

- China. J Med Virol, 2002, 67(3): 447-450
- 4 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, *et al.* Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. J Virol, 2002, 76(17): 8609-8620
- 5 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164
- 6 Alatrakchi N, Koziel M. Regulatory T cells and viral liver disease. J Viral Hepat, 2009, 16(4): 223-229
- 7 Webster G J, Reignat S, Brown D, *et al.* Longitudinal analysis of CD8⁺ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. J Virol, 2004, 78(11): 5707-5719
- 8 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, *et al.* Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. J Virol, 2005, 79(6): 3322-3328
- 9 Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, *et al.* Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatology, 2005, 41(4): 771-778
- (收稿: 2010-12-16)

不同负荷运动训练对大鼠大脑皮质躯体感觉区神经型一氧化氮合酶活性的影响

李浩旭 刘江静 鲁彦 李保利

摘要 目的 探讨不同负荷运动训练对大鼠大脑皮质躯体感觉区 nNOS 活性的影响。方法 健康雄性大鼠 60 只,分为对照组、一般负荷组和过度负荷组(后两组统称负荷组)。负荷组大鼠按照修改的 Beford 运动负荷标准进行训练。8 周后处死大鼠,称重,检测红细胞数目;取大鼠大脑,免疫组织化学法检测大脑皮质躯体感觉区 nNOS 免疫组化阳性产物。**结果** 过度负荷组大鼠训练后 8 周体重、红细胞数目和对照组、一般负荷组比较有统计学差异;正常对照组大鼠皮质 nNOS 平均灰度值大于一般负荷运动组和过度运动负荷组 ($P < 0.01$);一般运动负荷组的平均灰度值与过度运动负荷组无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** 适量运动能使大鼠大脑皮质 nNOS 活性增加,有益于神经元信息的传递和递质的释放,促进大脑功能的发挥。

关键词 大鼠 运动训练 nNOS 皮质躯体感觉区

The Influences of Different Loading Excise on the Expression of Nitrogen Monoxidum in the Cerebral Cortex Somathetic Area. Li Haoxu, Liu Jiangjing, Lu Yan, Li Baoli. The Department of Anatomy, Xi'an Medical College, Shanxi 710021, China

Abstract Objective To explore the influences of different loading excise on the expression of nitrogen monoxidum (nNOS) in the cerebral cortex somathetic area (CCSA). **Methods** Sixty healthy rats were randomly assigned to control or experimental groups with 20 animals for each group of control, general exertion (GE) and overexertion (OE). The rats in GE and OE were forced to excise according to the revised beford standard. After having been excised for 8 weeks, all rats were killed, weighed and their brains were disassociated. The numbers of red blood cell of rats were counted and the expression nNOS in the CCSA was determined by immunohistochemistry. **Results** Our study showed that the expression of nNOS in the CCSA of OE group was significantly higher than that of control; however, it had no significant difference between GE group and OE group. **Conclusion** Moderate excise increases the activities of nNOS in cortex, which is benefit to the transformation of information and release of transmitter.

Key words Rat; Motion; Nitrogen monoxidum; Cerebral cortex somathetic area

不同负荷运动训练对中枢神经系统的影响是运

动医学研究的热点之一,特别是中枢神经疲劳时脑内某些神经递质或信号分子的变化^[1,2]。研究表明一氧化氮(NO)是一种气体信号转导分子,介导神经传递过程,并参与血管调节和免疫反应^[3]。目前虽然有文献报道运动能对脑组织中一氧化氮合酶(NOS)及其亚型表达有一定的影响,但不同负荷的运动对皮

基金项目:陕西省卫生厅基金资助项目(06E05)

作者单位:710021 西安医学院解剖学教研室(李浩旭、李保利);
710065 西安,陕西省博爱医院(刘江静);730030 兰州,解放军第一医院检验科(鲁彦)

