

促肾上腺皮质激素释放激素及去甲肾上腺素对高原鼠兔体液免疫的抑制作用*

白海波 杜继曾

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

摘 要

采用第三脑室注入CRF及NE的方法观察对高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)体液免疫的影响。结果表明:第三脑室注入CRF 1 μg 可抑制抗体生成,比对照下降29.2% ($P < 0.01$),而在第三脑室注入CRF受体阻断剂 α helical CRF⁻(9-41) 50 μg 后再注入CRF 1 μg 则可取消CRF对抗体生成的抑制作用;第三脑室注入5 nM NE,与对照相比,抗体水平下降38.85% ($P < 0.01$),而使用6-OHDA损毁脑内交感神经系统则使抗体水平升高24.31% ($P < 0.01$)。这些结果表明,高原鼠兔中枢CRF升高对体液免疫有抑制作用,中枢交感神经系统对体液免疫也具有紧张性抑制作用。

关键词 促肾上腺皮质激素释放因子;去甲肾上腺素;IgG抗体;免疫调节

动物在遭受应激刺激时产生许多生理反应,如食欲缺乏,免疫抑制,交感神经系统和下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴激活等。而由下丘脑分泌的神经肽CRF (Corticotropin-releasing factor)是垂体—肾上腺皮质轴在应激时激活的启动者。脑室注入CRF也可诱导出动物在应激时表现出的生理反应。下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴在应激时的激活是动物对应激作出的一种适应性反应,在保持机体内环境稳定,调整机体生理功能以应付不良刺激方面有重要生理意义。高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)已被我们选定为研究高原低氧适应机制的模型动物,其下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴在低氧下不激活。但高原鼠兔在受到其它类型的应激刺激时理应也表现出与其它动物类似的生理反应,即诸如下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴激活,免疫功能抑制等。本研究即是通过第三脑室给予CRF及与CRF关系密切的神经递质NE,化学去交感药物6-羟多巴胺(6-OHDA)人为地激活下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴以及减弱中枢交感神经系统的功能活动来观察对高原鼠兔体液免疫的作用,为神经内分泌免疫调节理论提供进一步的实验支持。

材料与方法

1. 实验动物 高原鼠兔,雌雄兼用,体重100~140 g,捕自青海湖地区,运至实验室自然光照饲养1个月后用于实验。
2. 主要试剂 ^{125}I Na 由中国原子能科学研究院生产,SPA 蛋白购自卫生部上海生物制品研究所, Nunc-Immuno Tube (StarTube) 为Denmark Nunc 产品, 6-OHDA、鸡卵

* 国家自然科学基金(39470277)资助项目
本文于1996年6月7日收到,1996年12月18日收到修改稿

白蛋白抗原为 sigma 产品, CRF 及 α heilical CRF (9~ 41) 为 Peninsula 产品, Sephadex G-50为 Pharmacia 产品。

3. 脑室注射 实验动物在戊巴比妥钠麻醉下, 用微量注射器直接向第三脑室注入药物。6-OHDA 用0.2% 抗坏血酸生理盐水配制, 配制后4 保存不超过24 h。对照动物采用同样方法注入同体积的配药液或生理盐水。

4. SPA 蛋白的¹²⁵I 标记 1.5 ml 塑料离心管顺序加入 SPA 50 μ l (1 mg/m l)、¹²⁵I-N a 1 mCi、氯胺 T 20 μ l (1 mg/m l), 室温下反应1 m in, 再加入 N a₃S₂O₄ 20 μ l (2 mg/m l) 混匀, 将反应系统过 Sephadex G-50层析柱, 以0.1 M PBS 洗脱 (0.5 ml/m in), 1 tube/2 m in 收集。

5. 抗体水平测定 鸡卵白蛋白抗原 (100 μ g/m l) 100 μ l 加入 Star Tube 室温8 h 进行包被, 经0.1 M PBS 洗涤两次后用含0.5% BSA 的 PBS 200 μ l 室温放置4 h 封闭, 再经含0.05% Triton X-100的 PBS 洗涤两次, 取待测血清经适当稀释后每管加入100 μ l, 再加100 μ l PBS 4 过夜, 弃反应液后 PBS 洗一次, 加入¹²⁵I-SPA 100 μ l (约50 000 cpm) 4 过夜, 弃反应液后 PBS 洗一次, 然后放入 γ -计数器计数 cpm 值, 抗体水平以¹²⁵I-cpm 值表示。

