

高温预处理对力竭运动后人血液白细胞 HSP70mRNA 及自由基代谢的影响

陈 婷, 张治远, 张月娟

(西藏民族大学 体育学院, 陕西 咸阳 712082)

摘 要: 目的: 探讨一次及多次高温预处理对递增负荷至力竭运动后人血液白细胞 HSP70mRNA 及自由基代谢的影响。方法: 受试者随机分为运动对照组 (C), 一次高温预处理组 (P1), 多次高温预处理组 (P2)。P1 组进行一次性高温预处理 1 h (桑拿, 温度 46 ± 1 °C, 湿度 85%—90%, 体重下降 2%)。P2 组每隔三天进行一次 (共八次) 高温预处理。C 组采用 Bruce 方案在跑台上进行递增负荷运动至力竭。P1 和 P2 组高温预处理结束, 在室温下恢复 24 h 后, 在跑台上进行递增负荷运动至力竭。运动结束后记录最大心率、最大运动通气量、最大摄氧量、呼吸商等, 同时记录通气阈时的通气量、最大摄氧量利用率等。C 组、P1 组及 P2 组于运动前、运动后即刻、运动后 1 h 分别采肘静脉血。采用 RT-PCR 法检测受试者血液白细胞 HSP70mRNA 表达, 用硫代巴比妥 (TBA) 法测定血清丙二醛 (MDA) 含量, 用黄嘌呤氧化酶法测定血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 采用全血乳酸分析仪测定血乳酸值。结果: C 组力竭运动后即刻, 人血液白细胞 HSP70mRNA 表达和血清 MDA 含量较安静时显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。C 组运动后 1 h, HSP70mRNA 表达及 MDA 含量较运动后即刻显著减少 (均 $P < 0.05$), 而血清 SOD 活性较运动后即刻显著下降 ($P < 0.05$)。P1 组在安静时、运动后即刻及运动后 1 h, 均较 C 组相同时间点的 HSP70mRNA 显著升高 (均 $P < 0.05$)。而 P1 组在运动后 1 h 较 C 组同时时间点的 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$)。P2 组血液在运动后即刻和运动后 1 h, 均较 C 组相同时间点的 HSP70mRNA 表达及血清 SOD 活性显著升高 (均 $P < 0.05$)。而 P2 组在安静、运动后即刻及运动后 1 h 较 C 组同时时间点的 MDA 含量均显著减少 (均 $P < 0.05$)。P2 组在安静时、运动后即刻及运动后 1 h, 均较 P1 组相同时间点的 HSP70mRNA 显著下降 (均 $P < 0.05$)。P1 组、P2 组力竭运动中通气阈时通气量 VE 较 C 组均显著增加 ($P < 0.05$), 且受试者血液白细胞 HSP70mRNA 表达与血清 SOD/MDA 比例呈显著正相关 ($R = 0.48$, $P < 0.05$)。结论: 一次及多次高温预处理可上调运动后人血液白细胞 HSP70mRNA 表达, 抑制力竭运动所造成的氧化应激损伤。且多次高温预处理后 HSP70mRNA 表达降低, 可能是对高温重复应激的适应性反应。

关键词: 高温预处理; HSP70mRNA; 氧自由基; 抗氧化酶; 递增负荷运动; 力竭

中图分类号: G804.2

文献标志码: A

文章编号: 1008-3596 (2016) 04-0074-09

研究发现, 在缺血神经元损伤^[1], 心肌梗死及心脏^[2]、肝脏^[3]、脊髓缺血再灌注损伤^[4]等疾病模型中, 高温预处理均可发挥保护作用。其有益作用与热休克蛋白 70 (HSP70) 表达上调呈正相关^[3]。HSP70 在正常细胞中水平较低, 而

环境和生理应激 (包括热、冷、缺血、缺氧、损伤、运动等) 状态下 HSP70 可显著升高^[5-6]。研究表明, 小鼠骨骼肌 HSP70 过表达可保护肌肉免于萎缩及骨骼肌功能紊乱^[7], 心脏 HSP70 过表达可抑制缺血再灌注心肌细胞凋亡水平^[8]。而

敲除 HSP70 后的脑损伤小鼠,细胞死亡水平增加,活性氧 ROS 诱导的 p53 基因表达上调,导致外伤性脑部损伤进一步恶化^[9]。可见 HSP70 在提高细胞存活率、减轻细胞受损伤程度、维持机体内稳态中发挥着重要的保护作用。有文献报道,一次力竭运动^[10]和长期运动训练^[11]均可造成机体 HSP70 合成增加,且高温预处理后 24 h 人白细胞中 HSP70 蛋白表达较安静时显著上调。但关于高温预处理对力竭运动后人血液白细胞 HSP70mRNA 表达的影响未见报道,HSP70mRNA 是否会对高温重复应激产生适应亦未见报道。因此,本研究建立一次和多次两种高温预处理方式,采用一次递增负荷至力竭运动方案,探讨一次及多次高温预处理对力竭运动后人血液白细胞 HSP70mRNA 及自由基代谢的影响,旨在为高温预处理方式防治运动损伤研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验受试者与分组

