

间歇低氧暴露对逐步递增负荷运动 大鼠白细胞及其分类计数的影响

王丽平¹, 余 群¹, 翁锡全², 林文骏²

(1.安顺学院体育学院, 贵州 安顺 561000)

(2.广州体育学院运动生物化学重点实验室, 广东 广州 510075)

[摘要] 低氧训练是体育训练项目中广泛采用并行之有效的运动训练方法和手段。在低氧训练的过程中, 机体处于低氧环境和运动的双重刺激下, 对外周血中的免疫细胞参数有明显的影响。本文将探讨间歇低氧刺激对逐步递增负荷运动大鼠白细胞的影响。将大鼠随机分为安静组、运动组、运动+低氧连续暴露组和运动+间歇低氧暴露组。后 3 组进行 6 周递增负荷跑台运动, 运动+低氧连续暴露组和运动+间歇低氧暴露组从第 4 周起各在运动后进行人工低氧(O_2 含量为 14.5%) 2 h 连续暴露和间隔 3 h 的暴露。6 周训练后, 运动组大鼠运动性低血红蛋白现象发生, 运动组、运动+低氧连续暴露组和运动+间歇低氧暴露组白细胞计数显著或非常显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 间歇低氧暴露对大鼠白细胞总数影响不大($P>0.05$)。运动组大鼠中性粒细胞、淋巴细胞数显著或非常显著低于安静对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 运动+间歇低氧暴露组单核细胞数显著低于安静对照组, 嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞计数四组间无显著性差异($P>0.05$)。提示反复少量的低氧刺激可有效防治运动性低血红蛋白, 但对机体免疫力的影响也较大。

[关键词] 递增负荷运动, 运动性低血红蛋白, 间歇低氧, 白细胞, 动物实验

[中图分类号] G886 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2018)01-0116-05

Effects of Intermittent Hypoxic Exposure on WBC Counting and Classification of Gradually Increasing Load Exercise SD Rats

Wang Liping¹, Yu Qun¹, Weng Xiquan², Lin Wentao²

(1. Anshun University, Anshun 561000, China)

(2. Guangzhou Sport University, Guangzhou 510075, China)

Abstract: This paper discusses the intermittent hypoxia stimulate WBC (White Blood Cell) of gradually increasing load exercise SD rats. It explores the changes of the body's nonspecific immunity when hypoxia prevents movement lower hemoglobin and provides a reference for practical training and people fitness. 35 SD rats were divided into four groups: control group (A), training group (B), hypoxic exposure 2 hours group (C) and hypoxic exposure (1+1) hours group (D). The rats of training groups were given 6-week treadmill exercise with progressive loading. Three of the training groups were put in artificial hypoxic environment (14.5% O_2) 1 hour, 2 hours and (1+1) hour per day respectively for three weeks. In the end of the six week, we tested the levels of the red blood cells and white blood cells parameters. After six-week progressive treadmill exercise training, the phenomenon of lower hemoglobin took place. The WBC of the rats in the training groups were significantly lower than that of the control group ($P<0.05$, $P<0.01$), but it did not significantly changes in the intermittent hypoxic exposure groups comparing with the training groups ($P>0.05$). The Neut and Lymph in the training groups were significantly or very significantly lower than the control group ($P<0.05$ or $P<0.01$), the Mono in hypoxic exposure (1+1) hour group were significantly lower than the control group, the Acidophil and Basophil had no significant difference between the four groups ($P>0.05$). Repeated small amounts of hypoxic exposure can be effective prevention and treatment of exercise-induced lower hemoglobin phenomenon, but it has a large effect on the body's immune. We should be careful to choose suitable way of hypoxic exposure in hypoxia training practice.

Key words: increasing load exercise, exercise-induced lower hemoglobin, intermittent hypoxic, WBC, animal experiment

收稿日期: 2017-04-18.

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字 LKA[2013]07 号).

