

急性力竭性运动对大鼠淋巴细胞蛋白质组影响的初步研究

沙继斌¹, 刘明海², 隋波¹, 王娟¹

(1. 山东体育学院, 山东 济南 250063; 2. 商丘师范学院体育系, 河南 商丘 476000)

摘要:采用一次性力竭游泳为运动方式对大鼠进行训练,运动结束后取外周血,首先进行淋巴细胞计数,结果发现,运动组与对照组比较:CD4+ 细胞比值由 28.6% ± 3.5% 下降为 21.4% ± 5.7%,CD8+ 细胞比值由 14.7% ± 4.8% 数目上升为 23.8% ± 6.3% ($P < 0.01^{**}$),CD4+/CD8+ 由 1.93 ± 0.27 下降为 0.91 ± 0.31 ($P < 0.01^{**}$),随即取淋巴细胞制备蛋白样品,进行双向电泳,银染显色,利用 Pdquest 软件对获得的蛋白图谱进行分析,结果发现共得到 1546 个点,能够匹配的有 565 个,不能匹配的有 961 点。在分子量 43KD ~ 97KD 之间,运动组有部分蛋白质的量表现有较为明显增多,提示蛋白质表达的差异有可能是急性力竭性运动引发免疫机能下降的原因。

关键词:力竭性运动;淋巴细胞;双向电泳;大鼠

中图分类号: G804.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006 - 2076(2005)03 - 0062 - 03

Effect of the rats lymphocyte proteomics by acute exhaustive exercise

SHA Ji - bin¹, LIU Ming - hai², SUI BO¹, WANG Juan¹

(1. Shandong Institute of Physical Education and sports, Jinan 250063; 2. Dept. of PE, Shangqiu Teachers' College, Shangqiu 476000, China)

Abstract: In this study, it used one - off exhaustive swimming as the exercise model, soon after the training, collected the peripheral blood, then carried on lymphocyte counting at first. It has been found that, compared with the control group, the CD4+ cell value decreased from 28.6% ± 3.5% to 21.4% ± 5.7%, the CD8+ cell value raised from 14.7% ± 4.8% to 23.8% ± 6.3% ($P < 0.01^{**}$), the CD4+/CD8+ value decreased from 1.93 ± 0.27 to 0.91 ± 0.31 ($P < 0.01^{**}$). Next, it separated lymphocyte from the blood for protein sample preparation, then carried on two dimensional electrophoresis, soon after silver staining, used the Pdquest software analysis the gel. The result showed that there were 1546 points on the gel, 565 matched and 961 unmatched between the molecular weight 43 KD ~ 97KD, a part of protein increased obviously of the exercise group. It hinted that the difference of protein expression is probably an important cause of the immunity inhibition induced by the acute exhaustive exercise.

Key words: exhaustive exercise; lymphocyte; two dimensional electrophoresis; rat

一般认为 < 60 min 的游泳训练,会使 CD4+/CD8+ 值上升, T、B 细胞对丝裂原反应增强, IL - 21 分泌水平增高, NK 细胞数目及活性增加;而在 > 120 min 时,则出现不同程度的免疫抑制。目前对于这种抑制作用的机理,认为运动并不引起 CD4+ 亚群数目的太大变化,主要是由于 CD8+ T 细胞活性增加,数目增多,引起其他亚群功能抑制^[1,2,3]。有学者认为急性力竭性运动产生大量自由基,从而导致免疫机能下降。范少光研究组早在 1989 年就发现动物在发生应激反应时会产生免疫抑制因子并对此进行了深入研究^[4,5], 矫玮等则在超负荷游泳的小鼠血清中发现了分子量为 140 KD 的免疫抑制蛋白。这说明血清蛋白质表达的差异有可能是免疫抑制的重要诱因^[6,7]。免疫细胞各亚群内部蛋白质的表达对免疫机能的影响,目前报道较少,本实验对比进行了初步研究。

