化学切断交感神经可对抗大鼠应激免疫抑制蛋白的产生

李菊香 邵黎 李怡凡 梅林 范少光

(北京医科大学生理学系, 北京 100083)

摘要 大鼠新生期腹腔注射 6-OHDA, 成年后其血清中去甲肾上腺素含量明显减小. 应激后的大鼠血清对淋巴细胞转化的抑制作用明显减轻, 同一大鼠脾脏和淋巴结匀浆提取物对正常淋巴细胞转化的抑制作用也明显减轻, 血清和淋巴组织对淋巴细胞转化的抑制活性之间有显著的正相关关系. 结果表明, 化学切断交感神经可对抗应激大鼠血清和淋巴组织中应激免疫抑制蛋白的产生.

关键词 应激免疫抑制蛋白 束缚应激 6-羟多巴胺 淋巴细胞转化 高效液相-电化学检测

我们以前的研究发现, 大鼠和小鼠束缚应激后, 血清能在体外抑制 ConA 诱导的正常淋巴细胞转化. 随后证明这种抑制是由一种大分子蛋白质所引起, 简称应激免疫抑制蛋白^[1,2]. 后来证实该蛋白由外周淋巴组织(脾脏、淋巴结、小肠等)中的 T 淋巴细胞产生^[3,4], 其产生受控于中枢神经系统^[1,5,6]. 究竟中枢神经系统通过何种途径实现对应激免疫抑制蛋白生成的调控? 已知中枢神经系统与外周淋巴器官联系主要通过两条途径: 下丘脑-垂体系统产生的激素到达靶器官; 植物性神经系统通过交感和副交感神经对靶器官的支配^[7,8]. 本实验应用化学切除的方法消除交感神经的作用, 探讨交感神经与应激免疫抑制蛋白产生的关系.

1 材料与方法

() 动物和试剂. SD 孕鼠(北京医科大学实验动物中心提供)单个置笼中饲养. 产后 12 h, 调整为每只母鼠喂养 6~8 只乳鼠. 6-羟多巴胺(6-OHDA, 6-hydroxydopamine HBr)为 Sigma 产品, 溶于含 0.1% 抗坏血酸灭菌生理盐水中, 腹腔注射. 溶剂对照组为腹腔注射同容积含抗坏血酸的生理盐水.

() 实验分组和样本制备. 动物随机分为溶剂注射组、6-OHDA 注射组和正常对照组. 分别连续 5 d 注射溶剂、6-OHDA (100 mg/kg/d) 和不做任何处理 ($n=10$). 生长至 56 d 后, 3 组动物分别随机抽出一半给予束缚应激, 应激方法见文献[1], 余者置原饲养笼中不予惊动. 10~16 h 后, 所有动物断头取血, 血液置 4℃ 短暂凝固后, 离心分离血清, 用于儿茶酚胺类递质分析及生物学活性的检测. 脾脏和肠系膜淋巴结取出后迅速称重, 加入 0.05 mol/L 的盐酸 (1g: 10mL) 冰浴中匀浆, 4℃ 离心 ($2\,000 \times g$) 30 min, 取上清液冻干备用. 实验时以不完全 RPMI 1640 培养液(不含小牛血清)原体积复溶后, 依不同稀释度加入淋巴细胞培养液中, 检查其生物学活性.

() 淋巴细胞转化. 取同系正常 SD 大鼠淋巴结制成淋巴细胞悬液, 细胞浓度 1.5×10^6 /mL, ConA 浓度为 2 μ g/mL, 样本每稀释度三复孔, 置 95% 空气和 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 结束培养前 6 h 加入 ³H-TdR (7.4 kBq/孔), 用 β 计数器测定放射活性, 以 cpm 值表示.

1) Fan S G, Huang Q J. T lymphocyte generates an immune suppressive protein induced by stress (未发表)

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-16-1744>

() 血清儿茶酚胺类递质的含量测定. 取 0.5 mL 的血清置入 1.5 mL 离心管中, 加入 20 mg 酸性氧化铝, 10 μ L DHBA (3, 4-dehydroxybenzylamine, 100 μ g/mL) 做内标物, 以 250 μ L Tris-HCl (pH= 8.7) 和 25 μ L 10% EDTA 进行萃取, 方法参考文献[9]. 萃取液置进样阀中用高效液相层析-电化学检测器(HPLC-ED) 测定儿茶酚胺递质含量. 根据峰面积以内标对比法计算含量.

