

丙二醛对大鼠海马神经元结构的破坏 和钙离子稳态的影响

蔡建光¹, 汤 华², 唐 晖¹, 印大中³

(1. 湖南科技大学 体育学院, 中国湖南 湘潭 410200; 2. 湖南城市学院 体育系, 中国湖南 益阳 410300;
3. 湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘 要: 脂质过氧化中间产物丙二醛(Malondialdehyde, MDA)在生物体内表现了广泛的生物毒性, MDA 也是机体过度训练和运动性疲劳的重要生理指标. 采用光学显微镜和透射式电子显微镜观察不同浓度 MDA 作用后海马神经元形态和超微结构的变化, 并采用荧光分光光度法测定原代培养的海马神经元中 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化和胞质游离钙离子水平的变化, 探讨 MDA 对海马神经元形态和结构上的破坏及神经元钙离子稳态的影响. 在光镜下可观察到 MDA 作用下神经元突触变短, 胞体肿胀, 出现细胞死亡或凋亡的形态特征; 在电镜下可观察到线粒体结构的明显破坏, 内膜上的嵴颗粒减少或消失; 同时 MDA 还通过抑制质膜 Ca^{2+} -ATPase 的活性和其它的途径, 破坏神经元胞质游离 Ca^{2+} 稳态. 结果表明, MDA 可通过破坏海马神经元的结构和影响胞质中钙离子稳态, 破坏神经元的生理功能, 在机体运动性中枢疲劳形成中可能发挥重要作用.

关键词: 丙二醛; 运动性疲劳; 海马神经元; 钙离子稳态

中图分类号: Q422

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)04-0283-07

The Effects of Malondialdehyde on the Cellular Structures of Hippocampal Neurons and Its Calcium Homeostasis in SD Rats

CAI Jian-guang¹, TANG Hua², TANG Hui¹, YIN Da-zhong³

(1. School of Physical Education, Hunan University of Science & Technology, Xiangtan 410200, Hunan, China; 2. Department of Physical Education, Hunan City University, Yiyang 413000, Hunan, China; 3. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: As a useful physiological index for over trained or exercise-induced fatigue, there were kinds of biological toxicity of malondialdehyde (MDA) produced in the process of lipid peroxidation. In this investigation, in order to observe the effects of MDA on the damages of hippocampal neuronal shapes and ultra-structure, and examine the calcium homeostasis in primary culture neurons, the microscope and transmission electronic microscope were applied for observing the changes of shapes and the transforms of ultra-structures, and also, the fluorospectrophotometer was used to determine the concentration of cytosolic free calcium in the system of primary culture hippocampal neurons of SD rats. The microphotographic study clearly demonstrated that the hippocampal neurons became gradually damaged following exposure to different concentrations of MDA. And also, the ultra-structures were observed that the architectures of mitochondria were deformed and their cristae were decreased or disappeared with the increasing of MDA concentration. Further study indicated that the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) activity was inhibited by MDA in a concentration (1.0~1 000 $\mu\text{mol/L}$) and time (30 min) dependent manner, hence, induced to damage the calcium homeostasis in primary culture hippocampal neurons. It was hinted that MDA was one of the important ele-

收稿日期: 2011-05-09; 修回日期: 2011-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971413); 湖南科技大学博士启动基金资助项目(E51090)

作者简介: 蔡建光(1970-), 男, 湖南益阳人, 湖南科技大学副研究员, 博士, 主要从事运动性疲劳方面的研究, E-mail: pumacai@163.com.

ments induced to exercise-induced fatigue by damaging the structures of hippocampal neuron and disturbance of Ca^{2+} homeostasis.

Key words: malondialdehyde; exercise-induced fatigue; hippocampal neurons; calcium homeostasis

(*Life Science Research*, 2011, 15(4): 283~289)

