



摘 要

目的: 本研究采用不同持续时间低氧暴露后大鼠进行常氧下中等强度运动模型(模拟高住低练),探讨不同持续时间低氧暴露后运动条件下,观察大鼠胸腺组织细胞形态变化、细胞凋亡小体数目、胸腺组织分泌的胸腺素及 CD30 含量的变化、凋亡通路及相关因子蛋白及 mRNA 表达的影响,揭示不同持续时间低氧后运动对胸腺细胞凋亡的影响及其可能作用机制。

方法: 60 只 SD 大鼠按体重随机分为 6 组(10 只/组),即:正常对照组(A)、低氧暴露 8h 组(B)、低氧暴露 12h 组(C)、常氧运动组(D)、低氧 8h 暴露后运动组(E)和低氧 12h 暴露后运动组(F)。D、E、F 组大鼠在坡度为 0,速度为 25m/min 的 PT 动物跑台上每天运动 1h。运动完后,将 B、E 组和 C、F 组依次放入氧浓度为 12.5%(相当于海拔 4000m)的低氧舱内 8h 和 12h,共持续 4 周(5 天/周)。最后一次实验结束后 24 小时,大鼠腹腔麻醉断头处死,取胸腺组织液氮保存,胸腺组织匀浆后酶联免疫(ELISA)法检测胸腺组织胸腺素、CD30 的水平;制备胸腺组织石蜡切片,常规 HE 染色检测胸腺组织细胞形态学的变化;TUNEL 标记法在光镜下观察胸腺组织凋亡;免疫组化法检测大鼠胸腺组织细胞 HIF-1 α 、B 细胞淋巴瘤/白血病癌基因-2(B cell lymphoma/leukemia 2, Bcl-2)、Bax(Bcl-2 associated x, Bax)因子的蛋白水平;RT-PCR 法检测大鼠胸腺细胞 HIF-1 α 、Bcl-2、Bax 的 mRNA 水平。

结果: (1) 组织匀浆胸腺素、CD30 含量变化:胸腺素、CD30 含量 A 组、B 组、C 组三组之间比较均显示,具有显著性差异($p < 0.05$),

两两比较 A 组胸腺素、CD30 的含量均低于 B 组和 C 组, C 组高于 B 组, 具有显著性差异 ($p < 0.05$); E 组、F 组、D 组三组比较, 胸腺素与 CD30 均无显著性差异 ($p > 0.05$), 但 E 组和 F 组较 D 组有上升的趋势; D 组、E 组、F 组胸腺素、CD30 含量分别高于 A 组、B 组、C 组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

(2) HE 染色显示: A 组胸腺组织细胞结构完整, 胞核较大, 核膜完整。髓质与皮质部未见特殊改变; B 组胸腺细胞较 A 组胸腺细胞无明显的变化, 在皮质部分出现少量的脱落细胞; C 组胸腺小体部分细胞肿胀, 核膜部分边缘脱落, 在皮质可见较多的脱落细胞; D 组胸腺小体部分扩大, 细胞呈扁平, 细胞间隙增大; E 组胸腺小体扩大, 胸腺小体细胞轻度肿胀, 少量核膜有轻度损坏未见脱落; F 组胸腺细胞水肿, 以皮质部最为严重, 在皮质部可见到细胞核损坏的脱落细胞。

(3) TUNEL 染色显示: 胸腺细胞凋亡阳性颗粒多发生在皮质和髓质, 少发生在胸腺小体部分。图像分析表明 E 组、F 组、D 组三组凋亡指数之间比较, 呈显著性差异 ($p < 0.05$), 两两比较 F 组阳性凋亡均高于 D 组和 E 组, E 组高于 D 组, 具有显著性差异 ($p < 0.05$); D 组、E 组、F 组凋亡指数分别高于 A 组、B 组、C 组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

(4) 免疫组织化学染色石蜡切片观察大鼠胸腺组织 HIF-1 α 的蛋白表达显示: HIF-1 α 免疫组织化学阳性物质定位于胞浆内, 细胞核内偶见, 核膜阴性, 呈弥散或颗粒状主要分布于胸腺组织皮质部分。统计学分析结果显示: A 组、B 组、C 组三组之间比较, 具有显著性差异 ($p < 0.05$), 两两比较 B 组和 C 组表达均高于 A 组比较, 均具有显著性差异 ($p < 0.05$); E 组、F 组、D 组三组比较, 具有显著性差异 (p

<0.05); 两两比较 F 组均高于 D 组和 E 组, E 组低于 D 组, 均具有显著性差异 ($p<0.05$); D 组、E 组、F 组阳性表达分别高于 A 组、B 组、C 组, 具有显著性差异($P<0.05$)。

(5) 免疫组化染色石蜡切片观察大鼠胸腺组织 Bcl-2、Bax 的阳性表达显示: bcl-2、Bax 免疫组织化学阳性物质定位于胞浆内, 偶见细胞核内, 核膜阴性, 呈弥散或颗粒状主要分布于胸腺组织皮质部分。统计学分析结果: Bcl-2、bax 的阳性表达均显示 A 组、B 组、C 组三组之间比较, 具有显著性差异($p<0.05$), 两两比较 A 组阳性表达均低于 B 组和 C 组, C 组高于 B 组, 具有显著性差异 ($p<0.05$); D 组、E 组、F 组阳性表达分别高于 A 组、B 组、C 组, 具有显著性差异 ($P<0.05$)。

(6) 大鼠胸腺组织细胞凋亡与 Bax、Bax/bcl-2 比值的相关性以及 HIF-1a 与 Bax 表达的相关性显示:大鼠胸腺组织细胞凋亡指数与 Bax、Bax/Bcl-2 比值之间存在正相关 ($p<0.05$); 胸腺组织细胞 HIF-1a 的蛋白表达与 Bax 之间存在正相关($P<0.05$)。

(7) RT-PCR 检测 mRNA 的表达: Bcl-2、bax mRNA 表达 A 组、B 组、C 组三组之间比较, 具有显著性差异($p<0.05$), 两两比较 A 组 mRNA 表达均低于 B 组和 C 组, C 组高于 B 组, 具有显著性差异 ($p<0.05$); D 组、E 组、F 组 mRNA 表达分别高于 A 组、B 组、C 组, 具有显著性差异($P<0.05$); HIF-1a mRNA 表达 A 组、B 组、C 组三组之间比较, 具有显著性差异($p<0.05$), 两两比较 B 组和 C 组表达均高于 A 组比较, 均具有显著性差异($p<0.05$); D 组、E 组、F 组 mRNA 表达分别高于 A 组、B 组、C 组, 具有显著性差异($P<0.05$)。

结论: 1.低氧暴露或运动促进胸腺组织浆液胸腺素和 CD30 的含

量升高，但低氧暴露后运动双重刺激下其含量没有变化。

2.低氧暴露或低氧暴露后运动诱导胸腺组织凋亡，凋亡多发生在皮质和髓质，胸腺小体少见，且低氧暴露 8h 作为应激原作用强度较缓和。

3.低氧暴露后运动诱导胸腺凋亡因子 Bax、bcl-2 蛋白表达以及 Bax/bcl-2 比值均升高，且 mRNA 与蛋白的表达一致。

4.低氧暴露后运动诱导 HIF-1a 的蛋白表达升高，但 mRNA 的表达与蛋白表达不一致。

5.Bax 与 bcl-2 参与胸腺细胞凋亡的调控，且 HIF-1a 可能协同 bcl-2 家族参与凋亡调控。随着低氧时间的延长，促凋亡因子 Bax 的表达加速，加快胸腺细胞凋亡。

关键词：低氧暴露；低氧运动；胸腺细胞凋亡；胸腺素；凋亡因子

ABSTRACT

Objective: By using of different duration of hypoxia training model, Effect of the different duration exercise under the condition to hypoxia of rat thymus cells in morphology, the number of apoptotic cells, thymus cells hypoxia inducible factor (Hypoxia Induced Factor-1 α , HIF-1 α) changes in apoptosis pathway-related factor bcl-2, Bax protein and mRNA expression, hypoxia of different duration exercise on thymocyte apoptosis and its mechanism.

Methods: 60 SD rats were randomly divided into 6 groups of 10 each, namely: control group (A), hypoxia 8h group (B), hypoxic 12h group (C), regular aerobic exercise group (D), hypoxia 8h exercise group (E) and 12h hypoxia exercise group (F). D, E, F group every day in the animal gradient of 0 to 25m/min speed treadmill exercise 1h. After exercise, the B, E group and C, F group in turn into the oxygen concentration of 12.5% (equivalent to an altitude 4000 m) in the hypoxic chamber 8h and 12h. Lasted 4 weeks, 5 days a week. The last 24 hours after the end of the experiment, rats were anesthetized intraperitoneally implementation, the ideal of whole blood taken after the eyeball were executed, and thymus tissue preparation of paraffin sections of thymus tissue, HE staining of thymus cell morphological changes; TUNEL labeling of thymus tissue were observed in the light of apoptosis index; immune staining of rat thymus cells HIF-1 α , B-cell lymphoma / leukemia oncogene -2 (B cell lymphoma / leukemia 2, Bcl-2), Bax (Bel-2 associated x, Bax) factors of the protein; RT-PCR detection of rat thymus cells in HIF-1 α , Bcl-2, Bax in the mRNA level.

Results: (1) Tissue thymosin, CD30 content: thymosin, CD30

content of A, B group, C group were compared among the three groups showed significant differences ($p < 0.05$), group A pairwise comparison of thymus .

(2) Thymus tissue in the HE staining: A group of thymus tissue structural integrity, membrane integrity, the nucleus is relatively large. Medulla and the cortex and there were no specific changes; B group than the A group of thymus cells in the thymus cells had no significant changes in the cortex when a small number of exfoliated cells; C group thymic corpuscles swelling, some edge off, shedding more visible in the cortex cells; D group significantly expanded thymic corpuscles, flat cells, cell gap increases; E group than the D group of thymic corpuscles scope and extent of degeneration were significantly smaller than and light in the D group, thymic corpuscles mild swelling; F Thymus edema and degeneration of cells to the cortex serious, can be seen in the cortex of the small number of exfoliated cells.

(3) TUNEL staining: positive granules in apoptosis of thymocytes in medulla more, few parts of the cortex. Image analysis showed that the E group, F group, D group compared among the three groups, showing significant difference ($p < 0.05$), the expression of any two F groups were higher than D group and E group, E group was higher than D group, with significant difference ($p < 0.05$); D group, E group, F group were higher than the positive group A, B group, C group, with significant difference ($P < 0.05$).

(4) Immunohistochemical staining of rat thymus tissue HIF-1 α protein expression displayed: HIF-1 α immunohistochemical positive signal in the cytoplasm, which showed diffuse or granular distribution in the cortical part of the nucleus occasionally. Statistical analysis showed that: A

group, B group, C group compared among the three groups, with significant difference ($p < 0.05$), 22 compared the expression of B group and C group were higher than A group were significant difference ($p < 0.05$); E group, F group, D group compared three groups with significant difference ($p < 0.05$); 22 more F group was higher than D group and E group, E group than in D group, were significant differences ($p < 0.05$); D group, E group, F group were higher than the positive group A, B group, C group, with significant difference ($P < 0.05$).

(5) Immunohistochemical staining of rat thymus tissue Bcl-2, Bax expression showed positive, bcl-2, Bax immunohistochemistry positive signal in the cytoplasm, occasionally in the nucleus. Statistical analysis: Bcl-2, bax expression showed positive group A, B group, C group compared among the three groups, with significant difference ($p < 0.05$), Comparison of expression were lower than the B group group and C group, C group was higher than B group, with significant difference ($p < 0.05$); D group, E group, F group were higher than the positive group A, B group, C group, with significant difference ($P < 0.05$).

(6) Thymus tissue apoptosis of rat and Bax, Bax/bcl-2 the correlation ratio and the HIF-1 α and Bax expression show: rat thymus tissue cell apoptosis and Bax, Bax/Bcl-2 There was a positive correlation between the ratio ($p < 0.05$); thymus cells HIF-1 α protein expression and positive correlation between Bax ($P < 0.05$).

(7) RT-PCR detection of mRNA expression: Bcl-2, bax mRNA expression of A group, B group, C group compared among the three groups, with significant difference ($p < 0.05$), A group of mRNA expression compared lower than the B group and C group, C group was higher than B group, with significant difference ($p < 0.05$); D group, E

group, F group mRNA expression were higher than A, B group, C group, significant differences ($P < 0.05$); HIF-1 α mRNA expression of A group, B group, C group compared among the three groups, with significant difference ($p < 0.05$), compared the expression of B group and C group were higher than group A comparison, there were significant differences ($p < 0.05$); D group, E group, F group were higher than the mRNA expression of A group, B group, C group, with significant difference ($P < 0.05$).

Conclusion:

1. Hypoxic exposure on exercise for thymosin thymus size and CD30 levels increased, but when the duration of hypoxia, the content does not rise instead of decrease.

2. Hypoxic and / or exercise induced thymus apoptosis, more than in medulla, cortex rare, and the original role of hypoxia as a stress intensity 8h modest.

3. Hypoxic and / or exercise induced thymic apoptosis factor Bax, bcl-2 protein expression, and mRNA and protein expression of the same.

4. Hypoxic and / or exercise induced HIF-1 α protein expression increased, but mRNA and protein expression of inconsistency.

5. Bax and bcl-2 apoptosis of thymus cells, and HIF-1 α may be synergistic bcl-2 family involved in apoptosis regulation. As the hypoxia time, the expression of pro-apoptotic factor Bax to accelerate, accelerate thymocyte apoptosis.

