



16周HIIT干预对增龄大鼠骨骼肌线粒体自噬、ATP浓度及有氧运动能力的影响

Effects of 16 Weeks HIIT Intervention on Mitochondrial Autophagy, ATP Concentration and Aerobic Exercise Capacity in Skeletal Muscle of Aging Rats

蒋中业, 曹国欢, 张一民, 倪震, 温天皓, 邵佳, 苏浩*
JIANG Zhongye, CAO Guohuan, ZHANG Yimin, NI Zhen, WEN Tianhao, SHAO Jia, SU Hao*

摘要:目的:观察增龄和高强度间歇训练(high-intensity interval training, HIIT)干预对大鼠有氧运动能力、骨骼肌线粒体BNIP3、PI3-k相对表达量、线粒体数目、ATP浓度和丙酮酸脱氢酶活性的影响,梳理上述指标与骨骼肌增龄性退变的关系。方法:8月龄SPF级雄性Wistar大鼠40只,按照随机数字表随机分为安静对照组(C, $n=20$)和HIIT干预组(H, $n=20$)。C组不运动, H组以50%、70%和90% $\dot{V}O_{2max}$ 对应的速度交替进行50 min/天、5天/周、持续16周的运动干预,并根据 $\dot{V}O_{2max}$ 测试结果调整运动强度。在基线值(0周)每组各取4只大鼠,在干预的第8、16周结束后的24 h每组各取8只大鼠,剥离大鼠比目鱼肌,采用透射电子显微镜观察线粒体自噬情况,采用比色法检测比目鱼肌线粒体ATP浓度和丙酮酸脱氢酶活性,采用Western blot法测试BNIP3和PI3-k的蛋白表达。结果:16周增龄过程中, C组递增负荷运动至力竭的时长和 $\dot{V}O_{2max}$ 均出现显著降低($P<0.05$); H组上述指标在第8周和第16周时均显著高于基线值($P<0.05$)。H组比目鱼肌线粒体ATP浓度在16周时显著高于C组和基线值($P<0.05$),各组大鼠丙酮酸脱氢酶活性无明显变化。H组线粒体数目在8周和16周时均显著高于C组和基线值($P<0.05$),但各组大鼠自噬体数目在组间和组内对比中均未见显著性差异。C组和H组BNIP3在8周和16周时均显著高于基线值($P<0.05$)。C组PI3-k在16周时显著高于基线值($P<0.05$), H组PI3-k与基线值未见显著性差异。结论:16周HIIT运动可以提高增龄大鼠的 $\dot{V}O_{2max}$ 和有氧运动能力,作用机制或与骨骼肌线粒体数目增加、ATP浓度升高及自噬加强有关。

关键词:增龄;高强度间歇训练;有氧运动能力;线粒体自噬;ATP浓度

Abstract: Objective: To observe the effects of aging and high-intensity interval training (HIIT) intervention on aerobic exercise ability, relative expression levels of BNIP3 and PI3-k in skeletal muscle mitochondria, the number of healthy mitochondria, mitochondrial ATP concentration, pyruvate dehydrogenase activity in rats, and investigate their relationships with aging degeneration of skeletal muscle. Methods: 40 SPF male Wistar rats aged 8 months were selected and randomly divided into a control group (C, $n=20$) and an HIIT intervention group (H, $n=20$) according to the random number table. Group C did not exercise, while group H alternated 50 min/day, 5 days/week, and 16 weeks of exercise intervention at speeds corresponding to 50%, 70% and 90% $\dot{V}O_{2max}$, and adjusted exercise intensity according to $\dot{V}O_{2max}$ test results. Groups of rats in the baseline value (0 week) from each of 4 materials in rats, at the end of the intervention of 8 weeks, 16 weeks after 24 h of each 8 only materials, stripping rats' soleus, the mitochondrial autophagy was observed by transmission electron microscope. The concentration of mitochondrial ATP and the activity of pyruvate dehydrogenase in soleus muscle were measured by colorimetric method, and the protein expressions of BNIP3 and PI3-k were measured by Western blot. Results: During the aging process of 16 weeks, the duration of increasing load movement to

基金项目:

霍英东教育基金会第十六届高等院校青年教师基金资助项目(161094);中央高校基本科研业务费专项资金项目(2017YB025);北京体育大学研究生拔尖创新科研项目(20211016)

第一作者简介:

蒋中业(1994-),男,在读博士研究生,主要研究方向为运动营养和运动促进健康,E-mail:1210962636@qq.com。

*通信作者简介:

苏浩(1982-),男,副教授,博士,主要研究方向为运动营养和运动促进健康,E-mail:suhao1982@163.com。

作者单位:

北京体育大学,北京100084
Beijing Sport University, Beijing 100084, China.

exhaustion and $\dot{V}O_{2max}$ in group C were significantly decreased ($P<0.05$). The above indexes in group H were significantly higher than the baseline at 8 and 16 weeks ($P<0.05$). The ATP concentration of soleus mitochondria in group H at 16 weeks was significantly higher than that in group C and the baseline ($P<0.05$), and there was no significant change in pyruvate dehydrogenase activity in each group. The number of mitochondria in group H at 8 and 16 weeks was significantly higher than that in group C and the baseline ($P<0.05$), but there was no significant difference in the number of autophagosomes among groups and in intra-group comparison. BNIP3 in groups C and H was significantly higher than the baseline at 8 and 16 weeks ($P<0.05$). The PI3-k of group C was significantly higher than that of the baseline at 16 weeks ($P<0.05$), but there was no significant difference between the PI3-k of group H and the baseline. Conclusions: 16 weeks of HIIT exercise can improve $\dot{V}O_{2max}$ and aerobic exercise capacity in aging rats, which may be related to increased number of skeletal muscle mitochondria, increased ATP concentration and enhanced autophagy.

