

研究论文

萎缩比目鱼肌间断强直收缩疲劳后恢复速率的影响因素

李辉, 焦博, 余志斌*

第四军医大学航空航天生理学教研室, 西安 710032

摘要: 为研究模拟失重大鼠萎缩比目鱼肌强直收缩疲劳后恢复速率的影响因素, 采用尾部悬吊模拟失重大鼠模型及离体骨骼肌条灌流技术, 观测其不同收缩模式下疲劳后的恢复过程。正常大鼠离体比目鱼肌条实验显示, 10 s 短时程(S10P)与 300 s 长时程(L10P)强直收缩轻度疲劳[强直收缩最大张力(P_0)下降 10%]后, 在 20 min 恢复期末, 均可恢复至疲劳前 P_0 , 且恢复程度不受疲劳持续时间的影响; 轻度疲劳后, 在灌流液中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 钌红抑制肌浆网 Ca^{2+} 释放功能, 恢复速率减慢, 恢复程度最大仅至 94% P_0 , 然后呈下降趋势, 提示轻度疲劳可能仅抑制肌原纤维功能。60 s 短时程(S50P)与 300 s 长时程(L50P)强直收缩中度疲劳(P_0 下降 50%)后, 在 20 min 恢复期末, 收缩张力分别恢复至 95% P_0 和 90% P_0 , 表明中度疲劳持续时间影响恢复的速率; 相同条件中度疲劳后, 在灌流液中加入 5 mmol/L 咖啡因促进肌浆网 Ca^{2+} 释放功能, 恢复速率明显加快, 无论疲劳持续时间长短, 5 min 便可完全恢复, 提示中度疲劳不仅抑制肌原纤维功能, 还抑制肌浆网 Ca^{2+} 释放功能。尾部悬吊 1 周的大鼠比目鱼肌明显萎缩, 其重量/体重之比仅为对照大鼠的 60%。采用短与长持续时间的轻与中度疲劳作用后, 在 20 min 恢复期末, 收缩张力分别恢复至 94% P_0 (S10P)、95% P_0 (L10P)、92% P_0 (S50P)、84% P_0 (L50P), 均与同步对照组有显著差异。以上结果提示: 模拟失重 1 周大鼠萎缩的比目鱼肌, 轻度与中度疲劳均可抑制肌原纤维功能与肌浆网 Ca^{2+} 释放功能, 使恢复速率减慢。

关键词: 模拟失重; 强直收缩; 疲劳; 恢复速率

中图分类号: R852.22

Factors modulating recovery rate after intermittent tetanic fatigue in atrophic soleus

LI Hui, JIAO Bo, YU Zhi-Bin*

Department of Aerospace Physiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Fatigue occurs when the interval of intermittent tetanic contraction of skeletal muscle is shortened to a certain degree and the contractile tension declines. After fatigue, prolongation of the contraction interval can make the contractile tension recover. In atrophic soleus, the recovery rate is slower. It has been shown that a decrease in the contractile tension is caused by the inhibition of the myofibrils and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels during fatigue. So the mechanism of the recovery of contractile tension is the recovery of the inhibited myofibrils and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels. But how the inhibition affects the recovery course is still unclear. To specify the factors modulating the recovery rate after intermittent tetanic fatigue in soleus, and to seek the reasons for the decrease in recovery rate in atrophic soleus, we observed the recovery time course of different types of fatigue in isolated soleus muscle strips. The 10% or 50% decrease in the maximal tetanic contractile tension (P_0) was defined respectively as slight or moderate fatigue. After short-term (S10P, 10 s) and long-term (L10P, 300 s) slight fatigue, the tetanic contractile tension recovered to nearly 100% P_0 at the 20th minute. In both slight fatigue groups, perfusion with 10 $\mu\text{mol/L}$ of ruthenium red (an inhibitor of Ca^{2+} release channels in sarcoplasmic reticulum) slowed down the recovery rate. It was suggested that slight fatigue only induced inhibition of myofibrils. After short-term (S50P, 60 s) or long-term (L50P, 300 s) moderate fatigue, the tetanic contractile tension at the 20th minute recovered to about 95% P_0 in S50P group and 90% P_0 in L50P group, respectively. The recovery rate in L50P group was significantly lower than that in S50P group. So the recovery rate after moderate fatigue was related to the tetanic contraction duration. In both moderate fatigue

Received 2007-01-05 Accepted 2007-03-13

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 305000252).

