

·基础研究·

高压氧对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织小窝蛋白-1、基质金属蛋白酶-9表达的影响*

赵红¹ 张倩茹¹ 卢晓梅² 张海鹏² 陈学新³

摘要

目的:研究高压氧(HBO)对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织小窝蛋白-1(Cav-1)、MMP-9表达的影响。

方法:雄性Wistar大鼠,随机分成假手术组、脑缺血再灌注组(IR)、IR+HBO、HBO组。复制局灶性脑缺血再灌注模型。HBO和IR+HBO组经0.25MPa HBO治疗5次。采用比色法、免疫组化法及Western印迹法检测血脑屏障的通透性和Cav-1、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白的表达。

结果:IR组第4、12、24、48、72小时脑组织伊文思蓝(EB)的含量与第0小时组相比明显增加,再灌注后第4小时EB的含量最高。IR+HBO组脑组织EB的含量明显低于IR组。IR组第4、12、24、48、72小时Cav-1、MMP-9蛋白表达明显高于0小时组。IR+HBO组与IR组相比脑组织Cav-1、MMP-9蛋白表达显著减低。

结论:HBO降低了脑缺血再灌注时增高的脑微血管内皮细胞Cav-1蛋白和MMP-9的表达。这可能是HBO对脑缺血再灌注时血脑屏障通透性起保护作用的机制之一。

关键词 高压氧;脑缺血再灌注;小窝蛋白-1;基质金属蛋白酶-9

中图分类号:R743.3,R459.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-06-0550-05

Effects of hyperbaric oxygen on caveolin-1 and matrix metalloproteinase-9 in brain tissues after cerebral focal ischemia-reperfusion in rats/ZHAO Hong, ZHANG Qianru, LU Xiaomei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(6): 550—554

Abstract

Objective: To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on caveolin-1(Cav-1) and matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in brain tissues after cerebral focal ischemia-reperfusion in rats.

Method: Male Wistar rat were randomly assigned into sham, ischemia-reperfusion (IR), HBO, and IR + HBO groups. On cerebral focal ischemia-reperfusion models, 0.25MPa HBO were applied 5 times, and 2% Evans blue (EB) was injected into tail veins 1h before execution. Expressions of Cav-1 and MMP-9, contents of EB in brain tissues were determined by Western blot technique, immunohistochemistry, and spectrophotometer, respectively.

Result: In IR group, EB content in brain tissues increased significantly compared with 0h, reached its peak at the 4th h($P<0.01$). EB content in IR+HBO group was significantly lower than that in IR group. While expressions of Cav-1 and MMP-9 augmented significantly by IR injury at the 4thh, 12thh, 24thh, 48thh, and 72ndh. Compared to IR group, HBO intervention reduced their corresponding expressions levels.

Conclusion: HBO intervention can reverse the increase of Cav-1 and MMP-9 caused by IR injury, which maybe one of the mechanisms for the protective effect of HBO on the permeability of blood-brain barrier in IR injury.

Author's address College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang, 110001

Key word hyperbaric oxygen; cerebral ischemia-reperfusion; caveolin-1; matrix metalloproteinase-9

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.06.013

*基金项目:辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目(2005L456);辽宁省科技厅博士启动基金资助项目(20101149)

1 中国医科大学基础医学院机能实验中心,沈阳市和平区北二马路92号,110001; 2 中国医科大学基础医学院病理生理教研室; 3 中国医科大学附属第一医院高压氧科

作者简介:赵红,女,教授,博士; 收稿日期:2010-12-21

脑缺血再灌注是严重威胁人类健康的高发的疾病之一,其损伤过程主要是在脑缺血再灌注中伴随着细胞因子,黏附分子的表达,最终导致缺血性损伤向炎症性损伤转变,通过炎症反应导致脑毛细血管内皮细胞及其基底膜损害,破坏血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的完整性,导致BBB的通透性增加^[1-2]。血脑屏障通透性增高是缺血再灌注性脑损伤重要的病理生理基础,并且是脑缺血再灌注早期死亡的主要危险因素之一^[3-4]。因此,研究脑缺血再灌注时血脑屏障通透性的变化,以及可能的保护机制对脑缺血再灌注的治疗具有重要的意义。

