

- pulmonary fibrosis: an analysis from the prospective, multicentre profile study[J]. *Lancet Resp Med*, 2015, 3(6): 462-471.
- [16] 肖青雯, 陆金健, 陈修平. 靶向上皮间质转化: 中药抗肿瘤转移和器官纤维化新策略[J]. *医药导报*, 2018, 37(4): 401-409.
- [17] 苏 韞, 张 毅, 李 娟, 等. 红芪有效部位对肺间质纤维化模型大鼠肺组织胶原面积、透明质酸及层粘连蛋白的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(4): 72-76.
- [18] Morales-Nebreda LI, Rogel MR, Eisenberg JL, et al. Lung-specific loss of  $\alpha 3$  laminin worsens bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2015, 52(4): 503-512.
- [19] Weng TT, Poth JM, Karmouty-Quintana H, et al. Hypoxia-induced deoxycytidine kinase contributes to epithelial proliferation in pulmonary fibrosis[J]. *Am J Resp Crit Care Med*, 2014, 190(12): 1402-1412.
- [20] 吴礼循, 吴 翔. 白介素 11 拮抗剂对实验性小鼠肺纤维化的作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(3): 308-312.
- [21] 卢林明, 俞婷婷, 何晓伟, 等. 小剂量辣椒素抗小鼠肺纤维化的作用及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(3): 216-222.

## 低氧训练对骨骼肌 p53 及其调控的线粒体有氧代谢信号通路基因表达的影响\*

李 洁<sup>1△</sup>, 赵丽丽<sup>2</sup>

(1. 西北师范大学体育学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 陇南师范高等专科学校体育与健康学院, 甘肃 陇南 742500)

**【摘要】 目的:** 探讨低氧训练对大鼠骨骼肌 p53 及其调控的线粒体有氧代谢信号通路基因表达的影响, 以及对线粒体有氧氧化供能能力的影响。**方法:** 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组 ( $n=10$ ), 低住低练组 (LoLo)、高住高练组 (HiHi) 和高住高练低训组 (HiHiLo)。以当地海拔 1 500 m 为常氧环境, 模拟海拔 3 500 m 为低氧环境, 各组大鼠按训练方案训练 5 周后, 取股四头肌行匀浆及提取线粒体。Real-time PCR 检测 p53、细胞色素 c 氧化酶合成 2 (SCO2)、细胞色素 c 氧化酶亚基 I (COX I) 和谷氨酰胺酶 2 (GLS2) mRNA 表达, Western blot 检测 p53、SCO2、COX I 和 GLS2 蛋白表达; ELISA 测定  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 ( $\alpha$ -KGDHC), 细胞色素 c 氧化酶 (COX) 及 ATP 合酶 (ATP synthase) 活性。**结果:** ①与 LoLo 组比较, HiHi 和 HiHiLo 组 p53 mRNA 水平显著升高 ( $P<0.01$ ), HiHiLo 组 p53 蛋白表达水平显著下降 ( $P<0.01$ ); HiHi 和 HiHiLo 组 SCO2 mRNA 水平和蛋白表达水平均显著升高 ( $P<0.01$ ); HiHiLo 组 COX I mRNA 水平显著升高 ( $P<0.01$ ), HiHi 组显著降低 ( $P<0.01$ ), HiHi 组 COX I 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ ); HiHi 和 HiHiLo 组 GLS2 mRNA 水平均显著升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ), HiHiLo 组 GLS2 蛋白表达水平显著下降 ( $P<0.01$ )。②与 LoLo 组比较, HiHi 组  $\alpha$ -KGDHC 和 COX 活性均显著降低 ( $P<0.01, P<0.05$ ), HiHiLo 组均显著升高 ( $P<0.01$ ); HiHi 和 HiHiLo 组 ATP synthase 总活性和特异性活性均显著升高 ( $P<0.01$ )。**结论:** 高住高练低训上调大鼠骨骼肌 p53 及其调控的线粒体有氧代谢信号通路相关因子基因转录水平, 提高骨骼肌线粒体有氧氧化供能能力。

**【关键词】** p53; 细胞色素 c 氧化酶合成 2; 细胞色素 c 氧化酶亚基 I; 谷氨酰胺酶 2;  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶; 细胞色素 c 氧化酶; ATP 合酶

**【KEY WORDS】** p53; synthesis of cytochrome c oxidase 2; cytochrome c oxidase subunit I; glutaminase 2;  $\alpha$ -Ketoglutaric dehydrogenase; cytochrome c oxidase; ATP synthase

