

有氧运动训练对大鼠下丘脑、垂体 IL-1 β mRNA、IL-6mRNA 的影响

赖红梅¹ 万平² 刘正云³

摘要 目的:研究长时间运动对老年机体下丘脑、垂体 IL-1、IL-6 的基因表达的影响。方法:将大鼠随机分为 3 组:青年安静组(A 组)、老年安静对照组(B 组)、老年运动训练组(C 组),运动组大鼠在水中 90d 渐进游泳训练,采用 RT-PCR 的方法检测各组大鼠下丘脑、垂体 IL-1、IL-6 的基因表达。结果:在下丘脑老年大鼠与青年鼠相比 IL-1mRNA 和 IL-6mRNA 表达量显著升高($P<0.01$),在垂体水平老年大鼠 IL-1 β mRNA 的水平明显高于青年大鼠($P<0.01$),而 IL-6mRNA 变化不显著($P>0.05$)。通过 3 个月的游泳训练老年大鼠下丘脑 IL-6mRNA、垂体 IL-1 β mRNA 水平有所下降($P<0.01$),下丘脑 IL-1 β mRNA、垂体 IL-6mRNA 的表达水平变化不显著($P>0.05$)。结论:随着老化机体脑组织中炎症细胞因子的基因表达水平明显升高,运动可以抑制老年大鼠下丘脑、垂体细胞因子的基因表达水平,降低老年期神经细胞对炎症的反应性,有利于下丘脑-垂体-肾上腺轴的正常作用。

关键词 下丘脑;垂体;白细胞介素 1 β mRNA;白细胞介素-6mRNA

中图分类号: R493, R873 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-08-0693-03

Long time aerobic training effect on IL-1 β mRNA and IL-6mRNA of hypothalamus and pituitary/LAI Hongmei, WAN Ping, LIU Zhengyun//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(8):693-695

Abstract Objective: To study long time aerobic training effect on IL-1mRNA and IL-6mRNA of hypothalamus and pituitary in old rats. **Method:** 45 rats were randomly divided into three groups. Groups A (n=15) younger rats did not received training; Group B (n=15) old rats did not received training; Group C (n=15) old rats received gradually training for 90 days. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to observe IL-1mRNA and IL-6mRNA on hypothalamus and pituitary in all rats. **Result:** Through experiment, we discovered comparing with younger rats, IL-1mRNA and IL-6mRNA of hypothalamus and IL-1mRNA of pituitary in old rats were significantly increase ($P<0.01$), while IL-6mRNA of pituitary showed no significant difference ($P>0.05$). After training, IL-1mRNA of pituitary and IL-6mRNA of hypothalamus were significantly lower than that of the control group of old rats ($P>0.05$), while the others revealed no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** The results indicated that in old rat level of gene expression of inflammatory cytokine is increase, training could decline the level of gene expression of cytokine and the response of neuron to inflammation to restore normal function of HPA.

Author's address International Peace Maternity Child Hospital of Shanghai, Shanghai, 200030

Key words hypothalamus; pituitary; IL-1mRNA; IL-6mRNA

目前研究表明许多免疫递质对下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA) 都有调节作用, IL-1、IL-6 的作用尤为重要^[1]。IL-1、IL-6 可能作用于下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotriphin-releasing hormone, CRH) 神经元, 合成和释放促肾上腺皮质激素 (adrenocortitropic hormone, ACTH), 从而激活 HPA 轴。随着机体的衰老 HPA 轴的活性逐渐升高^[2]。我们曾报道长时间的有氧运动训练能对老年大鼠的 HPA 活性有一定的下调作用^[3], 这是否与调节下丘脑、垂体的 IL-1、IL-6 的基因表达有关尚不清楚。本研究采用 RT-PCR 的方法, 研究长时间运动对 IL-1、IL-6 的基因表达的影响, 旨在探讨运动训练对下调老年机体 HPA 活性的基本原理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 纯系大鼠, 雄性 (购于中英合资上海西浦儿公司), 3 月龄大鼠 20 只作为青年组, 体重 $300 \pm 40.89\text{g}$; 18—19 月龄大鼠 30 只作为老年组, 体重 $703 \pm 89.8\text{g}$ 。饲养环境温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照时间 12h, 自由饮食 (饲料由中英合资上海西浦儿公司提供)。

