *Rejuvenation Res* 2017; 20(2): 85-92.
  - 8 Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(6): 883-98.
  - 9 Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I. S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med* 2004; 8(2): 201-12.
  - 10 Rizvi SI, Maurya PK. L-cysteine influx in erythrocytes as a function of human age. *Rejuvenation Res* 2008; 11(3): 661-5.
  - 11 Rizvi SI, Srivastava N. [L-cysteine influx in diabetic erythrocytes]. *Biomed Khim* 2010; 56(5): 545-51.
  - 12 Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107(4): 1198-205.
  - 13 Xiong Y, Xiong Y, Zhou S, Yu Z, Zhao D, Wang Z, *et al.* Inhibition of glutathione synthesis induced by exhaustive running exercise via the decreased influx rate of L-cysteine in rat erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2016; 40(6): 1410-21.
  - 14 Yildiz D, Uslu C, Cakir Y, Oztas H. L-Cysteine influx and efflux: a possible role for red blood cells in regulation of redox status of the plasma. *Free Radic Res* 2006; 40(5): 507-12.
  - 15 Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-6.
  - 16 Ukeda H, Shimamura T, Tsubouchi M, Harada Y, Nakai Y, Sawamura M. Spectrophotometric assay of superoxide anion formed in maillard reaction based on highly water-soluble tetrazolium salt. *Anal Sci* 2002; 18(10): 1151-54.
  - 17 Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008; 112(10): 3939-48.
  - 18 Swanson JW, Besarab A, Pomerantz PP, DeGuzman A. Effect of erythrocytes and globulin on renal functions of the isolated rat kidney. *Am J Physiol* 1981; 241(2): F139-50.
  - 19 Xiong Y, Li Y, Xiong Y, Zhao Y, Tang F, Wang X. Exhaustive running exercise induce tyrosine phosphorylation of band 3 in rat erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(4): 1060-71.
  - 20 Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(3): 445-73.