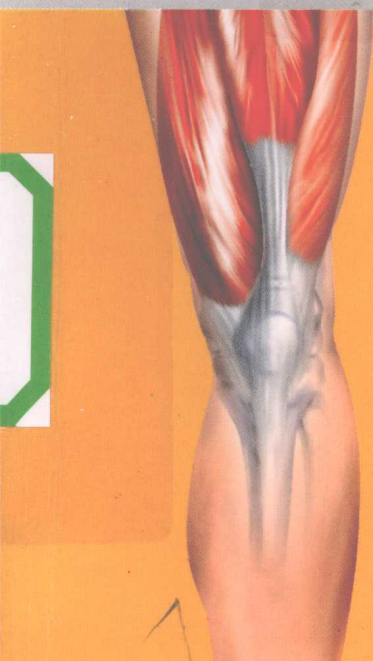




骨骼肌静力性负荷 所致损伤机理的研究

刘 晔 著



北京体育大学出版社

北京市教育委员会科研基地项目

《我国体能类项目优秀运动员专项训练过程中肌肉疲劳度评价模式研究》研究成果

(项目编号 PXM2009_014206_076951)

骨骼肌静力性负荷 所致损伤机理的研究

刘 晔 著

北京体育大学出版社

策划编辑: 闫文龙

责任编辑: 文冰成

审稿编辑: 苏丽敏

责任校对: 卢 雪

责任印制: 陈 莎

图书在版编目(CIP)数据

骨骼肌静力性负荷所致损伤机理的研究 / 刘晔著.

--北京: 北京体育大学出版社, 2010.8

ISBN 978-7-5644-0443-7

I. ①骨… II. ①刘… III. ①运动性疾病-骨损伤-研究

②运动性疾病-肌肉-损伤-研究 IV. ①R873

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第120393号

骨骼肌静力性负荷所致损伤机理的研究

刘 晔 著

出 版: 北京体育大学出版社

地 址: 北京市海淀区信息路48号

邮 编: 100084

邮 购 部: 北京体育大学出版社读者服务部 010-62989432

发 行 部: 010-62989320

网 址: www.bsup.cn

印 刷: 北京雅艺彩印有限公司

开 本: 787×1092毫米 1/16

印 张: 8.5

2010年8月第1版第1次印刷

定 价: 28.00 元

(本书因装订质量不合格本社发行部负责调换)



作者简介

刘晔，男，甘肃酒泉人，生于1971年12月，博士，北京体育大学运动解剖学教研室副教授，硕士研究生导师。主要从事“体育运动与人体形态结构的关系”、“运动技术原理与力量训练”方向的研究和教学工作。在核心期刊和国际、国内学术会议发表论文40余篇，主持省部级科研项目6项，主编和参与编写著作10部。曾于2004年奥运会备战工作中为国家皮划艇队进行科研攻关服务，为我国皮划艇项目在雅典奥运会夺得金牌、实现历史性的突破作出了贡献。2008年奥运会备战周期作为国家花样游泳队科研团队负责人之一，为我国花样游泳项目水平的迅速提升、在北京奥运会实现奖牌零的突破作出突出贡献。

目 录

1 前 言	1
2 文献综述	3
2.1 肌肉疲劳及肌肉损伤机理的研究概况	3
2.1.1 肌细胞能量代谢紊乱学说	4
2.1.2 肌细胞内钙稳态失调学说	11
2.1.3 自由基和脂质过氧化学说	21
2.1.4 机械损伤学说	25
2.2 肌肉损伤的证据与标志	27
2.2.1 肌肉损伤的形态学证据	27
2.2.2 肌肉损伤的生物化学证据和标志	29
2.3 肌肉损伤后修复与再生的研究概况	31
2.3.1 肌卫星细胞	32
2.3.2 生长因子	32
2.4 骨骼肌静力性损伤动物模型建立的研究概况	36
3 实验动物分组	38
3.1 实验动物分组	38
3.2 实验动物的运动方式和安排	38
3.2.1 大鼠静力性运动实验台的设计	38
3.2.2 大鼠静力性运动方式	39
3.3 取材和标本制备	40

