第壹章　緒論

一、前言

一氧化氮(nitric oxide；NO)是由一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase；NOS）生成的一種自由基。 NOS 已被發現有三種同功酶：神經型一氧化氮合成酶(neuronal nitric oxide synthase；nNOS)、誘導型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase；iNOS) 和內皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase；eNOS)。 NO 合成則需 L-精胺酸（L-arginine） 透過 NOS 反應且需 O_2 及 NADPH 為共同受質才能完成，而後生成半胱胺酸（citrulline），其他的輔助因子包括黃素腺嘌呤二核苷酸（flavin adenine nucleotide；FAD）、黃素單核苷酸（flavin mononucleotide；FMN）、四氫基喋呤(tetrahydrobiopterin, BH_4)、血紅素(haem)及攜鈣素(calmodulin；CaM）。NOS 與 CaM 鍵結需仰賴鈣離子的調節（calcium-dependent），而 nNOS 及 eNOS 與 CaM 的鍵結則在局部鈣離子的濃度達到 EC_{50} ≒ 0.3 μM 才會發生。這種 CaM 藉由鈣離子誘導性的鍵結對 nNOS 及 eNOS 為主要生成 NO 的機制，使其具有受到高度調控(highly regulated)及低產量(low-output) 的酵素功能以產生 NO 當作一種訊息傳遞的分子，而 iNOS 與 CaM 原本就具有高度鍵結親合力，因此在正常生理範圍的鈣離子濃度即能夠生成 NO ，而一般 iNOS 對 NO 生成的調控主要是仰賴 iNOS 傳譯生成的影響。L-NAME 與 L-精胺酸（L-arginine）在化學結構上相似，

與 L-arginine 有競爭性的作用，而 L-NAME 與 NOS 反應後不會生成 NO ，因此一般用來作為 NOS 的非選擇性抑制劑。

NO 主要的作用在於活化細胞質內鳥苷酸環化酶(soluble guanylyl cyclase，sGC)，以催化 GTP 形成 cGMP 及 PPi，再進一步活化蛋白激酶 G 以對蛋白質有磷酸化的作用，造成肌肉鬆弛，如血管的舒張作用。在過去20年， NO 與其衍生出的氧化物已經被認定為一種生理過程中的介質，而其範圍擴及自我免疫至神經傳導，其中就 NO 對神經傳導的影響更觸及至血管舒張及陰莖的勃起(Moncada & Higgs, 1993)。近幾年的研究已證實骨骼肌可生成 NO 及 NO 在肌肉組織與細胞層級中可視為一種內源性的調節者，且 NO 也直接影響骨骼肌纖維的代謝及收縮的功能，NO 的衍生物也呈現細胞與細胞之間的調節功能。長期性耐力性運動訓練的適應則可以增強有氧代謝能力及增進骨骼肌肝醣（glycogen）的儲存，並進一步可以促進耐力性運動表現。據此 NO 在運動生理中也伴演著重要的角色，其中包括對骨骼肌肝醣代謝的影響，而對心血管功能的調節也都與健康及運動表現有著息息相關的一面。

然而當血管中 NO 產量減少，會導致血管舒張能力降低，進而產生高血壓的生理現象。已有研究以硝化精胺酸（N^G-nitro-L-arginine-methyl ester hydrochloride； L-NAME）抑制 NOS 活性的作用來探討 NO 對生理的影

響(Husain, 2003; Roberts, Barnard, Jasman, & Balon, 1999)。L-NAME 使用的劑量若以 Roberts 等的研究來看，將大鼠飲用水加入 L-NAME並調配成濃度為 1 mg/ml，則 300g 的大鼠以一天飲用水約為 36 ml 來計算，每天 L-NAME 的攝取量為 36 mg；而 Husain 的研究則是用每天單次餵食劑量為 10 mg/g L-NAME，上述之研究劑量皆能顯著提升大鼠之尾動脈壓。而在本研究之前導實驗中則發現，四週每天單次餵食濃度為 5mg/g L-NAME 再配合耐力運動訓練能顯著提升大鼠比目魚肌 eNOS 蛋白表現(Lin 等，2003)，而且對大鼠實驗期間之尾動脈壓無顯著影響，此現象與 Roberts 等及 Husain 的研究結果所有差異可能因前導研究中 L-NAME 遠低於 Roberts 等及 Husain 研究的餵食劑量。而前導研究結果與激效作用（homesis）的機制有相似的地方。 Hormesis 為在生物體中利用微量毒性或具有抑制性的物質，而對生物體反而產生正面效果的反應(Thayer, Melnick, Burns, Davis, & Huff, 2005)。因此本研究擬透過引發 homesis 的機制，來觀察骨骼肌 NOS 表現的變化，進而探討對骨骼肌肝醣儲存及耐力性運動表現等等的影響。

二、骨骼肌與 NOS

在骨骼肌 eNOS 與 nNOS 是最常見的兩種一氧化氮合成酶，且均須藉由鈣離子與攜鈣素的輔助作用才能活化，nNOS 的 mRNA 最早在人類骨骼肌中發現(Nakane, Schmidt, Pollock, Forstermann, & Murad, 1993)，大鼠