1 材料和方法

收稿日期:2004 - 11 - 30

作者简介:沙继斌(1974 -),男,博士生,讲师。

1.1 试剂和材料

淋巴细胞分离液、CD4+ 单克隆抗体、CD8+ 单克隆抗体、尿素(超纯)、3 - [(3 - 胆酰胺丙基) - 二乙胺] - 丙磺酸(CHAPS)、2 - 巯基乙醇(2 - ME)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、二硫苏糖醇(DTT)、丙烯酰胺(Acrylamide)、N,N - 甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基磺酸钠(SDS)、溴酚蓝、低分子量标准蛋白质、矿物油、IPG 干胶条、IPGbuffer,其他所用的常规试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

FACSCalibur 流式细胞分析仪(美国 BD 公司)、TGL - 16G - A 高速冷冻离心机、PROTEAN IEF Cell 等电聚焦仪、PROTEAN II Xi 垂直电泳槽、PDQUEST 图像分析软件(Bio - Rad 公司)、WD - 9405A 型脱色摇床。

1.3 实验方法

1.3.1 动物运动方式:雄性 SD 大鼠 16 只,体重(184 ± 4)g,随

机分为运动组与对照组,适应性饲养 1 周,运动组进行一次性力竭游泳训练,尾部绑缚其体重 2% 的负荷,水深 60 cm,不停驱赶以维持运动强度,力竭以动物沉入水中 10 s 不能浮起为标准,训练时间(140 ± 4) min。对照组给以适应性水刺激。

1.3.2 取材及指标测定

1.3.2.1 运动结束后断头取血,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,抗体标记后 FACSCalibur 流式细胞分析仪细胞计数,结果见表 1。在淋巴细胞中加入裂解液(Urea (60.06 超纯) 9.5 M、Tris 40 mM、CHAPS 4 %w/v、三蒸水定容至 5 ml),冰浴超声破解 2 min,125 000 r/min 离心 30 min,取上清液用 Bradford 方法测定蛋白含量,分装后冻存于 -73 备用。

1.3.2.2 双向电泳:取出存储于 -20 下的胶条,室温下平衡 10 分钟,被动式泡胀,然后进行第一向等电聚焦(IEF) 200 V 1 小时,500 V 1 小时,1 000 V 1 小时,8 000 V 5 小时;IEF 结束后将胶条平衡两次,采用 12.5% 的 SDS 胶进行第二向,将胶条转移到第二向 SDS 胶上,先加 100 V 电压,跑 30 分钟,再加 160 V 电压直到电泳结束。凝胶取下后用双蒸水漂洗三次,参照 EMBL 的银染方法加以优化,染色中止后用专用扫描仪投射扫描,然后用 Pdquest 软件进行分析,结果见图 1、图 2。

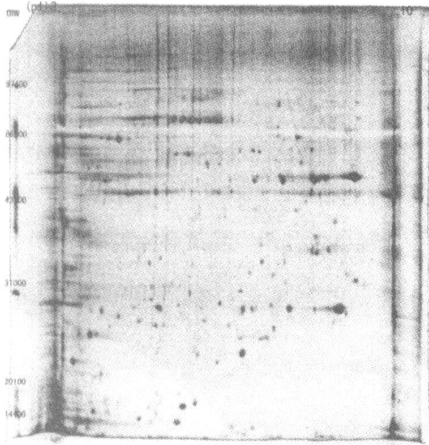


图 1 对照组淋巴细胞双向电泳图谱

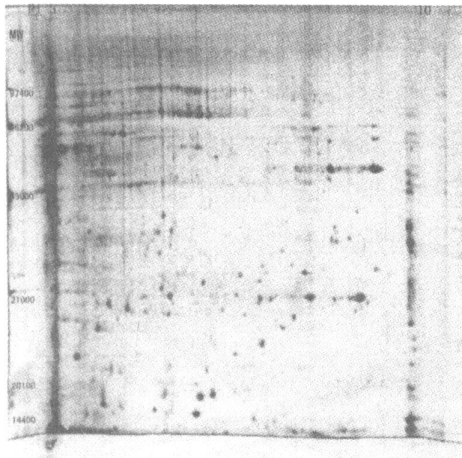


图 2 运动组淋巴细胞双向电泳图谱

2 试验结果

2.1 淋巴细胞计数分析,见表 1

表 1 淋巴细胞亚群分析结果

测试指标	对照组	运动组	P 值
CD4+	28.6% ± 3.5%	21.4 ± 5.7%	> 0.05
CD8+	14.7% ± 4.8%	23.8 ± 6.3%	< 0.01**
CD4+/CD8+	1.93 ± 0.27	0.91 ± 0.31	< 0.01**