Key Words: hypoxia; hypoxic exercise; thymocyte apoptosis; Fluid thymosin; Apoptotic factors

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	V
1 前言	1
2 材料与方法	3
2.1 实验动物	3
2.2 主要试剂与仪器	3
2.2.1 主要试剂	3
2.2.2 主要仪器	4
2.3 实验方法	5
2.3.1 实验分组	5
2.3.2 切片标本制备	6
2.3.3 组织匀浆及 ELISA 测定	6
2.3.4 HE 染色	7
2.3.5 TUNEL 染色	7
2.3.6 免疫组织化学染色	9
2.3.7 胸腺组织总 RNA 提取	10
2.3.8 RT-PCR 反应	10
2.4 质量控制	11
2.5 统计学分析	12
3 结果	13
3.1 大鼠胸腺细胞形态学的变化	13

3.2 组织匀浆胸腺素、CD30 含量.....	14
3.3 大鼠胸腺细胞 TUNEL 法凋亡检测.....	14
3.3.1 显微图像结果.....	14
3.3.2 凋亡发生率.....	15
3.3.3 凋亡指数.....	15
3.4 凋亡信号通路相关因子蛋白表达.....	16
3.4.1 免疫组化图像观察.....	16
3.4.2 Bcl-2、bax、HIF-1 α 蛋白阳性表达.....	18
3.5 凋亡信号通路相关因子 mRNA 表达.....	20
3.6 凋亡指数与凋亡信号相关因子表达的相关程度.....	21
4 讨论.....	23
4.1 低氧运动对胸腺形态结构的影响.....	23
4.2 低氧运动对胸腺分泌的激素及激素类物质的影响.....	24
4.3 低氧运动对凋亡相关因子 Bax、bcl-2 蛋白及 mRNA 表达的影 响.....	25
4.4 低氧运动对 HIF-1 α 蛋白及 mRNA 表达的影响.....	27
5 结论.....	29
参考文献.....	41
缩略词表.....	45
后 记.....	46
湖南师范大学学位论文原创性声明.....	47

1 前言

随着国家西部大开发战略与实施,进入高原海拔低氧环境地区的人越来越多,以及最近由“高原训练”改良而来的“低氧运动健身房”模拟高原训练的新启,人快速进入低氧环境会因缺氧发生以呼吸、消化和中枢神经系统症状为主的急性高原反应,严重者会导致高原肺水肿(high altitude pulmonary edema, HAPE)和/或高原脑水肿(high altitude cerebral edema, HACE)^[1-2]。低氧应激,可引起机体一系列的生理生化机能改变,而且低氧是许多疾病如休克、癌症、免疫性疾病等发生发展最基本的病理环节。目前国内外对高原医学和低氧运动生理学的研究主要集中在呼吸、心血管、中枢神经、运动等系统,而低氧及低氧运动所引起的免疫损伤一直未引起足够的重视。特别是在低氧的浓度、低氧的持续时间、运动强度等问题上对免疫系统胸腺组织细胞发生的细胞信号通路以及蛋白质组等方面的报道甚少。

刚进入高原或低氧运动环境,可使机体产生非特异性反应(即应激反应),具有双重效应:一方面使机体出现各系统不同程度的损伤,另一方面在全身进行抗损伤反应动员,表现出病理反应和生理反应的双重效应^[3]。流行病学资料显示,高原居民肺部感染有增加的倾向,高海拔兵站士兵比低海拔士兵易患肺炎,高原土著居民婴儿肺炎的发病率和死亡率大大增加,高原患病毒性感冒更易发展为高原肺水肿^[4]。这些提示低氧或低氧运动可能损伤机体特别是免疫系统,增加机体对疾病的易感性,促进高原病的发生发展。这将严重影响进驻高原者的身体健康和高原作业,以及高原训练的效率。

细胞凋亡是受一系列基因控制的程序化细胞死亡方式,它是通过

外源性或内源性的凋亡信号, 激活细胞内编码的自杀程序而促发的生理性死亡^[5]。对于胸腺(thymus)作为机体的重要淋巴器官, 与免疫功能紧密相关, 分泌激素胸腺素, 可使由骨髓产生的干细胞转变成T细胞, 因而有增强细胞免疫功能的作用。而CD30作为TNF- α 家族, 在T、B细胞、单核细胞、粒细胞和胸腺髓质上皮细胞上有表达; CD30在细胞增长、活化、分化和细胞凋亡过程中发挥重要的作用。胸腺细胞凋亡在维持胸腺细胞损伤与恢复中是不可缺少的环节。在以往胸腺细胞凋亡的研究中主要集中在运动训练及药物干预对大鼠胸腺细胞糖皮质激素及其受体和淋巴细胞群等的影响^[6-9]。大强度运动可引起Bax基因大量表达, Bcl-2基因表达量减少, Bax和Bcl-2的比率增加, 同时细胞凋亡的数目增加, 细胞凋亡过度, 可影响器官功能, 从而影响身体器官机能, 导致运动能力下降^[10-11]。而通过低氧运动对胸腺细胞凋亡信号通路及相关因子会产生何种影响, 胸腺细胞凋亡与不同低氧暴露后运动时间和方式的关系如何, 缺少此方面文献的报道。

本实验通过不同持续时间低氧暴露后运动大鼠模拟低氧运动模型, 观察胸腺细胞形态和凋亡数目的变化, 检测胸腺组织匀浆液胸腺素及CD30的变化、凋亡相关信号分子bcl-2、Bax和HIF-1 α 的蛋白及mRNA的表达水平, 探讨不同持续时间低氧暴露后对大鼠胸腺细胞发生凋亡信号通路的影响及其作用的可能机制, 为科学地指导人类进行低氧运动提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 实验动物

8周龄健康雄性SD(Sprague dawley)大鼠60只,体重180-220g,由湖南农业大学实验动物中心提供,为清洁级实验动物。分笼饲养,自由饮食,国家标准啮齿类动物饲料饲养(湖南农业大学实验动物中心提供)。室温 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度45%~55%。

2.2 主要试剂与仪器

2.2.1 主要试剂

(1) ELISA 试剂盒:胸腺素、CD30 购进于美国 R&D 公司由上海申工生物公司分装。

(2) TUNEL 标记细胞凋亡试剂盒和 DAB 染色剂:北京鼎国生物工程有限公司;

(3) Bax 一抗 Santa Cruz 提供,北京鼎国分装编号 st-7480 批号: F0509; bcl-2 一抗 Santa Cruz 提供,国家鼎国分装,编号 st-7382 批号: F1605; HIF-1 α 一抗 Santa Cruz 提供,北京鼎国分装编号 HIF-1 α (B-9): st-5620 批号: F0608;

(4) 即用型二抗免疫组化试剂盒(兔和鼠源)购于北京鼎国生物技术有限公司,批号: K3001204;

(5) 免疫组化油笔、多聚赖氨酸、PBS 缓冲液购于福州迈新生物工程有限公司;

(6) 苏木素、伊红染色剂、EDTA、TBS 液、柠檬酸盐组织抗原修复液、0.9%氯化钠注射液、甲醇、无水乙醇、冰醋酸、多聚甲醛、

松节油等常用分析纯试剂分别购于湖南省肿瘤医院;

(7) 10%水合氯醛: 由中南大学湘雅医学院提供; 溴化乙啶: 购自 MP Biomedical.LLC; 琼脂糖粉: 由 ShangHai YiTo Bio-instrument Company 提供;

(8) RNAiso Reagent、DEPC 处理水、RNA PCR kit (AMV) 均购自 TaKaRa Biotechnology (Da Lian) CO.Ltd;

(9) Taq 聚合酶、dNTP、DNA Ladder、Mark 及 Ladder 水均由 Fermentas 公司提供;

(10) 根据 Gene Bank 核酸数据库中大鼠各因子 cDNA 序列, 用生物软件 Primer5.0 自行设计 PCR 引物。以下引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成(见表 2-1)。

表 2-1 Bax、Bcl-2 和 HIF-1 α PCR 引物设计

Gene	Annealing temperature(°C)	Product Size (base pairs)	Sequence(5' to 3')
Bax	58	469bp	F TTGCTACAGGGTTTCATCCA RTGAGGACTCCAGCCACAAA
Bcl-2	59	446bp	F CCCTGGCATCTTCCTTC R CATCCCAGCCTCCGTTATC
HIF-1 α	55	390bp	F TCTCATTCTGCTCGTGG R GGTATGAAATGGCAAATCG
β -actin	60.4	486bp	F TCTGCTCCTCCCTGTCTTA R TGTCATATTTCTCGTGGTTC

注: β -actin 为内参

2.2.2 主要仪器

- | | |
|-----------------------|-----------------|
| (1) OLYMPUS 光学显微镜 | 日本 Jaran 公司 |
| (2) HM3401 型旋转切片机 | 德国 MICROM 公司 |
| (3) YBL-III型生物组织冷冻包埋机 | 湖北孝感医用研究所 |
| (4) HI1220 型烘片机 | 上海 Leica 器材有限公司 |

- | | |
|--------------------------|-------------------|
| (5) Eppendorf 冷冻台式高速离心机 | 德国 |
| (6) 台式电热恒温干燥箱 | 上海医疗器械厂 |
| (7) 梯度 PCR 仪 | eppendorf 德国 |
| (8) 德国 EFORD 低温高速离心机 | 德国 Hettich 公司 |
| (9) Simple PCI 专业图像分析系统 | 美国 |
| (10) PT 动物电动跑台 | 浙江杭州立泰科技有限公司 |
| (11) WFJ722 型可见分光光度计 | 上海仪器有限公司 |
| (12) SH·W1600 型三用电热恒温水浴箱 | 天津莱斯特公司 |
| (13) 199C K54 型电动匀浆机 | 美国 EQU-GLASCOL 公司 |
| (14) 自动酶标仪 | 雷杜电子有限公司 |
| (15) 低氧仪 | 美国 HyPoxico 公司 |
| (16) TOXIBLAEPGM-36型氧气监测 | 美国HyPoxico公司 |
| (17) 天能凝胶成像系统 (Tan3500) | 上海天能科技公司 |

2.3 实验方法

2.3.1 实验分组

将 60 只大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只: A.正常对照组、B.低氧暴露 8h 组、C.低氧暴露 12h 组、D.常氧运动组、E.低氧暴露 8h 后运动组和 F.低氧暴露 12h 后运动组。本实验采用 0 坡度动物 PT 跑台的训练方式, 对 D、E 和 F 三组以 25m/min 速度的中等强度每天训练 1h。训练完后, 将 B、C、E 和 F 组低氧舱内暴露, 氧浓度为 12.5% (相当于 4000m 海拔高度), 过 8h 和 12h 后, 分别将 B、E 组和 C、F 组取出放入正常氧浓度环境。训练共持续 4 周, 每周 5 天。实验分组情况见表 2-2。

表 2-2 实验动物分组
Tab.2.2 Groups of rats in the experiment

组别	组号	氧浓度状态	低氧后运动
正常对照组	A	常氧浓度	安静
低氧暴露 8h 组	B	12.5%氧浓度暴露 8h	安静
低氧暴露 12h 组	C	12.5%氧浓度暴露 12h	安静
常氧运动组	D	常氧浓度	25m/min 跑台运动 1h
低氧暴露 8h 运动组	E	12.5%氧浓度暴露 8h	25m/min 跑台运动 1h
低氧暴露 12h 运动组	F	12.5%氧浓度暴露 12h	25m/min 跑台运动 1h

2.3.2 切片标本制备

60 只实验大鼠，用 10%的水合氯醛麻醉（0.3ml/100g 体重）腹腔注射，断头处死，取位于胸骨后灰赤色，扁平椭圆形的胸腺组织。胸腺组织标本按照长、宽、高为 2mm×2mm×4mm 的标准取样，置于液氮保存和 4%的多聚甲醛磷酸缓冲液(0.01M, PH=7.4)中固定 24h 左右后用 0.1mol/L 的磷酸缓冲液（PBS）冲洗后，放入 10% EDTA 脱钙 10 天；常规酒精梯度脱水，透明，石蜡包埋；旋转切片机连续切片（3 μ m），厚度：3 μ m，60℃烘烤 2-3h 后置于 4℃冰箱保存待用。

2.3.3 组织匀浆及 ELISA 测定

称量胸腺组织 1g，用小眼科剪刀剪碎，置于 2ml 的生理盐水中，用匀浆机匀浆。匀浆混合液 1000 转/min 离心 15min，取上层液应用酶标仪检测。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

（1）确定检测所需的已包被因子的酶标板孔数目，增加 1 孔作为空白显色孔；

（2）配制 500pg/ml→15.6pg/ml 蛋白标准品：配置 6 只 1.5ml 离心管，将试剂盒中胸腺素、CD30 标准品用样品稀释液稀释，分别为 500pg/ml，250pg/ml，125pg/ml，62.5pg/ml，31.3pg/ml，15.6pg/ml 的标准液；

(3) 将 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.3pg/ml, 15.6pg/ml 的标准品各 0.1ml 依次加入一排 6 孔中, 1 孔只加样品稀释液的作为零孔, 匀浆液样本用样品稀释液每孔加入 0.1ml;

(4) 将酶标板加上盖, 置于恒温水浴箱, 37℃反应 60min;

(5) 将准备好的 ABC 工作液按每孔 0.1ml 依次加入 (空白显色孔除外), 置于恒温水浴箱 37℃反应 30min, 0.01M PBS 洗涤 3 次, 每次浸泡 1-2min 左右, 吸去或甩去多余液体;

(6) 按每孔依次加入 0.1ml TMB 显色液, 37℃避光反应 20min;

(7) 按每孔依次加入 0.1ml TMB 终止液;

(8) 用酶标仪在 450nm 测定 OD 值。

2.3.4 HE 染色

石蜡切片于二甲苯和松节油中分别透明脱蜡一次, 每次 10min; 100%乙醇溶液中脱苯两次, 每次 2min; 梯度 95%、90%、80%、70%乙醇溶液中水化, 各 1min, 蒸馏水冲洗 2min; 将切片置于苏木素中染色 10min, 蒸馏水冲洗 5sec; 1%盐酸乙醇分化 15sec, 蒸馏水冲洗 15min; 将切片置于 0.5%伊红液 2min; 梯度 70%、80%、90%、95%乙醇溶液中脱水, 各 1min; 99%乙醇溶液中脱水两次, 每次 5min; 二甲苯透明两次, 每次 2min; 水冲洗 5min, 中性树脂胶封片; 光学显微镜($\times 200$)下每张切片随机观察 6 个视野观察。

2.3.5 TUNEL 染色

细胞凋亡中, 染色体 DNA 双链断裂或单链断裂而产生大量的粘性 3'-OH 末端, 可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下, 将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的

