

运动员剧烈运动后血中应激免疫抑制蛋白的产生*

邵黎娇¹ 朱晓松² 范少光

(北京医科大学生理系, 北京 1000083; ¹北京体育大学; ²北京酒仙桥医院)

摘要 我们曾经报道, 大鼠或小鼠在束缚应激后血中产生了一种能抑制免疫功能的应激免疫抑制蛋白。(又称 Neuroimmune protein, NIP, 神经免疫蛋白)。本工作证明, 运动员在大运动量的训练后血清中也产生一种能抑制淋巴细胞转化的物质, 它的生化特性及分子量与前述大鼠和小鼠中的应激免疫抑制蛋白相同。在体外实验中, 应激大鼠的血清培养人淋巴结细胞, 获得了与大鼠实验相同的结果, 即人淋巴结细胞也能产生应激免疫抑制蛋白。同时小鼠束缚应激的血清和大运动量的人类血清可以分别抑制人正常淋巴细胞和正常小鼠由 ConA 诱导的淋巴细胞转化, 以上结果表明, 这种应激免疫抑制蛋白的种属特异性不强。

关键词 应激 人类 神经免疫蛋白

* 多年来, 我们以大鼠和小鼠为研究对象证明束缚应激后血清中能产生一种抑制免疫功能的应激免疫抑制蛋白^[1], 并对它的生成机制和生物学功能作了大量研究^[2,3]。后来又证明这种应激免疫抑制蛋白来源于外周淋巴组织^[4]。为了进一步研究人体内是否也能产生类似的蛋白质, 我们以大运动量训练的运动员血清为对象进行研究, 并在体外实验中, 以应激大鼠的血清培养人正常淋巴细胞, 观察这种应激血清是否也能获得与大鼠相同的结果, 即在人淋巴细胞中诱导出这种抑制蛋白。

1 材料和方法

1.1 实验试剂与动物

植物凝血素 (PHA) 购自广州医药研究所。刀豆蛋白 A (ConA) 购自美国 Sigma 公司, ³H 胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 为北京原子能研究所产品。动物为 BALB/C 雄性小鼠, 鼠龄 6-8 周, 体重 22-25g, 由北京医科大学实验动物科学中心提供。

1.2 运动员训练方式和血清标本采集

自行车运动员 8 名, 男性, 20-23 岁, 均为国家一级运动健将。在冬训期间每天按最大运动量训练共 18 天。每人分别在训练前, 训练结束当天的第 12h 和训练结束 12 天后取静脉血, 分离血清并在 -30℃ 下贮存备用。

1.3 体外诱导生成应激免疫抑制蛋白

我们以前的研究发现, 以束缚应激 (3-10h 以上) 大鼠血清孵育正常大鼠淋巴结细胞, 孵育后收集淋巴细胞并制成提取物。结果表明, 束缚应激血清可诱导正常淋巴细胞产生应激免疫抑制蛋白^[5]。本工作以大鼠应激血清孵育人淋巴细胞, 观察人淋巴

细胞是否也能产生应激免疫抑制蛋白, 人的淋巴结取自肿瘤手术病人活检剩余部分, 标本来自腹腔网膜和纵膈淋巴结并制成单细胞悬液, 分别加入大鼠应激 10h 的血清和正常大鼠血清 (每毫升血清含 5×10^5 个淋巴细胞)。上述标本在 24 孔板中孵育 (5% CO₂, 95% 空气, 37℃) 16h, 随后用 Hank's 液洗涤 3 次, 取出孵育过的细胞, 在 0.005N 盐酸中匀浆, 离心去沉淀, 上清冷冻干燥后备用。实验时以不完全 RPM I 1640 复溶检查上述标本对正常小鼠淋巴细胞转化的影响。

1.4 淋巴细胞转化

取同品系正常 BALB/C 雄性小鼠的肠系膜周围淋巴结制成单个淋巴细胞悬液 (1.5×10^6 个/ml), 在培养液 (RPM I 1640) 中加入 ConA ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$) 及血清 (稀释度为 1:16 及 1:32), 每种血清稀释度设三复孔, 在 CO₂ 孵育箱 (5% CO₂, 95% 空气, 37℃) 中培养 42h 后, 每孔加入 ³H-TdR, 7.4kbq, 再培养 6h, 最后以多头收集器将细胞收获在玻璃纤维滤纸上, 以 β 液体闪烁仪测定放射活性 (以 cpm 值表示)。

1.5 应激小鼠血清及淋巴结提取物对人淋巴细胞转化的影响

将人淋巴结 (来源同上) 制成单细胞悬液 (1.5×10^6 个/ml)。加入不同稀释度的正常及应激小鼠血清、PHA ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) 和小鼠淋巴组织提取物, 观察应激小鼠血清及小鼠淋巴结提取物对人淋巴细胞转化的影响。