通讯联系人: 王丽平, 硕士, 副教授, 研究方向: 运动训练生理生化原理、网球训练. E-mail: 447568832@qq.com

低氧训练是一种有效的运动训练方法和手段,在越来越多的体育训练项目中得到推广应用^[1]。在低氧训练的过程中,机体处于低氧环境和运动的双重刺激下,对外周血中的免疫细胞如白细胞、中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和淋巴细胞等,会有不同的影响,低氧训练进而对运动员免疫能力和低氧训练的效果产生一定影响^[2-4]。随着对低氧训练研究与应用的不深入,及其训练方式的不断创新,不同的低氧刺激浓度与方式会产生不同的效果^[4]。实验采用在大鼠逐步递增负荷训练过程周间歇低氧暴露3周,检测机体外周血中红细胞、血红蛋白、白细胞及其亚群数量变化,探讨低氧刺激对运动诱导的低血红蛋白大鼠机体的非特异免疫能力的影响。为低氧环境下训练提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 设计

随机对照动物实验。

1.2 时间及地点

实验于2014年3月至2015年2月在广州体育学院运动生物化学重点实验室完成。

1.3 材料

雄性SPF级SD大鼠43只,鼠龄6周,体质量(160 ± 15)g,由广东省实验动物研究所(粤监证字2005A060)提供。所用饲料为南海协力饲料有限公司提供的全价营养啮齿类动物饲料。饲养环境温度为(22 ± 2.5)℃,湿度39%~59%;大鼠饮食自由,依据白天夜晚的自然规律进行光照。

1.4 方法

1.4.1 动物分组

大鼠适应饲养7d后,随机分成4组:安静组、运动组、运动+低氧连续暴露组和运动+间歇低氧暴露组。各组大鼠数量见表1。

表1 实验动物分组情况

Table 1 Basic condition of experimental rats

组别	分组时大鼠数量	体质量/g	进入结果分析大鼠数量	间歇低氧刺激时间
安静组	10	188.2 ± 9.7	10	
运动组	11	187.1 ± 10.1	8	
运动+低氧连续暴露组	11	185.6 ± 10.0	8	9:00-11:00
运动+间歇低氧暴露组	11	189.0 ± 10.9	9	9:00-10:00 13:00-14:00

1.4.2 运动及低氧暴露

运动组、运动+低氧连续暴露组和运动+间歇低氧暴露组大鼠运动6周,每周一到周六运动,周日休息,第1天跑台运动速度为25 m/min,下一周增加2 m/min,运动10 min,第2天增加5 min。

运动+低氧连续暴露组和运动+间歇低氧暴露组大鼠,自第4周开始,在常氧下运动后按照实验设计每天固定时间放进低氧帐篷进行低氧刺激,共刺激3周。运动+间歇低氧暴露组的大鼠每天低氧刺激2 h,分2次进行,中间间隔3 h,见表1。低氧用低氧分压系统(美国HYPOXICO公司)在帐篷里面形成低氧的环境,氧体积分数要求14.5%上下。

1.4.3 取材

最后一次运动、低氧刺激之后休息1d后采样,采用体积分数10%水合氯醛注射大鼠腹腔进行麻醉,打开腹腔,腹主动脉取血,装入真空抗凝管,混匀,保存。

1.4.4 血常规检测

真空抗凝管取血2 h内采用Bayer-ADVIA-120全自动六分类血球分析仪(德国Bayer公司)测量红细胞数量、血红蛋白浓度、红细胞压积、白细胞总数以及中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞数量。

1.5 主要观察指标

白细胞数量与类型。

1.6 统计学分析

用统计学软件 SPSS 20.0 对测试数据统计分析,正态性、方差齐性检验后采用单因素方差检分析;数据以($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 实验动物数量分析

43 只大鼠中有 8 只未能完成实验,最终 35 只大鼠进入结果分析(表 1).

2.2 红细胞

大鼠经 6 周运动后,与安静组相比,运动组大鼠的红细胞数量、血红蛋白浓度与红细胞压积均显著降低($P<0.05$),即大鼠出现低血红蛋白现象,而低氧刺激的大鼠未见显著低下($P>0.05$;表 2).

表 2 不同运动方式对逐步递增负荷运动大鼠血红蛋白、红细胞以及红细胞压积的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 The result of Hb、RBC、Hct of rats				
组别	<i>n</i>	血红蛋白/(g/L)	红细胞计数/($\times 10^{12}$ L ⁻¹)	红细胞比容/(mL/L)
安静组	10	144.33 \pm 9.73	8.16 \pm 0.98	40.83 \pm 2.43
运动组	8	122.57 \pm 17.20 ^a	6.88 \pm 0.65 ^a	35.70 \pm 4.22 ^b
运动+低氧连续暴露组	8	138.05 \pm 10.71 ^b	7.94 \pm 0.72 ^b	39.24 \pm 3.01 ^b
运动+间歇低氧暴露组	9	138.80 \pm 12.99 ^b	7.99 \pm 0.52 ^b	39.73 \pm 1.86 ^b

注:与安静组相比,^a $P<0.01$;与运动组相比,^b $P<0.05$.