6. 数据处理 数据以平均值 \pm 标准误表示。由于单位时间内放射性计数数据呈普哇松分布, 数据经平方根转化后进行方差分析。

结 果

1. ¹²⁵I-SPA 蛋白的凝胶层析分离

SPA 蛋白是从金黄色葡萄球菌细胞壁分离的一种分子量为42 000道尔顿的蛋白质, 它具有与人 and 多种动物的免疫球蛋白 Fc 段结合的特性。本文即是利用此特性, 用同位素¹²⁵I 标记 SPA 作为检测抗体水平的示踪剂以反映体液免疫反应的强弱。¹²⁵I-SPA 的凝胶层析分离结果如图1所示, 第一峰即为¹²⁵I-SPA 峰。

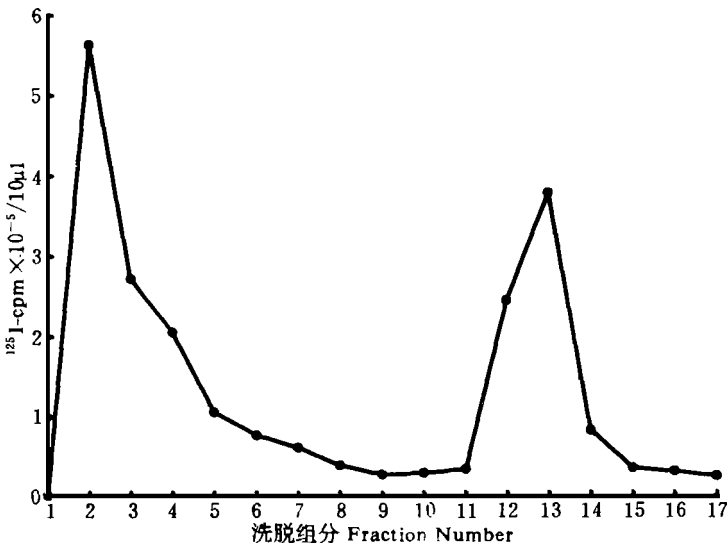


图1 ¹²⁵I-SPA 的 Sephadex G-50凝胶柱层析结果

Fig 1 Profile of ¹²⁵I-SPA on Sephadex G-50 column with 0.1 mol/L PBS pH7.4

2. 脑室注射NE 和6-OHDA 对高原鼠兔体液免疫的影响

高原鼠兔随机分为3组, 第一组动物脑室注入配药液作为对照, 第二组动物脑室注入NE 5 nM, 第三组注入6-OHDA 100 μg , 注药体积均为5 μl 每组动物均用鸡卵白蛋白5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔免疫, 第三组动物免疫是在注入6-OHDA 后第7 d. 3组动物在免疫后14 d 断头取血, 分离血清, 测定抗体水平. 结果表明: 脑室注入5 nM NE, 抗体水平比对照下降38.85% ($P < 0.01$), 在使用100 μg 6-OHDA 注入脑室7 d 损毁中枢交感神经系统后抗体水平比对照升高24.31% ($P < 0.01$), 提示交感神经系统对体液免疫具有紧张性抑制作用(图2).

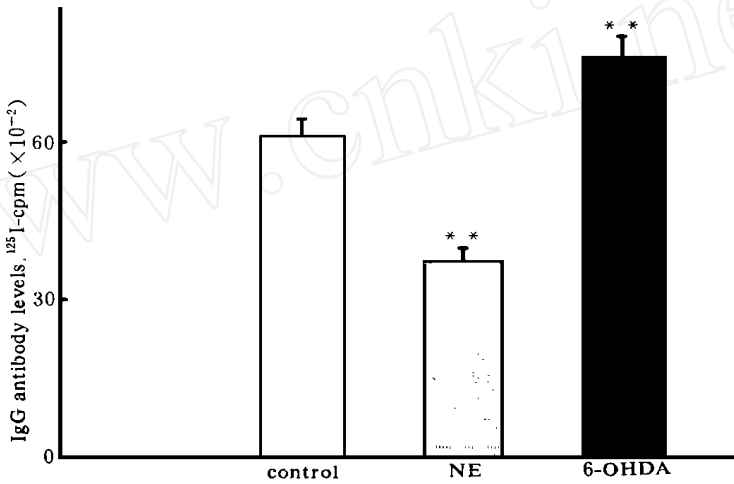


图2 脑室注入NE 及6-OHDA 对 IgG 抗体产生的影响

Fig 2 Effect of icv administration of NE and 6-OHDA on production of IgG antibody ($n = 8 \sim 10$, ** $P < 0.01$)