*Corresponding author. Tel: +86-29-84774807; Fax: +86-29-84774807; E-mail: yuzhibin@fmmu.edu.cn

groups, perfusion with 5 mmol/L of caffeine (an opener of Ca^{2+} release channels in sarcoplasmic reticulum) resulted in nearly 100% recovery at the 5th minute. It was suggested that moderate fatigue induced inhibition of myofibrils and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels. In 1-week tail-suspended rats, soleus muscles showed a 40% of atrophy. After slight fatigue, the tetanic contractile tension in unloaded soleus recovered to 94% P_0 in S10P group and 95% P_0 in L10P. After moderate fatigue, the tetanic contractile tension in unloaded soleus recovered to 92% P_0 in S50P and 84% P_0 in L50P at the 20th minute. There were significant decreases in all of the fatigue groups as compared with the control groups. These results suggest that both slight and moderate fatigue inhibit the myofibrils and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels in 1-week unloaded soleus, so the recovery rate after tetanic fatigue is slower than that in the control group.

Key words: weightlessness simulation; tetanic contraction; fatigue; recovery rate

失重或模拟失重引起抗重力骨骼肌萎缩, 萎缩骨骼肌除引起强直收缩期间收缩张力快速降低外^[1], 其强直收缩疲劳后收缩力恢复速率的降低亦是重要变化之一^[2]。已有大量研究关注强直收缩疲劳性的变化与机理, 但对疲劳后恢复速率的影响因素探讨较少。航天员返回地面后需借助运动措施来促进萎缩的抗重力肌恢复正常形态与功能, 由于强直收缩后收缩力恢复速率的减慢, 可能延缓萎缩骨骼肌的恢复进程。因此, 需探明骨骼肌强直收缩疲劳后收缩力恢复减慢的机理, 为制定更有针对性的促恢复措施提供理论依据。有研究表明: 骨骼肌在进行数分钟的间断强直收缩后, 由于肌纤维内代谢产物的积聚, 引起肌原纤维与肌浆网 Ca^{2+} 释放功能的抑制, 导致收缩力逐步下降, 呈现疲劳现象^[3]。而强直收缩疲劳后的恢复过程, 则是解除对肌原纤维与肌浆网 Ca^{2+} 释放功能抑制的过程, 但是, 这两者中哪一个更容易恢复活性, 特别是在萎缩比目鱼肌强直收缩疲劳后的恢复过程, 哪一个是影响恢复速率的主要因素, 目前尚不清楚。因此, 本研究采用尾部悬吊模拟失重大鼠模型, 观测比目鱼肌在不同的刺激模式下, 间断强直收缩疲劳后收缩力恢复的特征, 通过比较与药物干预实验, 探明影响萎缩比目鱼肌间断强直收缩疲劳后恢复速率的主要因素。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组 选用健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 180~210 g。按体重配对原则, 分为对照组与尾部悬吊组, 每组 6 只。按照本实验室已建立的方法进行大鼠饲养与尾部悬吊^[4], 定期称量大鼠体重。悬吊 1 周后, 在相同条件下进行实验。