**【中图分类号】** C804.7

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1000-6834(2024)01-180-005

**【DOI】** 10.12047/j.cjap.6314.2022.105

众所周知, p53 是 20 世纪 80 年代发现的又一抑癌基因, 位于人 17 号染色体短臂上约 16 ~ 20 KB 的基因组 DNA 中<sup>[1]</sup>, 编码产生 53 KD 蛋白, 具有与双链或单链 DNA 结合调节基因转录的能力<sup>[2]</sup>。近年来的研究发现, p53 还是一种调节能量代谢信号通路的转录因子, 具有降低糖酵解和增强细胞线粒体呼吸的作用。其调控能量代谢主要通过诱导 TI-GAR (Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator) 以及抑制磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase, PGM) 降低糖

酵解, 诱导细胞色素 c 氧化酶合成 2 (synthesis of cytochrome c oxidase 2, SCO2) 和谷氨酰胺酶 2 (glutaminase 2, GLS2) 增强线粒体的有氧呼吸; p53 缺失会导致机体耗氧量下降或促使细胞有氧呼吸转向糖酵解, 不利于提高机体有氧耐力水平<sup>[3,4]</sup>。p53 与运动训练相关的研究表明, p53 对运动训练的反应具有肌纤维类型的特异性和运动强度的敏感性<sup>[5]</sup>, p53-SCO2-COX II-有氧呼吸轴对耐力训练和大强度间歇训练均可产生良好的适应<sup>[6]</sup>。低氧训练是近年来用于提高机体有氧耐力和运动成绩的新型辅助训练方法, 目前有关低氧训练对 p53 及其调控的线粒体有氧代谢通路相关因子的影响鲜有报道。鉴于此, 本研究拟通过观测低氧训练下大鼠骨骼肌 p53 及其调控线粒体有氧代谢通路相关因子——SCO2、COX

\*【基金项目】国家自然科学基金资助项目(31760295)

【收稿日期】2022-05-17【修回日期】2022-09-16

△【通讯作者】Tel: 13919079404; E-mail: lijie2005ty@126.com

I 及 GLS2 基因表达, 以及线粒体三羧酸循环, 呼吸链功能的变化, 探讨低氧训练对骨骼肌 p53 及其调控的线粒体有氧代谢通路的影响, 以及对线粒体有氧氧化供能能力的影响, 旨为低氧训练研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 2 月龄 Wistar 大鼠 35 只(由兰州大学医学院实验动物中心提供), 体质量(180±20)g 左右, 常规饲养。

### 1.2 主要药品与试剂

一抗(p53、SCO2、COX I、GLS2)、二抗 HRP 和内参 GAPDH(武汉爱博泰克生物科技有限公司), 显色液—Western Bright™ ECL 和 Western Bright™ Peroxide、普通 RIPA 裂解液(北京索莱宝科技有限公司), RNA 提取试剂 Trizol、cDNA 第一条链合成试剂和荧光染料—TB Green™ Premix Ex Taq™ II(大连宝生物有限公司), 引物由大连宝生物(TaKaRa)提供。 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶( $\alpha$ -ketoglutaric dehydrogenase,  $\alpha$ -KGDHC)试剂盒(上海樊克), 细胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)和 ATP 合酶(ATP synthase)试剂盒(南京建成)。

### 1.3 主要仪器

低氧舱(自制), 动物跑台(DSPT—202, 中国杭州), 高速离心机(eppendorf5424r, 德国), Real time PCR 仪(BIO-RAD, CFX96™, 美国), 紫外分光光度计(UD730, 美国), 凝胶成像仪(BIO-RAD, Universal Hood II, 美国), 酶标仪(BIO-RAD 680, 美国)。

### 1.4 跑台及低氧环境适应

以当地海拔 1 500 m 为常氧环境, 模拟海拔 3 500 m 为低氧环境。参照文献[7]对大鼠进行跑台运动、低氧环境及低氧环境跑台运动适应。根据适应情况, 保留 30 只大鼠进行正式实验。