衍生物标记到 DNA 的 3'-末端,从而可进行凋亡细胞的检测,这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase mediate nick end labeling, TUNEL)^[12]。按说明书操作: a.3%双氧水的阻断内源性辣根过氧化物酶浸泡 30 分钟; b.0.15mol/L 的 PBS+TW 洗两次, 5min/次; c.将切片浸泡在 2×SSC 80℃20min; d.0.15mol/L 的 PBS+TW 洗两次, 5min/次; e.蛋白酶 K 消化 0~20min; f.0.15mol/L 的 PBS+TW 洗两次, 5min/次; g.TdT 缓冲液孵育 10min; i.TdT 反应液 37℃孵育 1h; j.将切片浸泡 2×SSC10 分钟; k.0.15mol/L 的 PBS 洗两次, 5min/次; m.链卵白素标记的辣根过氧化物酶孵育 30min; n.0.15mol/L 的 PBS+TW 洗两次, 5min/次; l.0.01%r DAB 显色 5~10min; k.苏木素复染 3-5min, 1%的 HCL 中 1min, 冲水 2-3min, 在饱和碳酸锂中反蓝, 水冲洗 5min, 吹干, 中性树脂封片。

在普通光学显微镜下观察,阳性凋亡细胞表现为细胞核呈棕黄色或棕褐色着染,部分胞浆也可因胞核 DNA 碎片溢出而呈阳性着染;正常细胞核和阴性对照细胞核被苏木素复染成蓝色(凋亡阳性核被染成不是蓝色的时候如 DAB 显色呈棕黄色或黄色时),核相对较大,形态大小一致。可根据下列标准确定着色阳性细胞为凋亡细胞:(1)单个散在分布;(2)具有凋亡的核形态,胞浆和核皱缩;(3)周围无炎症反应。对于缺乏凋亡核形态的阳性细胞,除非染色强度与背景有鲜明对比,且呈单个分布,否则不认为是凋亡细胞。光学显微镜(×200)下每张切片随机观察 6 个视野,每个视野至少 500 个细胞水平。以 Simple PCI 显微图像分析软件测试每 100 个细胞中的平均阳性凋亡细胞数,计算平均凋亡细胞数,即凋亡指数 (Apoptosis Index, AI),此外每组

发生了胸腺细胞凋亡的大鼠占组内总只数的百分比用凋亡发生率(%)表示。

2.3.6 免疫组织化学染色

利用特异性一级抗体与胸腺组织中 Bcl-2、Bax、HIF-1 α 。抗原结合,一抗再与生物素标记的第二级抗体结合,生物素标记的二抗,再通过生物素与抗生物素蛋白的亲合力使生物素标记的第二级抗体与抗生物素蛋白-生物素-过氧化物复合体结合,DAB 使生成的抗原抗体复合物染成棕黄色或棕褐色。将石蜡切片于二甲苯中浸泡 2 次,每次 10min,脱蜡至水;置于 95%、80%、70%乙醇溶液中各 5min 复水;3% H₂O₂ 室温孵育 10min 以灭活内源性酶,蒸馏水洗 3 次;将切片浸入 0.01M 的柠檬酸盐缓冲液 (PH6.0) 中加热沸腾 2 分钟(先将柠檬酸煮沸),室温冷却后蒸馏水冲洗,冷却后 0.1 M PBS+TW 洗 2 次;滴加 5%BSA 封闭液,室温 20 分钟,甩去多余液体,不洗;滴加一抗(第一抗体原液按 1: 100 稀释),室温 60min,0.1M PBS+TW 洗 2min \times 3 次;滴加二抗(兔和鼠源)一滴,室温 20min,0.1 M PBS+TW 洗 2min \times 3 次;滴加试剂 SABC,室温 20min,0.1 M PBS+TW 洗 5min \times 4 次;DAB 显色,室温显色 10min,蒸馏水冲洗;苏木素轻度复染;水冲,反蓝,吹干、封片。

用 SimplePCI 图像分析系统对免疫组化阳性产物的灰度和面积进行分析,具体步骤为:每张切片在 \times 200 倍镜下选取不相重叠的 3 个代表性视野,测量阳性产物的面积和灰度值以及所选区域的平均灰度值。阳性产物的表达用阳性单位表示,计算公式

$$\frac{|\text{阳性灰度} - \text{平均灰度}|}{\text{阴性面积}} \times 100$$

$$\frac{\text{阴性面积}}{\text{阴性面积} + \text{阳性面积}} \times 256 \quad [13]$$

2.3.7 胸腺组织总 RNA 提取

取出胸腺组织，称量 100mg/只。加入液氮研磨，研磨后转移至已消毒处理过的 EP 管内，加 1ml Trizol，振荡混匀；4℃ 12000rpm 离心 15min，弃沉淀；加 200 μl 氯仿，振荡混匀 15s，室温静置 5min；4℃ 12000rpm 离心 10min，小心吸取上清液于另一 EP 管中，后加 500 μl 异丙醇，颠倒混匀，过夜；4℃ 12000rpm 离心 15min，去上清，再用冷冻的 75%乙醇洗涤，静置片刻；4℃ 12000rpm 离心 5min，去上清，EP 管口朝上干燥（约 15min）以利乙醇挥发，再加 DEPC 水 10 μl 溶解，振荡混匀。紫外分光光度法测定提取的总 RNA 的吸光度 (A) 值， $1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.0$ ；琼脂糖凝胶电泳显示 28S、18S、5S 三条电泳条带，表明所提取的总 RNA 无降解，可作为逆转录反应的模板。

2.3.8 RT-PCR 反应

(1) 逆转录：根据核酸测定仪测定的 mRNA 浓度，用 DEPC 处理水调节 RNA 浓度至 1 μg/μl。反转录总反应体系为 20 μl。取 3 μl 浓度 1 μg/μl 的 RNA 于薄壁 PCR 管中，加 1 μl Oligo primer 再在管内加入 8 μl DEPC 处理水、1 μl 10×Buffer、1 μl dNTP、4 μl RNase inhibitor、2 μl AMV 反转录酶，此操作均在冰浴上进行。再将装有上述混合液的 EP 管放入恒温水浴箱内 42℃ 60min，72℃ 5min，然后 -80℃ 保存，获得 cDNA 的第一链。

(2) 聚合酶链式反应：总反应体系为 25 μl。取 1 μl cDNA 模板，加入 10×Taq Buffer 8.5 μl，2mM dNTP 2.5 μl，1.5 mM MgCl₂ 1.5 μl，1 μl

上游引物和 1 μ l 下游引物, Taq 酶 1 μ l, DEPC 水 9.5 μ l。此操作均在冰盒上进行。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 退火温度 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 分钟, 一般 33 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟。

(3) 琼脂糖凝胶电泳: 取 5 μ l PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 30min 后, 放入凝胶成像系统中, 紫外灯下观察并拍照。用凝胶图像分析系统对电泳条带的分子量和吸光度进行分析, 图像处理及灰度分析用 TANON 凝胶图像分析系统进行, 结果用目的基因和 β -actin mRNA 电泳带吸光度的比值表示。

2.4 质量控制

原位细胞凋亡检测细胞凋亡过程中: ①用两种方法进行热抗原修复, 比较效果, 一种利用电磁炉高温高压进行热抗原修复, 另外一种利用蛋白酶 K 修复, 结果发现电磁炉高温高压修复效果更好; ②内源性过氧化物酶的阻断的预实验时间(阻断时间与组织切片的厚度有关)分别为: 10min, 20min, 30min, 找出最佳阻断时间 20min。③DAB 染色时在显微镜下观察染色情况, 控制染色时间(5-10min), 否则影响背景颜色。

免疫组织化学法测定 HIF-1、Bcl-2、Bax 过程中: ①一抗浓度: 同一组胸腺组织切片分别以一抗 PBS 比为 1:100, 1:200, 1:400, 不同浓度的工作液孵育, 观察染色结果直到找出最佳浓度 1:200; ②二抗孵育时间: 同一组胸腺组织切片在滴加二抗后的孵育时间分别以 20min、30min、40min 找出最佳二抗的孵育时间 20min; ③电磁炉高温高压抗原修复时间: 同一组胸腺组织切片放置于高温高压修复时间分别为 1min, 2min, 3min, 找出最佳热抗原修复时间 2min; ④DAB 染色时在显微镜下观察染色情况, 控制染色时间(5-10min)。另外测定

中一定要注意玻片不能干燥, 否则出现假阳性。⑤做凋亡实验的时候, 另外还取用了湖南省肿瘤医院临床肝组织做了阳性对照, 并且每次实验做了阴性对照。

RT-PCR 法测定 HIF-1、Bcl-2、Bax mRNA 过程中: ①RNA 提取中, 在加入异丙醇后可操作有室温至 10-30min, 或-20℃2h, 或-20℃过夜, 找出最佳效果-20℃过夜。②在反转录中, 加入的样品量 0.1-5 μ l 的 RNA 稀释液; 结果最佳体积 3 μ l。③退火温度与引物的长度可以影响 PCR 的结果, 退火温度和引物较长时, 结果表明应适量增加 PCR 循环的次数。④琼脂糖凝胶电泳中, 胶带保持无水泡, 尽量保持平整, 琼脂糖浓度为 2%。⑤电泳中发现, 条带的亮度本身与 RNA 的纯度呈正比, 本实验所有组大鼠 RNA 的纯度 A_{260}/A_{280} 值 1.8 ± 0.2 。

2.5 统计学分析

所有数据均用 SPSS16.0 统计学软件分析, 用 $\bar{X} \pm S$ 表示各数据的平均值和分散程度。A、B、C 三组与 D、E、F 三组采用单因素方差分析, A 与 D、B 与 E、C 与 F 组比较采用双侧 t 检验。显著性水平取 $\alpha=0.05$ 。胸腺细胞凋亡指数与 HIF-1 α 、Bcl-2 以及 Bax 之间进行双侧相关性分析。

3 结果

3.1 大鼠胸腺细胞形态学的变化

3.1.1 HE 染色

HE 染色显示, 光学显微镜 ($\times 200$) 观察, 每张载玻片组织观察取 6 个视野, A 组胸腺组织细胞结构完整, 胞核较大, 核膜完整。髓质与皮质部未见特殊改变; B 组胸腺细胞较 A 组胸腺细胞无明显的变化, 在皮质部分出现少量的脱落细胞; C 组胸腺小体部分细胞肿胀, 核膜部分边缘脱落, 在皮质可见较多的脱落细胞; D 组胸腺小体部分扩大, 细胞呈扁平, 细胞间隙增大; E 组胸腺小体扩大, 胸腺小体细胞轻度肿胀, 少量核膜有轻度损坏未见脱落; F 组胸腺细胞水肿, 以皮质部最为严重, 在皮质部可见到细胞核损坏的脱落细胞。具体见图 3-1。

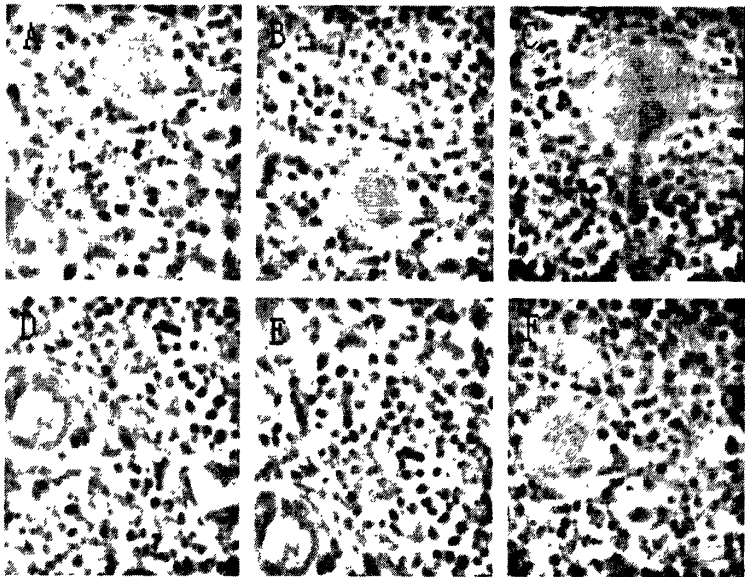


图 3-1 大鼠胸腺组织的 HE 染色 ($\times 200$), 石蜡切片

注: A. 正常对照组 B. 低氧 8h 组 C. 低氧 12h 组

D. 常氧运动组 E. 低氧 8h 运动组 F. 低氧 12h 运动组

3.2 组织匀浆胸腺素、CD30 含量

从表 3-1 中可以看出：胸腺素、CD30 含量 A 组、B 组、C 组三组之间比较均显示，具有显著性差异($p<0.05$)，两两比较 A 组胸腺素、CD30 的含量均低于 B 组和 C 组，C 组高于 B 组，具有显著性差异 ($p<0.05$)；E 组、F 组、D 组三组比较，胸腺素与 CD30 均无显著性差异 ($p>0.05$)，但 E 组和 F 组较 D 组有上升的趋势；D 组、E 组、F 组胸腺素、CD30 含量分别高于 A 组、B 组、C 组，具有显著性差异 ($P<0.05$)。具体见表 3-1。

表 3-1 胸腺组织匀浆液胸腺素、CD30 的含量

分组	胸腺素 (ug/l)	CD30 (pg/ml)
A	3.60±0.08	23.80±3.03
B	4.55±0.21*	26.18±2.74*
C	5.89±0.89*	33.90±2.56*
D	6.14±0.87#	35.63±3.71#
E	6.42±1.02#	36.33±3.78#
F	6.02±1.04#	36.28±4.26#

注：*： $p<0.05$ A、B、C 三组之间相比；+： $p<0.05$ D、E、F 三组之间相比；#： $p<0.05$ D 组与 A 组相比，E 组与 B 组相比，F 组与 C 组相比，E 组与 B 组相比。

3.3 大鼠胸腺细胞 TUNEL 法凋亡检测

3.3.1 显微图像结果

显微图像观察结果见图 3-2：胸腺组织凋亡细胞核以 TUNEL 法标记显示，运动与低氧中均出现胸腺细胞凋亡，低氧时间越长，凋亡的细胞逐渐增多(参见图 3-2)：G 为阴性对照片(箭头表示阳性细胞)：