1.2 离体骨骼肌间断强直收缩与恢复功能的测量

戊巴比妥钠(40 mg/kg)经腹腔麻醉大鼠, 剪开后肢小腿皮肤, 游离比目鱼肌, 顺肌纤维方向分离

宽约 2 mm 的全长肌条, 按本实验室已建立的方法行离体肌条灌流^[2]。采用场刺激模式, 刺激方波脉宽 0.5 ms、电压 20 V、间隔 20 s, 平衡 30 min, 并以 0.1 mm 增量逐步拉伸肌条至等长收缩张力为最大时的肌肉初长, 即最适初长($L_{\max}$)位置, 平衡 10 min。然后采用间断强直收缩刺激, 刺激方波脉宽 0.5 ms, 刺激电压 20 V, 先以 100 Hz 刺激 500 ms, 静息 1 min 后, 再刺激 500 ms, 静息 1 min, 按此规律循环作用 20 min (平衡期); 平衡期后, 在相同刺激方波与电压下, 在 500 ms 内给予 10 次刺激(20 Hz), 静息 1 min; 接着在 500 ms 内给予等间隔刺激 20 次(40 Hz), 静息 1 min; 依此规律, 继续分别给予 60、80、100、120、140 Hz 的刺激, 确定引起每条肌肉最大强直收缩的频率, 即最适刺激频率。最适刺激频率下的强直收缩最大张力记为 P_0 。以最适刺激频率使肌条产生三种模式的间断强直收缩: (1)在 1 000 ms 内, 给予 300 ms 的刺激, 则肌条间断强直收缩期间的负荷率(duty cycle, DC)为 30%。依此条件, 当强直收缩张力降低 10% P_0 或 50% P_0 时(S10P 或 S50P), 延长收缩间隔时间为 1 min, 使肌肉恢复 20 min。(2)在 5 000 ms 内给予 40 ms 的刺激(DC 为 0.8%), 持续 5 min, 强直收缩张力降低约 10% P_0 (L10P), 转入恢复期。(3)在 5 000 ms 内给予 300 ms 的刺激(DC 为 6.0%), 持续 5 min, 强直收缩张力降低约 50% P_0 (L50P), 转入恢复期(图 1)。在 S10P 与 L10P 间断强直收缩模式下, 疲劳期结束时, 30 s 内用 10 $\mu\text{mol/L}$ 钌红(ruthenium red, RR, 肌浆网 Ca^{2+} 释放通道选择性抑制剂)灌流, 使肌条恢复 20 min。在 S50P 与 L50P 间断强直收缩模式下, 疲劳期结束时, 30 s 内用 5 mmol/L 咖啡因(肌浆网 Ca^{2+} 释放通道选择性开放剂)灌流, 使肌条恢复 20 min。测量恢复期的张力变化, 作张力-恢复时间图。实验结束后, 用滤

纸吸干肌肉表面附着的水分并称重。按已建立的公式计算每一肌肉的横截面积(cross-sectional area, CSA)^[2]。本实验中, 将间断强直收缩期间 P_0 降低 10% 定义为轻度疲劳, P_0 降低 50% 定义为中度疲劳。

1.3 统计学处理 数据以 means±SEM 表示。使用 SPSS 对随机区组设计资料进行方差分析。 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 对照与悬吊大鼠比目鱼肌的一般特征

表 1 显示, 悬吊 1 周大鼠体重与对照组相比无明

表 1. 对照组与悬吊组大鼠比目鱼肌一般特征
Table 1. General features of soleus muscles in control and tail-suspended rats

	Control	Tail-suspended
Body weight (g)	225±11	223±10
Soleus weight (mg)	90±10	62±10**
Soleus weight/Body weight (%)	40±7	29±13*
Muscle strip length (mm)	26.80±2.30	27.20±1.80
Cross-sectional area (mm ²)	0.79±0.06	0.76±0.07

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control. means±SEM, $n=6$.

显差别, 但比目鱼肌明显萎缩。两组间进行实验观测的比目鱼肌肌条长度与 CSA 均无显著差异。

2.2 间断强直收缩轻度疲劳与钉红灌流对正常大鼠比目鱼肌恢复速率的影响

正常大鼠比目鱼肌肌条以 DC 为 30% 作间断强直收缩, 大约 10 s 内收缩的最大张力下降 10% P_0 (S10P), 然后恢复。在恢复期第 20 分钟, 强直收缩最大张力可恢复至疲劳前 99% P_0 (图 2)。另一组以 DC 为 0.8% 作间断强直收缩, 5 min 后收缩的最大张力亦下降约 10% P_0 (L10P), 立刻转入恢复期, 在第 20 分钟, 收缩张力可恢复到 100% P_0 。S10P 与 L10P 两组恢复期末无统计学差异($P>0.05$)。

疲劳后, 在灌流液中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 钉红, 观察比目鱼肌强直收缩功能的恢复过程。在 S10P 钉红灌流组(S10P + RR), 收缩张力在第 5 分钟恢复至 93% P_0 , 然后逐渐降低, 第 20 分钟降为 82% P_0 , 与 S10P 组相比有显著性差异($P<0.01$, 图 2)。在 L10P 钉红灌流组(L10P + RR), 收缩张力在第 14 分钟恢复至 93% P_0 , 并保持在此水平直至 20 min 恢复期末, 与 L10P 组相比有显著性差异($P<0.01$, 图 2)。

