

组织化学技术在体育科研中的应用

梁 健, 郝选明, 曾志刚

(华南师范大学 体育科学学院, 广东 广州 510631)

摘 要: 从普通组织化学、酶组织化学、免疫组织化学、原位杂交组织化学及定量组织化学等方面对国内外组织化学技术在体育科研中的应用研究进行了综述。随着现代生物化学和分子生物学的飞速发展, 在体育科学研究中普通组织化学方法逐渐退出而被其它更高效、精确的检测手段如免疫学方法及定量组织化学方法等技术代替。其中, 流式细胞技术、激光扫描共聚焦显微镜技术和免疫电镜技术等先进组织化学技术在体育科研中日益显示出其巨大的应用潜力, 并为此方面的研究提供丰富、稳定、可靠、准确的研究平台。

关 键 词: 组织化学技术; 体育科研; 综述

中图分类号: G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2007)06-0044-04

Application of histochemical techniques in sports researches

LIANG Jian, HAO Xuan-ming, ZENG Zhi-gang

(College of Physical Education, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: The authors gave an overview of domestic and foreign researches on the application of histochemical techniques in sports researches from such aspects as common histochemistry, enzyme histochemistry, immunohistochemistry, in situ hybridization histochemistry and quantitative histochemistry. With the rapid development of modern biochemistry and molecular biology, common histochemical methods used in sports researches are gradually becoming obsolete and replaced by other test means that are more efficient and accurate, such as immunological methods and quantitative histochemical methods, in which advanced histochemical techniques such as flow cytometry technique, laser scanning confocal microscope technique and immunohistochemical electron microscope technique are ever increasingly showing their tremendous potentials for application in sports researches, and providing a comprehensive, stable, reliable and accurate research platform for researches in this area.

Key words: histochemistry techniques; sports researches; reuiew

组织化学是运用组织学、化学、物理学、免疫学、分子生物学等原理与技术, 对组织与细胞的化学成分、化学反应及其变化规律进行定性、定位和定量研究的科学。目前组织化学技术已广泛地应用于体育科学研究当中。本文主要是就目前体育科研中仍然继续沿用并不断发展更新的一些组织化学技术的应用进行阐述, 以促进此领域研究的进一步深入。

1 普通组织化学技术

普通组织化学技术是指以常用的组织化学技术, 对细胞内主要化学成分和活性的粗略(一般性)的研

究。目前在体育科研中, 多数用于形态观察或常规组织学观察。如对负离心定量运动训练大鼠的骨骼肌方面组织学变化(肌纤维数目密度变化)及损伤程度研究^[1]和探讨内服、外用中药对家兔小腿前群肌肉离心训练后肌肉形态学、组织学和细胞学的影响^[2]等。除对肌肉组织学观察的研究较多以外, 还有一些研究涉及其他器官, 如肾脏、性腺等。相关报道有赵汝珠等^[3]研究中药抗疲号对雌性、雄性训练 Wistar 大鼠急进高原并运动力竭后性激素和卵巢、睾丸的防护作用, 并对性腺行 HE 染色进行病理学光镜观察等。总之, 普通组织化学技术在体育科研中主要用于形态学

观察，一方面从组织与细胞水平分析运动对各脏器的形态学及组织学影响；另一方面，又为相应的生理功能变化发生机理提供佐证或进一步研究的参考。

2 酶组织化学技术

酶组织化学 (Enzyme Histochemistry) 技术是利用组织细胞内酶具有催化某种反应的特性来检测酶活性。一般是用冻结或固定的切片,在一定条件下(具有酶的底物等)全酶进行催化作用,产生一种可见产物,沉淀在酶所在的部位,最终通过显微镜对酶的活性进行定位或定量研究。其特点是在原位检测,且检测酶的活性而不是酶分子本身。

