

## 长期递增负荷运动对小肠集合淋巴结结构及 淋巴细胞凋亡的影响

覃飞, 郝选明

(华南师范大学 体育学院, 广东 广州 510006)

**摘 要:** 观察 6 周递增负荷运动中, 大鼠小肠集合淋巴结(PP 结)形态结构及淋巴细胞凋亡的基本特征。雄性 SD 大鼠 64 只, 运动组进行 6 周递增负荷跑台运动, 分别在第 0、2、4、6 周末观察小肠 PP 结个数和 PP 结形态学变化, 并通过淋巴细胞 Bax、Bcl-2 表达和 SOD、MDA 水平探讨对淋巴细胞凋亡的影响。结果表明: 1)PP 结数目呈现先下降后回升的变化趋势。2)PP 结结构改变主要发生在生发中心及拱顶区(B cell 区), 第 2~4 周 PP 结生发中心出现断裂带, 拱顶顶部出现空泡, 第 6 周有所恢复。3)Bax 与 Bcl-2 比值升高, 提示淋巴细胞凋亡增多, 且主要发生在 PP 结生发中心。4)运动应激性自由基生成可能是肠道淋巴结细胞凋亡的机制之一。

**关 键 词:** 运动生物化学; 运动免疫; 免疫组织化学; 小肠集合淋巴结; 淋巴细胞凋亡; 自由基  
中图分类号: G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2012)01-0134-05

### Effects of exercising with a chronically increasing load on the structure and lymphocyte apoptosis of Peyer's patches

QIN Fei, HAO Xuan-ming

(School of Physical Education, South China Normal University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** In order to observe the basic characteristics of the morphological structure and lymphocyte apoptosis of Peyer's patches of rats during 6-week exercising with an increasing load, the authors divided 64 male SD rats into an exercise group and a control group, put the rats in the exercise group on a treadmill for 6-week exercising with an increasing load, observed the change of the number of Peyer's patches and the morphological change of Peyer's patches at the end of weeks 0, 2, 4 and 6 respectively, and probed into the effects of the expressions of lymphocytes Bax and Bcl-2 and the levels of SOD and MDA on lymphocyte apoptosis. The authors revealed the following findings: 1) the number of Peyer's patches showed a trend of decreasing followed by increasing; 2) the change of the structure of Peyer's patches mainly occurred in the germinal center and the dome zone (B cell zone); in weeks 2~4, rupturing belts appeared in the germinal center of Peyer's patches, bubbles appeared at the top of the dome, the conditions were somewhat restored in week 6; 3) the ratio of Bax to Bcl-2 increased, which suggested that lymphocyte apoptosis increased, and mainly occurred in the germinal center of Peyer's patches; 4) the generation of free radicals induced by exercising may be one of the mechanisms of intestinal lymphocyte apoptosis.

**Key words:** sports biochemistry; sports immunity; immunohistochemistry; Peyer's patch; lymphocyte apoptosis; free radical

肠道不仅是消化、吸收营养物质的重要场所, 而且是体内重要的淋巴器官。肠黏膜屏障功能损害、抗

体分泌不足可引起一系列消化道症状(恶心、呕吐、腹泻、食欲下降等)。小肠集合淋巴结(Peyer patches, PP

收稿日期: 2011-10-18

基金项目: 广东省自然科学基金(9151063101000059)。

作者简介: 覃飞(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 运动免疫。通讯作者: 郝选明教授。

结)是免疫应答的诱导和活化部位,沿小肠纵向分布,由多个富含淋巴细胞的淋巴滤泡集结而成,是浆细胞前体细胞的重要来源。其淋巴细胞最终离开 PP 结归巢到肠黏膜固有层,进一步分化为成熟浆细胞并分泌 IgA 发挥免疫效应<sup>[1]</sup>。

关于长期运动训练对肠道黏膜免疫诱导部 Peyer 氏结构及其淋巴细胞凋亡的影响,迄今尚未见详细报道。本实验旨在运用大鼠运动模型,观察长期递增负荷对肠道 PP 结构以及淋巴细胞凋亡的影响,从理论上探讨运动影响肠道免疫的机理,从实践上为运动训练和健身运动提供免疫学基础。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 研究对象与分组

