

·基础研究·

运动对BALB/c小鼠肺巨噬细胞吞噬活性的影响

龚莹莹¹ 雷雨² 杨斌¹ 龚宁¹

摘要

目的:探讨运动对BALB/c小鼠肺巨噬细胞(BAMs)吞噬活性的影响。

方法:选择300只8—10周龄的雄性BALB/c纯系小鼠为实验对象,随机分为对照组(CE)、急性中度组(ME)或剧烈运动组(SE),每组100只,在传动式跑步机上持续跑步。CE组不运动,ME组和SE组速度由9m/min开始,每隔3min增速1次,ME组强度为17m/min,SE组运动直至体力耗尽为止。各组小鼠经由重复的肺部冲洗收集巨噬细胞(BAMs),应用荧光显微镜及流式细胞分析仪分析BALB/c小鼠巨噬细胞吞噬活性的变化,比较各组肺巨噬细胞吞噬活性之间的差异。

结果:急性中度运动与剧烈运动分别造成约40%及100%以上的白细胞增加。剧烈运动后白细胞计数呈两相式增加,剧烈运动刚结束时淋巴细胞和性粒细胞分别比运动前增加24.9%和21.6%。中度运动组以及剧烈运动组吞噬细胞百分比(%P)和平均吞噬颗粒数(PI)分别为:34%、79%和1.92、5.09,与对照组比较剧烈运动可促进肺泡巨噬细胞吞噬失调颗粒的能力,而中度运动则否。剧烈运动结束后(Post-SE 0h)的肺巨噬细胞(BAMs)吞噬活性最强,且随休息时间增加而渐减,Post-SE 1h仍有显著的促进作用,而在4h后回到基值,一直到16h后不再变化。Post-SE 0h组%P和PI与同组对照组比较增加明显($P<0.05$),而吞噬IgG和IgG/c'颗粒活性只稍微增加,与同组对照组比较差异未达到显著水平($P>0.05$)。

结论:急性剧烈运动对BALB/c小鼠肺巨噬细胞吞噬无调理颗粒的能力具有促进作用。

关键词 运动;BALB/c小鼠;C57BL/6纯系小鼠;肺巨噬细胞;吞噬活性

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-04-334-05

The effect of exercise on phagocytosis of pulmonary bronchoalveolar macrophages in BALB/c's mice/
GONG Yingying, LEI Yu, YANG Bin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(4):
334—338

Abstract

Objective: Exploring the influence of exercise on BALB/c laboratory rats' alveolar macrophage phagocytic activity.

Method: A total of 300 male BALB/c pure lines laboratory rats are selected to be randomly and averagely distributed into Control Group (CE), Medium Group (ME) and Strenuous Exercise Group (SE). Traditional running machine is equipped for the test. Rats in CE group will be kept still. Rats in ME and SE groups participate in the test with 9m/min as the basis, then increasing once in every three minutes, until being increased to 17m/min for ME group and becoming exhausted for SE group. Macrophages of laboratory rats are to be collected through repeated lung washing. During the test, fluorescence microscope and flow cytometer are used to analyze amount variation of rats' alveolar macrophage, and to compare the difference between control group and exercise group.

Result: Acute medium exercise and strenuous exercise separately lead to 40% and 100% leukocyte growth. After strenuous exercise, the amount of leukocyte also increases. Moreover, lymphocyte and leukocyte separately increase

by 24.9% and by 21.6%, compared with that before the exercise. The phagocyte proportion (%P) and average phagocytic particle (PI) in medium exercise group and strenuous exercise group are separately raised by 34%, 79% and 1.92, 5.09. Through comparison, it is discovered that, strenuous exercise could improve pulmonary alveoli macrophages' ability in phagocytizing imbalance particles. However, medium exercise is faced with different situation. After strenuous exercise (Post-SE 0h), lung macrophages' (BAMs) phagocytic activity is of the highest, decreasing with rest time. By Post-SE 1 h, there is still significant promotional role. Four hours later, the influence returns back to normal. 16 hours later, it is stabilized. Compared with control group, %P and PI of Post-SE 0 h also increase significantly ($P<0.05$). By contrast, phagocytic IgG and IgG/c' particle activity increase quite slightly, not reaching to a significant level compared with the control group ($P>0.05$).

