

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.18.003

艾灸 "足三里"、"关元" 对模拟低住高练大鼠诱导缺氧因子和有氧运动能力的影响 *

冉清智¹ 徐 艳² 何本祥^{2△} 陈晶晶¹ 肖 雪¹ 王 坤³

(1 成都体育学院运动医学与健康学院 四川 成都 610041; 2 成都体育学院附属体育医院 四川 成都 610041;

3 成都体育学院运动医学与健康研究所 四川 成都 610041)

摘要 目的: 探讨艾灸对模拟高原训练低住高练大鼠有氧运动能力的影响及作用机制。**方法:** 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 A、B、C、D 四组。A 组: 大鼠处于 $(13.5 \pm 0.5\%)O_2$ 环境自由游泳至溺水后, 取双侧 "足三里" "关元" 进行干预, 每穴每日灸 15 min; B 组: 训练方法同 A 组, 不予艾灸干预; C 组: 艾灸方法同 A 组, 不予训练; D 组: 不进行任何干预。测量大鼠体质量、四肢抓力、首次溺水时长、一次性力竭心电图及血红蛋白、促红细胞生成素、血管内皮生长因子含量, 观察骨骼肌组织形态, 检测希佩尔-林道蛋白(PVHL)、转录延伸蛋白转录延伸蛋白干预。测量、诱导缺氧因子 1(HIF-1 α)蛋白表达水平。**结果:** 各组未出现死亡等异常情况, 体质量稳定增加, 且组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 四肢抓力比较 $F_A>F_C>F_B>F_D$ ($P<0.05$); 首次溺水游泳时间中 A 组较 B、C、D 组时间延长 ($P<0.05$); ECG 显示 $HR_A<HR_C<HR_B<HR_D$ 、一次性力竭时间 $S_A<S_C<S_B<S_D$ 、心脏系数 $M_B>M_A>M_D>M_C$ 、T 波 $T_B>T_A$ 、ST 段 $ST_B>ST_A$ ($P<0.05$); HB 含量检测显示: 与 D 组比较, A 组最高, C 组其次, B 组最小 ($P<0.05$); 与 D 组比较, B 组 EPO、VEGF 降低 ($P<0.05$), C 组 EPO、VEGF 增高 ($P<0.05$), 与 A 组比较, B、C 组 EPO、VEGF 降低 ($P<0.05$); A 组骨骼肌较 B、C、D 三组排列整齐, 肌纤维直径均匀且排列整齐紧密。与 D 组比较, A 组大鼠 HIF-1 α 含量最高, B 组其次, C 组最小 ($P<0.05$); 与 D 组比较, A 组 PVHL、Elongin- β 表达最低, B 组其次, C 组最小 ($P<0.05$)。**结论:** 艾灸 "足三里" "关元" 可提升大鼠有氧运动能力; 其机制可能与改善模拟低住高练大鼠改善肌纤维结构紊乱和缓解心脏代偿有关。

关键词: 有氧运动; 艾灸; 高原训练; 诱导缺氧因子

中图分类号: R-33; R135.6 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2022)18-3413-07

Moxibustion "Zusanli" and "Guanyuan" Induced Hypoxia Factors in Simulated Rats Living Low and Practicing High and Aerobic Exercise Ability*

RAN Qing-zhi¹, XU Yan², HE Ben-xiang^{2△}, CHEN Jing-jing¹, XIAO Xue¹, WANG Kun³

(1 School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu, Sichuan, 610041, China;

2 Affiliated Sports Hospital of Chengdu Sport University, Chengdu, Sichuan, 610041, China;

3 Institute of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu, Sichuan, 610041, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of moxibustion on the aerobic exercise capacity of rats living low and training high under simulated altitude training and its mechanism. **Methods:** Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups: A, B, C, and D. Group A: Rats swim freely until they drown in $(13.5 \pm 0.5\%) O_2$ environment, and then take bilateral "Zusanli" and "Guanyuan" for intervention, moxibustion for each point for 15 minutes per day; Group B: same training method as group A, No moxibustion intervention; C group: the same moxibustion method as group A, no training; D group: no intervention. Measure rat body mass, limb grip, first drowning time, one-time exhaustion ECG and hemoglobin, erythropoietin, vascular endothelial growth factor content, observe skeletal muscle tissue morphology, detect Hipper-lindau protein (PVHL), Transcription elongation protein β (Elongin- β), induced hypoxia factor 1 (HIF-1 α) protein expression levels. **Results:** There were no deaths and other abnormalities in each group, and the body weight increased steadily, and the difference between the groups was not statistically significant ($P>0.05$); comparison of limb grip $F_A>F_C>F_B>F_D$ ($P<0.05$); first drowning The swimming time of group A was longer than that of group B ($P<0.05$); ECG showed $HR_A<HR_C<HR_B<HR_D$, one-time exhaustion time $S_A<S_C<S_B<S_D$, cardiac coefficient $M_B>M_A>M_D>M_C$, T wave $T_B>T_A$, ST segment $ST_B>ST_A$ ($P<0.05$); HB content detection showed: compared with group D, group A was the highest, group C was the second, group B was the smallest ($P<0.05$); compared with group D, group B EPO, VEGF decreased ($P<0.05$), EPO and VEGF increased in group C ($P<0.05$). Compared with group A, EPO and VEGF in group B and C decreased ($P<0.05$); skeletal muscle of group A was higher than that of B, C, D The three groups are arranged neatly, the diameter of the muscle fibers is uniform and the arrangement is neat and tight. Compared with group