Keywords: aging; HIIT; aerobic capacity; mitochondrial autophagy; ATP concentration

中图分类号:G804.7 **文献标识码:**A

骨骼肌增龄性退变所引起的活动能力受限是导致中老年人群生活质量下降、运动过程中出现异常的重要原因之一。线粒体作为ATP合成的场所,线粒体自噬对维持健康线粒体数目和能量代谢稳态至关重要(李渊芳等, 2019)。有研究表明,随着大鼠年龄增长,其机体内线粒体数目较年轻时显著减少(陈彩珍等, 1999;何宏文等, 1998; Davies et al., 1981)。增龄过程中,线粒体的损伤以及抗氧化能力下降会引起氧自由基的累积从而诱导线粒体自噬的发生(Dadakhujiev et al., 2009)和线粒体功能受损,导致骨骼肌局部能量不足,致使受影响的肌纤维局部萎缩,引起衰老时出现的肌纤维丢失(Lang et al., 2010, 1993),进而推进骨骼肌增龄性退变的进程(Fulle et al., 2004, 2005)。

BNIP3是存在于哺乳动物细胞内的部分线粒体标记蛋白,在线粒体自噬调节过程中发挥重要作用(Ney, 2015)。PI3-k具有丝氨酸/苏氨酸激酶的活性,也具有磷脂酰肌醇激酶的活性。BNIP3和PI3-k为反映线粒体自噬的指标(杨春兰等, 2017;Ney, 2015),通过其表达量的变化可以有效判断机体线粒体自噬发生的程度。

有研究表明,运动锻炼对大鼠机体内线粒体数目的减少具有良性作用(Schmalbruch, 1970)。高强度间歇训练(high-intensity interval training, HIIT)作为一种短时(Bartlett et al., 2011)、高效(严翊等, 2012)的训练方式,可以有效提升最大摄氧量(maximal oxygen consumption, $\dot{V}O_{2max}$) (梁春瑜等, 2017)和运动能力(崔新雯等, 2018; 范朋琦等, 2018)。虽然当前已有采用HIIT干预骨骼肌增龄性退变的相关研究,且在前期研究中已证实HIIT运动能对大鼠增龄过程中能量代谢相关AMPK和PGC-1 α 蛋白产生良性影响(蒋中业等, 2019),但目前HIIT干预对大鼠增龄过程中线粒体自噬、ATP合成能力和机体有氧运动能力的影响以及上述各指标间的变化关系尚不明确。

本研究通过建立增龄大鼠模型,并对其进行HIIT干预,观察大鼠增龄过程中机体有氧能力、线粒体中ATP浓

度和丙酮酸脱氢酶活性、骨骼肌中线粒体数目和自噬体数目、骨骼肌线粒体BNIP3和PI3-k相对表达量的变化规律。探究增龄过程中大鼠线粒体自噬和有氧运动能力的关系及HIIT干预对线粒体自噬和有氧运动能力的作用效果。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象及分组

本研究选取8月龄SPF级雄性Wistar大鼠40只(北京维通利华实验动物技术有限公司),按照随机数字表将大鼠随机分为安静对照组(C, $n=20$, 平均体质量为602.78 g)和HIIT干预组(H, $n=20$, 平均体质量为585.86 g)。

1.2 实验方案

1.2.1 $\dot{V}O_{2max}$ 测试方案

运动训练开始前对所有大鼠进行 $\dot{V}O_{2max}$ 测试,之后每隔2周进行1次 $\dot{V}O_{2max}$ 测试。采用动物气体代谢分析仪(Oxymax Deluxe System, USA)进行递增负荷测试。测试的运动强度方案参照Leandro等(2007)的研究设计,测试原理与前期研究相同(蒋中业等, 2019)。

1.2.2 运动训练方案

所有大鼠进入动物房后进行为期1周的适应性喂养,各组运动干预方案为:C组不进行运动;H组根据 $\dot{V}O_{2max}$ 测试结果重新调整运动强度。根据大鼠达到 $\dot{V}O_{2max}$ 时的跑台运动速度确定HIIT运动方案进行为期16周的训练,每天训练50 min,每周训练5天。每天的训练内容参照王林佳等(2016)的HIIT训练方案进行改良(表1)。

表1 HIIT组训练方案

Table 1 The Training Program of HIIT

训练阶段	强度/% $\dot{V}O_{2max}$	时间/min	重复次数
热身	70	7	1
高强度运动期	90	3	6
低强度运动(间歇期)	50	3	6
恢复	70	7	1