3.3.1 取材	40
3.3.2 石蜡切片制备及染色	40
3.3.3 透射电镜组织切片制备及染色	42
3.3.4 腓肠肌线粒体的制备 [204]	42
3.3.5 腓肠肌肌浆网的制备 [204]	42
3.3.6 腓肠肌胞浆的制备 [204]	42
3.4 测试指标与方法	43
3.4.1 大鼠体重的监测方法	43
3.4.2 大鼠一般状况的观察 [118]	43
3.4.3 大鼠腓肠肌常规组织学观察	44
3.4.4 大鼠腓肠肌透射电镜观察	44
3.4.5 大鼠血清乳酸激酶 (CK) 活性的测定	44
3.4.6 大鼠血清乳酸脱氢酶 (LDH) 活性的测定	44
3.4.7 腓肠肌线粒体、肌浆网和胞浆蛋白含量的测定	45
3.4.8 腓肠肌线粒体钙含量的测定	45
3.4.9 腓肠肌肌浆网钙含量的测定	46
3.4.10 腓肠肌胞浆钙含量的测定	46
3.4.11 腓肠肌线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - K^{+} -ATP 活性的测定	46
3.4.12 腓肠肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - K^{+} -ATP 活性的测定	46
3.4.13 腓肠肌线粒体中丙二醛 (MDA) 含量的测定	46
3.4.14 腓肠肌肌浆网中丙二醛 (MDA) 含量的测定	47
3.4.15 腓肠肌胞浆中丙二醛 (MDA) 含量的测定	47
3.4.16 腓肠肌线粒体中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性的测定	47
3.4.17 腓肠肌肌浆网中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性的测定	48
3.4.18 腓肠肌胞浆中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性的测定	48
3.4.19 腓肠肌糖原含量的测定	48

3.4.20 腓肠肌胞浆中乳酸 (LA) 含量的测定	48
3.4.21 血清中乳酸 (LD) 含量的测定	49
3.4.22 bFGF、TGF- β 1 免疫组化染色的显微图象分析方法	49
3.4.23 bFGF、TGF- β 1 mRNA 表达的 RT-PCR 方法	49
3.5 数据统计处理	51
4 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤模型的建立	52
4.1 实验结果	52
4.1.1 施加不同时间静力性负荷对大鼠体重的影响	52
4.1.2 大鼠一般状态的变化	53
4.1.3 大鼠腓肠肌常规组织学的变化	53
4.1.4 大鼠腓肠肌超微结构的变化	54
4.1.5 不同时间静力性负荷实验组大鼠血清肌酸激酶活性的变化	54
4.1.6 不同时间静力性实验组大鼠血清乳酸脱氢酶活性的变化	55
4.2 分析与讨论	55
4.2.1 施加不同时间静力性负荷对大鼠体重的影响	55
4.2.2 施加不同时间静力性负荷对大鼠腓肠肌微观结构的影响	56
4.2.3 施加不同时间静力性负荷对大鼠血清肌肉酶活性的影响	58
4.3 小 结	60
5 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤机制的研究	61
5.1 实验结果	62
5.1.1 骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中骨骼肌能量代谢指标的改变	62
5.1.2 骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中肌细胞钙稳态的改变	64
5.1.3 骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中肌细胞自由基代谢的改变	69
5.2 分析与讨论	72
5.2.1 骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中能量代谢的变化	72
5.2.2 骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中肌细胞钙稳态的变化	77

5.2.3 骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中自由基代谢的变化	84
5.3 小结	89
6 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中 bFGF 和 TGF-β 1 的表达	91
6.1 实验结果	92
6.1.1 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中 bFGF 蛋白表达的变化	92
6.1.2 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中 TGF- β 1 蛋白表达的变化	94
6.1.3 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中 bFGF mRNA 表达的变化	96
6.1.4 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中 TGF- β 1 mRNA 表达的变化	97
6.2 分析与讨论	97
6.2.1 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中 bFGF 表达特征与损伤时间的关系	97
6.2.2 大鼠骨骼肌静力性负荷所致损伤过程中 TGF- β 1 表达特征与损伤时间的关系	101
6.3 小结	104
7 全文总结	106

1 前言

骨骼肌损伤是发生率较高的运动性损伤。临床统计资料表明^[1]：“我国优秀运动员由于运动训练不当、过度负荷或被动拉伸导致的骨骼肌损伤占全部运动损伤的 50% 以上”。Linenger 等人^[2]报道：美陆军士兵中，肌肉损伤占有所有训练损伤的 46%。对不同运动项目流行病学调查表明^[3,4]：“骨骼肌损伤发生率有其项目差异，某些项目可达 30% 以上”。近几十年来，与职业有关的慢性肌肉损伤问题也日趋突出。据前西德统计，因此类疾病造成的缺勤占整个工业缺勤天数的 15% ~ 22%^[5]。加拿大每年因肌肉骨骼损伤疾病而导致的直接和间接经济损失高达 996 亿美元^[6]。国内研究报道^[7]我国机械工人的职业性慢性肌肉骨骼损伤患病率达 64%。由此可见，无论是一般人群还是特殊职业人群，骨骼肌损伤的发生率都较高。骨骼肌损伤虽不及心血管疾病、癌症等疾病那样危及生命，但它会给人们日常生活、工作和运动带来极大不便，严重影响生活质量、学习和工作的效率以及运动训练的正常进行。因此，研究骨骼肌损伤的机制，了解与认识其病理、病变规律，探讨预防、治疗及康复措施，一直是运动医学领域中的重要研究内容之一。