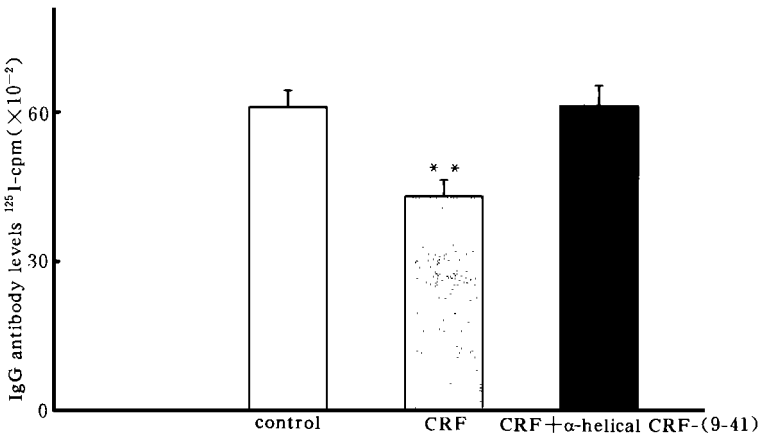


图3 脑室注入CRF 及CRF 受体阻断剂 α -helical CRF-(9-41) 对 IgG 抗体产生的影响

Fig 3 Effect of icv administration of CRF and α -helical CRF-(9-41) on production of IgG antibody ($n = 8 \sim 10$, ** $P < 0.01$)

3. 脑室注射CRF 及CRF 受体阻断剂 α -helical CRF-(9-41) 对高原鼠兔体液免疫的影响

脑室注入CRF 1 μg , 与对照相比, 抗体水平下降29.2% ($P < 0.01$), 预注入CRF 受体阻断剂 α -helical CRF-(9-41) 50 μg 后再注入CRF 1 μg , 则可取消中枢CRF 诱导的抗体水平下降(图3).

讨 论

本研究的结果表明, 中枢 CRF 水平升高可抑制抗体产生, 预注入 α -helical CRF-(9-41) 后可阻断 CRF 的作用, 提示中枢 CRF 对抗体产生的抑制可能是通过中枢内机制介导的。但是通过何途径抑制抗体的产生, 本文未作深入探讨。我们推测至少有两条途径: 1. CRF 通过刺激 ACTH 的释放而激动糖皮质激素 (GC) 的分泌, 后两者均具有广泛的免疫抑制效应; 实验证明大鼠脑室注射 CRF 可升高血浆 ACTH 和皮质酮水平从而降低淋巴细胞转化 NK 细胞活性 (Strausbaugh 等, 1992; Jain 等, 1991); 2 通过激活交感神经系统抑制免疫。有许多实验发现脑室注入 CRF 可升高血浆 NE 和 Neuropeptide-Y 的水平 (Irwin 等, 1992), 应激时中枢内源性 CRF 释放诱导外周血浆中 NE 和 E 升高 (Brown 等, 1982), 这些实验说明脑内 CRF 升高可激活交感神经系统, 而交感神经系统的激活则使免疫受到抑制 (Irwin 等, 1988)。这一结果也得到有关实验观察的支持。如解剖学研究显示在初级和次级淋巴器官有 NE 神经纤维分布 (Felten 等, 1988; Livnat 等, 1985), NE 与淋巴细胞 β 肾上腺能受体结合降低 NK 细胞功能 (Hellstrand 等, 1985), 化学性交感神经切断或阻断 β 受体可取消中枢给予 CRF (Irwin 等, 1990), 白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) (Sundar 等, 1990), 电击应激 (Cunnick 等, 1990) 造成的细胞免疫抑制。

中枢交感神经系统与 CRF 神经元在形态上和功能上密切相关。许多实验表明, 起源于大鼠脑干的儿茶酚胺类纤维投射, 其末梢终止于下丘脑 PVN 区小细胞部分的 CRF 胞体上, 电刺激或化学损毁包含这些传入投射的纤维束可增加或降低垂体门脉血中 CRF 含量 (Plotsky 等, 1989; Guillem in 等, 1987)。应激过程中 PVN 的去甲肾上腺素能末梢刺激 CRF 释放通过 $\alpha 1$ 受体介导 (Plotsky 等, 1987), 在体实验表明, $\alpha 1$ 和 β 受体参与介导 NE 和 E 对 CRF 释放的促进作用 (Szafarczyk 等, 1987)。鉴于此, 本研究也探讨了高原鼠兔中枢交感神经系统与体液免疫的关系。结果表明, 脑室注入 NE, 体液免疫受到抑制, 损毁中枢交感神经系统, 体液免疫比未损毁组升高, 提示中枢交感神经系统对体液免疫具有紧张性抑制作用。而 NE 对体液免疫的抑制作用机制可能与刺激 CRF 释放进而抑制体液免疫有关。