(Kobzik, Reid, Bredt, & Stamler, 1994)與小型脯乳類動物(Grozdanovic, Nakos, Dahrmann, Mayer, & Gossrau, 1995)的 Type I 肌纖維膜（sarcolemma）附近發現有 nNOS 存在。大鼠的骨骼肌，包括比目魚肌、腓腸肌都發現有 nNOS 的表現，而骨骼肌的 NOS 主要來自位於肌細胞膜上的 nNOS，部份骨骼肌(如比目魚肌）發現有 eNOS 存在，eNOS 主要存在於血管中的內皮細胞，且會受剪應力的刺激而增強。雖然運動可以引起剪應力的產生進而刺激 eNOS 的活性(Shen 等，1995)，但研究指出 eNOS 對於骨骼肌 NO 產量的貢獻主要還是需仰賴於蛋白表現的總量(Kobzik, Stringer, Balligand, Reid, & Stamler, 1995)。iNOS 則受脂多醣（lipopolysaccharides ；LPS）或發炎性細胞激素的作用才會誘導產生，然而在骨骼肌鮮少有 iNOS，目前只有部份研究證實在骨骼肌發炎反應的情況下才會有 iNOS 基因層級上的表現(Thompson 等，1996)，因此在本研究中暫不討論 iNOS 的變化。

耐力性運動再配合衝刺性運動訓練，已被證實能增強 nNOS 及 eNOS 蛋白表現(Balon & Nadler, 1997)，另一研究也證實骨骼肌中的 eNOS 會受長期性運動的刺激而增強其表現 (Balon & Nadler, 1997; Tidball 等，1998)，但有研究指出耐力性運動訓練對 nNOS 蛋白表現及活性無顯著影響(Frandsen 等，2000)。據此，耐力性運動訓練對 nNOS 的影響在 Balon & Nadler 及 Frandsen 等的研究中似乎有所出入，是否 nNOS 能受耐力性運動而增強其表現仍需尚待釐清。

此外，在細胞模式的研究中發現，主動脈內皮細胞接受剪應力刺激前給予額外的 NO，會降低其 eNOS mRNA 表現；若在接受剪應力（shear stress）刺激前給予 L-NAME 以抑制 eNOS 活性，其 eNOS mRNA 表現則有增強的現象(Grumbach, Chen, Mertens, & Harrison, 2005)。其機轉與 NO 會透過抑制 NOS 其基因轉錄因子-NF-κB 有關(Bogdan, 2001)，顯然 NO 自己本身會反饋抑制 NOS 的基因表現。而前研究結果發現，藉由低劑量 L-NAME 可引發骨骼肌 eNOS 代償增生(Lin 等，2003)，可能增加骨骼肌 NO 含量，然而在基因層級上的變化需進一步探討以瞭解低劑量 L-NAME 對 NOS 轉譯的因果關係。由於 L-NAME 是種非選擇性的抑制劑，可對大鼠整體 NOS 活性產生系統性的抑制作用，況且 nNOS 的基因表現也會受 NF-κB 所調節(Marshall, Hess, & Stamler, 2004)，因此本研究亦嘗試探討在運動訓練前餵食低劑量 L-NAME 對於 nNOS 的蛋白及 mRNA 表現，是否也會有類似 homesis 的現象，進而與 eNOS 有類似的變化。

三、NO 對骨骼肌能量代謝的影響

骨骼肌在運動中的能量消耗模式會因運動的強度、種類及時間之差異而有所不同，而在生物體最快速生成 ATP 的來源為磷酸肌酸系統（creatine phosphate；CP），只要 CP 與 ADP 經過磷酸肌酶（creatine kinase）反應催化後即可生成 ATP；其次是肝醣或葡萄糖透過醣解作用（glycolysis）也

能快速的產生運動所需的 ATP；最後能產生大量 ATP 為氧化系統，主要是將脂肪及糖類代謝後產生之乙醯輔酶 A （acetyl-CoA）透過三羧酸循環（tricarboxylic acid cycle；TCA cycle）反應後，即可產生 ATP，又因檸檬酸合成酶（citrate synthase activity）為 TCA cycle 中第 1 個反應酶，且研究也證實檸檬酸合成酶與有氧代謝能力有高地的相關性(Coggan 等，1993; Mccully, Fielding, Evans, Leigh, & Posner, 1993)，因此本研究亦將檸檬酸合成酶活性視為有氧代謝能力的指標。

一般來說，運動時間為 0 至 3 秒之爆發性運動，其能量來源以 CP 為主，4 至 50 秒之運動則以醣解作用，持續 2 分鐘以上的運動則需仰賴氧化系統來供應骨骼肌所需之能量。而運動時骨骼肌主要的能量代謝來源為脂肪及醣類，就耐力性運動而言，在運動期間往往會大量的消耗骨骼肌肝醣含量以供骨骼肌收縮之能量來源。當肝醣耗盡時，骨骼肌也就難以進行收縮，以致有礙耐力性運動(Aoi, Naito, & Yoshikawa, 2006)。但骨骼肌肝醣耗竭卻可短暫性增強肝醣合成酶活性，以透過將碳水化合物轉換成肝醣的機制，提升骨骼肌肝醣含量(Lemon & Mullin, 1980; Nielsen 等，2001; Perseghin 等，1996)，以供應下次耐力性運動所需之能量。