1.6 运动员训练后血清中免疫抑制物分子量测定

* 1996-11-4 收稿 1997-3-13 修回

取运动员训练前和结束后12h的血清,以 Sep-Pak C₁₈柱进行层析分离,收集水洗脱组份,冷冻干燥后以高压液相层析洗脱液复溶并进行分离,分离柱为 Zorbax GF250凝胶过滤柱,进样体积为200微升/次,洗脱液为0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0),洗脱速度为1ml/min,每0.5min 收集一管。冷冻干燥后复溶测定对淋巴细胞转化的影响。

2 结果

2.1 大运动量训练后运动员血清对正常小鼠淋巴细胞转化的影响

自行车运动员训练前、训练18天后及训练结束后12天共三次取血,以上述三种血清培养正常小鼠淋巴结细胞,观察对小鼠淋巴细胞转化的影响。培养液中 ConA 浓度为4μg/ml,血清的稀释度为1:16及1:32,淋巴细胞转化值(cpm)分别为26095 ± 4057(均值 ± 标准误,下同),42519 ± 2254; 13582 ± 3284, 36020 ± 2127; 21842 ± 4314以及42510 ± 1548。以上结果表明训练结束时与训练前相比淋巴细胞转化受到明显抑制(P < 0.01, ANOVA, n = 8);而训练结束后12天淋巴细胞转化已得到恢复,与训练前相比无差异(P > 0.05, ANOVA, n = 8)。结果说明,大运动量的应激可以使人的血清具有抑制正常小鼠淋巴细胞转化的作用(图1)。

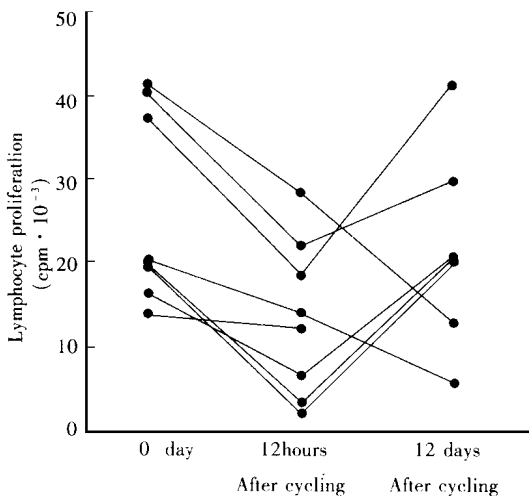


Fig. 1 Individual response of the lymphocyte proliferation to the serum from heavy physically stressed athletes

2.2 HPLC 分析

训练结束时血清标本以 HPLC 分离,结果表明第9min 洗脱物,与训练前相同管洗脱物相比明显抑制正常小鼠淋巴细胞的转化。经与标准品分子量相比较,第九管组份的分子量为140kD。其它管运动前

后 HPLC 分离洗脱物对淋巴细胞转化的影响均未见到明显差别(图2)。

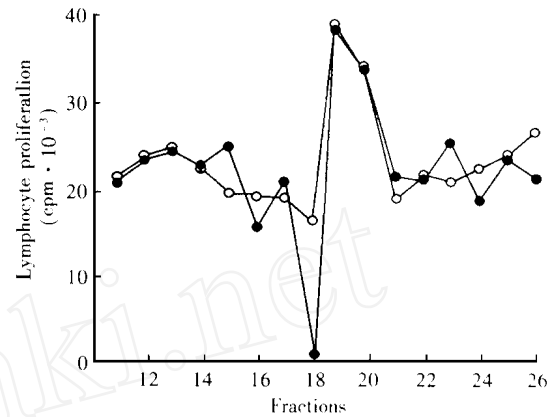


Fig. 2 Identification of the molecular weight of the serum

2.3 体外诱导实验

Tab. 1 Suppressive protein in human lymphocytes induced by incubation with stressed rat serum ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, n = 6)

Dilution	Lymphocyte proliferation (cpm)	
	Control	Stress
1:640	11249 ± 1007	7914 ± 480**
1:1280	11753 ± 663	6797 ± 469**

** P < 0.01, vs control (ANOVA).

2.4 应激小鼠血清及提取物对人淋巴细胞转化的影响

Tab. 2 Effect of the serum from stressed mice on human lymphocyte proliferation ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, n = 6)

Dilution	Lymphocyte proliferation (cpm)	
	Control	Stress
1:16	6085 ± 88	4669 ± 325**
1:32	8704 ± 494	7587 ± 466**