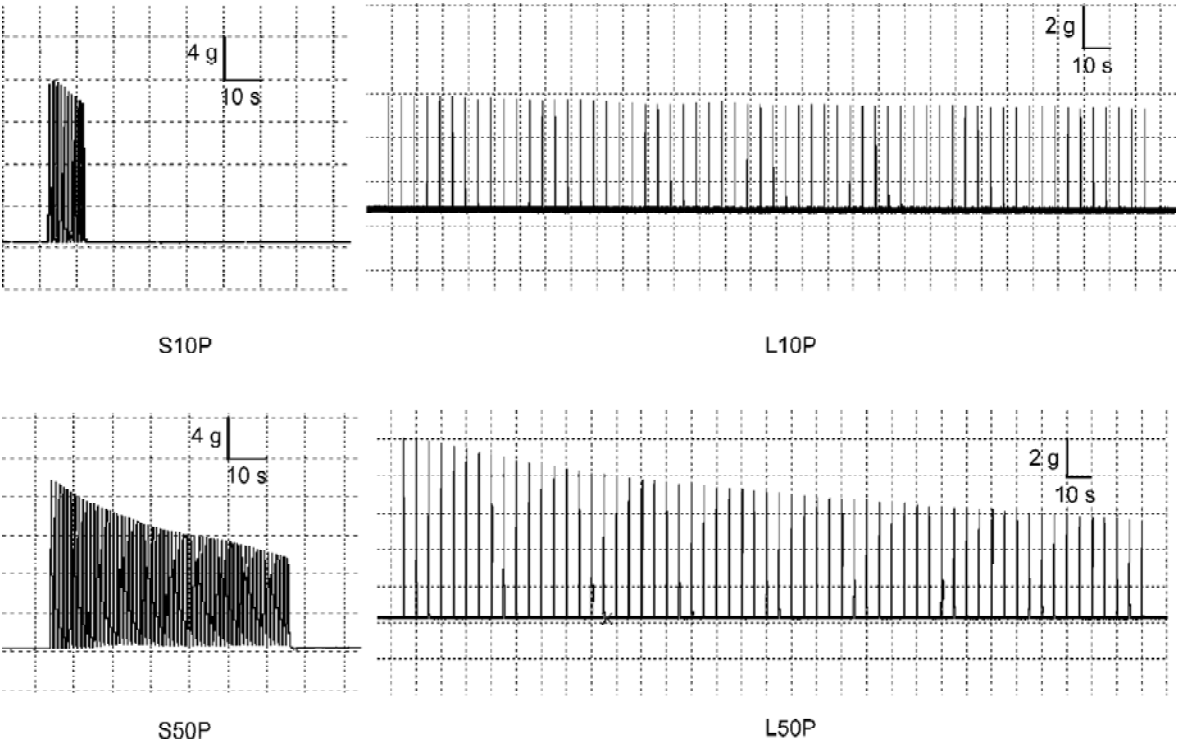


图 1. 典型的间断强直收缩疲劳图
Fig. 1. Typical recordings of intermittent tetanic fatigue.

