



# 跑台运动下大鼠脱钙股骨骨髓适应性节约化和脾脏免疫机能下降对B细胞早期发育的影响研究

## Effect of Decalcified Femoral Bone Marrow Adaptive Conservation and Decreased Immune Function of Spleen on Early B Cell Development in Rats Under Treadmill Exercise

耿青青<sup>1\*</sup>, 田祯祥<sup>2</sup>, 张鹤鸣<sup>3</sup>, 王宏<sup>1</sup>, 何伟<sup>1</sup>, 刘双妍<sup>1</sup>

GENG Qingqing<sup>1\*</sup>, TIAN Zhenxiang<sup>2</sup>, ZHANG Heming<sup>3</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>, HE Wei<sup>1</sup>, LIU Shuangyan<sup>1</sup>

**摘要:**目的:选取大鼠脱钙股骨骨髓、脾脏,观察其在运动性免疫失衡状态下所引发的组织结构改变,探讨机体免疫机能的适应性变化。方法:64只SD大鼠随机分为实验组和对照组。实验组进行递增负荷跑台运动6周,在第0、2、4、6周的末次训练结束后48 h,无菌采样大鼠股骨和脾脏,采用脱钙股骨骨髓石蜡切片和脾脏H.E.染色技术,观察4组之间骨髓、脾脏组织结构及脾指数的差异。结果:1)与0周运动组相比,2周运动组脱钙股骨骨髓造血细胞呈下降趋势,6周组呈上升趋势( $P>0.05$ ,0周组、2周组、6周组分级均为-级);与2周运动组相比,4周组呈上升趋势;与4周运动组相比,6周组呈继续增加趋势( $P>0.05$ ,4周组分级为-级)。2)与0周运动组相比,2周运动组脾脏开始出现白髓和红髓界线有交叉( $P>0.05$ ,分级为-级),脾系数呈非常显著性下降( $P<0.01$ );4周运动组仍有界线交叉现象,白髓呈减少趋势( $P>0.05$ ,分级为+级),脾系数呈显著性下降( $P<0.05$ );6周运动组,红髓浸润白髓的现象( $P>0.05$ ,分级为-级),脾系数呈显著性下降( $P<0.05$ )。结论:1)随着训练周数的推进,推测骨髓髓系干细胞对递增的运动强度有了更加节约化的适应性免疫反应,由于机体营养供应分配有优先等次之分,会引起骨髓髓系与淋巴系细胞增殖情况发生变化,进而影响B淋巴细胞在骨髓的早期发育。2)从2周运动组就开始出现白髓和红髓之间界线交叉现象,同时脾指数也明显下降,提示脾脏免疫机能下降,可能是伴随着运动性疲劳的累积,削弱了脾脏免疫细胞的增殖与活化能力,进而影响了B淋巴细胞在脾脏的进一步分化与发育。3)与骨髓微环境相比,脾脏微结构的免疫反应对运动应激更为敏感和明显,两者的适应性反应也不同。

**关键词:**运动性免疫失衡;骨髓;B细胞;脱钙股骨石蜡切片;脾指数

**Abstract:** Objective: To observe the adaptive changes of the bone marrow and spleen immune function in rats under the condition of exercise-induced immune imbalance. Methods: 64 SD rats were randomly divided into experimental group and control group. The experimental group underwent incremental treadmill exercise for six weeks. At the end of 0, 2, 4 and 6 weeks, within 48 h hours after the last training, the femur and spleen of rats were sampled aseptically. The H.E. staining of paraffin section of decalcified femur and spleen were used to observe the differences of bone marrow, spleen tissue structure and spleen index among the four groups. Results: 1) Compared with the 0-week exercise group, it showed a downward trend that the bone marrow myeloid stem cells of the decalcified femur in the 2-week exercise group ( $P>0.05$ , 0-week group, 2-week group and 6-week group were all graded as - level), while it showed an upward trend in the 4-week and 6-week exercise groups ( $P>0.05$ , 4-week group was graded as - level). 2) Compared with the 0-week exercise group, the spleen of the 2-week exercise group began to show crossover between the white pulp and red pulp boundaries ( $P>0.05$ , grade - ), and the

### 基金项目:

山东省自然科学基金项目(ZR2014CL018)

### \*通信作者简介:

耿青青(1981-),女,副教授,博士,硕士研究生导师,主要研究方向为运动免疫学、运动健康促进, E-mail: gqq1188@126.com。

### 作者单位:

1. 山东体育学院,山东 济南 250102;
2. 枣庄学院,山东 枣庄 277160;
3. 济南市第七人民医院,山东 济南 251400
1. Shandong Sport University, Jinan 250102, China;
2. Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China;
3. Jinan Seventh People's Hospital, Jinan 251400, China.