Conclusion: Acute strenuous exercise has promotional role on BALB/c laboratory rats' lung macrophages' ability in phagocytizing imbalance particles.

Author's address Dept. of PE, Hunan City University, Yiyang, 413002

Key word exercise; BALB/c mice; pulmonary bronchoalveolar macrophage; phagocytosis

运动是身体活动之一,在运动过程中几乎全身组织参与反应。组织内的细胞功能和活性均会受到影响,导致系统整体的运作产生变化,免疫系统就是其中之一^[1]。研究发现适度而规律的慢性运动具有改善个体的心肺功能,以及提高免疫能力的作用,是临床某些疾病如糖尿病、高血压、心脏病等的推荐疗法之一^[2],甚至具有减缓癌症、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的进程的效果^[3]。

运动与免疫关系的研究源于运动生理学和血液学的结合。早期研究指出在不同运动下,个体周边血液中白细胞浓度及种类区别于休息状态。流行病学研究指出规律的中度运动能提升个体免疫能力,而剧烈运动反而会造成抑制,在剧烈运动结束后的数小时内会因免疫力降低而易被感染^[4]。在运动与癌症关系的研究方面,部分研究显示运动能减缓癌症患者的死亡率。Hoffman等^[5]研究指出,运动能减少肺内肿瘤的生长。Davis等^[6]认为只有耗尽运动才能抑制癌细胞在肺部的增殖与扩散,中度运动则无效。运动的确能调节肺部免疫能力,且与肺巨噬细胞(pulmonary macrophage)的活性改变有重要关联。

肺巨噬细胞由单核细胞分化而来,广泛分布在肺间质内。肺巨噬细胞的吞噬、免疫和分泌作用十分活跃,有清除异物、参与肺表面分泌物的代谢、感染时活化免疫系统等功能^[7]。以往探讨运动对巨噬细胞影响的文献不多,对肺巨噬细胞的研究更少。Fehr等^[8]研究发现:小鼠经过一次耗尽运动或中度跑步训练,其腹腔巨噬细胞代谢与溶酶体的酶活性以及吞噬乳胶颗粒的能力均以耗尽运动组的最

高,中度跑步训练组次之,不运动组最低。Lötzerich等^[9]研究指出在一次跑步后,硫乙醇酸盐引起腹腔巨噬细胞的细胞抑制活性会增强;跑步运动训练能使肿瘤小鼠的腹腔及脾巨噬细胞吞噬活性增强。

在巨噬细胞所拥有的多重生物活性中,本研究选择吞噬作用作为主要测定参数,以观察急性中度及剧烈运动对肺巨噬细胞吞噬活性的影响,旨在为运动与肺巨噬细胞活性变化相关性及其调控机制研究提供思路,以作为相关学者或运动应用的有益的参考信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选择出生8—10周的BALB/c纯系雄性小鼠300只,体重约22—26g。将小鼠随机分为对照组(CE)、中度运动组(ME)及急性剧烈运动组(SE),每组100只。其中SE组又包括Post-SE 0h、Post-SE 1h、Post-SE 4h及Post-SE 16h组,每组25只,分别是运动刚结束、运动结束后1h、4h及16h。BALB/c纯系小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所,无疾病症状。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠的跑步流程。利用跑步分级运动测试程序^[10],调整跑步机的速度及倾斜度,使个体随时间而逐渐增加运动的负载使小鼠达到实验要求,并求得小鼠的最大耗氧量(VO_{2max}),将 VO_{2max} 的20%、50%或100%左右的运动分别定义为轻度、中度及剧烈运动。其中CE组不运动处于静息状态,ME和SE速度

由9m/min开始,每隔3min增速1次,ME组强度为17m/min,SE组运动直至体力耗尽为止,跑步机倾斜度均为30°。

1.2.2 周边血液收集及白细胞计数。用70%酒精棉球消毒小鼠尾巴,在其尾部尖端截去约0.5cm使血液缓慢流出,用移液枪连续收集40 μ l血液后与抗凝剂混合均匀。在收集的抗凝血液中滴加细胞裂解液,将红细胞打破,在20—30s内以CELL-DYN自动血球计数仪分析,每份样品作2—3次计数,取其平均值作为检测值。

