



临沂大学学术专著

LINYIDAXUE XUESHU ZHUANZHU

YUNDONG YOUDAO DASHU MIANYIXIBAO DIAOWANG JI JIZHI YANJIU

运动诱导大鼠免疫细胞凋亡 及机制研究

王雪芹
著

山东人民出版社

国家一级出版社 全国百佳图书出版单位

YUNDONG YODAO DASHU MIANYIXIBAO DIAOWANG JI JIZHI YANJIU

运动诱导大鼠免疫细胞凋亡 及机制研究

王雪芹 著

山东人民出版社

国家一级出版社 全国百佳图书出版单位

图书在版编目 (CIP) 数据

运动诱导大鼠免疫细胞凋亡及机制研究 / 王雪芹著.
—济南: 山东人民出版社, 2016.3

ISBN 978-7-209-09334-7

I. ①运… II. ①王… III. ①运动—影响—鼠科—免疫细胞—凋亡—研究 IV. ①Q959.837.02

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 298155 号

运动诱导大鼠免疫细胞凋亡及机制研究

王雪芹 著

主管部门 山东出版传媒股份有限公司

出版发行 山东人民出版社

社 址 济南市胜利大街 39 号

邮 编 250001

电 话 总编室 (0531) 82098914

市场部 (0531) 82098027

网 址 <http://www.sd-book.com.cn>

印 装 山东华立印务有限公司

经 销 新华书店

规 格 16 开 (169mm × 239mm)

印 张 16

字 数 230 千字

版 次 2016 年 3 月第 1 版

印 次 2016 年 3 月第 1 次

ISBN 978-7-209-09334-7

定 价 38.00 元

如有印装质量问题, 请与出版社总编室联系调换。

前 言

竞技运动是体育的重要组成部分,它是以创造优异运动成绩,夺取比赛优胜为主要目标的社会体育活动。在竞技运动中,运动员的身体状况,尤其是运动员的机体免疫状况与优异的运动成绩密切相关。国内外的运动免疫学研究业已证实,长期从事大强度的运动训练可以产生非常明显的运动性免疫抑制现象,这种现象不仅直接影响运动员的正常训练工作以及比赛的成绩,而且直接影响运动员的运动寿命甚至身体健康。

运动免疫学中大量的人体和动物实验结果证实,长期从事大强度运动对免疫机能的负性影响包括:(1)淋巴细胞数量显著减少;(2)淋巴细胞增殖能力明显降低;(3)主要免疫球蛋白及补体含量显著降低;(4)免疫因子的能力减低;(5)黏膜免疫功能降低;(6)巨噬细胞的抗原提呈作用降低等,负性地影响着细胞免疫和体液免疫反应过程。

可见,运动员出现运动性免疫抑制现象时,其免疫功能会显著降低,对各种感染性疾病的抵抗力会明显降低。鉴于此,深入研究运动性免疫抑制现象发生与发展的生物学机制,改善免疫功能低下问题,是一个非常重要的课题。

鉴于国内外目前尚无有关运动性免疫抑制发生与发展过程中胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡及其机理方面的系统研究,本书采用研究团队十几年研究建立的运动性免疫抑制动物模型——6周递增负荷运动模型,探讨运动性免疫抑制发生与发展过程中,大鼠胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞的凋亡情况及凋亡机制,旨在为运动员和大众健

身人员的运动性免疫机能失衡提供基础实验和理论支持。因此,运动状态下免疫机能的研究具有深远的现实意义。

一、主要研究内容

1. 运动与胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的研究背景

在整理胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的相关资料、运动与胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的相关资料和细胞凋亡机制等方面的资料的基础上,分析运动对胸腺细胞凋亡的影响及机制,以便进一步探讨运动对胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的影响及其凋亡的机制。

2. 六周递增负荷运动过程中,大鼠胸腺细胞的凋亡情况

通过 HE 染色和 TUNEL 等方法观察 SD 大鼠胸腺结构变化及胸腺细胞的凋亡情况,从形态学水平观察六周递增负荷运动对胸腺结构及胸腺细胞凋亡情况的影响。

3. 六周递增负荷运动过程中,大鼠胸腺细胞凋亡的 Fas/FasL 信号转导途径机制

通过免疫组化和实时荧光定量 RT-PCR 等实验方法,观察六周递增负荷运动过程中, Fas/FasL 信号转导途径上的主要信息分子 Fas、FasL、caspase-8、caspase-3 等的变化情况,探讨六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的 Fas/FasL 信号转导途径机制。