受试者为华南师范大学体育科学学院 20 名健康男性大学生。随机分为 2 组:一次高温预处理组(P1)、多次高温预处理组(P2),每组 10 人。另外运动对照组(C)与 P2 组受试者相同,以此做多次高温干预的前后对照。受试者在实验期间禁止饮酒,常规活动,禁止大强度运动。C 组采用 Bruce 方法在跑台上进行递增负荷运动至力竭,作为力竭运动对照组。P1 组干预方式为一次性高温预处理 1 h, P2 组高温预处理时间为一个月,每隔三天一次(共八次), P1 和 P2 组室温恢复 24 h 后采用 Bruce 方法在跑台上进行递增负荷运动至力竭。

表 1 受试者身体特征 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	n	身高/cm	体重/kg	年龄
C 组/P2 组	10	171.25 $\pm$ 5.49	61.66 $\pm$ 5.50	20 $\pm$ 0.79
P1 组	10	172.7 $\pm$ 4.56	62.5 $\pm$ 4.37	20 $\pm$ 1.32

1.2 主要仪器和试剂

主要仪器为 Quinton Q55 活动跑台、2900 心肺功能测试仪、Polar 遥测心率表、YSI-1500 SPORT 全血乳酸分析仪、PTC 200 PCR 仪、A-pollo 水平电泳仪、BIO 凝胶成像系统、722 分光光度计、TU-1901 紫外分光光度计、广州气体厂液氮等。主要试剂包括全血总 RNA 快速提取试剂盒、通用 RT-PCR 试剂盒、通用 PCR 优化试剂盒、HSPcDNA 的引物、DNA Marker、EB、琼脂糖、南京建成 SOD 和 MDA 测试盒。

1.3 高温预处理实验方案

高温预处理方案在文献 [12-13] 基础上改良^[12-13]。P1 组受试者高温预处理 1 h (桑拿, 温度 46 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 湿度 85%—90%, 体重下降 2%), 受试者分两组进行桑拿, 实验人员陪同, 观察和询问受试者情况。于安静、高温预处理 0.5 h、高温预处理后即刻记录直肠温度。P2 组受试者每间隔三天进行一次(共八次)高温预处理, 桑拿方式同 P1 组。

1.4 受试者运动方案

C 组采用 Bruce 方法在跑台上进行递增负荷运动至力竭^[14-15] (Bruce 运动方案见表 2)。P1 组高温预处理 1 h 及 P2 组多次高温预处理结束, 均在室温 (温度 25 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C, 湿度 60%—65%) 恢复 24 h 后, 在跑台上进行递增负荷运动至力竭。运动方式同 C 组。

表 2 Bruce 运动方案

	第 1 级	第 2 级	第 3 级	第 4 级	第 5 级	第 6 级	第 7 级
速度/mph	1.7	2.5	3.4	4.2	5.0	5.5	6.0
坡度/%	10	12	14	16	18	20	22
METS	4.6	7.0	10.1	12.9	15.0	16.9	19.1
时间/min	3	3	3	3	3	3	3

1.5 最大摄氧量测定

采用 Bruce 运动方案, 使用 2 900 气体代谢仪进行测试, 参照文献 [16] 判断 VO_{2max} : ①

吸氧量不再增加而出现平台; ②呼吸商大于 1.1; ③心率大于 180/分; ④血乳酸浓度在 8 mmol/L 以上。以上任何 3 种条件出现即可确定

为最大摄氧量^[16]。运动结束后记录最大心率 (HR_{max})、最大运动通气量 (VE_{max})、相对最大摄氧量 (VO_{2max}/kg)、最大摄氧量 (VO_{2max})、呼吸商 (R)、运动力竭时间 (Time)。通气阈参照通气曲线进行判断^[17], 判断方法为: ①通气量非线性上升的起点; ②二氧化碳排出量非线性上升的起点; ③二氧化碳当量非线性上升并不伴随氧当量的变化。记录通气阈时各指标, 包括心率 (HR)、通气量 (VE)、最大摄氧量利用率 ($\%VO_{2max}$)、呼吸商 (R)、最大心率百分比 ($\%HR_{max}$)。

1.6 受试者血液采集

C组、P1组及P2组于运动前安静、递增负荷运动后即刻、运动后1h分别采肘静脉血, 测试受试者血液白细胞 HSP70mRNA、血清丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、血乳酸。