结果表明,CD4+ 亚群比列下降,但变化不大,CD8+ 亚群显著上升, $P < 0.01^{**}$,CD4+/CD8+ 比值显著下降, $P < 0.01^{**}$,提示力竭游泳后引起免疫抑制。

2.2 双向电泳结果

表 2 本实验采用的双向电泳蛋白质标准品的分子量

标准蛋白名称	分子量(Dalton)
鸡蛋清溶菌酶	14 400
胰蛋白酶抑制剂	20 100
牛碳酸酐酶	31 000
兔肌动蛋白	43 000
牛血清白蛋白	66 200
兔磷酸化酶 B	97 400

经 Pdquest 软件分析,从图谱中共扫描到 1 546 个点,其中 565 个可以匹配,其他 961 个点不能匹配,这提示对照组与运动组存在蛋白质表达的量或者质的差异。从图 2 中可以看到在分子量 43~97.4 kD,PI 值在 3~5 之间区域与图 1 差别较大,提示酸性蛋白质表达差异较为显著,这可能是力竭性游泳引起 CD4+(Th)/CD8++(Ts) 比值下降,从而导致免疫机能抑制的一个诱因。

3 讨论

力竭性运动引发免疫机能抑制,国内外已经有较多文献报道^[1]。有关免疫抑制的原因,目前还缺乏系统有说服力的解释。其中,国内学者如范少光等发现在束缚应激后大鼠外周淋巴组织可产生一种应激免疫抑制蛋白(Neuroimmune Protein NIP),在小鼠中也有类似发现,分子量分别为 155,370 kD^[4,5,6],矫玮等发现在人体大强度运动后也产生这种抑制刀豆蛋白 A (ConA) 诱导的小鼠淋巴细胞增殖的抑制蛋白,可溶于水,分子量 140 kD,大鼠应激血清孵育人淋巴细胞也能使人淋巴细胞产生应激抑制蛋白,表明这种蛋白的种属特异性不强,提示中枢神经系统对外周淋巴组织可能有直接的软线调节作用^[6,7]。其学者如浦钧宗等研究了不同运动强度对于动物免疫指标的影响^[8],陈佩杰等从糖皮质激素受体入手研究了运动对于免疫机能的影响^[9,10,11,12]。近期金其贯通过研究发现 8 周的大负荷训练后,大鼠血清 Gn 和 Arg 含量显著降低,而淋巴细胞凋亡率却显著升高,认为这是导致机体免疫功能降低的重要机制^[13]。

1975 年, O Farrell 利用双向电泳结合放射自显影方法,首次得到了近 5 000 个蛋白点的图谱,从而使双向电泳成为分析蛋白质差异表达的有力工具^[14]。随着 1994 年蛋白质组(Proteome)概念的建立,双向电泳与生物质谱技术结合成为高通量蛋白质组分析的最有效的工具。对于真核生物,在一个哺乳动物细胞