4. 六周递增负荷运动过程中,大鼠胸腺细胞凋亡的线粒体信号转导途径机制

本研究通过免疫组化、实时荧光定量 RT-PCR、流式细胞术和 ELISA 等实验,观察六周递增负荷运动过程中,线粒体信号转导途径上主要的信号分子线粒体膜电位、Bid、Bax、Bcl-2 和 Cyt-C 等的变化,探讨六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的线粒体信号转导途径机制,及六周递增负荷运动过程中, Fas/FasL 信号转导途径与线粒体信号转导途径的关系。

5. 六周递增负荷运动过程中,大鼠脾细胞凋亡及线粒体信号转导途径

机制

本研究通过MTT法、实时荧光定量RT-PCR和流式细胞术等实验方法,观察六周递增负荷运动过程中,线粒体信号转导途径上主要的信号分子线粒体膜电位、Bax和Bcl-2等的变化,计算脾脏系数和测定脾淋巴细胞增殖活性,并探讨六周递增负荷运动诱导脾细胞凋亡的线粒体信号转导途径机制。

6. 六周递增负荷运动过程中,大鼠小肠集合淋巴结细胞凋亡及线粒体信号转导途径机制

本研究主要通过实时荧光定量RT-PCR和流式细胞术等实验方法,观察六周递增负荷运动过程中,小肠集合淋巴结细胞线粒体膜电位、Bax和Bcl-2等的变化,并探讨六周递增负荷运动诱导小肠集合淋巴结细胞凋亡的线粒体信号转导途径机制。

二、研究目标

1. 六周递增负荷运动对胸腺细胞凋亡的影响,通过TUNEL等研究方法,计算胸腺细胞的凋亡指数,研究长期大强度运动对胸腺细胞凋亡的影响。

2. 六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的Fas/FasL信号转导途径机制,即用先进的实验手段和仪器,以及免疫组化、实时荧光定量RT-PCR和ELISA等实验方法分析解释六周递增负荷运动过程中,胸腺细胞凋亡的Fas/FasL信号转导途径机制。

3. 六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的线粒体信号转导途径机制,即用先进的实验手段和仪器,以及免疫组化、实时荧光定量RT-PCR和流式细胞术等实验方法分析解释六周递增负荷运动过程中,胸腺细胞凋亡的线粒体信号转导途径机制。

4. 六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的情况、Fas/FasL信号转导途径和线粒体信号转导途径上各指标的相关性研究。

5. 六周递增负荷运动诱导脾细胞凋亡的线粒体信号转导途径机制,即用先进的实验手段和仪器,以及实时荧光定量RT-PCR和流式细胞术等

实验方法分析解释六周递增负荷运动过程中,脾细胞凋亡的线粒体信号转导途径机制。

6. 六周递增负荷运动诱导小肠集合淋巴结细胞凋亡及机制,即用先进的实验手段和仪器,以及实时荧光定量 RT-PCR 和流式细胞术等实验方法分析解释六周递增负荷运动过程中,小肠集合淋巴结细胞的凋亡及机制。

三、创新点

国内外目前尚无有关运动性免疫抑制发展过程中胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡及其机理方面的系统研究。因此,本实验研究聚焦于此,希冀从胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的视角探讨运动性免疫抑制的机理。

1. 六周递增负荷运动对大鼠胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的影响

六周递增负荷运动模型是本研究团队经过十几年的研究成功建立的运动性免疫抑制动物模型,以六周递增负荷运动为运动性免疫抑制模型进行胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的研究是本课题组独有的。研究发现,六周递增负荷运动诱导胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡增加,且运动时间越长,运动强度越大,胸腺细胞凋亡越显著。

2. 六周递增负荷运动诱导大鼠胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的机制研究

六周递增负荷运动诱导大鼠胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的 Fas/FasL 信号转导途径机制和线粒体信号转导途径机制研究是相关研究中最系统的。研究发现,六周递增负荷运动诱导胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡过程中激活了 Fas/FasL 信号转导途径和线粒体信号转导途径。

3. 研究中综合运用多种方法,有的指标在不同研究方法下得出的结果得到了相互验证

本书采用 TUNEL、免疫组化、实时荧光定量 RT-PCR、流式细胞术

和 ELISA 等实验方法对六周递增负荷运动过程中大鼠胸腺细胞凋亡及凋亡机制进行研究,方法多样。另外, Fas、FasL、Bax 和 Bcl-2 等主要基因采用两种方法进行研究,得出研究结果相一致,即结果得到了相互验证。