1.3 取材

在首次 $\dot{V}O_{2\max}$ 测试后随机选取各组大鼠 4 只, 在干预的第 8、16 周随机选取各组大鼠 8 只, 在 $\dot{V}O_{2\max}$ 测试结束后 24 h 进行取材。

称量大鼠体质量后采用 2% 戊巴比妥钠 (剂量为 0.25~0.50 g/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 随后固定其四肢及头部, 取部分新鲜比目鱼肌进行线粒体提取后用于 ATP 浓度和丙酮酸脱氢酶活性测试。取部分比目鱼肌样品置于包埋剂中保存, 用于电镜拍摄。剩余比目鱼肌用锡箔纸包好后投入液氮中速冻, 随后转入 -80 °C 冰箱中保存, 用于 BNIP3 和 PI3-k 的 Western blot 测试。

1.4 指标测试方法

1.4.1 骨骼肌线粒体透射电镜拍摄

取新鲜大鼠比目鱼肌 10 mg, 2.5% 戊二醛于 4 °C 环境下固定 2 h。使用磷酸缓冲液冲洗 (pH 7.2) 3 次, 每次 10 min。随后采用 1% 的锇酸在 4 °C 环境下进行 2 h 的固定后使用双蒸水冲洗 3 次 (每次 10 min), 再使用梯度酒精脱水, 50%、70%、90% 的酒精浓度各进行 10 min, 100% 浓度进行 2 次, 每次 15 min。随后分别使用环氧丙烷进行 2 次、每次各 15 min 的操作 (环氧丙烷: 树脂以 1:1 和 1:4 的比例于室温环境下分别置换 1 h)。再使用纯树脂于室温条件下浸透 2 h 后使用纯树脂进行包埋 (EPON 812), 于 45 °C、60 °C、80 °C 环境下进行持续 5 h 的样品聚合。聚合成功后对其进行半薄切片 (使用天青-美兰染色后光镜下定位观察) 和超薄切片 (使用醋酸双氧铀、枸橼酸铅进行染色)。使用 JEM-1400 电镜, 在 2 000 倍下观察不同组大鼠比目鱼肌筋膜下的线粒体数目。使用透射电镜特殊成像系统 (美国) 进行拍摄。每只大鼠所取样本制作 5 张电镜切片, 每张切片随机拍摄 6 张图片。计数时只统计视野范围内可见的完整线粒体与自噬体, 若出现线粒体或自噬体位于图像边缘, 未整体进入图片内则不予计入, 图片内未见自噬体则记为 0 个。

1.4.2 线粒体提取方法

取质量约为 50~100 mg 的新鲜比目鱼肌。在 1.5 mL 离心管内对剪取的组织进行称重。用 PBS 洗涤 1 次。把组织放在一个置于冰上的培养皿中, 用剪刀把组织剪切成非常细小的碎片后, 加入 10 倍体积预冷的 PBS, 冰浴 3 min 后置于 600 rpm 转速离心 10~20 s, 沉淀样品, 弃上清。再加入 8 倍体积预冷的胰酶消化液, 冰浴 20 min 后置于 600 rpm 转速离心 10~20 s, 沉淀样品, 弃上清。随后加入 2 倍体积相应线粒体分离试剂, 重悬组织, 用于洗去残余的胰酶。置于 600 rpm 转速离心 10~20 s, 沉淀样品, 弃上清。加入 8 倍体积预冷的相应线粒体分离试剂或临用前添加了 PMSF 的线粒体分离试剂, 冰浴环境匀浆 20~30 次, 完成后置于 600 rpm 转速, 4 °C 离心 5 min。将上清液转移到另一离心管中, 11 000 rpm 转速, 4 °C 离心 10 min。去除

上清, 沉淀即为分离得到的线粒体。

1.4.3 线粒体 ATP 浓度测试

使用 ATP Assay Kit 通过比色法进行比目鱼肌线粒体 ATP 浓度测试 (Ab-83355); 采用试剂盒所提供标准液制备工作标准液。用 100 μ L ATP Assay Buffer 使样本悬浮混匀。在 4 °C 低温离心机中使用最高转速离心 2 min 以除去所用不溶性物质。取上清液, 在每个标准和样本孔中都加入 50 μ L Reaction Mix。在每个样本背景控制孔中加入 50 μ L 背景反应混合溶液。在室温下避光混合和孵化 30 min 后用酶标仪在 OD 570 nm 下进行测量。

1.4.4 丙酮酸脱氢酶活性测试

使用丙酮酸脱氢酶活性测试试剂盒 (Ab-109902) 进行比目鱼肌线粒体丙酮酸脱氢酶浓度测试: 在样品溶解前测量样品的蛋白含量, 制备相应浓度的 PDH。冰上孵育 10 min 后置于 5 000 rpm 转速 4 °C 离心 10 min, 提取上清液, 用孵育液将所有样本稀释后向每个孔中加入样本 200 μ L, 室温孵育 3 h 后将测试孔中内容物甩出, 迅速加入 300 μ L 稳定液和 200 μ L 1X Detector Antibody。室温孵育 1 h 后, 将测试孔中内容物甩出, 迅速加入 300 μ L 稳定液和 200 μ L 1X HRP Label, 室温孵育 1 h 后再向每孔迅速加入 200 μ L HRP Development solution 后置于酶标仪中进行测试。以 100 mg/min 蛋白变化 0.01 OD 为 1 个酶活力单位/(a. u.)。