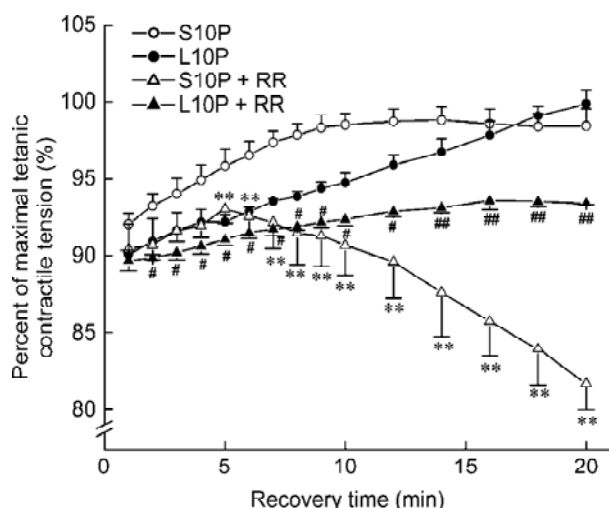


图 2. 间断强直收缩轻度疲劳与钌红灌流对正常大鼠比目鱼肌恢复速率的影响

Fig. 2. Effects of slight fatigue and ruthenium red (RR) on recovery rate in soleus muscles in control rats. S10P, intermittent tetanic contractile tension of soleus muscle strip was declined by 10% P_0 in short term (about 10 s). L10P, intermittent tetanic contractile tension of soleus muscle strip was descended by 10% P_0 in 5 min. S10P + RR or L10P + RR, the muscle strips were perfused with 10 $\mu\text{mol/L}$ of ruthenium red during recovery period. ** $P < 0.01$ vs S10P; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs L10P. means $\pm$ SEM, $n = 6$.

2.3 间断强直收缩中度疲劳与咖啡因对正常大鼠比目鱼肌恢复速率的影响

正常大鼠比目鱼肌肌条以DC为30%作间断强直收缩, 大约60 s内收缩的最大张力下降至50% P_0 (S50P), 然后恢复, 在第20分钟, 收缩张力可恢复到95% P_0 。另一组以DC为6.0%作间断强直收缩, 5 min后收缩的最大张力亦下降至约50% P_0 (L50P), 转入恢复期, 在第20分钟, 收缩张力可恢复到90% P_0 (图3A)。L50P组恢复速率明显慢于S50P组, 两组恢复期各观测时间点有显著性差异 ($P < 0.05$)。

在咖啡因灌流的第5分钟, S50P组收缩张力可恢复至105% P_0 , 而L50P组亦可恢复至100% P_0 。与未进行咖啡因灌流的对照组相比, 有显著性差异 ($P < 0.01$, 图3B)。

2.4 悬吊大鼠比目鱼肌间断强直收缩疲劳后恢复速率的变化

悬吊1周大鼠S10P与L10P组, 在20 min恢复期内, 比目鱼肌强直收缩张力仅分别恢复到94% P_0 与95% P_0 , 与对照组相比, 均有显著性差异 ($P <$

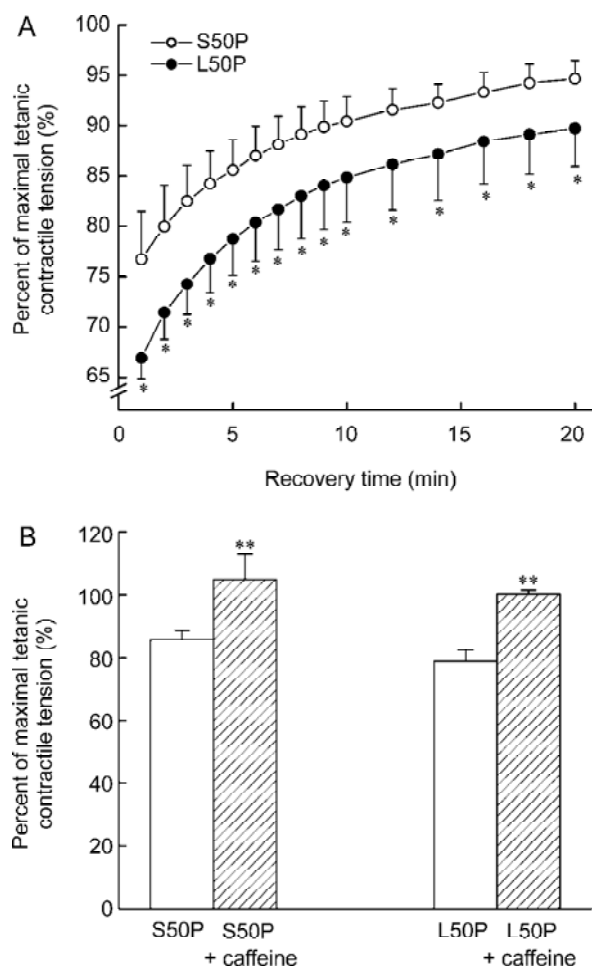


图 3. 间断强直收缩中度疲劳与咖啡因对正常大鼠比目鱼肌恢复速率的影响

Fig. 3. Effects of moderate fatigue and caffeine on recovery rate in soleus muscles in control rats. A: Effect of moderate fatigue on recovery rate in soleus muscles. S50P, intermittent tetanic contractile tension of soleus muscle strip was declined by 50% P_0 in short term (about 1 min). L50P, intermittent tetanic contractile tension of soleus muscle strip was declined by 50% P_0 in 5 min. * $P < 0.05$ vs S50P. B: Effect of caffeine (5 mmol/L) on recovery rate in soleus muscles at the 5th minute. ** $P < 0.01$ vs S50P or L50P.