* 基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFF0301704); 四川省大学生创新创业计划项目(S202010653070)

作者简介: 冉清智(2001-), 男, 本科在读, 研究方向: 运动健康促进方向

△ 通讯作者: 何本祥(1973-), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向: 中医骨伤科学方向, E-mail: 2975423854@qq.com

(收稿日期: 2021-12-28 接受日期: 2022-01-15)

D, group A had the highest HIF-1 α content, followed by group B, and group C was the smallest ($P<0.05$); compared with group D, group A had the lowest expression of PVHL and Elongin- β , group B was the second, and group C was the smallest ($P<0.05$). **Conclusion:** Moxibustion of Zusanli and Guanyuan can improve the aerobic exercise capacity of rats; the mechanism may be related to improving the muscle fiber structure disorder and relieving cardiac compensation in simulated low-living and high-training rats.

Key words: Aerobic exercise; Moxibustion; Altitude training; Induced hypoxia factor

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R135.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)18-3413-07

前言

高原训练是运动员在接受运动和缺氧的双重刺激下,通过改善机体运输和利用氧气的能力、骨骼肌代谢能力及心肺功能等,达到运动表现能力提升的目的^[1]。通过高原训练取得很多运动项目极限的突破,但其生理机制复杂,而研究大多集中于训练方法的改进与缺氧环境的适应^[2],很少从无兴奋性药物角度考虑提升运动效果,探寻合理利用缺氧刺激并提升高原训练效率已经成为医学研究的热点和难点之一。机体通过感知氧含量决定是否泛素化以降解诱导缺氧因子 1(Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha, HIF-1 α),其生理过程与希佩尔-林道(P-von Hippel-Lindau, PVHL)、转录延伸因子(Elongin- β)有关,缺氧环境下,通过下调 PVHL、Elongin- β 而积累 HIF-1 α ,高表达促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)促进红细胞生成及微血管的形成以适应缺氧环境^[3]。既往研究多着重于训练方法的改善^[4],因大多数药物存在兴奋性问题而较少涉及,艾灸有温阳扶正、通调气血之功,且无需内服等兴奋性问题,正治高原缺氧寒冷环境。已有实验^[5]显示艾灸能有效提高运动能力,缓解运动疲劳,但其作用机制复杂,较少从改善缺氧角度分析。艾灸可以提升高原训练大鼠的运动能力是通过提升肌力量、肌耐力及增加微血管循环实施的^[6],且既往研究^[7]处于行为学、形态学层面,缺少从低氧角度探寻其作用机制。

本研究通过观察艾灸对模拟低住高训大鼠抓力、溺水耐力、力竭心电图、股直肌切片和 HB、EPO、VEGF 分子含量及 PVHL、Elongin- β 、HIF-1 α 蛋白表达的影响,探讨艾灸提升高原训练中运动表现能力可能作用机制。研究假设:高原训练+艾灸组大鼠的运动能力较高原训练组大鼠运动能力增强。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只,8 周龄,体质量 (197.35 ± 0.24)g,成都达硕实验动物有限公司[动物许可证号:SCXK(川)2020-030]。饲养条件:温度 20℃-26℃,湿度 40%-50%,每日人工光源 12 h 昼夜交替。实验过程中对动物的处置遵循 2021 年 "Ethical issues in animal experimentation" 中实验动物使用及养护的伦理规定,本研究经成都体育学院动物实验伦理委员会批准(成体伦理(2021)52 号)。

1.2 主要仪器与试剂

EK518 体质量称重仪、YLS-13A 大鼠抓力测定仪、LS-20ECG 心电图测定仪,Awareness 公司;AR8100 氧气检测仪,希玛仪表有限责任公司;PL3508 型动物压力容积测定系统、SA101A 型动物跑台,江苏赛昂斯生物科技有限公司;

RM2235 石蜡包埋机、DM2750 电子显微镜、1530-800159 全自动 Multiskan Sky 酶标仪、KZ-II 高速组织研磨仪,Servicebio 公司;KDC-2046 低速冷冻离心机、DYCZ-24DN 双垂直电泳仪、DYCZ-40D 转印电泳仪,北京六一仪器厂。

艾条(汉医牌,2011 第 3310002 号);苏木素-伊红染液、血红蛋白试剂盒(南京建成,批号分别为 D006-1、A056-1-1);促红细胞生成素(EPO)酶联免疫吸附测定试剂盒、血管内皮生长因子(VEGF)酶联免疫吸附测定试剂盒,HIF-1 α 抗体(Elabscience 公司,批号分别为 E-ELR0007c、E-EL-R2603c、E-AB-22189);PVHL 抗体、Elongin- β 抗体(美国 Abcam,批号分别为 ab270968、ab168836);生物素标记羊抗兔 IgG,BCA 蛋白试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、ECL 显色液(上海碧云天,批号分别为 A0208、AF8352、AF0066、AF1186)。