** P < 0.01, vs control (ANOVA).

取人淋巴结淋巴细胞制成单个细胞悬液,加入应激大鼠血清(5 × 10⁵个细胞/毫升),在 CO₂ 孵育箱中孵育16h后,以细胞匀浆制成提取物(方法见前述),检查对淋巴细胞转化的影响。对照及应激血清培养后的细胞提取物在稀释度为1:640及1:1280时,淋巴细胞转化值(cpm)分别为11249 ± 1007, 11753 ± 663; 7914 ± 480, 6797 ± 469, 两组相比差异显著(P < 0.01, ANOVA, n = 6)。说明应激大鼠血清能诱导出人淋巴细胞产生抑制淋巴细胞转化的物质(表1)。

为了检验应激小鼠的血清及淋巴结提取物抑制淋巴细胞转化的作用是否具有种属特异性,进行以下两项实验。

取人淋巴结细胞(1.5×10^6 个/ml), 分别加入对照及应激小鼠的血清及 PHA ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$), 血清的稀释度为1:16及1:32时淋巴细胞转化 (cpm) 分别为 6085 ± 88 , 8704 ± 494 及 4669 ± 325 , 7587 ± 466 , 二者相比差异显著 ($P < 0.01$, ANOVA, $n = 6$) (表2)。

应激小鼠淋巴结提取物对人淋巴细胞转化的影响。取人淋巴结细胞(1.5×10^6 个/ml, 分别加入对照和应激小鼠淋巴结提取物及 PHA ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$), 当稀释度为1:160及1:320时淋巴细胞转化值 (cpm) 分别为 973 ± 66 , 1594 ± 71 及 857 ± 46 , 1008 ± 43 。两者相比差异显著 ($P < 0.05$, ANOVA, $n = 6$)。上述两种结果表明, 应激小鼠血清及淋巴结提取物都可以抑制人淋巴细胞转化 (表3)。

Tab. 3 Effect of the lymph node extract from stressed mice on human lymphocyte proliferation ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$, $n = 6$)

Dilution	Lymphocyte proliferation (cpm)	
	Control	Stress
1:160	973 ± 66	$857 \pm 43^{**}$
1:320	1594 ± 71	$1008 \pm 43^{**}$

* $P < 0.05$, vs control (ANOVA).

3 讨论

我们室以前的工作证明束缚应激大鼠和小鼠的血清可以抑制正常 T 淋巴细胞由 ConA 诱导的转化反应, 并证明这是由一种大分子 (155及370kD) 的蛋白质所引起, 后来证明这种蛋白质来源于外周淋巴组织, 究竟人类应激后是否也能产生与大鼠和小鼠类似的应激免疫抑制蛋白, 一直是我们想要回答

的问题。近来北京体育大学与我们合作进行了研究。结果表明, 人大负荷运动 (应激) 时血清内也能产生一种抑制物抑制由 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化。进一步的结果表明这种抑制物的分子量为 140kD, 溶于水, 与我们在大鼠和小鼠体内发现的大分子抑制蛋白基本一致。本工作还证明, 小鼠应激血清及淋巴结提取物也能抑制人类淋巴细胞的转化。体外实验也证明, 大鼠应激血清孵育人淋巴细胞能使人类淋巴细胞产生应激免疫抑制蛋白, 上述结果从不同角度提示, 人类和动物产生的应激免疫抑制蛋白在生化特性和功能上有类似之处, 说明这种蛋白的种属特异性不强。

4 参考文献

1. Zha H B, Ding G F, Fan, S G. Serum factor(s) induced by restraint stress in mice and rats suppresses lymphocyte proliferation. *Brain Behavior, and Immunity* 1992; 6: 18- 31
2. 李怡凡, 左永昌, 邵黎, 等. 脑室注射白细胞介素1对淋巴细胞应激免疫抑制因子生成的影响. *药理学报* 1995; 30: 395- 399
3. 刘薇, 左永昌, 丁桂凤. 束缚应激血清抑制因子对免疫细胞功能的影响. *北京医科大学学报* 1995; 27: 150
4. 邵黎, 高珊, 孙长伟, 等. 束缚应激能引起淋巴结及脾脏细胞产生抑制淋巴细胞转化的因子. *科学通报* 1995; 42(2): 166- 168
5. 李怡凡, 等. 体外诱导产生束缚应激免疫抑制蛋白的研究 (待发表)

GENERATION OF SUPPRESSIVE PROTEIN AFTER HEAVY PHYSICAL STRESS IN ATHLETES

Shao Li Jiao Wei Zhu Xiaosong Fan Shaogung
(Department of Physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT

Our previous work showed that under the condition of restraint stress and the control of central nervous system, a suppressive protein (neuroimmune protein, NIP) was generated in peripheral lymph tissue and released into the blood stream, which acts as an immune suppressor. In the present study the serum from the athletes performed a heavy athletic training for 18 days was also able to suppress the lymphocyte proliferation of normal mice. The molecular weight of the suppressive factor in athlete serum determined by gel filtration HPLC was similar to that in mice and rats. In vitro experiment, the normal human lymphocytes were incubated with the serum from restraint stressed rats for 12h and then the extract of human

lymphocyte was made for testing the effect on normal lymphocyte proliferation. The result showed that it suppressed normal mouse lymphocyte proliferation. This result was similar to our previous experiment by using normal mouse lymphocyte incubated with the rat serum treated with restraint stress. It was also found that the serum and the extract of lymph node from restraint stressed mice suppressed human lymphocyte proliferation induced by PHA. The results suggest that suppressive protein induced by stress in mice and rats could also be induced in human beings and there is no distinct species specificity among them.