四、结论与展望

1. 研究结论

(1) 六周递增负荷运动过程中,大鼠胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡程度呈进行性增加,胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡对各周负荷强度的应答性反应也随着运动强度的递增出现递增趋势。另外,胸腺呈进行性萎缩,提示长期递增负荷运动过程中胸腺细胞凋亡增加是胸腺萎缩、胸腺功能降低、运动性免疫抑制发生发展的机制之一。

(2) 通过观察 Fas/FasL 信号转导途径上相关信号分子的变化,在运动性免疫抑制发生发展过程中,大鼠胸腺及小肠集合淋巴结组织 Fas mRNA 和 FasL mRNA 表达及 Fas、FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达增加,且胸腺细胞凋亡指数与 FasL 和 Caspase-8 蛋白表达存在高度正相关,与 Fas mRNA、FasL mRNA 表达和 Fas、Caspase-3 蛋白表达存在中度正相关。这表明六周递增负荷运动诱导胸腺细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡增加的过程中激活了 Fas/FasL 凋亡信号转导途径,且 Fas/FasL 凋亡信号转导途径在运动性免疫抑制发生发展过程中扮演着重要角色。

(3) 通过观察线粒体信号转导途径上相关信号分子的变化,在运动性免疫抑制发生发展过程中,Bax 基因和蛋白表达明显增加,Bid 浓度增加,Cyt-C 蛋白表达增加,而 Bcl-2 基因和蛋白表达降低,胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞线粒体膜电位降低。且胸腺细胞凋亡指数与 $\Delta \Psi_m$ 存在高度负相关,与 Bcl-2 mRNA 和 Bcl-2 蛋白表达存在中度负相关;胸腺细胞凋亡指数与 Bax mRNA、Bax 和 Bid 存在高度正相关,与 Cyt-C 蛋白表达存在中度正相关。这表明六周递增负荷运动诱导胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡增加的过程中激活了线粒体凋亡信号转导途径,且线粒体凋亡途径在长期大强度运动诱导大鼠胸腺细胞、脾细胞及小

肠集合淋巴结细胞凋亡增加中起着重要作用。

(4) 六周递增负荷运动过程中, 大鼠胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡增加主要是通过 Fas/FasL 凋亡信号途径与线粒体凋亡信号途径共同作用实现的, 且两条途径间的相关信号分子 Bid 浓度变化显著, Fas/FasL 信号途径可通过激活 Bid 来放大线粒体凋亡途径的回路, 提示在六周递增负荷运动过程中 Fas/FasL 凋亡信号转导途径与线粒体凋亡信号转导途径之间是相联系的。

总之, 在长期递增负荷运动过程中, 胸腺细胞凋亡增加是胸腺萎缩、胸腺功能降低的机制之一, 胸腺细胞的凋亡是通过 Fas/FasL 信号转导途径和线粒体信号转导途径两条途径介导的, 且两条途径之间是有联系的。所以了解胸腺细胞凋亡及凋亡机制, 有助于进一步认识长期递增负荷运动对中枢免疫器官胸腺的影响, 从而更进一步了解运动性免疫抑制发生发展的机理。

另外, 在长期递增负荷运动过程中, 脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡增加也可能是通过 Fas/FasL 信号转导途径和线粒体信号转导途径两条途径介导的, 且两条途径之间是有联系的, 所以了解脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡及凋亡机制, 有助于进一步认识长期递增负荷运动对脾及小肠集合淋巴结的影响。

2. 研究展望

通过本研究, 作者认为以下三个方面的问题需进一步做深入研究。

(1) 对于六周递增负荷运动诱导胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡增加的机制研究。在进一步的研究中, 可以采用基因敲除的相关动物进行研究验证, 如 Fas 基因敲除后, 胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞的凋亡情况, Bax 基因敲除后, 胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞的凋亡情况等, 来验证 Fas/FasL 信号转导途径和线粒体信号转导途径在胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡中的作用。

(2) 对于六周递增负荷运动诱导胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡增加的机制研究。在进一步的研究中, 还可以采用基因阻断

的方法进行研究验证,如阻断 Fas 基因表达后,胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞的凋亡情况,阻断 Bax 基因表达后,胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞的凋亡情况等,来验证 Fas/FasL 信号转导途径和线粒体信号转导途径在胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡中的作用。

(3) 研究六周递增负荷运动诱导胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡及机制,目的在于了解长期大强度运动对机体免疫机能的影响,进而找出机理,为运动性免疫抑制的调理提供理论支持,所以从胸腺细胞、脾细胞及小肠集合淋巴结细胞凋亡的机制中找出运动性免疫抑制的调理思路,将其应用到运动员的免疫抑制调理中去是后面工作的重点和新的研究方向。