1.3 分组与干预方法

将 40 只大鼠适应性喂养 1 w 后,按照随机数字表法分为 A 组(高原训练+艾灸组)、B 组(高原训练组)、C 组(艾灸组)、D 组(空白对照组),每组 10 只,分组成功后予以不同方法进行干预。A、B 组模拟高原训练(低住高练),将大鼠置于密闭玻璃缸内,调整氧气浓度为 15.75%(模拟海拔高度 2500 m)。大鼠在缸内自由游泳训练出现溺水即停止训练,每日 1 次,每 6 日休息 1 日,共持续 28 日。训练完毕后,迅速捞取大鼠置于常氧环境,擦拭吹干。A 组擦拭吹干后立即予以艾灸 "关元" 双侧 "足三里" 穴位,穴位定位参照《实验针灸学》^[4]取穴方法,每次 15 min,每日 1 次,每周 6 次。B 组擦拭吹干后不予以艾灸干预;C 组不予高原训练,仅予以艾灸干预且方法同 A 组,D 组不予任何干预。

1.4 观测指标与方法

1.4.1 体质量 每周第 7 d 空腹时使用实验动物称重仪称重并记录,观察体质量变化。

1.4.2 四肢抓力 称重完毕后使用动物抓力仪测定每只大鼠前肢、后肢及四肢总抓力,测量 3 次,取平均值记录,观察四肢肌力变化。

1.4.3 首次溺水时长 抓力测定完毕将大鼠置于拟密闭低氧玻璃缸内,调整氧气浓度后观察小鼠游泳至首次溺水(水下 5 s 不能上浮)的时间并记录,观测运动耐力变化。溺水标志:鼻尖以上部位(包括鼻尖)沉入水面下 5 s 仍不能返回水面时,被判定为溺水,大鼠首次溺水即停止计时并迅速捞起。

1.4.4 心电图 ECG 第 28 d 干预结束空腹 24 h 后,各组随机选取 4 只大鼠进行力竭跑台实验,速度 15 m/min、坡度 20° 电流强度 2.00 mA 进行一次性力竭实验,记录力竭时间后立即测定 4 组大鼠心电图、心率、ST 段、T 波、心脏指数。

1.4.5 制作光镜切片 ECG 测定完毕用 20% 乌拉坦(0.5 mL/100 g)腹腔注射麻醉,取双侧股直肌中段约 3 cm,HE 染色

制作光镜切片。股直肌切片于光学显微镜下行常规病理组织学观察,采用 Leica IM55 image manager V1.21 分析软件对切片进行筛图、保存与解析。

1.4.6 测定 HB、EPO、VEGF 含量 第 28 d 指标测定结束空腹 24 h 后,各组余下 6 只大鼠用 20% 乌拉坦(0.5 mL/100 g)腹腔注射麻醉,取颈静脉全血测定 HB 含量,分离血清测定 EPO、VEGF 含量。比色法测定 HB 含量,严格按照试剂盒操作说明操作,HB 含量=(测定 OD - 空白 OD)× 367.7。颈静脉取血法取抗凝静脉血 1.5 mL 室温静置 0.5 h,以 3000 r/min,离心 15 min,分离血清,设孔,加液,洗涤,加液覆膜,ELISA 法测定 EPO、VEGF 光密度 OD 值,操作严格按照试剂盒说明书操作,计算标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度。

1.4.7 蛋白印记法(Western blot)测定 HIF-1 α 、PVHL、Elongin-B 的表达水平 大鼠取血后予以空气栓塞法处死,取双侧股直肌中段 3 cm 置于 -80℃ 液氮罐待测。测定方法:取待测股直肌加 RIPA 冰上研磨裂解,4℃ 12000 r/min 离心 10 min,离心半径 6.2 cm,取上清,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,加入上样缓冲液及 RIPA 调整蛋白浓度后,100℃ 煮 5 min 变性。SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上,5% 牛奶室温封闭 1 h,加入一抗(β -actin 1:4000,其余抗体 1:1000),4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后,加入二抗(1:5000)室温孵育 1 h,显影曝光,使用 Image J(1.52a)软件分析目标条带的灰度值。

1.5 STRING 生物信息学分析

STRING(<https://string-db.org/>)生物信息学预测 HIF-1 α 相关因子,得到 HIF-1 α 信号通路 GO(Gene Ontology)分析结果,GO 分析从生理功能、生物途径以及定位情况对基因产物进行标准化描述,通过 GO 富集分析粗略了解相关基因富集的生物学功能和作用途径^[6]。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,样本均数方差齐性的比较采用单因素方差(One-way ANOVA)分析,各组间的单独效应统计方法使用单因素方差分析,若方差齐性时用 LSD 法进行检验;方差不齐时采用 Tamhane's T2 的统计结果进行分析, ($P < 0.05$)为差异具有统计学意义。

2 结果

各组动物在实验期间,一般情况良好,无死亡及不良事件发生。

2.1 各组大鼠体质量变化比较

各组大鼠体质量在观测点(0 d、7 d、14 d、21 d、28 d)均稳定上升见表 1,各组组内比较差异有统计学意义($P < 0.05$);组间比较差异无统计学意义见($P > 0.05$)。

表 1 大鼠体质量变化比较($\bar{x} \pm s$, g)

Table 1 Comparison of rat body weight changes ($\bar{x} \pm s$, g)

Groups	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A	201.1 $\pm$ 0.18	241.5 $\pm$ 0.41	291.8 $\pm$ 0.62	316.8 $\pm$ 0.28	330.7 $\pm$ 0.11
B	199.8 $\pm$ 0.23	251.4 $\pm$ 0.79	297.8 $\pm$ 0.85	327.1 $\pm$ 0.95	346.3 $\pm$ 0.21
C	203.4 $\pm$ 0.51	246.9 $\pm$ 0.84	306.4 $\pm$ 0.63	331.0 $\pm$ 0.38	358.8 $\pm$ 0.72
D	202.5 $\pm$ 0.28	253.6 $\pm$ 0.19	302.1 $\pm$ 0.84	329.6 $\pm$ 0.25	356.1 $\pm$ 0.62