1.7 RT-PCR

取1ml的EDTA-K2抗凝血, 倒入DEPC处理的离心管, 9000转离心2min, 去上清, 加入1ml的Trizol, 4℃下12000转离心5min。离心后加入氯仿0.2mL, 4℃下12000转离心15min。加入异丙醇0.5mL, 4℃下12000转离心20min, 加入75%乙醇1mL, 4℃下10000转离心5min。吸去剩余乙醇。取适量DEPC水溶解RNA。分装出5μl用于RNA定量, 余下RNA用于反转录。利用紫外分光光度计测定所提取样本

总RNA浓度 ($\mu g/\mu l$)。以A260/A280在1.8—2.0范围作为RNA纯度较好的标准。取4μlRNA进行1%琼脂糖凝胶电泳, 观察18S和28S的完整性, 检测RNA有无降解。

反转录步骤: 将提取的样本RNA以2μg/μl的浓度确定所需体积 (<11μl), 按照反转录试剂盒操作步骤加入Oligo (dT) 1μl, 样本RNA, 加DEPC水至总体积12μl, 65℃孵育5min。按反转录试剂盒操作步骤分别加入5×Reaction Buffer 4μl、RiboLock™ RNase Inhibitor (20μg/μl) 1μl、10mM dNTP Mix 2μl、RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200μg/μl) 1μl, 混合均匀后离心。42℃孵育60min, 70℃加热5min终止反应, 获得RT产物。

PCR步骤: 按照试剂盒操作步骤, 配成25μl反应体系。分别加入2×Taq MasterMix 12.5μl、Forward Primer (10μM) 1μl、Reverse Primer (10μM) 1μl、Template DNA<1μg, 加Rnase-free Water至总体积25μl。充分混匀后离心, 进行PCR反应 (PCR引物见表3)。

PCR产物分析: 取PCR产物各7.5μl, 进行1%琼脂糖凝胶电泳。电压80V, 电泳60min, 之后采用Syngene凝胶成像系统成像并定量分析。以HSP70与β-actin扩增条带的成像面积积分比值来评定HSP70mRNA表达水平。

表3 PCR引物

	Primers	PCR products/bp	引物长度	GC含量
HSP70				
sense	5'-CAAGATCAGCGAGGCCGA-3'	200	18	61.11%
antisense	5'-CCCTTGGGACCTGAGC-3'		16	68.75%
β-actin				
sense	5'-GGTCACCCACACTGTGCCCAT-3'	350	21	61.9%
antisense	5'-GGATGCCACAGGACTCCATGC-3'		21	61.9%

1.8 血清MDA含量和SOD活性测定

采用硫代巴比妥 (TBA) 法测定血清丙二醛 (MDA) 含量, 用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 操作按照试剂盒说明书的规定程序进行。

1.9 血乳酸值测试

用美国产YSI-1500 SPORT全血乳酸分析仪测定血乳酸值。

1.10 数据采集与统计学处理

RT-PCR实验数据采用凝胶图象处理软件获取灰度值。所有数据用GraphPad Prism 6.0软件转换作图。且均运用SPSS 17.0 for Windows软件包进行处理。C组与P2组受试相同, 两组前后对照采用Paired Samples T-Test。组内三个时间点数据比较采用One-Way ANOVA, P1组与另两组组间比较采用One-Way ANOVA进行

数据统计处理。结果以平均数±标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 实验结果

2.1 高温预处理前中后受试者不同时刻直肠温度的比较

P1 组受试者直肠温度在高温预处理 0.5 h、1 h 均较高温预处理前极显著升高 ($P < 0.01$), 高温预处理 1 h 较 0.5 h 极显著升高 ($P < 0.01$)。P2 组受试者进行 8 次高温预处理, 直肠温度总平均值在高温预处理 0.5 h、1 h 均较高温前极显著升高 ($P < 0.01$)。高温预处理 1 h 较 0.5 h 极显著升高 ($P < 0.01$), 见表 4。

表 4 高温预处理前中后不同时刻受试者直肠温度

Tr/℃	高温预处理前	高温预处理 0.5h	高温预处理 1 h
P1 组	36.76±0.75	38.04±1.06**	38.84±0.87** #
P2 组 8 次高温预处理总平均值	37.47±0.52	37.99±0.54**	38.43±0.50** #

注: * 表示与高温预处理前相比, $P < 0.05$; ** 表示与高温预处理前相比, $P < 0.01$; # 表示与高温预处理 0.5 h 相比, $P < 0.05$; ## 表示与高温预处理 0.5 h 相比, $P < 0.01$ 。

2.2 高温预处理前后受试者裸重的比较

P1 组受试者高温预处理后裸重极显著下降 ($P < 0.01$), 下降百分比约为 2%。P2 组受试者进行 8 次高温预处理后, 裸重总平均值极显著下降 ($P < 0.01$), 下降百分比约为 2%。见表 5。

表 5 高温预处理前后受试者裸重

Weight(kg)	高温预处理前	高温预处理后
P1 组	62.53±4.37	61.39±4.12**
P2 组 8 次高温预处理总平均值	62.40±5.45	61.55±5.28**