SPF 级雄性 SD 大鼠(8 周龄,体重 180~200 g)64 只(购自广州中医药大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2008-0020;NO:0043379,粤监证字 F2008A002),随机分为实验组 and 对照组。对照组(Absolute control, AC)32 只,正常喂养,每次训练置于跑台中但不运动,用于判别大鼠生长对实验指标的影响。结果发现,对照组各指标各周之间没有显著性差异( $P>0.05$ ),表明 6 周生长对这些指标无显著性影响。实验组 32 只,进行 6 周递增负荷训练,分别于第 0、第 2、第 4 和第 6 周各周末取脏器并测试相关指标。

### 1.2 运动方案

采用 6 周递增负荷模型<sup>[2-4]</sup>:大鼠跑台运动,匀速,坡度为 0°,每次 30 min,每天 1 次,每周 6 d(周日休息)。负荷强度为:适应性运动(10 m/min)1 周后,负荷递增至 20 m/min。随后,每周递增负荷增量 5 m/min。至第 6 周,达到 40 m/min。

### 1.3 主要试剂

Bax、Bcl-2 一抗(Santa, 美国),羊抗兔二抗试剂盒、DAB 显色(北京中杉金桥),SOD 活性检测试剂盒、MDA 含量检测试剂盒、考马斯亮蓝蛋白定量检测试剂盒(南京建成)。

### 1.4 检测指标及方法

#### 1)PP 结计数。

无菌取大鼠全段小肠,计数每只大鼠小肠 PP 结个数。

#### 2)PP 结形态光学显微镜观察。

于回盲部向近心端 10 cm 处切取回肠组织后,冰生理盐水冲洗肠腔,于小肠肠壁上切取 PP 结。质量分数 10%中性甲醛溶液进行固定;常规乙醇梯度脱水,石蜡包埋切片,片厚 3  $\mu\text{m}$ ,HE 染色,中性树脂封片,镜下观察 PP 结生发中心、淋巴细胞形态特征及有

炎症。

#### 3)PP 结淋巴细胞 Bax 和 Bcl-2 免疫组化染色检测。

采用 SABC 法进行免疫组化染色,DAB 显色,常规脱水、透明、封固。在 10 $\times$ 10、40 $\times$ 10 倍的光镜视野下,分别对相邻切片的 Bcl-2、Bax 染色阳性细胞进行统计。显微镜下胞浆有棕色颗粒者为阳性细胞,运用 Imagepro plus 软件进行阳性面积定量分析,得出 IOD(积分光密度)、Area(阳性面积),通过  $\text{density}=\text{IOD}/\text{Area}$  计算出平均光密度,每张切片中采集 5 个视野。

#### 4)SOD 活性和 MDA 含量测定。

将 PP 结用生理盐水研磨制成 5%组织匀浆,检测 MDA(硫代巴比妥酸法),1%组织匀浆用 SOD 活力检测(黄嘌呤氧化酶法)。

#### 5)数据的统计学处理。

所有数据用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,用 SPSS Statistics 17.0 统计软件进行统计处理;组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)进行分析。显著性水平取  $P<0.05$ 。

## 2 结果及分析

### 2.1 长期递增负荷运动对 PP 结形态结构及个数的影响

#### 1)PP 结形态结构变化。

HE 染色光镜观察:6 周递增负荷运动对大鼠 PP 结滤泡旁区影响不大,结构变化主要发生在滤泡(生发中心)及拱顶区(见图 1)。

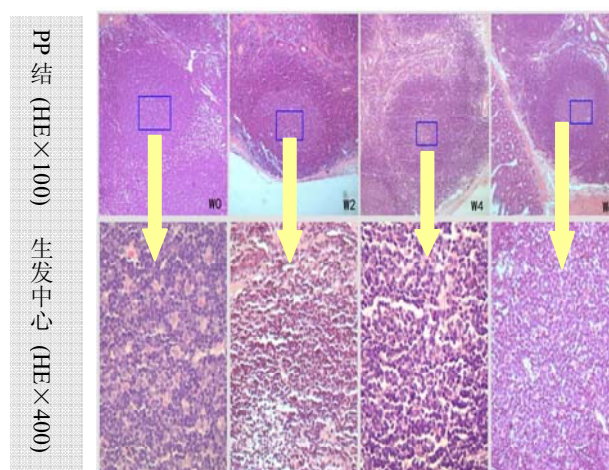


图 1 PP 结组织结构适应性变化

0 周时大鼠 PP 结组织结构清晰,未见炎症细胞浸润,只有个别滤泡生发中心轻微扩大且生发中心淋巴细胞分布均匀。2 周时 PP 结组织滤泡生发中心扩大且出现断裂带,拱顶顶部有空泡出现;滤泡区靠肠壁处,

