

壳寡糖抗运动疲劳及对运动性免疫抑制的影响

尹雨芳¹, 林强¹, 曹建民², 周海涛^{3*}, 王灿²

(1. 北京联合大学 应用文理学院, 北京 100191; 2. 北京体育大学, 北京 100084;
3. 北京联合大学 生物化学工程学院, 北京 100023)

[摘要] **目的:**研究壳寡糖(chitosan oligosaccharide, CO)抗运动疲劳及对运动性免疫抑制的影响。**方法:**以大强度耐力训练大鼠为模型, 55只SPF级Wistar 49 d龄雄性大鼠为对象, 随机分为5组: 静止组, 运动组, 运动+低、中、高剂量壳寡糖干预组, 每组10只(剔除不符合实验要求的大鼠)。每天ig给药1次, 壳寡糖干预组剂量分别为100, 200, 600 mg·kg⁻¹, ig体积为5 mL·kg⁻¹, 其他组ig等体积生理盐水。42 d力竭游泳训练后, 测试相关指标。**结果:**力竭游泳时间, 静止组、运动组组间无显著差异, 壳寡糖干预组较运动组均显著增加($P < 0.01$)。血清超氧化物歧化酶(SOD)活性, 白细胞介素-10(IL-10)含量, 运动组较静止组明显下降($P < 0.01$); 壳寡糖干预组较运动组均显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。丙二醛(MDA), 核转录因子- κ B(NF- κ B), 白细胞介素-6(IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量, 脾脏Toll样受体4(TLR4)表达率, 运动组较静止组均显著升高($P < 0.01$), 壳寡糖干预组较运动组均显著下降($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**壳寡糖可以有效缓解过度训练导致的机体内环境失衡, 延缓和避免运动疲劳及运动性免疫抑制的发生与发展, 且以高剂量组效果最为明显。

[关键词] 壳寡糖; 抗运动疲劳; 运动性免疫抑制; 炎症因子; Toll样受体4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0146-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040146

Effect of Chitosan Oligosaccharide on Exercise Anti-fatigue and Exercise-induced Immunosuppression

YIN Yu-fang¹, LIN Qiang¹, CAO Jian-min², ZHOU Hai-tao^{3*}, WANG Can²

(1. College of Applied Arts and Science of Beijing Union University, Beijing 100191, China;
2. Beijing Sport University, Beijing 100084, China;
3. Biochemical Engineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of chitosan oligosaccharide (CO) on anti-exercise fatigue and exercise-induced immunosuppression. **Method:** To establish the model of high-intensity endurance training, 55 7-week-old male SPF Wistar rats were randomly divided into 5 groups, with 10 in each group (the rats that did not meet the requirements were removed): clam group (C group), exercise group (E group), exercise + ig low-dose, middle-dose and high-dose chitosan oligosaccharide group (CO + E-L group, CO + E-M group, CO + E-H group). Gavage was performed by using professional devices once a day. The rats in CO groups were gavaged CO 100, 200, 600 mg·kg⁻¹ with ig volume of 5 mL·kg⁻¹ respectively. Rats in other groups were given saline of the same volume. After 42 days of exhaustive swimming training, measuring related indicators. **Result:** Swimming time in CO + E groups were significantly longer than that in E group ($P < 0.01$). There were no difference between C and E groups. Serum superoxide dismutase (SOD) and interleukin-10 (IL-10) in E group were significantly lower than C group ($P < 0.01$), at the same time, those in CO + E groups were all higher than

[收稿日期] 20150605(003)

[基金项目] 北京市保健食品与生物活性物质重点实验室开放课题(ZK70201401)

[第一作者] 尹雨芳, 硕士, 从事天然活性高分子物的研究, Tel:15101632051, E-mail: zhuizhuy11@163.com

[通讯作者] *周海涛, 硕士, 副教授, 从事运动性疲劳与恢复研究, Tel:13611383040, E-mail: zsettle@sina.com

E groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Serum malondialdehyde (MDA), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and spleen Toll like receptor 4 (TLR4) expression ratio in E group were all significantly higher than C group ($P < 0.01$), those in CO + E groups were all lower than that in E group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The supplement of CO can effectively relieve the imbalance of internal environment caused by excessive training, avoid the occurrence and development of exercise fatigue and exercise immunosuppression and CO + E-H group have a significant effect.

