

牡蛎多糖对力竭运动小鼠血免疫球蛋白、T淋巴细胞亚群、自然杀伤细胞、自然杀伤T淋巴细胞的影响*

华 岩¹ 邓武装² 王春亮^{3,4} 卓杰先¹ 潘家志¹

中小强度训练可以提高机体的免疫功能,长期大强度训练,特别是过度训练导致机体的免疫功能受到抑制。所以,常有运动员在高强度训练或者竞技比赛后,身体抵抗力下降,且容易受到病毒的感染,严重影响其身体健康,甚至停训停赛。因此,寻找大强度训练后的运动员身体的恢复方法,成为当今运动免疫学研究的重要课题。牡蛎是一种药用价值极高的海洋贝壳类动物,其肉中富含多糖、氨基酸、蛋白等多种活性物质,有关牡蛎粗提物研究认为,牡蛎具有增强机体免疫力^[1]、抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、提高心血管功能等^[4]作用,且对人体和动物无任何毒副作用。然而,有关牡蛎多糖的研究相对较少,本研究拟通过建立小鼠力竭游泳运动损伤模型,观察牡蛎多糖对力竭训练小鼠血免疫球蛋白、T淋巴细胞亚群、自然杀伤细胞、自然杀伤T淋巴细胞的影响,为牡蛎多糖应用于运动免疫领域提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

8周龄昆明小雄性鼠30只,健康,体重18—20g,由广西医科大学动物实验中心提供。小鼠分笼饲养,每个鼠笼5只,自由进食、进水,由国家标准准啮齿类饲料喂养。动物饲养室温28±2℃,湿度50%—60%,自然昼夜规律照明。小鼠适应喂养1周后,按体重随机(采用RandA1.0软件处理)分安静对照组(无运动,在安静状态下取材)、运动训练组(在最后一次力竭运动后即刻取材)、运动给药组(服药,在最后一次力竭运动后即刻取材),每组10只。实验前,对3组小鼠的体重和无负重力竭游泳时间进行测定(力竭判定标准:小鼠头部全部入水持续10s不能浮出水面,捞出后平放在水平面上,不能完成翻正反射)。实验前小鼠的运动能力、生理功能状态比较差异无显著性,样本分组适合实验条件(表1)。

1.2 药物、主要试剂与仪器

牡蛎多糖的制备:新鲜牡蛎,去壳取肉,1%甲醇过夜,除脂、抽滤后,用1%NaOH溶液,沸水浴10h,取上清,氯仿、正丁醇萃取出蛋白,用乙醇分级沉淀^[7-8],得到牡蛎多糖粗

表1 实验前各组小鼠体重及力竭游泳运动时间 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	力竭游泳时间(s)
安静对照组	10	22.35±2.11	63.89±10.24
运动训练组	10	23.24±2.54	64.22±11.38
运动给药组	10	22.31±2.25	63.75±11.44

品,淡绿色粉末状,水溶性好,经分析测定,总糖的含量为83.89%。主要试剂:免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM)试剂盒、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)、自然杀伤T淋巴细胞(natural killer T cells, NKT)、单克隆抗体由南京建成生物工程研究所提供,淋巴细胞分离液由TBD公司提供。主要仪器:TGL-16G台式高带冷冻离心机(北京沃德生物医学仪器公司);BCD-203A荣升冰箱;FSH-2高速电动匀浆机(北京瑞丽分析仪器公司);自制动物游泳缸(规格为100cm×60cm×80cm,透明玻璃缸,其底部装有小型潜水泵,水流量为100L/h,水温30±1℃,水深50cm);EPICS-XL流式细胞仪和Q-Prep流式细胞仪标本制备仪(美国贝克曼公司);AV400全自动生化分析仪器(北京瑞丽分析仪器公司)。

1.3 训练方案及给药方案

分组后2d无负重适应性游泳训练,每天20min。

正式实验开始,安静对照组不运动,只进行正常的生理活动,运动给药组小鼠在每天下午4:00—5:00灌服牡蛎多糖悬浮液1次(将牡蛎多糖用0.3%的羧甲基纤维素钠制成悬浮液),剂量为100g/kg·d(根据前期实验的有效性制定剂量),其他两组小鼠灌胃同体积的生理盐水。运动训练组、运动给药组小鼠灌胃,0.5h后进行力竭游泳训练,共灌胃20d,隔天进行1次无负重力竭游泳训练。最后一次力竭游泳时,专人记录小鼠力竭游泳时间。