() 统计分析. 所有数据(均数 $\pm$ 标准误) 以方差分析处理, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 注射 6-OHDA 对血清去甲肾上腺素(NE) 含量的影响

测定血清中 NE 含量的变化, 作为交感神经切除效果的判定^[10]. 注射 6-OHDA 后安静时血清中 NE 含量降低, 与正常不注射 6-OHDA 组相比, 差别显著 ($P < 0.05$, ANOVA, $n = 5$). 注射 6-OHDA 再加应激, 动物血 NE 含量没有明显增高, 仍保持在低水平, 与不应激大鼠(注射 6-OHDA) 血清中 NE 含量之间的差别无统计学意义 ($P < 0.05$, ANOVA, $n = 5$). 不注射 6-OHDA 的动物在应激后血中 NE 含量明显增加. 这些结果从不同侧面说明注射 6-OHDA 后, 交感神经的作用已被去除(图 1).

图 1 腹腔注射 6-OHDA 对血清中 NE 含量的影响

* 示 6-OHDA 注射组基础水平与对照组基础水平相比 $P < 0.05$; + 示对照组应激与基础水平相比 $P < 0.05$; ## 示 6-OHDA 注射组应激与基础水平相比 $P < 0.01$. $n = 5$

2.2 注射 6-OHDA 对血清中应激免疫抑制蛋白产生的影响

在淋巴细胞培养液中加入不同稀释度应激

动物和对照动物的血清, 观察对淋巴细胞转化的影响, 从而反映血中应激免疫抑制蛋白的含量. 结果表明血清在不同稀释度时, 正常对照组和溶剂注射组的不应激组和应激大鼠相比(图 2 中 a, b 和 c, d), 淋巴细胞转化受到明显的抑制, 说明应激可增加血中应激免疫抑制蛋白的含量, 且溶剂注射不影响动物的反应. 6-OHDA 注射组不应激和应激大鼠(图 2 中 e 和 f) 相比对淋巴细胞转化的抑制程度明显减轻, 说明 6-OHDA 注射后有对抗应激免疫抑制蛋白产生的作用. 此外, 比较 3 组中的不应激组(图 2 中 a, c 和 e), 它们之间无显著差异, 说明注射 6-OHDA 对安静动物没有明显影响.

2.3 6-OHDA 对脾脏和肠系膜淋巴结中应激免疫抑制蛋白产生的影响

正常对照组和溶剂对照组在应激后与不应激相比, 在淋巴细胞培养液中脾脏和淋巴结提取物对淋巴细胞转化有明显的抑制作用(图 3 中 a~ d 和 g~ j), 说明应激可使脾脏和淋巴结中应激免疫抑制蛋白含量升高. 注射 6-OHDA 后, 应激动物脾脏和淋巴结提取物对淋巴细胞转化的抑制作用几乎消失(图 3 中 e, f, k, l), 说明注射 6-OHDA 可使脾脏和淋巴结中应激免疫抑制蛋白明显减少. 对比不应激动物脾脏和淋巴结的提取物, 正常对照、溶剂注射和 6-OHDA 注射 3 组动物(图 3 中 a, c, e 和 g, i, k), 对淋巴细胞转化的作用没有明显差别, 说明注射 6-OHDA 对安静动物脾脏和淋巴结中应激免疫抑制蛋白的产生没有明显影响.

为了进一步分析应激后血清和组织提取物抑制淋巴细胞转化之间的关系, 分别以淋巴结

图2 化学切除交感神经对大鼠血清淋巴细胞转化(cpm 值)的影响

a——正常对照; b——正常对照+ 应激; c——溶剂注射对照; d——溶剂注射+ 应激; e——6-OHDA 注射对照; f——6-OHDA 注射+ 应激. * 为 a, c, e 和 b, d, f 相比; + 为 b, d 和 f 相比. * 和+ 示 $P < 0.05$, ** 和++ 示 $P < 0.01$, *** 示 $P < 0.001$. $n = 5$

提取物或脾脏提取物实验的 cpm 值为 x_1 和 x_2 , 两组实验相应动物血清的 cpm 值为 y_1 和 y_2 , 计算回归方程和相关系数. 结果表明, 它们之间有正相关关系. 淋巴结和血清之间的回归方程为 $y_1 = 0.7389x_1 + 9668$, 相关系数为 0.6877 ($n = 20$, $P < 0.01$); 脾脏和血清之间的回归方程为 $y_2 = 0.978x_2 + 8473$, 相关系数为 0.7677 ($n = 20$, $P < 0.01$). 这一结果与我们以前的结果相同, 从一个侧面提示血清中的抑制作用可能来源于淋巴结和脾脏.