### 1.5 动物分组与训练方案

将 30 只大鼠随机均分为 3 组( $n=10$ ): 低住低练组(LoLo)、高住高练组(HiHi)和高住高练低训组(HiHiLo)。训练方案<sup>[8]</sup>为: LoLo 组, 第 1 周和第 2 周运动速度为 35 m/min, 运动时间分别为 30 min 和 40 min; 第 3 周和第 4 周运动速度为 37 m/min, 运动时间分别为 40 min 和 50 min; 第 5 周运动速度为 39 m/min, 运动时间为 50 min。训练日和休息日大鼠每天 24 h 均在常氧环境。HiHi 组, 第 1 周和第 2 周, 运动速度为 30 m/min, 运动时间分别为 30 min 和 40 min; 第 3 周和第 4 周, 运动速度为 32 m/min, 运动时间分别为 40 min 和 50 min; 第 5 周, 运动速度为 34 m/min, 运动时间 50 min。训练日和休息日大鼠每天 24 h 均在低氧环境。HiHiLo 组常氧训练方案同 LoLo 组, 低氧训练方案同 HiHi 组(隔天训练), 训练日和休息日大鼠每天连续 12 h 在低氧环境, 连续 12 h 在常氧环境。以上各组均每周训练 6 d, 休息 1 d, 共训练 5 周。

### 1.6 取材与线粒体分离

5 周训练结束后, 所有大鼠腹腔注射 0.4% 的戊巴比妥

钠(0.3 ml/100 g)麻醉, 取股四头肌, 低温保存待用。将低温保存样本取出, 4℃ 放置 5 min 融化, 取适量股四头肌称重后剪碎, 按重量(g): 体积(ml) = 1: 5 加入缓冲液[100 mmol/L sucrose, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mmol/L Tris-base, pH = 7.4, 4℃], 匀浆器匀浆(60 Hz, 上下匀浆 180 s, 间隔 180 s, 共 3 次)。按 1 g 组织加入 1 mg 枯草杆菌蛋白酶(Nagarse protease)室温孵育 5 min 后, 加入适量的缓冲液, 再次匀浆(50 Hz, 上下匀浆 120 s, 间隔 180 s, 共 2 次)。匀浆液 2 000 r/min 离心 10 min, 双层医用纱布过滤, 弃沉淀, 所得上清液以 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用悬浮液(100 mmol/L sucrose, 50 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mmol/L Tris-base, pH = 7.4, 4℃)轻轻悬浮, 12 000 r/min 再离心 10 min, 收集沉淀即为线粒体<sup>[9,10]</sup>, 用小体积悬浮液悬浮待用。

### 1.7 p53 及其调控的线粒体有氧代谢通路相关因子基因表达的测定

p53、细胞色素 c 氧化酶合成 2 (synthesis of cytochrome c oxidase 2, SCO2), 细胞色素 c 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, COX I) 和谷氨酰胺酶 2 (glutaminase 2, GLS2) mRNA 应用 Real time PCR 进行检测, 蛋白表达应用 Western blot 进行检测。扩增引物基因序列来自 NCBI 数据库, primer5.0 进行引物设计, p53 引物: F5' TCCAGTTCATTGGACTTATCCTTG3', R5' GCTCATATCCGACTGTGAATCCTC3'。SCO2 引物: F5' GACCACTCCATTGCCATCTACTT3', R5' TTCAGGACAGGACACTTTGGA3'。COX I 引物: F5' CCCACTTTGCCATTATATTTGTAGG3', R5' TTTCATGTGGTGTAAAGCATCTGG3'。GLS2 引物: F5' CGCATGTCCAAGAGTCCAG3', R5' GGCATCCTCAAATATACGATCCAC3'。

### 1.8 线粒体三羧酸循环及呼吸链酶活性的测定

ELISA 测定  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶( $\alpha$ -ketoglutaric dehydrogenase,  $\alpha$ -kGDHC)、COX 和 ATP 合酶(ATP synthase)活性, BCA 法检测线粒体蛋白质浓度。

### 1.9 统计学处理

所有数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, SPSS 13.0 软件进行单因素方差(one-way ANOVA)分析。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠骨骼肌 p53、SCO2、COX I 和 GLS2 基因转录的比较

p53 mRNA, 与 LoLo 组比较, HiHi 和 HiHiLo 组均显著升高( $P<0.01$ ); 与 HiHi 组比较, HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ )。SCO2 mRNA, 与 LoLo 组相比, HiHi 和 HiHiLo 组均显著升高( $P<0.01$ ); 与 HiHi 组相比, HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ )。COX I mRNA, 与 LoLo 组相比, HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ ), HiHi 组显著降低( $P<0.01$ ); 与 HiHi 组相比, HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ )。GLS2 mRNA, 与 LoLo 组比较, HiHi 和 HiHiLo 组均显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 与 HiHi 组比较, HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ , 表 1)。