目前，有关运动导致肌肉损伤的研究大多是针对肌肉进行高强度、大负荷及耗竭性的离心性或向心性的动力性收缩所致的损伤，对于肌肉进行静力性收缩所致的损伤研究较少。而肌肉在进行静力性收缩时与离心性和向心性收缩有不同的机能特征，此时肌肉不发生长度变化但产生肌张力，且肌张力持续作用的时间较长，肌内压持续保持较高状态，使肌肉血供和代谢产物排出产生障碍。由此提示，肌肉静力性收缩所致损伤的机理可能与离心性和向心性收缩方式所致损伤的机理有所不同。

流行病学研究和生物力学分析已经证实^[8]，肌肉损伤的主要原因是局部肌肉的过度负荷或反复用力。当机体或肢体处于某种强迫体位或维持某种固定姿势时，肌肉静力性收缩产生一定的肌张力，使肌纤维

承受较大的静力负荷。有研究表明肌肉等长收缩达到最大随意收缩的15%~20%时,肌肉血液循环会减弱,可致组织缺血,代谢产物清除减慢^[9],逐渐积累可造成损伤。目前有关静力性负荷所致肌肉损伤的确切机理尚不十分清楚。随着竞技体育的飞速发展,在诸如射击、射箭、棋类和武术等许多运动项目中,运动员在训练和比赛中承受的静力性负荷越来越大,时间越来越长,由肌肉静力性收缩所导致的肌肉损伤也呈现逐渐增加的趋势,直接影响运动员正常的训练和比赛,制约了运动技能的维持和发展,严重者会导致运动生涯的缩短。另外,随着生产机械化、自动化、专业化程度的提高和计算机在社会生活中的广泛应用,人们在工作、学习和生活中越来越长时间保持某种姿势和体位,与此有关的慢性肌肉静力性损伤问题也日趋突出^[5,6,7],已严重影响人们正常的工作、学习和生活,严重影响青少年的身体发育和健康成长。因此,研究静力性收缩所致肌肉损伤的机理对于预防和治疗这种运动性损伤具有重要意义,在竞技体育、群众体育和劳动卫生等领域均具有一定的理论和实际价值。

本研究通过建立静力性收缩所致肌肉损伤的动物模型,从整体及组织水平观察血清、肌肉中与能量代谢、细胞内钙稳态和自由基反应有关的生化指标的变化,从亚细胞水平观察肌肉超微结构及肌细胞线粒体、肌浆网和胞浆中与能量代谢、细胞内钙稳态和自由基反应有关的指标的变化,同时观察肌肉内生长因子在细胞和基因水平表达的变化,力求从多角度探讨静力性收缩所致肌肉损伤和修复的机理,为运动训练、大众健身和劳动卫生领域提供理论依据。总体研究思路如图1-1所示。