在剧烈运动或者大负荷长时间训练中, 机体运动量的加大, 呼吸活动及物质代谢和能量代谢加速, 自由基水平升高, 自由基介导的脂质过氧化速率加快, 脂质过氧化过程中会产生以丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 为代表的许多含有 α - β -不饱和醛酮类物质 (也叫 TBARS), 这些物质在机体的衰老和疲劳过程中有重要的毒副作用^[1-3]. 在科学研究和临床中也常以 MDA 作为氧化应激和脂质过氧化的重要生理指标. 由于 MDA 是伴随机体在物质和能量代谢过程中形成的副产物, 因此机体 MDA 容易累积在心、脑、肝、肾和剧烈运动时的骨骼肌等器官. 已有的研究表明, MDA 对机体器官和体外培养的细胞都有广泛的生物毒副作用: 陈菁菁等进行的大鼠水迷宫实验表明, MDA 能降低大鼠的学习记忆能力^[4], 彭密军等以离体红细胞为研究模型, 结果表明 MDA 能破坏红细胞的形态结构并改变系统的粘度^[5], 刘慧敏等的研究显示 MDA 能缩短大鼠游泳力竭运动的时间^[6]. 目前关于运动性疲劳的生理生化机制有多种, 归纳起来一是代谢产物对机体外周即运动器官的功能损伤作用, 即运动性疲劳的外周机制; 二是神经中枢在运动过程中代谢的混乱所致的运动能力下降, 即运动性疲劳的中枢机制. 体外大量研究表明, MDA 作为一种含有两个活性醛基的双功能能量代谢副产物, 能与多种含有氨基的神经递质作用, 如多巴胺^[7]、组胺^[8]、5-羟色胺、美拉托宁^[9](褪黑素, 俗称脑白金)等, 还能与抗运动性疲劳的氨基酸或多肽作用^[10], 如精氨酸、赖氨酸、牛磺酸^[11]、肌肽^[12]等. 由于 MDA 的高生物活性, 在剧烈运动中产生的大量 MDA 必然会对机体神经中枢和外周都产生不利影响, 导致机体运动功能的下降. 钙离子是与机体运动和许多其它生理功能正常发挥密切相关的离子, 神经元钙离子稳态异常必然导致神经冲动传递障碍和机体运动能力的下降. 本研究旨在观察不同度 MDA 对原代培养的海马神经元在光学显微结构水平和超微结构水平下的形态变化及对神经元中钙离子稳态的影响, 从而探讨 MDA 在机体运动性中枢疲劳发生中可能的作用及其机制.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

TMP(1, 1, 3, 3-四甲基丙烷)、HEPES 缓冲液、Fur-2/AM、HBSS 缓冲液、胎牛血清、胰蛋白酶均购自 Sigma 公司, lowery 法蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司, Ca^{2+} -ATPase 活性测定试剂盒购自南京建成生物工程公司. Neurobasal medium、B-27 购自 Invitrogen 公司, Krebs 培养液和其它常用试剂购自上海生工生物工程公司. MDA 母液的配制按照 Kikugawa 等^[13]的方法进行, 即取 0.845 mL TMP, 加入 2 mL 1.0 mol/L HCl, 40 °C 水浴振荡 2.5 min, 再用 6.0 mol/L 的 NaOH 调节至 pH 7.4, 用 0.1 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液定容至 50 mL, 得到 1 mol/L 的 MDA. 配制的母液按照实验要求用磷酸缓冲液稀释成相应浓度. 每次实验所需 MDA 都为新鲜配制, 过滤除菌后使用.

主要仪器有透射式扫描电子显微镜(Jem1200 型, 日本 JEOL 公司), 荧光分光光度计 (LS50 型, 美国 PE 公司).

1.2 海马神经元原代培养

实验动物购自中南大学湘雅医学院实验动物中心. 取新生 2~4 d SD 大鼠, 用 CO_2 麻醉后迅速解剖分离大脑, 将大脑放在预置有雪花冰的盘子中分离脑双侧新月形海马组织. 海马神经元的原代培养方法按照 Brewer 等^[14]的方法进行. 即新生的 SD 大鼠用 CO_2 麻醉后迅速解剖分离大脑, 将大脑放置在预置有雪花冰的盘子中剔除脑膜和血管, 分离出双侧新月形海马, 用冲洗缓冲液冲洗干净血污, 捣碎海马组织后放入含有 0.03% 的胰酶的 HBSS 缓冲液中置 37 °C、5 % CO_2 培养箱中消化 15 min 后, 放入预包有多聚 L-赖氨酸的培养板中并加入预培养基(含 5%胎牛血清, 2% B27, 0.5 mmol/L 谷胺酰胺, 25 μ mol/L 谷氨酸, 50 U/mL 青霉素, 50 mg/L 链霉素). 继续放入培养箱中至少 4 h 后, 更换无血清培养基含 0.5 mmol/L 谷胺酰胺, 2% B27, 50 U/mL 青霉素, 50 mg/L 链霉素. 用上述培养基每周 2 次, 每次更换 1/3 培养基. 海马神经元培养大约 10 d 后开始使用.

1.3 海马组织电镜样品制备

1.0、10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$ MDA 经腹腔注射 SD 大鼠 10 d 后(每天 1 次),采取上述方法分离获取海马组织,固定于 3%多聚甲醛的固定液中.样品经丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋,60 $^{\circ}\text{C}$ (36 h)烤箱内烘烤后,组织块聚合硬化,形成包埋块.行常规铅铀双染色,每份标本制作 5 张铜网,每张铜网沿左上向右下方向移动并随机拍摄 80 000 倍显微照片.