[Key words] chitosan oligosaccharide; exercise-induced immunosuppression; exercise-induced immunity; inflammatory factors; Toll like receptor 4

壳寡糖是壳聚糖经特殊的生物酶技术降解得到的一种聚合度在 2 ~ 20 之间寡糖产品,相对分子质量 $\leq 3\ 200$ kDa,具有无毒性、容易吸收和利用、水溶性好以及相对分子质量小等理化特性。现代医学研究证明^[1],壳寡糖具有增强人体免疫力,抗氧化、抑炎、抗菌、抗感染等多种药理作用。在具有类似于壳聚糖性质的同时,其生理活性及功能性质更加显著,药理活性是同等重量壳聚糖的 14 倍。竞技体育中,运动员为提高运动能力,常需要进行长时间、大强度的运动训练刺激机体。但由于周期长、强度大,体内能量物质大量消耗,营养供应及体内环境的动态平衡被打破,会导致短期过度训练的发生。同时由于恢复时间短,过度疲劳后无法及时恢复,进而发展为过度训练综合症。短期过度训练经过 1 ~ 2 周可自行恢复,运动能力得以恢复甚至可超过原来水平。而过度训练综合症则表现为易感染及持续的运动能力、免疫力下降^[2]。运动医学界将这种现象称为运动性免疫抑制^[3]。运动性免疫抑制不仅影响运动员运动能力提升与发展,更直接影响其身体健康^[4]。延缓和避免运动免疫抑制的发生与发展已成为当前运动医学领域的重点和热点。本文以大强度耐力训练大鼠为模型,探讨壳寡糖抗运动性疲劳及对运动性免疫抑制的影响,旨在为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 55 只,7 周龄,体重 (257 ± 15) g,北京大学医学部实验动物科学部提供,合格证号 SCXK(京)2006-0008。在整个实验过程中,实验室内温度保持在 (22 ± 2) °C,相对湿度 55% ~ 75%,光照时间随自然变化。所有实验大鼠均以基础饲料(北京大学医学部实验动物科学部提供)和蒸馏水常规饲养,自由饮食。实验时间 49 d,正式训练时间 42 d。

1.2 药物与试剂 壳寡糖(相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da,可溶于水),大连中科格莱克生物技术有限公司

购得,批号 14081425。将 10 g 壳寡糖溶于适量蒸馏水中,定容至 100 mL,得到质量浓度为 $100\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 壳寡糖水溶液,4 °C 存放备用。脾脏 Toll 样受体 4 (TLR4) 抗体(上海诚凛生物科技有限公司,20150206);磷酸盐缓冲液(PBS),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),IL-10,核因子- κ B(NF- κ B)测试试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20150115, 20150205, 20150203, 20150206, 20150202, 20150209, 20150211)。

1.3 仪器 佳宝 AP1500 型水泵(广东振华电器有限公司),ALCYON300 型全自动生化分析仪(美国 Abbott Laboratories 公司),FACS Calibur2000 型流式细胞仪(美国 B&D 公司),NR-B17CC 型超低温冰箱(日本松下电器产业株式会社),ISO9001 型电子天秤(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 实验大鼠适应性饲养 4 d 后,以 $30\ \text{min} \cdot \text{d}^{-1}$ 的运动量对其进行为期 3 d 的筛选,淘汰 5 只不适应游泳训练的大鼠,将剩余 50 只大鼠以数字随机分组法分为 5 组:静止组,运动组,运动 + 壳寡糖低、中、高剂量组,每组 10 只(剔除不符合实验要求的大鼠)。训练期间,各组每天自由摄食饮水。干预各组 *ig* 剂量分别为 $100, 200, 600\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的壳寡糖,相当于成人推荐剂量的 5, 10, 30 倍,*ig* 体积为 $5\ \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。其他组 *ig* 等体积生理盐水。

2.2 训练及测试方案 静止组不进行任何运动,其他组进行负重游泳运动。玻璃泳槽水深 50 cm,水温 (31 ± 2) °C,在游泳箱底部放置水泵形成流动水防止大鼠在水面漂浮不动。训练 42 d,第 1 周不负重,第 2 周负 2% 体重,第 3 周负 4% 体重,第 4 ~ 6 周负 5% 体重,每次训练至力竭。开始游泳至力竭所用时间为大鼠力竭运动能力。力竭标准以大鼠下沉后 10 s 不露出水面为度。处死前的最后 1 次为无负重力竭游泳训练,记录力竭时的游泳时间。

2.3 指标测定 各组大鼠于末次游泳训练 24 h 后,乙醚适度麻醉,从颈总动脉处取全血 5 mL 加入柠檬酸钠溶液抗凝,37 ℃ 水浴 30 min 后,4 ℃ 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离制备血清。打开胸腹腔,取出脾脏,清洗吸湿后称重。脾脏放入 PBS 中。血清及脾脏置 -20 ℃ 冰箱中保存待查。MDA 采用比色法测定;SOD 采用黄嘌呤氧化酶法测定;血清 IL-6, TNF- α , IL-10, NF- κ B 含量采用酶联免疫吸附法(ELISA)测试。脾脏单核细胞表面 TLR4 表达,采用流式细胞术测定。以上各指标的测定严格按照试剂盒说明书进行,计算公式等详见试剂盒使用说明书。