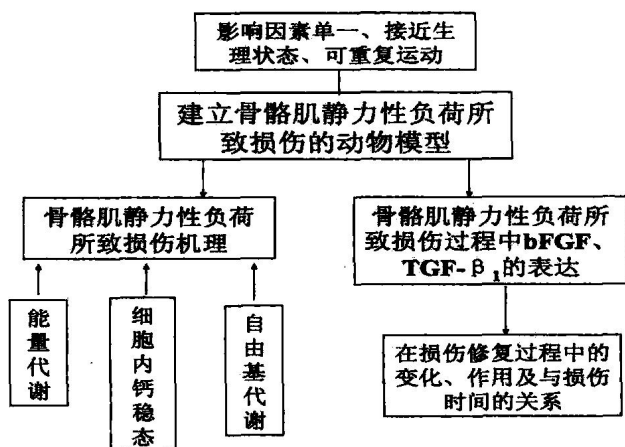


图 1-1 总体研究思路示意图

2 文献综述

肌肉损伤在运动和工作中极为常见,最常见的是急性拉伤,发生于运动和工作中,临床表现为明显的疼痛及功能障碍。另一类肌肉损伤则通常在运动和工作中无明显的疼痛感,有时仅表现为肌肉僵硬或酸胀,但在运动和工作中出现延迟性肌肉酸痛。延迟性肌肉酸痛是肌肉疲劳的典型表现,然而,肌肉疲劳时,肌肉损伤的某些症状可以经常被观察到,例如肌肉酸胀、僵硬、肿胀,此时肌肉疲劳似乎与肌肉损伤伴随出现。对疲劳肌肉的活组织检查也提供了肌肉损伤的直接证据,如血清肌酸激酶和乳酸脱氢酶升高,血清中肌红蛋白检出阳性^[10],以及可以检出肌肉内蛋白质的一些降解产物^[11]。显然,肌肉的疲劳有时伴有肌肉的损伤。依据Hough的观点^[12],出现延迟性肌肉酸痛不可单纯地认为是肌肉疲劳,而可能伴有损伤,即当代许多学者所提出的肌肉微损伤^[13]。Hough将肌肉酸痛分为两大类型,第一类为发生于肌肉活动时的肌肉酸痛,它与疲劳有密切关系;第二类肌肉酸痛一般出现于运动后并且持续较长时间,依据现代的研究此类肌肉酸痛与肌肉损伤关系密切。根据Hough的论述和已报道的有关研究,可以认为在某些状况下,如肌肉进行长时间工作,或进行不习惯的活动,肌肉的微损伤伴随着肌肉的疲劳,而且二者可能有互为因果的关系。从肌肉功能的角度来看,运动性肌肉疲劳表现为肌肉不能维持原有的功率输出,而肌肉的运动能力下降;从肌肉结构变化的角度来看,运动性肌肉疲劳可能存在着骨骼肌微细结构的损伤。因此本文就肌肉疲劳及与其关系密切的肌肉损伤的相关研究进行综述。

2.1 肌肉疲劳及肌肉损伤机理的研究概况

肌肉疲劳是指肌肉在经过一段时间的持续收缩或反复收缩后,不能继续保持运动所需或所预期的肌张力和肌肉收缩^[14]。此概念最早由Edward提出,现已得到普遍认同。有关肌肉疲劳机理的研究一直是肌肉

生理学研究的重点。肌肉疲劳及损伤主要是由于骨骼肌负荷过大引起的。其中一种负荷是动态负荷，如身体某些部位频繁或快速地运动；另一种是静态负荷，如长时间保持某种姿势或体位。前者骨骼肌进行向心性 or 离心性的收缩，在运动医学领域以往研究较多；后者骨骼肌多进行静力性的等长收缩，以往研究较少。目前，有关运动导致肌肉疲劳及损伤（又称骨骼肌超微结构变化）的机理，学术界一直存在着不同的看法，可归纳为肌肉能量代谢紊乱学说、自由基学说、细胞内钙稳态失调学说和机械损伤学说等不同假说。

2.1.1 肌细胞能量代谢紊乱学说

许多学者的研究表明肌肉收缩过程中，肌细胞内能量物质耗竭、代谢产物堆积等对肌纤维的功能及整块肌肉的工作能力均产生影响，是导致肌肉疲劳和损伤发生的重要原因。

2.1.1.1 高能磷酸化合物与肌肉疲劳

骨骼肌收缩时，肌纤维的收缩蛋白—肌动蛋白和肌球蛋白在连接和分离的过程中要消耗能量，其能量来自三磷酸腺苷（ATP）分子的分解反应。在肌丝滑动过程中，ATP 的作用模式如下^[15]：（图 2-1）

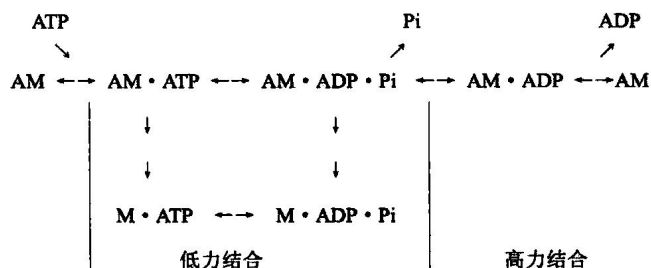


图 2-1 肌丝滑动过程中 ATP 作用模式示意图（依据 Metzger^[15]）

肌肉利用 ATP 的部位和作用是：（1）肌球蛋白 ATP 酶消耗 ATP，引起肌丝相对滑动和肌肉收缩做功；（2）肌浆网膜上钙泵（ Ca^{2+} —ATP 酶）消耗 ATP，转运 Ca^{2+} ，调节肌肉松弛；（3）肌膜上钠泵（ Na^+ , K^+ —ATP 酶）消耗 ATP，转运 Na^+/K^+ 离子，调节膜电位。通常肌肉组织中保持足够的 ATP 含量。而上述任何一个过程被阻断都将引起肌肉疲劳^[16]。