1.4 神经元质膜的制备

按照 Michaelis 等^[15]提供的方法进行.断头处死新生的 SD 大鼠后,快速分离出大鼠大脑部分,将分离获得的海马组织置于预先准备好的装有碎冰的解剖盘中快速分离出新月形海马组织.用预先准备好的冰冷的海马组织冲洗缓冲液冲洗干净附着在海马组织上的血污.把冲洗干净的海马组织加入冰冷的 10 倍体积的匀浆缓冲液置于冰浴中,电动匀浆(10 000 r/min)持续 20 s,间隔 1 min,重复 3 次.匀浆物在高速冷冻离心机中以 4 $^{\circ}\text{C}$, 1 000 g 离心 10 min,重复离心一次后合并收集 2 次离心的上清液.再次以 30 000 g 离心 30 min,去上清;在沉淀中加入预冷 20 倍体积的低渗缓冲液振荡混匀于冰箱中静置 3~5 h 后,以 30 000 g 离心 30 min 后,收集沉淀加入适量的突触膜悬浮缓冲液中.溶液中突触蛋白的含量用 Lowry 法测定,将溶液蛋白含量调整到 2 g/L,小份分装于 70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.5 神经元质膜 Ca^{2+} -ATPase (PCMA)活性的测定

按上面的方法获取海马神经元质膜后,测定各不同处理组质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性,测定方法按照试剂盒说明书进行.

1.6 神经元胞内游离 Ca^{2+} 浓度的测定

海马神经元胞内游离 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)浓度的测定以 Fura-2/AM 为荧光指示剂,采用 LS-50 荧光分光光度计进行测定.收集培养的海马神经元(约为 $(3\sim 6)\times 10^5/\text{mL}$)悬浮在 Krebs 培养液中,加入 5 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2/AM 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中水浴 30 min,再用 Krebs 培养液洗涤培养的细胞以去除 Fura-2/AM.将细胞转入比色皿中分别在激发波长 340 nm 和 380 nm,发射波长 510 nm 进行荧光测定.胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 按照下面的公式进行计算^[16, 17]:

$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times ((R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)) \times \beta$ 其中:

R : 波长为 340 nm 和 380 nm 时的比荧光;

R_{\max} 和 R_{\min} : 荧光染料饱和 Ca^{2+} (采用 10^{-5} g/mL

digitonin 处理增加细胞膜通透性使荧光染料易于饱和 Ca^{2+})和胞外无 Ca^{2+} (用钙离子螯合剂 EGTA 处理)时的比荧光;

β : 波长为 380 nm 胞外无 Ca^{2+} 和饱和 Ca^{2+} 时的基础比荧光;

K_d : Fura-2/ Ca^{2+} 复合物的解离常数,在本实验条件下,取值为 224 nmol/L.

2 结果

2.1 MDA 对培养的海马神经元形态结构的影响

海马神经元经过 10 d 原代培养后,在培养板中分别加入 MDA,使体系中 MDA 浓度分别达到 1.0、10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$,3 h 后观察其在光学显微镜下形态上的变化如图 1 所示.

与对照组比较随着 MDA 浓度的升高,神经元突触和轴突逐渐变短,神经元胞体变得肿胀,细胞核固缩最后解体消失,细胞膜的边缘也变得越来越不清晰,形成“油煎蛋状”细胞形态,表现出了比较典型的细胞凋亡或者死亡的形态特征.

2.2 MDA 对海马神经元超微结构的影响

在电子显微镜下,空白对照组神经元电子剪密度高,其细胞核大而圆,核内异染色质较少,核仁大呈网状,双层核膜有清晰的核周隙其宽度均匀而明显;胞质内有核糖体、内质网、高尔基氏体和线粒体;线粒体呈圆或卵圆形,嵴较多而明显.除 1.0 $\mu\text{mol/L}$ MDA 处理组超微结构变化不明显外,其余各组经 MDA 处理后大鼠神经元细胞核变形,表面呈锯齿状,核内异染色质增多、核膜及核周隙模糊不清,核仁网状结构消失;细胞器减少或变形,结构不清;线粒体呈气球样肿胀、嵴减少或消失;质膜结构不清或消失断裂.

2.3 MDA 对突触质膜 Ca^{2+} -ATPase (PMCA)活性的影响

在测定 PMCA 活性前,首先加入了 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 毒胡萝卜素(为内质网膜上 Ca^{2+} -ATPase 活性专一抑制剂),经测定对本体系质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性测定没有影响(相关的测定数据本在论文中没有提供),表明所分离得到的海马神经元质膜分离物基本没有被内质网 Ca^{2+} -ATPase 所污染.