2.4 数据统计 采用 SPSS 13.0 软件对所有数据进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠运动能力及血清 SOD 活性和 MDA 含量的影响 力竭游泳时间,静止组、运动组间无显著差异,壳寡糖干预组较运动组均显著增加 ($P < 0.01$),高剂量组长于低剂量组 ($P < 0.05$)。血清 SOD 活性,运动组较静止组明显下降 ($P < 0.01$),壳寡糖干预组较运动组均显著升高 ($P < 0.01$),中、高剂量组较低剂量组升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);血清 MDA 含量,运动组较静止组显著升高 ($P < 0.01$),壳寡糖干预组较运动组显著下降 ($P < 0.05, P <$

0.01),中、高剂量组较低剂量组下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 运动及壳寡糖对大鼠运动能力及血清 SOD 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of exercise and chitosan oligosaccharide on rats' exercise capacity and content of serum SOD, MDA ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	力竭游泳时间 /min	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹
静止	-	85.5 ± 13.2	87.7 ± 13.8	6.2 ± 2.1
运动	-	76.9 ± 12.4	47.5 ± 8.5 ²⁾	10.2 ± 2.5 ²⁾
运动 + 壳寡糖	100	117.2 ± 13.1 ⁴⁾	64.9 ± 11.5 ⁴⁾	8.4 ± 1.7 ³⁾
	200	121.3 ± 12.9 ⁴⁾	75.0 ± 13.5 ^{4,5)}	7.3 ± 1.1 ^{4,5)}
	600	131.6 ± 20.3 ^{4,5)}	95.7 ± 21.6 ^{4,6)}	6.0 ± 1.2 ^{4,6)}

注:与静止组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与运动组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与运动 + 壳寡糖 100 mg·kg⁻¹ 组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对大鼠脾脏 TLR4 表达率及血清 NF- κ B, IL-6, TNF- α , IL-10 含量的影响 脾脏 TLR4 表达率,血清 IL-6, TNF- α , NF- κ B 含量运动组较静止组显著升高 ($P < 0.01$),壳寡糖干预组较运动组均显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),中、高剂量组较低剂量组显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。血清 IL-10 含量,运动组较静止组显著降低 ($P < 0.01$),壳寡糖干预组较运动组显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),中、高剂量组较低剂量组显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 运动及壳寡糖对大鼠脾脏 TLR4 表达率及血清 NF- κ B, IL-6, TNF- α , IL-10 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of exercise and chitosan oligosaccharide on rats' spleen TLR4 expression and content of serum NF- κ B, IL-6, TNF- α , IL-10 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TLR4 表达率 /%	NF- κ B /ng·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹
静止	-	24.9 ± 0.8	1 096.8 ± 281.8	19.9 ± 7.4	6.8 ± 1.8	428.5 ± 9.8
运动	-	29.0 ± 1.1 ²⁾	1 821.0 ± 209.5 ²⁾	59.0 ± 12.4 ²⁾	21.0 ± 9.5 ²⁾	279.2 ± 12.5 ²⁾
运动 + 壳寡糖	100	26.9 ± 1.0 ³⁾	1 673.4 ± 246.7 ³⁾	44.9 ± 11.5 ³⁾	11.4 ± 6.7 ³⁾	315.4 ± 11.7 ³⁾
	200	26.0 ± 0.9 ³⁾	1 599.3 ± 233.1 ^{3,5)}	41.0 ± 7.5 ³⁾	9.3 ± 3.1 ^{3,5)}	347.1 ± 10.3 ^{3,5)}
	600	25.1 ± 0.9 ³⁾	1 328.0 ± 241.2 ^{4,5)}	35.1 ± 8.6 ^{4,5)}	8.0 ± 1.2 ^{4,6)}	361.3 ± 9.3 ^{4,6)}

4 讨论

4.1 运动及壳寡糖对大鼠体重及抗运动疲劳的影响 力竭时间则是衡量机体抗运动疲劳能力的直接指标。实验结果表明训练过程中,由于周期长、强度大、恢复时间短导致大鼠出现过度训练,运动能力下降。补充壳寡糖可以有效提高其抗运动疲劳能力。其可能机制为①提高线粒体对 Ca²⁺ 的缓冲能力,减少胞内 Ca²⁺ 外流,调节线粒体膜通透性,缓解神经元凋亡^[5]。②壳寡糖分子中的还原端羰基和伯、仲-

