

低氧对新生大鼠脾单个核细胞DNA合成及转化的影响*

白海波¹ 杜继曾^{1,2} 贾红卫¹

(¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²浙江大学生命科学与技术系)

摘要 本研究以荧光法测定脾单个核细胞DNA合成及MTT比色法测定的脾单个核细胞对Con A的增殖反应, 观察模拟高原低氧对出生后14天大鼠上述两指标的影响, 同时也观察了交感神经和副交感神经的活动状态, 以初步探讨低氧对上述两指标的作用是如何介导的。结果表明: 5km海拔高度低氧作用24h不抑制脾单个细胞DNA合成及脾单个核细胞转化, 而作用5天时则抑制DNA合成及脾单个核细胞转化, 分别为对照组的56.6% ($P < 0.01$) 和86.8% ($P < 0.05$); 7km海拔高度低氧作用24h, DNA合成及脾单个核细胞转化均受抑制, 分别为对照组的61.0% ($P < 0.01$) 和81.2% ($P < 0.01$); 7km海拔24h低氧导致脾脏中乙酰胆碱下降, 儿茶酚胺升高; 用DSP-4中枢药理性损毁NE神经元, 可使脾单个核细胞DNA合成的抑制程度减弱, 脾脏中儿茶酚胺含量下降。这些结果表明低氧可抑制新生大鼠脾单个核细胞的DNA合成及转化, 并可能与交感神经兴奋及副交感神经抑制有关。

关键词 低氧 新生大鼠 DNA合成 脾单个核细胞 增殖 乙酰胆碱 儿茶酚胺

* 应激对免疫系统的影响倍受人们重视, 动物实验及人体观察证实, 应激对免疫的影响主要是抑制性的, 我们以前的实验也发现低氧对成年大鼠的细胞免疫具抑制作用, 但低氧对新生大鼠的细胞免疫是否也有抑制作用还未见报道, 本研究对此进行了观察。由于应激通过神经内分泌系统的作用影响机体的免疫功能, 而应激时神经内分泌系统的最主要的反应之一是交感神经兴奋儿茶酚胺分泌增多。因而我们同时也观察了低氧对脾脏儿茶酚胺及乙酰胆碱水平的影响, 以及使用NE神经元损毁药DSP-4对脾单个核细胞DNA合成的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 Wistar大鼠仔鼠, 出生后14d, 雌雄不拘, 由本所实验动物室提供。

1.2 主要试剂 RPMI1640购自美国生命技术公司, Con A、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)、N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4)、4, 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 均为Sigma公司产品, 1, 2-diphenylethylenediamine (DPE) 为瑞士Fulka产品。

1.3 低氧模拟 仔鼠随机分为三组: 2.3km对照组(西宁海拔高度), 5km, 7km海拔组。每组8只, 连同母鼠一起放入低气压舱, 由母鼠哺乳, 低氧作用24h及5d后, 取脾脏。

1.4 脾脏DNA含量测定 脾脏研磨过筛制成细胞悬液, 用生理盐水洗2次, 经稀释调细胞浓度为

2×10^6 cell/ml, 离心收集细胞沉淀, 加入0.25mg/ml SDS 0.1ml, 37-30min, 取10 μ l加入2.5ml含400ng/ml DAPI缓冲液(100mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris pH7.0)中使用岛津RF-540荧光分光光度计, 在激发波长450nm, 发射波长360nm, 狭缝10nm条件下测定荧光值。

1.5 脾脏淋巴细胞转化 无菌取脾, 用RPMI 1640液制成 2×10^6 cell/ml悬液, 台盼蓝排除法检查细胞存活率大于95%, 每孔0.1ml, 种入96孔板, 再加入含Con A (5 μ g/ml)的营养液0.1ml, 5% CO₂饱和湿度48h培养, 结束前4h加0.25mg/ml的MTT 10 μ l/well, 4h后加二甲亚砜0.1ml/well, 使用Model 450酶标读数仪(Bio-Rad)在检测波长570nm处测定OD值。