注: ** 表示与高温预处理前相比, $P < 0.01$ 。

2.3 高温预处理前后血液白细胞 HSP70mRNA 的变化

C 组受试者力竭运动后即刻, 血液白细胞

HSP70mRNA 表达较安静值显著升高 ($P < 0.01$), 升高了 2.96 倍。运动后 1 h 的 HSP70mRNA 表达较运动后即刻显著下降 ($P < 0.05$)。P1 组 HSP70mRNA 在安静时、运动后即刻及运动后 1 h, 均较 C 组相同时间点的值显著升高 (均 $P < 0.05$), 且分别升高了 10.29 倍、2.34 倍和 10.97 倍。P2 组 HSP70mRNA 在运动后即刻和运动后 1 h, 均较 C 组相同时间点的值显著升高 ($P < 0.05$), 且分别升高了 0.93% 和 3.18 倍。P2 组 HSP70mRNA 在安静时、运动后即刻及运动后 1 h, 均较 P1 组相同时间点的值显著下降 ($P < 0.05$), 且分别下降了 72%、43% 和 65%。见图 1、图 2。

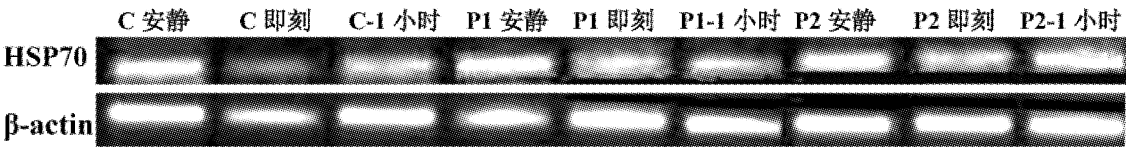


图 1 受试者血液白细胞 HSP70mRNA 表达变化

2.4 高温预处理前后血清 MDA 含量、SOD 活性的变化

C 组力竭运动即刻血清 MDA 含量较安静时显著增加 ($P < 0.05$)。运动后 1 h 较即刻显著减少 ($P < 0.05$)。P2 组 MDA 含量在安静、运动后即刻及运动后 1 h 较 C 组同时时间点的值均显著减少 (均 $P < 0.05$)。见图 3。

C 组力竭运动后 1 h 血清 SOD 活性较运动后即刻显著下降 ($P < 0.05$)。P1 组 SOD 活性在运动后 1 h 较 C 组同时时间点的值显著升高 ($P < 0.05$)。P2 组 SOD 活性在运动即刻和运动后 1 h, 均较 C 组同时时间点的值显著升高 (均 $P < 0.05$)。见图 4。

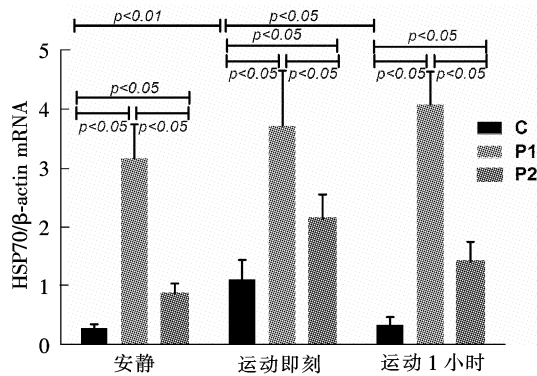


图2 受试者血液白细胞 HSP70mRNA (HSP70/β-actin) 面积积分比值

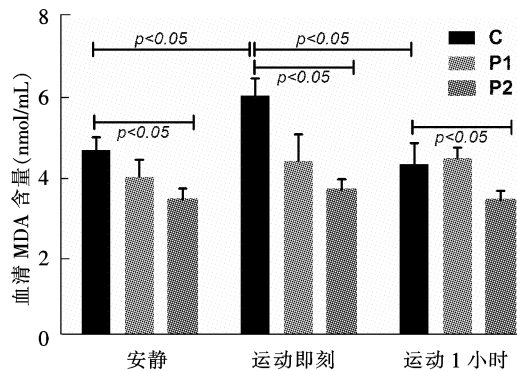


图3 受试者血清 MDA 含量 (nmol/mL) 变化

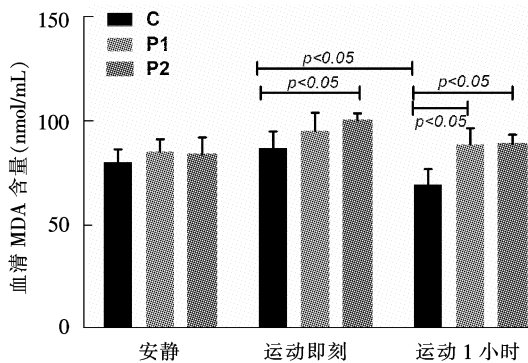


图4 受试者血清 SOD 活性 (μ/mL) 变化

2.5 受试者力竭运动时最大摄氧量、血乳酸等指标的变化

C 组、P1 组和 P2 组在力竭运动时, 最大心率 (HR_{max})、最大运动通气量 (VE_{max})、相对最大摄氧量 (VO_{2max}/kg)、最大摄氧量 (VO_{2max})、呼吸商 (R)、运动力竭时间 ($Time$) 各指标均未出现显著性变化 ($P>0.05$)。见表 6。