KEY WORDS stress; athlete; neuroimmune protein (NIP)

别嘌呤醇对急性运动后骨骼肌丙二醛(MDA)的影响

周丽波¹ 徐东青

(包头医学院病理生理教研室, 包头 014010; ¹天津体育学院运动生理研究所)

运动时自由基生成主要来源是线粒体的半醌和组织上皮细胞的黄嘌呤氧化酶(XO)。关于XO介导自由基生成对机体构成的损害已为许多缺血-再灌注研究所证实。但有关XO对运动性自由基产生的作用并没有直接证据。本实验观察了大鼠递增负荷运动至力竭后即刻和24h后骨骼肌MDA含量的变化和服用黄嘌呤氧化酶抑制剂—别嘌呤醇后MDA含量的变化,以探讨运动性自由基产生的机制。

1 材料与方 法

雄性 Sprague-Dawley 大鼠36只, 体重230-260g, 随机分为未服药组和服药组, 每组18只。再分为安静组, 运动后即刻组和运动后24h组, 每组6只, 分笼饲养, 自由饮食。所有服药组动物于实验前48h, 24h, 1h以50mg/kg灌服别嘌呤醇。运动方式采用Bedfore建立的递增负荷运动至力竭的模型略加改动, 按以下五级负荷程序, 1级: 5°/6m/min, 15min(相当于53%VO_{2max})

2级: 5°/15m/min, 15min(相当于62%VO_{2max}) 3级: 5°/20m/min, 15min(相当于64%VO_{2max}) 4级: 5°/24m/min, 15min(相当于68%VO_{2max}) 5级: 5°/28m/min, 至力竭(相当于72%VO_{2max})。实验总运动时间为90±27min, 运动时使用适当刺激以保证运动速度。

分别于相应时刻, 用2.5%苯巴比妥50mg/kg腹腔麻醉动物, 迅速取出腓肠肌用于MDA的测定。肌肉组织在冰浴条件下制成匀浆。采用Yagi等的组织脂质过氧化物测定方法。离心后取上层液于HITACHI-650型荧光分光光度计Ex515nm, Em553时测定荧光强度, 分别按公式计算MDA含量(nmol/mg湿重)

按常规方法进行统计学处理, 显著水平定为0.05。对服药组和未服药组运动后骨骼肌含量进行相关分析。

2 结果与讨论

未服药组安静时MDA值为178.54±12.76nmol/mg, 在运动后即刻最高204.06±21.05nmol/mg, 24h后略有下降(194.83±9.49nmol/mg)但仍显著高于对照($P < 0.05$)。

服药组安静时MDA值为176.42±10.25nmol/mg, 运动后即刻增高200.47±19.56nmol/mg, 较未服药组相应时刻没有明显改变($P > 0.05$)。运动后24h服药组MDA为186.08±18.63nmol/mg, 和相应时刻未服药组相比下降较为明显, 但无统计学意义($P > 0.05$)。

XO在代谢紧张时是介导自由基产生的重要途径, 这已为许多缺血-再灌注研究所证实。剧烈运动后代谢应激与缺血-再灌注损伤有许多相似之处, 但不同的是, 较大强度运动时, 机体处于相对乏氧期, 运动中ATP并非由于机制性缺氧, 而是需求大于生成。本实验的动物模型采用递增负荷运动, 可以引起线粒体呼吸链酶活性下降, 导致电子传递受阻, O₂生成增多。同时, 由于ATP相对不足黄嘌呤氧化酶(XO)也可能参与自由基的生成, 造成运动后骨骼肌脂质过氧化水平增高, 但是XO的作用可能在恢复期更加明显, 此时氧的供应更加充足。

以上结果可以看出, 剧烈运动后, 组织中的自由基增多并导致脂质过氧化水平同时增高, 别嘌呤醇对恢复期的自由基生成有一定抑制作用, 但就整个运动过程来说并不明显。我们推测递增负荷性运动后自由基的增多并由此而致的脂质过氧化可能以线粒体呼吸链机制为主, 而黄嘌呤氧化酶的作用似乎并不主要。

(1996-10-17收稿 1997-7-14修回)