1.2.3 巨噬细胞的收集。利用多次肺部冲取的方法来收集肺部巨噬细胞^[1]。准备数管1ml无菌的肺冲取盐溶液,事先于37℃培养箱内回温数小时,使用前才取出。小鼠以0.10—0.15ml耐波他腹下注射,确定完全麻醉后将其腹面朝上,固定于解剖盘上,用70%酒精消毒小鼠腹面后,自颈部至横膈皮质作“工”字形剪开,截断颈动脉以进行驱血,清除血迹后再小心地打开胸腔使肺脏暴露出来,不能伤及肺脏及心脏。用缝线自气管下穿过,剪开包覆的肌肉层露出气管,将附近血液擦干净后用刀片在气管上作一切口,勿切断气管,然后作气管插管并将缝线环绕气管与插管,打活结束紧,便可开始作肺部冲取。

将回温的1ml肺冲取盐溶液经由插管送入肺中,将整个肺叶撑开,但勿使撑破,然后再抽回针筒内,如此重复5次,再换一管新的盐溶液重复以上动作,一共收集6管1ml肺冲取液,置于冰上减低细胞代谢速度。分离细胞前先以血球计数盘在相位差显微镜下计算各管肺冲取液的细胞浓度。再在800 $\times$ g速度下离心8min将细胞分离出来,收集第一管肺冲取液的上清液标示为BALIS,而所有的细胞沉淀则根据实验目的分为第一二管、第三四管、第五六管,再以盐溶液或RPMI 1640培养液调整细胞浓度使成为1 $\times$ 10⁶/ml—2 $\times$ 10⁶/ml,分别进行吞噬作用分析及细胞培养。

1.2.4 吞噬作用分析。利用牛血清白蛋白(BSA)和免疫球蛋白包裹染有荧光的塑胶颗粒,分别作为吞噬失调和调理性颗粒的分析。将巨噬细胞(1 $\times$ 10⁶/ml)与包裹的荧光塑胶颗粒(3 $\times$ 10⁸/ml)以1:30比例混合,置于37℃培养箱内,每隔10min轻拍几次使巨噬细胞与塑胶颗粒均匀混合,1h后用4℃ PBS(磷酸

盐缓冲液)终止吞噬作用。800 $\times$ g离心10min,将细胞与游离的塑胶颗粒分离,分离细胞在4℃的固定液(4%甲醛)中固定2h后,利用荧光显微镜和流式细胞分析仪测定巨噬细胞的吞噬能力,测量参数包括:吞噬细胞百分比(%P)=(含吞噬颗粒的细胞数/总检测细胞数) $\times$ 100%;平均吞噬颗粒数(PI)=细胞吞噬的颗粒总数/总检测细胞数。

1.3 统计学分析

所有数据以均数 $\pm$ 标准差方式表示。两组间的比较分别使用双尾学生测试,两组以上的比较使用单因素方差分析,当存在差异时再以 q 检验法进一步两两比较。曲线间的比较利用单向重复测量方差分析;相关性比较则使用Pearson's方式,提供参数包括相关系数及 P 值,以上所有数据处理过程均由SAS 9.2计算机软件完成。

2 结果

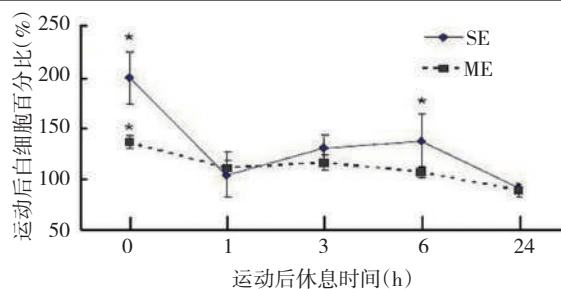
2.1 运动前后总白细胞计数比较

在运动刚结束时立即检测小鼠血中白细胞浓度,并与其运动前的数据做比较。结果显示,急性中度及剧烈运动的确能造成血中白细胞计数增加,且血中白细胞增加的程度随运动强度增加而增强,中度运动与剧烈运动分别造成约40%及100%以上的白细胞数增加。由于运动造成的影响是全身性的,前人研究一致认为由运动引发的白细胞增加是伴随发生的现象,因此可肯定在本研究中所给予的运动刺激是确切的。见图1。