2.3 白细胞

6 周后,运动组大鼠白细胞总数显著低于安静组($P<0.05$),而间歇低氧暴露对大鼠白细胞总数的影响不明显($P>0.05$). 运动组大鼠中性粒细胞、淋巴细胞显著低于安静组($P<0.05$),运动+间歇低氧暴露组单核细胞显著低于安静组,而运动组和运动+低氧连续暴露组的中性粒细胞和淋巴细胞数量接近($P>0.05$),4 组大鼠嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞数量接近($P>0.05$),结果见表 3.

表 3 不同运动方式对逐步递增负荷运动大鼠白细胞数量及分类的影响($\bar{x}\pm s,\times 10^9$ L⁻¹)

Table 3 Effects of different hypoxic preconditioning on leucocyte subpopulations of rats							
组别	<i>n</i>	白细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	嗜酸细胞	嗜碱细胞
安静组	10	5.094 \pm 0.665	0.441 \pm 0.060	3.337 \pm 0.343	1.084 \pm 0.072	0.027 \pm 0.033	0.016 \pm 0.015
运动组	8	4.501 \pm 0.570 ^a	0.387 \pm 0.053 ^a	2.992 \pm 0.300 ^a	1.031 \pm 0.067	0.038 \pm 0.039	0.013 \pm 0.011
运动+低氧连续暴露组	8	4.496 \pm 0.426 ^a	0.371 \pm 0.048 ^b	3.013 \pm 0.264 ^a	1.032 \pm 0.035	0.051 \pm 0.042	0.014 \pm 0.009
运动+间歇低氧暴露组	9	4.269 \pm 0.604 ^b	0.378 \pm 0.015 ^a	2.906 \pm 0.346 ^b	1.004 \pm 0.100 ^a	0.031 \pm 0.036	0.013 \pm 0.012

注:与安静组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$.

3 讨论

人体的白细胞主要功能是执行机体的非特异性免疫功能,具有细胞核的无色细胞,活体细胞一般呈球形,血液中的白细胞包括单核细胞、淋巴细胞、粒细胞(颗粒白细胞). 根据其形态又可以分为有颗粒白细胞与无颗粒白细胞两类,粒细胞中有特殊的染色物质,使用瑞氏燃料着色可以分出 3 种不同的粒细胞即嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞. 不含染色颗粒的白细胞总数有单核细胞、淋巴细胞. 不同种类的白细胞总数的保护功能不尽相同. 白细胞总数的变化能间接反映机体疾病状况与身体的免疫应激状态的改变以及机体对环境改变的适应情况^[5]. 中性粒细胞具有吞噬病毒或异物的功能,可以产生变形运动,是白细胞总数中数目最多的细胞,是人体杀灭细菌、病毒的最重要的防卫工具之一,是人体对抗疾病的重要防线. 如果机体的中性粒细胞大量减少时,身体感染的几率就会显著增加. 嗜酸性粒细胞含嗜酸颗粒,具有酸性磷酸酶、过氧化物酶等,其具有趋化性,可以吞噬侵入人体的抗原异物,保护人体少受危害,还有对抗组织胺等致炎因子的功能. 嗜碱性粒细胞含嗜碱颗粒,里面有 5-羟色胺、组织胺、肝素等,在免疫反应时起辅助作用. 白细胞中的单核细胞是机体骨髓产生血液最大的细胞,通过人体血液循环运输到身体组织中,有的在机体特异性器官中变成强大功能巨噬细胞,可以变形,可以吞噬“异物”等抗原;同时它参与机体的免疫反应,吞噬“异物”后可以把抗原决定簇传递于淋巴细胞,使机体产生免疫特异性反应,另外它可以杀灭寄生虫、细菌、肿瘤细胞等. 淋巴细胞则为特异性免疫功能性细胞,是机体细胞免疫反应和体

液免疫反应细胞. 机体白细胞总数通过吞噬、产生抗体、传递免疫信息、参与细胞免疫等作用来抵御病原微生物等侵入,以确保身体健康,是机体至关重要的防御系统. 机体白细胞总数与分类计数一般正常情况是稳定的,可是当人们身体产生疾病时白细胞总数计数与白细胞总数亚群的比例会发生改变,故在临床医学上检验白细胞总数计数与白细胞总数亚群比例可以用来辅助医生诊断疾病^[6].