在所制备的海马神经元突触膜中分别加入 1.0、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 MDA,再在 0、5、10、15、20、25、30 min 时间点分别各自测定其体系中 PMCA 的活性.测定结果如图 3 所示.

随着 MDA 浓度的升高和作用时间的延长,

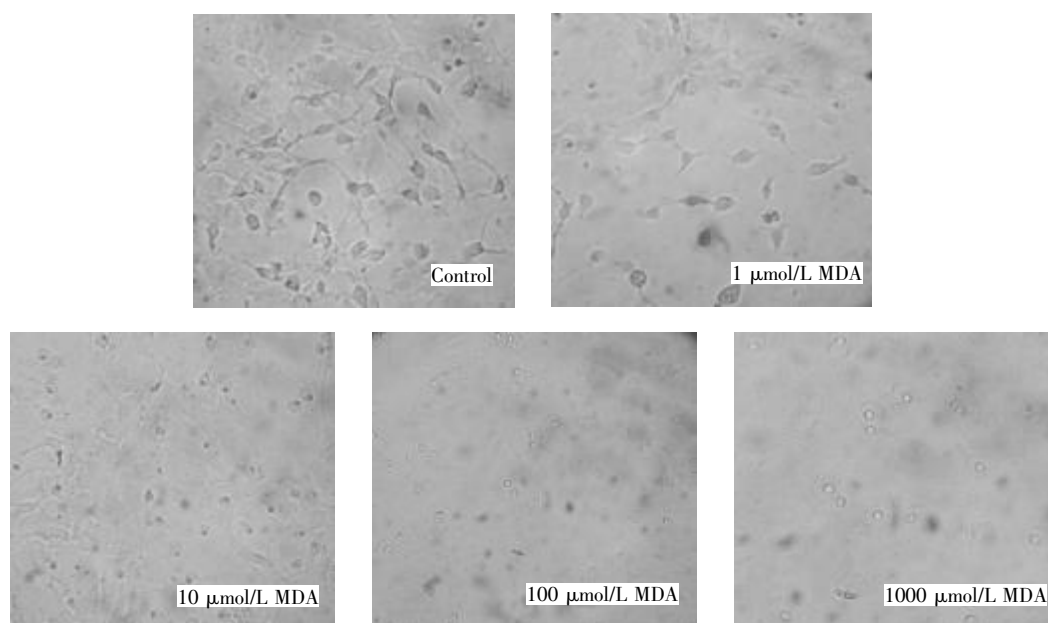


图 1 不同浓度 MDA 对原代培养海马神经元形态的影响

Fig.1 The morphological alterations of hippocampal neuronal cultures affected by different concentration of MDA