图3 化学切除交感神经对脾脏和淋巴结提取物抑制淋巴细胞转化的影响

结果取自提取物为 1:160 稀释度时的 cpm 值. a 和 g 为正常对照; b 和 h 为正常对照应激; c 和 i 为溶剂注射对照; d 和 j 为溶剂注射应激; e 和 k 为 6-OHDA 注射对照; f 和 l 为 6-OHDA 注射应激. *** 示 $P < 0.001$ (b (h), d(j), f(l) 与 a(g), c(i), e(k) 相比). $n = 5$

3 讨论

支配外周淋巴器官的植物性神经系统主要是交感神经系统, 其释放的神经递质为 NE. 已有研究证明免疫细胞上存在肾上腺素能受体, 交感神经释放的 NE 可影响淋巴器官的发育和免疫反应, 例如 T, B 淋巴细胞的分化和抗体形成等^[7,8]. 本实验注射交感神经化学切断剂 6-OHDA 后, 血清中 NE 含量显著减少. 而血清中 NE 含量可反映外周交感神经活动的变化^[8], 说明本工作中注射 6-OHDA 已经发挥切断外周交感神经的作用. 在切断交感神经后血清及组织中应激免疫抑制蛋白产生减少, 说明交感神经活动介导了该蛋白的产生, 也再次提示血清中的应激

免疫抑制蛋白来源于外周淋巴组织.

我们在研究中也测定了血清中肾上腺素和多巴胺的含量. 在使用 6-OHDA 后, 血中肾上腺素的含量没有明显变化. 血中 DA 含量较低, 使用 6-OHDA 后也未见明显变化, 这些均与文献报道一致^[11].

由于本工作持续的时间较长(8周), 注射 6-OHDA 后, 可能对动物的一般状况有影响, 从而间接影响动物对应激的反应. 为此我们观察了动物的体重、行为及脾脏和淋巴结的重量. 结果表明动物在注射 6-OHDA 后的前5天内体重减轻, 随后有恢复. 在第8周后动物的行为、体重、脾脏和淋巴结的重量等与正常对照无差别, 说明动物的一般状态良好. 这一结果也与文献^[11]报道相同.

为了进一步检验注射 6-OHDA 后 6-OHDA 本身是否因其他作用导致对应激免疫抑制蛋白生成的抑制, 我们曾在成年鼠的研究中腹腔注射去甲丙咪嗪, 阻断交感神经对 6-OHDA 的重吸收, 从而消除其对交感神经的毒性作用. 结果表明 6-OHDA 注射后不再抑制应激免疫抑制蛋白的生成(待发表). 说明 6-OHDA 的作用是通过破坏交感神经而实现的.

化学切除交感神经的作用后, 为什么动物的行为等未见明显异常, 有哪些代偿机制出现等问题目前还不了解. 有可能在应激等环境条件改变时, 这一缺损的后果方能表现. 我们实验中抑制应激免疫抑制蛋白的产生可能就是其中的一种表现.

本工作证明去交感后应激免疫抑制蛋白的产生明显减少, 说明外周交感神经介导了应激免疫抑制蛋白的产生. 近来我们应用应激免疫抑制蛋白的单克隆抗体对很多组织和细胞做了免疫组织化学的研究, 证明这一蛋白是由 T 淋巴细胞产生(待发表). 因此, 综合目前我们已有的研究结果可以认为, 应激免疫抑制蛋白是在应激条件下, 由中枢神经系统通过交感神经作用于 T 淋巴细胞产生的. 根据这一思路, 是否可能还有另一些调节蛋白在 T 细胞中产生, 目前我们正在做这方面的进一步研究. 此外, 关于去交感后应激免疫抑制蛋白减少的机制, 我们的离体实验结果表明, 在体外培养的淋巴细胞中, 去甲肾上腺素在浓度为 10^{-4} mmol/L 时具有促进应激免疫抑制蛋白生成的作用(待发表). 因此, 去甲肾上腺素可能介导了体内交感神经的作用. 已知交感神经末梢可与很多其他递质共存, 如神经肽 Y、脑啡肽等, 这些共存递质是否也参与调节, 还有待进一步研究.

致谢 本工作的单胺类 HPLC 测定工作, 得到了北京医科大学药学院分析化学教研室夏桂珠教授的热情指导和帮助, 在此表示深切的谢意. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39770240)、卫生部科研基金、国家“攀登”计划资助项目.