1.2 动物分组及运动方式

1 中国福利会国际和平妇幼保健院医学中心, 上海市衡山路 910 号, 200030

2 上海师范大学生物系

3 上海中国福利会国际和平妇幼保健院内科

作者简介: 赖红梅, 女, 博士, 主治医师

收稿日期: 2007-03-22

将大鼠随机分为3组:青年安静组(n=15)、老年安静对照组(n=15)、老年运动训练组(n=15),运动组大鼠在30±2℃水中进行渐进游泳训练,共90天,每周训练5次,每次训练的时间以每周递增的方式(每星期递增5min),从开始的30min到最后的50min。

1.3 大鼠下丘脑、垂体总RNA的制备

采用异硫氰酸胍一步法,取1μl总RNA溶解于99μl双蒸水中,混匀,紫外分光光度计测260/280比值,1μl总RNA加入4μl样本缓冲液、1μlEB后于65℃变性10min,置冰浴10min后,在1%的琼脂糖凝胶(含18%的甲醛),于45℃电泳4h,观察拍照,260/280nm比值介于1.8—2.0,10μl总RNA电泳,28S荧光亮度约为18S的1倍,无其他大分子条带,表明总RNA无蛋白污染,无降解。

1.4 PCR反应引物

见表1。

引物名称	序列	片段长度
IL-1β ^[4]	P1 ATAGCAGCTTTCGACACYYGAG	748bp
	P2 GTCAACTATGTCCCGACCATT	
IL-6 ^[5]	P1 TTCCTACTTCACAAGTA	567bp
	P2 CTAGGTTTGCCGAGTAGA	
GAPDH ^[6]	P1 TGAAGTTCGGTGTCAACGGATTGGC	983bp
	P2 CATGTAGCCATGAGGTCCACCAC	

1.5 RT-PCR扩增mRNA

1.5.1 cDNA的合成: 1μg总RNA+2μl [50mM Tris-HCL (pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT], +2μl 4×dNTPs,+0.5μl Rnasin (20^U)+1μl 寡聚(dT)₁₅引物 (0.5μg)+ DEPC水至38μl; 于65℃变性5min,加入MMLV反转录酶2μl(400^U),37℃,1h;再于95℃,5min;生成cDNA

1.5.2 PCR扩增: (总体积:10μl)PCR反应采用PTC-100PCR扩增仪(RJ-Resrarch)反应物总体积为10μl。循环条件为: IL-1,IL-6,GAPDH: 94℃, 预变性, 4min (1个循环); IL-1, 94℃, 30s; 50℃, 45s; 72℃, 90s(30个循环); IL-6,GAPDH:94℃,1min;55℃, 1min; 72℃,1min(30个循环)

1.5.3 PCR产物的电泳鉴定: 每管PCR产物取5μl,6%聚丙烯酰胺凝胶,40W恒功率电泳2h。将胶固定于3mm滤纸上,用保鲜膜包好在干胶机上80℃空抽干40min胶干后压X光片于-70℃放射自显影,扫描扩增的基因片段。

1.6 统计学分析

使用SPSS10.0软件, 计量资料以均数±标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 对下丘脑、垂体IL-1β的影响

见图1—2。图1、表2显示:老年大鼠下丘脑IL-1βmRNA的表达较青年大鼠高,老年大鼠经过训练后下丘脑IL-1βmRNA的表达与对照组相比没有明显差异。图2、表2显示:在垂体水平老年大鼠IL-1βmRNA的表达较青年大鼠高,但在垂体水平运动老年大鼠IL-1βmRNA的表达与对照组相比有所下降。见表2。

表2 运动训练对老年大鼠下丘脑、垂体IL-1mRNA、IL-6mRNA的影响 (x±s)

组别	鼠数	IL-1βmRNA 密度比		IL-6mRNA 密度比	
		下丘脑	垂体	下丘脑	垂体
青年组	15	0.322±0.045	0.113±0.020	0.056±0.013	0.374±0.027
老年对照组	15	0.540±0.029 ^①	0.310±0.028 ^①	0.125±0.030 ^①	0.350±0.019
老年运动组	15	0.562±0.039	0.212±0.013 ^②	0.076±0.011 ^②	0.360±0.022