高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)作为治疗缺血性脑血管疾病中的一种非创伤性手段在临床上正得以应用^[5-6]。它具有改善组织缺氧,维持细胞能量代谢,减轻脑水肿作用,但HBO在脑缺血再灌注损伤中对血脑屏障的影响研究甚少。

BBB是由毛细血管内皮细胞、基膜(细胞外基质)和星形胶质细胞足突三层结构组成,其主要作用是将中枢神经系统与外界分隔。物质通过BBB的途径一般有两种:细胞旁路和跨细胞途径。在BBB通透性增加的实验研究中,关于紧密连接介导的细胞旁路研究比较多,作用比较肯定,而跨细胞途径方面的研究较少。跨细胞途径主要由内源性的运载体介导,其中caveolae介导的内化途径是经典的跨细胞途径之一^[7]。小窝蛋白-1(caveolin-1, Cav-1)是一种分子量为21—24kDa的整合膜蛋白,是caveolae的主要结构成分和唯一功能载体,是胞膜窝中的标志性分子^[8]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是基质降解代谢的主要酶类,几乎能降解细胞外基质和基底膜的所有成分,其中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在脑缺血再灌注损伤导致BBB通透性的变化起重要的作用^[9]。新近发现, Cav-1与MMP-9在胞膜窝中共定位^[10]。本研究通过复制脑缺血再灌注模型,经HBO治疗5次,旨在探讨HBO对脑缺血再灌注大鼠BBB通透性的影响和可能的相关机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠,3—4月龄,体重为(250 ±

30)g(由中国医科大学动物部提供)。动物随机分为假手术组(60只)、脑缺血再灌注组(180只)、HBO+脑缺血再灌注组(60只)、HBO组(60只)。

1.2 方 法

1.2.1 脑缺血再灌注动物模型的复制:采用大脑中动脉线栓法,大鼠以10%水合氯醛腹腔麻醉,在右侧颈部切开,暴露右侧颈总动脉,分离迷走神经。结扎翼腭动脉和颈外动脉,将末端圆钝的420尼龙丝线依次通过颈外动脉和颈内动脉小心插至大脑前交通动脉,插入约118—210cm,阻塞右侧大脑中动脉,120min后,拔出尼龙线形成再灌注。对照组为假手术组,仅结扎颈外动脉,造成与实验组同样的手术损伤。

1.2.2 实验鼠的HBO处理:HBO组与HBO+脑缺血再灌注组于术后第0、2、9、21、45、69小时进入HBO舱内,待动物进舱后,先用纯氧洗舱10min,使舱内O₂浓度>90%,加压速率为0.0125MPa/min,加压至0.25MPa,在高压氧状态下停留60min,其间用纯氧通气10min。停留毕,以20min匀速减至常压。假手术组与脑缺血再灌注组亦置于舱内,模拟除压力,氧浓度外的类同实验组的其他处理过程和环境条件。

1.2.3 脑组织伊文思蓝(Evans blue, EB)测定:参考Baskawa MK^[3]用甲酰胺测定皮肤EB含量的方法加以改进。在处死动物(60只/组,10只/时间点,无动物死亡)前1h经尾静脉注入2%EB生理盐水(1ml/kg),在摘取脑组织前20min经心脏灌注生理盐水直至流出清亮的液体为准。处死大鼠,在冰盘上取右侧脑组织,用电子天平精确称重,投入中试管中,分别加入3ml甲酰胺,加盖后于45℃水浴箱孵育48h轻轻摇匀,离心15min(3000转/min),取上清液在分光光度计比色($\lambda=632\text{nm}$)。