参 考 文 献

- 1 范少光, 查宏斌, 李小蕊, 等. 束缚应激小鼠血清中产生的免疫因子及其调节. 科学通报, 1989, 34(20): 1584~ 1587
- 2 黄庆军, 蒋 灿, 范少光. 应激免疫抑制蛋白在血清中的作用时间. 科学通报, 1998, 43(12): 1411~ 1412
- 3 邵 黎, 高 珊, 孙长伟, 等. 束缚应激能引起淋巴结及脾脏细胞产生抑制淋巴细胞转化的因子. 科学通报, 1995, 40(2): 164~ 166
- 4 黄庆军, 周先锁, 范少光. 应激大鼠肠壁提取物对淋巴细胞转化的影响. 科学通报, 1998, 43: 1504~ 1506
- 5 Zuo Y C, Li Y F, Shao L, et al. Interleukin 1 in the brain is involved in generation of the serum suppressive factor induced by restraint stress in mice. Neuroimmunomodulation, 1995, 4(2): 82~ 87
- 6 汪静雪, 梅 林, 范少光. GABA 能神经元对抗束缚应激后淋巴细胞转化抑制因子的产生. 应用生理学杂志, 1992, 8: <https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-16-1744>

102~ 124

- 7 Felten S Y. The role of the sympathetic nervous system in the modulation of immune response. *Adv Pharmacol*, 1998, 42: 583~ 587
- 8 Livnat S, Felten S Y. Involvement of peripheral and central catecholamine systems in neural-immune interactions. *J Neuroimmunol*, 1985, 10: 5~ 30
- 9 Toleikis P M, Godin D V. Alteration of antioxidant status following sympathectomy: differential effects of modified plasma levels of adrenaline and noradrenaline. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1995, 152: 39~ 49
- 10 Gregory C. Strategies for determination of serum or plasma norepinephrine by reverse-phase liquid chromatography. *Anal Chem*, 1981, 53: 156~ 159
- 11 Ackerman K D, Madden, K S, Livnat S, et al. Neonatal sympathetic denervation alters the development of *in vitro* spleen cell proliferation and differentiation. *Brain Behavior and Immunity*, 1991, 5: 235~ 261

(1998-12-17 收稿, 1999-04-01 收修改稿)

短杆菌肽 A 在双层磷脂相变过程中荧光猝灭的反常行为 ——是否存在电子转移反转区?

乐加昌 李彦萍^④ 苏雅娴^④ 林克椿^④

(中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; ④北京医科大学基础医学院生物物理系, 北京 100083)

摘要 脂双层中的短杆菌肽 A (GA) 荧光可以被竹红菌乙素 (HB) 猝灭. 当磷脂从凝胶相转变为液晶相时猝灭反应速率反而降低, 用传统荧光猝灭理论无法解释相变过程中的这一反常荧光猝灭现象. 用 Marcus 光诱导电子转移理论进行分析, 获得了较好的符合.

关键词 荧光猝灭 竹红菌乙素 (HB) Marcus 理论

荧光猝灭技术已广泛地用于研究蛋白质(包括膜蛋白)的结构、功能及动力学过程. 蛋白质中的色氨酸基团发出的荧光能被中性猝灭剂所猝灭, 如丙烯酰胺和分子氧. 丙烯酰胺作为溶液猝灭剂已应用多年, 而分子氧被用于膜内只是近几年才刚刚开始, 由于它是一种气体分子, 需要特殊装置才能使用^[1]. 为此我们提出了竹红菌乙素 (HB, 分子式 $C_{30}H_{24}O_9$) 作为膜体系荧光猝灭剂^[3], 到目前为止, 已有几个研究小组利用 HB 作为膜蛋白质荧光猝灭剂, 并得到了许多有意义的结果^[2~4].

随之而来的问题是, 在膜体系脂相变过程中荧光猝灭会发生什么变化? 按照荧光碰撞猝灭理论, 猝灭反应速率将主要取决于体系中微环境的粘度. 当脂从凝胶相转变到液晶相时, 膜体系的粘度减小, 将导致膜体系流动性增加, 此过程中猝灭反应速率应上升. 但是, 我们的实验结果正与预期相反. 对于这一非正常现象我们试用多种光谱方法进行了验证, 然而所有的结果都无法用传统荧光猝灭理论来解释. 对此我们试用 Marcus 电子转移能量反转区的理论^[8]来解释, 获得了较好的符合. 本工作为证明“电子转移过程在膜体系中存在反转区的可能性”提供了实验依据.