①与青年组相比 P<0.01; ②与老年对照组相比 P<0.01

2.2 对下丘脑、垂体IL-6基因表达的影响

见图3—4。图3、表2中显示:老年大鼠下丘脑水平老年大鼠IL-6mRNA的表达较青年大鼠高,老年大鼠经过训练后下丘脑IL-6mRNA的表达与对照组相比有所下降。图4、表2显示:在垂体水平IL-6mRNA的表达与青年大鼠相比没有显著的差别,老年大鼠经过训练后IL-6mRNA的表达与对照组相比没有明显差异。见表2。

3 讨论

近几年的研究发现细胞因子除了作为免疫调节

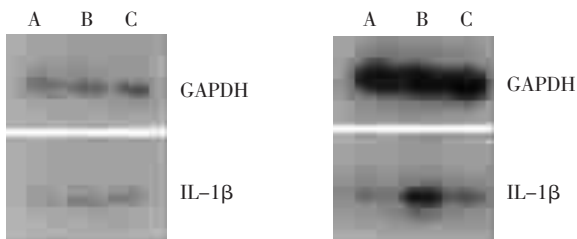


图1 运动训练对老年大鼠下丘脑IL-1βmRNA的影响 A、B、C分别为青年组,老年对照组,老年运动组

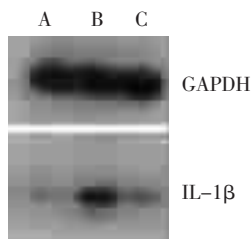


图2 运动训练对老年大鼠垂体IL-1βmRNA的影响 A、B、C分别为老年组,老年对照组,老年运动组

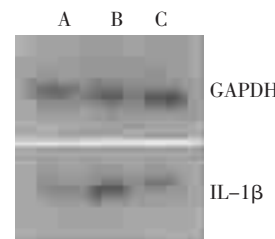


图3 运动训练对老年大鼠下丘脑IL-6mRNA的影响 A、B、C分别为青年组,老年对照组,老年运动组

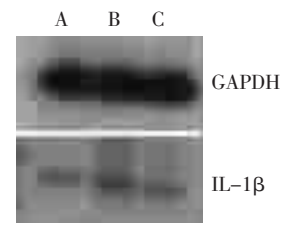


图4 运动训练对老年大鼠垂体IL-6mRNA的影响 A、B、C分别为青年组,老年对照组,老年运动组

物外还可以作用到神经内分泌系统影响全身各系统功能。目前认为 IL-1, 特别是 IL-1 的 β 亚型是免疫系统和 HPA 轴重要的信使物质^[6]。有学者研究表明如果预先用 CRH 的抗体处理动物则可阻止 IL-1 引起的 ACTH 升高。这表面 IL-1 能刺激下丘脑 CRH 神经元合成和释放 CRH 而激活 HPA 轴。前列腺素 PG 对 IL-1 引起的 CRH 分泌这一过程有介导作用, 用前列腺素合成抑制剂处理动物可以阻止 IL-1 引起的 CRH 分泌的增加^[7]。

通过体内外的实验也证明了 IL-6 对 HPA 轴有激活作用, 而且发现在机体急性期反应中, IL-6 与糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 有协同效应, 因而认为 IL-6 促进 CRH 释放, 从而使 ACTH 释放构成了急性期的正反馈环路^[8]。IL-1、IL-6 的生成具有复杂的调控机制, 生理情况下血清中不能够测出, 但随着年龄的增长, 即使在无炎症刺激的情况下血清中也能测出高水平的 IL-1、IL-6。也有研究表明, 老年人外周血单核细胞数量及 IL-1、IL-6 的自发分泌能力与年轻人比较并无明显差异, 但经丝裂原刺激后分泌水平明显提高。动物实验也发现, 正常的 BALB/C 小鼠血清细胞因子随年龄而增加, 且在整个生命过程中呈持续增高^[9-10]。