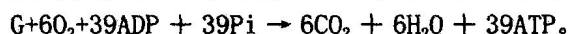
肌细胞内 ATP 储量十分有限，但由于 ATP 在消耗的同时又不断再合

成, 使人体可利用的 ATP 总量非常大。ATP 合成基本上是 ATP 水解过程的逆转: $\text{ADP} + \text{P}_i + \text{能量} \rightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$ 。肌细胞中可提供能量合成 ATP 的代谢系统包括下列三个供能系统, 它们构成了运动肌能量供应系统。

(1) 磷酸原供能系统: 高能磷酸化合物如磷酸肌酸 (CP) 分解供能, 可表示为: $\text{CP} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{Cr} + \text{ATP}$ 。磷酸肌酸 (CP) 安静时其含量是 ATP 的 3 ~ 4 倍, 在短时间、最大强度运动中起主导作用。当肌肉收缩、ATP 耗竭时, CP 可暂时补充高能磷酸根, 再生 ATP, 使胞浆中的 ATP 迅速恢复。近年的研究表明, CP 的生理功能不止于此。Bessman 等^[17, 18]提出 CP 能量往返机制, 指出 CP 不仅参与磷酸原供能系统, 还能作为能量的转递者, 将线粒体有氧代谢所产生的能量输送到所需部位, 积极参与有氧氧化功能, 使 ATP 在利用部位水解后, 就地重新合成, 有效地保证了 ATP 水解与再合成紧密的耦联。

(2) 糖酵解供能系统: 糖无氧分解供能, 可表示为: $\text{G} + 3\text{ADP} + 3\text{P}_i \rightarrow 2\text{LA} + 3\text{ATP}$;

(3) 有氧代谢供能系统: 糖、脂肪、蛋白质有氧氧化供能, 可表示为:



越来越多的研究表明, 高能磷酸化合物在肌肉疲劳和损伤的发生过程中起着很大的作用。当肌肉由于长期处于收缩状态而导致 ATP 分解速率大于合成速率时, ADP、AMP、 P_i 和乳酸等代谢产物在体内大量堆积, 导致 pH 值下降, 肌肉酶活性及电解质浓度发生改变。Taylor^[19]研究表明, ADP 和 P_i 从肌动蛋白-肌球蛋白复合物 (AM) 的解离是不同步的, 所产生的作用也不相同。 P_i 的解离是与 AM 复合物从低力结合态到高力结合态的转变相耦联的, 其解离触发了储存在肌球蛋白横桥中的能量的释放, 使横桥滑动, 而肌球蛋白的头部和肌动蛋白的脱离首先需要 ADP 的解离, 之后 ATP 与肌球蛋白分子结合, 横桥断开, 随后 ATP 被位于肌球蛋白头部的 ATP 酶分解。Cooke^[20]等发现 ADP 可以抑制横桥脱离速度, 表明 ADP 的解离发生在横桥循环的末期。另一方面肌肉持续收缩使局部血管受压, 血供减少, 细胞缺氧, 而线粒体是细胞内对缺氧最敏感的细胞器, 因此首先出现损伤, 使能量生成进一步减少, 长期影响可导致肌肉疲劳和肌肉结构的损伤。