中同时表达的基因至少有 5 000 ~ 10 000 个,而蛋白质表达与基因并不一一对应,就人类而言,一个基因可以编码 100 种蛋白质,近年来为了提高分辨率,创立了蛋白质组重叠群技术、ICAT 技术、蛋白质差异双向电泳技术等^[15]。本实验采用双向电泳方法对大鼠外周血淋巴细胞蛋白质进行了初步分析,结果提示力竭性运动作为一种强烈的应激原,使大鼠淋巴细胞蛋白质出现了较为明显的变化,这种变化有可能是免疫机能抑制的一个诱因,这种变化的意义及机理,有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1]沙继斌.运动、白细胞、免疫调节[J].天津体育学院学报,1998,13(3):8-13.
- [2]姚毓才,张宝慧.游泳训练对小鼠巨噬细胞功能影响的实验研究[J].中国运动医学杂志,1994,13(6):211-214.
- [3]姚毓才,张宝慧.运动训练对小鼠NK细胞杀伤功能和脾细胞IL-2产生能力的影响[J].中国运动医学杂志,1995,14(1):17-20.
- [4]范少光,查宏斌,李小蕊.束缚应激小鼠血清中产生的免疫抑制因子及其调节[J].科学通报,1989,34(20):584-587.
- [5]黄庆军,蒋灿,范少光.应激免疫抑制蛋白在血清中的作用时间[J].科学通报,1998,43(13):1411-1413.
- [6]邵黎,矫玮,范少光,等.运动员剧烈运动后血中应激免疫抑

- 制蛋白的产生[J].中国应用生理学杂志,1997,13(4):312-316.
- [7]矫玮,樊晋华,佟启良,等.剧烈运动与训练诱发体内产生免疫抑制蛋白的初步研究[J].体育科学,1998,18(3):71-74.
- [8]浦钧宗,唐培,冯建英,等.不同运动量对动物免疫指标影响的研究[J].中国运动医学杂志,1996,15(3):170-173.
- [9]陈佩杰,任杰,刘无逸,等.强化训练后血浆B2内啡肽及生长抑素与T淋巴细胞及其亚群的关系[J].上海体育学院学报,1995,19(4):24-28.
- [10]陈佩杰,陶心铭,韦俊文.老年人外周白细胞糖皮质激素受体的变化特征[J].上海体育学院学报,1991,15(4):57-59.
- [11]陈佩杰,任杰,刘无逸,等.大强度训练后机体免疫机能的变化及其与垂体-肾上腺皮质系统的可能关系[J].体育科学,1995,15(2):51-51.
- [12]陈佩杰,陶心铭,徐仁宝.慢性应激大鼠肝、脑液和胸腺细胞糖皮质激素受体的研究[J].体育科学,1991,11(1):45-47.
- [13]金其贵,吴凤起.运动性免疫抑制的机制研究[J].西安体育学院学报,2004,21(5):48-52.
- [14]O·Farrell. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J].J Biol Chem,1975,250:4007-4021.
- [15]夏其昌,曾嵘.蛋白质化学与蛋白质组学[M].北京:科学出版社,2004.

(上接第 61 页)

参考文献:

- [1]Veldhuis JD, et al. Responsiveness of gonadotropin secretion to infusion of an opiate-receptor antagonist in hypogonadotropic individuals[J].J Clin Endocrinol Metab,1982,55:649-653.
- [2]Quigley ME, et al. The role of endogenous opiates on LH secretion during the menstrual cycle[J].J Clin Endocrinol Met,1980,51:179-181.
- [3]Loucks AB, et al. Effects of exercise training on the menstrual cycle:existence and mechanism[J].Med Sci Sports Exerc,1990,22(3):275-280.
- [4]郑陆.生殖激素及抗生殖激素在运动性月经失调中的作用[J].中国运动医学杂志,1997,(3):203-207.
- [5]郑陆,潘力平,隋波,等.运动性动情周期紊乱动物模型的建

立[J].山东体育学院学报,2005,(2):46-49.

- [6]Garlberg KA, Fregly MJ. Disruption of estrous cycles in exercise trained rats[J].Proc Soc Exp Biol Med,1985,179(1):21-24.
- [7]郑陆.不同强度运动对不同运动级别及不同项目女运动员性激素水平的影响及其特征.中国运动医学杂志,1997,(3):215-219.
- [8]谢敏豪.血睾酮与运动[J].体育科学,1999,(3):82-84.
- [9]Yasin M, Dalkin AC, Haisenleder DJ, et al. Testosterone is required for gonadotropin-releasing hormone stimulation of luteinizing hormone-messenger ribonucleic acid expression in female rats[J].Endocrinology,1996,137:1265-1271.
- [10]陆庆仁.性激素与胰岛素的相互关系[J].国外医学内分泌学分册,1989,8(3):113-114.