1.6 脾脏儿茶酚胺水平测定 参照文献^[1]采用荧光分光光度法测定。简述之, 脾脏研磨制成细胞悬液, 用0.2mol/L高氯酸匀浆10000g离心6min, 上清加入1.0mol/L K₂CO₃中和, 取上清0.3ml加入20 μ l 20mmol/L铁氰化钾和100 μ l 20g/ml的DPE40反应2h, 冰浴终止反应, 使用岛津RF-540荧光分光光度计, 在发射波长345nm, 激发波长485nm, 狭缝10nm条件下测定。

1.7 脾脏乙酰胆碱水平测定 脾脏用1.54mmol/L毒扁豆碱水匀浆, 加1.84mol/L三氯乙酸0.2ml 5000 \times g离心15min, 取上清液参照文献^[2]测定。

* 国家自然科学基金资助项目(.39470277)

1996-6-10收稿 1996-12-9修回

1.8 数据处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学处理用非配对计量资料的 *t* 检验和单因子方差分析, 多重比较采用Duncan 检验。方差齐性较差的数据经Log 转换。

2 结果

2.1 低氧对新生大鼠脾单个核细胞DNA 含量的影响 新生大鼠 5km 海拔受低氧作用 24h, 不抑制脾单个核细胞DNA 合成, 对照与 5km 组DNA 测定荧光值分别为 58.05 ± 10.57 和 53.37 ± 7.43 ($P > 0.05$)。新生大鼠另设组进行低氧实验, 发现 5km 缺氧 5 天后, 脾单个核细胞DNA 含量比对照下降 43.3% ($P < 0.01$); 7km 海拔低氧作用 24h, 抑制脾单个核DNA 合成, 其含量为对照的 61.0% ($P < 0.01$) (图 1)。

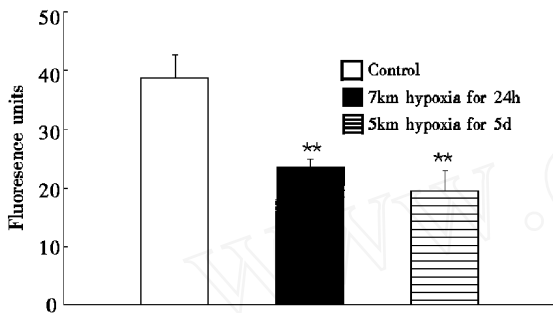


Fig. 1 The inhibitory effect of hypoxia on DNA synthesis of spleen in neonatal rats

* $P < 0.01$ vs control $\bar{x} \pm s$, $n = 8$

2.2 低氧对新生大鼠脾单个核细胞转化的影响

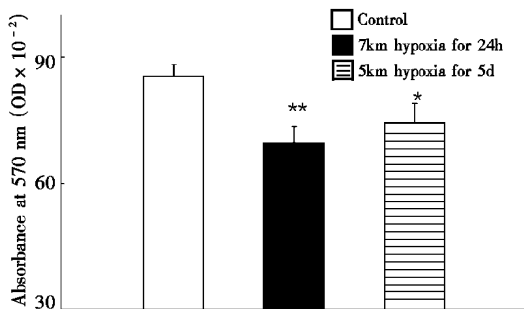


Fig. 2 The inhibitory effect of hypoxia on lymphocyte proliferation of spleen in neonatal rats

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control $\bar{x} \pm s$, $n = 8$

新生大鼠 5km 海拔低氧作用 5d 和 7km 低氧作用 24h, 与对照组比, 脾单个核细胞对 Con A 的增殖反应分别下降 13.2% ($P < 0.05$) 和 18.8% ($P < 0.01$) (图 2)。

2.3 低氧对新生大鼠脑室注射DSP-4 后脾单个核

细胞DNA 含量的影响: 新生大鼠侧脑室注入DSP-4 ($40\mu\text{g}/\text{rat}$) 1d 后, 7km 海拔低氧 24h, 与注生理盐水低氧组比, 低氧对脾单个核细胞DNA 合成的抑制则减弱 (图 3)。

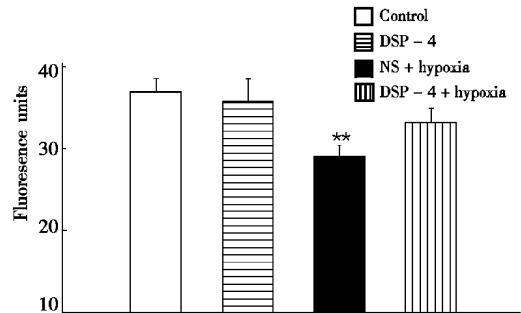


Fig. 3 Effect of hypoxia on DNA content of spleen.