2.1.1.1.1 ATP 对 Ca^{2+} 的释放及再摄取的影响

Nagessar^[21]曾报道在肌肉疲劳产生早期, 胞内 ATP 浓度基本保持不变。但当肌肉的磷酸肌酸储备耗竭, 进入肌肉疲劳后期以后, ATP 含

量缓慢下降,而此时肌浆网释放 Ca^{2+} 亦呈下降趋势。因此他提出 ATP 含量的下降可能使 Ca^{2+} 通道开放受到影响,从而使 Ca^{2+} 释放减少。Allen 等^[22] 应用 ATP 的 P^3 -1-(2-硝基苯基)乙基酯复合物对此进行了研究。上述复合物经紫外线照射可发生光分解产生 ATP,他们将这种复合物注入到鼠骨骼肌中,使肌纤维经反复强直收缩出现疲劳后给以紫外线照射,发现随着胞内 ATP 含量增加, Ca^{2+} 释放及肌张力也随之增加,但肌浆网膜上 Ca^{2+} 泵功能没有明显变化,作者认为三联管处的 ATP 含量比肌浆中的 ATP 含量低,这将抑制 Ca^{2+} 的释放。Han^[23] 发现当胞浆内 Ca^{2+} 浓度从 100nM 增加至 10 μM 时,三联管处的 ATP 水解率显著增加,当肌肉处于强直收缩状态时,肌浆中的 Ca^{2+} 浓度可达 1 μM ,在三联管处浓度更高一些,所以胞内 Ca^{2+} 浓度增加导致三联管处 ATP 消耗增加,ATP 含量下降,抑制肌浆网 Ca^{2+} 释放。此外,ATP 含量下降也可使 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性明显降低,肌浆网摄取 Ca^{2+} 减少。

ATP 浓度下降与 Ca^{2+} 释放减少有关的机制可能有以下几方面:

(1) 肌浆网 Ca^{2+} 通道的开放需要 ATP。虽然 ATP 的分解产物 ADP 和 AMP 均可激活 Ca^{2+} 通道,但它们的激活能力远远小于 ATP 的激活能力,所以 ATP 浓度的下降将减少肌浆网 Ca^{2+} 通道的开放;

(2) ATP 浓度的下降可使肌膜表面的 K^+ 通道被激活,并且减少动作电位的幅度和持续时间,减少 Ca^{2+} 的释放;

(3) 随着 ATP 浓度的下降,肌浆网摄取 Ca^{2+} 的速率和数量均下降,导致 Ca^{2+} 的释放减少。

2.1.1.1.2 ADP 在肌肉疲劳发生中的作用

Eisenberg^[24] 等认为肌肉最大收缩速度受横桥与肌动蛋白脱离速度的影响。Siemankowski^[25] 等提出横桥解离的速度又受 ADP 从 AM 复合物上解离的控制。White^[26] 通过实验发现,ADP 浓度在 0.05mmol/L 时即可抑制肌动—肌球蛋白的解离。Cooke 和 Pate^[20] 发现,当肌细胞内 ADP 浓度由静息时的大约 20 $\mu\text{mol/L}$ 升高到疲劳时的 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,等长收缩力升高 2%,肌肉最大缩短速度降低了约 5%。他们认为由于 ADP 从 AM 复合物解离下来的反应是可逆的,所以 ADP 浓度升高可使该解离反应向反方向进行,从而使大量 ADP 仍结合在 AM 复合物上,使肌球蛋白无法与 ATP 结合,导致肌球蛋白与肌动蛋白的分离速度下降,表现为肌肉的最大收缩速度下降。这种变化在 ATP 浓度低、ADP 浓度高时最为明显。但上述实验是在缺乏肌酸激酶、磷酸肌酸和糖酵解反应的情况下进行的,

这些反应可以使 ADP 不断磷酸化而保持在较低的水平, 所以 ADP 在肌肉疲劳时使肌肉最大收缩速度下降的作用只有在特定实验条件或长时间持续运动后才能表现出来, 而且这种作用同肌纤维类型密切相关。

2.1.1.1.3 H^+ 浓度升高在肌肉疲劳发生中的作用

目前普遍认为肌细胞内 H^+ 浓度升高是导致肌肉疲劳的一个重要因素。肌细胞内 H^+ 浓度升高与肌张力下降之间有很高的相关性。静息状态时肌细胞内 pH 值一般在 6.9 ~ 7.33 之间。在高强度运动导致肌肉出现疲劳时, 肌细胞内 pH 值一般下降 0.4 ~ 0.8 个单位, 可低至 6.2 左右。大量实验表明随着 pH 值从 7.0 降至 6.2, 肌张力可降低 30% 左右。在肌肉疲劳后的恢复期进行观察发现, 肌张力的恢复同 pH 值的升高呈显著相关。但也有人认为在正常生理温度下, 肌细胞内 pH 值降低对肌张力产生的直接抑制作用不是导致肌张力下降的主要原因。Westerblad^[27] 等发现随着温度从 12℃ 上升至 32℃, pH 值下降对肌张力的抑制作用也随之减弱。22℃ 时肌张力下降约 28%, 肌肉最大收缩速度降低约 20%, 32℃ 时肌张力只下降了 10%, 肌肉最大收缩速度则没有改变。但肌细胞内 H^+ 浓度升高使肌张力下降是肯定的, 只是目前人们对其作用机制尚不十分明确。