1.4.5 骨骼肌 WB 测试方法

WB 测试所用一抗为: Anti-PI3-k, Ab40776; Anti-BNIP-3 Ab109362。WB 测试方法与前期研究一致 (蒋中业等, 2019)。大鼠 $\dot{V}O_{2\max}$ 和力竭时长在每 2 周 1 次的 $\dot{V}O_{2\max}$ 测试中获得。

1.5 数据分析方法

采用 Image Lab 5.2 对 WB 测试所得蛋白相对含量数据进行采集; 条带分析中, 以基线值作为参考对照, 运用 Image Lab 5.2 对条带进行灰度分析, 得到各样本蛋白含量的相对值; 所有结果均表示为平均值 \pm 标准差的形式。

由于每组大鼠来源于同一总体, 基因条件以及生活环境一致, 因此每组大鼠的随机抽样取材均可作为对该组的重复测量, 所得各组大鼠的 $\dot{V}O_{2\max}$ 、力竭时间、BNIP3 和 PI3-k 相对表达量及线粒体丙酮酸脱氢酶活性及 ATP 浓度数据采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 组内两两对比采用单因素方差分析进行处理, 组间比较采用配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有极显著性差异。

2 研究结果

2.1 HIIT 对大鼠递增负荷运动至力竭时长的影响

16 周的增龄过程中, C 组大鼠递增负荷运动至力竭的时长在第 8 周和 16 周时显著低于基线值 ($P < 0.05$, $P < 0.05$); H 组在第 8 周和 16 周时大鼠递增负荷运动至力竭的时长显著高于基线值 ($P < 0.01$, $P < 0.05$; 表 2)。

表2 大鼠力竭时间结果

时间	C组	H组
基线值	522.33±62.64	608.33±149.64
第2周	611.89±117.45	779.44±124.96
第4周	629.29±125.15	812.89±113.96
第6周	558.24±137.10	894.31±180.08
第8周	407.89±133.50 [#]	879.89±159.19 ^{###}
第10周	460.33±128.30	874.83±160.42
第12周	419.22±97.81	849.61±113.98
第14周	393.33±232.14	838.11±151.85
第16周	368.33±134.85 [#]	805.33±138.43 [#]

注:*表示与C组相比有显著性差异($P<0.05$);#表示与基线值存在显著性差异($P<0.05$);##表示与基线值相比有极显著性差异($P<0.01$);下同。

2.2 HIIT对大鼠 $\dot{V}O_{2max}$ 的影响

16周自然增龄使大鼠的 $\dot{V}O_{2max}$ 显著降低($P<0.05$)。持续8周和16周的HIIT干预可以使增龄大鼠的 $\dot{V}O_{2max}$ 相比于基线值显著提高($P<0.01, P<0.01$),且16周时相比于第8周显著升高($P<0.05$)。H组在8周和16周时均显著高于C组($P<0.01, P<0.01$;表3)。

表3 大鼠 $\dot{V}O_{2max}$ 结果

时间	C组	H组
基线值	2 751.74±572.99	2 768.67±628.74
第2周	2 607.89±522.18	2 705.44±477.36
第4周	2 410.89±315.88	2 784.67±519.18
第6周	2 236.06±375.61	3 250.63±489.58
第8周	1 988.95±521.57	3 469.11±386.43 ^{###}
第10周	1 905.98±311.12	3 508.22±279.82
第12周	1 772.06±422.68	3 460.94±418.68
第14周	1 684.56±478.61	3 716.61±717.14
第16周	1 446.52±319.15 [#]	3 907.22±575.58 ^{###&}

注:**表示与C组相比有极显著性差异($P<0.01$);&表示与第8周时相比有显著性差异($P<0.05$);下同。

2.3 HIIT对大鼠比目鱼肌线粒体丙酮酸脱氢酶活性与ATP浓度的影响

16周增龄过程中各组大鼠丙酮酸脱氢酶活性无明显变化,且8周和16周时的组间对比中无显著差异(表4)。

表4 丙酮酸脱氢酶活性比较

时间	C组	H组
基线值	4.2±2.3	4.3±1.9
第8周	4.4±1.7	4.6±2.4
第16周	4.5±1.2	4.3±3.0

16周增龄过程中,C组比目鱼肌线粒体ATP浓度呈

先升后降的趋势,H组呈上升趋势(表5)。16周时,H组大鼠比目鱼肌线粒体ATP浓度显著高于C组和基线值($P<0.05, P<0.05$)。

表5 线粒体内ATP浓度结果

时间	C组	H组
基线值	0.72±0.29	0.65±0.33
第8周	0.87±0.55	1.30±0.82
第16周	0.68±0.42	1.52±0.79 [#]

