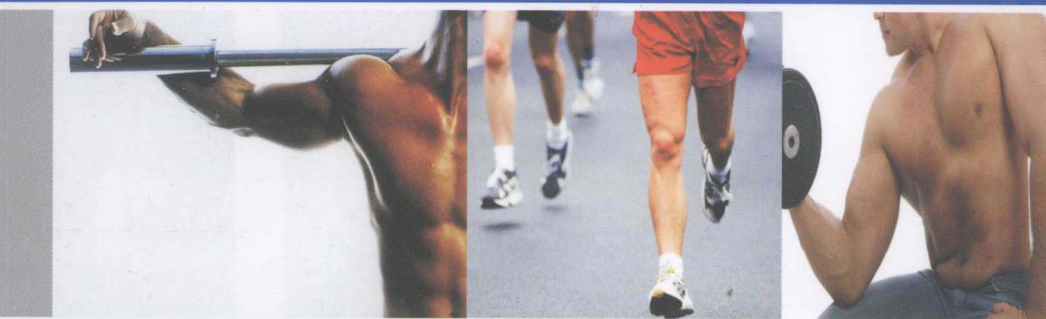


湖南科技大学学术著作出版基金资助

YUNDONGXING PILAO YU
SHUAILAO GUOCHENGZHONGDE
TANGJIYINGJI



运动性疲劳与 衰老过程中的羧基应激

蔡建光◎著

 吉林大学出版社

本书受湖南科技大学学术著作出版基金资助出版
本著作的研究成果由湖南科技大学博士
启动基金(E51090)赞助完成

运动性疲劳与衰老过程中的 羰基应激

蔡建光 著

吉林大学出版社

内容提要

本书是探讨丙二醛对运动性疲劳和衰老这两个生理过程的影响。首先从物质和能量代谢角度,探讨活性羰基类物质形成的生化过程,并阐述了自由基特别是脂氧自由基在活性羰基类物质形成中的作用。在实验研究上,以SD大鼠为动物模型,研究了丙二醛在运动性疲劳和机体衰老形成中的作用,并探讨了丙二醛对血液流变学的影响。因此,本书不仅从理论上探讨了丙二醛在机体运动性疲劳和衰老生理发生中的作用,从实验上对这些理论进行了进一步的阐释。

图书在版编目(CIP)数据

运动性疲劳与衰老过程中的羰基应激 / 蔡建光著.

— 长春: 吉林大学出版社, 2012.5

ISBN 978-7-5601-8340-4

I. ①运… II. ①蔡… III. ①运动性疲劳—研究②衰老—研究③羰基—生理应激—研究 IV. ①G804.7②R339.3③Q591

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 102195 号

运动性疲劳与衰老过程中的羰基应激

编 著: 蔡建光,

责任编辑: 沈广启

责任校对: 崔小波

封面设计: 赵勇刚

出版发行: 吉林大学出版社出版

网 址: <http://www.jlup.com.cn>

E-mail: jlup@mail.jlu.edu.cn

社 址: 长春市明德路 501 号

邮 编: 130021

发行部电话: 0431-89580026/28/29

印 刷: 长沙裕锦印务实业有限公司

印 次: 2012 年 6 月第 1 版

2012 年 6 月第 1 次印刷

开 本: 880 × 1230 1/32

印 张: 6

字 数: 150 千字

书 号: 978-7-5601-8340-4

定 价: 26.80 元

序 言

尽管衰老机制极其复杂,然而越来越多的事实表明,动物和人类的衰老过程是先天(遗传)因子和后天(环境)因素相互作用,生死拮抗的过程。

由抵抗应激、新陈代谢、蛋白更新和机体稳态等系统的基因组成的网络扮演着高等动物生老病死的先天性制约因子的主要角色——所谓“基因决定寿命”。而在能量代谢中自发进行的自由基氧化和非酶糖基化等生化副反应导致的损伤改变则为生物体衰老的主要后天驱动因子。