Sue palmer^[28] 提出 H^+ 抑制肌张力产生的作用机制可能为: 作为 ATP 水解产物, H^+ 释放是在横桥循环中完成的, 当 H^+ 浓度升高时, 可能使其释放过程逆转。Kentish^[29] 认为横桥循环中 H^+ 的释放可能发生在 $AM \cdot ADP \cdot Pi$ 处于低力结合状态时。Seow 和 Ford^[30] 的研究肯定了这一说法, 认为 H^+ 确实作用于横桥低力结合状态, 使其无法正常过渡到高力结合状态, 从而直接抑制肌张力的产生。

有一些学者认为肌细胞内 H^+ 浓度升高而使 Ca^{2+} 敏感性降低也是导致肌肉疲劳的重要原因。对各种类型肌纤维所作实验证实, 胞内 pH 值从 7.0 降至 6.2 时, 力-pCa 曲线出现右移, 表明肌纤维进行收缩所必需的游离 Ca^{2+} 敏感性下降。Blanchard^[31] 等认为 H^+ 浓度升高降低了 TnC 与 Ca^{2+} 的亲合力, 抑制了 Ca^{2+} 与 TnC 的结合。但有人发现 pH 值降低对 TnC- Ca^{2+} 结合部位的亲合力并无影响。在上述研究中均存在一个问题, 即所用实验材料是完整的肌原纤维或是经分离纯化的肌钙蛋白, 这样所测定的 Ca^{2+} 可能是总结合的 Ca^{2+} , 包括与 TnC 上高亲合力位置结合的 Ca^{2+} , 也包括与 TnC 上低亲合力 Ca^{2+} 专一位置结合的 Ca^{2+} , 还可能包括与肌原纤维的其他蛋白成分相结合的 Ca^{2+} , 这样就很难判定 pH 值变化对 TnC 上

Ca^{2+} 专一位置 Ca^{2+} 亲和力的影响。为解决这个问题, Sue palmer 等^[28] 应用荧光探针标记经分离提纯的 TnC 以观察 pH 值降低对 TnC 上 Ca^{2+} 专一位置 Ca^{2+} 亲和力的直接影响, 发现 Ca^{2+} 敏感性下降的部分原因是由于 H^+ 浓度的增高对 TnC 的直接抑制作用, 作用机制可能是 H^+ 竞争性地与 TnC 上低亲和力的 Ca^{2+} 专一位置 (II 位) 结合, 抑制了 II 位与 Ca^{2+} 的结合。 Ca^{2+} 敏感性下降的另外一部分原因是由于间接作用造成的。这些间接作用包括 H^+ 浓度升高使处于高能结合状态的肌动蛋白—肌球蛋白复合体数目减少以致降低了 Ca^{2+} 与 TnC 的亲和力, 同时影响其他的调节蛋白 (TnT、TnI 或 TM) 功能并最终使 Ca^{2+} 敏感性降低。

2.1.1.1.4 无机磷酸在肌肉疲劳发生中的作用

肌肉收缩时, 随着 CP 和 ATP 含量的下降, 肌细胞内无机磷酸 (Pi) 的含量增高。肌细胞对 Pi 浓度增高的反应是将其通过线粒体膜上的载体蛋白转运到线粒体中, 这种载体蛋白能够选择性转运 HPO_4^{2-} 。但这一转运系统在肌内 Pi 大量生成时作用有限, 故肌肉疲劳时胞内有大量 Pi 蓄积。由于横桥周期中 Pi 的解离是一个可逆反应, Pi 浓度升高使 Pi 解离反应逆向进行, 也使得肌动蛋白—肌球蛋白复合物无法从低力结合状态过渡到高力结合状态, 从而显著降低肌纤维的最大肌张力 (P_0)。Pate 等^[32] 发现, 等长肌张力的下降同 Pi 浓度的对数成线性关系, 他们认为 Pi 和 ATP 之间的竞争可阻止肌动蛋白与肌球蛋白的解离从而导致收缩速度的下降, 且 Pi 对收缩速度的影响只有在 ATP 含量较低时才比较明显。