P1 组、P2 组力竭运动中通气阈时通气量 (VE) 较 C 组均显著增加 ($P<0.05$)。其他指标包括心率 (HR)、最大摄氧量利用率 ($\%VO_{2max}$)、呼吸商 (R)、最大心率百分比 ($\%HR_{max}$) 均未出现显著变化 ($P>0.05$)。见表 7。

C 组、P1 组和 P2 组受试者力竭运动后即刻血乳酸浓度较各组安静值均显著增加 (均 $P<0.01$)。C 组、P1 组和 P2 组受试者力竭运动后 1 h 血乳酸浓度较各组运动后即刻均显著降低 (均 $P<0.01$)。P2 组运动后即刻血乳酸浓度较 C 组、P1 组均显著增加 (均 $P<0.01$)。见图 5。

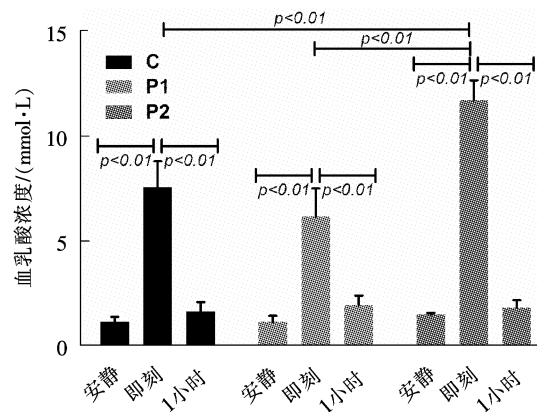


图5 受试者力竭运动时血乳酸浓度 (mmol/L) 的变化

表6 受试者力竭运动时最大摄氧量等指标的变化

组别	$HR_{max}/(B/min)$	$VE_{max}/(L/min)$	VO_{2max}/kg	$VO_{2max}/(mL \cdot min)$	R	$Time/min$
C 组	183.6 ± 9.55	102.12 ± 16.64	49.86 ± 7.19	3064 ± 524.41	1.219 ± 0.05	14.18 ± 0.86
P1 组	193.78 ± 7.16	116.37 ± 13.82	53.22 ± 3.13	3319.22 ± 252.75	1.17 ± 0.06	14.4 ± 0.85
P2 组	192.6 ± 5.06	111.1 ± 11.70	50.79 ± 5.69	3135.1 ± 398.14	1.22 ± 0.05	13.98 ± 0.82

表7 受试者力竭运动中通气阈时的各指标变化

组别	$HR/(B/min)$	$VE/(L/min)$	$\%VO_{2max}$	R	$\%HR_{max}$
C 组	168.3 ± 9.98	64.31 ± 6.59	82.61 ± 4.55	1.02 ± 0.06	89.8 ± 5.41
P1 组	161 ± 8.56	$69.63 \pm 4.70^*$	78.33 ± 6.56	0.99 ± 0.06	85.78 ± 4.76
P2 组	158.4 ± 15.06	$67.16 \pm 4.13^*$	79.48 ± 7.79	0.99 ± 0.05	84.7 ± 8.00

注: * 表示与 C 组相比, $P<0.05$ 。

2.6 相关性分析

图6的相关性分析结果表明,受试者血液白细胞 HSP70mRNA 表达与血清 SOD/MDA 比例相关性密切,呈显著正相关 ($R=0.48$, $P<0.05$)。表明一次及多次高温预处理后受试者血液白细胞 HSP70mRNA 表达增加,伴随血清 SOD/MDA 比例的增加。