spleen coefficient showed a very significant decrease ( $P < 0.01$ ). Boundaries were still crossed in the 4-week exercise group, and the white pulp showed a decreasing trend ( $P > 0.05$ , grade +), and the spleen coefficient showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ). In the 6-week exercise group, the infiltration of red pulp into white pulp was observed ( $P > 0.05$ , grade -), and the splenic coefficient was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Conclusions: 1) It is speculated that with the advancing of training weeks, the immune function of the body had a more economical adaptive response to the increasing exercise intensity. Due to the preferential distribution of nutrition supply in the body, the proliferation of myeloid and lymphoid cells in the bone marrow would be changed, which would affect the early development of B lymphocytes in the bone marrow. 2) The crossover between the white and red medulla lines began at 2-week exercise group, at the same time, the spleen index also declined obviously, and those prompted the spleen immune function decline. It might be associated with the accumulation of exercise fatigue and the weakened of spleen immune cell proliferation and activation, which affected the differentiation and development of B lymphocytes in spleen. 3) It also suggested that the immune response of spleen microstructures was more sensitive and obvious to exercise stress than that of bone marrow microenvironment, and the adaptive responses of both were different.

**Keywords:** exercise-induced immune imbalance; bone marrow; B lymphocytes; paraffin section of decalcified femur; spleen index

**中图分类号:** G804.2 **文献标识码:** A

现有运动免疫学研究从血液和外周淋巴器官的免疫细胞入手探索运动性免疫失衡现象发生的原因,研究了运动过程中 $CD4^+/CD8^+$ 倒置(陈佩杰等,2011; Dong et al., 2011; Wang et al., 2011)、Th1/Th2 漂移(肖卫华等,2011a, 2011b; Wang et al., 2009)等现象,这些问题虽然表现在血液,但根源应在中枢淋巴器官骨髓及主要迁移区次级淋巴器官脾脏,即运动应激可能会在B淋巴细胞发育的不同阶段,通过刺激分化因子、转录因子等调控因子(耿青青,2012,2013;耿青青等,2011),影响B淋巴细胞发育过程中不同阶段性的分化、增殖、发育和成熟。随着研究的深入,发现运动性免疫失衡现象的原因非常复杂,并非单一因素所造成,涉及免疫细胞之间的相互作用和整合作用(陈佩杰等,2011; Wang et al., 2009),运动过程中会导致免疫细胞DNA损伤和细胞凋亡增多等现象(陈佩杰等,2011;耿青青,2012,2013;耿青青等,2011; Dong et al., 2011),造成免疫失衡。

本研究遵循以上思路,从B淋巴细胞发育成熟的源头骨髓及主要迁移区次级淋巴器官脾脏入手,探索B淋巴细胞受运动的影响所发生的数量和功能的改变,有助于阐明长期运动对B淋巴细胞发育成熟的影响以及机理。

随着科研人员对骨髓分子生物学研究的深入,骨髓与骨微环境的形态学研究技术也在不断优化,如何使骨髓支架微结构及造血细胞群更加清晰易辨,这关系着骨微环境的重塑在实验研究中的真实再现。Liu等(2017)采用振动法和低温法处理样品,探讨了不同脱钙剂对骨结构和抗原性的保护作用,得出10%中性缓冲EDTA和5%硝酸是组化染色的首选脱钙剂,为制定适宜的大鼠脱钙股骨组织分析方案提供了依据。

苏木素-伊红(H.E.)染色是组织病理学的主要染色之一,也是医学诊断中应用最广泛的染色之一。Fujii等

(2016)选取了5例肺部API2-MALT1融合阳性MALT淋巴瘤进行石蜡切片,依次进行H.E.染色、CD79a免疫荧光染色等,研究显示,肿瘤结构可能是对MALT淋巴瘤进行正确组织病理学诊断的核心因素,H.E.染色、免疫荧光染色等方法是在细胞水平上实用且有效的病理学分析工具。

Laakko等(2002)研究在体植入小鼠体内相当于应激下的糖皮质激素含量36h后,用流式细胞术方法观察到淋巴系中的前祖B细胞减少20%;髓系干细胞中的粒细胞系增加了30%,红细胞系、单核细胞系所占的百分比没有显著性变化,推测机体通过限制骨髓淋巴细胞的发育以保障机体的第一线免疫防御体系的能量供应。Trottier等(2012)和King等(2002)研究发现,饮食导致肥胖的小鼠骨髓中髓系分支和淋巴系分支细胞均有增强,早期观察发现,在营养不良时,尤其是锌元素缺乏时,机体通过减少淋巴系分支的发育以平衡有限的营养供应。