1.4 指标的测定与方法

最后一次力竭游泳结束后,各组小鼠即刻摘除眼球取血约2.0ml,肝素抗凝。同时取血1.0ml,静置放30min,以300r/min的转速冷冻离心机离心10min,取上清液,-20℃保存待测。

血清免疫球蛋白的测定:血清0.1ml,配备0.3ml生理盐水,充分混匀。单向免疫过散发检测IgG、IgA、IgM的含量。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.06.016

*基金项目:广西教育厅科学研究项目(201106LX531);钦州学院科研项(2012XJKY-15B)

1 钦州学院体育学院,广西钦州,535000; 2 周口师范学院体育学院; 3 广西师范大学体育学院; 4 通讯作者
作者简介:华岩,男,讲师;收稿日期:2013-08-05

T淋巴细胞亚群及NK、NKT的测定:取100μl抗凝血,分别加入20μl抗体,用PBS(pH7.2)对倍稀释,混匀后,25℃室温避光孵育1h,溶红细胞后放入恒温器20min,1200r/min的转速离心15min,取上清液,生理盐水洗2次,1200r/min的转速离心5min后,采用流式细胞仪测CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺、NK、NKT细胞数。

1.5 统计学分析

采用SPSS13.0统计软件包处理。运动训练组与安静对照组比较、运动给药组与运动训练组比较,均采用独立样本t检验,显著性水平为0.05,非常显著性水平为0.01。

2 结果

2.1 牡蛎多糖对小鼠血清免疫球蛋白的影响

运动训练组与安静对照组相比,血清IgG、IgA、IgM均极显著或显著降低($P < 0.01, P < 0.05$);运动给药组与运动训练组相比,血清IgG、IgA、IgM均极显著升高($P < 0.01$)。见表2。

2.2 牡蛎多糖对小鼠外周血T淋巴细胞亚群的影响

运动训练组与安静对照组相比,CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺极显著降低($P < 0.01$),CD₈⁺略低;运动给药组与运动训练组相比,CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺极显著升高($P < 0.01$),CD₈⁺略高。见表3。

2.3 牡蛎多糖对小鼠外周血NK、NKT的影响

运动训练组与安静对照组相比,NK、NKT显著或极显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);运动给药与运动训练组相比,NK、NKT显著或极显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表4。

表2 牡蛎多糖对小鼠血清IgG、IgA、IgM含量的影响 ($\bar{x} \pm s, g/dl$)

组别	鼠数	IgM	IgG	IgA
安静对照组	10	0.47±0.08	3.83±0.33	0.57±0.02
运动训练组	10	0.32±0.02 ^②	2.66±0.47 ^①	0.38±0.04 ^②
运动给药组	10	0.43±0.04 ^③	3.28±0.41 ^③	0.51±0.05 ^③

与安静对照组比较:①P<0.05;②P<0.01;
与运动训练组比较:③P<0.01

表3 牡蛎多糖对小鼠外周血T淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	鼠数	CD ₃ ⁺	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
安静对照组	10	68.85±4.27	43.58±3.91	28.57±3.25	1.57±0.01
运动训练组	10	50.22±3.95 ^①	33.66±3.04 ^①	27.22±3.11	1.22±0.05 ^①
运动给药组	10	60.76±4.18 ^②	38.27±3.66 ^②	27.48±3.34	1.49±0.05 ^②

与安静对照组比较:①P<0.01;与运动训练组比较:②P<0.01

表4 牡蛎多糖对小鼠外周血NK、NKT的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	鼠数	NK	NKT
安静对照组	10	8.81±1.32	8.19±1.24
运动训练组	10	5.23±1.06 ^①	6.04±1.13 ^②
运动给药组	10	7.35±1.64 ^③	7.96±1.42 ^④