3.1 间歇低氧暴露对逐步递增负荷运动 SD 大鼠血液白细胞的影响

有关运动影响白细胞总数与亚群比例的研究较多,由运动引起机体白细胞总数增高同运动量的大小和运动训练水平的高低密切相关,较低强度运动一般不会引起白细胞总数与亚群比例变化^[7]. 白细胞总数与亚群比例的变化是机体免疫系统对运动应激的显著特征,运动训练实际应用中可依据白细胞总数与亚群比例的变化对机体的免疫系统的机能作出第一步的诊断. 有研究认为,血液白细胞总数增加是大强度大运动量后免疫系统的反应特点^[8].

临床医学常常用外周血液系统白细胞总数的变化作为反应机体器官受到损害和恢复程度的主要指标^[9]. 国内外的研究中,低氧训练对非特异性免疫功能影响报道不多,Pedersen 等^[10]发现低氧刺激影响血液白细胞水平,可暂时导致免疫抑制,因而认为低氧环境促使体内激素发生改变而影响白细胞含量. 而低氧对运动诱导的低血红蛋白机体的非特异性免疫的影响更是未见报道.

实验结果显示,递增负荷运动使大鼠白细胞总数降低,间歇低氧暴露对递增负荷运动大鼠白细胞总数无明显影响,而长时间递增负荷运动会使大鼠出现血红蛋白值显著降低,产生低血红蛋白血症,同时白细胞总数也明显下降,表明递增负荷的大强度的运动使机体血红蛋白降低的同时会使机体免疫力同时降低,实验结果与既往研究结果关于大强度运动量的训练会使基础状态下的免疫力受损、白细胞总数总数会降低相符^[11],提示大强度运动训练应加强医务监督,预防运动员免疫力低下,而低氧环境对白细胞总数的影响不大,未见显著性变化,这与以往大多数研究有一定的出入,其原因与低氧暴露的方式(低氧的浓度、暴露的时间、剂量、间隔时间)不同有关.

3.2 间歇低氧暴露对逐步递增负荷运动 SD 大鼠血液白细胞亚群的影响

在以往低氧刺激对白细胞亚群的影响的研究中,大多数研究认为长时间低浓度(海拔高度大于 3 000 m)的低氧刺激会使白细胞亚群发生显著降低,而短时间稍低浓度(海拔高度小于 3 000 m)低氧刺激对白细胞亚群的影响不大^[12-15].

实验结果显示,低氧暴露对递增负荷大鼠白细胞亚群的影响没有显著改变,只是间歇低氧暴露大鼠单核细胞有些变化,反而是运动对亚群中的中性粒细胞与淋巴细胞的影响较大,而运动以及低氧暴露对大鼠嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞数量没有影响. 中性粒细胞、淋巴细胞的变化基本与白细胞的变化一致,而白细胞的改变比二者的变化幅度更大,反应了白细胞亚群变化的叠加效应. 提示在运动监控与临床应用中应当主要关注白细胞总数的改变,同时监控白细胞亚群中的中性粒细胞与淋巴细胞的变化,而对其他亚群细胞的变化则无需过度关注.

3.3 不同低氧暴露模式对逐步递增负荷运动 SD 大鼠血液白细胞的影响

目前在低氧训练中,对低氧暴露的模式的研究较多且各具特色,各有优缺点^[16-18]. 实验结果显示,间歇低氧暴露对大鼠单核细胞的影响较大.

白细胞亚群中单核细胞的主要作用是吞噬、调理,最后要迁移到机体各组织器官,发挥免疫监控,防止机体被感染的功用. 低氧对单核细胞的影响是在迁移性方面. 有研究显示,低氧刺激可抑制机体单核细胞迁移,其效果快、可逆、非特异性,原理是低氧使呼吸链产生故障,合成能量(ATP)减少导致的^[19]. 另有研究显示,低氧可激活下丘脑—垂体—肾上腺轴,释放激素抑制单核细胞的生成^[20].

低氧运动有加低氧的反复刺激引起机体减少单核细胞的合成,同时低氧运动时,交感神经兴奋,体内运动激素(乙酰胆碱、儿茶酚胺)抑制单核细胞合成 DNA,以致单核细胞下降,反复多次的低氧应激影响会更显著,对提升血红蛋白有一定的作用,可有效预防运动性低血红蛋白,但对机体的免疫力的影响也较大,所以在低氧训练的实际应用中,不能只考虑低氧对运动成绩、血红蛋白值的改善,还应观察该种刺激方式对免疫系统的影响,及早预防在运动过程中产生免疫力低下的负面效应.