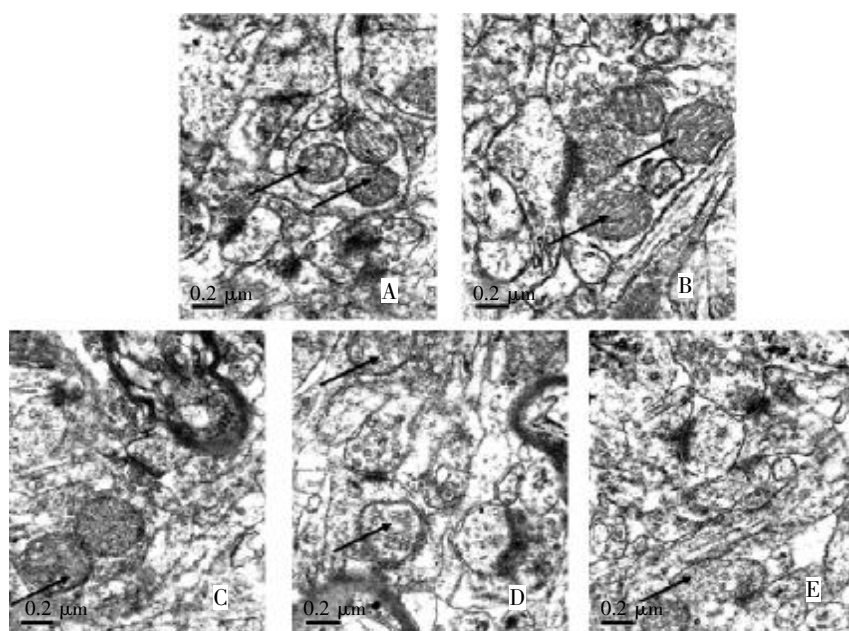


图 2 不同浓度 MDA 作用 SD 大鼠海马区神经元超微结构图

箭头所指为线粒体。(A) 空白对照组, 细胞内线粒体内外膜结构清晰可见, 形状规则为圆形或椭圆形或杆状, 突触间的联系紧密且结构完整; (B) 1.0 $\mu\text{mol/L}$ MDA 处理组, 其超微结构与空白对照组比较, 没有明显变化; (C) 10 $\mu\text{mol/L}$ MDA 处理组, 线粒体轻微肿胀, 形状上类似“洋葱”, 其内部结构“嵴”等不清晰; (D) 100 $\mu\text{mol/L}$ MDA 处理组, 线粒体内外膜结构不完整, 线粒体的内部结构也不清晰, 可以明显看出超微结构上的损伤, 突触间的连接结构不清晰完整; (E) 1 000 $\mu\text{mol/L}$ MDA 处理组, 与上组相似, 可以看到更明显的线粒体的损伤, 细胞突触前膜和厚膜之间的连接也不清晰。

Fig.2 The ultra structural alterations of hippocampal neuron affected by different concentration of MDA

Arrows for mitochondria. (A) Control, the outside membrane of mitochondria was clear, the shapes were round or oval, the links between the synapses were close and structural integrity; (B) Treatment with 1.0 $\mu\text{mol/L}$ MDA, there was no significant difference in ultra structure; (C) Treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ MDA, the mitochondria were a little swollen, the cristae of mitochondria in inside membrane were unclear and disappeared partly; (D) Treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ MDA, the structures of mitochondria inside membrane were imperfect, the links between synapse were not so close, there were significant impairment of the mitochondria; (E) Treatment with 1 000 $\mu\text{mol/L}$ MDA, it was seem that there were more distinct impairment of mitochondria compared with the group D.

PMCA 的活性不断下降. 在 30 min 的作用时间里, 当 MDA 的浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 PMCA 的活性影响比较小; 当 MDA 的浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 作用时间从 5 min 开始就能显著抑制 PMCA 活性. 但 MDA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 此二者对 PMCA 活性的抑制作用没有明显的差别. 从图 3 还可以看出, 在 MDA 浓度由 10 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 PMCA 活性的抑制作用发生了极大的变化.

2.4 MDA 对培养海马神经元胞质 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 稳态的影响

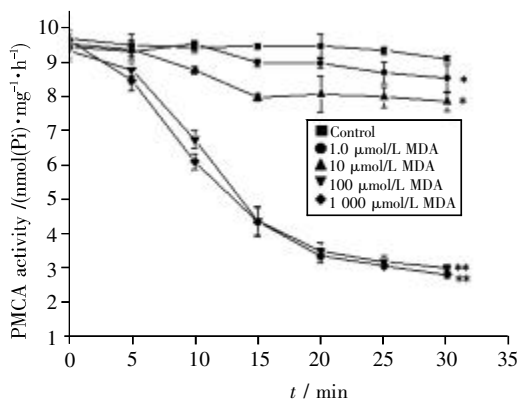


图 3 MDA 对突触质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响
Fig.3 The effects of MDA on plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity

在本研究中以 Fura-2/AM 为荧光指示剂研究 MDA 对培养的海马神经元胞质中游离 Ca^{2+} 浓度的影响. 在培养的海马神经元中分别加入 1.0、10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 MDA, 作用 30 min 后的实验结果如图 4 所示.

在 30 min 作用时间内, 当 MDA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 随着 MDA 浓度的升高和作用时间的延长, 海马神经元胞质中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著升高; 当 MDA 的浓度为 1.0、10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其胞质中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度变化则不显著. 但在 MDA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胞质中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高可以分为 3 个不同的阶段: 在 0~10 min 时出现逐渐升高的过程, 在 10~15 min 时出现一个平台期, 在 15~30 min 时再出现一个显著升高的过程. 平台期左边胞质中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 逐渐升高过程称为早期 Ca^{2+} 升高, 平台右边胞质中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著升高过程称为晚期 Ca^{2+} 升高.