与安静对照组比较:①P<0.05,②P<0.01;
与运动训练组比较:③P<0.05,④P<0.01

3 讨论

免疫球蛋白是指具有抗体活性或者化学结构相似的球蛋白。它有B细胞产生,存在于血液、组织液、分泌液中。免疫球蛋白可以分为IgG、IgA、IgM、IgD、IgE五大类。在人类的血清中,IgG含量最高,其次为IgA、IgM、IgD、IgE,其中,IgG、IgA、IgM常被用到衡量体液免疫机能和机体抗感染免疫能力高低的指标。运动主要影响免疫球蛋白的分泌率,长期有规律的中小强度训练可以提高机体中IgG、IgA、IgM的含量,增强机体的免疫机能,长期大强度训练导致机体中IgG、IgA、IgM含量降低,导致机体免疫功能受到抑制^[6-7]。本研究中,运动训练组小鼠IgG、IgA、IgM的含量显著降低,而服用牡蛎多糖后,小鼠IgG、IgA、IgM的含量显著升高,提示牡蛎多糖能提高B淋巴细胞的免疫功能。

T淋巴细胞在细胞免疫反应中具有重要的作用,根据细胞表面的特征分子可以分为CD₃⁺和CD₄⁺两个亚群。CD₃⁺分布于成熟的T淋巴细胞表面,与T细胞抗原受体非共价链接,对于信号的传递起重要的作用,常用CD₃⁺细胞数代表总的T淋巴细胞。CD₄⁺和CD₈⁺是两个功能相异的T淋巴细胞亚群,CD₄⁺起辅助和诱导作用,CD₈⁺起杀伤和抑制作用。CD₄⁺/CD₈⁺的比值常被用于衡量机体的免疫功能,正常生理状况下,其比值1.4至2.0,当比值大于2.0或者小于1.4时,表明细胞免疫功能紊乱。李永峰等^[8]的研究认为,一次力竭运动后即刻,大鼠外周血CD₄⁺含量降低,CD₈⁺含量无明显变化,CD₄⁺/CD₈⁺比值下调。高明等^[9]的研究认为,中长跑运动员在长期大负荷训后,CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺含量下降,CD₄⁺/CD₈⁺比值下调。本研究中,CD₄⁺/CD₈⁺比值下调的结果与李永峰、高明等的研究结果相同,但CD₈⁺含量无明显变化与高明的研究结果相异,原因可能是本实验采用力竭运动损伤方式与高明等的不同。CD₃⁺细胞含量降低,说明小鼠免疫机能受到抑制。而运动给药组小鼠,CD₃⁺、CD₄⁺含量,CD₄⁺/CD₈⁺比值上调,CD₈⁺含量无明显变化。结果表明,牡蛎多糖通过增加小鼠CD₃⁺细胞数,CD₄⁺/CD₈⁺的比值,增强小鼠的细胞免疫功能。

NK细胞是机体重要的免疫细胞,它具有自然杀伤的能力,在抗肿瘤、抗病毒感染等免疫调节中起到重要作用,在所有淋巴细胞中,NK细胞是运动过程中反映最明显,变化幅度最大的一类,常作为早期诊断运动性疲劳的监测指标。NKT细胞的表面既表达T细胞表面标志,如TCR、CD₃等,又表达了NK表面的一些特异分子如NKR1C、CD₁₆、CD₁₂₂等。NKT细胞常作为反应运动后免疫功能改变的指标之一,主要受运动强度和运动量影响,大强度运动可显著降低血中NKT细胞的比值^[10]。孙婧瑜等^[11]对小鼠进行6周过度训练,结果发现6周过度训练后,小鼠NK、NKT细胞数显著下降。本实验中,运动训练组NK、NKT细胞数显著降低。而运动给药组小鼠的NK、NKT细胞数量显著增加,表明牡蛎多糖通过增

加NK、NKT细胞数量,改善训练小鼠的细胞免疫功能。

4 结论

力竭运动可导致小鼠免疫球蛋白IgG、IgA、IgM含量和CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺、NK、NKT显著下降,表明力竭训练可以抑制机体免疫功能明显降低。而补充牡蛎多糖能提高IgG、IgA、IgM含量、CD₃⁺、CD₄⁺、NK、NKT细胞数、CD₄⁺/CD₈⁺比值,提示牡蛎多糖对力竭训练小鼠具有增强机体免疫力的作用。

参考文献

[1] 华岩,杨彩云,叶邵凡,等.牡蛎提取液对长期训练小鼠免疫功能的影响[J].中国老年学杂志,2012,32(19):4206—4208.
 [2] 陈艳辉,李超住,吴磊,等.广西产牡蛎多糖的制备和抗肿瘤活性初步研究[J].中国现代医学杂志,2010,20(7):1004—1007.
 [3] 王勇,袁强,华岩.牡蛎提取液对小鼠运动耐力及骨骼肌自由基、能量代谢酶的影响[J].现代预防医学,2013,40(1):106—108.