参 考 文 献

- Brown MR, Fisher LA, Spiess J, Rivier C, Rivier J, Vale W. 1982 Corticotropin releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology*, 111: 928~ 931.
- Cunnick JE, Lysle DT, Kucinski BJ, Rabin BS. 1990 Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones and peripheral β adrenergic receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 36: 645~ 651.
- Felten SY, Felten DL, Bellinger DL, Carlson SL, Ackeman KD, Madden KS, Olschowska JA, Livnat S. 1988 Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs. *Progress in Allergy*, 43: 14~ 36.
- Guillem in V, Conte-Devolx B, Szafarczyk A, Malaval F, Gibault R. 1987. The corticotropin-releasing factor release in rat hypophysial portal blood is mediated by brain catecholamines. *Neuroendocrinology*, 46: 134~ 146.
- Hellstrand K, Hemodsson S, Strannegard O. 1985. Evidence for a β adrenoceptor-mediated regulation of human natural killer cells. *Journal of Immunology*, 134: 4095~ 4099.
- Irwin M, Hauger R, Brown M. 1992 Central corticotropin releasing hormone activates the sympathetic nervous system and reduces immune function: increased responsiveness of the aged rat. *Endocrinology*, 131: 1047~ 1053.
- Irwin M, Hauger RL, Jones L, Provencio M, Britton KT. 1990 Sympathetic nervous system mediates central corti-

- corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, 255: 101~107.
- Irw in M, Hauger RL, Brown M, Britton KT. 1988 CRF activates autonomic nervous system and reduces natural killer cytotoxicity. *Am J Physiol*, 255: R744~ R747.
- Jain R, Zwicker D, Hollander CS, Brand H, Saperstein A, Hutchinson B, Brown C, Audhya T. 1991. Corticotropin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat. *Endocrinology*, 128: 1329~ 1336
- Livnat S, Felten SY, Carlson SL, Bellinger DL, Felten DL. 1985. Involvement of peripheral and central catecholamine system in neural-immune interactions. *J Neuroimmunol*, 10: 5~ 30
- Plotsky PM, Cunningham ET, Widmaier EP. 1989. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev*, 10: 437~ 458
- Plotsky PM. 1987. Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion in to the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology*, 121: 924~ 930
- Strausbaugh H, Irw in M. 1992. Central corticotropin-releasing hormone reduces cellular immunity. *Brain Behav Immunol*, 6: 11~ 17.
- Sundar SK, Ciernial MA, Kilts C, Ritchie JC, Weiss JM. 1990. L-1 induced immunosuppression occurs through activation of pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system by corticotropin-releasing factor. *J neurosci*, 10: 3701~ 3706
- Szafarczyk A, Malaval F, Laurent A, Gibaud R. 1987. Further evidence for a central stimulatory action of catecholamines on adrenocorticotropin release in the rat. *Endocrinology*, 121: 883~ 892.

THE INHIBITORY EFFECT OF CORTICOTROPHIN RELEASING FACTOR AND NOREPINEPHRINE ON HUMORAL IMMUNE FUNCTION OF *OCHOTONA CURZONIAE*

BAI Haibo DU Jizeng

(Northwest Plateau Institute of biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001)

Abstract

What action the CRF and NE played in modulating immune function in the brain of *Ochotona curzoniae* was studied. The changes of humoral immune function of *Ochotona curzoniae* were examined by icv injection of CRF, NE and their blocker. The results showed that icv CRF (1.0 μg) resulted in a 29.2% ($P < 0.01$) decrement in the production of IgG; Central administration (icv) of the CRF antagonist α -helical CRF-(9-41) 50 μg completely blocked the immunosuppressive action of CRF, when animals were icv injection of NE 5 nM produced a significant suppression of the IgG production. After destroyed central sympathetic nervous system with 6-OHDA, the IgG levels increased by 24.3% ($P < 0.01$). These findings suggest that enhanced CRF level in the brain might be a source to reduce humoral immune function and central sympathetic nervous system may play a strained suppressive role in modulation of humoral immune in *Ochotona curzoniae*.

Key words Corticotrophin releasing factor; Norepinephrine; IgG antibody; Immunoregulation