2.2 各组大鼠前肢、后肢、四肢总抓力比较

各组大鼠前肢、后肢及四肢总抓力,测定结果如表 2。前肢、后肢及四肢总抓力 A 组最大,D 组最小,B、C 组介于二者之间。A 组与 B、C 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),B、C 组

与 D 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),B、C 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明高原训练、艾灸均能增强大鼠四肢肌力,尤以二者结合效果明显。

表 2 各组大鼠前肢、后肢、四肢总抓力比较($\bar{x} \pm s$, g)

Table 2 Comparison of total grasping power of forelimbs, hindlimbs and limbs of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, g)

Groups	The first week			The second week			The third week			The fourth week		
	F	H	L	F	H	L	F	H	L	F	H	L
A	318.56 $\pm$ 0.35	302.24 $\pm$ 0.87	698.77 $\pm$ 0.30	488.78 $\pm$ 0.36	398.49 $\pm$ 0.41	975.23 $\pm$ 0.82	732.26 $\pm$ 0.87	549.26 $\pm$ 0.43	1401.26 $\pm$ 0.20	798.26 $\pm$ 0.21 [△]	613.41 $\pm$ 0.87 [△]	1621.28 $\pm$ 0.34 [△]
B	328.99 $\pm$ 0.34	299.79 $\pm$ 0.45	682.31 $\pm$ 0.92	475.25 $\pm$ 0.98	401.26 $\pm$ 0.73	916.71 $\pm$ 0.19	654.90 $\pm$ 0.62	517.31 $\pm$ 0.93	1299.85 $\pm$ 0.47	756.75 $\pm$ 0.62 ^{*△}	529.19 $\pm$ 0.71 ^{*△}	1501.18 $\pm$ 0.66 ^{*△}
C	333.45 $\pm$ 0.63	301.23 $\pm$ 0.89	659.77 $\pm$ 0.20	455.36 $\pm$ 0.21	388.83 $\pm$ 0.64	701.74 $\pm$ 0.88	667.98 $\pm$ 0.82	508.92 $\pm$ 0.94	1308.26 $\pm$ 0.66	754.13 $\pm$ 0.87 ^{*△}	540.44 $\pm$ 0.75 ^{*△}	1488.76 $\pm$ 0.23 ^{*△}
D	327.34 $\pm$ 0.11	299.87 $\pm$ 0.49	643.92 $\pm$ 0.40	455.36 $\pm$ 0.21	388.83 $\pm$ 0.64	701.74 $\pm$ 0.88	478.88 $\pm$ 0.23	433.71 $\pm$ 0.09	898.78 $\pm$ 0.37	513.92 $\pm$ 0.91 ^{*#}	498.51 $\pm$ 0.92 ^{*#}	1015.54 $\pm$ 0.81 ^{*#}

Note: *Compared with group A, $P < 0.05$; [△]compared with group B and C, $P < 0.05$; [#] compared with group D, $P < 0.05$. F replace forelimb; H replace hind legs; L replace Limbs

2.3 各组首次溺水时长比较

各组大鼠首次溺水时长见表 3,A 组时长最长,D 组最短, B、C 组介于二者之间。B、C 组与 D 组比较,差异有统计学意义

($P<0.05$),A 组与 B、C 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),B、C 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。高原训练、艾灸二者联合作用优于单一造模。

表 3 各组大鼠首次溺亡时间($\bar{x} \pm s$, min)
Table 3 The first drowning time of each group of rats ($\bar{x} \pm s$, min)

Groups	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A	5.90	7.51 [△] #	12.79 [△] #	17.36 [△] #	25.07 [△] #
B	6.46	7.11	11.31 ^{*△}	15.18 ^{*△}	19.72 ^{*△}
C	6.02	7.23	11.25 ^{*△}	16.21 ^{*△}	21.78 ^{*△}
D	5.99	6.46 ^{**}	7.67 ^{**}	8.55 ^{**}	9.79 ^{**}

Note: *Compared with group A, $P<0.05$; #compared with group B and C, $P<0.05$; [△] compared with group D, $P<0.05$.

2.4 各组心电图比较

各组大鼠力竭后立即测定心电图(ECG)见表 4,A 组心率最低,D 组最高,B、C 组介于二者之间。A 组大鼠力竭时间最长,C 组次之,B 组第三,D 组最短, 各组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。B 组大鼠心脏系数最大,B 组与 A、C、D 组差异均有统计学意义 ($P<0.05$),A、C、D 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。B 组 T 波与 ST 段最大,D 组最小,A、C 组介于二者

之间。A、C 组与 D 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),B 组与 A、C 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),A、C 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。B、C 组大鼠力竭运动出现心力衰竭征象, A、D 组大鼠未出现心力衰竭,A 组心脏供血能力强于 B、C 组, 高原训练结合艾灸能增强大鼠心脏供血能力并提升有氧运动能力,且缓解心脏过度代偿。