EB含量=OD × 10³U/g脑组织蛋白

1.2.4 免疫组化检测脑缺血再灌注脑组织微血管内皮细胞Cav-1蛋白的分布和表达变化:大鼠于再灌注后第0、4、12、24、48、72小时(10只/时间点),用水合氯醛麻醉后,沿胸骨左侧剪开胸腔,从左心室灌注预冷生理盐水(10ml/min),无血污后改滴4%多聚甲醛(5—10ml/min),约250ml,断头取脑;取缺血再灌注侧的海马组织在4%多聚甲醛固定24h后,依次放入15%、20%、30%蔗糖溶液中脱水;OTC包埋,冰冻

切片机冠状连续切片,厚度为10 μ m,进行免疫组化染色。免疫组化结果用Motic Images Advanced 3.2图像分析系统采集照片,并进行定量分析。

1.2.5 Western印迹法检测脑缺血再灌注脑组织微血管段 Cav-1、MMP-9蛋白表达的变化(60只/组,10只/时间点):分离脑缺血再灌注脑组织微血管段,加入裂解液后匀浆,4 $^{\circ}$ C,15000g离心15min,制成蛋白质抽提液,取上清20 μ l,用考马斯亮蓝G-250结合法进行蛋白定量;10%SDS-PAGE分离后,转印到硝酸纤维素膜上的Cav-1、MMP-9一抗稀释度均为1:500(Santa Cruz Biotechnology), β -actin抗体的稀释度为1:5000,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;相应二抗室温孵育3h;ECL试剂反应,示出活性的Cav-1、MMP-9位于蓝色背景上的透亮带。采用Chemi Imager 5500 2.03软件扫描胶片,Fluor Chem 2.0图像分析仪对条带积分光密度进行定量分析。

1.3 统计学分析

用SPSS13.0进行统计学处理。组间均数比较用ANOVA进行统计学分析。 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 HBO对脑缺血再灌注大鼠脑组织中EB含量的影响

见表1。脑缺血再灌注组第4、12、24、48、72小时脑组织EB的含量与相应时间假手术组相比明显

增加($P<0.01$),并以再灌注后4h渗出最多。HBO+脑缺血再灌注组于第4、12、24、48、72小时EB渗出明显低于相应时间的脑缺血再灌注组($P<0.05,P<0.01$)。HBO组不同时间EB渗出与相应时间假手术组相比无明显差异($P>0.05$)。

2.2 脑缺血再灌注不同时间脑组织微血管段内皮细胞 Cav-1蛋白表达

见图1。从图中可见,Cav-1蛋白在不同时间脑缺血再灌注组大鼠脑组织中均沿血管呈阳性表达。免疫组化结果显示随着再灌注时间延长Cav-1的表达量增加,与再灌注第0小时组相比,再灌注第4、12、24、48、72小时组Cav-1的表达水平显著增加($P<0.01$),见表2。

2.3 HBO对脑缺血再灌注不同时间脑组织微血管段 Cav-1蛋白表达水平的影响

Western印迹结果显示(表2),Cav-1蛋白的表达变化趋势与免疫组化结果一致,即随着再灌注时间延长Cav-1蛋白表达量增加,与脑缺血再灌注第0小时相比,缺血再灌注第4、12、24、48和72小时组Cav-1蛋白表达水平均显著增加($P<0.01$)。HBO+IR组与IR组相比Cav-1蛋白表达水平均显著下降($P<0.01$)。第72小时HBO组与假手术组相比没有显著差异($P>0.05$)。

2.4 HBO对脑缺血再灌注大鼠脑组织MMP-9蛋白表达变化的影响

Western印迹结果(表2)显示,MMP-9蛋白的

表1 HBO对脑缺血再灌注小鼠不同时间点脑组织中EB含量的影响量级 ($\bar{x}\pm s, U/mg$)