2.4 HIIT对大鼠骨骼肌线粒体自噬体数目的影响

16周过程中各组比目鱼肌自噬体数目呈现上升趋势(图1,表6)。16周过程中C组线粒体数目呈下降趋势,H组呈上升趋势(表7)。干预至第8周时,H组线粒体数目显著高于C组($P<0.05$)和基线值($P<0.05$)。干预至第16周时,H组线粒体数目显著高于C组($P<0.05$)和基线值($P<0.05$)。在第8周和第16周时,虽然C组自噬体数目均多于H组,但各组大鼠在组间和组内对比中均未见显著性差异。

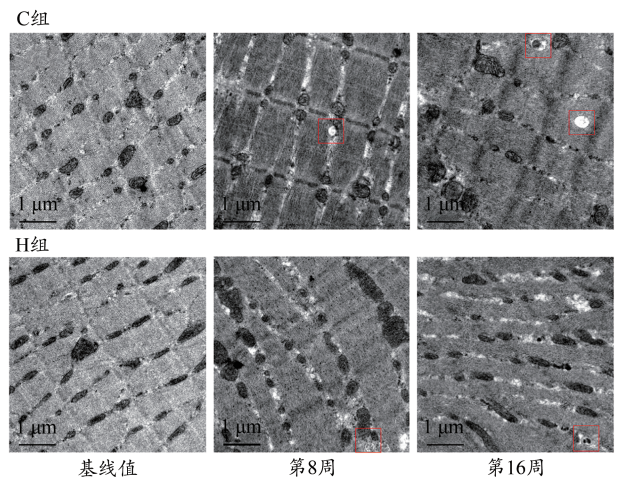


图1 透射电镜下比目鱼肌自噬体

Figure 1. Autophagosome of Soleus Muscle under Transmission Electron Microscope

注:红框标记为自噬体。

表6 线粒体自噬体数目

时间	C组	H组
基线值	1.25±0.75	1.50±1.00
第8周	1.75±1.29	1.67±0.65
第16周	2.69±1.35	1.97±0.96

2.5 HIIT对大鼠骨骼肌BNIP3和PI3-k表达量的影响

16周过程中C组BNIP3表达量呈现上升趋势,H组呈

现先升后降的趋势(图 2,表 8)。干预至第 8 周时,C 组 BNIP3 表达量显著高于基线值($P<0.05$);H 组 BNIP3 表达量显著高于基线值($P<0.01$)。干预至第 16 周时,C 组 BNIP3 表达量显著高于基线值($P<0.01$);H 组 BNIP3 表达量显著高于基线值($P<0.01$)。

表 7 线粒体数目
Table 7 Numbers of Mitochondrial 个

时间	C 组	H 组
基线值	48.17±21.81	44.83±14.74
第 8 周	44.17±14.33	61.00±8.05**
第 16 周	36.00±5.93	60.33±9.04**

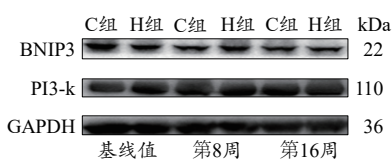


图 2 大鼠比目鱼肌 BNIP3 和 PI3-k 蛋白 WB 结果
Figure 2. BNIP3 and PI3-k Protein in Soleus Muscle of Rats

表 8 BNIP3 蛋白表达量变化
Table 8 Changes of BNIP3 Protein Expression

时间	C 组	H 组
基线值	1.00±0.00	1.00±0.64
第 8 周	1.12±0.32#	2.27±0.92###
第 16 周	1.86±0.71###	1.99±1.39###

16 周增龄过程中,C 组大鼠比目鱼肌 PI3-k 蛋白表达量呈现持续上升趋势,H 组呈现先升后降的趋势(图 2,表 9)。第 16 周时,C 组大鼠比目鱼肌内 PI3-k 蛋白含量显著高于基线值($P<0.05$),H 组与基线值未见显著性差异。

表 9 PI3-k 蛋白表达量变化
Table 9 Changes of PI3-k Protein Expression

时间	C 组	H 组
基线值	1.00±0.00	1.00±0.22
第 8 周	1.17±0.37	1.39±0.58
第 16 周	1.56±0.57#	1.32±0.42

3 分析讨论

3.1 HIIT 对大鼠运动能力和 $\dot{V}O_{2max}$ 的影响

本研究表明,16 周增龄过程中大鼠 $\dot{V}O_{2max}$ 持续下降,HIIT 干预能使大鼠 $\dot{V}O_{2max}$ 得到有效提升,这与梁春瑜等(2017)和 Miller 等(2019)的研究结果一致。16 周自然增龄过程中大鼠运动至力竭的时长持续下降,HIIT 运动干预可延长大鼠力竭时间并在第 8~16 周过程中使大鼠运动至力竭的时长维持在相对较高水平,与刘丹慧等(2008)、

尤寿江等(2011)、He 等(2009)的研究结果一致。这说明在本研究的 16 周增龄过程中,大鼠 $\dot{V}O_{2max}$ 和运动能力发生了增龄性退变。长期 HIIT 训练能有效提高大鼠 $\dot{V}O_{2max}$ 并延长力竭时间,且力竭时间的延长可能与 $\dot{V}O_{2max}$ 的提升有关。