2.2 运动前后不同白细胞计数比较

除了总白细胞计数变化外,血中各种白细胞数量及其所占比例也发生变化。分析结果显示剧烈运动后白细胞计数呈两相式增加,初期(运动刚结束)

图1 急性运动引起的外周血白细胞数量增多百分率



与运动前比较: * P <0.05

及后期(结束后3—6h)的增加分别为淋巴细胞及嗜中性白细胞的贡献。运动刚结束时血中白细胞中主要以淋巴细胞为主,占白细胞总数的73.8(%),比运动前增加24.9%;运动结束后3h,血中白细胞中主要以中性粒细胞为主,占白细胞总数的54.7%,比运动前增加21.6%。见表1,图2。

2.3 急性运动对BALB/c肺巨噬细胞吞噬活性影响

BAM细胞吞噬能力活性受不同强度急性运动的影响。结果显示:对照组、中度运动组以及剧烈运

动组吞噬细胞百分比(%P),平均吞噬颗粒数(PI)分别为:40%、34%和79%;2.05、1.92和5.09。与对照组比较,剧烈运动会促进肺泡巨噬细胞吞噬失调颗粒的能力,而中度运动则否,分别以流式细胞分析仪及显微镜检测均呈此趋势。见图3。

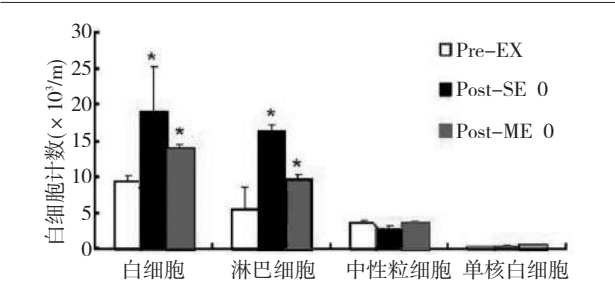
进一步分析不同运动后时间点,肺泡巨噬细胞吞噬失调颗粒的能力的变化,包括剧烈运动刚结束(Post-SE 0h)、休息1h(Post-SE 1h)、休息4h(Post-SE 4h),以及休息16h(Post-SE 16h)等组别。

表1 BALB/c运动前与急性运动后不同白细胞在血中所占比例 (x±s, %)

	Pre-SE	Post-SE(0h)	Post-SE(0.5h)	Post-SE(1h)	Post-SE(3h)	Post-SE(6h)	Post-SE(24)
淋巴细胞	48.9 ± 3.6	73.8 ± 2.2 ^①	42.9 ± 5.7	33.8 ± 6.0	29.5 ± 1.7	47.3 ± 6.9	41.3 ± 5.1
中性粒细胞	33.1 ± 3.2	9.7 ± 2.1 ^①	31.6 ± 5.6	48.8 ± 8.0	54.7 ± 1.9 ^①	35.7 ± 6.7	42.6 ± 4.5
单核白细胞	3.7 ± 0.4	1.7 ± 0.6	1.4 ± 0.1	2.7 ± 1.5	1.1 ± 0.2	2.4 ± 0.8	1.5 ± 0.7

与运动前比较:①P<0.05

图2 不同白细胞Wright染色的计数数量



*与运动前比较差异有显著性意义(P<0.05)