组别	例数	再灌时间					
		第0小时	第4小时	第12小时	第24小时	第48小时	第72小时
假手术组	60	0.1 \pm 0.02	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.02	0.1 \pm 0.02	0.1 \pm 0.02	0.1 \pm 0.02
脑缺血再灌注组	60	0.12 \pm 0.01	1.14 \pm 0.07 ^①	0.78 \pm 0.06 ^①	0.61 \pm 0.06 ^①	0.52 \pm 0.05 ^①	0.38 \pm 0.06 ^①
HBO组	60	0.11 \pm 0.01	0.1 \pm 0.02 ^②	0.1 \pm 0.01 ^②	0.1 \pm 0.02 ^②	0.12 \pm 0.01 ^②	0.1 \pm 0.01 ^②
脑缺血再灌注+HBO组	60	0.1 \pm 0.02	0.76 \pm 0.06 ^③	0.63 \pm 0.04 ^③	0.52 \pm 0.04 ^③	0.41 \pm 0.03 ^③	0.21 \pm 0.03 ^③

与同期假手术组比较^① $P<0.01$,^② $P>0.05$; ^③与同期脑缺血再灌注组比较 $P<0.01$

图1 I/R组不同时间脑组织微血管段内皮细胞 Cav-1蛋白表达 (TUNEL染色, $\times 400$)

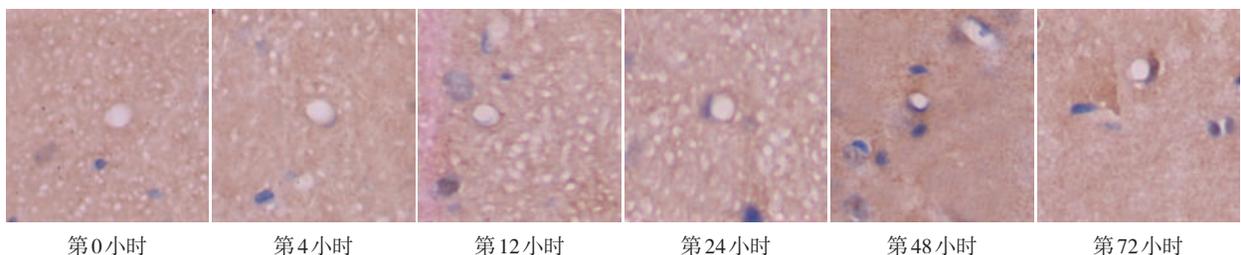


表2 脑缺血再灌注不同时间点大鼠脑组织中 Cav-1 和 MMP-9 蛋白表达的变化及 HBO 对 Cav-1 影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	再灌注时间					
		第0小时	第4小时	第12小时	第24小时	第48小时	第72小时
Cav-1 平均光密度值							
脑缺血再灌注组	60	121.16 ± 3.53	142.34 ± 3.92 ^①	163.91 ± 9.44 ^①	176.56 ± 9.46 ^①	193.66 ± 10.06 ^①	210.23 ± 10.42 ^{①②}
Cav-1 蛋白含量(%)							
假手术组	60	1.72 ± 0.81	1.71 ± 0.72	1.72 ± 0.82	1.71 ± 0.79	1.72 ± 0.81	1.72 ± 0.80
脑缺血再灌注组	60	1.71 ± 0.83	4.22 ± 0.84 ^③	6.31 ± 0.91 ^③	8.51 ± 0.97 ^③	9.71 ± 1.12 ^③	12.16 ± 1.13 ^③
脑缺血再灌注+HBO组	60	1.72 ± 0.82	2.51 ± 0.52 ^④	4.14 ± 0.85 ^④	6.56 ± 0.84 ^④	8.11 ± 0.96 ^④	9.03 ± 1.26 ^④
HBO组	60	1.07 ± 0.80	1.71 ± 0.83 ^⑤	1.71 ± 0.09 ^⑤	1.72 ± 0.81 ^⑤	1.72 ± 0.83 ^⑤	1.71 ± 0.82 ^⑤
MMP-9 蛋白含量(%)	60	86.13 ± 6.12	86.03 ± 5.18	87.56 ± 6.02	89.34 ± 5.19	90.12 ± 6.03	160.21 ± 7.0 ^⑥

①再灌注不同时间与第0小时比较 $P < 0.01$; ②脑缺血再灌注第72小时同第4、12、24、48小时比较 $P < 0.01$; ③再灌注不同时间与相应时间假手术组比较 $P < 0.01$; ④再灌注与相应时间脑缺血再灌注组比较 $P < 0.01$; ⑤与相应时间假手术组比较 $P > 0.05$; ⑥脑缺血再灌注第72小时同第0、4、12、24、48小时比较 $P < 0.01$