OH, -NH₂, 可与 ·O²⁻ 发生反应并清除 ·O²⁻^[6]。降低 ·O²⁻ 对抗氧化酶消耗及活性的影响,改善体内的自由基代谢紊乱及其引发的脂质过氧化反应^[7]。③降低血清中乳酸脱氢酶(LDH)活性,增进了糖原储备增加糖原储备量,保障有氧供能^[8]。

4.2 运动及壳寡糖对大鼠运动性免疫抑制的影响

TLR4 被活化后,可识别病原体相关分子模式,与相关配体结合激活 NF- κ B 等转录因子,通过调控多种相关细胞因子及趋化因子的释放,以及增强免疫

细胞的吞噬能力等途径,启动、扩大并参与天然免疫。TNF- α 可刺激单核巨噬细胞合成和分泌IL-1,IL-6等炎症介质,并协同扩大其生物学效应。IL-6在机体免疫调节、炎症反应等过程中发挥重要的作用,具有致炎和抗炎的双向作用。此外,IL-6还可以直接刺激Th2淋巴细胞产生IL-10等抑制细胞免疫的细胞因子。IL-10可强烈抑制致炎因子的合成,发挥抑炎作用。

本实验结果证明在长时间、大强度训练导致机体过度训练并引发运动性免疫抑制。补充壳寡糖有效地缓解了运动性免疫抑制的发生与发展,且以高剂量组效果最佳。其机制可能为:①通过介导细胞表面TLR4受体来激活巨噬细胞,增加小鼠的脾脏指数,刺激外周血淋巴细胞增殖^[9]。②通过有效地促进T、B细胞和其它免疫细胞的增殖和分化,协调免疫细胞的相互作用,增加其杀伤活性^[10]。③通过对过度激活的中性粒细胞的缓解作用并促进其凋亡,减少炎症因子的释放以缓解运动性免疫抑制^[11]。④通过诱导相关细胞因子的分泌或者激活相应受体或蛋白,活化细胞内相关的免疫信号通路^[12]。⑤通过影响NF- κ B依赖的荧光素酶活性、NF- κ B下游基因的表达及NF- κ B亚基的核转位,增强机体免疫功能^[13]。⑥通过增强机体内一氧化氮合酶(iNOS)活性,促进一氧化氮(NO)的生成,介导NO和TNF- α 在巨噬细胞中产生,缓解运动性免疫抑制^[9]。

壳寡糖可以有效改善因过度训练导致的机体内环境失衡,延缓和避免运动性疲劳及运动免疫抑制的发生与发展,且以高剂量组效果最为明显。

[参考文献]

[1] 付辰炜. 氨基葡萄糖及壳寡糖对小鼠免疫功能的影响[D]. 青岛:中国海洋大学,2006.
[2] 张琳,郝选明. TGF- β 对T细胞发育分化的影响与运动性免疫抑制[J]. 中国运动医学杂志,2011,30(1):100-104.

[3] Nieman D C. Exercise, infection, and immunity[J]. Int J Sports Med, 1994, 15(S3):131-141.
[4] Meeusen R, Duclos M, Foster C, et al. Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European college of sport science and the American college of sports medicine[J]. Med Sci Sports Exerc, 2013, 45(1):186-205.
[5] Zhou S, Yang Y, Gu X, et al. Chitooligosaccharides protect cultured hippocampal neurons against glutamate-induced neurotoxicity[J]. Neurosci Lett, 2008, 444(3):270-274.
[6] 刘冰,刘万顺,韩宝芹,等. 壳寡糖及其衍生物对实验性糖尿病大鼠调节血脂和抗氧化作用[J]. 山东大学学报:理学版,2006,41(4):158-163.
[7] Kim K W, Thomas R L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights [J]. Food Chem, 2007, 101(1):308-313.
[8] 陈筱春,文质均,熊静宁. 甲壳寡糖抗小鼠运动性疲劳的实验研究[J]. 湛江师范学院学报,2005,26(3):53-55.
[9] Dou J, Tan C, Bai X, et al. Effects of oligochitosan on the immuno regulation in mouse [J]. Chin J Marine Pharmaceutic, 2005, 24:33-35.
[10] Pangestuti R, Bak S, Kim S. Attenuation of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated Bv2 microglia by chitooligosaccharides via the mapk signaling pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2011, 49(4):599-606.
[11] 党一兵,邹明明,王文霞,等. 两种不同相对分子质量的壳寡糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国海洋药物, 2011, 30(6):36-39.
[12] 张良平. 运动性免疫抑制可能机制探微[J]. 现代预防医学, 2013, 40(3):571-572.
[13] Yoon H J, Moon M E, Park H S, et al. Chitosan oligosaccharide (cos) inhibits LPS-induced inflammatory effects in Raw 264.7 macrophage cells [J]. Biochem Bioph Res Commun, 2007, 358(3):954-959.

[责任编辑 聂淑琴]