前期研究发现,运动性免疫失衡状态下,B细胞早期发育中Pro B cell(原B细胞)阶段的细胞数量明显下降,Pre B cell(前B细胞)阶段的细胞数量呈非常显著性下降,不成熟B细胞呈显著性下降,成熟B细胞则呈显著性上升,提示6周递增负荷运动可能通过代偿机制,促使增殖池中仅存的少量前B细胞增殖和分化成为成熟B细胞,从而适应机体大量运动耗能的需要,这可能与骨髓中转录因子E2A、EBF、PAX5因子的表达相关(耿青青,2012,2013;耿青青等,2011)。课题组一方面继续从趋化因子如CXCL12、CXCL13、粘附因子、Notch信号家族等角度探索原因机制,另一方面,希望从形态学上得到B细胞发育的中枢器官骨髓和主要迁移区次级淋巴器官脾脏的图像论据支持。

基于此,本研究在传统脱钙股骨骨髓组化技术的基础上,对实验流程进行改良,利用该实验能够使骨髓支架

微结构及造血细胞群更加清晰易辨的特点,检测递增负荷运动过程中大鼠股骨骨髓、脾脏的组织结构变化及对骨髓 B 细胞早期发育的影响。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 研究对象分组、采样与运动模型

选取 64 只 8 周龄雄性 SD 大鼠,随机分为 0 周、2 周、4 周和 6 周组,每周数组又各分为实验组和对照组,每组 8 只。大鼠进行 6 周递增强度训练,分别在 0 周、2 周、4 周和 6 周最后一次运动后 48 h(消除上次运动的影响)采样,无菌条件下取大鼠股骨和脾脏,有利于观察随着运动负荷的递增,免疫功能所发生的适应性变化。

匀速跑台运动,坡度设为 0,每天训练 30 min,每周 6 天,共 6 周,经过 1 周的适应性训练,第 2 周 20 m/min 起,速度每周递增 5 m/min,直至 40 m/min。对照组正常喂养,不进行运动干预(耿青青,2012,2013)。

### 1.2 大鼠脱钙股骨骨髓石蜡切片的制作及 H.E. 染色程序

1) 股骨骨髓石蜡块取材:在各采样点无菌取出大鼠的一侧股骨,迅速放入 10% 中性甲醛液中固定 24 h,4℃ 10% EDTANA<sub>2</sub> 脱钙,摇床,每 3 天换液 1 次,1.5~2.0 个月,针刺无阻即判断为脱钙完成。用流动水冲洗 8 h,取股骨干和股骨头的结合部备用;2) 脱水:60% 乙醇 1 h,70%、80%、90%、95% 乙醇各 2 h,无水乙醇 I、II 各 1 h;3) 透明:正丁醇 I、II 依次各 8 h 和 16 h。4) 浸蜡:入蜡 I、II 各 2 h,浸蜡温度 63℃~65℃,不得高于 70℃;5) 包埋:将组织放入包埋盒内,注入融化的石蜡,写上标签;6) 切片:2~3 μm 厚度连续切片;7) 烤片:1.5 h,65℃;8) 脱蜡:二甲苯 I、II 依次各 10 min,无水乙醇 I、II、95%、90%、80%、70% 乙醇依次各 1~2 min,水洗 3 min,蒸馏水 30 s;9) 苏木素染色 1~2 min;10) 流水冲洗反蓝,蒸馏水洗;11) 伊红染色 1~3 s,在镜下控制分色程度,至细胞着色分明;12) 蒸馏水速洗,吸水纸吸干;13) 入 95% 乙醇分色 1 min,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

### 1.3 大鼠脾脏石蜡切片的制作及 H.E. 染色程序

由于脾脏本身质地的原因,脾脏在固定液内固定后,若实验试剂配制浓度及反应时间控制不当,极易引起固定后的脾脏变脆,导致切片标本有裂痕,甚至有脱片现象。

本研究将此方法改良,有效提高了制片的成功率:1) 取材,4% 甲醛固定 24 h,流水冲洗 8 h,切割成 1~1.5 cm 小块备用;2) 脱水:60% 乙醇 1 h,70% 乙醇和 80% 乙醇各 2 h,95% 乙醇 27 min,无水乙醇 I、II 依次各 9 min,7 min;3) 透明:二甲苯 I、II 依次各 9 min,7 min;4) 浸蜡:入蜡 I、II、III 依次各 16 min,18 min,20 min(浸蜡温度 63℃~64℃);5) 包埋:做成蜡块,写上标签;6) 切片:2~3 μm 的厚度;7) 烤片:1.5 h,65℃;8) 脱蜡:二甲苯 I、II 各 9 min,10 min,无水乙醇 I、II、95% 乙醇各 2 min,80% 乙醇 1 min,