由这些生化副反应以及老年色素研究的最新成果所推举而出的羰基毒化衰老理论及其近期的发展突破了当前“从生物大分子——主要从基因和蛋白质——看生命奥秘”的思维局限,进而从代谢组学和系统生物学的角度,从生化反应的共性元素,“分子功能团”的水平,或所谓“亚分子水平”,看人类生理性衰老的共同分子机制,值此,衰老过程的生化本质昭然若揭——*所谓“熵增决定衰老”。换言之,衰老是损伤与生命维护的无尽博弈。

衰老是一个复杂的过程,影响着分子、细胞、组织、器官以及整个身心,而机体的自我维护与更新修复也复杂得令成千上万的科学家为之叫绝,甚而终身“俯首称臣”。每一个维持机制单独看都可以作为一门学科,疲劳与维护就是其中之一。

“疲劳”生化主要包括:乳酸积累、ATP 消耗、生物垃圾堆积、组织损伤等。但前两个生化变化与能量代谢过程的急性消耗联系紧密,与造成老年退行性疾病的垃圾积累和组织损伤关系不大。老年病与衰老

则与后两者的积累联系更密切,所谓积劳成疾。“积劳”就是“疲劳”的积累,或者用生化语言就是生化副反应代谢垃圾的积累。值得庆幸的是,生化副反应造成的组织损伤和毒性垃圾在产生的早期是可以被机体积极地修复清除的,例如,我们机体的休息与睡眠成功地执行并基本完成了这个伟大的使命,所谓常人不睡则病,睡则病轻,睡眠乃“日复一日的返老还童”。

蔡建光老师是数年前从我们衰老生化研究室走出来的优秀博士研究生,深得“羰基毒化衰老学说”的精髓。本书把以“羰基毒化”为核心的能量代谢相关“广义衰老学说”开拓应用于运动性疲劳的研究上,确实令人耳目一新,发人深省。这个方向,横跨诸多生物医学领域,尤须学贯中西的科学大家来一网打尽,融会贯通。涉浅水者捕鱼虾,涉深水者缚蛟龙。

尽管目前这条路上仍然山重水复,荆棘丛生,希望不久的将来这里将开出烂漫山花,结出硕果累累。

科学的发展不就是因为艰难如此,充满未知,才更令人迷离其中,流连忘返的吗?

印大中

湖南师范大学生命科学学院

特聘教授 终身潇湘学者

2012年3月

前 言

运动性疲劳和机体衰老是运动人体科学和生命科学领域两个常议常新的命题。在运动医学和运动生理学界,就人体在长时间剧烈运动中出现的运动性疲劳现象提出过许多假说。从 1880 年生理学家莫索(Mosso)提出运动性疲劳的原因是机体在剧烈运动过程中代谢产物的毒害,到 1956 年 Harmann 教授提出自由基氧化学说并由现代运动人体科学工作者应用到运动医学领域,提出了运动性疲劳的自由基学说,无不反映出机体在剧烈运动中物质和能量代谢的变化与机体运动能力下降之间的密切联系。莫索提出其假说距今已有 100 多年的历史,经过运动生理学和运动医学工作者的不懈努力,至今提出了几十种运动性疲劳产生机制的学说,其中不少学说是莫索假说的具体和深入,如“乳酸堆积学说”、“代谢产物堵塞学说”,包括众所周知的“自由基氧化学说”。然而有关运动性疲劳形成的确切生理生化机制,还是众说纷纭,莫衷一是。有关疲劳的概念直到 1982 年 6 月在美国波士顿召开的第五届国际运动生物化学会议上,科学工作者才取得了初步统一认识,即疲劳是“机体生理过程不能持续其机能在一特定水平上和/或不能维持预定的运动强度。”这一概念的特点是第一次从生理学的角度把疲劳时机体和器官的机能水平与运动能力结合起来评定疲劳的发生和疲劳程度,同时有助于选择客观指标评定疲劳,如心率、血乳酸、最大吸氧量和输出功率在某一特定水平工作时,单一指标或各指标同时改变都可用来判断疲劳。当然,这一概念也有它的不足,主要是没有对有关疲劳的心理因素进行探讨。因为导致机体运动性疲劳的因素有机体运动能力的下降,也包括主观上的情感因素。因此,探讨有关