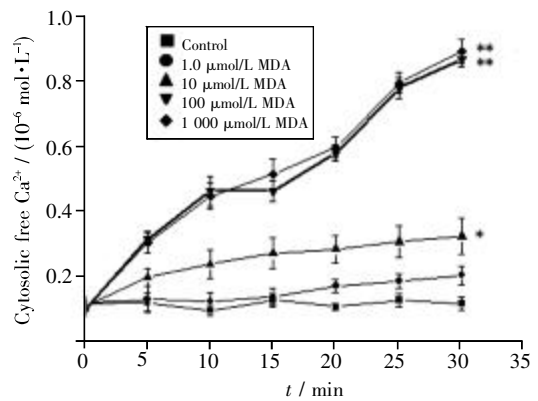


图 4 MDA 对海马神经元胞质 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 稳态的影响
Fig.4 The effects of MDA on homeostasis changes of plasma membrane $[\text{Ca}^{2+}]_i$

3 讨论

有研究表明, 运动性疲劳时神经-内分泌系统机能紊乱是运动能力下降的主要原因之一^[18, 19]. 海马是边缘系统的重要组成部分, 不仅与学习记忆密切相关, 而且与运动性中枢疲劳的发生也密切相关. 曹电康^[20]采用 4 周大强度训练制成的大鼠运动性疲劳模型研究表明, 疲劳组大鼠海马 NOS 总活性大于对照组, 说明运动性疲劳过程中, 使海马神经元中 NOS 的表达上调, 海马 NOS 神经元参与了中枢运动性疲劳的形成. 满军^[21]等的研究表明, SD 大鼠过度运动后, 可导致海马神经元形态结构的改变, 采用 HE 染色可观察到海马神经元排列松散、紊乱, 与周围神经元的联络减少, 部分细胞固缩并呈不规则变化. 在电子显微镜下可以看到细胞核内陷, 线粒体肿胀并且出现空泡. 这些形态结构上的变化与在 MDA 的作用下导致的原代培养的海马神经元的变化和腹腔注射 MDA 后导致的超微结构的变化基本一致.

MDA 是伴随机体的物质代谢和能量代谢过程中形成的副产物. 特别是在长时间的剧烈运动过程中, 由于脂肪酸 β -氧化供能以满足机体运动的需要, 这时会产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 这些活性氧攻击细胞质中的脂肪酸及存在细胞膜上的作为细胞骨架的不饱和脂肪酸, 在这个过程中会产生大量的 MDA^[22]和其它各种与 MDA 类似的活性羰基化合物. 所形成的这些活性羰基类物质在机体有非常广泛的生物学效应^[23-25]. 体外研究表明, MDA 能与多种氨基酸或多肽作用^[26-28], 这些作用可能影响蛋白质的结构、功能或者破坏其空间构象^[29, 30]. 在中枢神经系统, MDA

的这些作用不仅会影响神经递质的分泌,还可能对神经递质的活性产生影响。

神经元细胞质中 $[Ca^{2+}]_i$ 稳态的调节受到多种因素的共同作用,主要有存在于细胞膜和内质网膜上的各种类型的 Ca^{2+} 通道,如电压门控的 Ca^{2+} 通道、 Na^+/Ca^{2+} 交换通道,细胞膜和內质网膜上的 Ca^{2+} -ATPase,细胞中各种能与钙离子结合的蛋白如钙调蛋白等钙缓冲系统^[31]等,它们的共同作用使神经元在静息状态下处于低 $[Ca^{2+}]_i$ 稳态水平。本实验表明,在 MDA 的作用下,会使神经元胞质 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高而破坏原来的稳态水平(图 4)。其中的可能原因之一是 MDA 抑制了胞质膜 Ca^{2+} -ATPase(PMCA)的活性。通常 PMCA 的功能是在静息状态下将胞质中游离 Ca^{2+} 泵到细胞外以维持胞质中低 $[Ca^{2+}]_i$ 。而且胞质中 $[Ca^{2+}]_i$ 升高与 MDA 的浓度和作用时间存在正相关性,表明 MDA 对 PMCA 活性的抑制(图 3),引起了胞质中游离钙水平升高。

该实验结果还表明:在 MDA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$,作用时间为 30 min 的时间内,存在一个前 10 min 的早期胞质 $[Ca^{2+}]_i$ 升高过程和 15 min 到 30 min 的晚期升高过程,提示 MDA 致培养的海马神经元胞质中 $[Ca^{2+}]_i$ 升高可能存在两个不同的机理,或者导致这两个阶段胞质 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的 Ca^{2+} 存在两个不同的来源。推测其中一个阶段是来源于神经元细胞内部的 Ca^{2+} 库(内质网)释放;另一个阶段则是神经元细胞外的培养液中钙离子内流(实验数据还没有发表)。Carini 等^[32]以原代培养的肝细胞为实验模型,在体系中加入 4-HNE(4-羟基壬烯醛,亦为脂质过氧化产物,分子结构与 MDA 类似)后,也得到了基本相似的实验结果。