然而運動可增強 NOS 活性以增加 NO 產量，且 NO 已被證實能影響血糖的吸收(Balon & Nadler, 1994)，進一步的研究亦證實抑制 NOS 的活性

可降低 2-去氧葡萄糖的吸收(Balon & Nadler, 1997)。此研究也顯示 NO 釋放劑可促進 2-去氧葡萄糖攝取，此作用對透過胰島素路徑攝取的血糖有加成作用，並證實長期耐力性運動訓練可促進 nNOS 及 eNOS 的活性，因此 NO 可視為再運動所誘發血糖轉運至骨骼肌的調節者。另外， NO 調控醣類代謝的機轉在於影響糖解作用酶：3-磷酸甘油醛脫氫酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ； GAPDH）(Mohr, Stamler, & Brune, 1996)。GAPDH 活性被亞硝酸化之半胱氨酸 ^{149}（S-nitrosylation of cysteine^{149}）所抑制，NO 抑制醣解作用能使激烈運動後快速恢復基本的肝醣含量。因此，若能增強骨骼肌 NOS 表現，進而增加 NO 產量即可能有助於肝醣的儲存，此現象將可能有利於促進耐力性運動表現。

四、NO 與有氧運動能力

運動可以刺激生理反應，以增強心血管系統之功能，並進一步可以降低心血管發生的機率(Hakim 等，1999; Myers 等，2002; Sesso, Paffenbarger, & Lee, 2000)，其中因運動而引起的高剪應力能刺激血管內皮細胞生成 NO，並使血管舒張以有利血液中各項物質之運輸，如運動可以透過刺激骨骼肌小動脈舒張以對作用肌群分配及運輸氧氣及營養物質(Dyke, Proctor, Dietz, & Joyner, 1995; Hirai, Visneski, Kearns, Zelis, & Musch, 1994; Maxwell, Schauble, Bernstein, & Cooke, 1998; Wilson & Kapoor, 1993)。血管的舒張作用，對於肺功能也有所助益，其中在人體實驗(Greenberg, Rhoden, & Barnes,

1987)及動物實驗(Chand & Altura, 1981)皆證實 NO 能促進肺動脈舒張作用，以增強肺臟之氣體交換作用(Verges, Flore, Favre-Juvin, Levy, & Wuyam, 2005)，此現象有益於排出運動中所產生的二氧化碳，並也使生物體內能有充足的氧氣以供骨骼肌產生能量。

此外， NO 的生成需有 L-arginine 為前驅物才能透過 NOS 產生 NO，已有研究證實服用 L-arginine 可增加骨骼肌 NOS 活性 (Roberts 等，1999)及 cGMP (Lau 等，2000)。若小鼠長期性服用 L-arginine 則能透過增強內皮細胞生成 NO 的能力，以促進有氧能力(Maxwell 等，2001)。長期性 L-arginine 增補能促進心血管病患的有氧能力，在健康的族群中則有稍微增加的現象 (McConell, 2007)。因此，若生物體內 NO 含量增加似乎可透過心血管系統及呼吸系統的功能增強，進一步對有氧運動能力有促進的作用。

然而，在前導研究中四週每天單次低劑量 L-NAEME 配合耐力運動訓練及耐力性運動訓練皆能顯著提升大鼠比目魚肌 eNOS 蛋白表現(Lin 等，2003)，而肌肝醣含量及檸檬酸合成酶活性亦有顯著增加 (Lin & Su, 2004)，且其效果有優於運動訓練組的趨勢但未達顯著，而大鼠尾壓方面似乎有受低劑量 L-NAME 所影響，雖有升高的趨勢，但未達顯著。因此本研究擬透過延長上述研究實驗設計之週數以觀察單次低劑量 L-NAEME 對運動訓練

之肌肝醣含量及檸檬酸合成酶活性是否有顯著加成之效果，也監控低劑量 L-NAME 對大鼠尾壓是否有影響。據此，假設在肌肝醣含量增加及檸檬酸合成酶活性增強情況下是否顯著促進大鼠耐力性運動表現，亦是本研究欲探討之課題。

五、研究目的

綜上所述，本研究擬透過下列方向以釐清上述之疑點：

（一）觀察四週耐力性運動訓練對大鼠比目魚肌 nNOS 及 eNOS 蛋白表現影響。

（二）觀察四週低劑量 L-NAME 及耐力性運動訓練對大鼠骨骼肌 nNOS 和 eNOS 蛋白及 mRNA 表現的影響。

（三）觀察八週低劑量 L-NAME 對大鼠尾壓的影響

（四）觀察八週低劑量 L-NAME 對大鼠骨骼肌肝醣含量及檸檬酸合成酶的影響

（五）觀察五週及八週低劑量 L-NAME 對大鼠耐力性運動表現的響。