0.05, 图4)。

悬吊1周大鼠S50P与L50P组, 疲劳后经20 min恢复, 收缩张力可分别恢复至92% P_0 与84% P_0 , 与其对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$, 图5A、B)。延长恢复时间至40 min, 对照组短时程中度疲劳后可恢复至101% P_0 , 悬吊组则恢复至97% P_0 , 有显著性差异 ($P < 0.05$); 对照组长时程中度疲劳后可恢复至92% P_0 , 悬吊组仅恢复至90% P_0 , 有显著性差异 ($P < 0.05$, 图5C)。

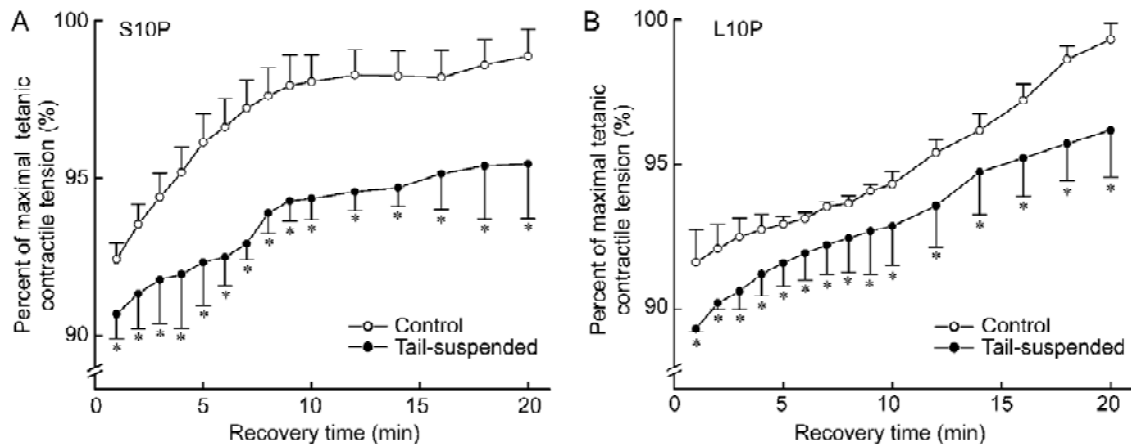


图 4. 轻度疲劳对去负荷比目鱼肌恢复速率的影响

Fig. 4. Recovery rate after slight fatigue in unloaded soleus muscle of rats. A: S10P. B: L10P. S10P, intermittent tetanic contractile tension of soleus muscle strip was declined by 10% P_0 in short term (about 10 s). L10P, intermittent tetanic contractile tension of soleus muscle strip was descended by 10% P_0 in 5 min. * $P < 0.05$ vs control. means $\pm$ SEM, $n = 6$.