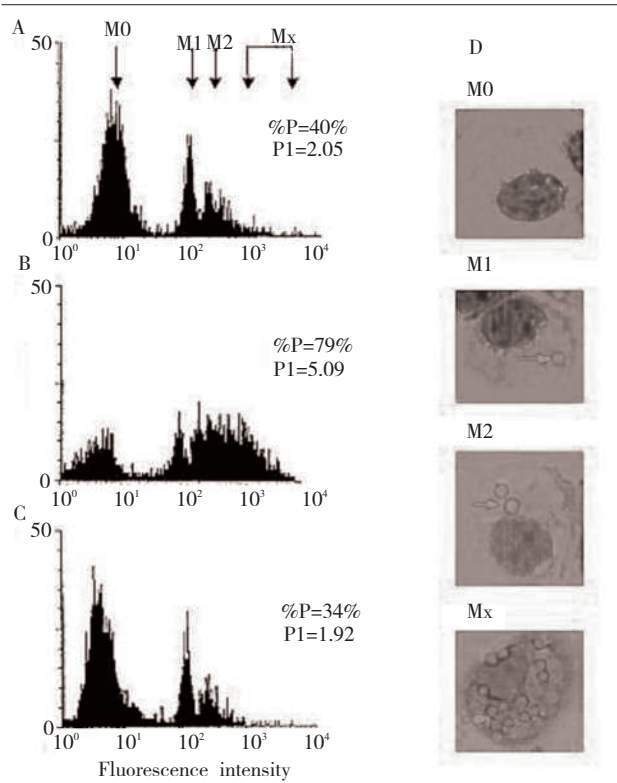
分析结果显示 Post-SE 0h的BAMs吞噬活性最强(包括%P及PI),且随休息时间增加而逐渐减少,Post-SE 1h仍有显著的促进作用,而在4h后回到基值,一直到16h后仍不再变化。见图4。

选择IgG和IgG/c'荧光标记颗粒来测试肺巨噬细胞后天免疫能力是否受剧烈运动影响。结果显示:对照组BAM细胞在IgG颗粒受体及IgG/c'荧光标记颗粒帮助下,吞噬颗粒的BAM细胞占BAM细胞的百分率和平均吞噬颗粒数明显增加,能明显增强对照组的吞噬作用,而Post-SE 0h组除吞噬失调颗粒的BAM细胞以及平均吞噬颗粒数与同组对照组比较增加明显,而吞噬IgG和IgG/c'颗粒活性只稍微增加,与同组对照组比较差异无显著性意义。见图5。

3 讨论

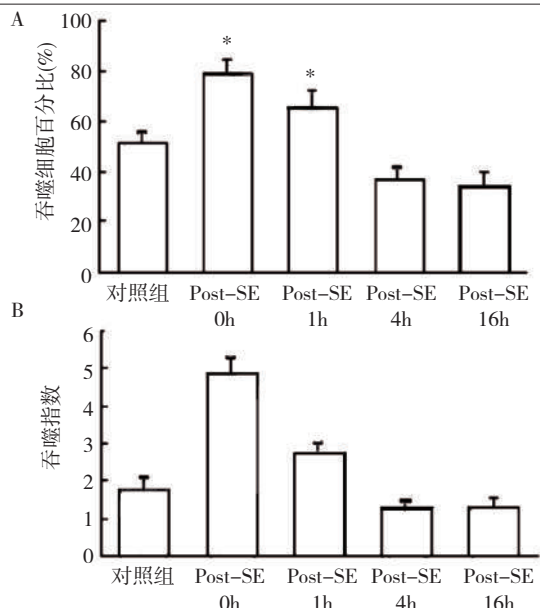
由肺部结构来看,肺巨噬细胞是肺上皮细胞层

图3 BAM细胞吞噬荧光塑胶颗粒的细胞形态和荧光强度以及吞噬失调颗粒的流式细胞计数结果



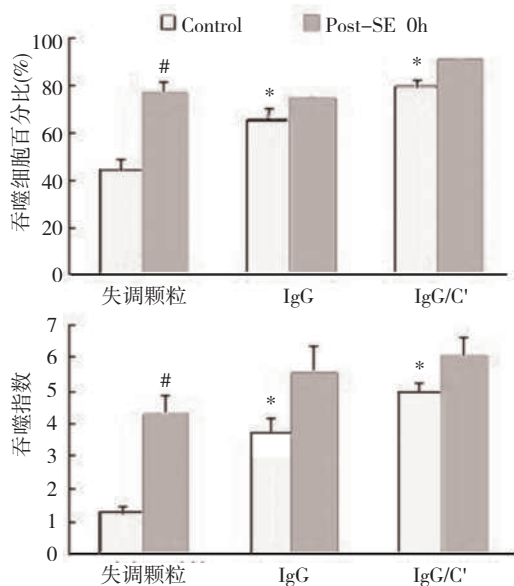
A、B、C分别表示对照组、Post-SE 0h组、Post-ME 0h组的荧光强度;%P表示流式细胞分析仪所测得的吞噬细胞百分比,PI表示平均吞噬颗粒数;D表示对照组BAMs吞噬塑胶颗粒后的细胞形态。M0、M1、M2、Mx分别表示BAM未吞噬任何颗粒、吞噬1个颗粒、吞噬2个颗粒、吞噬大量颗粒后对照组BAM的细胞形态。