水洗 3 min,蒸馏水 30 s;9)~13) 同脱钙股骨骨髓切片染色程序。

### 1.4 脱钙股骨骨髓、脾脏石蜡切片形态学观察

随机选取 5 个视野/切片,Image-pro PLUS 6.0 图像分析。骨髓 H.E. 切片观察骨髓支架结构与造血细胞群;脾脏 H.E. 切片观察红髓、白髓、脾小结结构。

### 1.5 统计方法

实验数据均使用 SPSS 18.0 软件进行统计处理,结果采用平均数±标准差( $M\pm SD$ )表示,通过单因素方差分析, $P<0.05$  为显著性差异, $P<0.01$  为非常显著性差异。

## 2 实验结果

### 2.1 大鼠体质量变化

各组大鼠体质量均有增长,均高于 0 周对照组,但各组间无显著性变化( $P>0.05$ ,表 1)。

### 2.2 大鼠脾脏系数变化

与 0 周运动组相比,2 周运动组呈非常显著性下降( $P<0.01$ ),4 周运动组和 6 周运动组均呈显著性下降( $P<0.05$ );对照组各组间无显著性差异( $P>0.05$ ),排除了生长发育因素的影响(表 2)。

表 1 大鼠体质量变化  
Table 1 Changes of Weights of Rats g

	0 周	2 周	4 周	6 周
对照组	231±16	289±23	330±19	352±21
运动组	235±9	251±8	271±7	285±9

注:各组间无统计学差异, $P>0.05$ 。

表 2 大鼠脾脏系数变化  
Table 2 Changes of Spleen Index of Rats

	0 周	2 周	4 周	6 周
对照组	2.72±0.35	2.53±0.47	2.41±0.49	2.37±0.43
运动组	2.70±0.33	2.32±0.19**	2.38±0.29*	2.37±0.26*

注:\*表示  $P<0.05$ ,\*\*表示  $P<0.01$  vs. 0 周运动组。

### 2.3 大鼠脱钙股骨骨髓组织结构的变化

在 6 周递增负荷运动过程中,0 周运动组大鼠骨髓造血组织结构完整,造血细胞丰富,细胞群分布均匀,无分布定位异常。与 0 周运动组相比,2 周运动组骨髓支架结构中造血细胞呈减少趋势。与 2 周运动组相比,4 周运动组骨髓支架结构中造血细胞有增加趋势。与 4 周运动组相比,6 周运动组骨髓支架结构中造血细胞有继续增加趋势,同时,与 0 周运动组相比,6 周运动组细胞数量有增多趋势(图 1)。脱钙股骨骨髓石蜡切片半定量(吴迪等,2018)分析表明:骨髓网状纤维化病理分级各组均为 0 级,未出现 1 级、2 级和 3 级;骨髓造血细胞病理分级各组均为 - 级,各组造血细胞形态正常,分布均匀,造血组织结构



完整,未出现病理+级,甚至++级和+++级。

#### 2.4 大鼠脾脏组织结构的变化

显微镜下可见大鼠脾脏被膜、红髓、白髓和脾小结。大鼠脾脏被膜较薄。白髓H.E.染色呈紫色,红髓呈粉红色。白髓中央或一侧有中央动脉。当白髓结构完整典型时,脾小结清晰可见,大小不一,形状各不相同。红髓内还可见许多红细胞。

在0周运动组,白髓和红髓之间界线清楚,脾小结比较明显;2周运动组白髓和红髓之间界线不清晰,脾小结模糊;4周运动组仍呈现白髓和红髓界线交叉现象,界线模糊,白髓开始呈现减少趋势,脾小结模糊不清;6周运动组,白髓结构相对比较集中,但出现红髓浸润到白髓结构中的现象,脾小结模糊(图2)。H.E.染色半定量(刘玲玲等,2012)分析表明,0周、2周、4周和6周的脾组织病理分级分别为-、+、+、-,尚未出现病理++级和+++级。