表 4 一次性力竭指标汇总($\bar{x} \pm s$)
Table 4 One-time exhaustion index summary ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Heart rate /min ($\bar{x} \pm s$)	Exhausted time /S ($\bar{x} \pm s$)	Cardiac coefficient ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) ($\bar{x} \pm s$)	ECG wave ($\bar{x} \pm s$)	
				T wave	ST segment
A	369 $\pm$ 2 [△] #	4831.15 $\pm$ 1.12 [△] #	2.4673 $\pm$ 0.024	0.069 $\pm$ 0.059 [△] #	0.044 $\pm$ 0.012 [△] #
B	427 $\pm$ 3 ^{*△}	4227.34 $\pm$ 1.67 ^{*△}	3.1232 $\pm$ 0.075 ^{*△}	0.163 $\pm$ 0.013 ^{*△}	0.094 $\pm$ 0.007 ^{*△}
C	406 $\pm$ 2 ^{*△}	4327.85 $\pm$ 1.21 ^{*△}	2.7632 $\pm$ 0.078	0.073 $\pm$ 0.015 ^{*△}	0.053 $\pm$ 0.037 ^{*△}
D	432 $\pm$ 5 ^{**}	3721.15 $\pm$ 1.49 ^{**}	2.7645 $\pm$ 0.053	0.061 $\pm$ 0.024 ^{**}	0.041 $\pm$ 0.023 ^{**}

Note: *Compared with group A, $P<0.05$; #compared with group B and C, $P<0.05$; [△] compared with group D, $P<0.05$.

2.5 各组大鼠股直肌组织形态学比较

光镜切片观察结果见图 1,观察 HE 染色的股直肌切片。A 组:骨骼肌细胞排列整齐,肌纤维直径大小均匀,肌纤维排列整齐紧密。B 组:肌纤维结构紊乱、断裂、松散,肌纤维间出现间

隙、分界不清,见肌纤维碎片,肌纤维直径大小差异较大,边界圆润,角化肌纤维,细胞核中心化。C 组骨骼肌细胞排列较整齐,肌纤维直径大小均匀,细胞膜清晰,肌纤维排列整齐,肌纤维排列较为紧密。D 组肌纤维间隙均匀,排列整齐。

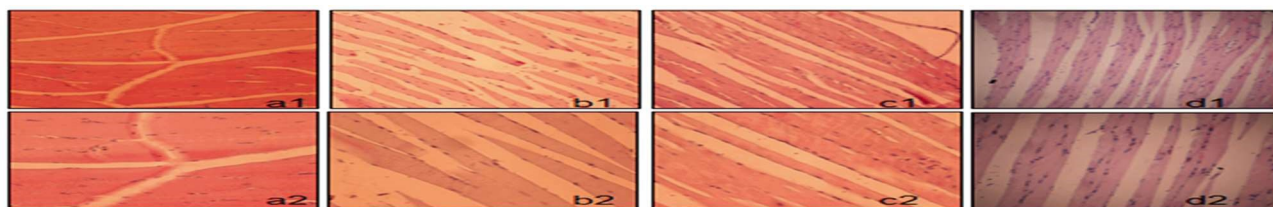


图 1 大鼠股直肌 HE 染色

Fig.1 HE staining of rat rectus femoris

注:a1,b1,c1,d1(HE 染色, $\times 10$);a2,b2,c2,d2(HE 染色, $\times 20$)

Note: a1, b1, c1, d1 (HE staining, $\times 10$); a2, b2, c2, d2 (HE staining, $\times 20$)

2.6 各组大鼠 HB、EPO、VEGF 含量比较

各组大鼠 HB、EPO、VEGF 含量比较见表 5。A 组 HB、EPO、

VEGF 含量最高,D 组含量最低,B、C 组介于二者之间。A 组与 B、C 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);B、C 组比较,差异无

统计学意义($P>0.05$)。高原训练、艾灸单一干预较空白对照大鼠 果更为明显。
均增强大鼠有氧运动能力,但联合使用对有氧运动能力提升效

表 5 各组大鼠 HB、EPO、VEGF 含量比较

Table 5 Comparison of the contents of HB, EPO and VEGF in each group of rats

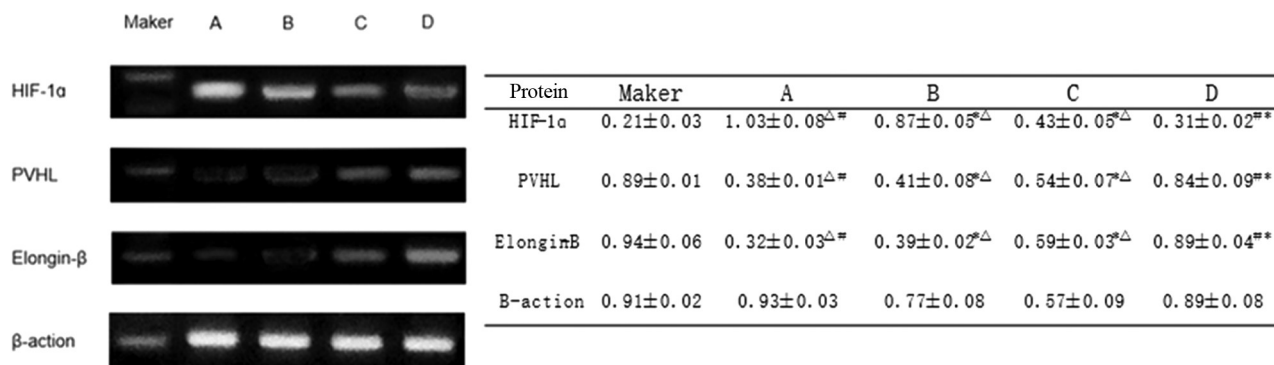
Groups	HB(g/L)	EPO(U·L ⁻¹)	VEGF(pg/mL)
A	203.995± 0.345 [△] #	45.69± 0.24 [△] #	7.2211± 0.1238 [△] #
B	133.401± 0.786 ^{*△}	38.83± 0.11 ^{*△}	6.9995± 0.8736 ^{*△}
C	187.141± 0.992 ^{*△}	40.62± 0.98 ^{*△}	6.2975± 0.9807 ^{*△}
D	101.999± 0.904 ^{**}	33.76± 0.06 ^{**}	6.1076± 0.1384 ^{**}