A 组，胸腺组织皮质、胸腺髓质偶见阳染颗粒。

B 组，胸腺组织皮质、胸腺髓质偶见阳染颗粒。

C 组，胸腺组织皮质、胸腺髓质可见阳染颗粒，胸腺小体上皮偶见阳染颗粒。

D组, 胸腺组织皮质、胸腺髓质阳染颗粒与正常对照组和低氧组比较有所增加。

E组, 胸腺组织皮质、胸腺皮质可见阳染颗粒。

F组, 胸腺组织皮质、胸腺髓质出现了较多的散在的阳染颗粒, 胸腺小体部位偶见。

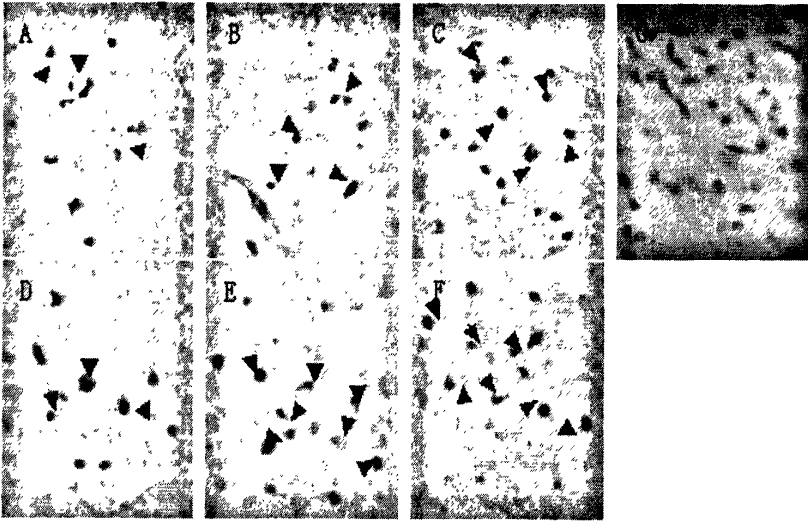


图 3-2 大鼠 TUNEL 染色 ($\times 200$), 石蜡切片, DAB 显色
注: A.正常对照组 B.低氧 8h 组 C.低氧 12h 组 D.常氧运动组
E.低氧 8h 运动组 F.低氧 12h 运动组 G.阴性对照片

3.3.2 凋亡发生率

A、B、C、D、E、F 组大鼠胸腺组织细胞的凋亡发生率依次为: 60%、60%、70%、70%、70%、70%; 各组之间比较均无显著性差异 ($P>0.05$)。

3.3.3 凋亡指数

凋亡指数(AI)A 组 $4.88 \pm 1.12\%$ 、B 组 $4.98 \pm 1.98\%$ 、C 组 $7.38 \pm 1.69\%$ 三组之间进行比较, 无显著性差异($p>0.05$), 但 B、C 组较 A 组均有上升趋势; E 组 $5.051.47\%$ 、F 组 $9.05 \pm 1.04\%$ 与 D 组 $15.4 \pm 4.78\%$

三组之间比较,呈显著性差异($p<0.05$),两两比较 F 组凋亡指数均高于 D 组和 E 组, E 组高于 D 组,具有显著性意义 ($p<0.05$); D 组、E 组、F 组阳性凋亡分别高于 A 组、B 组、C 组,具有显著性差异 ($P<0.05$)。(参见图 3-3)。

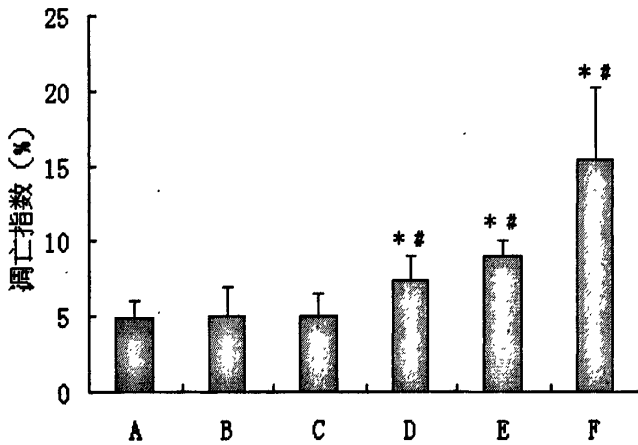


图 3-3 大鼠凋亡指数

注: A.正常对照组 B.低氧 8h 组 C 低氧 12h 组 D.常氧运动组
E.低氧 8h 运动组 F.低氧 12h 运动组

*: $p<0.05$ D 组、E 组、F 组三组之间进行比较;

#: $p<0.05$ D 组与 A 组、E 组与 B 组、F 组与 C 组两组之间进行比较

3.4 凋亡信号通路相关因子蛋白表达

3.4.1 免疫组化图像观察

Bcl-2、Bax、HIF-1 α 表达以免疫组化法标记显示如下: G 为阴性对照片。具体见图 3-4, 图 3-5, 图 3-6。

A 组,胸腺细胞质及胞浆内偶见 BCL-2、Bax、HIF-1 α 免疫阳性物质,表达很弱。

B 组,胸腺细胞质及胞浆内少许免疫阳性物质, Bcl-2、Bax 呈浅黄色稀疏分布, HIF-1 α 呈浅黄色较集中。

C 组,胸腺细胞质及胞浆内少许免疫阳性物质,少有在胞核,核

膜呈阴性。Bcl-2、Bax 呈浅黄色较集中，HIF-1 α 呈浅黄色密集集中。

D 组，胸腺细胞阳染物质增加，少有在胞核，核膜呈阴性。Bcl-2、Bax 呈黄色密集集中，HIF-1 α 呈深黄色密集集中胞浆。

E 组，胸腺细胞阳性染色定位于胞浆，少有在胞核，核膜呈阴性。阳染物质 Bcl-2、Bax 呈深黄，HIF-1 α 呈棕黄色。

F 组，胸腺细胞阳染物质明显增加，位于胞浆，少有在胞核，核膜呈阴性。Bcl-2、Bax 呈强阳染棕褐色。大量阳性 HIF-1 α 表达反应物位于胞浆内，细胞核偶见。

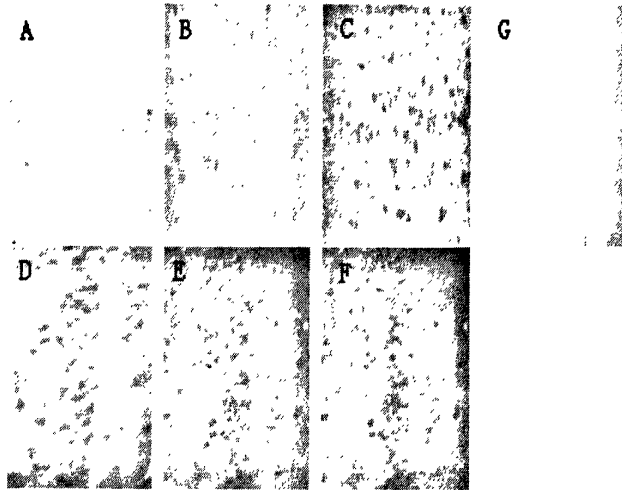


图 3-4 各大鼠 Bcl-2 免疫组化染色 ($\times 100$)，石蜡切片，DAB 显色

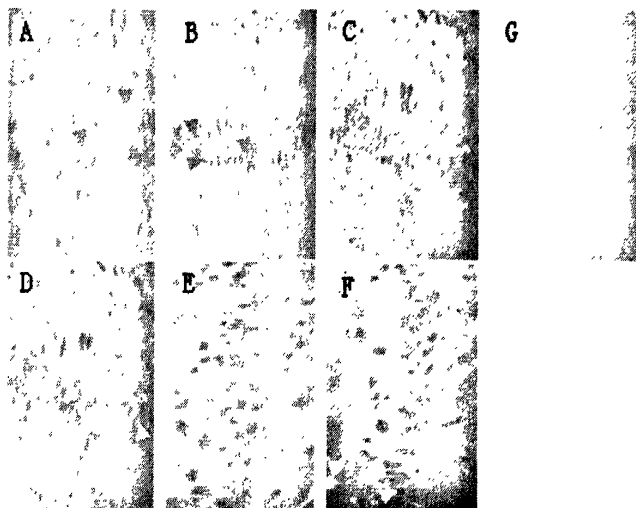


图 3-5 各大鼠 bax 免疫组化染色 ($\times 100$)，石蜡切片，DAB 显色

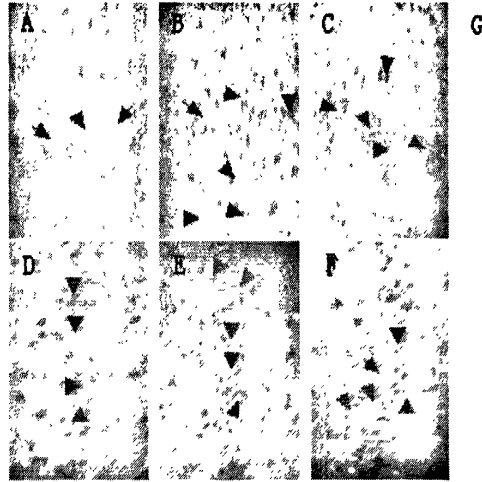


图 3-6 各组大鼠 HIF-1 α 免疫组化染色 ($\times 100$), 石蜡切片, DAB 显色

注: 图 3-4、3-5、3-6 中 A.正常对照组 B.低氧暴露 8h 组 C 低氧暴露 12h 组

D.常氧运动组 E.低氧暴露 8h 运动组 F.低氧暴露 12h 运动组 G.阴性对照片

说明: 图中因背景和显色均偏淡取 $\times 100$ 视野视觉, 但阳性表达取 $\times 200$ 计算。

3.4.2 Bcl-2、bax、HIF-1 α 蛋白阳性表达

从显微图像分析结果显示: Bcl-2、bax 的阳性表达以及 Bax/ Bcl-2 比值 A 组、B 组、C 组三组之间比较均显示, 具有显著性差异($p < 0.05$), 两两比较 A 组阳性表达均低于 B 组和 C 组, C 组高于 B 组, 具有显著性差异($p < 0.05$); E 组、F 组、D 组三组比较, 无显著性差异($p > 0.05$), 但 E 组和 F 组较 D 组有上升的趋势; D 组、E 组、F 组阳性表达分别高于 A 组、B 组、C 组, 具有显著性差异($P < 0.05$)。具体见表 3-2, 图 3-7, 图 3-8。

HIF-1 α 的阳性表达显示: A 组、B 组、C 组三组之间比较, 具有显著性差异($p < 0.05$), 两两比较 B 组和 C 组表达均高于 A 组比较, 均具有显著性差异($p < 0.05$); E 组、F 组、D 组三组比较, 具有显著性差异 ($p < 0.05$); 两两比较 F 组均高于 D 组和 E 组, E 组低于 D 组, 均具有显著性差异 ($p < 0.05$); D 组、E 组、F 组阳性表达分别高于 A

组、B组、C组,具有显著性差异($P < 0.05$)。具体见表3-2,图3-9。

表3-2 各组大鼠 Bcl-2、bax、HIF-1 α 的阳性表达

分组	Bcl-2 阳性表达	Bax 阳性表达	HIF-1 α 阳性表达
A	3.60 \pm 1.08	3.80 \pm 1.03	7.83 \pm 2.28
B	6.55 \pm 0.21*	8.18 \pm 2.74*	14.7 \pm 3.68*
C	7.89 \pm 0.89*	13.90 \pm 2.56*	19.35 \pm 3.72*
D	8.14 \pm 2.87#	14.63 \pm 3.71+#	23.6 \pm 3.19+#
E	8.42 \pm 3.2#	16.33 \pm 3.78+#	19.33 \pm 3.78+#
F	10.02 \pm 4.4#	19.28 \pm 4.26+#	25.6 \pm 4.98+#

注: *: $p < 0.05$ A、B、C三组之间相比; +: $p < 0.05$ D、E、F三组之间相比; #: $p < 0.05$ D组与A组相比, E组与B组相比, F组与C组相比, E组与B组相比。

A组、B组、C组、D组、E组和F组大鼠胸腺组织 Bax/bcl-2 的比值依次为 1.05 \pm 0.39、1.24 \pm 0.73、1.76 \pm 0.37、1.8 \pm 0.52、1.93 \pm 0.88、1.92 \pm 0.73。A组、B组、C组三组之间比较,均具有显著性差异($p < 0.05$); D组、E组、F组三组之间比较,均无显著性差异 ($p > 0.05$); 但 D组、E组、F组比值分别高于 A组、B组、C组,具有显著性差异($P < 0.05$)。

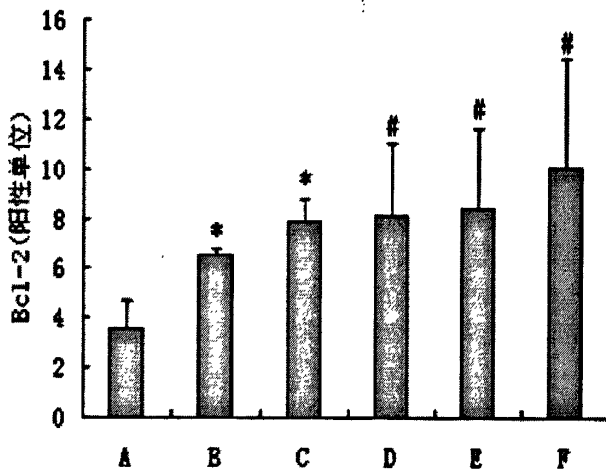


图3-7 各组大鼠 Bcl-2 的阳性表达

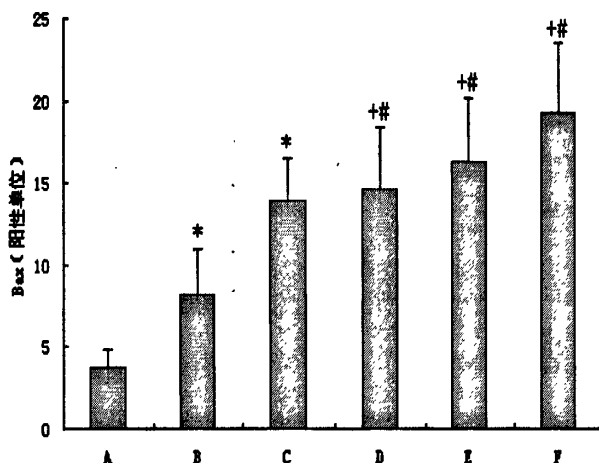


图 3-8 各组大鼠 bax 的阳性表达

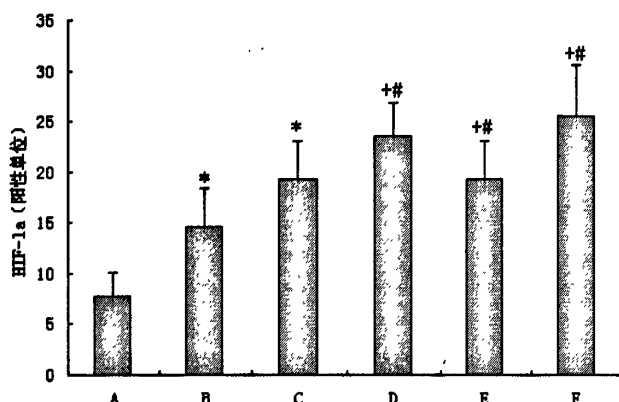


图 3-9 各组大鼠 HIF-1α 阳性表达

注：*：p<0.05 A、B、C 三组之间相比，+：p<0.05 D、E、F 三组之间相比；#：p<0.05 D 组与 A 组相比，E 组与 B 组相比，F 组与 C 组相比，E 组与 B 组相比。