[4] 王海桃,刘赛.牡蛎糖胺聚糖对损伤的血管内皮细胞功能的影响[J].海洋水产研究,2007,5(10):106.
 [5] 王志峰.麦西来甫-木卡姆练习对维吾尔族肥胖妇女脂肪细胞因子、胰岛素和免疫球蛋白含量的影响[J].中国体育科技,2012,48(5):133—137.
 [6] 范锦勤.舞龙对男大学生免疫球蛋白和白细胞的影响[J].广州体育学院学报,2010,30(6):83—86.
 [7] 李勤,刘建平,肖国强,等.运动强度和运动量对血液免疫指标影响程度的比较研究[J].武汉体育学院学报,2011,45(11):97—100.
 [8] 李永峰,韩勇,郭勇力,等.黄芪注射液和有氧运动对一次力竭运动大鼠外周血T淋巴细胞亚群的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(14):181—184.
 [9] 高明,吴瑛,李国强.艾灸对大负荷训练期间男子中长跑运动员T淋巴细胞亚群的影响[J].中国运动医学杂志,2011,30(11):997—1001.
 [10] 王家中,姜传银.大强度训练对散打运动员免疫指标的影响[J].军事进修学院学报,2013,27(1):93—96.
 [11] 孙婧瑜,杨文吉,王茹,等.补充蒺藜提取物对过度训练大鼠T淋巴细胞亚群和NK、NKT细胞的影响[J].中国运动医学杂志,2011,30(5):456—459.

·短篇论著·

下肢智能反馈训练系统与电动起立床对脑卒中患者下肢功能影响的对照研究

陈佩顺¹ 黄臻^{1,2} 谭碧东¹ 张婉容¹ 郭桦¹

下肢智能反馈训练系统和电动起立床是当前常用的康复医疗设备,对上述设备应用的报道多倾向于能够改善体位性低血压的发生率^[1],提高下肢运动功能和ADL能力^[2]。但是,两者的运用有何区别?如何合理运用上述设备?相关报道尚少。现将本研究结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

取2012年3月—2013年8月我院康复医学科住院的脑卒中恢复早期(生命体征平稳后1—2周)伴有不同程度的运动功能障碍患者82例,其中脑出血37例,脑梗死45例,男46例,女36例,年龄36—72岁,病程1—3个月。入组标准:符合1995年全国第四届脑血管学术会议通过的诊断标准^[3],并经头颅CT或MRI确诊为初发脑卒中患者。排除标准:存在严重的心肝肾等重要器官疾病不能接受治疗者、严重的认知功能障碍、脑卒中恢复中后期、小脑卒中。采用随机单盲法把上述病例分成两组,其中下肢智能反馈训练系统组(简称“智能床组”)41例,电动起立

床组(简称“起立床组”)41例,两组患者一般资料见表1。

1.2 方法

两组均采用运动再学习(motor relearning programme, MRP)技术,接受常规康复治疗,即根据患者的功能状态进行床上翻身、转移、平衡、坐、站、步行、ADL等训练,智能床组采用广州一康医疗实业有限公司生产提供的下肢智能反馈训练系统进行站立训练,该系统由站立床、下肢踏步训练器和减重支持悬吊装置组成,可以在0—90°角度下进行减重踏步训练,根据患者的活动能力设置步幅(膝关节屈膝0—25°可调)和步速(0—80步/min,可调)和痉挛控制值(每出现1次痉挛系统自动暂停并降低步速2步/min,可调,痉挛缓解后设备自动继续治疗)。起立床组用英国产电动站立斜床进行站立训练,站立角度0—90°可调,从0—30°开始站立,如患者无不适第二天开始每次

表1 两组患者一般情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	性别(例)		病程(d)	脑卒中类型(例)	
			男	女		脑出血	脑梗死
智能床组	41	58.53±23.47	24	17	65.72±24.35	17	24
起立床组	41	57.82±24.32	22	19	66.28±23.65	20	21

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.06.017

1 广州市番禺区中心医院,511400; 2 通讯作者

作者简介:陈佩顺,男,主管技师; 收稿日期:2014-01-11