Note: *Compared with group A, $P<0.05$; #compared with group B and C, $P<0.05$; [△] compared with group D, $P<0.05$.

2.7 各组大鼠肾脏中 PVHL、Elongin-B、HIF- I α 表达水平比较

各组大鼠肾脏组织 PVHL、Elongin-B、HIF- I α 蛋白电泳见图 2。与 D 组比较,A 组、B 组、C 组大鼠肾脏中 HIF- I α 蛋白表达显著增高($P<0.05$),PVHL、Elongin-B 蛋白表达降低($P<0.05$)。B、C 组 PVHL、Elongin- β 、HIF- I α 表达比较无统计学意

义 ($P>0.05$); 与 B 组比较,A 组大鼠肾脏中 HIF- I α 表达升高 ($P<0.05$),PVHL、Elongin-B 表达降低($P<0.05$);与 C 组比较,A 组 HIF- I α 蛋白表达增高($P<0.05$),PVHL、Elongin-B 蛋白表达降低($P<0.05$)。

图 2 各组大鼠 PVHL、Elongin-B、HIF- I α 表达水平及 western blot 条带图($\bar{x} \pm s$)Fig.2 The expression levels of PVHL, Elongin-B, HIF- I α and western blot strips of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Note: *Compared with group A, $P<0.05$; #compared with group B and C, $P<0.05$; [△] compared with group D, $P<0.05$.

2.8 STRING 生物信息学

STRING 生物信息学方法分析 HIF- I α 生物学功能和细胞通路见图 3。结果显示:上游 PVHL 蛋白、Elongin-B 蛋白通

过 HIF- I α 信号分子与下游 EPO、VEGF 因子存在基因互作关系。

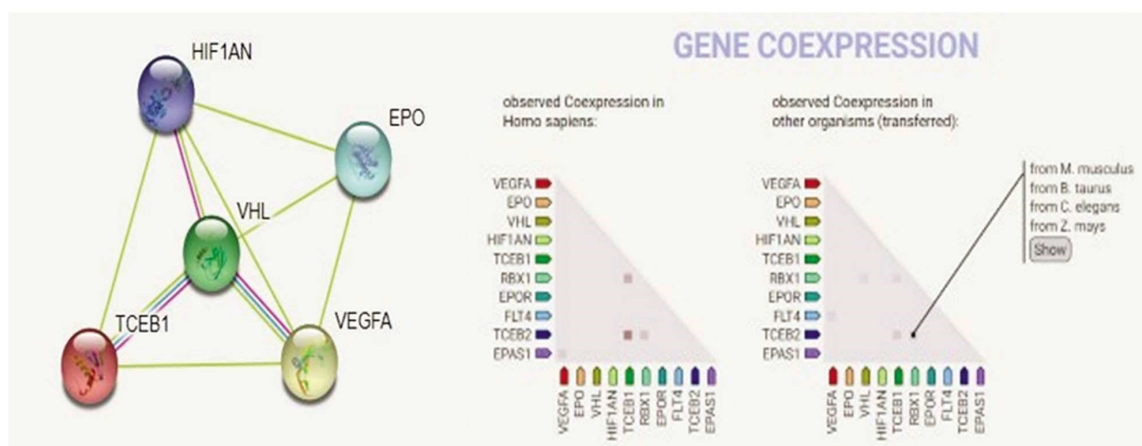


图 3 STRING 蛋白互作分析图

Fig.3 STRING protein interaction analysis diagram

3 讨论

这项研究是探寻艾灸对模拟高原训练模型大鼠有氧运动能力的影响及作用机制,我们验证了研究假设(高原训练+艾灸组大鼠的运动能力较高原训练组大鼠运动能力增强)。主要发现:保持体质量稳定的情况下,高原训练+艾灸组与高原训练组、艾灸组大鼠的四肢抓力、心脏供血能力、首次溺水时长、力竭时长均有效改善,说明有氧运动能力提升。

3.1 艾灸对模拟低住高练大鼠有氧运动能力肌力的影响

肌耐力、爆发力、肌肉形态是评价肌肉力量的公认指标^[8],同时也直接反应了机体有氧运动能力。本文数据显示:高原训练、艾灸及联合干预均有效提升大鼠肌力,但联合干预较单一艾灸、高原训练效果更为明显。艾灸主要通过热敏刺激肌表皮细胞以提高运氧能力来提高有氧运动能力的^[9],高原训练通过缺氧、训练双重刺激机体产生一系列生理生化反应以激发运动潜能的^[10]。切片显示联合干预在改善肌纤维结构紊乱优于单纯艾灸或高原训练干预^[11],这说明艾灸与高原训练结合在改善大鼠有氧运动能力上可能具有互补效应。