图4 剧烈运动对BAM吞噬失调颗粒的能力的影响



A图表示对照组以及剧烈运动组运动结束后不同时间点,吞噬失调颗粒的BAM细胞所占总BAM细胞数的百分比;B图表示对照组以及剧烈运动组运动结束后不同时间点BAM吞噬指数。

图5 剧烈运动对BAM后天免疫力的(吞噬正常和失调颗粒活性)影响



与吞噬失调颗粒的对照组的值比较: * $P < 0.05$; 与吞噬相同颗粒的同组对照组的值比较: # $P < 0.05$

上的一层细胞,能阻隔空气中异物进入,在机体免疫方面扮演重要角色^[12],如巡逻、清除异物^[13]、参与肺表面活性物质的代谢^[14]、感染时通报免疫系统活化、抑制淋巴球增殖等。大量研究表明运动会造成肺部

进行巨幅调整以适应生理需求,包括肺循环血流量增加及耗氧量增加,此外空气中颗粒在深度呼吸时也较容易进入肺泡中,在此多重变化下可能影响个体的免疫能力。以往的文献中,探讨运动影响巨噬细胞的报告并不多,大都是关于腹腔巨噬细胞方面的研究,而肺巨噬细胞的研究很少。因此,本文旨在研讨急性运动对肺部巨噬细胞的影响,及其可能的调控机制,以解明肺部的免疫反应受运动调控的方式。

本研究发现运动能有效引发BALB/c实验小鼠身白细胞由周边淋巴组织或黏附的血管壁进入血液循环中,且此白细胞增多的程度与运动强度成正相关,虽然不同动物的各类白细胞百分比不尽相同,如人类血液循环中嗜中性多核细胞最多(70%左右),而小鼠则是淋巴球所占比例最高(50%左右),但典型的运动导致白细胞增多现象在不同种类动物身上均一致^[15]。本研究的运动处理(包括中度及剧烈运动)并不会造成循环细胞进入肺组织,因此自肺冲洗收集的细胞种类仍以巨噬细胞为主,显示即使剧烈运动的刺激,仍不至于引发病理性机制。

同时,本文研究最新发现急性剧烈运动能促进BALB/c小鼠的肺巨噬细胞活性,而急性中度运动则无此影响,另外急性剧烈运动也具促进SP-A介导吞噬IgG/C'颗粒的作用。比较对照组与运动组的前两管肺巨噬细胞的活性,显示剧烈的跑步运动能造成肺巨噬细胞的活化,明显增强其吞噬能力,尤其是吞噬失调颗粒,且此活化作用是快速(运动约30min即引发)并短暂(4h内回到基值)。Fehr等^[8]采用类似于本实验室的跑步运动,发现急性耗尽运动能造成腹腔巨噬细胞吞噬能力增加,而中度运动组则与控制组无明显差异;在Ortega^[16]的研究中,施予小鼠游泳运动至耗尽,发现包括急性及慢性运动组(先训练30d)均造成腹腔巨噬细胞吞噬白色链球菌的能力增加,并认为与血中甲状腺素、促乳素和皮质甾酮浓度的增加有关。已知在运动过程中,多种压力荷尔蒙及细胞激素或急性蛋白质的血中浓度会增加^[17],包括肾上腺素、去甲肾上腺素、糖皮质激素、甲状腺激素、生长激素、白细胞介素6等,增加的幅度也与运动强度成正相关^[18],如去甲肾上腺素随强度增强而

(下转第343页)