**Tab. 1** Comparison of gene transcription of p53, SCO2, COX I and GLS2 in skeletal muscle of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Group	p53	SCO2	COX I	GLS2
LoLo	0.14±0.04	0.20±0.07	0.98±0.23	0.23±0.07
HiHi	1.12±0.30**	0.62±0.10**	0.38±0.04**	0.35±0.02*
HiHiLo	2.22±0.20***	0.88±0.09***	1.98±0.31***	0.50±0.11***

SCO2: Synthesis of cytochrome c oxidase 2; COX I: Cytochrome c oxidase subunit I; GLS2: Glutaminase 2; LoLo: Living low- training low; HiHi: Living high- training high; HiHiLo: Living high-exercise high-training low

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs LoLo group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs HiHi group

**2.2 各组大鼠骨骼肌 p53、SCO2、COX I 和 GLS2 蛋白表达的比较**

p53 蛋白表达,与 LoLo 组相比,HiHiLo 组显著下降( $P<0.01$ ),HiHi 组下降,但无显著性差异;与 HiHi 组相比,HiHiLo 组显著下降( $P<0.01$ )。SCO2 蛋白表达,与 LoLo 组比较,HiHi 和 HiHiLo 组均显著升高( $P<0.01$ );与 HiHi 组比较,HiHiLo 组显著下降( $P<0.01$ )。COX I 蛋白表达,与 LoLo 组相比,HiHi 组显著上升( $P<0.05$ ),HiHiLo 组无变化;与 HiHi 组相比,HiHiLo 组显著下降( $P<0.01$ )。GLS2 蛋白表达,与 LoLo 组比较,HiHiLo 组显著下降( $P<0.01$ ),HiHi 组升高,但无显著性差异;与 HiHi 组比较,HiHiLo 组显著下降( $P<0.01$ ,表 2,图 1)。

**Tab. 2** Comparison of protein expression levels of p53, SCO2, GLS2 and COX I in skeletal muscle of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Group	p53	SCO2	COX I	GLS2
LoLo	0.57±0.10	0.33±0.02	1.19±0.11	1.51±0.09
HiHi	0.48±0.03	0.74±0.08**	1.44±0.10*	1.54±0.14
HiHiLo	0.26±0.12***	0.50±0.03***	1.19±0.11##	1.14±0.21***

SCO2: Synthesis of cytochrome c oxidase 2; COX I: Cytochrome c oxidase subunit I; GLS2: Glutaminase 2; LoLo: Living low- training low; HiHi: Living high- training high; HiHiLo: Living high-exercise high-training low

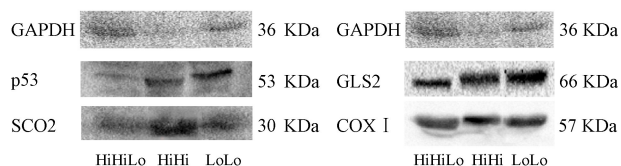
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs LoLo group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs HiHi group

**Tab. 3** Comparison of the activities of  $\alpha$ -KGDHC, COX and ATP synthase of mitochondrion in skeletal muscle of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Group	$\alpha$ -KGDHC activity (U/ml)	COX activity ( $\mu\text{mol Cyt C}/(\text{min} \cdot \text{mg prot})$ )	ATP synthase total activity ( $\mu\text{mol NADH}/(\text{min} \cdot \text{mg prot})$ )	ATP synthase specific activity ( $\mu\text{mol NADH}/(\text{min} \cdot \text{mg prot})$ )
LoLo	1642.79±191.65	0.21±0.24	1.39±0.45	0.68±0.17
HiHi	1355.31±119.38**	0.12±0.01*	3.29±0.11**	1.18±0.05**
HiHiLo	1980.80±107.22***	0.61±0.10***	2.94±0.13**	1.08±0.17**

$\alpha$ -KGDHC:  $\alpha$ -ketoglutaric dehydrogenase; COX: Cytochrome c oxidase; LoLo: Living low-training low; HiHi: Living high- training high; HiHiLo: Living high-exercise high-training low

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs LoLo group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs HiHi group