出现空隙。4 周与 2 周时相比只有个别滤泡生发中心扩大，扩大程度与 0 周时相似，但在其生发中心依然可见断裂带，拱顶顶部存在空泡。6 周时生发中心扩大，且中心断裂带消失，淋巴细胞排列均匀，拱顶顶部空泡与 2、4 周时相比基本消失。

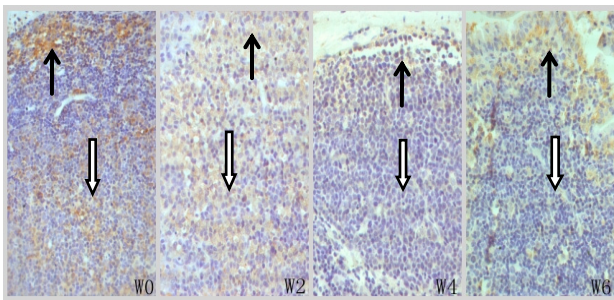
2)PP 结数目变化。

6 周递增负荷运动过程中，2 周 PP 结数目最少，2~4 周数目逐渐增多，4~6 周保持不变。4 周、6 周与 2 周相比具有差异具有显著性( $P<0.05$ )。

2.2 长期递增负荷对 PP 结淋巴细胞 Bax、Bcl-2 的影响

1)表达部位。

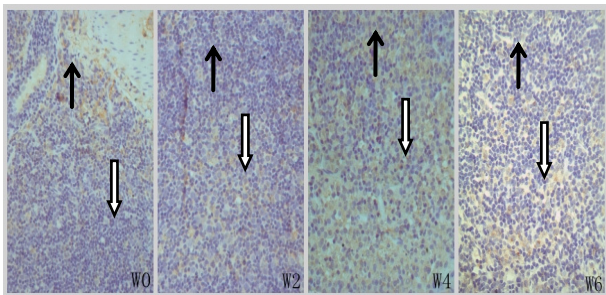
Bcl-2 阳性表达主要分布在淋巴细胞的胞浆，呈棕黄色颗粒状(见图 2)。0 周在生发中心及拱顶顶部阳性细胞高表达。2 周的 PP 结蛋白表达弥散性分布，生发中心及拱顶分界线消失。4 周、6 周阳性表达生发中心迁移至拱顶顶部。



⇐表示生发中心      →表示 PP 结拱顶

图 2 PP 结淋巴细胞 Bcl-2 阳性表达 (SABC×400)

Bax 阳性表达主要分布在淋巴细胞的胞浆，呈棕黄色颗粒状(见图 3)。0 周阳性表达面积在拱顶、生发中心均有表达，2~6 周蛋白阳性表达部位迁移至生发中心。

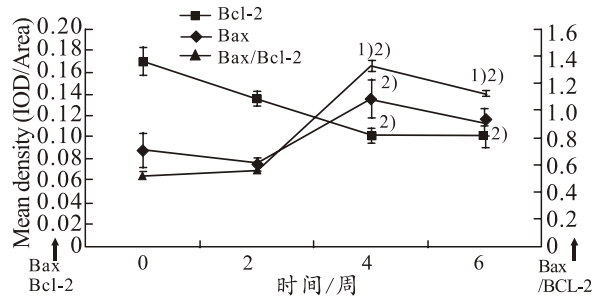


⇐表示生发中心      →表示 PP 结拱顶

图 3 PP 结淋巴细胞 Bax 阳性表达 (SABC×400)

2)定量分析。

6 周递增负荷运动过程中，0~4 周，BCL-2 蛋白表达持续下降，4 周后趋于平稳。4、6 周与 2 周比较差异具有差异性( $P<0.05$ )。Bax 蛋白表达，2~4 周呈上升趋势，且 4 周较之 0 周差异具有显著性( $P<0.05$ )，4~6 周略有下降但较之 0 周基础值较高。Bax 与 Bcl-2 比值 0~4 周持续增大，2 周后斜率明显增大。4 周后略有下降。4、6 周与 0、2 周比较差异均具有显著性( $P<0.05$ )(见图 4)。