4 小 结

本研究表明,MDA 在光学显微镜下可导致神经元的异常变化,在电子显微镜下可导致超微结构的异常如线粒体等细胞器的损伤性变化,可抑制质膜 PMCA 活性和导致细胞中游离钙水平稳态的破坏。所有这些变化都将导致机体在剧烈运动中机体运动能力的下降和疲劳的发生。

参考文献(References):

- [1] 蔡建光. 运动性疲劳与羰基应激[J]. 实用老年医学(CAI Jian-guang. Exercise-induce fatigue and carbonyl stress[J]. Practical Geriatrics), 2010, 24(1): 16-19.
- [2] 沈志祥. 运动对羰基应激的调节及其延缓衰老的作用机制[J]. 实用老年医学 (SONG Zhi-xiang. The mechanisms of exercise on the regulation of carbonyl stress and delay the process of aging[J]. Practical Geriatrics), 2010, 24(1): 10-13.
- [3] YIN D, CHEN K. The essential mechanisms of aging: Ir-reparable damage accumulation of biochemical side-reactions[J]. Experimental Gerontology, 2005, 40(6): 455-465.
- [4] 陈菁菁, 方垂, 李芳序, 等. 丙二醛对大鼠空间学习、记忆能力及海马 CA1 区超微结构的影响[J]. 动物学报(CHEN Jing-jing, FANG Chui, LI Fang-xu, *et al.* Effects of malonaldehyde on spatial memory, learning and ultra microstructure of the hippocampal CA1 area of SD rats[J]. Acta Zoologica Sinica), 2008, 53(6): 1041-1047.
- [5] 彭密军, 刘婷婷, 蔡建光. 红细胞羰基毒化及谷胱甘肽的保护作用[J]. 生命科学研究(PENG Mi-jun, LIU Ting-ting, CAI Jian-guang. Carbonyl stress on erythrocytes and the protective effects of glutathione[J]. Life Science Research), 2008, 12(3): 216-221.
- [6] 刘慧敏, 贺洪, 印大中. 赖氨酸对力竭运动后的大鼠保护作用[J]. 湖南师范大学学报(医学版)(LIU Hui-ming, HE Hong, YIN Da-zhong. Mechanism study on the protection of lysine on rats after taking exhausting exercises[J]. Journal of Hunan Normal University(Medical Sciences)), 2007, 4 (1): 49-52.
- [7] DISCHIA M C C, PROTA G. Reaction of dopamine with malondialdehyde: A possible underlying event in Parkinson's disease[J]. Tetrahedron Letters, 1993, 34(24): 3921-3924.
- [8] LI L, LI G, SHENG S, *et al.* Substantial reaction between histamine and malondialdehyde: a new observation of carbonyl stress[J]. Neurology and Endocrinology Letters, 2005, 26(6): 799-805.
- [9] LI G, LI L, YIN D. A novel observation: melatonin's interaction with malondialdehyde[J]. Neurology Endocrinology Letters, 2005, 26 (1): 61-66.
- [10] OGASAWARA M, NAKAMURA T, KOYAMA I, *et al.* Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role[J]. Chemistry and Pharmacology Bulletin, 1993, 41 (12): 2172-2175.
- [11] 李良鸣. 牛磺酸与运动的关系[J]. 中国运动医学杂志(LI Liang-ming. The relationship of taurine and exercise [J]. Chinese Journal of Sports Medicine), 2000, 19(1): 80-83.
- [12] 樊凤艳, 黄灵芝, 王广义, 等. 肌肽对大鼠缺血一再灌注损伤后热休克蛋白 70 及炎症因子表达水平的影响[J]. 医学分子生物学杂志(FAN Feng-yan, HUANG Ling-zhi, WANG Guang-yi, *et al.* Effect of carnosine on the expression of HSP70 and inflammatory factors in a rat ischemia-reperfusion injury model[J]. Journal of Medical Molecular Biology), 2007, 4(1): 11-14.
- [13] KIKUGAWA K, MACHIDA Y, KIDA M, *et al.* Study on peroxidized lipids III: Fluorescent pigments derived from the reaction of malonaldehyde and amino acids[J]. Chemistry and Pharmacology Bulletin, 1981, 29(1): 3003-3011.
- [14] BREWER G J, TORRICELLI J R, EVEGE E K, *et al.* Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination[J]. Journal of Neuroscience Research, 1993, 35(5): 567-376.
- [15] MICHAELIS E K, MICHAELIS M L, CHANG H H, *et al.* High affinity Ca^{2+} -stimulated Mg^{2+} -dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1983, 258 (10): 6101-6108.
- [16] GUTIERREZ-MARTIN Y, MARTIN-ROMERO F J, HENAO