表3 高压氧对脑缺血再灌注第72小时大鼠 MMP-9 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MMP-9(%)
假手术组	10	152.43 ± 4.312
脑缺血再灌注组(IR组)	10	187.52 ± 5.224 ^①
脑缺血再灌注+HBO组	10	163.12 ± 5.304 ^②
HBO组	10	159.47 ± 4.104 ^③

①与假手术组比较 $P < 0.01$; ②与IR组比较 $P < 0.01$; ③与假手术组比较 $P > 0.05$

表达变化,缺血再灌注第72小时组 MMP-9 蛋白表达水平显著增加($P < 0.01$)。从表3可见,HBO+IR组第72小时与IR组相比MMP-9蛋白表达水平均显著下降($P < 0.01$)。HBO组与Sham组相比没有显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤导致血脑屏障的开放,在本研究中,建立局灶性脑缺血再灌注模型,经HBO治疗5次,观察HBO对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障通透性变化的影响。发现与对照组再灌注0h相比,再灌注第4、12、24、48、72小时缺血再灌注区脑组织EB含量显著增加;HBO+IR组第4、12、24、48、72小时的EB含量与对照组同时点相比显著下降,HBO组第4、12、24、48、72小时的EB含量与对照组同时点相比无显著差异,研究结果提示,HBO对脑缺血再灌注时血脑屏障通透性具有保护作用。

脑微血管内皮细胞是血脑屏障的重要组成部分,内皮细胞质膜表面含有丰富的内陷囊状结构,即胞膜窖,它们在细胞膜上或平铺,或管状,或形成分离的小泡,并且融合成直径为50—100nm的结构^[11]。Cav-1是胞膜窖的主要结构成分,在内皮细胞

的功能有:跨细胞转运作用,入胞作用,调节内皮组织通透性,致动脉粥样硬化,并参与G-蛋白介导的信号转导等功能。近年来发现,Cav-1与脑功能的生理或病理变化有关,在神经发育、突触可塑性以及神经退行性疾病中起着重要的作用^[12]。但Cav-1在脑缺血再灌注损伤中导致血脑屏障通透性的改变研究的甚少。本实验中,我们利用免疫组织化学及免疫印迹方法观察了Cav-1在不同再灌注时间的变化。结果表明,Cav-1随着缺血再灌注时间的延长,其蛋白表达明显增加,同时伴有血脑屏障通透性的改变,提示Cav-1在缺血再灌注损伤导致血脑屏障通透性增高中起着一定的作用。

MMPs是一组依赖Zn⁺的金属蛋白内切酶家族,可以降解绝大部分细胞外基质成分。MMPs,特别是MMP-9在脑缺血再灌注损伤中的作用尤为重要。本实验观察到MMP-9在脑缺血再灌注72h损伤中表达最高,表明增高的MMP-9可以通过促进缺血再灌注过程中脑组织毛细血管破坏,特别是血脑屏障微血管基底膜的损伤,从而导致缺血再灌注后续发性血脑屏障通透性的改变。

20世纪60年代以来,国内外广泛应用HBO治疗脑血管疾病,取得了显著疗效。其提高血氧分压、增加氧代谢、预防能量衰竭等优势越来越被临床所认可^[13]。为了了解HBO在缺血再灌注损伤对Cav-1、MMP-9蛋白表达的影响,我们对不同时间的HBO及HBO+IR组Cav-1、MMP-9蛋白表达进行了分析。结果发现,高压氧能显著降低缺血再灌注损伤中Cav-1、MMP-9蛋白表达,而对正常的脑组织作用不明显。从而进一步丰富了高压氧在治疗脑血管

疾病中的相关理论。

参考文献

[1] Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 87: 179—197.

[2] Nordal RA, Wong CS. Molecular targets in radiation-induced blood-brain barrier disruption[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 62: 279—287.