有研究表明,运动训练可以有效提高骨骼肌线粒体内氧化酶活性和 ATP 合成能力(Short et al., 2003),ATP 合成能力的变化对大鼠 $\dot{V}O_{2max}$ 有一定影响(蒋中业等, 2019)。HIIT 延缓大鼠增龄过程中的 $\dot{V}O_{2max}$ 下降可能是通过影响骨骼肌线粒体来实现的。

3.2 HIIT 对大鼠比目鱼肌线粒体中丙酮酸脱氢酶活性与 ATP 浓度的影响

本研究表明,16 周增龄过程中,无论是否进行 HIIT 干预大鼠比目鱼肌线粒体内丙酮酸脱氢酶浓度均未见明显变化,说明增龄和 HIIT 均无法对大鼠比目鱼肌线粒体供能能力产生影响。16 周增龄过程中大鼠比目鱼肌线粒体 ATP 浓度呈现先升高后下降的趋势,与 Short 等(2005)的研究结果一致,且 Hepple(2014)研究表明这一现象的发生早于骨骼肌质量的下降。这说明增龄导致大鼠比目鱼肌线粒体 ATP 浓度降低。16 周 HIIT 干预使大鼠比目鱼肌线粒体中的 ATP 浓度升高,并且在 16 周时显著高于自然增龄大鼠。这说明 16 周的 HIIT 运动对大鼠增龄过程中比目鱼肌 ATP 浓度具有显著的促进作用,结合大鼠线粒体数目的变化,本研究认为,大鼠比目鱼肌 ATP 浓度变化可能与线粒体数目变化有关。第 8 周时两组大鼠线粒体 ATP 浓度未见显著性差异,可能是由于骨骼肌线粒体中 ATP 浓度与线粒体氧化酶活性(陈雅维,2020;Safdar et al., 2010;Short et al., 2003)有关,线粒体氧化酶活性变化与线粒体数目变化在 16 周增龄及 HIIT 干预过程中不同步所致,也可能是因为随着大鼠年龄的增长,短期的运动锻炼难以使其线粒体功能得到有效改善,此现象出现的原因仍需进一步探索。

在 16 周增龄过程中,大鼠 ATP 浓度和线粒体数目出现显著性差异,而线粒体 ATP 合成能力无明显变化。因此,推测比目鱼肌线粒体 ATP 浓度的变化与线粒体自噬以及线粒体数目变化密切相关(Chiao et al., 2016)。

3.3 HIIT 对大鼠比目鱼肌线粒体 BNIP3 和 PI3-k 的影响

BNIP3 是存在于哺乳动物细胞内的一些线粒体标记蛋白,可通过直接与 LC3 结合(Ney, 2015),竞争 Beclin-1 与 Bcl-2/Bcl-xl 的结合(Maiuri et al., 2009; Zeng et al., 2013),减少线粒体磷酸化和 ATP 含量(徐冉等,2013)等途径引起线粒体自噬。BNIP3 的表达与自噬的激活呈正相关关系。崔迪(2013)研究表明,6 周跑台运动使小鼠腓肠肌 BNIP3 表达量出现上升趋势。4 周中等强度运动可以使大鼠骨骼肌 BNIP3 表达量升高同时诱导线粒体自噬增强(于亮等,2020)。杜涛等(2014)在脂多糖调控巨噬细胞自噬的研究中分别阻断 PI3-k 和 mTOR,发现 BNIP3 表达量的升高均伴随着自噬增强。本研究证实,16 周的自然

增龄和HIIT干预均会使大鼠比目鱼肌BNIP3表达量升高,且相较于自然增龄,HIIT干预使得大鼠增龄过程中比目鱼肌BNIP3表达量升高出现得更早、更明显。这说明在16周增龄过程中,HIIT运动可能通过调控BNIP3的表达促进了大鼠增龄过程中线粒体自噬的发生。

PI3-k作为反映线粒体自噬和凋亡的重要下游指标,其经过PI3-k/AKT/mTOR途径激活AKT和mTOR(舒婷等,2016; Rodon et al., 2013; Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2015),抑制自噬。有研究表明,抗阻和有氧等多种运动形式均可通过调控PI3-k途径有效影响机体自噬的发生:抗阻运动(房国梁等,2016)和耐力运动(李锋等,2018)可以上调脑组织中PI3-k的表达,有效提升老年大鼠心肌PI3-k的表达(谢金凤,2020),并对下游底物产生积极影响进而调控自噬的激活;有氧运动可以上调大鼠和小鼠骨骼肌中PI3-k的表达(刘霞等,2012),使骨骼肌自噬减弱(樊申元等,2016);间歇运动可以通过上调心肌PI3-k/Akt途径抑制心肌细胞自噬与凋亡(谭支内等,2016)。然而本研究显示,16周的自然增龄和HIIT干预中PI3-k的升高趋势虽然与上述研究结果相同,但是各组之间并未出现与其一致的显著性差异。推测出现这种现象的原因是上述研究中大部分使用的研究对象为6~8周龄的青年大鼠或21月龄的衰老大鼠模型,且均使用某一固定方案进行运动干预,而本研究中大鼠HIIT干预的运动强度根据每2周1次的 $\dot{V}O_{2max}$ 测试结果进行调整,随着大鼠年龄增长,HIIT干预中的高强度阶段较大强度的运动刺激了线粒体自噬的发生(马晓雯等,2016),此现象出现的原因仍需进一步研究探索。