目 录

前 言	1
第一章 绪 论	1
1.1 选题背景与研究意义	1
1.2 研究思路与研究方法	4
1.2.1 研究思路	4
1.2.2 研究方法	6
1.3 研究内容与结构	7
1.3.1 研究内容	7
1.3.2 基本结构	8
第二章 研究现状综述	9
2.1 运动与免疫系统概述	9
2.1.1 免疫器官	9
2.1.2 免疫细胞	11
2.1.3 免疫分子	13
2.1.4 免疫系统的功能	13
2.1.5 运动与免疫系统	14
2.2 运动与免疫细胞凋亡	24
2.2.1 细胞凋亡概述	24

2.2.2	运动与免疫细胞凋亡	27
2.3	运动、Fas/FasL 信号转导途径与胸腺细胞凋亡	32
2.3.1	Fas/FasL 信号转导途径相关信号分子介绍	33
2.3.2	Fas/FasL 系统的生物学特性	34
2.3.3	Fas 介导的细胞凋亡途径	35
2.3.4	胸腺细胞凋亡与 Fas/FasL 信号转导途径的相关研究	36
2.3.5	运动诱导胸腺细胞凋亡与 Fas/FasL 信号转导途径的 相关研究	38
2.3.6	小结	38
2.4	运动、线粒体信号转导途径与胸腺细胞凋亡	39
2.4.1	线粒体信号转导途径中的相关信号分子介绍	39
2.4.2	线粒体信号转导途径	41
2.4.3	胸腺细胞凋亡与线粒体信号转导途径的相关研究	42
2.4.4	运动诱导胸腺细胞凋亡与线粒体信号转导途径的 相关研究	43
2.4.5	小结	45
2.5	运动与脾淋巴细胞	45
2.5.1	运动对脾脏系数的影响	46
2.5.2	运动对 T 淋巴细胞的影响	47
2.6	运动与脾淋巴细胞凋亡及机制	55
2.6.1	脾细胞凋亡的概述	55
2.6.2	运动与脾细胞凋亡	58
2.6.3	脾细胞凋亡的机制分析	59
2.7	小肠派尔集合淋巴结细胞、凋亡及机制	60
2.7.1	小肠派尔集合淋巴结	60
2.7.2	运动对小肠集合淋巴结细胞的影响	61
2.7.3	小肠集合淋巴结细胞、凋亡及机制	62

第三章	六周递增负荷运动过程中大鼠胸腺细胞的凋亡情况	88
3.1	检测方法评述	89
3.1.1	实验材料和实验方法	89
3.2	六周递增负荷运动过程中大鼠胸腺细胞凋亡的 相关研究结果	95
3.2.1	实验结果	95
3.3	实验结果的分析讨论与总结	98
3.3.1	分析与讨论	98
3.3.2	小结	103
第四章	六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的 Fas/FasL 信号 机制研究	106
4.1	检测方法评述	108
4.1.1	实验材料与方法	108
4.1.2	数据分析	113
4.2	六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的 Fas/FasL 信号 机制的相关研究结果	114
4.2.1	实验结果	114
4.3	实验结果的分析讨论与总结	127
4.3.1	分析与讨论	127
4.3.2	小结	137
第五章	六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的线粒体信号转导 途径机制研究	142
5.1	检测方法评述	143
5.1.1	实验材料与方法	143
5.1.2	数据分析	151

5.2	六周递增负荷运动诱导胸腺细胞凋亡的线粒体机制	
	相关研究结果	151
5.2.1	实验结果	151
5.3	实验结果的分析讨论与总结	166
5.3.1	分析与讨论	166
5.3.2	小结	179
第六章	六周递增负荷运动诱导脾脏细胞凋亡的线粒体机制研究	185
6.1	检测方法评述	186
6.1.1	实验材料与方法	186
6.1.2	数据分析	194
6.2	六周递增负荷运动诱导脾脏细胞凋亡的线粒体	
	机制研究结果	194
6.2.1	实验结果	194
6.3	实验结果的分析讨论与总结	200
6.3.1	分析与讨论	200
6.3.2	小结	208
第七章	六周递增负荷运动诱导小肠集合淋巴结细胞凋亡的	
	线粒体机制研究	212
7.1	检测方法评述	212
7.1.1	实验材料与方法	212
7.1.2	数据分析	218
7.2	六周递增负荷运动诱导小肠集合淋巴结细胞凋亡的	
	线粒体机制相关研究结果	219
7.2.1	实验结果	219
7.3	实验结果的分析讨论与总结	226
7.3.1	分析与讨论	226

7.3.2 小结	232
第八章 结论与问题	237
8.1 结论与创新点	237
8.1.1 结论	237
8.1.2 创新点	239
8.2 问题与展望	239
后 记	240