有人提出 Pi 中的 HPO_4^{2-} 是导致肌张力下降的主要因素。当肌浆的 pH 值近中性时, Pi 主要以 HPO_4^- 和 HPO_4^{2-} 两种形式存在。当 pH 值降低时, Pi 主要以 HPO_4^{2-} 形式存在。在用肌纤维所做实验中证实 HPO_4^{2-} 浓度与肌张力存在明显的负相关关系。近来 Nosek^[33] 等研究证实在快肌纤维 (II 型纤维) 中, HPO_4^{2-} 浓度与肌张力呈负相关, 但在慢肌纤维 (I 型纤维) 中, 两者间无相关关系。

一些研究发现^[34], 肌细胞内 Pi 的积聚不但可以降低最大肌张力, 而且可明显降低细胞对钙离子的敏感性, 表现为力-pCa 关系曲线右移 ($\text{pCa} = -\lg[\text{Ca}^{2+}]$, 在不同的 pCa 值时, 肌张力的变化曲线为力-pCa 关系曲线)。因为在正常的肌肉收缩过程中, 肌球蛋白与肌动蛋白结合可以增强 Ca^{2+} 敏感性, 据推测可能是通过一种蛋白质间的相互作用使用肌钙蛋白的亚单位 C (TnC) 对 Ca^{2+} 的亲和力升高所致, 所以对 Pi 升高

时 Ca^{2+} 敏感性下降的一个可能的解释是 Pi 浓度升高使肌动蛋白—肌球蛋白复合体数目减少, 导致 Ca^{2+} 敏感性降低。也有人提出 Pi 可能作用于 TnC , 使其与 Ca^{2+} 的亲合力下降。Sue palmer^[28] 通过应用荧光探针 IAANS 和 DANZ 标记分离的 TnC 研究了 Pi 浓度升高对 TnC 上 I、II 位专一性结合部位与 Ca^{2+} 的亲合性的影响, 结果表明 Pi 浓度升高对 TnC 与 Ca^{2+} 的亲合性无影响, 由此认为 Pi 浓度升高引起的 Ca^{2+} 敏感性降低同 TnC 无关, 而可能与 Pi 浓度升高所导致的高力结合态的肌动蛋白—肌球蛋白复合体数目减少有关或同 Pi 与 Ca^{2+} 的功能拮抗作用有关。

2.1.1.1.5 “高能磷酸化合物含量变化导致肌肉疲劳”的疑点

研究疲劳时一个重要问题是细胞 ATP 含量是否降低到一个临界水平, 以致于肌肉产生力量的能力和 / 或横桥的循环率受到损害^[35, 36]。有研究发现, 即使在高强度运动疲劳时, 细胞内 ATP 也很少降低到运动前水平的 70% 以下, 此时细胞内 ATP 浓度仍比肌纤维产生最大收缩力所需要的量高 100 多倍^[37]。Sahlin^[38] 和 Dawson^[39] 等认为: ATP 在未耗竭时即可限制肌肉活动, 原因是 ATP 水解释放的自由能减少。胞浆中的自由能由下列公式计算:

$$G' = G^0 - RT \ln [\text{ATP}] / [\text{ADP}][\text{Pi}]$$

随着疲劳的发展, 由于 ADP 和 Pi 不断增加, 即使 ATP 含量保持稳定, 可利用的自由能也将下降。

有研究表明, ADP 可以降低横桥循环的速率和肌张力^[40]。在等长收缩 (15 ~ 60 秒) 和重复性强直收缩时, ATP 水解率下降, 并影响到肌张力的生成和收缩速度^[41, 42, 43, 44, 45, 46]。

目前, 有些学者认为肌肉疲劳至力竭与高能磷酸化合物的代谢并不相关^[47, 48, 49, 50]。VΦllestad 等^[47] 发现: 当伸膝肌以 30%MVC (最大随意收缩运动) 进行间歇性收缩活动时, 在开始的 30 分钟内, 最大肌张力逐渐下降至开始的 50%, 而 CP、 Pi 和 H^+ 都几乎保持不变, 因此认为由重复性等长收缩所致的疲劳可能是由于兴奋—收缩耦联受阻所致, 而与其底物和代谢改变无关。Sahlin 等^[48] 研究也发现: 肌肉力竭时底物浓度改变并不明显, CP 水平仍大约是对照组的 50%。Saugen^[40] 等在相似的研究中发现: 在接近力竭时, 肌肉产生肌张力的能力和代谢产物水平都没有发生很大的改变, 接近力竭的研究对象仍可继续运动 15 ~ 20 分钟而保持 ATP 不下降。相反, 在运动开始的最初几分钟里, CP 呈现较快速的下降。这一结果表明肌肉力竭与高能磷酸化合物的代谢并不相关。