3.5 凋亡信号通路相关因子 mRNA 表达

对上述 4 个基因 RT-PCR 反应凝胶扫描灰度比值结果显示：Bcl-2、bax mRNA 表达以及 Bax/Bcl-2 比值 A 组、B 组、C 组三组之间比较均显示，具有显著性差异(p<0.05)，两两比较 A 组 mRNA 表达均低于 B 组和 C 组，C 组高于 B 组，具有显著性差异 (p<0.05)；E 组、F 组、D 组三组比较，无显著性差异 (p>0.05)，但 E 组和 F 组较 D 组

有上升的趋势；D组、E组、F组 mRNA 表达分别高于 A 组、B 组、C 组，具有显著性差异($P<0.05$)。具体见表 3-3，图 3-7，图 3-8。

HIF-1 α mRNA 表达显示：A 组、B 组、C 组三组之间比较，具有显著性差异($p<0.05$)，两两比较 B 组和 C 组表达均高于 A 组比较，均具有显著性差异($p<0.05$)；E 组、F 组、D 组三组比较，无显著性差异($p>0.05$)，但 F 组较 D 组与 E 组，E 组较 D 组均有升高的趋势；D 组、E 组、F 组 mRNA 表达分别高于 A 组、B 组、C 组，具有显著性差异($P<0.05$)。具体见表 3-3，图 3-10，图 3-11。

表 3-3 各组大鼠 Bcl-2、bax、HIF-1 α mRNA 的表达

组次	Bcl-2 / β -actin A 值	Bax / β -actin A 值	HIF-1 α / β -actin A 值
A	0.1491 \pm 0.0223	0.2771 \pm 0.0450	0.2691 \pm 0.0223
B	0.2501 \pm 0.0315*	0.453 \pm 0.03800*	0.6133 \pm 0.0108*
C	0.3961 \pm 0.0243*	0.6433 \pm 0.0118*	0.7433 \pm 0.0118*
D	0.6601 \pm 0.0420#	0.713 \pm 0.0810+#	0.8601 \pm 0.0712#
E	0.67120 \pm 0.0242#	0.8241 \pm 0.0112+#	0.8741 \pm 0.0212#
F	0.8241 \pm 0.0112#	0.987 \pm 0.0730+#	0.8941 \pm 0.0612#

注：*： $p<0.05$ A、B、C 三组之间相比，+： $p<0.05$ D、E、F 三组之间相比；#： $p<0.05$ D 组与 A 组相比，E 组与 B 组相比，F 组与 C 组相比，E 组与 B 组相比。

3.6 凋亡指数与凋亡信号相关因子表达的相关程度

大鼠胸腺组织细胞凋亡指数与 Bax 蛋白表达相关系数 $r=0.62$ ，与 Bax/Bcl-2 比值的相关系数 $r=0.829$ ；HIF-1 α 与 Bax 蛋白表达相关系数 $r=0.752$ ，大鼠胸腺组织细胞凋亡指数与 Bax、Bax/Bcl-2 比值之间存在正相关 ($p<0.05$)；胸腺组织细胞 HIF-1 α 的蛋白表达与 Bax 之间存在正相关($P<0.05$)。

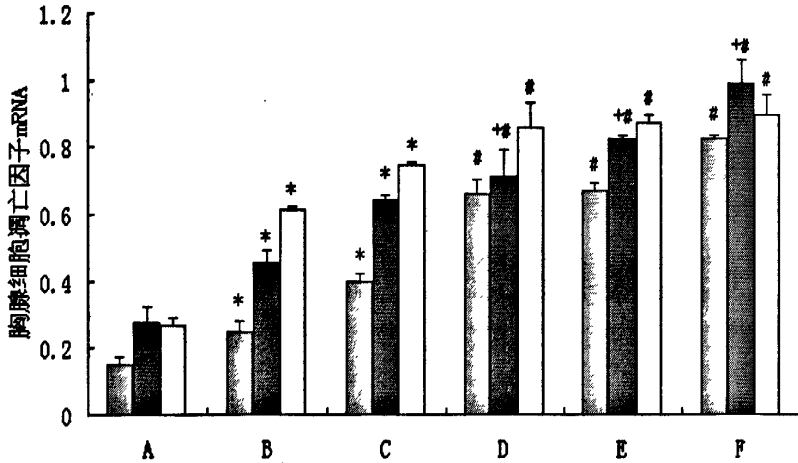


图 3-10 各组大鼠胸腺细胞凋亡相关因子 mRNA 的表达

注: *: $p < 0.05$ A、B、C 三组之间相比, +: $p < 0.05$ D、E、F 三组之间相比;
#: $p < 0.05$ D 组与 A 组相比, E 组与 B 组相比, F 组与 C 组相比, E 组与 B 组相比。

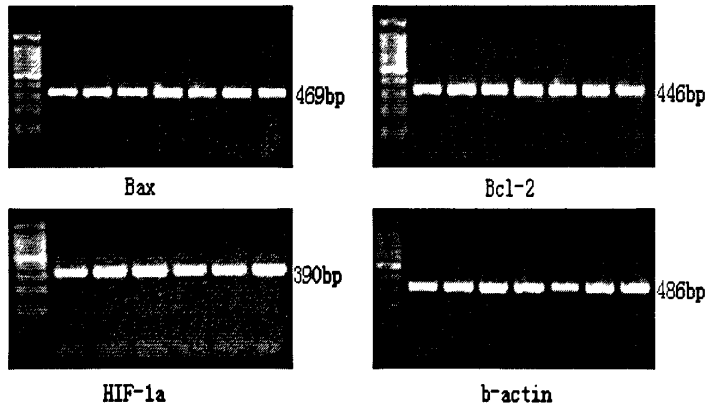


图 3-11 琼脂糖凝胶电泳图谱

4 讨论

在机体内部随时都发生着细胞的死亡,传统上用显微镜来观察细胞的死亡,其特征为核染色质的浓缩和碎片的形成,但是这种现象出现很晚,时间也短暂。凋亡的特征是内源性核酸内切酶被激活,细胞自身染色质或 DNA 被切断,出现单链或双链缺口^[14-16]。机体免疫细胞的增殖与死亡过程达到动态平衡是机体维护内环境稳定和行使免疫功能的必要条件。若机体免疫细胞异常增殖或凋亡减退则是自身免疫性疾病产生的病理学基础,导致机体免疫机能低下,炎症的产生等疾病^[17]。低氧运动为解决运动与低氧负荷双重刺激同时存在的矛盾,机体能在不同的时间分别接受缺氧和运动双重负荷,使之相互协调,最大限度地调动机体的免疫能力。本本采用不同持续时间低氧暴露后进行跑台运动模型,探索在低氧、运动及在低氧暴露后运动条件下胸腺组织分泌的激素及激素类物质的变化、凋亡通路 Bcl-2、Bax 因子在胸腺细胞中蛋白及 mRNA 表达的变化,旨在揭示低氧和低氧运动导致胸腺细胞凋亡对免疫系统起到的保护作用及其可能机制。

4.1 低氧运动对胸腺形态结构的影响

胸腺是机体免疫的主要调节者,它是人类主要的中枢免疫器官,是 T 细胞分化、发育、成熟的场所。它通过分泌胸腺类激素,影响并调节 T 细胞的分化发育和功能。已有研究表明运动训练可诱导骨骼肌、心肌及肝细胞凋亡^[19-22]。同样近来有些证明运动能够诱导胸腺细胞凋亡。Hoffman-Goetz 等^[23]将 C57BL/6 雌小鼠的胸腺细胞在体外以相当于一次急性中等强度运动应激下的皮质酮水平孵育 210min,导致胸腺细胞凋亡率增加。Concondet 和 Frrey 等^[24]以 Wister 进行斜坡

10%，速度 20m/min 的跑台运动至力竭。发现无论两次力竭（间隔 24h、1 次力竭、还是中等强度（相当于 1 次力竭强度的一半）训练，运动后胸腺细胞 DNA 均表现出梯状电泳这一典型的凋亡特点，而 24h 后均检测不到凋亡现象。提示运动应激能诱导大鼠胸腺细胞凋亡，且与运动强度无关。Lin 等^[25]发现 Wister 大鼠进行跑台运动，速度 13.8m/min，60-90min/d，连续 2 天，可诱导胸腺细胞 DNA 断裂；服用抗氧化剂 BHA 可阻断运动所诱导的胸腺细胞 DNA 断裂。表明该运动能诱导胸腺细胞凋亡，而活性氧基团（ROS）在其中起了一定作用。本实验结果发现：随着低氧时间延长而出现胸腺组织损伤，提示低氧暴露 8h 作为应激原作用强度较缓和。低氧暴露 8h 后运动组较常氧训练组病变明显减轻，胞核基本正常，胸腺小体轻度肿胀，TUNEL 染色可见阳颗粒凋亡小体的出现；而低氧暴露 12h 后运动组胸腺细胞水肿样变性，以皮质和髓质部分最为严重，表现为细胞间隙扩大，可见脱落细胞，TUNEL 染色见较多散在胸腺皮质的阳性颗粒，凋亡小体增多；可能低氧刺激过强或作用时间过长时，机体通过应激产生的抵抗力和适应力最后被耗竭，机体就会出现损伤、凋亡、甚至死亡现象，这是低氧应激后的病理反应。提示低氧暴露 12h 后运动组低氧刺激过强或作用时间过长，使胸腺组织出现损伤、凋亡的组织形态学改变，这揭示了过长时间低氧暴露后运动增强机体的胸腺免疫组织的病理发生，影响其功能，从而本研究为人进入高原或高原训练的效率可能的提供参考意义。

4.2 低氧运动对胸腺分泌的激素及激素类物质的影响

胸腺为机体的重要淋巴器官，具内分泌机能的器官，分泌胸腺激素及激素类物质，其分泌的物质与胸腺细胞的发育和生长紧密相关。

从 40 年代开始, 已从胸腺中提出十几种有效的激素或激素类物质, 它们无种属特异性, 在某种程度上代替胸腺机能, 以微量存在于血中, 以环核苷酸 (cAMP) 作为第二信使, 可视为胸腺激素 (thymine)。其中研究最多的是胸腺素 (thymosin)。胸腺素为怀特 (White) 和戈尔茨坦 (Goldstein) 从小牛胸腺中提取出来的、分子量为 12000 道尔顿的蛋白质。能使免疫缺陷病人的 T 细胞机能得到恢复, 可诱导无胸腺及去胸腺小鼠的 T 细胞机能, 并可增加小鼠胸腺细胞中的环鸟苷酸。此外, 胸腺激素 I, 也是从小牛胸腺中提取出来的多肽, 以后进一步提纯成胸腺激素 II, 亦有诱导 T 细胞的机能。此激素存在于胸腺皮质或髓质上皮细胞中, 而不存在胸腺细胞中。

CD30 分子属于肿瘤坏死因子 TNF 家族, 为 I 型跨膜蛋白, 前体在高尔基体上糖化而来, 表达于 T、B 细胞、单核细胞、中性粒细胞和胸腺髓质上皮细胞上, 在胸腺细胞增殖和凋亡中发挥着重要的调控作用, 活化和诱导 B 细胞产生抗体^[18]。本研究中发现, 低氧暴露后胸腺素、CD30 的含量增高, 但是低氧暴露 12 小时与低氧暴露 8 小时没有变化; 在运动应激下, 大鼠胸腺素、CD30 的含量均升高, 说明运动促使了胸腺细胞分泌激素或激素类物质, 从而提高免疫功能。而在低氧运动的双重应激下, 大鼠胸腺细胞分泌的激素或激素类物质没有变化, 可能胸腺作为分泌器官其分泌能力有一定的限度, 从而在运动和低氧适应性刺激下胸腺素并没有变化。

4.3 低氧运动对凋亡相关因子 Bax、bcl-2 蛋白及 mRNA 表达的影响

细胞凋亡是基因控制的细胞主动的生理性死亡过程。研究发现, 有些基因表达蛋白质启动细胞凋亡(如bax, p53, caspase系等), 有些

表达蛋白质则抑制凋亡(如bcl-2), 而细胞最终的结果是生存还是死亡, 则取决于不同基因表达的比例^[26]。比如, 如果bcl-2表达的水平高于bax, 那么细胞可以存活, 反之则死亡。现已有多项研究都发现, bcl-2、bax和p53与运动诱导的细胞凋亡相关^[27-28]。高表达的bax从胞浆移位至线粒体膜时, bcl-2家族凋亡诱导蛋白bax和Bak发生构象改变, 寡聚的bax和Bak形成线粒体膜通路, 促进凋亡蛋白细胞色素c释放; 此外, bax还能与抗凋亡蛋白bcl-2、Bcl-xl等结合, 抑制其阻断bax和Bak寡聚化作用, 促进细胞凋亡发生; 且蛋白通过bax和Bak破坏线粒体外膜, 放大凋亡信号, 加速细胞凋亡。