3.2 艾灸对模拟低住高练大鼠心脏功能的影响

适宜负荷运动可提升运动能力^[12],重塑心脏结构与功能,以心肌毛细血管密度增加,心肌纤维增粗,心脏收缩力增加形成"运动性心脏"^[13]。然而,过度负荷运动会引起心脏代偿,产生运动性心脏损伤(exercise-induced myocardial injury, EIMI)^[14],并且可能导致运动性心律失常等严重影响训练效果^[15]。本研究在干预完成后,选取大鼠造取一次性力竭模型,观察各组大鼠力竭情况下心脏功能情况。数据显示相同速度频率下联合干预较单一艾灸、高原训练大鼠力竭时间更长,且心率最低。对照组、高原训练组大鼠心脏指数较大,且测定其心电图ST段倒置,T波压低,反映心脏过度代偿而导致心率失常。艾灸组、艾灸+高原训练组心脏指数、T波、ST段属于正常范围内波动,提示艾灸可能存在缓解心脏代偿的作用机制,有待后续进一步研究。

3.3 艾灸对模拟低住高练大鼠的中医理论作用机理

寒冷、缺氧分别属于中医学"六淫外邪""体虚"范畴^[16]。长期高原训练中机体表卫不固,寒邪侵袭腠理经络,影响骨骼肌、筋膜、关节的活动,寒邪内侵心阳,心阳虚衰而致血虚,侵袭肾阳致肾不纳气而呼吸浅表,且肾主闭藏,肾阳不足而肾精流失无法滋养脏腑经脉,以外寒侵袭、阴盛阳虚为本,故温阳化气、祛寒通经是改善高原训练的中医基本治则^[17]。《说文解字》^[18]曰:"灸,灼也"。艾灸即用点燃之艾刺激穴位达到治病补益之功。艾叶性温,有温通散寒、通经活络之功。《素问·异法方宜论》云:"北方者,天地所闭藏之域也,其地高陵居,……藏寒生满病,其治宜灸^[19]。"艾灸以高温、药熏作用于经穴穴位,补阳祛寒,阳化气,气卫腠理肌表以抵寒邪。另一功效祛寒通经,心肾阳气得以固护,经络得以疏通,增强代谢防治过度缺氧。本研究^[20]根据"寒者热之,虚者补之"的原则,证明了艾灸干预高原训练大鼠相关作用机制。

3.4 艾灸对模拟低住高练大鼠股直肌 HIF-1 α 信号的影响

高原训练处于高海拔缺氧寒冷环境,利用缺氧刺激机体可以产生一系列抗缺氧生理生化反应,刺激机体代偿的同时激发

机体能量代谢及运动潜能,但因身体差异及耐受性不同产生高原训练综合症而影响训练成绩比比皆是^[21]。诱导缺氧因子 HIF-1 α 可协调机体一系列抗缺氧生理生化反应,是全身氧代谢的枢纽和标准^[22],常氧条件下 PVHL 高表达形成 E3 泛素-蛋白酶,迅速降解 HIF-1 α ^[23],当氧气含量不足时,染色体 3p25-26 的 VHL 基因产物 PVHL 的合成减缓^[24],Elongin- β 缺氧下低表达,导致体内 HIF-1 α 降解速率缓慢,HIF-1 α 的积累。HIF-1 α 与缺氧基因结合^[25],共同作用于血管内皮细胞表面 VEGF 受体及自身磷酸化激活有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK),促进体内 VEGF 实现内皮细胞的增生,利于新生毛细血管的形成和生长,使机体更好的适应外部缺氧环境,以缓解体内缺氧状态^[26]。HIF-1 α 还可以大量合成与分泌 EPO,提高血液携氧能力,并且 EPO 含量的增加取决于缺氧程度及暴露时间^[27]。实验结果显示:高原训练组大鼠 PVHL、Elongin-B 蛋白表达低于空白组,HIF-1 α 、EPO、VEGF 表达高于空白组,与文献一致^[28],说明缺氧环境下 PVHL、Elongin-B、HIF-1 α 参与大鼠运动能力改变。高原训练+艾灸组相比于高原训练组大鼠 PVHL、Elongin-B 蛋白表达降低明显,HIF-1 α 、EPO、VEGF 表达升高显著,说明艾灸结合高原训练可有效增强大鼠有氧运动能力,可能通过抑制 PVHL、Elongin-B 水平起效。

值得注意的是,艾灸组大鼠运动能力几乎与高原训练组大鼠持平,但其 PVHL、Elongin-B、HIF-1 α 表达水平与空白组保持一致,提示缺氧与常氧环境下艾灸提升运动能力作用机制不同,有待后续实验研究。研究局限性:本研究未设置不同氧含量下艾灸对大鼠运动能力的影响是否均通过调控 PVHL、Elongin-B、HIF-1 α 蛋白以改善运动能力,有待后续深入研究。

4 结论

高原训练、艾灸均有效增强机体有氧运动能力,艾灸联合高原训练效果更佳,其机制可能抑制上游 PVHL、Elongin-B 蛋白表达,调控 HIF-1 α 信号高表达,促进下游 HB、EPO、VEGF 合成而提高模型大鼠有氧运动能力。

参考文献(References)