运动性疲劳的产生机制及如何全面地对运动性疲劳进行定义并由此对运动性疲劳进行评价和监督,对提高运动员的运动训练水平和指导大众健身有十分重要的现实意义。

机体衰老和抗衰老更是一个古老的课题。追溯 5000 年的中华文明,随处可见古人追求延年益寿、驻颜抗衰的印记。“长生不老”已经成为中国文化的一部分。从秦始皇派徐福东渡求取长生不老之仙草到汉室宫廷盛行的炼丹之风,再到历代名医留下的养生益寿经典,古人渐渐将“抗衰老”从追求永生的“神仙之学”,融入到中医药学的体系之中,留下了惠泽后世的益寿方药,如《黄帝内经》,《神农本草》等。古今中外关于机体衰老的学说也让人眼花缭乱。从整体上来说,可以分为主动衰老学说和被动衰老学说两个主要流派。前者以奥古斯特·魏斯曼(August Weismann)为代表,他在 1881 年发表的小册子《寿命》(The Duration of Life)中第一次用进化的观点解释衰老现象,认为机体存在一个预定的被自然选择设定的死亡机制,用以去除无用的、衰老的个体。……当这个群体已经产生足够的子代,如果没有死亡,则物质消耗者的增加将对后代生存不利,因此自然选择将去除这些无用的、衰老个体。关于主动衰老的其他代表性的理论有:机体磨损衰老学说、差误成灾衰老学说、自然演进衰老学说及剩余信息衰老学说等。而被动衰老学说则以 1952 年诺贝尔生理学和医学奖获得者 Peter Medawar 提出的突变累积衰老理论为代表,他认为衰老并不是自然选择为了杀死老年个体的主动过程,而是自然选择的副产物;衰老并不是该群体对自然选择的适应,因为高龄的衰老个体对子代的进化已经不起作用,所以高龄衰老个体应是被自然选择忽视的部分。其他有代表性的被动衰老理论有 Williams 提出的互逆基因多效性衰老理论、Kirkwood 提出的弃置体衰老理论、细胞复制衰老理论等。随着现代分子生物学的发展,特别是在全球生命科学领域主要实验室和科学家共同参与的人类基因组计划实施以来,以基因为单位、以模式生物(主要是线虫)为对象,广泛开展了生物体衰老机制的研究,发现了一大批与个体衰

老相关的基因,其中主要有:age-1,clk等。

然而机体衰老是一个错综复杂的生命过程。在涉及衰老研究领域,关于衰老现象和衰老本质的探索相互掩映;机体整体衰老与组织器官衰老或者细胞衰老之间的关系难解难分;进化与种系对机体衰老的影响扑朔迷离;病理性的衰老和生理性的衰老又交叉含混;衰老的原因与结果更是一个“鸡生蛋和蛋生鸡”的命题。透过现象看本质:动物限食是延年益寿良方;组织交联是生物衰老的普遍现象;细胞老化死亡只是整体动物衰老的部分内容;遗传因子与环境损伤的共同作用影响着机体的寿命短长;氧化是一柄双刃剑,抗氧化剂不是长命仙丹;葡萄糖也会造成衰老性病变等。这一切现象都表明,衰老和机体疲劳一样,与机体的物质和能量代谢之间有着紧密的联系:急性的变化导致机体疲劳,慢性的变化导致机体衰老。衰老与疲劳之间或许存在共同的生化过程。本书立足于物质和能量代谢过程产生的中间副产物MDA在整体动物水平上对大鼠运动性疲劳的影响,探讨了MDA在机体疲劳中的作用。而后又以原代培养的大鼠海马神经元为模型,研究了MDA在机体衰老过程的影响。最后进一步以红细胞为材料研究了MDA对机体血液流变学的影响,以实验证明了机体的衰老和疲劳过程的共同生化本质。