国内外运动医学领域已有对运动后即刻胸腺细胞凋亡的研究, 得出了一些有益结论^[29-31]。Azenabor等通过实验发现, 力竭运动后即刻和力竭运动后24 h大鼠胸腺组织脂质过氧化物明显高于对照大鼠, 表明淋巴组织在力竭运动后发生氧化应激损伤, 这种损伤可引起激烈运动后的淋巴细胞损伤及凋亡^[32]。Woods等研究表明, 适宜的游泳运动和免疫调节剂可提升老年小鼠机体免疫功能, 增加胸腺皮质部分淋巴细胞分化的数量^[33]。力竭运动可引起胸腺细胞凋亡, 并伴有胸腺组织的应激性损伤。本研究中发现: 低氧暴露8h或低氧运动条件下, 促使凋亡因子Bax、bcl-2的蛋白表达, 同时Bax/bcl-2蛋白表达的比值升高, 但低氧运动组之间无显著性差异, 说明低氧和或运动均可诱导胸腺细胞发生凋亡, 且在低氧与运动双重刺激下, 胸腺细胞凋亡不会加重, 并且本模型中的中等强度运动病没有过度的引起胸腺细胞发生凋亡, 因此, 可能中等强度运动诱导胸腺细胞凋亡运动强度缓和适中。Bax、bcl-2的mRNA水平同样表达升高, Bax、bcl-2参与了胸腺细胞凋亡的调控。随着低氧暴露时间的延长, Bax/bcl-2的比值升高, 揭示

促进细胞凋亡的Bax基因表达随着低氧暴露时间的延长而增强,然而加速了胸腺细胞的凋亡,但8h低氧暴露或后运动较12h低氧暴露或后运动刺激更缓和适中。

4.4 低氧运动对 HIF-1 α 蛋白及 mRNA 表达的影响

近年来,许多国内外有文献报道低氧可以诱导机体某些特定基因的表达,其中低氧诱导因子HIF-1 α (HIF-1 α)被认为是细胞对低氧环境产生适应作用的一个关键环节,参与了低氧反应的许多调节过程^[34-35]。HIF-1 α 作为一种转录因子,低氧时在组织细胞中有广泛的表达,如肝、肾、脑、心等。它能与低氧反应有关基因中的低氧反应元件(HRE)上的结合位点偶联,从而调控在低氧时多种基因的表达,来缓解机体缺氧状态出现的机体机能的低下^[36-37]。

研究表明: HIF-1 α 自身活性的调节既可作为活性氧受体,适应环境中的低氧程度,同时又对起效应器作用的低氧暴露反应基因的转录具有调控作用^[51]。研究已经证实,只要低氧暴露的氧浓度降低,即可触发HIF-1 α 的激活,而且HIF-1 α mRNA水平增加^[38],但关于这一具体分子机制并不十分清楚。有研究证明^[39-40]其低氧暴露与HIF-1 α mRNA表达水平具有双重效应,在轻度低氧时,促进了其目的基因,从而促进低氧组织细胞存活而具有抗凋亡的功能;当低氧暴露持续时间过长时,可以调节凋亡相关因子,如bax等,导致Caspases系的激活,从而可能促进了低氧诱导的凋亡,即HIF-1 α 的激活影响细胞的增殖和凋亡的调控基因或通路^[41-42];另外有研究证明HIF-1 α 激活而使其蛋白表达增加,调节bcl-2、bax的基因表达,表明HIF-1 α 有可能在bcl-2、bax的表达调节中发挥作用,从而调节细胞凋亡的发生发展。本实验结果表明:大鼠胸腺组织细胞凋亡指数与bax蛋白阳性表达以及bax/ bcl-2比

值呈正相关。低氧12h运动组胸腺组织HIF-1 α 蛋白阳性表达最高，促细胞凋亡因子bax的蛋白阳性表达及bax/bcl-2的比值也最高；同时，胸腺凋亡指数也最高，提示HIF-1 α 表达可能协同bcl-2家族凋亡相关蛋白的表达，在低氧导致胸腺细胞凋亡中发挥促细胞凋亡的作用。然而，低氧暴露8h组HIF-1 α 的蛋白阳性的高表达与bcl-2凋亡蛋白及mRNA的表达相一致，表明其在低氧导致胸腺细胞凋亡中可能发挥抑制凋亡的作用。这提示HIF-1 α 可能在大鼠胸腺组织凋亡因子bcl-2、bax的蛋白阳性表达调节中发挥着重要作用，其作为机体凋亡调节因子具有双重效应。其中在低氧暴露8h后运动组和低氧暴露12h后运动组中蛋白表达水平与mRNA表达水平不一致，其可能原因是低氧运动HIF-1 α 的调控发生在转录水平，在其作为一个转录调节因子。HIF-1 α 与胸腺细胞凋亡调节的平衡关系还有待进一步研究。

5 结论

1.低氧暴露后或运动促进胸腺组织浆液胸腺素和 CD30 的含量升高, 但低氧暴露后运动双重刺激下其含量没有变化。

2.低氧暴露或低氧暴露后运动诱导胸腺组织凋亡, 凋亡多发生在皮质和髓质, 胸腺小体少见, 且低氧暴露 8h 作为应激原作用强度较缓和。

3.低氧暴露后运动诱导胸腺凋亡因子 Bax、bcl-2 蛋白表达以及 Bax/ bcl-2 比值均升高, 且 mRNA 与蛋白的表达一致。

4.低氧暴露后运动诱导 HIF-1a 的蛋白表达升高, 但 mRNA 的表达与蛋白表达不一致。

5.Bax 与 bcl-2 参与胸腺细胞凋亡的调控, 且 HIF-1a 可能协同 bcl-2 家族参与凋亡调控。随着低氧时间的延长, 促凋亡因子 Bax 的表达加速, 加快胸腺细胞凋亡。

参考文献

- [1]尹伟娜,张传新.高原训练的研究进展[J].北京体育大学学报,2005,17(3):115
- [2]Levine BD,Frideman DB,Engfrde k,et al. The effect of normoxic or hypobaric hypoxic endurance training on the hypoxic ventilatory response[J].Med Sci Sports Exerc,1992,24(7):769-775.
- [3]李尚师,郑必海,宋娟,等快速进入高原者肺功能变化及意义[J].高原医学杂志,2004.14(3):19-20.
- [6]st-Gundersen,levin BD: "living high and traing low":eanimprovesea level for maneat hletes[J].Br J Sports Med,1999,33(3):150-151.
- [7]Dehnert C,Huetler M,LiuY,et.Erythropoiesis and performance after two week sof living high And training 10 win Well trained triathletes[J].Internationail Journal of Sports Medieine,2007,23(8):561-566.
- [8]Townsend Nathan E, stopher J. HallnAllan G, etal.Living high-training low increase shyp exieventil atoryr esponse of well-trained enduran Ceathletes[J]. Journal of APPLIED Physin.2002,93(4):1498-1502.
- [9]陈佩杰,陶心铭,徐仁宝.慢性应激大鼠肝、脑胞液和胸腺细胞糖皮质激素受体的研究[J].体育科学,1991(1):45-47,51
- [10]Peijie C, Renbao X, Xinming T. Long2term endurance training induced changes in glucocorticoid receptors con2cent rations in rat and in man [J].The Journal of sport smedicine and physical fitness,2004,44 (3):322-327.
- [11]Thompson CB.apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J].science,1995,267:1456-1462.
- [12]Peng K, Chen X.D, Liang SP, et al. The effect of Huwentoxin-I on Ca^{2+} channels in differentiated NG108-15 cells, a patch-clamp study. Toxicon. 2001, 39(4), 491-498.
- [13]王君,全小林,李纯,等.增液汤抑制幼鼠胸腺细胞凋亡作用的机制探讨[J].中国中西医结合杂志,2003,23 (1):35-39.

- [14]邵金英,徐锋鹏,罗兴华.运动训练及还原煎对大鼠胸腺细胞糖皮质激素受体影响[J].广州体育学院学报,2001,21(6):32-35.
- [15]张新,项树林,尹亿民,等.黄芪多糖对小鼠胸腺细胞程序化死亡影响[J].中华微生物学和免疫学杂志,2006,17(3):204-207.
- [16]张洪勤,王勤.酵母提取物对小鼠免疫细胞凋亡的调节作用[J].温州医学院学报,1999,29(3):188-189.
- [17]李斌,田国才,林娜,等.广枣总黄酮对小鼠胸腺细胞凋亡及腺苷脱氨酶活性的影响[J].中华微生物学和免疫学杂志,1998,18(5):386-390.
- [18]赵春红,侯明.特发性血小板减少性紫癜的细胞免疫异常的研究新进展.中国实验血液学杂志,2006;14(5):1045-1048.
- [19]Sehumer M,Colombel MCI.Morphologic biochemical and molecular evidence of apoptosis during rethelation Phasea fterbrief Periods of renalise hemial.Am J Pathol,1992;140-148.
- [20]王长青,刘丽萍,郑师陵,等.游泳训练后大鼠骨骼肌细胞自由基代谢\线粒体膜电位变化与细胞凋亡的关系[J].中国运动医学杂志,2002,21(3):256-260.
- [21]王长青,刘丽萍,郑师陵,等.运动性疲劳时 Ca^{2+} 线粒体膜电位的改变与细胞凋亡[J].体育科学,2000,23(2):59-62.
- [22]金其贯,邓荣华,李宁川,等.过度训练对大鼠心肌细胞凋亡的影响[J].中国运动医学杂志,2000,19(4):236-240.
- [23]金其贯.慢性力竭性训练对大鼠骨骼肌细胞凋亡的影响[J].体育与科学,1999,25(3):23-28.
- [24] Maruyama T,Yamamoto Y,Sakai N ,et al.[J].Keio J Med ,2002 ,51(2) :93-99.
- [25] Wei Q , Alam MM , Wang MH , et al. Bid activation in kidney cells following ATP depletion in vit ro and ischemia in vivo. Am J Physiol Renal Physiol , 2004 , 286 (4) : 803-809.
- [26] Danial NN , Korsmeyer SJ.Cell death : critical cont rol point s. Cell ,2004 ,116 (2) : 205-219.
- [27]杨海平.低氧\运动对大鼠骨骼肌细胞凋亡及bcl-2 \bax表达的影响[J].中国运动医学杂志,2006 ,25 (6) :706-709.
- [28]Shimonovitz S, HurwitzA,DushnikM, et al. Developmental regulation of the exp resion of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion[J]. Am J Obstet Gynecol,1994,,171 (3) : 832-838.

- [29]Cleland SJ, Sattar N, Petrie JR, et al. Endothelial dysfunction as a possible link between p53 protein levels and cardiovascular disease[J]. Clin Sci (Lond), 2000 May, 98 (5) : 531-535.
- [42]Cauzac DM, Czuba JG, Hauguel-MS. Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of bax activation[J]. Placenta, 2003, 24: 378-384.
- [30] Murakawa M, Jung S K, Iijima K, et al. Apoptosis inducing protein AIP from parasite infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms [J]. Cell death and differentiation, 2001, 8(3):298-307.
- [31]张帆,李啸红,董建华,等.黄芪对小鼠胸腺细胞凋亡的抑制作用[J].中医药学报,2009,32 (6):37-38.
- [45]Azenabor A, Hoffman Goetz L. Intrathymic and intrasplenic oxidative stress mediates thymocyte and splenocyte damage in acutely exercised mice [J]. Journal of applied physiology, 1999, 86 (6) :1823-827.
- [32]Woods JA, Ceddia MA, Zack MD, et al. Exercise training increases the nerve to memory T cell ratio in old mice[J]. Brain, behavior and immunity, 2003, 17 (5) : 384-392.
- [33]Stroka Dm, Burkhardt T, Desbaillets, et al. HIF-1 α is expressed in normoxic tissue and displays organ specific regulation under systemic hypoxia[J]. FASEB J, 2001, 15 (13) : 2445-2453.
- [34]Zhongh, DE Matzo AM, Lauhgner, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. Cancer Res, 1999, 59: 5830-5835.
- [35]宋海邦,瓦龙美.低氧诱导因子-1研究进展[J].解剖科学进展, 2008, 8 (4): 372-376.
- [36]Takahashi H, Asano K, Nakayama H. Effect of endurance training under hypoxic condition on oxidative enzyme activity in rat skeletal muscle[J]. Appl. Human Science. 2006, 15 (3) :111-114.
- [37]Knaupp W. Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans[J]. J Appl Physiol, 1992, 73 (3):837-840.
- [38]KO ISTINEN PO, RUSKO H, IRJALA K, et al. EPO, red cells, and serum transferrin receptor in continuous and intermittent hypoxia[J]. Med Sci Sports Exerc, 2000, 32 (4):800-8044.

- [39]曹蕾.“高住低练”对大鼠骨髓促红细胞生成素受体的影响[D].湖南师范大学,2006.
- [40]冯连世,赵中应,洪平等.模拟高原训练对大鼠促红细胞生成素表达的影响[J].中国运动医学杂志,2001,20(4):358-360.
- [41]Eckardt KU. Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia [J].*J Appl Physiol*,1989(66):1785-1788.
- [42]Berglund B, Gennser H, Ornhaugen H, et al. Erythropoietin Concentrations during 10 Days of Normobaric Hypoxia under Controlled Environmental Circumstances [J]. *Acta Physiol Scand*,2002, 174:225-229.