* $P < 0.01$ vs control $\bar{x} \pm s$, $n = 8$

2.4 低氧对脾脏儿茶酚胺及乙酰胆碱含量的影响

7km 海拔低氧 24h, 与对照组相比, 脾脏中乙酰胆碱水平明显下降, 而儿茶酚胺水平则增加, 表明 7km 低氧激活交感神经, 而副交感神经受抑制 (图 4)。

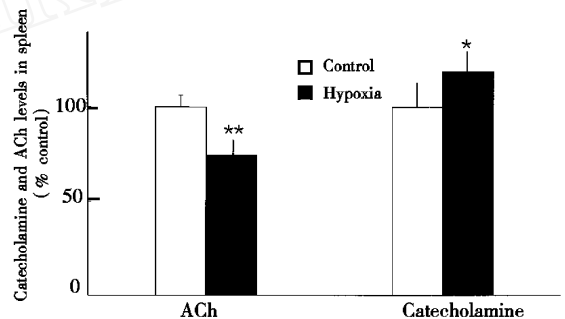


Fig. 4 Effect of hypoxia on catecholamine and ACh levels in spleen of neonatal rats

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control $\bar{x} \pm s$, $n = 8$

3 讨论

免疫器官具有神经支配是久已周知的事实, 交感和副交感神经纤维末梢在支配部位分别释放NE 和ACh, 以突触和旁分泌的方式影响免疫功能, 这种影响至少涉及血流调控, 淋巴细胞的分化、发育、成熟、移行及再循环; 细胞因子或其他免疫因子的生成和分泌; 免疫应答的强弱及维持的时间等。一般认为交感神经兴奋可减弱免疫机能, 而副交感神经兴奋则作用相反。本研究主要观察低氧对生后 14 天大鼠脾单个核细胞DNA 含量及对 Con A 增殖反应的影响, 以探讨低氧是否影响了免疫细胞的发育和功能以及可能的调节机制。发现 7km 低氧作用 24h 后, 脾单个核细胞转化及DNA 含量均下降, 相

比之下, 5km 组受到的影响较小, 而 5km 组低氧 5 天后脾单个核细胞转化及 DNA 含量则下降, 说明在严峻的或较长的低氧环境中, 新生大鼠的免疫功能受到抑制性影响, 在检测脾脏中儿茶酚胺、ACh 含量时发现低氧 24h 时, 低氧组儿茶酚胺增加, 而低氧组 ACh 水平明显低于对照组。本结果提示低氧对免疫的抑制作用可能与交感神经兴奋副交感神经抑制有关。有许多实验支持这种推测, 如大鼠在出生时切断交感神经, 当发育到第 10 天时胸腺细胞对 L-2 的反应能力增强; 新生动物整体给予 6-羟多巴胺选择性破坏外周交感神经, 结果 T 细胞非依赖性抗原刺激引起的免疫应答增强^[3]; 儿茶酚胺可通过 β 肾上腺能受体抑制 NK 细胞活性^[4] 乙酰胆碱通过 M 受体促进胸腺细胞 DNA 合成^[5]; 乙酰胆碱提高 T 细胞的细胞毒活性等^[6]。

为进一步探讨交感神经系统对脾单个核细胞的作用, 我们使用了 NE 神经元损毁药 DSP-4 损毁中枢 NE 神经元后观察低氧对脾单个核细胞 DNA 含量的影响。结果显示未损毁组 DNA 合成仍受低氧抑制, 而损毁组未显示低氧对脾单个核细胞 DNA 合成的抑制作用, 此观察提示中枢交感神经参与低氧下对脾单个核细胞 DNA 合成的调节。其它一些实验也表明, 激活中枢交感神经系统可降低细胞免疫功能^[7], 外周免疫反应达高峰时, 下丘脑内 NE 含量及代谢更新率降低最为明显。这些实验结合我们的观察提示交感神经活动减少可解除其对细胞免疫的抑制作用。但我们的观察从方法学角度考虑, 中枢损毁常殃及许多结构和通路, 效应的发生途径及机制不易搞清。