目 录

前 言

第一章 机体羰基物质的产生、毒性作用和代谢	1
第一节 机体活性羰基类物质的产生	3
第二节 活性羰基类物质对机体细胞和生物大分子的损伤	8
第三节 活性羰基类物质在机体中的代谢	13
第二章 羰基应激与运动性疲劳	15
第一节 运动性疲劳	15
第二节 活性羰基类物质在运动性疲劳发生中的作用	32
第三节 MDA 致大鼠运动性疲劳研究 ——牛磺酸对丙二醛诱导疲劳大鼠的保护作用	38
第三章 羰基应激与机体衰老	46
第一节 羰基应激与衰老理论	46
第二节 羰基应激对神经系统的影响 ——MDA 对大鼠学习记忆能力及海马神经元超微结构的影响	63

第三节 羰基应激对神经细胞中钙离子稳态的影响	
——MDA 对大鼠海马神经元胞内 Ca^{2+} 稳态的破坏	83
第四章 羰基应激对血液粘度和红细胞膜流动性的影响	
.....	105
第一节 血液粘度概述	106
第二节 红细胞膜流动性与其功能的关系	110
第三节 羰基应激对血液流变学的影响	
——丙二醛对血液粘度的影响和谷胱甘肽的拮抗作用	118
第五章 结论与展望	141
参考文献	145

第一章 机体羰基物质的产生、毒性作用和代谢

越来越多的研究证据表明,机体在剧烈运动及许多与衰老相关的病理生理和机体疲劳过程中,在脂质过氧化作用下会产生各种各样的内源性的活性羰基类化合物(reactive carbonyl species, RCS)^[1-7],其中主要代表性产物包括羟基烯醛类(hydroxyalkenals),如4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)和4-羟基己烯醛(4-hydroxyhexenal, 4-HHE)、丙二醛又称为马龙二醛(malondialdehyde, MDA)和丙烯醛(acrolein)。这些醛类物质在机体可由共同的生物化学途径产生,它们具有共同的化学官能团,在机体具有相似的生物活性和代谢途径。其在生物体内表现出的广泛生物毒性,包括非特异性的细胞毒性^[8],如抑制DNA和蛋白质的合成^[9],白细胞的趋化性^[10],在细胞信号转导中调节鸟苷环化酶(guanylcyclase)和磷脂酶C(PL-C)的活性^[11]等。我们将这些活性醛类所表现的广泛的生物毒性称为羰基毒化作用(Carbonyl toxicification)。不管是在衰老研究领域的自由基衰老学说^[12]或者在运动医学研究领域的自由基运动性疲劳学说^[13-15],基本一致的观点认为自由基对机体的细胞和组织结构的攻击和破坏,从而导致细胞功能的降低,是导致这些生理过程的基本原因。但自由基伤害往往造成急性的病理变化,而自由基攻击生物大分子所形成的中间产物不饱和醛酮即活性羰基类物质则造成缓慢积累的生理性改变。因此,自由基对机体的损伤应是机体疲劳与衰老中的一个起始因子,也是加速因素,而活性醛造成的缓慢积累的生理改变才是机体疲劳与衰老过程的关键生化机理。

活性羧基类物质不像自由基,它们具有较长的半寿期,因此它们在细胞内的作用具有一定距离的“扩散作用”。自由基寿命在 37℃时约为 10^{-9} 秒,其反应范围大约仅仅在形成处的 6 nm。由于在活性氧自由基和活性醛的作用下能加速脂质过氧化作用,因此脂质过氧化过程本身也是一个自由基和活性醛产生的“放大器”。