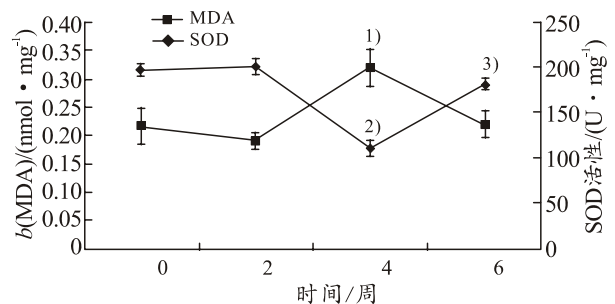


1)较之 0 周差异具有显著性( $P<0.05$ ); 2)较之 2 周差异具有显著性( $P<0.05$ )

图 4 PP 结 Bax、Bcl-2 蛋白表达适应性变化

2.3 PP 结组织 SOD 活性及 MDA 生成量的变化

2~4 周 PP 结组织 SOD 活性下降，4 周与 2 周相比差异具有显著性( $P<0.01$ )，4~6 周 SOD 活性呈回升趋势( $P<0.01$ )。2~4 周 MDA 生成量增多，4 周与 2 周比较差异具有显著性( $P<0.05$ )，W4~W6 MDA 生成量逐渐减少并高于 0 周基础值(见图 5)。



1)MDA 生成量，2 周与 4 周相比，差异具有显著性( $P<0.05$ );  
2)SOD 活性，4 周与 2 周相比，差异具有非常显著性( $P<0.01$ );  
3)SOD 活性，6 周与 4 周相比，差异具有非常显著性( $P<0.01$ )

图 5 MDA 生成量、SOD 活性适应性变化

3 讨论

3.1 递增负荷运动对大鼠 PP 结数目、形态结构的影响

PP 结由上皮下拱顶区、滤泡区(生发中心)和滤泡旁区组成。上皮下拱顶是由 B 细胞构成的高活性的拱顶型滤泡，其间含有大量未成熟的效应细胞。T 细胞

位于滤泡旁区, 主要为细胞 CD4<sup>+</sup>T, 表达 T 细胞受体 (TCR)  $\alpha \beta$ 。滤泡区是 B 细胞增殖场所, 淋巴母细胞增殖时生发中心产生且不断扩大<sup>[5]</sup>。2 周(W2)和 4 周(W4)时 PP 结组织滤泡区出现断裂带, 拱顶顶部产生空泡。出现明显断裂带提示: 生发中心有较多凋亡细胞呈簇状分布, 随着运动负荷增大淋巴细胞凋亡率升高。而在拱顶顶部出现空泡可能会影响 M 细胞的功能。M 细胞位于肠黏膜上皮细胞和拱顶区之间与其紧密排列在一起, 主要通过受体介导的胞吞方式, 非特异性地摄取转运抗原。期间存在空泡可能会影响 M 细胞转运抗原及抗原递呈过程, 影响抗原特异性的 B 淋巴母细胞产生数量, 进一步影响抗体分泌水平<sup>[6]</sup>。而第 2 周滤泡区靠肠壁处出现的空隙, 也可能会影响 B 淋巴细胞数量, 此方面的发现需要进一步的实验支持。第 6 周生发中心断裂带消失, 淋巴细胞排列均匀, 拱顶顶部空泡相比基本消失, 提示我们机体 B 细胞免疫应答功能逐渐恢复, 可能已进入新的稳态建立阶段。

PP 结个数计数实验结果提示: 随着运动负荷增大, 2 周时(W2)肠道免疫功能抑制最强烈<sup>[7]</sup>。实验大鼠属于不惯常运动的动物。主要变化发生在第 2 周, 应该与机能进入应激过程的 shock phase 有关, 即机体对负荷表现出全面的不适应, 以致机能下降。随后机能的恢复表明机体逐渐进入到 countershock phase 和 resistance 阶段。