3.4 结论

长时间递增负荷运动可导致运动性血红蛋白低下,间歇低氧暴露方式可防治运动性低血红蛋白,其中

以少量多次反复刺激的效果较明显;长时间递增负荷运动诱导运动性低血红蛋白的同时,出现了基础状态下低白细胞血症,同时白细胞亚群中淋巴细胞、中性粒细胞显著性降低;反复少量的低氧暴露刺激预防运动性低血红蛋白的效果较佳,但对机体的免疫的影响也较大,特别是白细胞亚群中的单核细胞变化较大,故在选取适宜的低氧暴露方式上应综合全面考量。

[参考文献]

- [1] LEVINE B D, STRAY G J. A practical approach o altitude training: where to live and training for optimal performance enhancement[J]. *Int J Sports Med*, 1992(suppl 1): s209-s212.
- [2] CALDWELL C C, KOJIMA H, LUKASHEV D, et al. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lympho-cyte development and effectors functions[J]. *J Immunol*, 2001, 167(11): 6 140-6 149.
- [3] 王竹影,姜文凯,陈龙孙,等. 中、高强度不同模式低氧训练对大鼠白细胞及其分类计数的影响[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2011, 34(4): 147-147.
- [4] 余群,翁锡全,林文澍,等. 间歇低氧预防 SD 大鼠大运动负荷训练期血红蛋白下降及其机制探讨[J]. *中国运动医学杂志*, 2010, 29(4): 399-402.
- [5] 张漓,路瑛丽,徐建方,等. 低氧耐力运动4周内大鼠 ET-1 与 NO 生成的时序性变化[J]. *中国体育科技*, 2014, 50(4): 108-116.
- [6] YAMAMURA C, ZUSHI S, TAKATA K, et al. Physiological characteristics of well-trained synchronized swimmers in relation to performance scores[J]. *Int J Sports Med*, 1999, 20(4): 246-251.
- [7] WANG J S, WENG T P. Hypoxic exercise training promotes antitumour cytotoxicity of natural killer cells in young men[J]. *Clinical science*, 2011, 121(8): 343-353.
- [8] PE DERS EN B K, HOFFM AN-GOET Z L. Exercise and the immune system. regulation, integration and adaption[J]. *Physiol Rev*, 2000, 80: 1 055-1 081.
- [9] ISOWA T, OHIRA H, MURASHIMA S. Reactivity of immune, endocrine and cardiovascular parameters to active and passive a-cute stress[J]. *Biol Psychol*, 2004, 65(2): 101-120.
- [10] PE DERSEN BK, S TEE SBERG A. Ex ercise and Hypoxia: Effects on Leukocytes and Interleuk in-6-shared M echanism s[J]. *Med Sci Sports Exe*, 2002, 34(12): 2004-13.
- [11] 王竹影,姜文凯,陈龙,等. 中、高强度不同模式低氧训练对大鼠白细胞及其分类计数的影响[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2011, 34(4): 142-147.
- [12] TURNER L, SCOTTON C, NEGUS R, et al. Hypoxia inhibits macrophage migration[J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(7): 2 280-2 287.
- [13] NIESS A M, FEHRENBACH E, STROBEL G. Evaluation of stress responses to interval training at low and moderate altitudes[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2003, 35(2): 263-269.
- [14] FISCHETTI F, FABRIS B, ZACEARIA M, et al. Effects of prolonged high-altitude exposure on peripheral adrenergic receptor in young healthy volunteers[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2000, 82(5): 439-445.
- [15] 常芸,何子红,王莱芮,等. 高原训练对国家短道速滑运动员细胞免疫功能的影响[J]. *体育科学*, 2002, 22(1): 86-89.
- [16] TIOLLIER E, SCHMITT L, BURNAT P, et al. Living high-training low altitude training: effects on mucosal immunity[J]. *European journal of applied physiology*, 2005, 94(3): 298-304.
- [17] CARR A J, SAUNDERS P U, VALLANCE B S, et al. Increased hypoxic dose after training at low altitude with 9h per night at 3 000 m normobaric hypoxia[J]. *Journal of sports science and medicine*, 2015 Dec; 14(4): 776-782.
- [18] 赵杰修,张漓,路瑛丽,等. 高原(低氧)和高温环境下运动训练生理生化监控研究进展[J]. *中国运动医学杂志*, 2016(12): 1 165-1 171.
- [19] NIESS A M, FEHRENBACH E, STROBEL G. Evaluation of stress responses to interval training at low and moderate altitudes[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2003, 35(2): 263-269.
- [20] GOSWAMI A R, DUTTA G, GHOSH T. Effects of vitamin C on the hypobaric hypoxia-induced immune changes in male rats[J]. *Int J Biometeorol*, 2014 Nov; 58(9): 1 961-1 971.

[责任编辑:陆炳新]