虽然本研究中各组大鼠的BNIP3和PI3-k变化结果均表明大鼠比目鱼肌线粒体自噬产生了变化,电镜下观察的自噬体数目也出现了增多的趋势,但各组大鼠比目鱼肌自噬体数目未出现显著性差异,推测可能是由于取材前的 $\dot{V}O_{2max}$ 测试强度较大,引起各组大鼠骨骼肌线粒体发生一过性自噬增强所致(高扬等,2020)。因此,在未来的研究中应避免大鼠在取材前72h内进行剧烈运动。

综上所述,16周HIIT干预使大鼠比目鱼肌线粒体数目增多,ATP浓度升高,机体有氧运动能力增强。同时,相比自然增龄大鼠,16周HIIT干预对大鼠比目鱼肌线粒体自噬激活程度影响更大。线粒体丙酮酸脱氢酶活性无明显变化,可以一定程度上说明线粒体ATP浓度的增加与线粒体数目变化有关。因此,本研究结合李渊芳等(2019)提出的自噬是调控线粒体数目的重要方式的观点,推测HIIT干预使大鼠健康线粒体数目增多以及ATP合成能力增强是通过调控大鼠增龄过程中的自噬以及线粒体合成实现的。

4 结论

16周HIIT运动可以提高增龄大鼠的 $\dot{V}O_{2max}$ 和有氧运

动能力,作用机制或与骨骼肌线粒体数目增加、ATP浓度升高及自噬加强有关。

参考文献:

- 陈彩珍,卢健,许豪文,等,1999.运动训练对老年小鼠骨骼肌线粒体形态变化的电镜定量研究[J].浙江体育科学,(5):42-45.
- 陈雅维,2020.ATP调控策略及其在微生物代谢产物合成中的应用[J].生物工程学报,36(8):1515-1527.
- 崔迪,2013.运动与高脂膳食对骨骼肌线粒体自噬的影响[D].上海:华东师范大学.
- 崔新雯,张一民,汪赞,等,2018.自噬介导的高强度间歇运动对中年大鼠骨骼肌质量和有氧运动能力随时间变化的影响[J].中国组织工程研究,22(8):1196-1204.
- 杜涛,黄海,陈欣,等,2014.脂多糖通过PI3K/Akt/mTOR通路调控巨噬细胞自噬[J].中国病理生理杂志,30(4):675-680.
- 樊申元,靳二辉,2016.PI3K/Akt/mTOR信号通路对自然衰老小鼠骨骼肌自噬的影响及不同运动方式的调控[J].沈阳体育学院学报,35(1):82-86,92.
- 范朋琦,秦永生,彭朋,2018.不同运动方式对自发性高血压大鼠心脏重塑和运动能力的影响[J].现代预防医学,45(23):4341-4345,4351.
- 房国梁,田野,赵杰修,等,2016.抗阻运动对大鼠大脑皮质和海马组织PI3K/Akt信号通路的影响[J].中国运动医学杂志,35(10):901-907,912.
- 高扬,梁孝天,王博,等,2020.聚集体自噬在运动性骨骼肌损伤中的特征[J].中国组织工程研究,24(5):720-725.
- 何宏文,姚志彬,陈以慈,1998.衰老晚期海马CA1区锥体细胞线粒体改变:电镜定量分析[J].神经解剖学杂志,(3):251-254,316.
- 蒋中业,苏浩,杨中亚,等,2019.16周高强度间歇训练对增龄大鼠骨骼肌ROS-AMPK-PGC-1 α 通路及最大摄氧量的影响[J].中国运动医学杂志,38(5):379-386.
- 李锋,李静静,姜淑杰,2018.有氧运动激活肥胖大鼠前额叶PPAR γ -PI3K-Akt通路并促进神经可塑性相关蛋白表达[J].中国生物化学与分子生物学报,34(5):574-580.
- 李渊芳,谢盈娥,徐士欣,等,2019.线粒体自噬与心脏能量代谢研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,21(3):320-323.
- 梁春瑜,王林佳,倪震,等,2017.不同时长高强度间歇训练与中等强度持续运动对大鼠骨骼肌AMPK、PGC-1 α 表达量及最大摄氧量的影响[J].中国运动医学杂志,36(5):390-399.
- 刘丹慧,吕建新,2008.线粒体自噬的研究进展[J].细胞生物学杂志,30(4):467-471.
- 刘霞,金其贯,罗强,2012.有氧运动和膳食控制对2型糖尿病大鼠骨骼肌InsR-PI3K-GLUT4信号通路的影响[J].中国运动医学杂志,31(11):988-993.
- 马晓雯,常芸,王世强,等,2016.不同强度不同时间耐力训练对于大鼠心肌细胞自噬发生程度的影响[J].中国运动医学杂志35(1):27-31,44.
- 舒婷,万福生,2016.PI3K/Akt/mTOR信号通路与自噬及肿瘤的关系[J].中国生物化学与分子生物学报,32(11):1192-1196.
- 谭支内,蔡梦昕,陈婷,等,2016.间歇运动激活心肌梗死大鼠心肌NRG1-PI3K/Akt通路抑制心肌细胞凋亡[J].北京体育大学学报,39(6):69-76,83.
- 王林佳,苏浩,梁春瑜,等,2016.不同时长HIIT与中等强度运动后大鼠 $\dot{V}O_{2max}$ 及血液心血管风险指标的变化[J].中国体育科技,