- F, *et al.* Alteration of cytosolic free calcium homeostasis by SIN-1: high sensitivity of L-type Ca^{2+} channels to extracellular oxidative/nitrosative stress in cerebellar granule cells[J]. *Journal Neurochemistry*, 2005, 92(4): 973-989.
- [17] GUTIERREZ-MARTIN Y, MARTIN-ROMERO F J, HENAO F, *et al.* Synaptosomal plasma membrane Ca^{2+} pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO(-) pulses[J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2002, 32 (1): 46-55.
- [18] 陈佩杰, 李红武, 徐锋鹏, 等. 6周不同负荷训练后大鼠下丘脑、垂体和血浆 β -内啡肽、强啡肽 A₁₋₁₃、精氨酸加压素以及缩宫素的变化[J]. *中国运动医学杂志*(CHEN Pei-jie, LI Hong-wu, XU Feng-peng, *et al.* Effects of six-week training at various loads on the contents of β EP, Dyn A 1-13, AVP and OT in hypothalamus, pituitary and plasma in rats[J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*), 1999, 19(1): 36-38.
- [19] NEWSHOLME E A, BLOMSTRAND E. The plasma level of some amino acids and physical and mental fatigue[J]. *Experientia*, 1996, 52(5): 413-415.
- [20] 曹电康, 刘宏宇, 续俊, 等. 运动性疲劳对大鼠海马一氧化氮合成酶活性的影响[J]. *北京体育大学学报*(CAO Dian-kang, LIU Hong-yu, XU Jun, *et al.* Research on effects of exercise-induced fatigue on activity of nitric oxide synthase(NOS) in rat hippocampus[J]. *Journal of Beijing University of Physical Education*), 2005, 28(12): 1647-1648.
- [21] 满君, 田野, 高颀. 过度运动对海马神经元形态及脑源性神经营养因子表达的影响[J]. *中国运动医学杂志*(MAN Jun, TIAN Ye, GAO Qi. Influence of excessive exercise on the morphology and brain-derived neurotrophic factor expression of hippocampus neurons[J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*), 2004, 23(5): 510-514.
- [22] 李莉, 印大中. 生物体内的应激醛损伤及其代谢—动物生理性衰老的重要生化过程[J]. *生命科学研究*(LI Li, YIN Da-zhong. Damage and defense of aldehyde stress in organisms-an important biochemical process during animal physiological aging[J]. *Life Science Research*), 2003, 7(1): 25-29.
- [23] 张澍, 朱泽瑞. 丙二醛(MDA)对小鼠游泳能力的影响[J]. *生命科学研究* (ZHANG Shu, ZHU Ze-rui. The effects of malondialdehyde (MDA) on burden-swimming ability of KM mice[J]. *Life Science Research*), 2006, 10(3): 33-38.
- [24] 李莉, 陈菁菁, 李方序, 等. 氧应激毒性产物丙二醛(MDA)对小鼠体能的影响及其体内代谢[J]. *湖南师范大学自然科学学报*(LI Li, CHEN Jing-jing, LI Fang-xu, *et al.* Toxic effects of oxidative stress product malondialdehyde (MDA) on mice physical stamina and metabolism *in vivo*[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*), 2006, 29(2): 97-101.
- [25] PETER J O, ARNO G S, NANDITA S. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health[J]. *Critical Review of Toxicology*, 2005, 35: 609-662.
- [26] UCHIDA K, STADTMAN E R. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (10): 4544-4548.
- [27] SLATTER D A, AVERY N C, BAILE Y. Identification of a new cross-link and unique histidine adduct from bovine serum albumin incubated with malondialdehyde[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(1): 61-69.
- [28] ISHII T, KUMAZAWA S, SAKURAI T, *et al.* Mass spectroscopic characterization of protein modification by malondialdehyde[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, 19(1): 122-129.
- [29] ESTERBAUER H, SCHAUR R J, ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes[J]. *Free Radical Biology Medicine*, 1991, 11(1): 81-128.
- [30] ESTERBAUER H, ZOLLNER H, SCHAUR J. Aldehydes Formed by Lipid Peroxidation: Mechanisms of Formation, Occurrence, and Determination. In *Membrane Lipid Oxidation*[M]. Boca Raton: CRC Press Inc, 1990.
- [31] MATTSON M P. Calcium and free radicals: mediators of neurotrophic factor and excitatory transmitter-regulated developmental plasticity and cell death [J]. *Perspectives on Developmental Neurobiology*, 1996, 3(2): 79-91.
- [32] CARINI R, BELLOMO G, PARADISI L, *et al.* 4-Hydroxynonenal triggers Ca^{2+} influx in isolated rat hepatocytes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 218(3): 772-776.