质躯体感觉区神经型一氧化氮合酶(nNOS)表达的影响目前尚未报道^[4]。我们对大鼠进行了为期 8 周不同负荷的运动训练,通过测定大鼠皮质躯体感觉区 nNOS 表达强度,探讨不同负荷运动训练对机体躯体感觉区中 nNOS 活性的影响,并研究其生物学意义。

材料与方法

1. 实验动物分组:3 月龄健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 200~230g,(由西安交通大学医学部动物中心提供)。随机分成 3 组,正常对照组(NC,20 只),一般负荷组(MT,20 只),过度负荷组(OT,20 只)。标准啮齿类动物饲料喂养,自由饮水,室温约 20℃,湿度(45±10)%,通风良好,自然照明。

2. 训练模型:参照改动的 Beford 运动负荷标准对大鼠进行动物跑台训练。跑道长 58cm,宽 8.5cm;跑台坡度为 10°,每周训练 6 天,每日 1 次,共训练 8 周。SC 组大鼠按常规喂养,自由活动、饮食,不进行任何训练;MT 组大鼠第 1 周每天完成 10m/min×10min 的跑台运动;第 2 周每天完成 10m/min、15m/min 各 10min 的跑台运动;第 3 周,每天进行 10m/min、15m/min、20m/min 各 10min 的跑台运动;第 4 周后每天进行 10m/min、15m/min、20m/min 和 25m/min 各 10min 的跑台运动,并维持此负荷直至实验结束。OT 组前 4 周运动负荷同一般训练组,从第 5 周开始,进行 4 周递增负荷跑台运动,每天以 10m/min、15m/min、20m/min、25m/min 各 10min 运动后,加速至 30m/min、35m/min,并延长运动时间,直至大鼠力竭^[1,2]。

3. 取材与制片:训练 8 周后,各组大鼠称重,25% 乌拉坦(0.6ml/100mg)麻醉,仰卧位固定于手术台,开胸,暴露心脏,经心尖插管入主动脉内。取 0.5ml 血液置于预先包裹 EDTA-LK₂ 试管内,专人显微镜下计数红细胞数目。大鼠经插管灌注生理盐水冲洗并经 4% 多聚甲醛固定后,开颅取大脑。4% 多聚甲醛 4℃ 固定 24h 后再用自来水冲洗 24h,乙醇脱水、二甲苯脱脂。将大脑中央后回做冠状切开,60℃ 下石蜡包埋后切片(片厚 5μm),切片贴于经 10g/L 明胶+0.5g/L 硫酸锰钾处理过的玻片上。再脱腊完成后浸入 0.01mol/L 的 PBS(pH7.4),100% 甲醇+3mol/LH₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶,PBS 浸洗 3×5min 后再浸泡于 3g/L TritonX-100 中 30mi,切片入正常山羊抗血清 30min,加 NOS 抗体血清(1:100,北京中山公司,4℃ 孵育 24h,再 PBS 浸洗 3×10min 后入结合生物素的兔抗羊第二抗体中室温孵育 1h,BS 浸洗 3×10min,ABC 复合物(1:200)室温孵育 1h 之后显色,常规脱水透明,DPX 封片。对照实验用 PBS 代替第一抗体。间隔 3 张取 2 片,切片进行免疫组化 ABC 法染色:入含 0.3% Triton X-100,10% 正常羊血清,37℃ 的 1:500 的兔抗 2h。4℃ 冰箱内 60h 以上后再入 37℃ 的 1:200 的羊抗兔 IgG 1h 后用 0.05% DAB/H₂O₂ 显色。以上各步骤间均用 0.01mol/L PBS(pH7.4)漂洗 3 次,每次 5min。常规裱片,脱水,透明,封片。

4. nNOS 测定:切片置 OlympusB-2 光学显微镜下,用低倍镜(4×10)定位,每套切片随机等距抽取 10 张切片,每张切

片中,随机抽取 5 个视野。根据 nNOS 阳性染色细胞选择合适的门限分割值,采用双门限分割成半灰度图,然后测量每一个视场单个阳性细胞的 nNOS 的相对含量,测量单位用 AU。用 MPIAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统进行分析,每个切片随机取 10 个视野,计算每个视野阳性反应产物的平均灰度值。酶着色越深,其灰度值越小,说明 NOS 阳性表达越强。