**Fig. 1** Protein expression levels of p53, SCO2, GLS2 and COX I in skeletal muscle of rats in each group

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SCO2: Synthesis of cytochrome c oxidase 2; COX I: Cytochrome c oxidase subunit I; GLS2: Glutaminase 2; LoLo: Living low- training low; HiHi: Living high- training high; HiHiLo: Living high-exercise high-training low

**2.3 各组线粒体蛋白含量**

各组线粒体蛋白含量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), LoLo 组为 2309.88 ± 34.14, HiHi 组为 2669.67 ± 45.15, HiHiLo 组为 2978.24 ± 34.06。

**2.4 各组大鼠骨骼肌线粒体  $\alpha$ -KGDHC、COX 和 ATP synthase 活性的比较**

$\alpha$ -KGDHC 活性,与 LoLo 组比较,HiHi 组显著降低( $P<0.05$ ),HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ );与 HiHi 组比较,HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ )。COX 活性,与 LoLo 组相比,HiHi 组显著降低( $P<0.05$ ),HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ );与 HiHi 组相比,HiHiLo 组显著升高( $P<0.01$ )。ATP synthase 总活性和 ATP synthase 特异性活性,与 LoLo 组比较,HiHi 和 HiHiLo 组均显著升高( $P<0.01$ );与 HiHi 组比较,HiHiLo 组显著降低( $P<0.05$ ,表 3)。

**3 讨论**

研究认为,p53 可在多个信号转导通路上影响糖代谢功能<sup>[11]</sup>。p53 抑制葡萄糖转运蛋白 1 和 4 (GLUT1, GLUT4) 的表达,导致糖酵解途径中的磷酸甘油酸变位酶 (PGM) 水平降低;同时诱导 TIGAR (Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator) 的表达,将葡萄糖转移到磷酸戊糖途径 (PPP)<sup>[12]</sup>,抑制糖酵解。p53 诱导谷氨酰胺酶 2 (GLS2),增加谷氨酸 (glutamate, GLU) 和  $\alpha$ -酮戊二酸生成<sup>[13]</sup>;诱导细胞色素 c 氧化酶 2 (SCO2),增加细胞色素 c 氧化酶复合物 (cytochrome c oxidase complex, COX) 的合成,增强线粒体呼吸能力<sup>[14]</sup>。已有研究表明,p53 敲除后小鼠有氧呼吸水平降低,细胞色素 c 氧化酶 (COX) 含量降低<sup>[15]</sup>。耐力训练不影响 p53 基因表达,

但 p53 调节糖酵解信号通路在一定程度上会受到抑制,可抑制糖酵解,促进线粒体的有氧呼吸<sup>[16]</sup>。运动诱导的 p53 基因表达存在肌纤维类型的特异性和运动强度的敏感性,运动对 p53 基因表达的调控可发生在转录及转录后水平<sup>[5]</sup>。但也有研究表明,p53 基因表达具有极强的保守性,耐力训练和大强度间歇训练均无法影响其稳态效应<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,低氧训练均可显著上调大鼠骨骼肌 p53 基因转录,而蛋白表达有所下降,其中 HiHiLo 显著下降,HiHi 无显著性差异。p53 mRNA 由高至低顺序为 HiHiLo 组>HiHi 组>LoLo 组,蛋白表达量由高到低顺序为 LoLo 组>HiHi 组>HiHiLo 组。本研究结果还显示,低氧训练均可显著上调大鼠骨骼肌 GLS2 基因转录,而蛋白表达 HiHiLo 显著下降,HiHi 有所增加,但无显著性差异。GLS2 mRNA 量由高至低顺序为 HiHiLo 组>HiHi 组>LoLo 组,蛋白表达量由高到低顺序为 HiHi 组>LoLo 组>HiHiLo 组。说明 p53 和 GLS2 对低氧训练具有敏感性,低氧训练对 p53 和 GLS2 基因表达可产生影响。通过低氧训练 p53 和 GLS2 基因转录显著增加,但其蛋白表达没有显著增加甚至还出现下降,这可能与机体蛋白合成过程受阻和/或低氧复合运动导致蛋白质降解有关,其机制还有待进一步研究。已有研究表明,耐力训练和大强度间歇训练对 SCO2 基因在转录和转译水平上的影响存在差异,但均呈现促进有氧呼吸的趋同性<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,低氧训练均可显著上调大鼠骨骼肌 SCO2 基因转录水平,同时蛋白表达也均显著增加,SCO2 mRNA 由高至低顺序为 HiHiLo 组>HiHi 组>LoLo 组,蛋白表达量由高到低顺序为 HiHi 组>HiHiLo 组>LoLo 组。说明 SCO2 基因对低氧训练具有敏感性,低氧训练对 SCO2 基因转录和蛋白表达的影响呈现趋同性。已有研究表明,运动诱导 COX I 基因表达存在肌纤维类型特异性及运动强度敏感性,对 COX I 基因表达的调控可发生在转录和转录后水平<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,HiHiLo 使大鼠骨骼肌 COX I 基因转录水平显著增加,而蛋白表达无显著性变化,HiHi 使 COX I 基因转录水平显著下降,蛋白表达显著增加。COX I mRNA 量由高至低顺序为 HiHiLo 组>LoLo 组>HiHi 组,蛋白表达量由高到低顺序为 HiHi 组>LoLo 组 = HiHiLo 组。说明低氧运动对 COX I 基因表达的调控可发生在转录和翻译水平。HiHiLo 使 COX I 基因转录水平显著增加,但其蛋白表达水平无显著性变化,这可能与蛋白合成过程受阻有关。HiHi 组 COX I 转录水平显著下降,但其蛋白表达水平显著升高,这可能是 COX 对 HiHi 产生的一种节省化的良好效应,在不增加甚至降低转录水平的情况下,增加原有 mRNA 蛋白合成过程,从而满足机体对能量的需求。其机制还有待进一步研究。另外,本研究结果还显示,HiHiLo 组的 P53、SCO2、COX I、GLS2 基因转录水平均显著高于 HiHi 组,然而,HiHiLo 组的上述指标蛋白表达水平均显著低于 HiHi 组,基因转录和蛋白表达不同步。提示,HiHiLo 即使上调 P53、SCO2、COX I、GLS2 基因转录水平,最终也无法提高其蛋白合成。本研究也仅仅在此做一实验性探究,其生物效应还有待进一步探讨。