应用 RT-PCR 检测老年大鼠不同脑区细胞因子的表达, 目前这方面的报道非常少, 有学者研究发现, 老年大鼠垂体 IL-1 β 表达明显高于青年大鼠, 而在下丘脑的表达与年轻组相比无明显差异^[11]。目前研究发现 IL-1、IL-6 主要在两个部位作用于 HPA 轴, 一是作用于下丘脑刺激 CRH 分泌, 这一作用发生在早期, 另一种是在垂体水平的作用, 但后一种观点仍有争议。我们的研究发现, 在下丘脑 IL-1 和 IL-6 表达量, 老年大鼠与青年相比明显升高, 在垂体水平老年大鼠 IL-1 β mRNA 水平明显高于青年组大鼠, 而 IL-6mRNA 变化不明显。这一结果提示: 老年大鼠部分脑区神经细胞处于“激发状态”, 在炎症等条件刺激下其反应较年轻大鼠更为强烈。

目前研究普遍认为, 长时间中低强度有规律的运动有助于减缓年龄相关的功能的衰退以及加强机体自身对外界病毒的抵抗作用, 研究表明, 长时间有规律运动能增加老年小鼠神经细胞的可塑性^[12]。我们还首次报道运动训练降低老年机体下丘脑-垂体-肾上腺的活性, 从而提高机体免疫功能^[3]。由于

免疫递质(细胞因子)与 HPA 轴的关系密切, 故本研究进一步观察运动训练对神经系统中细胞因子的影响, 在实验中我们首次观察到 3 个月的游泳训练对老年大鼠下丘脑 IL-1 β mRNA、垂体 IL-6mRNA 水平作用不明显, 而对老年大鼠下丘脑 IL-6mRNA、垂体 IL-1 β mRNA 的水平有显著的调节作用。这一结果表明, 运动可以抑制老年大鼠脑组织中细胞因子的基因表达水平, 降低老年期神经细胞对炎症的反应性, 有利于下丘脑-垂体-肾上腺轴正常作用。这可能是运动抗衰老, 加强机体免疫作用的主要机制之一。

参考文献

- [1] 杨宏, 鞠躬. 细胞因子与下丘脑-垂体-肾上腺轴[J]. 神经解剖杂志, 1996, 12(1): 70-74.
- [2] Calza L, Pozza M, Coraddu F, et al. Hormonal influences on brain aging quality focus on corticotrophin releasing hormone - vasopressin and oxytocin - immunoreactive neurons in human brain[J]. J of Neural Transmission, 1997, 104: 1095-1100.
- [3] 赖红梅, 许豪文, 万平. 运动训练对老年大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[C]. 体育科学报告会. 北京. 2002.
- [4] Nishida T, Hirato T, Nishino N. Cloning of the cDNAs for rat interleukin -1 and IN: Monokines and other non -lymphocyte cytokines[M]. Liss, 1988. 73-78.
- [5] Shirai T, Shimizu N, Horiguchi S, et al. Cloning and expression in escherichia coil of the gene for rat tumor necrosis factor[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 1733-1736.
- [6] Dun AJ, Chuluyan HE. The role of cyclo-oxygenase and lipoxigenase in the interleukin-1 induced activation of the HPA axis: Dependence on the route of injection [J]. Life Sci, 1992, 51: 219-225.
- [7] Crassock D, Thomas A. Cytokines and late-life depression[J]. Essent Psychopharmacol, 2006, 7(1): 42-52.
- [8] Franchini A, Ottaviani E. IL-6 immunoreactivity changes during aging in the polychaete *Ophryotrocha labronica* (Polychaeta: Dorvilleidae) [J]. Tiaaue Cell, 2007, 39(1): 27-34.
- [9] 韩易, 拓西平. 老年大鼠总抗氧化能力与白介素-6 及诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的相关性研究 [J]. 上海医学, 2003, 26(5): 341-344.
- [10] 倪晶晶, 吴仲敏, 凌树才. 苦参碱注射液对老年痴呆模型大鼠脑组织白细胞介素 1 含量及海马神经元超微结构的影响[J]. 解剖学杂志, 2006, 29(5): 608-611.
- [11] 黄诚, 陈汉平, 秦秀娣. 针刺抑制老年大鼠脑与垂体细胞因子基因表达[J]. 针刺研究, 2000, 1: 24-26.
- [12] 郭健, 刘辉. 应激与衰老的机制研究进展[J]. 国外医学·老年学分册, 2004, 25(3): 112-115.