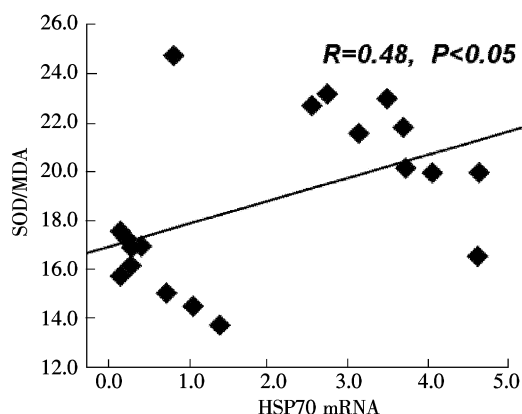


图6 受试者血液白细胞 HSP70mRNA 与血清 SOD/MDA 比例相关性示意图

3 分析与讨论

有研究发现,一次力竭运动^[10]和长期运动训练^[11]均可造成机体 HSP70 合成增加。而两种运动方式的时相性表现为,一次力竭运动后 30—60 min,骨骼肌 HSP70mRNA 表达达到峰值,之后逐渐下降,6 h 后恢复安静水平^[10]。而连续 4 周大强度训练,运动员肌肉 HSP70 蛋白水平(训练前为 100%)从第一周到第四周分别增长 181%、405%、456%和 363%,呈下降趋势。HSP70 蛋白峰值出现在训练第二周后^[18]。同时研究发现运动员跑完半个马拉松后,白细胞胞浆 HSP70 在运动后即刻、3 h、24 h 显著增加^[19-20]。HSP70 表达与运动时间和强度密切相关^[21]。中等强度运动尚不足刺激 HSP70 表达增加,高强度训练对 HSP70 的诱导更为显著^[22]。而关于运动诱导 HSP70 表达增加的机制,目前认为剧烈运动过程中 ATP 的减少、体温升高、pH 值改变、氧化应激损伤、乳酸堆积、运动引起的肌肉收缩、血流改变等应激,都可能是诱导 HSP70 增加的刺激因素^[23]。

而本实验证实,力竭运动后即刻人血液白细胞 HSP70mRNA 显著增加,运动后 1 h 逐渐降低。本实验还发现,一次及多次高温预处理可显

著上调人血液白细胞 HSP70mRNA 表达,高温预处理与运动叠加后 HSP70mRNA 表达进一步增加。文献表明热应激可导致 HSP70 合成增多,其合成量与受热时间和程度有关。随着 HSP70 表达增加,细胞存活率增加,受损伤程度减轻^[24]。通过高温预处理方式提前诱导 HSP70 产生,可增加机体抵抗损伤的能力,从而起到保护作用^[2,12]。而 HSP70 表达的时相性研究发现,经冠状静脉窦逆行高温灌注稀释血液入心脏后大鼠心肌 HSP70mRNA 水平于 15 min 增加 5 倍,30 min 增加 10 倍,60 min 增加 2 倍^[25]。而高温预处理后大鼠肝脏 HSP70 表达在 8—24 h 达到最高峰^[25]。而本实验指标时相性结果发现,一次高温预处理白细胞 HSP70mRNA 在运动后即刻及运动后 1 h,较运动对照组分别升高了 2.34 倍和 10.97 倍。而多次高温预处理 HSP70mRNA 在运动后即刻和运动后 1 h,较运动对照组分别升高了 0.93%和 3.18 倍。且多次高温预处理后 HSP70mRNA 表达较一次高温预处理降低,在安静时、运动后即刻及运动后 1 h,分别下降了 72%、43%和 65%。表明可能是机体对高温重复应激的适应性反应。

本实验采用一次递增负荷至力竭的运动方案,发现运动对照组在运动后即刻,血清 MDA 含量较安静时显著增加,SOD 活性有上升趋势,此时 HSP70mRNA 表达在运动后即刻较安静时显著升高。说明力竭运动使机体脂质过氧化水平增加,而抗氧化酶活性提高不足以对抗 ROS 的增加,引起机体氧化应激损伤。文献中降低氧化应激损伤的方式多样,本实验中采用了高温预处理方案。研究表明,高温预处理可增加大鼠腓肠肌和淋巴细胞 HSP 表达,提高肌纤维线粒体氧化酶活性,增加大鼠在高温环境中的运动时间和耐力水平^[24]。且高温预处理的保护作用与 HSP70 表达上调呈正相关^[3]。在本实验中,一次高温预处理后血清 SOD 活性在运动后即刻和运动后 1 h,较运动对照组显著升高。多次高温预处理后 MDA 含量在运动后即刻和运动后 1 h,较运动对照组显著降低。而 SOD 活性在运动后即刻和运动后 1 h 显著增加。此时一次及多次高温预处理组白细胞 HSP70mRNA 在运动后即刻和运动后 1 h 均显著升高,且 HSP70mRNA 表达与血清 SOD/MDA 比例呈显著正相关。提示高温预处理及运动双因素刺激后 HSP70mRNA

表达显著增高,可提高机体抗氧化酶活性,抑制脂质过氧化水平,减轻力竭运动造成的氧化应激损伤。同时本研究发现,一次及多次高温预处理组在运动后通气阈值 VE 均较运动对照组显著增加。通气阈值可反映人体有氧工作能力,提示两种高温预处理方式可增强受试者的有氧工作能力。