### 3.2 递增负荷运动对大鼠 PP 结淋巴细胞凋亡的影响

一些研究表明: 大强度运动负荷可诱发免疫细胞凋亡, 使浆细胞数量减少, 抗体分泌受限, 从而导致免疫失衡<sup>[8-9]</sup>; Bax 和 Bcl-2 是细胞凋亡过程中两个重要的调控因子。Bax 为促进凋亡基因, 通过插入线粒体膜, 诱导线粒体蛋白释放, 促进凋亡。而 Bcl-2 是凋亡抑制基因, 通过调节线粒体膜通道的通透性来稳定线粒体, 阻止线粒体释放细胞色素 C 等凋亡相关蛋白, 抑制凋亡发生。当 Bax 同源二聚体形成时, 细胞凋亡率升高。而随着 Bcl-2 蛋白表达量上升, 大量 Bax 二聚体分开, 与 Bcl-2 形成更稳定的 Bax-Bcl-2 异源二聚体, 从而“中和” Bax 诱导凋亡的作用。因此, Bax/Bcl-2 比值决定了细胞的命运, 当比值大于正常值时, 细胞则趋于凋亡, 当比值小于正常值时, 凋亡则受到抑制<sup>[10]</sup>。

由上述结果可知: 随着运动负荷增强, 2 周时 Bcl-2 蛋白表达部位在 PP 结拱顶顶部及生发中心成弥散性分布, 而 Bax 蛋白阳性表达迁移至生发中心, 这可能是机体的免疫保护机制启动, Bcl-2 蛋白大面积表达, 避免淋巴细胞过度凋亡导致免疫失衡现象发生。4 周后 Bcl-2 阳性表达迁移至拱顶顶部, 提示 Bcl-2

蛋白抑制初始淋巴过度凋亡, 以保证结内淋巴细胞数目。而 Bax 阳性蛋白表达 2 周后迁移至生发中心, 形成大量 Bax 同源二聚体, 诱导细胞凋亡。根据两种蛋白表达部位的分布情况差异, 提示细胞凋亡主要出现在 PP 结生发中心与既往研究及本次实验光镜形态学观察结果高度一致<sup>[11]</sup>。据 Bax、Bcl-2 蛋白表达定量分析及 Bax/Bcl-2 比值分析发现, Bax/Bcl-2 比值 0~4 周持续增大, 2 周后增加斜率增大, 4 周后略有下降。4、6 周与 0、2 周相比差异均具有显著性( $P < 0.05$ )。这可能与 Bcl-2 生成量减少, Bax 单体生成量增多, Bax 同源二聚体大量形成有关。其发生机制有待我们今后继续深入研究。

### 3.3 递增负荷运动对大鼠 PP 结淋巴细胞凋亡的相关机制

为探索运动引起的氧化应激导致 PP 结细胞凋亡的原因, 我们分析了 PP 结组织 SOD 活性及 MDA 生成量的变化, 已有研究表明, 运动引起的氧化应激, 使得脂质过氧化产物大量产生, 氧化酶活性下降, 产生大量的活性氧(ROS)。这些活性氧分子是氧自由基的来源, 可以通过一系列途径诱导细胞凋亡, 如氧自由基引起的 DNA 损伤激活 P53 基因引起细胞凋亡。此外, 氧自由基形成的氧化应激也可活化核转录因子 NF- $\kappa$ B 和 AP-1, 加速细胞凋亡相关的一些基因的表达, 从而诱发细胞凋亡<sup>[12]</sup>。测试结果发现: 此训练过程中 Bax 蛋白表达与 MDA、SOD 变化趋势存在一致性, 但 Bcl-2 在 0~2 周期间变化趋势与之相反, 2 周后与上述指标变化趋势一致。4 周时 SOD 活性最低, MDA 生成量最多, 这也进一步证明: 随着运动负荷不断增加, PP 结组织内活性氧产生增多, 脂质过氧化程度增大, 可能加速了 Bax 与 Bcl-2 的分离, Bax 同源二聚体产生, PP 结淋巴细胞趋向凋亡<sup>[13]</sup>。从而导致肠道上皮下浆细胞数量减少, 影响抗体分泌水平, 肠道黏膜产生免疫抑制<sup>[14]</sup>。而 4~6 周 MDA 生成量减少, SOD 活性增强, 运动负荷虽然依然持续增加但机体抗氧化能力却有所改善, 提示机体抗氧化机制正在启动, 新的稳态正在建立。