荷兰 Koopman R 等^[4]采用酶组化方法测定不同肌纤维中 S6K1 的磷酸化状态的变化,发现人体骨骼肌在抗阻训练后,S6K1 的磷酸化增加主要发生在 I 型肌纤维。还有应用酶组织化学方法反映骨骼肌的生理状态的研究,如黄庆愿等^[5]通过酶组织化学方法检测肌球蛋白 ATP 酶(myosin-ATPase)从而观察缺氧及在缺氧条件下运动对大鼠腓肠肌肌纤维形态和毛细血管的影响。此外,酶组织化学方法还应用于运动实践中物质代谢和能量代谢等方面。如,用以研究未习服热暴露附加运动负荷(游泳)动物的过氧化脂质(LPO)、超氧化物歧化酶(SOD)的变化^[6]。

可见,酶组织化学技术在体育科研中主要用于检测机体生物化学反应过程中具有代表性或限速性的关键酶,从而分析机体生理功能状态,尤其是物质代谢、能量代谢、氧自由基等方面。

3 免疫组织化学技术

免疫组织化学 (Immunohistochemistry) 技术是组织化学的分支,是用标记的特异性抗体(或抗原)对组织内抗原(或抗体)的分布进行组织和细胞原位检测技术。此技术在不断更新检测手段和克服自身不足中日趋完善,呈现出其他技术无法比拟和替代的优势。

在神经(脑)研究方面,主要有通过免疫组化 SP 法观察不同动情周期、不同训练强度时雌性大鼠下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)和 β -内啡肽(β -EP)免疫反应阳性细胞的定量变化的研究^[7],采用免疫组化 ABC 与 SABC 法研究下丘脑腹内侧核和背内侧核、室旁核和视上核、杏仁体核簇、海马 CA₁ 区中神经型(nNOS)、诱导型(iNOS)、内皮型(eNOS)一氧化氮合酶与不同运动模式或状态之间的关系^[8]。所以免疫组化技术在研究神经递质/调质,神经内分泌激素,以及其他生物活性物质的定性、定量、定位分

析方面起着非常重要的作用。

另外,免疫组化技术在研究心肌与骨骼肌的各种生物活性物质及细胞凋亡方面也有重要的应用。Delchev SD 等^[9]采用免疫组织化学方法研究亚强度运动后大鼠心肌细胞线粒体膜酶活性的变化。国内有通过免疫组化 ABC 法研究不同强度运动训练对心脏内分泌功能(血浆 ANP 的含量和心肌组织中 ANP 的表达)的影响^[10]的报道。此外,免疫组织化学技术还应用于观察运动应激对吸烟大鼠支气管平滑肌大电导的钙激活的钾通道(BK_{Ca})和电压依赖性延迟整流钾通道 Kv1.5 蛋白表达的影响^[11]等方面。

从上述可见,免疫组织化学技术的应用范围极其广泛,凡是组织细胞内具有抗原性的物质,如肽类、激素、神经递质、细胞因子、受体、表面抗原等均可用免疫组织化学方法显示,并且可以对所研究的大分子物质进行定位、定性与定量分析,进而深入研究其功能,综合分析其作用机理。因此目前在体育运动领域的基础理论与实践应用科研中都被广泛运用。

4 原位杂交组织化学技术

原位杂交组织化学(In Situ Hybridization Histochemistry)技术是基于利用标记物(荧光素、酶、重金属离子等)或放射性核素(已少用)作为示踪剂,通过核酸杂交(碱基配对特异性连接)途径,在组织切片或细胞涂片上,原位显示生物大分子物质基因表达的动态变化而建立的一门组织化学技术。基本特点是“特异、灵敏、准确、原位”,是分子生物学研究的常用手段。如 Holmes PV 等^[12]采用原位杂交组织化学技术对不定量随意运动和抗抑郁药物-海地芬治疗提高促生长激素神经肽中 mRNA 水平影响的研究。Timofeeva E 等^[13]采用原位杂交组织化学技术研究跑台运动对大鼠兴奋性与促肾上腺皮质激素释放激素系统的影响。而国内有通过原位杂交的方法结合图像分析,观察运动训练中不同负荷和运动后不同恢复时相的大鼠脑组织一氧化氮合酶(NOS)和 ET-1 mRNA 的表达的研究报道^[14]。另外,采用原位杂交组织化学技术研究低氧训练对大鼠骨骼肌血管内皮生长因子(VEGF)基因表达的影响^[15]等。至此,原位杂交组织化学技术突破了组织化学分子水平研究的瓶颈,为原位研究各种运动状态下相关基因的变化提供了有力的手段。