研究表明,HSP70 的分子保护机制包括抗氧化作用^[26]、协同免疫作用^[27]、分子伴侣作用、抗细胞凋亡作用^[28-29]。HSP 具有抗氧化的生物活性,HSP 与其结合物可激活蛋白激酶 C,增强蛋白酶活性,促进 ATP 水解,刺激内源性抗氧化剂的合成和释放,从而抵抗过氧化物损伤。研究报道小鼠骨骼肌过表达 HSP72,可增加血清抗氧化酶 SOD 活性,抑制氧化应激损伤,降低力竭运动造成的骨骼肌损伤和疲劳^[26]。同时发现心肌过表达 HSP72,可通过提高心脏 Mn-SOD 含量及活性,减少心肌细胞凋亡,对缺血再灌注心脏起到保护作用^[29]。在本实验中两种高温预处理方式抑制了力竭运动造成的氧化应激损伤,其机制主要体现在白细胞 HSP70mRNA 的抗氧化作用。

4 结论

本研究发现一次及多次高温预处理可上调运动后人血液白细胞 HSP70mRNA 表达,抑制力竭运动造成的氧化应激损伤。且多次高温预处理后 HSP70mRNA 表达降低,可能是对高温重复应激的适应性反应。

参考文献:

- [1] Du F, Qian Z M, Zhu L, et al. A synergistic role of hyperthermic and pharmacological preconditioning to protect astrocytes against ischemia/reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(2): 312-318.
- [2] Juggi J S, Hoteit L J, Babiker F A, et al. Protective role of normothermic, hyperthermic and estrogen preconditioning and pretreatment on tumour necrosis factor-alpha-induced damage [J]. *Exp Clin Cardiol*, 2011, 16(2): 5-10.
- [3] Mizushima Y, Wang P, Jarrar D, et al. Preinduction of heat shock proteins protects cardiac and hepatic functions following trauma and hemorrhage [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, 278(2): 352-359.
- [4] Zhang P, Abraham V S, Kraft K R, et al. Hyperthermic preconditioning protects against spinal cord ischemic injury [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(5): 1490-1495.
- [5] Kim N, Kim J Y, Yenari M A. Pharmacological induction of the 70-kDa heat shock protein protects against brain injury [J]. *Neuroscience*, 2015, 284C(10): 912-919.
- [6] Kourtis N, Nikolettou V, Tavernarakis N. Small heat-shock proteins protect from heat-stroke-associated neurodegeneration [J]. *Nature*, 2012, 490(7419): 213-218.
- [7] McArdle A, Dillmann W H, Mestrl R, et al. Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction [J]. *FASEB J*, 2001, 18(2): 355-357.
- [8] Suzuki K, Sawa Y, Kagisaki K, et al. Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70 [J]. *Basic Res Cardiol*, 2000, 95(5): 397-403.
- [9] Eroglu B, Kimbler D E, Pang J, et al. Therapeutic inducers of the HSP70/HSP110 protect mice against traumatic brain injury [J]. *J Neurochem*, 2014, 130(5): 626-641.
- [10] Thompson H S, Scordilis S P, Clarkson, P M, et al. A single bout of eccentric exercise increases HSP27 and HSC/HSP70 in human skeletal muscle [J]. *Acta Physiol Scand*, 2001, 171(2): 187-193.
- [11] Milne K J, Noble E G. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93(2): 561-568.
- [12] Du F, Zhu L, Qian Z M, et al. Hyperthermic preconditioning protects astrocytes from ischemia/reperfusion injury by up-regulation of HIF-1 alpha expression and binding activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(11): 1048-1053.
- [13] Ozveri E S, Bekraki A, Cingi A, et al. The effect of hyperthermic preconditioning on the immune system in rat peritonitis [J]. *Intensive Care Med*, 1999, 25(10): 1155-1159.
- [14] Fielding R A, Frontera W R, Hughes V A, et al. The reproducibility of the Bruce protocol exercise test for the determination of aerobic capacity in older women [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 1997, 29(8): 1109-1113.
- [15] van der Cammen-van Zijp M H M, Ijsselstijn H, Takken T, et al. Exercise testing of pre-school