线粒体是细胞能量产生的主要场所,其含有丰富的氧化

糖和脂肪的酶体系及呼吸链酶体系。已有研究表明,运动训练可提高大鼠骨骼肌线粒体柠檬酸合成酶(CS)、异柠檬酸脱氢酶(ICD)和  $\alpha$ -KGDHC 的活性,从而提高骨骼肌线粒体三羧酸循环功能<sup>[17]</sup>。10 名受试者缺氧运动腿肌肉 CS 活性升高,推测,高原训练后骨骼肌氧化酶的活性可得到改善<sup>[18]</sup>。模拟海拔 4 000m 的低氧训练,可提高大鼠骨骼肌苹果酸脱氢酶(MDH)的活性<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,大鼠骨骼肌线粒体  $\alpha$ -KGDHC 和细胞色素 c 氧化酶(COX)的活性,HiHiLo 显著升高,HiHi 显著降低,HiHiLo 显著高于 HiHi。 $\alpha$ -KGDHC 和 COX 活性由高到低顺序为 HiHiLo 组>LoLo 组>HiHi 组。由此可看出,在改善三羧酸循环和呼吸链功能方面,HiHiLo 要好于 HiHi,推测,这可能与 HiHiLo 氧供较 HiHi 好有关。本研究结果还显示,ATP synthase 总活性和特异性活性 HiHi 和 HiHiLo 均显著升高,HiHi 显著高于 HiHiLo,各组 ATP synthase 总活性和特异性活性由高到低顺序为 HiHi 组>HiHiLo 组>LoLo 组。HiHi  $\alpha$ -KGDHC 和 COX 活性均显著低于 HiHiLo 和 LoLo,而 ATP synthase 活性却显著高于 HiHiLo 和 LoLo,推测,这可能是由于 HiHi 造成机体缺氧程度较 HiHiLo 和 LoLo 严重,致使三羧酸循环和呼吸链功能降低,为满足机体对能量的需求从而代偿性的提高 ATP synthase 活性,其确切机制还有待进一步研究。以上结果提示,低氧训练可提高骨骼肌线粒体能量生成,但 HiHiLo 和 HiHi 影响位点不同,在提高线粒体能量代谢方面存在各自的局限性。另外也提示,通过运动训练提高机体的运动能力可能存在上限。

综上,HiHiLo 和 HiHi 对 p53、SCO2、COX I 和 GLS2 基因表达的调控可发生在转录和转译水平,且具有各自特点,对线粒体有氧代谢供能能力的影响也存在差异。