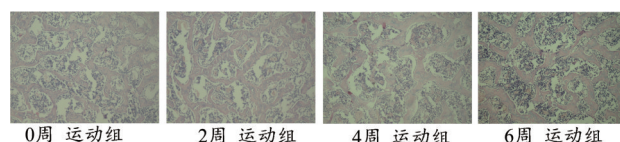


图1 各周运动组大鼠脱钙股骨骨髓石蜡切片H.E.染色图  
(40×10倍)

Figure 1. H.E. of Paraffin Section of Decalcified Femur Bone Marrow in Exercise Group

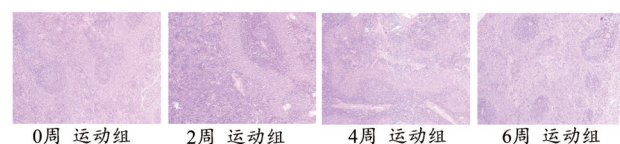


图2 各周运动组大鼠脾脏H.E.染色图(40×10倍)

Figure 2. H.E. of Spleen in Exercise Group

### 3 分析与讨论

#### 3.1 长期递增负荷运动中骨髓切片结构的改变

功能的变化源于结构的变化。骨髓和脾脏这两个重要的B细胞发育中枢和主要迁移区次级淋巴器官,维持其正常的形态和结构是保障免疫功能正常运作的前提和先决条件。鉴于此,观察6周递增负荷运动中大鼠骨髓和脾脏结构的变化,研究其对B淋巴细胞发育早期的影响,对于揭示运动性免疫失衡机制具有重要意义。

本研究遵循这个思路,从B淋巴细胞发育成熟的源头骨髓和次级淋巴器官脾脏,探索B淋巴细胞受运动的影响所发生的数量、功能的改变,不仅有助于阐明长期运动对B淋巴细胞发育成熟的影响以及机理,还为运动性免疫失衡的调理提供新的方法、思路和图像依据。

本研究采用的脱钙股骨骨髓组化技术鲜见报道,与骨髓涂片相比,该方法可以使骨髓支架微结构及造血细胞群更加清晰易辨,更利于髓内组织构形的保存(Clay-

combe et al., 2016; Hardy et al., 2012)。因为脱钙是骨组织病理学观察和含骨组织(Ma et al., 2016)的重要步骤,目前脱钙方法普遍操作繁琐,因此,样品的脱钙处理环节对骨微环境重塑的真实再现至关重要。本研究采用4°C低温处理、10% EDTANa<sub>2</sub>低脱钙溶液和摇床方式连续性地晃动样品,有助于高效脱钙和保存石蜡包埋切片样品的组织结构和抗原性(图1)。

骨髓是造血组织,也是各类免疫细胞的发生场所。骨髓中含有骨髓基质细胞(stromal cell)和造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)(Abdelrasoul et al., 2018)。HSC具有多种分化潜能,因此又称多能HSC(pluripotent HSC)。出生后以及整个成年期,多能HSC一般仅见于骨髓。多能HSC分为淋巴样干细胞(lymphoid stem cell)和髓样干细胞(myeloid stem cell)两大类。髓样干细胞可继续分化为具有产生粒细胞系、红细胞系、巨核细胞系和单核-吞噬细胞系潜能的集落形成单位CFU-GEMM(Abdelrasoul et al., 2018)。淋巴样干细胞可继续分化为B细胞、T细胞和NK细胞,在此过程中,有众多转录因子(如EBF)、细胞分化因子(如IL-7)、趋化生长因子(如CXCL-12)、Notch信号家族等参与调控,它们启动不同谱系特异基因的表达,以确保淋巴样干细胞向某一谱系(如B淋巴细胞)分化时,也将失去向其他谱系分化的潜能。淋巴样干细胞中的一部分在骨髓内继续分化成B细胞,主要包括前祖B细胞(pre-pro B cell)、原(祖)B细胞(pro-B cell)、前B(祖)细胞(pre-B cell)、不成熟B细胞(immature B)、成熟B细胞(mature B)。B淋巴细胞大约在骨髓发育20 d成熟时穿过血窦壁进入血流。其迁出骨髓,先进入脾脏,往往在脾脏接触抗原后再迁移到其他次级淋巴器官(Abdelrasoul et al., 2018)。