文献综述

低氧运动与胸腺细胞凋亡

【摘要】模拟高原训练的新启，细胞凋亡进来成为热门的话题。凋亡作为机体维持内环境稳态的重要机制，而胸腺细胞的增殖与凋亡的失衡将导致机体免疫功能的紊乱。运动可以诱导细胞凋亡，凋亡与组织的发育、生长等生理活动紧密相关，那么低氧运动对胸腺免疫功能产生的影响及其机制的研究成为高原训练的理论基础。

【关键词】低氧；运动；胸腺；凋亡

前言

间歇性低氧训练、高住低练、低住高练、高住高练低练等训练方式已经广泛存在于竞技体育中，成为运动实践中提高运动能力的有利手段^[1-2]。大量的基础实验和运动训练实践发现低氧运动对不同组织细胞可能产生不同的效应，但是这种效应的作用机制并不清楚，特别是有关低氧运动与胸腺免疫组织的研究更加甚少。

机体免疫细胞的增殖与死亡(坏死、凋亡)过程达到动态平衡是机体维护自身恒定和行使功能的必要条件。在以往的大多数有关高原训练的研究中集中在对机体的保护作用的正面研究，而对机体损害的免疫功能相关的研究大多数停留在免疫细胞群的数量上的变化，而有关胸腺免疫组织的研究较少。我们知道若机体免疫细胞异常增殖而凋亡减退则是肿瘤形成及自身免疫性疾病产生的病理生理学基础^[6]。低氧运动为解决运动与低氧负荷同时存在的矛盾，运动员能在不同的时间分别接受缺氧和运动双重负荷，使之相互协调，最大限度地调动机体的免疫能力，又提高机体运动能力。因此，低氧运动诱导的胸腺细胞凋亡通路对免疫系统起到的保护作用，并有效提高机体免疫功能就有

着重要的意义。

1 胸腺细胞发育与凋亡

胸腺是人体免疫特别是细胞免疫的重要器官。胸腺的淋巴细胞又称为胸腺细胞,在皮质浅层细胞较大,为较原始的淋巴细胞。中层为中等大小的淋巴细胞,深层为小淋巴细胞。从浅层到深层为造血干细胞增殖分化为小淋巴细胞的过程。皮质内还有巨噬细胞,无淋巴小结。髓质中淋巴细胞少而稀疏,上皮性网状细胞多而显著。形态多样,胞质中有颗粒及泡状结构,为其分泌物。尚有散在圆形的胸腺小体,但作用尚不清楚。胸腺细胞由无T细胞表面标志的骨髓淋巴干细胞在胸腺组织的微环境中分化增殖,最终成为具有免疫功能的T细胞。发育可分3个阶段:1)初期阶段:从前驱细胞移入到完成T细胞受体(TCR) β 链重建的阴性(CD4-CD8-TCR-)细胞;2)中期阶段:从表达TCR链的阴性细胞到具有完整TCRAB的双阳性(CD4+CD8+)细胞;3)后期阶段:从双阳性细胞到单阳性细胞(CD4+CD8-或CD4-CD8+)。

T细胞在胸腺内发育过程中经历TCR基因重排与表达无T细胞、阳性选择和阴性选择三个主要事件,大部分未经选择的细胞因得不到任何选择信号刺激而死亡,称为无选择死亡(death by neglect)^[7]。阴性选择和无选择死亡过程涉及细胞凋亡通路,阳性选择过程在某种程度上也与凋亡用的负相调节有关^[8]。Smith用14天胎鼠胸腺器官培养7天,有50%以上胸腺细胞表达TCR,继续培养18小时后,胸腺细胞则减少,DNA电泳时出现梯形条带,电镜下可见典型的凋亡细胞。TCR介导的胸腺细胞凋亡与阴性选择机制的有关。 Ca^{2+} 导游剂也能诱导胸腺细胞凋亡, Ca^{2+} 在细胞信号传导系统中起第二信使作用,它可激活许多蛋白酶,而影响细胞功能^[9]。

在胸腺细胞发育过程中,凋亡通路参与胸腺选择的全过程,胸腺细胞存活与否的命运取决于不同分子对凋亡调节的综合结果。胸腺细胞的整个发育过程自始至终受到细胞凋亡通路的监控。对凋亡的抑制

作用使胸腺得以进入阳性选择过程,进一步发育成为具有功能的成熟细胞,执行免疫功能。对细胞凋亡的促进作用则使胸腺细胞进入阴性选择,使那些自身反应性细胞得以清除,避免了自身免疫的形成。而那些未经选择的大部分胸腺细胞也要通过凋亡机制在胸腺组织中原位死亡。如果免疫细胞凋亡通路出现紊乱,则将导致自身免疫病、肿瘤等相应疾病。但目前对凋亡通路的了解还很不全面,对机体如何调控细胞的增殖或凋亡以及凋亡信号转导的分子机制等方面仍需进一步研究。

2 运动训练与胸腺细胞凋亡

剧烈运动后常伴随着机体免疫能力的暂时性下降,导致运动员对疾病的抵抗力降低,是长期困扰教练员和运动员一个棘手的问题。目前国际上运动医学学者对淋巴组织、免疫细胞在运动训练条件下发生的细胞凋亡开展了一些研究性工作。其中有结果显示运动会导致小鼠胸腺淋巴凋亡^[11]。Concordet 等对两次力竭的 Wistar 大鼠胸腺进行细胞凋亡研究,发现无论两次力竭、一次力竭、还是中等强度(相当于一力竭强度的一半)训练,胸腺细胞 DNA 表现出梯带电泳这一典型的凋亡特点^[11]。Hoffman-Goetz^[12]等观察到雌性 C57BL/6 小鼠在 6% 坡度跑台上以 35m/min 的强度跑 90min (对照组则以 12m/min 的速度走 5min)之后 120min 时,大强度组比对照组的活性胸腺细胞百分比明显高,说明大强度运动关联着较低百分比的胸腺细胞凋亡早期信号。

Mars^[13]等对 11 位自愿者进行跑步力竭运动,分别在跑步前、力竭后即刻、24 小时和 48 小时取静脉血做单细胞凝胶电泳,显示力竭后即刻有 10% 的淋巴细胞出现单丝 DNA 损害,但在其它时间点未出现。Malm^[14]等研究认为离心运动将减少单核细胞活性,增加粘着力,这是因为改变受细胞在淋巴组织和血液之间流动、细胞凋亡和细胞与内壁附着及分离有关。

孙尔维^[15]等人的研究认为,细胞凋亡可主动性参与免疫反应,其依据是细胞凋亡常常跟随细胞免疫功能的降低,细胞凋亡可主动抑制巨噬细胞产生的炎症因子白介素因子、调节外周血单核细胞使其产生免疫抑制淋巴因子或降低 T 细胞株的免疫抗原性。从而,凋亡细胞可调节 T 细胞的活化抗原,进而影响 T 细胞得活化而导致免疫抑制,即细胞凋亡本身就是一种免疫抑制。

从目前的研究进展看:运动训练对淋巴细胞凋亡的影响具有双向性。大强度及大运动量训练可直接诱发免疫细胞凋亡,使免疫细胞数量显著性减少,表现为免疫功能受抑制;而适宜强度的运动一定程度上可以抑制免疫细胞的凋亡。这与运动员通常在大负荷运动训练后才出现免疫机能下降是相一致的,提示大负荷运动引起的免疫细胞凋亡加强,可能是运动导致的机体免疫功能下降的重要因素。

3 低氧与胸腺细胞凋亡

众所周知,低氧时间过长对机体组织具有损伤作用。已有研究表明,低氧通过增强中性粒细胞、巨噬细胞等激活炎症细胞产生促炎因子,导致包括肺在内的多器官炎症^[16]。高原低氧刺激,通过自主神经系统和内分泌系统的活动改变而影响机体免疫系统功能^[17]。有研究报告^[18],急性高原低氧可导致机体免疫功能降低,易感染性增加,淋巴细胞和中性粒细胞等免疫细胞减少, T 淋巴细胞激活与增殖功能受损,而 B 淋巴细胞的数量和功能无明显变化,自然杀伤细胞(nature killercell, NK)仅在急性低氧时一过性地增加,复氧 2h 后即可恢复正常,迄今为止,有关 CI-HH 对机体免疫功能的影响尚未完全明了。

大量研究表明,低氧作为环境应激刺激源,可明显影响机体的免疫功能,造成机体免疫功能稳态的破坏,机体的易感染性增加^[19-22]。低氧对机体免疫系统具有直接和间接的调节作用。高原低氧时可以诱发神经内分泌反应,使激素和神经递质的合成和释放能力改变,进而改变免疫功能^[23]。直接的调节通过外周单核细胞 (polymorphonuclear

neutrophilic granulocyte-s, PMNC) 的吞噬、受体表达及巨噬细胞迁移所实现^[24]。有证据显示低氧引起的免疫反应中信号转导机制的参与, 如 HIF-1 介导^[25]等等。

有研究发现, 海拔 4000m 高原急性和慢性低氧暴露后, CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞群减少, 有丝分裂原增殖活性反应(PHA)明显下降。Caldwell 等^[26]发现, 将小鼠胸腺细胞放在 2.5% 的低氧环境中培养时, T 淋巴细胞成熟延缓, 细胞因子分泌发生改变。Naldini 等人^[27]研究表明低氧使 T 细胞增殖反应下降, 细胞周期延迟, 大多数细胞停留在 G1 期。黄庆愿^[28]等研究报道, 急性低氧刺激在一定程度上抑制 T 淋巴细胞功能, 认为低氧可能影响细胞的能量代谢, 当组织氧供/需失衡时, 细胞中的代谢产物特别是磷酸腺苷含量增多, 因此抑制作用可能与低氧引起的组织间液中能量代谢有关。

4 细胞凋亡相关调控因子

细胞凋亡一般由细胞外的调节因素与其在细胞表面的受体结合而启动。细胞外的调节因素包括生理活性因子, 有研究发现 Fas、bcl-2、p53、c-myc、ced、TGF- β 等基因均参与了调控细胞凋亡的重要基因。细胞凋亡有两条独立的途径: ①是线粒体-细胞色素C通路。线粒体释放的细胞色素C能与 Apaf-1 及 Caspase-9 形成复合体, 在 dATP、ATP 存在下活化 Caspase-3、6、7 等成员, 使凋亡进行下去^[29]。②是通过激活死亡配体与死亡受体相偶联通路。bcl-2 是近几年来研究较多的几种基因。在细胞新陈代谢中如果细胞过度凋亡或者细胞凋亡不足是许多疾病发病的基础, 比如组织器官的退行性病变、早衰、艾滋病等; 若细胞凋亡不足就会导致细胞过剩性疾病, 比如癌症、自身免疫性疾病、某些病毒病等。

4.1 Bcl-2 信号通路

Villunger^[30-33]等用基因敲除小鼠, 敲低 bcl-2 表达, 结果在淋巴细胞群中发现了 CD4 和 CD8, 说明胸腺细胞凋亡的阴性选择中发现 Bax

和 bcl-2 介导通路是必要的。

Bcl-2 属原癌基因,由26KD编码的线粒体膜蛋白,现发现它是一种重要的凋亡抑制基因,能抑制多种因素引起或诱导的细胞凋亡。现已发现数个bcl-2的同源基因,如BHRF-1a、LMW4-HL、bax、bcl-x等基因,这些基因共同构成bcl-2家族。Bcl-2家族成员通常以二聚体的形式发挥作用,bcl-2/bax 和bcl-2/Bcl-X1 均能抑制细胞凋亡,而bad/bax、bax/bax、bcl-2/Bcl-Xs却不可促进细胞凋亡。Bcl-2抑制凋亡的可能机制是:通过拮抗另一原癌基因c-myc的致凋亡作用。也可能通过表达Bim蛋白,Bim含一蛋白作用框架BH3区,其可附着于促进细胞生存的分子上阻碍其功能的发挥,并活化FKHR-L1促进凋亡通过抑制活性氧,抑制脂质过氧化物的产生,从而可抑制过氧化物诱导的凋亡^[34-36]。

有学者认为Bcl-2通过抗氧化应激或抑制氧自由基的产生而发挥其抑制细胞凋亡的作用^[37-38]。Hockenbery等人发现Bcl-2基因缺陷小鼠可发现两种与氧化还原存在潜在联系性疾病:多囊肾和色素沉着不足,揭示Bcl-2具有抗氧化应激作用,它可阻止产生的活性氧族(ROS)通过脂质过氧化反应造成细胞损害,但以后研究发现Bcl-2过表达可阻止^[39-40]。

4.2 低氧运动中 HIF-1 α 的调控作用及机制

HIF-1 α 是 1992 年 Semenza 在 Hep3B 细胞株中发现的一种 DNA 结合蛋白。HIF-1 α 有 91、93、94、120kDa 的四个肽链,91、93、94kDa 三链是从一个前体而来,所以它们之间的肽谱比较相似,通常 HIF-1 α 的 120kDa 肽链和 91、93、94kDa 肽链之一是以异双链二聚体的形式存在,只有少量的以四聚体形式存在^[41]。HIF-1 由两个亚单位组成,一个 120KD 的 α 亚单位(HIF-1 α) 和一个 91/93/100kd 的 β 亚单位(HIF-1 β)。在低氧环境中,HIF-1 α 可以被诱导大量表达并介导低氧诱导基因的调控,使低氧诱导基因表达增强,产生生理效应。比如调节 VEGF 基因

的转录使得产生更多的毛细血管增强氧气和能源物质的运输供给;对糖酵解酶的调节可以增强无氧条件下糖酵解能力等等。

Hoppeler 通过对未经训练的健康人在低氧暴露下(相当于 4000m)进行八周有氧运动后,发现 HIF-1 α mRNA 在低氧运动后明显增加,但在正常氧状态下却没有观察到这个结果^[42-43]。黄丽英等研究结果提示:经过间歇性重复缺氧暴露和运动训练双重刺激,心肌 HIF-1 α mRNA 表达增加, HIF-1 α 可能参与形成适应时机体心血管系统的缺氧耐受与自我保护,是低氧适应机制之一^[44]。至今虽然还未有足够的有关低氧训练中 HIF-1 α 及 HRG 研究证据,即 HIF-1 α 是如何协调低氧、运动中的有利和不利两种因素,最终使机体产生适应性变化,随着对不同低氧训练模式中 HIF-1 α 作用的深入研究,有望揭示低氧运动提高机能的内在机制。

但到目前为止还没有 HIF-1 α 直接参与缺血、低氧胸腺细胞凋亡的证据。Gwag 建立的低氧模型观察到: HIF-1 α 和 bcl-2 能够保护皮质神经原使其凋亡减少,说明 HIF-1 α 是通过抑制 bcl-2 表达的信号途径来促进神经细胞凋亡的。Carmeliet 等研究也表明 HIF-1 α 与 Bcl-2、p53 等因子的表达存在非常紧密的关系。由于 HIF-1 是细胞转录调节的重要因子,因而 HIF-1 α 是否对 Bcl-2 和 Bax 表达具有调节作用值得深入研究。探讨 HIF-1 与凋亡的关系将会揭示低氧特异的细胞凋亡机制。