5. 统计分析:所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析进行显著性检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

结 果

1. 一般情况观察:在训练的前 4 周,3 组大鼠神态安静,性情温顺,活泼好动,皮毛光亮整洁。从第 5 周末开始,OT 组大鼠精神倦怠,双目无光,少活动,易激惹。训练结束后,对照组和一般负荷组大鼠神态安静,皮毛光整,双目有神;OT 组大鼠神态倦怠,精神萎靡,食量下降,反应降低,眼睛暗淡无光,毛发脱落明显。

2. 体重变化:实验后 3 组大鼠体重均较实验前增长:第四周 MT 组大鼠体重与 SC 和 OT 组比较有统计学差异($P < 0.05$),第八周 MT 组和 SC 组比较没有显著性差异,但 OT 组大鼠体重与 SC 组(294.22±26.54g vs 366.85±40.34g, $P < 0.05$)和 MT 组(294.22±26.54g vs 366.85±40.34g, $P < 0.05$)比较均有显著性差异。说明适量的运动虽然可以控制体重,但对体重影响不大;过度运动可导致体重严重减轻(表 1)。

表 1 不同运动负荷对大鼠体重的影响

实验期(周)	SC(n=20)	MT(n=20)	OT(n=20)
1	236.87±31.18	243.28±17.26	237.41±19.16
4	331.53±27.18	304.57±43.36*	307.26±34.52*
8	377.09±27.99	366.85±40.34 [△]	294.22±26.54*

与 SC 组比较,* $P < 0.05$;与 OT 组比较,[△] $P < 0.05$

3. 不同运动负荷对大鼠红细胞数量的影响(表 2)。与实验期比较,3 组大鼠红细胞数量均有增加,8 周后,OT 组大鼠红细胞数目反而下降,与 SC 组比较有显著性差异[(4.21±0.46)×10¹²/L vs (5.87±0.31)×10¹²/L, $P < 0.05$],但 MT 组大鼠红细胞数目与 SC 组比较没有显著性差异。

表 2 不同运动负荷对大鼠红细胞数量的影响(10¹²/L)

实验期	SC(n=20)	MT(n=20)	OT(n=20)
训练前	5.21±0.35	5.18±0.44	5.20±0.27
第 4 周末	6.11±0.39	6.84±0.74	6.74±0.78
第 8 周末	5.87±0.31	6.03±0.47	4.21±0.46*

与 SC 组比较,* $P < 0.05$

4. 不同运动负荷对大鼠皮质 nNOS 表达的影响 (表 3)。安静状态下, SC 组的平均灰度值明显大于 MT 组 ($121.33 \pm 20.14\text{AU}$ vs $74.90 \pm 23.75\text{AU}$, $P < 0.05$) 和 OT 组 ($121.33 \pm 20.14\text{AU}$, $P < 0.05$); MT 组的平均灰度值与 OT 组比较无显著性差异 ($74.90 \pm 23.75\text{AU}$ vs $72.78 \pm 26.63\text{AU}$, $P > 0.05$)。

表 3 大鼠大脑皮质躯体感觉区
nNOS 平均灰度值 (AU)

组别	n	细胞数目 (个)	平均灰度
SC	20	200 ± 10	121.33 ± 20.14
MT	20	202 ± 11	$74.90 \pm 23.75^*$
OT	20	199 ± 10	$72.78 \pm 26.63^*$