在体内,活性醛能通过多种途径生成,容易积累。但是,并非机体内所有的应激醛都对机体有毒害作用,不同的生物醛酮的生物活性也有所不同,如乙醛等可以被氧化给机体供能。因此弄清楚活性醛在脂质过氧化和糖基氧化中的产生机理、代谢过程和对生物体的损伤,对于弄清机体疲劳发生的机理和衰老过程的生化本质有至关重要的意义。

第一节 机体活性羧基类物质的产生

机体活性羧基类物质的产生有两个主要的生化途径：长链多不饱和脂肪酸的脂质过氧化作用(lipid peroxidation)和蛋白质及糖类的非酶糖基化作用(non-enzyme glycation)。这两个生化途径都与机体的物质代谢和能量代谢过程密切相关，因此活性羧基类物质的产生是伴随着机体在物质和能量代谢过程形成的。

一、脂质过氧化作用生成活性羧基类物质的生化过程

所谓脂质过氧化主要是指在多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 中发生的一种自由基链式反应，它主要是由活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 引发产生的，它的特点是链式地产生脂氢过氧化物。其大致的转化过程如图 1-1 所示。

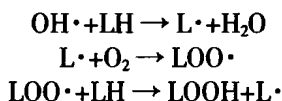


图 1-1 脂质过氧化链式反应

Figure 1-1 The chain reaction of lipid peroxidation

$\text{OH}\cdot$ 是 ROS 诱导脂质过氧化过程中最重要的成分，它首先攻击 PUFAs，形成脂自由基(lipid radical, $\text{L}\cdot$)，然后 $\text{L}\cdot$ 与基态氧反应生成脂过氧自由基 (lipid peroxyradical, $\text{LOO}\cdot$)， $\text{LOO}\cdot$ 再从其它磷脂多不饱和脂肪酸分子抽提一个 H，形成脂氢过氧化物(LOOH)，同时又形成新的脂自由基 $\text{L}\cdot$ 。

因此在生物体内，脂质过氧化作用一旦被引发，就可以较持续反复地进行，即脂质过氧化链式反应，不断地产生 LOOH 这类脂氢过氧

化物。LOOH 在 Fe^{2+} 的催化作用下又能形成脂氧自由基($\text{LO}\cdot$)和脂过氧自由基($\text{LOO}\cdot$),该过程又称为 Fenton 反应。其反应式如图 1-2 所示:

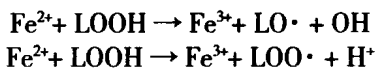


图 1-2 Fenton 反应形成过氧自由基

Figure 1-2 The formation of peroxy radical in Fenton reaction

从 LOOH 形成活性醛的主要机理是氢过氧化任意一边 $\text{C}=\text{C}$ 双键的断裂。该反应在机体中痕量过渡金属离子(Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^+)的催化下能产生两种类型的醛(图 1-3),①从脂肪酸链的甲基末端断裂形成脂肪醛;②醛仍连在原脂质分子上。但目前第二种很少发现。

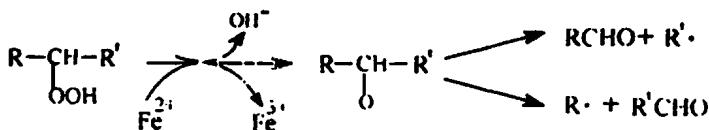


图 1-3 脂质过氧化产生活性醛的主要过程

Figure 1-3 The main formation mechanisms of reactive aldehydes in lipid peroxidation