综上所述,就本研究方案而言,HiHiLo 上调骨骼肌 p53 及其调控的线粒体有氧代谢通路相关因子基因转录水平,提高骨骼肌线粒体有氧氧化供能能力。

## 【参考文献】

- [1] Harlow E, Williamson NM, Ralston R, *et al.* Molecular cloning and *in vitro* expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53 [J]. *Mol Cell Biol*, 1985, 5 (7): 1601-1610.
- [2] Soussi T, Caron de Fromental C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution [J]. *Oncogene*, 1990, 5(7): 945-952.
- [3] Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: The growing complexity of p53 [J]. *Cell*, 2009, 137 (3): 413-431.
- [4] Ma W, Sung HJ, Park JY, *et al.* A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2007, 39(3): 243-246.
- [5] 丁树哲, 陈彩珍, 漆正堂, 等. 不同强度训练对大鼠骨骼肌 p53 和细胞色素氧化酶 I 亚基基因和蛋白表达的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2008, 27(4): 454-457.

- [6] 邵月, 陈胜强, 漆正堂, 等. 不同训练方式对骨骼肌 p53 调节线粒体有氧呼吸轴 p53、SCO2 和 COX II 基因表达的影响[J]. 体育科学, 2010, 30(3): 46-52.
- [7] 李洁, 张耀斌. 不同低氧训练模式对大鼠力竭运动后骨骼肌线粒体抗氧化能力及呼吸链酶复合体活性的影响[J]. 生理学报, 2011, 63(1): 55-61.
- [8] 李洁, 张耀斌, 邢良美. 不同低氧训练模式对大鼠肝脏及肾脏组织内自由基代谢的影响[J]. 体育科学, 2008, 28(5): 56-61.
- [9] Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(2): 287-295.
- [10] Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, et al. Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18317.
- [11] Zhang XD, Qin ZH, Wang J, et al. The role of p53 in cell metabolism[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(9): 1208-1212.
- [12] Iwao C, Shidoji Y. Upregulation of energy metabolism-related, p53-target TIGAR and SCO2 in HuH-7 cells with p53 mutation by geranylgeranoic acid treatment[J]. *Biomed Res*, 2015, 36(6): 371-381.
- [13] Humpton TJ, Vousden KH. Regulation of cellular metabolism and hypoxia by p53[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(7): a026146- a026146.
- [14] Tong XM, Zhao FP, Thompson CB, et al. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(1): 32-37.
- [15] Saleem A, Hood DA. Acute exercise induces tumour suppressor protein p53 translocation to the mitochondria and promotes a p53-Tfam-mitochondrial DNA complex in skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2013, 591(14): 3625-3636.
- [16] 邵月. 不同运动方式对 P53、TIGAR、HKII 基因表达和乳酸含量的影响[J]. 北京体育大学学报, 2011, 34(5): 60-62.
- [17] 李洁, 杨静, 赵丽丽. 不同负荷运动训练对大鼠骨骼肌线粒体三羧酸循环的影响及其机制研究[J]. 武汉体育学院学报, 2019, 53(5): 88-94.
- [18] Melissa L, Macdougall J D, Tamopolsky MA, et al. Skeletal muscle adaptations to training under normobaric hypoxic versus normoxic conditions[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 1997, 29(2): 238-243.
- [19] 王荣辉, 刘桂华, 胡琪, 等. 低氧训练对大鼠骨骼肌乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶活性的影响[J]. 北京体育大学学报, 1998, 21(3): 31-33.

(上接第 140 页)

- [14] Zhang L, Li Y, Wang Q, Chen Z, et al. The PI3K subunits, P110 $\alpha$  and P110 $\beta$  are potential targets for overcoming P-gp and BCRP-mediated MDR in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 10-27.
- [15] Yip PY. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Trans Lung Cancer Res*, 2015, 4(2): 165-176.
- [16] Wang X, Li G. MicroRNA-16 functions as a tumor-suppressor gene in oral squamous cell carcinoma by targeting AKT3 and BCL2L2[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(12): 9447-9457.
- [17] Glab JA, Cao Z, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins, beyond the veil[J]. *Int Rev Cel Mol Bio*, 2020, 351: 1-22.
- [18] Kalashnikova I, Mazar J, Neal CJ, et al. Nanoparticle delivery of curcumin induces cellular hypoxia and ROS-mediated apoptosis via modulation of Bcl-2/Bax in human neuroblastoma[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(29): 10375-10387.