5 定量组织化学技术

随着现代物理学的飞速发展,新理论新技术不断出现,发明了一批新的仪器,从而使组织、细胞的化学成分提高到定量分析的水平。最常用的有显微分光

光度计、流式细胞仪、激光扫描共聚焦显微镜等。

1)流式细胞仪。流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)是 20 世纪 70 年代发展起来的先进科学技术,具有分析和分选细胞功能。它不仅可测量细胞大小、内部颗粒的性状,还可检测细胞表面和细胞浆抗原、细胞内 DNA、RNA 含量等;可对群体细胞在单细胞水平上进行分析,在短时间内检测分析大量细胞,并收集、储存和处理数据,进行多参数定量分析;也能够分类收集(分选)某一亚群细胞,分选纯度 > 95%。FCM 以其快速、灵活、大量、灵敏和定量的特色,广泛应用于基础研究和应用实践,在体育科研中发挥着重要的作用。近年来,在免疫方面的研究有运用流式细胞技术探讨免疫参数与测试对象的身体素质、技术水平和机能状态关系的研究^[16]报道,还有应用流式细胞仪检测红细胞 CD35 来探讨 HiHiLo 对机体红细胞 CD 数量及活性的影响研究^[17]。

此外,流式细胞术还广泛应用于研究心肌和骨骼肌细胞凋亡^[18]并取得喜人的成果,同样 Lagranha CJ 等^[19]结合使用流式细胞术与荧光显微技术探讨补充谷胺酰胺对运动引起大鼠中性粒细胞凋亡的影响进行分析。Ding YH 等^[20]使用流式细胞仪做运动预处理提高心脏局部缺血大鼠大脑整合机能的研究。

2)激光扫描共聚焦显微镜。激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)是 20 世纪 80 年代发展起来的一项具有划时代意义的高科技新产品。与免疫荧光组化结合,实现了对细胞内部非侵入式光学断层扫描成像,从而对被检物体样品从停留在表面单层、静态平面的观察进行到立体、断层扫描、动态全面的观察,在生命科学研究中得到迅速应用。其性能特点是分辨率高、灵敏度高、扫描速度快、扫描范围大、图像存取方便,可进行“光学切片”的观察,可进行定量荧光分析。Higa-Taniguchi KT 等^[21]采用共聚焦显微镜对运动训练导致正常大鼠与高血压大鼠室旁核内肾上腺素能分布变化的影响进行研究。常芸等^[22]应用激光扫描共聚焦显微镜与新一代钙荧光指示剂 Fluo-3AM 负载方法观察心肌活细胞内具有生物活性的游离钙的动态变化,从而探讨运动心脏结构与功能的发生、转归及其与病理心脏的本质差异。

组织化学技术是一门庞大复杂、综合全面的分析技术,具有很强的外延扩展性,随着组织学、化学、物理学、免疫学、分子生物学等基础学科的不断发展,也会不断地扩展其研究手段和方法。而这些方法手段在体育科研中有广阔的应用前景,它将为此方面的研究提供丰富、稳定、可靠、准确的研究技术。如流式

细胞技术的广泛应用,能在单细胞水平上,大量地、多参数地定量分析与运动机能相关的指标,为运动训练和健身运动的科学合理安排提供重要的参考依据。而激光扫描共聚焦显微镜技术能使研究更深入到立体、断层、动态的分析水平。另外,目前在运动医学领域还没有得到广泛应用的免疫电镜技术,能够更好地从亚细胞水平研究分析运动生理功能。以上几项各有优势的实验技术将在体育科学研究领域具有非常良好的应用前景,也将是研究的热点。相信先进的组织化学技术在体育科研中的充分应用,必将促进此领域分子水平研究的快速提高。

参考文献:

- [1] 王易虎,易南,张灿久,等.负离心定量运动训练对大鼠肱三头肌损伤的程度及作用机制[J].现代康复,2001,5(8):33-35.
- [2] 马建,刘波,戴国钢,等.中医消除运动性肌肉疲劳动物实验研究——外用、内服中药对两周离心训练后兔骨骼肌形态学、组织学和细胞学影响[J].中国运动医学杂志,2002,21(2):146-151.
- [3] 赵汝珠,肖永良,哈英娣,等.中药抗疲 I 号对雌性训练 Wistar 大鼠急进高原并运动力竭后性激素和卵巢的防护作用[J].中国中医急症,2006,15(1):80-81.
- [4] Koopman R, Zorenc A H, Gransier R J, et al. Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 290(6): E1245-52.
- [5] 黄庆愿,高钰琪,孙秉庸.缺氧及缺氧复合运动大鼠骨骼肌组织化学观察[J].中国运动医学杂志,2000,19(4):351-352.
- [6] 李继红,朱国标,刘雄.未习服热暴露附加运动负荷大鼠某些血液指标的改变及细胞膜损伤[J].中国运动医学杂志,1999,18(4):330-332.
- [7] 苑晓玲,王蕴红,邹延艾.运动对大鼠下丘脑 GnRH 和 β -EP 含量的影响[J].中国运动医学杂志,2000,19(3):270-272.
- [8] 刘鸿宇,杨桂姣,张荷玲,等.疲劳应激大鼠下丘脑腹内侧核和背内侧核神经元中一氧化氮合酶的表达[J].神经解剖学杂志,2005,21(1):69-72.
- [9] Delchev S D, Georgieva K N, Koeva Y A, et al. Bcl-2/Bax ratio, mitochondrial membranes and aerobic enzyme activity in cardiomyocytes of rats after submaximal training[J]. Folia Med (Plovdiv), 2006, 48(2): 50-56.

- [10] 陆爱云,潘珊珊,张 炎,等.不同强度运动训练对心脏内分泌功能的影响[J].中国运动医学杂志, 2004, 23(5): 507-509.
- [11] 叶 红,杜 亮,吴贺华,等.运动应激对慢性吸烟大鼠气道平滑肌钾通道 BK_(Ca)、Kv1.5 表达的影响[J].中国病理生理杂志, 2004, 20(11): 1999-2004.
- [12] Holmes P V, Yoo H S, Dishman R K. Voluntary exercise and clomipramine treatment elevate pre-pro-galanin mRNA levels in the locus coeruleus in rats[J].Neurosci Lett, 2006, 408(1): 1-4.
- [13] Timofeeva E, Huang Q, Richard D. Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system[J].Neuroendocrinology, 2003, 77(6): 388-405.
- [14] 李 峰,杨维益,季绍良,等.运动性疲劳大鼠脑组织中一氧化氮合酶和内皮素 mRNA 表达的变化规律及中药“体复康”的调节作用[J].中国运动医学杂志, 2001, 20(2): 116-120.
- [15] 郑 澜,陆爱云,周志宏.低氧训练对大鼠骨骼肌缺氧诱导因子-1 α 蛋白和血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响[J].中国运动医学杂志, 2005, 24(4): 424-429.
- [16] 李 雷,刘丽萍,张彦东,等.少年男子足球运动员运动训练前后免疫机能的变化[J].中国运动医学杂志, 2003, 22(5): 503-505.
- [17] 罗 琳,张 纓.高住高练低训对足球运动员红细胞 CD₍₃₅₎数量及活性变化的影响[J].中国运动医学杂志, 2006, 25(4): 395-398.
- [18] 袁海平,史仍飞,刘 学,等.补充银杏制剂对过度训练大鼠心肌细胞凋亡的影响[J].中国运动医学杂志, 2004, 23(5): 503-506.
- [19] Lagranha C J, Senna S M, de Lima T M, et al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils[J].Med Sci Sports Exerc, 2004, 36(2): 210-217.
- [20] Ding Y H, Li J, Yao W X, et al. Exercise preconditioning upregulates cerebral integrins and enhances cerebrovascular integrity in ischemic rats[J].Acta Neuropathol (Berl), 2006, 112(1): 74-84.
- [21] Higa-Taniguchi K T, Silva F C, Silva H M, et al. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats[J].Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292(4): R1717-27.
- [22] 常 芸,林福美,陈小同,等.运动心脏重塑的发生与转归[J].体育科学, 2000, 20(5): 46-50.

[编辑: 郑植友]