- [1] Khodae M, Grothe HL, Seyfert JH. Athletes at High Altitude [J]. Sports Health, 2016, 8(2): 126-32
- [2] Sutehall S, Muniz-Pardos B, Lima G. Altitude Training and Recombinant Human Erythropoietin: Considerations for Doping Detection [J]. Curr Sports Med Rep, 2019, 18(4): 97-104
- [3] Quindry J, Dumke C, Slivka D, et al. Impact of extreme exercise at high altitude on oxidative stress in humans [J]. Physiol, 2016, 594(18): 5093-104
- [4] Lindholm ME, Rundqvist H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise [J]. Exp Physiol, 2016, 101(1): 28-32
- [5] Yu SG, Jing XH, Tang Y. Acupuncture and Moxibustion and Immunity: the Actuality and Future [J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2018, 43(12): 747-753
- [6] Seki Shigenori, Takahashi Tomohiko. Reduction of open string amplitudes by mostly BRST exact operators [J]. Physics Letters B, 2021: 822
- [7] Huang K, Liang S, Sun Z, et al. Startup mechanism of moxibustion warming and dredging function [J]. Zhong Guo Zhen Jiu, 2017, 37(9): 1023-1026

- [8] Wang DXM, Yao J, Zirek Y, et al. Muscle mass, strength, and physical performance predicting activities of daily living: a meta-analysis[J]. *Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2020, 11(1): 3-25
- [9] Wankhede S, Langade D, Joshi K, et al. Examining the effect of Withania somnifera supplementation on muscle strength and recovery: a randomized controlled trial[J]. *Int Soc Sports Nutr*, 2015: 12-43
- [10] Benfica PDA, Aguiar LT, Brito SAF, et al. Reference values for muscle strength: a systematic review with a descriptive meta-analysis[J]. *Braz J Phys Ther*, 2018, 22(5): 355-369
- [11] Grgic J, Garofolini A, Orazem J, et al. Effects of Resistance Training on Muscle Size and Strength in Very Elderly Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials [J]. *Sports Med*, 2020, 50(11): 1983-1999
- [12] Scott BR, Duthie GM, Thornton HR, et al. Training Monitoring for Resistance Exercise: Theory and Applications [J]. *Sports Med*, 2016, 46(5): 687-698
- [13] Morán-Navarro R, Martínez-Cava A, Escribano-Peñas P, et al. Load-velocity relationship of the deadlift exercise[J]. *Eur J Sport Sci*, 2021, 21(5): 678-684
- [14] Kreider RB, Kalman DS, Antonio J, et al. International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine [J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2017: 14-18
- [15] Thorpe RT, Atkinson G, Drust B, et al. Monitoring Fatigue Status in Elite Team-Sport Athletes: Implications for Practice [J]. *Int J Sports Physiol Perform*, 2017, 12(Suppl 2): S227-S234
- [16] Liu BY, Yang XY, Wu XD. Defining Acupuncture-Moxibustion: A Delphi Study Protocol[J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(4): 260-264
- [17] Sun C, Li Y, Kuang J, et al. The thermal performance of biological tissue under moxibustion therapy[J]. *Therm Biol*, 2019, 83: 103-111
- [18] Zhang YH, Liu J, Li XF, et al. Advances of studies on acupuncture and moxibustion for exercise-induced fatigue[J]. *Zhong Guo Zhen Jiu*, 2010, 30(3): 261-264
- [19] Stellingwerff T, Peeling P, Garvican-Lewis LA, et al. Nutrition and Altitude: Strategies to Enhance Adaptation, Improve Performance and Maintain Health: A Narrative Review[J]. *Sports Med*, 2019, 49(Suppl 2): 169-184
- [20] Gu YH, Ren JN, Wu YC. Influence of acupuncture on the motor ability in training-induced fatigue mice[J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2010, 35(5): 359-362
- [21] Flaherty G, O'Connor R, Johnston N. Altitude training for elite endurance athletes: A review for the travel medicine practitioner [J]. *Travel Med Infect Dis*, 2016, 14(3): 200-211
- [22] Khacho M, Lee S. Subcellular dynamics of the VHL tumor suppressor: on the move for HIF-1 α degradation [J]. *Future Oncol*, 2009, 5(1): 85-95
- [23] Devraj G, Beerlage C, Brüne B, et al. Hypoxia and HIF-1 α activation in bacterial infections. *Microbes Infect*[J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2017, 19(3): 144-156
- [24] Yue-Hong Liu, Chang Guo, Yi-Qiong Sun, et al. Polymorphisms in HIF-1 gene are not associated with diabetic retinopathy in China[J]. *World Journal of Diabetes*, 2021, 12(08): 1304-1311
- [25] Zhang Z, Huang Q, Wang Z. Elongin B is a binding partner of the male germ cell nuclear speckle protein sperm-associated antigen 16S (SPAG16S) and is regulated post-transcriptionally in the testis[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2019, 31(5): 962-971
- [26] Nicolas S, Abdellatef S, Haddad MA, et al. Hypoxia and EGF Stimulation Regulate VEGF Expression in Human Glioblastoma Multiforme (GBM) Cells by Differential Regulation of the PI3K/Rho-GTPase and MAPK Pathways[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1397
- [27] Lappin TR, Lee FS. Update on mutations in the HIF: EPO pathway and their role in erythrocytosis[J]. *Blood Rev*, 2019, 6(10): 37
- [28] De Smet Stefan, D'Hulst Gommaar, Poffé Chiel, et al. High-intensity interval training in hypoxia does not affect muscle HIF responses to acute hypoxia in humans [J]. *European journal of applied physiology*, 2018, 118(4): 847-862