[3] Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57: 173—185.

[4] Cucullo L, McAllister MS, Kight K, et al. A new dynamic in vitro model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier[J]. *Brain Res*, 2002, 951: 243—254.

[5] 汪薇,张立新,张志强,等.不同物理因子对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008,23(8): 694—696.

[6] 侯燕芝,陈瑞,于培兰,等.高压氧对急性损伤期全脑缺血再灌注大鼠脑内兴奋性氨基酸水平的影响 [J]. *中国康复医学杂志*,

2006,21(1):38—41.

[7] Shin JS, Abraham SN. Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens[J]. *Immunology*, 2005, 102(1): 2—7.

[8] Frank PG, Woodman SE, Park DS, et al. Caveolin, caveolea, and endothelial cell function[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(7):1161—1168.

[9] Planas AM, Sole S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia[J]. *Neurobiol Dis*, 2001, 8: 834—846.

[10] Romanic AM, White RF, Arleth AJ, et al. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size[J]. *Stroke*, 2003, 29: 1020—1030.

[11] Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins[J]. *Genome Biol*, 2004, 5:214—217.

[12] Gaudreault SB, Blain JF, Gratton JP, et al. A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity[J]. *J Neurochem*, 2005, 102:11319—11324.

[13] 蒋杞英,霍本良.高压氧对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死灶及 bcl-2 蛋白表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006,21(10): 890—892.

(上接第 549 页)

Exp Pathol, 2010, 3(5):472—481.

[8] de Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, et al. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats[J]. *BMC Physiol*, 2008, 8:12.

[9] 裴锡全,林洁如,林文韬,等.低氧暴露对运动性贫血大鼠抗氧化能力的影响[J].*中国组织工程研究与临床康复*, 2007,11(17): 3357—3360.

[10] Bedford TG, Tipion CM, Nilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedure[J]. *J Appl Physiol*, 1979, 47(6):1278—1283.

[11] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见.2006—09—30.

[12] Shepherd RE, Gollnick PD. Oxygen uptake of rats at different work intensities[J]. *Pflugers Arch*, 1976, 362(3):219—222.

[13] Levine BD. VO_{2max} : what do we know, and what do we still need to know?[J]. *J Physiol*, 2008, 586(1):25—34.

[14] 周蔚,陈立军,张敏,等.不同训练负荷条件下SD大鼠运动模型的构建与评价[J].*中国组织工程研究与临床康复*, 2010,14(37): 6899—6903.

[15] Selamoglu Talas Z, Ozdemir I, Yilmaz I, et al. The investigation of the antioxidative properties of the novel synthetic organoselenium compounds in some rat tissues[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008, 233(5):575—579.

[16] Devrim E, Cetin M, Namuslu M, et al. Oxidant stress due to non ionic low osmolar contrast medium in rat kidney[J]. *Indian J Med Res*, 2009, 130(4):433—436.

[17] Mármol F, Sánchez J, López D, et al. Role of oxidative stress and adenosine nucleotides in the liver of aging rats[J]. *Physiol Res*, 2010, 59(4):553—560.

[18] 曹俊,张洪建.运动对糖尿病大鼠脑组织 CuZn-SOD、CAT 和 GSH-Px 活性的影响[J].*昆明医学院学报*, 2009,(4):36—39.

[19] 周庆功,刘伟.VitE 对力竭运动时大鼠肝脑肌肉组织自由基代谢的影响[J].*中国康复医学杂志*, 2007,22(11):1002—1003.

[20] 沙继斌,陈家琦.长期有氧运动对衰老大鼠脂质过氧化水平的研究[J].*山东体育学院学报*, 2001,17(49):32—34.

[21] 廖远朋,金文泉.四物汤对大鼠有氧运动能力影响的研究[J].*四川中医*, 2005,23(5):16—17.

[22] 顾丽燕,张岚,张一民.不同游泳运动对大鼠血清 MDA、SOD、T-AOC 的影响[J].*武汉体育学院学报*, 2004,38(3):28—31.