第一章 绪 论

1.1 选题背景与研究意义

运动性免疫抑制现象一直是运动免疫学和运动训练学中关注的一个重要问题。长期从事大强度运动训练会导致运动性免疫抑制现象的出现,不管在运动员的训练中还是一般人的体育锻炼中,都存在这种现象,而运动性免疫抑制现象的出现会影响到运动员的成绩、身体健康及运动寿命,也会影响到体育锻炼者的身体健康等。因此,研究运动性免疫抑制现象的机理具有非常重要的意义,本书研究了运动性免疫抑制发生发展过程中胸腺细胞、脾细胞和小肠集合淋巴结细胞的凋亡情况及凋亡机制,希冀从中探讨运动性免疫抑制的机理。

运动免疫学研究业已证实,长期从事大强度的运动训练,会发生强烈的运动性免疫抑制现象。大量人体和动物实验结果证实,长期从事大强度运动对免疫机能有非常强烈的负性影响,表现在淋巴细胞数量减少,亚群改变,免疫平衡受到破坏;淋巴细胞增殖能力明显降低,细胞毒性降低,表明细胞免疫功能受损;主要免疫球蛋白及补体含量降低;中性粒细胞吞噬作用降低;大负荷运动降低巨噬细胞的抗原提呈及 MHC 的表达等,大强度运动训练对细胞和体液免疫有明显的负性作用。

本研究团队在运动免疫抑制方面已经做了大量的研究,发现运动性免疫抑制发生与发展过程中,随着运动强度的加大和运动周数的递增,大鼠出现了运动性免疫抑制现象,且这种免疫抑制程度呈现进行性加深;鼻黏

膜出现不同程度的损害；骨髓结构破坏，功能区紊乱；T细胞的增殖转化能力明显下降；且胸腺随运动负荷和周数延长而出现进行性的萎缩和胸腺皮质、髓质的交叉与融合；胸腺细胞早期发育阶段的 DN3 和 DN4 细胞数量下降， $CD4^+CD8^+DP$ 细胞减少，胸腺 $CD4^+/CD8^+$ 比例下降。与胸腺细胞的分化、发育、成熟及凋亡有关的蛋白质表达发生显著变化，Annexin-1、TPM3、Actin-like 表达上调，PKCSH、YUBB5、TPM4、PP1G、RCCP7、KRT17、SEPHS1、PGK1 和 LSHB 表达下调等。表明长期递增负荷运动使机体细胞免疫功能明显受损，整体免疫机能下降；促使胸腺出现进行性萎缩，胸腺功能降低等。

国内外的研究显示：（1）一次性力竭运动对胸腺细胞、脾细胞凋亡的影响。李靖等采用大鼠一次性力竭游泳运动方案，发现与安静组相比，运动后即刻组大鼠的胸腺细胞凋亡率升高。Concordet 等让 Wistar 大鼠进行力竭训练，发现无论两次力竭、一次力竭训练，胸腺细胞 DNA 测定都表现出来凋亡特征。Lin 等让大鼠以 $13.8\text{m/min} \times 60-90\text{min/d}$ 的强度连续运动两天，观察到典型的胸腺细胞 DNA 断裂等细胞凋亡特征。Quadrilatero 等给 88 个雌性 C57BL/6 小鼠跑台运动 90min，2 度斜坡（ 22m/min ， 25m/min ， 28m/min 各 30min），运动后立即处死或运动后 24h 处死，发现与安静组相比，运动后即刻组小鼠分离的胸腺细胞显示一个早期凋亡迹象；运动后 24h，胸腺细胞数目减少 50%。即一次力竭性运动会使胸腺细胞凋亡增加。（2）长时间大强度运动对胸腺细胞凋亡的影响。李靖等研究发现，训练+力竭运动组及力竭运动组胸腺细胞凋亡率均显著高于安静组，且训练+力竭运动组显著高于力竭运动组。李德锋研究发现，四周的模拟高原训练（间歇性低氧训练）使大鼠胸腺细胞凋亡增加。刘勇让大鼠以 25m/min 的速度进行四周的运动训练，运动后进行不同持续时间的低氧暴露，发现常氧运动组、运动后暴露 8h 组和运动后暴露 12h 组大鼠胸腺细胞凋亡都明显高于安静组。即长时间大强度运动也会导致胸腺细胞凋亡增加。

王安利（2001 年）采用流式细胞仪技术，较系统地观察了不同年龄、不同运动负荷对小鼠免疫细胞凋亡的影响。发现 6 月龄小鼠、12 月龄小鼠