- children using the Bruce treadmill protocol: new reference values [J]. *Arbeitsphysiologie*, 2009, 108(2):393-399.
- [16] Levine B D. VO_{2max} : what do we know, and what do we still need to know? [J]. *J Physiol*, 2008, 586(1):25-34.
- [17] Gaskill S E, Ruby B C, Walker A J, et al. Validity and reliability of combining three methods to determine ventilatory threshold [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2001, 33(11):1841-1848.
- [18] Liu Y, Mayr S, Opitz-Gress A, et al. Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers [J]. *J Appl Physiol*, 1999, 86(1): 101-104.
- [19] Fehrenbach E, Passek F, Niess A M, et al. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2000, 32(3):592-600.
- [20] Walsh R C, Koukoulas I, Garnham A, et al. Exercise increases serum Hsp72 in humans [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6(4): 386-393.
- [21] Liu Y, Lormes W, Baur C, et al. Human skeletal muscle HSP70 response to physical training depends on exercise intensity [J]. *Int J Sports Med*, 2000, 21(5):351-355.
- [22] Liu Y, Lormes W, Wang L, et al. Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training [J]. *Arbeitsphysiologie*, 2004, 91(2-3): 330-335.
- [23] Pösö A R, Eklund-Uusitalo S, Hyypä S, et al. Induction of heat shock protein 72 mRNA in skeletal muscle by exercise and training [J]. *Equine Vet J Suppl*, 2002, (34):214-218.
- [24] Chen H W, Chen S C, Tsai J L, et al. Previous hyperthermic treatment increases mitochondria oxidative enzyme activity and exercise capacity in rats [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 1999, 15 (10): 572-580.
- [25] McCully J D, Myrmet T, Lotz M M, et al. The rapid expression of myocardial hsp 70 mRNA and the heat shock 70 kDa protein can be achieved after only a brief period of retrograde hyperthermic perfusion [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27 (3): 873-882.
- [26] Liu C C, Lin C H, Lin C Y, et al. Transgenic overexpression of heat shock protein 72 in mouse muscle protects against exhaustive exercise-induced skeletal muscle damage [J]. *J Formos Med Assoc*, 2013, 112(1): 24-30.
- [27] Chang C C, Chen S D, Lin T K, et al. Heat shock protein 70 protects against seizure-induced neuronal cell death in the hippocampus following experimental status epilepticus via inhibition of nuclear factor-kappaB activation-induced nitric oxide synthase II expression [J]. *Neurobiol Dis*, 2013(62): 241-249.
- [28] Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions [J]. *Febs Lett*, 2010, 581(19): 3702-3710.
- [29] Suzuki K, Murtuza B, Sammut I A, et al. Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction [J]. *Circulation*, 2002, 106(1):270-276.

Effects of Hyperthermic Preconditioning on Blood Leucocyte HSP70mRNA and Oxygen Free Radical after Exhaustive Exercise

CHEN Ting, ZHANG Zhi-yuan, ZHANG Yue-juan

(School of Physical Education, Tibet University for Nationalities, Xianyang 712082, China)

Abstract: *Objectives:* To discuss the effects of two kinds of hyperthermic preconditioning on blood leucocyte HSP70mRNA and oxygen free radical after incremental exercise. *Methods:* The subjects are randomly divided into 3 groups: exercise control group (C), exercise after one hyperthermic precon-

conditioning group (P1), and exercise after more hyperthermic preconditioning group (P2). P1 Group: The hyperthermic preconditioning is performed for an hour (Sauna, $46 \pm 1^\circ\text{C}$; relative humidity, 85%-90%). P2 Group: one hyperthermic preconditioning every three days, total eight times are performed. Group C applies Bruce protocol on treadmill to do incremental exercise to exhaustion. P1 and P2 Group are at rest under the normal temperature for 24 hours after hyperthermic preconditioning, and then do incremental exercise to exhaustion on treadmill. The maximum heart rate, maximal exercise ventilation, maximal oxygen uptake, respiration quotient are recorded at the end of the exercise, and the ventilation rate, maximal oxygen uptake utilization ratio are recorded at the same time. The elbow vein blood of C Group, P1 and P2 are collected before exercise, immediately after exercise, and 1 hour after exercise. By RT-PCR method, the tested groups' expression of blood white cells HSP70mRNA are detected, content of malondialdehyde (MDA) in the serum is determined by the method of TBA and superoxide dismutase (SOD) activity is measured by the method of xanthine oxidase, blood lactic acid values is examined by the blood lactate analyzer. **Results:** in C Group, in immediate testing, the expression of HSP70mRNA and the content of serum MDA are significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$) compared with the test at rest. C Group after 1 hour's exercise, HSP70mRNA expression and MDA content are significantly reduced compared with immediate testing (both $P < 0.05$), while the serum SOD activity is significantly decreased ($P < 0.05$) compared with immediate testing. Compared with C Group, HSP70mRNA expression in P1 Group increases significantly at rest, immediately and 1h after exercise (both $P < 0.05$). SOD activity of P1 Group elevates significantly immediately after exercise ($P < 0.05$). Compared with C Group, HSP70mRNA expression and SOD activity in P2 Group increases significantly at immediately and 1hour after exercise (both $P < 0.05$), MDA content in P2 Group reduces markedly at rest, immediately and 1hour after exercise (both $P < 0.05$). Compared with P1 Group, P2 Group HSP70mRNA expression decreases markedly at rest, immediately after exercise, 1 hour after exercise ($P < 0.05$). And HSP70mRNA is positively correlated with the production of SOD/MDA ($R = 0.48$, $P < 0.05$). **Conclusions:** Two kinds of hyperthermic preconditioning could increase leukocyte HSP70mRNA expression after incremental exercise, and reduce exhaustive exercise-induced oxidative damage. Leukocyte HSP70mRNA expression is decreased after one month hyperthermic preconditioning, this may be the adaptive response to repeated heat stress.

Key words: hyperthermic preconditioning; HSP70mRNA; oxygen free radical; superoxide dismutase; incremental exercise; exhaustion