## 4 结论

1) 受 6 周递增负荷训练影响, 小肠集合淋巴结(PP 结)数目呈现先下降后回升的变化趋势, 至第 2 周下降至最低水平。

2) 6 周递增负荷运动期间, PP 结滤泡旁区(Tcell 区)结构无明显变化。结构学改变主要发生在生发中心及拱顶区(Bcell 区), 第 2 周~第 4 周 PP 结生发中心出现断裂带, 拱顶顶部出现空泡, 至第 6 周有所恢复。

3) 6 周递增负荷运动过程中, Bax 与 Bcl-2 比值升

高,提示淋巴细胞凋亡增多,结合形态学表现,发现长期大强度训练导致的肠道淋巴细胞凋亡主要出现在PP结生发中心。

4)6周递增负荷运动期间,肠道淋巴细胞凋亡程度与组织自由基含量变化基本一致,提示运动应激性自由基生成可能是肠道淋巴结细胞凋亡的机制之一。

PP结的结构改变及淋巴细胞凋亡率升高可能与抗体分泌不足和肠道粘膜免疫系统功能下降有关,这可能是大强度训练引发消化系统症状的主要机制。这种改变应引起科研工作者重视,运用有效方法及干预手段,更好地预防肠道感染性疾病及肠道黏膜免疫系统异常导致的其他疾病。

致谢:感谢兰州大学药理学研究所覃红教授和病理解剖学研究所高级实验师王春华老师在实验过程中给予的悉心指导与帮助!

#### 参考文献:

- [1] Wittig B M, zeitzm. The gut as an organ an organ of immunology[J]. *Int J Color-ectal Dis*, 2003, 18: 181-187.
- [2] 唐亮. 大鼠细胞免疫功能对六周递增负荷运动的应答性和适应性特征[D]. 广州: 华南师范大学, 2007.
- [3] 王茂叶. 6周递增跑台运动对大鼠血清 Th1/Th2 平衡和 IL-6 的影响[J]. *体育科学*, 2009, 29(10): 46-50.
- [4] 李杰. 大鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 和 sIL-2R 对长期递增负荷运动的应答和适应特征[D]. 广州: 华南师范大学, 2007.
- [5] Charles A Janeway. 免疫生物学[M]. 5 版. 北京: 科学出版社, 2008.
- [6] 白雪飞. 粘膜免疫系统相关免疫细胞、免疫分子及淋巴细胞归巢研究进展[J]. *河南医学研究*, 2008(3): 270-273.
- [7] Xu Yx, Ayala A, Monfils B, et al. Mechanism of intestinal mucosal immune dysfunction folloeing tranma-hrmorrhage: increase opoptosis associated with elevated Fas expression in peyer' s patches[J]. *J SURG RES*, 1997, 70: 55-60.
- [8] Tiollier E. Intense training: mucosal immunity and incidence of respiratory infections[J]. *J Eur J Appl Physiol*, 2005(93): 421-428.
- [9] Boudreau J, Quadriatero J, Hoffman-Goetz L, et al. Voluntary training in mice and submandibular lymphocyte response to acute exercise[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2005, 37(12): 2038-2045.
- [10] Korsmeyer S J. Bcl-2 Investigation of the subeellular distribution of the bcl-2 ooncprotein :residence in the cuclear envelope, endoPlasmicreticulum and outer mitochondrial membranes[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(19): 4701-4714.
- [11] 马明. 高原大鼠严重烧伤延迟复苏后氧化应激对小肠氏结淋巴细胞凋亡的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [12] 金惠铭. 病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [13] 陈德权, 邓树勋, 彭峰林. 间歇运动对大鼠骨骼肌凋亡基因 Bax、Bcl-2 及相关因素的影响[J]. *北京体育大学学报*, 2008, 31(7): 922-925.
- [14] 刘铁民. 过度训练大鼠肠粘膜超微结构\_MDA 和 IgA 变化的研究[J]. *广州体育学院学报*, 2001, 21(3): 54-58.

#### 更正:

由于校对工作不够仔细,本刊 2011 年第 6 期上出现两处错漏,特予更正,并向作者、读者致歉!

1)第 116 页表 6 中的心率单位应为: 次·min<sup>-1</sup>;

2)136 页表 2 项目栏中的第 2 个“大多角骨”应为“小多角骨”。