在哺乳动物组织和细胞中的 PUFA 主要是亚油酸(18:2)、亚麻酸(18:3)、花生四烯酸(20:4)和二十二碳六烯酸(22:6)。一旦发生氧化,这些 PUFA 能转化成共轭的位置异构氢过氧化物。从花生四烯酸或二十二碳六烯酸的氢过氧化物能生成大量的在两个双键中夹有一个亚甲基的醛,这些活性醛就像形成它们的脂肪酸一样能进入过氧化过程,生成氢过氧化醛,这些氢过氧化醛均裂(β -裂解)可形成各种各样的第二代活性醛。20:4 氧化产物之一的 2,4,7,10-十六碳四烯醛,反应后能生成 14 种活性醛。其中产物 MDA、4-HNE 和丙烯醛的生物学作用引起了生物学家的极大兴趣,对这些活性醛在机体中的转化,毒性作用进行了较为系统的研究。形成活性醛的其他机理也与均裂反应有关,并涉及链烯自由基($\text{R}-\text{CH}=\text{CH}\cdot$)的氧化和结构的重排、

断裂。链烯自由基能捕获氢原子生成链烯($R-CH=CH$)或与一个羟自由基($OH\cdot$)结合形成烯醇($R-CH=CH-OH$)，该醇能重排生成醛($R-CH-CHO$)。形成醛的第三种可能机理是链烯自由基与氧和 $OH\cdot$ 反应生成氢过氧化物 $R-CH=CH-OOH$ ，再分解成醇，然后氧化形成醛。

除此以外，脂肪酸氢过氧化物还能发生许多保持母链长度的反应(图 1-4)。在 $OH\cdot$ 和 O_2 的作用下，该过程能生成二氢过氧化脂肪酸和氢过氧化-环二氧化物，氢过氧化-环二氧化物很可能是发生了过氧化的生物样品中 MDA 的主要来源。同时生成的其他氧化产物可能还能转化

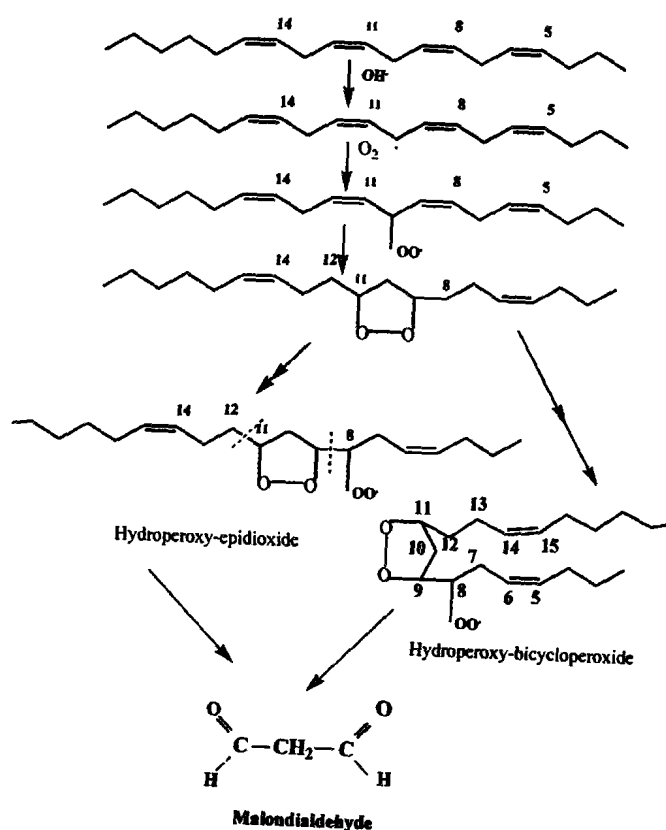


图 1-4 脂质过氧化生成活性醛的第三种机理
Figure 1-4 The third formation mechanism of reactive aldehyde in lipid peroxidation

成 4- 羟基 -2- 链烯醛、4,5- 二羟基 -2- 链烯醛和 4- 氢过氧化 -2- 链烯醛。这些活性醛中 4- 羟基壬烯醛(4-HNE)和 4- 羟基己烯醛(4-HHE)具有很强的生物活性,许多文献都报导了它们的各种生物毒性^{[6][7]}。