新生大鼠 5km 低氧暴露 5d 脾淋巴细胞转化及 DNA 含量均下降, 造成此种免疫抑制现象的部分原因尚不能排除是由于低氧影响了母鼠摄食能力, 产乳量降低, 进而使幼鼠摄取减少或者低氧直接降低

了幼鼠对食物的摄取、消化、吸收及代谢能力。本室以前工作证明, 低氧影响幼鼠肝物质代谢功能^[8]。本实验也发现低氧 5d 后体重低于同龄对照组。

4 参考文献

1. Mitsui A, Nohta H, Ohkura, Y. High performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1, 2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J Chromatogr* 1985; 344: 61-70
2. 鲁祖赫, 叶菲, 都本业. 碱性羟胺比色法测定全血乙酰胆碱. *临床检验杂志* 1992; 10: 85
3. Felten D L, Felten S Y, Bellinger S L, et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 1987; 100: 225-260
4. Hellstrand K S, Hemodsson Strannegard O. Evidence for a beta-adrenoceptor-mediated regulation of human natural killer cell. *J Immunol* 1985; 134: 4095-4099
5. Tomiyama K, Hato F, Kinoshita Y, et al. Enhancement of DNA synthesis in rat thymocytes by stimulating their muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Mol Biol* 1992; 38: 815-822
6. Strom T B, Sytkowski A J, Carpenter C B, et al. Cholinergic augmentation of lymphocyte-mediated cytotoxicity. A study of the cholinergic receptor of cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1330-1333
7. Irwin M, Richard L H, Brown M et al. CRF activates autonomic nervous system and reduces natural killer cytotoxicity. *Am J Physiol* 1988; 255: R744-R747
8. 尤治秉, 李庆芬, 陈晓光等. 不同发育年龄大鼠肝细胞及其溶酶体对急性低氧的应答. *中国应用生理学杂志* 1989; 5: 15-21

EFFECT OF HYPOXIA ON SPLEEN MONO NUCLEAR CELL DNA CONTENT AND PROLIFERATION OF NEONATAL RATS

Bai Haibo¹, Du Jizeng^{1,2}, Jia Hongwei¹

(¹Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; ²Department of Biological Science and Technology)

ABSTRACT

Effects of hypoxia on the immune function of neonatal rats at the age of 14 days as well as on the levels of ACh, catecholamine in spleen were studied. After the animals were exposed to hypoxia at 5km simu-

lated altitude in hypobaric chamber for 5 days, there was 43.4% decrease in DNA content in spleen mono nuclear cell and a 13.2% decrease in mono nuclear cell proliferation. Similar suppression of these two parameters of immune function in exposure to 7km for 24h was also noted, which decreased by 39% and 19.8% respectively. The suppressive effect of 7km for 24h hypoxia on DNA content was partly blocked when rats were pretreated with DSP-4 intracerebroventricularly one day before hypoxia. The levels of catecholamine in spleen increased, while the levels of ACh decreased after 7km exposure for 24h. These observations indicate that hypoxia may suppress cellular function of neonatal rats and its action may be mediated by activation of sympathetic nervous system and inhibition of parasympathetic one.