5 展望

综上所述,国内外有关运动训练对胸腺细胞功能的影响较多,但在低氧运动对胸腺免疫功能方面特别是胸腺细胞凋亡这一点的研究不多,低氧、运动时间、运动方式等对胸腺细胞免疫功能作用的机制尚不清晰。低氧与运动双重负荷过程对胸腺细胞凋亡的调控仍然存在争议还在继续的探讨中,低氧与运动的双重负荷对胸腺细胞凋亡通路相关蛋白产生的作用与 HIF-1 α 是否存在关系,及其机制还需探索。

参考文献

- [1]高炳宏.模拟低氧训练的新方法与新进展[J].体育科研,2005,26(2):44-46.
- [2]赵鹏,冯连世.新的低氧训练模式研究及应用进展[J].体育科学,2005,25(6):70-74.
- [3]Hale AJ,Smith CA, Sutherland LC,et al.Apoptosis:molecular regulation of cell death.Eur J Biochem.1999,236(1):1-26.
- [4]Bar PR,Apoptosis-The cell's silent exit.Life Science,2006,59(5/6):369-387.
- [5]Carraro U,Franceschi C.Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise.Aging(Milano)2009 Feb-Apr;9(1-2):19-34
- [6]Patel H,Hoffman-Goetz L.Effects of oestrogen and exercise on caspase-3 activity in primary and secondary lymphoid compartments in ovariectomized mice.[J].Acta Physiol Scand 2002 Nov,176(3).
- [7]朱锡华.免疫细胞因子凋亡的影响及机制.中华微生物学和免疫学杂志1996; 16(2): 77.
- [8]孙尔维等.凋亡细胞体外抑制T细胞活化.细胞凋亡的调控[M].北京:军事医学科学出版社,2006.
- [9]金其贯,吴凤起.运动性免疫抑制的机制研究[J].西安体育学院学报,2004(5):23-25.
- [10]Patel H,Hoffman-Goetz L.Effects of oestrogen and exercise on caspase-3 activity in primary and secondary lymphoid compartments in ovariectomized mice.[J].Acta Physiol Scand 2002 Nov,176(3).
- [11]Concordet J-P,Ferry A.Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress(exercise).[J].Am.J.Physiol,256(Cell Physiol.34):1993.
- [12]Hoffman-Goetz L,Zajchowski S,Aldred A.Impact of treadmill exercise on early apoptotic cell in mouse thymus and spleen[J].Life Sci.,1999(3).
- [13]Mars M,Govender S,Weston A,et al.High intensity exercise:a cause of lymphocyte apoptosis? [J].Biochem.Res.Commun,1998(2).
- [14]Mooren FC,Blomling D,Lechtermann A,et al.Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. [J].J Appl Physiol,2002(1).

- [15] 孙尔维等.凋亡细胞体外抑制T细胞活化.细胞凋亡的调控[M].北京:军事医学科学出版社,1999.
- [16] Lindert KA, Caldwell-Kenkel JC, Nukina S, et al. Activation of Kupffer cells on reperfusion following hypoxia: particle phagocytosis in a low-flow, reflow model [J]. *Am J Physiol*, 1992, 262(2 pt 1): G345-350.
- [17] Ertel W, Singh G, Morrison MH, et al. Chemically induced hypotension increases PGE₂ release and depresses macrophage antigen presentation [J]. *Am J Physiol*, 1993, 264(4 pt 2): R655-660.
- [18] Leeper-Woodford SK, Mills JW. Phagocytosis and ATP levels in alveolar macrophages during acute hypoxia [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 6(3): 326-334.
- [19] Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, et al. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions [J]. *J Immunol*, 2001, 167(11): 6140-6149.
- [20] Klecha AJ, Barreiro Arcos ML, Genaro AM, et al. Different mitogen-mediated Beta-adrenergic receptor modulation in murine T lymphocytes depending on the thyroid status. *Neuroimmunomodulation*. 2005; 12(2): 92-99
- [21] Lorton D, Lubahn C, Lindquist CA, et al. Changes in the density and distribution of sympathetic nerves in spleens from Lewis rats with adjuvant-induced arthritis suggest that an injury and sprouting response occurs. *J Comp Neurol*. 2005 Aug 22; 489(2): 260-73
- [22] Norboo T, Saiyed HN, Angchuk PT, et al. Mini review of high altitude health problems in Ladakh [J]. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(4): 220-225.
- [23] Penalzoza D, Arias-Stella J. The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness [J]. *Circulation*, 2007, 115(9): 1132-1146.
- [24] Guillemin K, Krasnow MA. The hypoxic response: HIFing and HIFing [J]. *cell*, 1997, 89(1): 9-12.
- [25] Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis [J]. *Immunol Today*, 1997, 18(1): 44-51.
- [26] Naldini A, Carraro F, Silvestri S, et al. Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells [J]. *J Cell Physiol*, 1997, 173(3): 335-342.

- [27]黄庆愿,张国斌,曹利飞,等.急性低氧和腺苷对大鼠脾脏T淋巴细胞增殖的影响[J].中国应用生理学杂志,2004,20(3):214-216.
- [28]张勇,李之俊.模拟低住高练(LoHi)对自行车运动员免疫功能的影响[J].体育科学,2005,25(11):26-28.
- [29]Adams V,JiangH, Yu J,et al.Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associatedwith exercise intolerance.JAmColl Cardiol 1999 Mar 15;33(4):959-64
- [30]Sabbah HN.The cellular and physiologic effects of beta blockers in heart failure,Clin Cardiol 1999 Oct;22 Suppl 5:V16-20
- [31]Schenck K,Kiyono H.Innate and acquired immunity, cytokines,and genetic factors in relation to the mucosal immune system.Acta Odontol Scand.2001,59(3):121-3
- [32]Ramer-Quinn DS,Swanson MA,Lee WT,et al.Cytokine production by naive and primary effector CD4+T cells exposed to norepinephrine.Brain Behav Immun.2000,14(4):239-55
- [33]Bellinger DL,Brouxhon SM,Lubahn C,et al.Strain differences in the expression of corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in nerves that supply the spleen and thymus.Neuroimmunomodulation.2001;9(2):78-87.
- [34] Miyashita T,Shikama Y,Tadokoro K,et al .[J].FEBS Lett ,2001 ,509(1) :1352141.
- [35] Puccik B ,Kasten M,Giordano A.[J].Neoplasia ,2000 ,2 (4) :291-299.
- [36] Maruyama T,Yamamoto Y,Sakai N ,et al.[J].Keio J Med ,2002 ,51(2) :93-99.
- [37]Wei Q , Alam MM , Wang MH , et al. Bid activation in kidney cells following ATP depletion in vit ro and ischemia in vivo. Am J Physiol Renal Physiol , 2004 , 286 (4) : 803-809.
- [38]Danial NN , Korsmeyer SJ.Cell death : critical cont rol point s. Cell ,2004 ,116 (2) : 205-219.
- [39]杨海平.低氧运动对大鼠骨骼肌细胞凋亡及 bcl-2 、 bax 表达的影响.中国运动医学杂志,2006 ,25 (6) :706-709.
- [40]Moritz W , Meier F , St roka DM , et al. Apoptosis in hy2poxic human pancreatic islet s correlates with HIF21alpha expression. FASEB J , 2002 , 16 (7) : 745-747.
- [41]Goda N , Ryan HE , Khadivi B ,et al . Hypoxia2inducible factor 1 is essential for cell cycle arrest during hypoxia.Mol Cell Biol , 2003 , 23 (1) : 359-369.

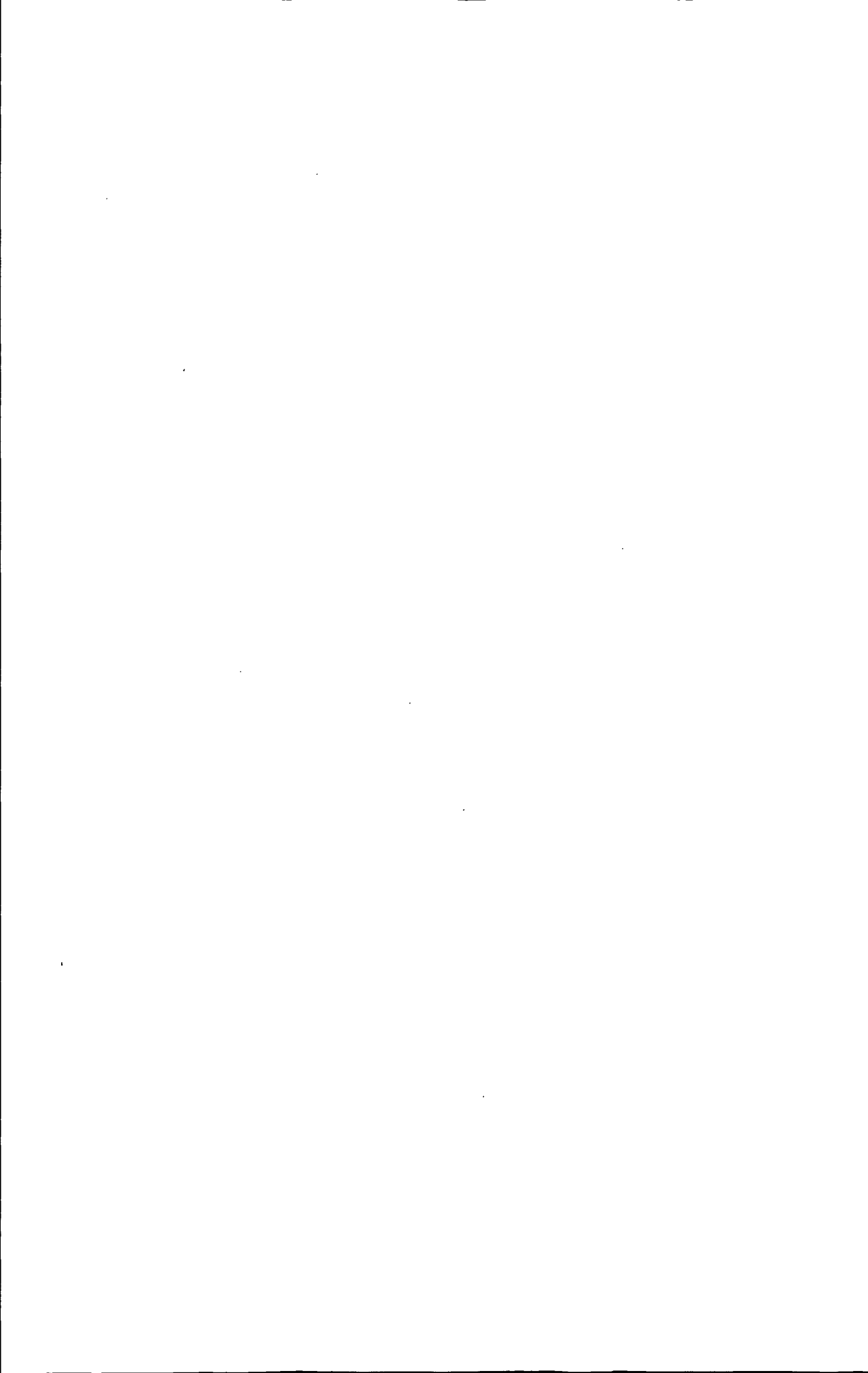
[42]Ande Velde C , Cizeau D , Dubik J ,et al. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* ,2000 ,20 (15) : 5454-5468.

[43]Stray-Gundersen J , Chapman RF , Levine BD. "Living high training low" altitude training improves sea level performance in male and female elite runners. *J Appl Physiol* ,2001 , 91 (3) : 1113-1120.

[44]Wei Q , Alam MM , Wang MH , et al. HIF-1 α activation in kidney cells following HIF-1 α depletion in vitro and ischemia in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* , 2004 , 286 (4) : 803-809.

缩 略 词 表

缩略词	英文全称/中文译名
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2 B 细胞淋巴瘤/白血病癌基因
Bax	B- cell lymphoma -2 associated-x B 细胞淋巴瘤-2 相关 x
HIF-1	Hypoxia Induced Factor-1 低氧诱导因子
Ad	Apoptotic body 凋亡小体
AI	Apoptosis Index 凋亡指数
RBC	Red blood Cell 红细胞
HCT	Hematocrit 红细胞压积
Hb	Hemoglobin 血红蛋白
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediate nick end labeling 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标 记法
PCD	Programed Cell Death 程序性细胞死亡
PTP	Permeability Transition Pore 线粒体通透性转换孔
TBS	Tris 缓冲液
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 逆转录-多聚酶链式反应
Cyt C	Cytochrome C 细胞色素 C



后 记

三年的时光转瞬即逝，在论文即将付梓之际，我谨向导师瞿树林教授表示衷心的感谢，感谢导师瞿树林教授几年来对我的谆谆教诲和悉心的栽培，导师严谨的治学态度、渊博的学识、忘我的工作精神和高尚的情操为我树立了榜样，使我受益终生。

在运动人体科学这门交叉学科的学习中，不仅仅让我学到了许多新的知识，更重要的是让我产生了许多新的理念，从某个角度上可以说是提高了我的科研思维能力，与教学的说课方式方法。让我明白了研究领域方向以及今后创新思路的开拓。同时，为培养创新性人才奠定了模式。

在实验的过程中，刘铭师兄、林喜秀师姐、周桔师姐等给予了极大的帮助，在此要表示特别感谢，你们陪伴我度过了实验中最艰苦的阶段。同时还要感谢湖南体育科学研究所、湖南肿瘤医院陈主任和高老师非常热心的帮助以及无私的提供实验场所和部分仪器、试剂，在此致以诚挚的谢意！！

感谢所有关心和爱护我的领导、老师、同学和朋友，是你们为我带来了充实而快乐的三年研究生生活！

在读这几年，边教课边学习的过程中，感谢家人给我的支持，在我困难的时候给予了生活以及精神上很大的帮助与鼓励！



湖南师范大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：



2010年12月12日

湖南师范大学学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属湖南师范大学。同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权湖南师范大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

- 1、保密 ，在-----年解密后适用本授权书。
- 2、不保密 。

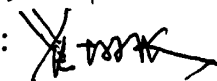
(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：



日期：2010年12月12日

导师签名：



日期：2010年12月12日

111-5