二、非酶糖基化生成活性羰基类物质的生化过程

活性醛除了在脂质过氧化过程中形成外,还可以在蛋白质和糖类的非酶糖基化过程中生成。蛋白质的非酶糖基化又称美拉德反应 (Maillard Reaction)^[18]。其转化过程如图 1-5 所示。

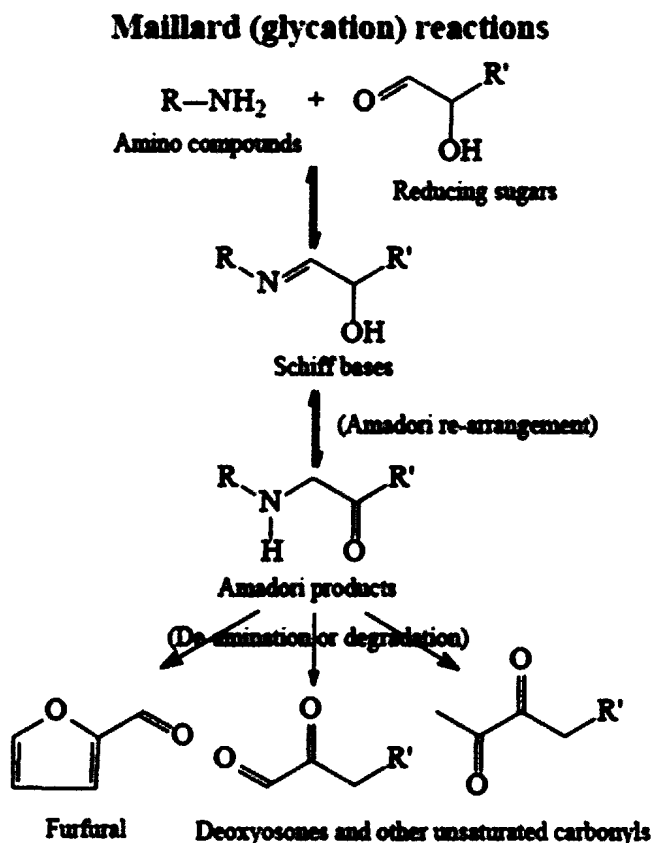


图 1-5 美拉德反应生成不饱和醛酮的转化过程

Figure 1-5 The formation mechanisms of unsaturated aldehyde and keton in Maillard reaction

美拉德反应是机体在无酶催化的条件下,蛋白质(氨基酸)与糖之间自动发生的、缓慢的、持续的形成糖基化蛋白的过程。该过程由葡萄糖与蛋白质或多肽中赖氨酸或羟基赖氨酸的 ε -氨基通过 Schiff's 碱反应形成可逆的醛亚胺(aldimine)中间物,醛亚胺通过分子内重排生成结构较为稳定的糖-蛋白质酮胺(ketoamine)结合物,即阿马多里(Amadori)重排产物,该产物通过一系列的缓慢而复杂的化学作用如脱氨、水解可产生脱氧邻酮醛糖(deoxyosone)等不饱和醛酮类,这就是所谓高级糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)。脂质过氧化和美拉德反应中形成的活性醛易与含氮、共轭、环状复合物结合形成褐色、荧光老年色素^[19]。而且,在反应中所形成的中间产物有的为羰基复合物,它们同时含有醛、酮结构,特别是一些 α, β -不饱和醛或酮,具有与大多数蛋白质和核苷酸之类的生物分子反应的能力。当一些辅助功能团与不饱和醛酮分子进一步共轭时,就成为多功能醛酮化合物。我们将含有两个或多个功能团的羰基化合物定义为多功能基团羰基化合物(DMcarbonyls, DMCs),常见的 DMCs 有 2-酮醛(2-ketoaldehydes)、羟烯醛(hydroxylenals)、烯醛(enals)、二烯醛(dienals)、三烯醛(trienals)、邻酮醛糖(osones)等生化组分,它们几乎能与细胞内外所有的重要生物分子反应并产生毒害作用^[20]。