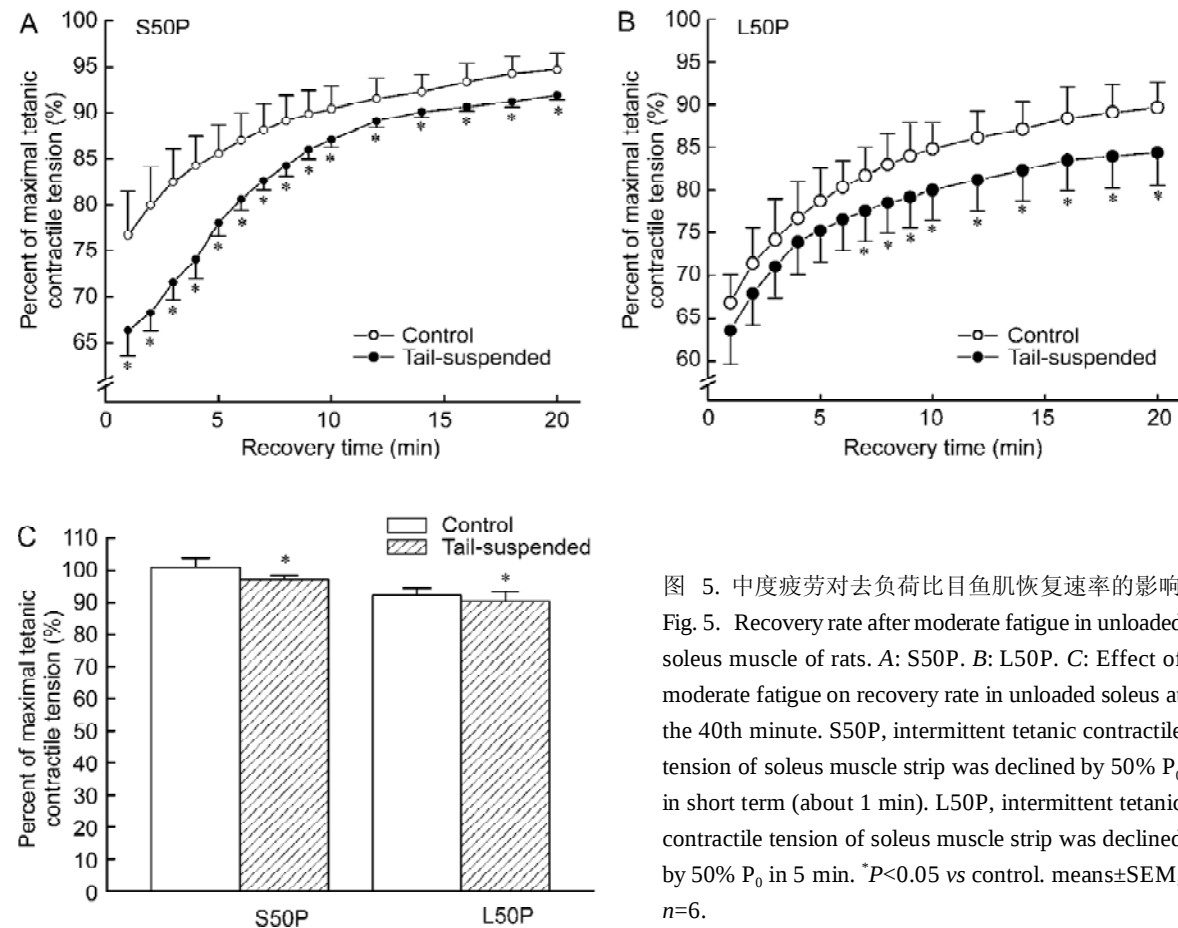


图 5. 中度疲劳对去负荷比目鱼肌恢复速率的影响

Fig. 5. Recovery rate after moderate fatigue in unloaded soleus muscle of rats. A: S50P. B: L50P. C: Effect of moderate fatigue on recovery rate in unloaded soleus at the 40th minute. S50P, intermittent tetanic contractile tension of soleus muscle strip was declined by 50% P_0 in short term (about 1 min). L50P, intermittent tetanic contractile tension of soleus muscle strip was declined by 50% P_0 in 5 min. * $P < 0.05$ vs control. means $\pm$ SEM, $n = 6$.

3 讨论

3.1 正常大鼠比目鱼肌强直收缩疲劳后恢复速率的影响因素

骨骼肌间断强直收缩期间，当刺激间隔缩短到一定程度时，收缩张力呈现逐步降低，即产生疲劳现象。有研究表明，强直收缩张力从初始张力下降 15% 时，代谢产物仅导致对肌原纤维的抑制而引起

收缩张力降低;随作用时间的延长,代谢产物同时抑制肌浆网 Ca^{2+} 释放功能,引起收缩张力进一步降低^[3]。因此,恢复期则是被抑制的肌原纤维与肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能恢复的过程。然而,在恢复期肌原纤维与肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能恢复的速率与影响因素还不清楚;恢复过程中,模拟失重大鼠萎缩比目鱼肌恢复速率明显减慢的机制也未探明。