与 SC 组比较, * $P < 0.05$

讨 论

我们的研究表明,运动能使大鼠体重增长,红细胞数目增加,但长期过度负荷运动反而降低大鼠体重,并减少大鼠红细胞数目。运动能使大鼠皮质 nNOS 表达增加,增加的数量和运动量没有关系。运动能使大鼠大脑皮质躯体感觉区 nNOS 表达增多,活性增强。超负荷运动组与一般负荷组比较,整个大脑皮质躯体感觉区神经元型一氧化氮合酶没有明显增高,说明运动负荷的大小与 nNOS 含量的多少没有显示出必然的联系。

nNOS 主要分布于不同物种动物的大脑皮质、海马、纹状体、下丘脑、中脑和小脑等处。在大脑皮质,含有 nNOS 的神经元占约为 2% 左右^[5,6]。NO 是一种特殊的神经递质,也是一种重要的气体信号传导分子,参与突触传导过程。NO/环鸟苷酸 (NO/cGMP) 途径是 NO 参与神经传递和发挥其他多种生物学效应的主要信号转导机制。中枢神经系统 NO 还可以影响其他神经递质的释放,研究报道,在大脑皮质神经元,NO 供体硝普钠、S-亚硝基-乙酰青酶胺可诱导 γ -氨基丁酸 (GABA) 或乙酰胆碱 (Ach) 的释放^[7]。

此外,一氧化氮还可使 N-甲基-D-天冬氨酸

(NMDA)受体分子中的巯基发生亚硝酰基化作用,阻断该受体的过度兴奋,减少钙离子内流,从而减轻神经元的兴奋性毒性损害,起到了保护神经元的作用^[8,9]。大脑皮质躯体感觉区神经元的胞核和棘突的增大对信息的传递起重要作用。这些区域 nNOS 的增多,使 NO 合成的速度和浓度增加,合成后的 NO 快速扩散作用于靶细胞,发挥作用,影响神经元对信息的传递,进而影响神经元功能的发挥^[10,11]。运动能提高大脑皮质 nNOS 表达,这可能是运动能提高动物运动灵活性,并延长寿命,防止人类老年痴呆的重要原因。

参考文献

- 1 Criswell DS, Henry KM, DiMarco NM, *et al.* Chronic exercise and the pro-inflammatory response to endotoxin in the serum and heart. *Immunol Lett* [J]. 2004, 95 (2): 213-220
- 2 Kalesnykas G, Puolivali J, Sirvio J, *et al.* Cholinergic neurons in the basal forebrain of aged mice [J]. *Brain Res*, 2004, 1022: 148-156
- 3 李翠珍,贾静. 力竭游泳对大鼠红细胞膜脂质过氧化及红细胞变形性的影响 [J]. 中国临床康复, 2005, 7 (28): 198-199
- 4 Ohkuma S, Narihara H, Katsura M, *et al.* Nitric oxide-induced [3H] GAGB release from cerebral cortical neuron is mediated by peroxynitrite [J]. *J Neurochem*, 1995, 65: 1109
- 5 李宁川,陈晓莺,孙新荣. 力竭运动对大鼠脑组织中微量元素含量及抗氧化酶活性的影响 [J]. 体育与科学, 2003, 24 (1): 41-43
- 6 Grandfield A, Lefter DJ, Vinten Johansen J. Protective ischemia in patients: p preconditioning and postconditioning [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83 (2): 234-246
- 7 Schulz R, KelmbM, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia / reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 402-413
- 8 夏志,汪清祥,黄涛,等. 一氧化氮和一氧化氮合酶与运动训练 [J]. 首都体育学院学报 [J], 2009, 21 (1): 83-87
- 9 刘美娟,王蓬伟,林松娟. 慢性阻塞性肺疾病肺动脉压和一氧化氮合酶的变化. 中国现代医学杂志 [J], 2008, 21 (18): 3179-3181
- 10 马瑞,周建平,肖明,等. 大鼠耳神经节和基底动脉壁神经纤维一氧化氮合酶表达的增龄变化. 解剖学杂志 [J], 2009, 32 (1): 79-81
- 11 Praticto F, Perfetti P. Images in clinical medicine Frey's syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (1): 66

(收稿: 2010-12-17)

(修回: 2011-06-26)

欢迎订阅

欢迎赐稿