KEY WORDS hypoxia; neonatal rats; DNA synthesis; spleen mono nuclear cell; proliferation; ACh; catecholamine

高原训练对竞走运动员肺通气功能的影响*

陈俊民

(青海师范大学生物系, 西宁 810008)

高原训练可提高运动员生理机能和运动能力已被多数人所接受。本文通过对中国 10 名世居高原和日本 10 名居平原竞走运动员 4 周高原不同海拔地区交替训练, 以及中方队员 3 周平原训练肺通气功能的测定和比较研究, 探讨了高原训练对竞走运动员肺通气功能的影响。另外, 对高原运动员下平原训练期间肺通气功能的变化规律进行了初步研究, 以期科学合理地评价高原训练效果提供客观依据。

1 材料与方法

中日竞走运动员 20 名, 男女各半。中方队员为青海省体工队世居高原的竞走运动员。男队员平均年龄为 19.2 ± 2.4 岁, 身高为 173.3 ± 6.3 cm, 体重为 58.3 ± 6.3 kg; 女队员上述指标分别为 17.4 ± 0.6 岁, 167.7 ± 1.5 cm, 50.9 ± 2.5 kg。中方队员有健将 2 名, 一级 5 名, 二级 3 名。日方队员为居平原的运动员, 男队员平均年龄为 20.2 ± 2.2 岁, 身高为 171.1 ± 6.4 cm, 体重为 58.9 ± 4.8 kg; 女队员分别为 21.2 ± 2.3 岁, 161.1 ± 7.0 cm, 47.0 ± 4.2 kg。按中国分级方法, 日方有健将 1 名, 一级 7 名, 二级 2 名。实验仪器为意大利产肺量计 (COSMED PONY SPIROMETER), 每晚 19 点 30 分至 21 点, 安静状态下, 采用立姿进行测试, 受试者含口器, 通气管与仪器相接, 先进行几次平静呼吸, 然后进行一次最大深吸气和最大用力呼气, 仪器自动显示最大用力肺活量 (FVC) 和 1s 用力呼气量 (FEV₁) 等指标。另外, 受试者以每分钟 30 次的频率进行 12 秒深呼吸测定最大通气量 (MVV)。测试指标选用 6 项, 即 MVV, 安静时每分钟通气量 (VE), 潮气量 (VT), 呼吸频率 (RF), FVC 和 FEV₁。测试地点分别为多巴 (海拔 2366m), 青海湖 (海拔 3200m), 兰州 (海拔 1573m) 和青岛 (海拔 10m)。

2 结果与讨论

Tab. Some parameters of pulmonary ventilatory function in Chinese and Japanese walkers at different altitude ($\bar{x} \pm s$, n= 10)

A Altitude (m)	Nation	MVV (L/min)	VE (L/min)	VT (L)	RF (resp · /min)	FVC (L)	FEV ₁ (L)
2366	C	117.6 ± 19.8*	11.0 ± 3.6*	0.70 ± 0.3	15.7 ± 5.4**	3.5 ± 0.6	3.2 ± 0.4
	J	139.8 ± 24.0	17.2 ± 6.2	0.71 ± 0.3	24.87 ± 7.7	3.0 ± 0.7	2.9 ± 0.7
3200	C	124.5 ± 25.8*	11.3 ± 2.1	0.64 ± 0.2	17.6 ± 7.1	3.6 ± 0.7*	3.3 ± 0.4
	J	155.7 ± 36.7	11.6 ± 6.1	0.60 ± 0.4	21.2 ± 6.6	2.7 ± 1.0	2.7 ± 1.0
1573	C	128.1 ± 25.1	11.2 ± 4.0	0.69 ± 0.3	16.2 ± 7.0	3.5 ± 0.6	3.2 ± 0.4
	J	142.06 ± 30.5	8.7 ± 3.4*	0.55 ± 0.2		2.9 ± 0.9	2.7 ± 0.7
2366	C	130.4 ± 20.9	8.6 ± 3.0*	0.64 ± 0.3	13.4 ± 3.7**	3.5 ± 0.5*	3.2 ± 0.5
	J	146.6 ± 35.0	13.6 ± 6.4*	0.63 ± 0.3	21.7 ± 6.5	2.8 ± 0.8	2.8 ± 0.8
10	C	113.5 ± 19.4	10.3 ± 4.8	0.64 ± 0.3	15.9 ± 4.3	3.3 ± 0.6	3.1 ± 0.4

* P < 0.05, ** P < 0.01 compared with Japanese walkers at the same altitude. C: China; J: Japan; MVV: maximum voluntary ventilation; VT: tidal volume; RF: respiratory frequency; FVC: forced vital capacity; FEV₁: forced exhaled volume after 1sec

(下转 227 页)