运动状态下,神经-内分泌-免疫轴会发生变化,抵抗或适应运动应激,免疫系统也会发生变化,最终使机体尽可能保持相对平衡的内稳态(Dela et al., 2016; Radom et al., 2016; Yamanaka et al., 2010)。中枢骨髓造血干细胞、造血祖细胞等幼稚细胞和造血调控因子的改变,会引发外周血细胞形态、功能和数量改变,而免疫细胞数量的变化则可反映免疫失衡的发展进程和严重程度。骨髓造血微环境中细胞与细胞之间、细胞与基质之间以及细胞与细胞因子之间的相互作用,造血细胞自我更新与分化之间的平衡,精确地调控着骨髓中免疫细胞的损伤与修复(浦权,2002)。骨髓作为中枢淋巴器官,为免疫细胞提供了适宜存活和增殖的微环境,研究脱钙股骨骨髓形态结构的变化,对于了解机体的B细胞早期发育具有重大参考价值。

本研究通过观察脱钙股骨骨髓石蜡包埋组织切片发现,2周运动组骨髓造血细胞数量呈减少趋势,可能是机体受到骤然升高的运动强度,机体免疫机能保护性应答

反应过度而产生;4周、6周运动组造血细胞呈增加趋势,可能是骨髓髓系干细胞在随着训练周数的递进,对递增的运动强度有了更加节约化的适应性免疫反应。由于机体营养供应分配有优先等次之分,会引起骨髓髓系与淋巴系细胞增殖情况发生变化(King et al., 2002; Laakko et al., 2002; Trotter et al., 2012):骨髓增殖池中髓系干细胞的数量变化影响着淋巴系细胞凋亡的数量变化以及增殖情况的抑制或促进。这些骨髓造血微环境的改变一定会影响B淋巴细胞在骨髓的早期分化与发育(耿青青, 2012, 2013; 耿青青等, 2011)。

已有研究表明(卢兴国, 2008),免疫失衡状态下,骨髓各造血细胞所受影响各不相同,细胞的半衰期越短越易受影响而发生凋亡。白细胞的半衰期为6h,血小板5~7天,红细胞则长至127天,因此白细胞受影响最大,特别是粒细胞减少最为明显,即白细胞数量对骨髓造血微环境的变化更为敏感。研究还发现,骨髓中B淋巴细胞数量减少不仅是因为发育中细胞数量的减少,还与存活细胞增殖能力的减弱有关(Nunez et al., 1990; Juan et al., 2011)。Laakko等(2002)模拟了运动应激下的体内皮质酮(corticosterone),不仅造成小鼠骨髓中原B细胞、前B细胞的数量百分比大幅下降,且存活下来的原B细胞和前B细胞的增殖能力也会急剧下降。

### 3.2 长期递增负荷运动中脾指数与脾脏微结构的改变

脾是机体最大的外周淋巴器官,具有滤血和产生免疫应答等重要功能。白髓是一个密集的淋巴组织,分布在中央静脉周围,由动脉周围淋巴鞘和脾小结组成。动脉周围淋巴鞘由大量T细胞等组成,是脾脏中的胸腺依赖区,当发生免疫应答时,此区明显增厚(成令忠, 2003)。脾小结主要由B细胞组成。红髓由脾索和脾血窦组成。白髓结构典型与否和机体受到的抗原刺激有关。随着抗原刺激的不断增加,免疫反应不断增强,脾小结中含有活跃的B细胞,移行区则被用作脾脏与血液淋巴细胞再循环的通道,其在动员具有免疫活性的淋巴细胞方面发挥重要作用。随着白髓与红髓界线渐渐模糊,白髓比例降低,脾小结逐渐不明显,预示着免疫能力逐渐下降,因此,脾脏的组织学变化代表了机体免疫功能的改变。

脾也是机体发生免疫功能的重要场所,脾指数的高低在一定程度上反映了身体免疫机能的强弱。本文同时检测了脾指数和脾脏切片H.E.染色两项指标,既可以相互补充,又可以相互论证:脾脏切片显示,从2周运动组开始出现白髓和红髓之间界线交叉现象;6周运动组,出现了红髓浸润到白髓结构中的现象;与0周运动组相比,脾指数在2周运动组呈非常显著性下降,4周运动组和6周运动组呈显著性下降。

综上,提示脾脏免疫机能下降,推测可能是在训练进程的第2周,运动负荷骤升,机体免疫系统对此“不适应”

应激,产生了一种过表达方式的应答初反应。4周和6周,在运动负荷的不断递加的情况下,伴随着运动性疲劳的累积等,诱导机体产生过多活性氧,这会对淋巴细胞DNA造成损伤,改变淋巴细胞的生物学活性,如削弱细胞的增殖能力,分泌功能等,也会加速免疫细胞的凋亡甚至死亡(陈佩杰等, 2011; 耿青青, 2013; 耿青青等, 2011),可能会进一步诱发外周肌肉组织炎症因子浸润的发生(陈佩杰等, 2011)。