为此,在高(DC为30%)与低(DC为0.8%)两种收缩负荷条件下,使强直收缩张力下降10% P_0 后,张力恢复较快,20 min内可恢复至接近100% P_0 (图2)。在S10P与L10P组的恢复期加入钆红进行灌流,因钆红可选择性抑制肌浆网 Ca^{2+} 释放通道^[5],故使恢复速率减慢或在20 min的恢复期内收缩张力不能完全恢复至原有的 P_0 水平(图2),提示间断强直收缩张力幅值降低10% P_0 时未影响肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能,与Allen等的研究结果一致^[3];另一方面则提示轻度疲劳仅抑制肌原纤维功能,且不受强直收缩持续时间的影响,肌原纤维的抑制恢复较快,肌浆网 Ca^{2+} 释放通道受抑制后,恢复速率较慢。

在较短时间内强直收缩张力下降50% P_0 时,20 min恢复期内,张力仅恢复至95% P_0 ;而在较长时间内使强直收缩张力同样只下降50% P_0 ,20 min恢复期内,张力仅恢复至90% P_0 (图3)。提示强直收缩张力降低大于15%时,除抑制了肌原纤维功能,同时也抑制了肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能;对肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能的抑制还受强直收缩持续时间的影响,持续时间越长,抑制越明显。无论在S50P,还是在L50P条件下,肌浆网 Ca^{2+} 释放通道开放剂咖啡因^[6]均在5 min内使收缩张力基本达到完全恢复,从另一方面提示在S50P与L50P条件下间断强直收缩抑制了肌浆网 Ca^{2+} 释放通道。

3.2 模拟失重萎缩比目鱼肌强直收缩疲劳后恢复速率减慢的可能机制

尾部悬吊模拟失重1周大鼠比目鱼肌明显萎缩(表1)。与正常大鼠比目鱼肌间断强直收缩功能相比,在S10P与L10P两种条件下,萎缩比目鱼肌强直收缩疲劳后恢复的速率均明显减慢(图4),提示被抑制的肌原纤维功能恢复速率降低,或者肌浆网 Ca^{2+} 释放通道对代谢产物的抑制作用更敏感。与同步对照组相比,悬吊1周组在S50P与L50P条件下的恢复速率更慢(图5A、B),需40 min才能恢复90% P_0 以上(图5C),提示萎缩比目鱼肌肌浆网

Ca^{2+} 释放通道更容易被抑制,且是影响恢复速率的主要因素。

无论是轻度还是中度疲劳后,萎缩比目鱼肌的恢复速率均减慢,可能与收缩蛋白由慢型向快型转化有关^[7]。萎缩比目鱼肌肌浆网 Ca^{2+} 释放通道亦发生了向快型的转化^[8],这是否是其更容易被抑制的原因尚不清楚。

综上所述,本研究提示:(1)间断强直收缩轻度疲劳可能仅抑制肌原纤维功能,在一定范围内抑制程度与间断强直收缩疲劳持续时间无关;单纯抑制肌原纤维,其恢复速率较快。(2)间断强直收缩中度疲劳则抑制肌原纤维与肌浆网 Ca^{2+} 释放通道的功能,且间断强直收缩的持续时间越长,对肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能的抑制越明显;肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能被抑制后,恢复速率较慢,肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能的抑制可能是影响恢复速率的主要因素。(3)萎缩比目鱼肌的肌原纤维与肌浆网 Ca^{2+} 释放通道功能更易被抑制,其机理尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000; 89: 823-839.
- 2 Yu ZB, Gao F, Feng HZ, Jin JP. Differential regulation of myofilament protein isoforms underlying the contractility changes in skeletal muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(3): C1192-C1203.
- 3 Allen DG, Westerblad H. Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue. *J Physiol* 2001; 536: 657-665.
- 4 Chen J (陈杰), Ma J, Ding ZP, Zhang LF. A modified tail-suspension model for simulating long-term weightlessness. *Chin J Space Sci (空间科学学报)* 1993; 13(2): 81-84 (Chinese, English abstract).
- 5 Coronado R, Morrisette J, Sukhareva M, Vaughn DM. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 1994; 266(35): C1485-C1504.
- 6 James RS, Wilson RS, Askew GN. Effects of caffeine on mouse skeletal muscle power output during recovery from fatigue. *J Appl Physiol* 2004; 96: 545-552.
- 7 Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol* 1999; 277(46): C1044-C1049.
- 8 Bastide B, Conti A, Sorrentino V, Mounier Y. Properties of ryanodine receptor in rat muscles submitted to unloaded conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 442-447.