- 52(6):81-85,141.
- 谢金凤, 2020. 运动通过 IGF-1/PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活延缓衰老大鼠心肌细胞凋亡的机制[D]. 武汉: 武汉体育学院.
- 徐冉, 魏珑琬, 李志强, 等, 2013. BNIP3 在细胞凋亡与自噬中的作用[J]. 山东医药, 53(28):105-108.
- 严翊, 林家仕, 苏浩, 2012. 大强度运动是否适用于大众健身指导[J]. 北京体育大学学报, 35(8):50-53.
- 杨春兰, 戴爱国, 2017. 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白信号通路在肺部疾病中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 37(4):813-818.
- 尤寿江, 石际俊, 张艳林, 等, 2011. ROS 介导的自噬及其在相关疾病中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 27(1):187-190, 195.
- 于亮, 赵泽铭, 赵斌婷, 等, 2020. BNIP3 介导骨骼肌线粒体自噬: 不同强度运动的影响[J]. 中国组织工程研究, 24(5):682-688.
- BARTLETT J D, CLOSE G L, MACLAREN D P M, et al., 2011. High-intensity interval running is perceived to be more enjoyable than moderate-intensity continuous exercise: Implications for exercise adherence[J]. *J Sports Sci*, 29(6): 547-553.
- CHIAO Y A, KOLWICZ S C, BASISTY N, et al., 2016. Rapamycin transiently induces mitochondrial remodeling to reprogram energy metabolism in old hearts[J]. *Aging*, 8(2): 314-327.
- DADAKHUJAEV S, JUNG E J, NOH H S, et al., 2009. Interplay between autophagy and apoptosis in TrkA-induced cell death[J]. *Autophagy*, 5(1): 103-105.
- DAVIES K J A, PACKER L, BROOKS G A, 1981. Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training[J]. *Arch Biochem Biophys*, 209(2): 539-554.
- FULLE S, PROTASI F, DI TANO G, et al., 2004. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing[J]. *Exp Gerontol*, 39(1): 17-24.
- FULLE S, DI DONNA S, PUGLIELLI C, et al., 2005. Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells[J]. *Exp Gerontol*, 40(3): 189-197.
- HE C, KLIONSKY D J, 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy[J]. *Ann Rev Genet*, 43(1): 67-93.
- HEPPLER R T, 2014. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle[J]. *Front Aging Neurosci*, doi: 10.3389/fnagi.2014.00211.
- LANG T, STREPPER T, CAWTHON P M, et al., 2010. Sarcopenia: Etiology, clinical consequences, intervention, and assessment[J]. *Osteoporos Int*, 21(4): 543-559.
- LEANDRO C G, LEVADA A C, HIRABARA S M, et al., 2007. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption[J]. *J Strength Cond Res*, 21(3): 751-756.
- MAIURI M C, TASDEMIR E, CRIOLLO A, et al., 2009. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes[J]. *Cell Death Differ*, 16(1): 87-93.
- MILLER M G, HANSON N, TENNYCK J, et al., 2019. A comparison of high-intensity interval training (HIIT) volumes on cognitive performance[J]. *J Cogn Enhanc*, 3(2):168-173.
- NEY P A, 2015. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1853(10): 2775-2783.
- ROGERS M A, EVANS W J, 1993. Changes in skeletal muscle with aging: Effects of exercise training[J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 21: 65-102.
- RODON J, DIENSTMANN R, SERRA V, et al., 2013. Development of PI3K inhibitors: Lessons learned from early clinical trials[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 10(3):143-153.
- SAFDAR A, HAMADEH M J, KACZOR J J, et al., 2010. Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults[J]. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0010778.
- SHORT K R, VITTONI J L, BIGELOW M L, et al., 2003. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity[J]. *Diabetes*, 52(8):1888-1896.
- SHORT K R, BIGELOW M L, KAHL J, et al., 2005. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(15): 5618-5623.
- ZENG M, WEI X, WU ZH Y, et al., 2013. NF- κ B-mediated induction of autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 436(2): 180-185.
- ZHAO G X, PAN H, OUYANG D Y, et al., 2015. The critical molecular interconnections in regulating apoptosis and autophagy[J]. *Ann Med*, 47(4):305-315.
- ZHANG J, ZHANG J X, ZHANG Q L, 2016. PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy in the development of autism spectrum disorder[J]. *Brain Res Bull*, 125:152-158.
- SCHMALBRUCH H, 1970. Cross-striated human muscle fibers[J]. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 43(1):3-5.

(收稿日期:2020-06-16; 修订日期:2022-07-11; 编辑:尹航)