脾脏和淋巴结都是机体的外周免疫器官,是成熟T细胞和B细胞驻留、增殖以及对抗原刺激作出反应的场所,这些器官富含捕捉和处理抗原的巨噬细胞和树突细胞,后者又能迅速捕获和处理抗原,并将处理后的抗原递呈给免疫活性细胞,主要是T细胞和B细胞。T细胞和B细胞经骨髓分化发育成熟后,经血液循环分布到外周免疫器官。B细胞主要分布在脾脏的脾小结、脾索和脾淋巴鞘外周,以及淋巴结的淋巴小结、髓索和胃肠道黏膜下的淋巴小结中(陈海英, 2008)。本研究通过观察脾脏组织切片可知,由2周组红髓和白髓界限不清,到6周组红髓与白髓有浸润现象发生,提示递增负荷运动应激下,大鼠脾脏B淋巴细胞数量有减少趋势。有研究显示,脾脏淋巴细胞的大量凋亡必然导致免疫细胞的损耗以及凋亡细胞本身所产生对免疫系统的抑制(Kennedy et al., 2017),这将进一步削弱脾脏B细胞的增殖能力,加速脾脏B细胞凋亡,进而导致脾脏免疫机能下降。

骨髓作为中枢淋巴器官,脾脏作为次级淋巴器官,对比表明,与骨髓微环境相比,脾脏微结构发生的免疫反应对运动应激更为敏感,其变化也比骨髓更加明显;两者适应性反应也各不相同。这些组织微结构的变化为运动性免疫失衡的分子生物学讨论(图3)提供了有力的图像论证支持,奠定了组织学基础。

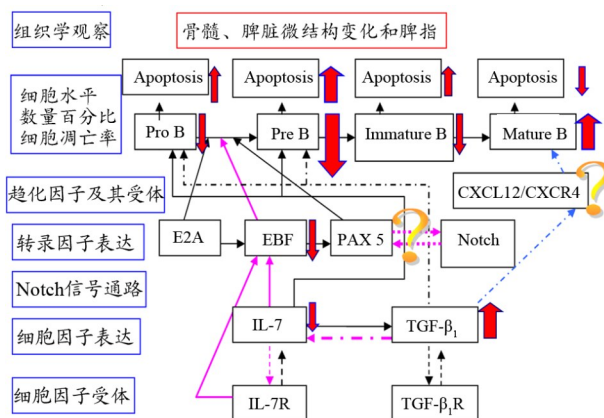


图3 实验各指标在2周组的变化及相互关联

Figure 3. Changes and Correlations of Indexes in 2-Week Group

### 4 小结

与0周运动组相比,2周运动组脱钙股骨骨髓造血细胞

胞呈下降趋势,4周组和6周组呈上升趋势,推测:随着训练周数的推进,骨髓中淋巴系干细胞与髓系干细胞生发比例会发生改变,因为机体营养供应,对于髓系与淋巴系的分配是不同步且有优先等次之分,那么骨髓增殖池中髓系干细胞的数量变化,影响着淋巴系细胞的凋亡和增殖情况,进而影响B淋巴细胞在骨髓的早期发育。

从2周运动组开始出现骨髓和红髓之间界线交叉现象,同时脾指数明显下降,提示脾脏免疫机能下降,可能是伴随着运动性疲劳的累积,削弱了脾脏免疫细胞的增殖与活化能力,进而影响了B淋巴细胞在脾脏的进一步分化与发育。

综上,提示与骨髓微环境相比,脾脏微结构的免疫反应对运动应激更为敏感,其变化比骨髓更加明显;两者适应性反应大不相同。

#### 参考文献:

陈海英,2008.组织学与胚胎学[M].北京:人民卫生出版社.

陈佩杰,董静梅,2011.过度运动激活中性粒细胞产生的活性氧对淋巴细胞DNA损伤及干预研究[J].体育科学,31(1):29-38.

成令忠,2003.现代组织学(第三版)[M].上海:上海科学技术文献出版社.

耿青青,2012.长期递增负荷运动对调控骨髓B细胞发育分化的E2A、EBF、PAX5的影响[J].体育科学,32(11):76-82.

耿青青,2013.递增负荷运动对大鼠早期B细胞发育数量及凋亡情况的影响[J].山东体育学院学报,29(1):60-65.

耿青青,郝选明,2011.长期递增负荷跑台对大鼠骨髓Pro B细胞、Pre B细胞发育的影响[J].广州体育学院学报,31(5):101-105.

刘玲玲,李旭芳,刘兴楼,等,2012.小鼠巨细胞病毒播散性感染急性期脾脏损伤的免疫病理机制[J].细胞与分子免疫学杂志,28(6):564-567.

卢兴国,2008.骨髓细胞学和病理学[M].北京:科学出版社.

浦权,杨梅如,2002.血液病骨髓诊断病理学[M].北京:科学出版社.

吴迪,王雯娟,张梅,2018.多发性骨髓瘤伴非骨旁髓外病变骨髓形态学特征[J].中国实验血液学杂志,26(3):807-811.

肖卫华,陈佩杰,2011a.IGF-1和MGF在过度训练抑制大鼠腹膜巨噬细胞吞噬功能中的作用研究[J].体育科学,31(10):67-71.

肖卫华,陈佩杰,王茹,等,2011b.过度训练及补充二联甲苯或谷氨酰胺对大鼠腹膜巨噬细胞活性氧和诱导型一氧化氮合酶的影响[J].体育科学,31(2):49-54.

ABDELRASOUL H, WERNER M, SETZ C S, et al., 2018. PI3K induces B-cell development and regulates B cell identity[J]. Sci Rep, 8(1):1327.

CLAYCOMBE K, KING L E, FRAKER P J, 2016. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 105(6):2017-2021.

DE LA FUENTE M, GIMENEZ-LLORT L, 2016. Models of aging

of neuroimmunomodulation: Strategies for its improvement[J]. Neuroimmunomodulation, 17(3):213-216.

DONG J M, CHEN P J, WANG R, et al., 2011. NADPH oxidase: A target for the modulation of the excessive oxidase damage induced by overtraining in rat neutrophils[J]. Int J Biol Sci, 7(6):881-891.

FUJII K, ISHIBASHI K I, KATO J, et al., 2016. Cellular-level characterization of B cells infiltrating pulmonary MALT lymphoma tissues[J]. Virchows Arch, 469(5):575-580.

HARDY R R, KINCADE P W, DORSHKIND K, 2012. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage[J]. Immunity, 26(6):703-714.

KENNEDY D E, KNIGHT K L, 2017. Inflammatory changes in bone marrow microenvironment associated with declining B lymphopoiesis[J]. J Immunol, 198(9):3471-3479.

KING L E, OSATI-ASHTIANI F, FRAKER P J, 2002. Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice[J]. J Nutr, 132(5):974-979.

LAAKKO T, FRAKER P, 2002. Rapid changes in the lymphopoietic and granulopoietic compartments of the marrow caused by stress levels of corticosterone[J]. Immunology, 105(1):111-119.

LIU H, ZHU R, LIU C, et al., 2017. Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining[J]. Biomed Res Int, doi: 10.1155/2017/9050754.

MAR F, ZHU R Y, WANG D W, et al., 2016. Diabetic osteoporosis: a review of its traditional Chinese medicinal use and clinical and preclinical research[J]. Evid-Based Compl Alt, doi: 10.1155/2016/3218313.

NUNEZ G, LONDON L, HOCKENBERY D, et al., 1990. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines[J]. J Immunol, 144(9):3602-3610.

RADOM-AIZIK S, ZALDIVAR F J, OLIVER S, et al., 2016. Evidence for microRNA involvement in exercise-associated neutrophil gene expression changes[J]. J Appl Physiol, 109(1):252-261.

TROTTIER M D, NAAZ A, LI Y, et al., 2012. Enhancement of hematopoiesis and Lymphopoiesis in diet-induced obese mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 109(20):7622-7629.

WANG R, CHEN P J, 2009. Modulation of NKT cells and Th1/Th2 imbalance after alpha-GalCer treatment in progressive load-trained rats[J]. Int J Biol Sci, 5(4):338-343.

WANG R, CHEN P J, CHEN W H, 2011. Effect of diet and exercise-induced weight reduction on complement regulatory proteins CD55 and CD59 levels in overweight Chinese adolescents[J]. J Exerc Sci Fit, 9:46-51.

YAM-PUC J C, ZH L L, ZH Y, et al., 2011. Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation[J]. Cell Mol Immunol, 8(1):41-49.

YAMANAKA M, FURUSAWA K, et al., 2010. Impaired immune response to voluntary arm-crank ergometer exercise in patients with cervical spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 48(10):734-739.

(收稿日期:2019-01-22; 修订日期:2021-07-29; 编辑:尹航)