

低氧对大鼠体液免疫的抑制作用*

白海波 杜继曾** 贾红卫

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;

**浙江大学生命科学与技术系, 杭州 310027)

摘 要

本实验以模拟高原低氧的方法, 探讨了低氧对大鼠体液免疫的作用, 并与高原鼠兔比较, 体液免疫以溶血素和 IgG 产生为指标。实验结果: 与对照组相比, 大鼠低氧 10 d, 5 km 海拔抑制溶血素形成 10.3%, 7 km 海拔抑制溶血素形成 21.9%; 经再次免疫后又低氧 10 d, 5 km 海拔抑制溶血素形成 4.2%, 7 km 海拔抑制溶血素形成 4.6%, 高原土著动物高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 则不表现上述的抑制现象; 大鼠经 SRBC 腹腔致敏 2 d 后低氧 5 d 和 8 d, 未表现低氧抑制溶血素形成的作用; 大鼠侧脑室给予外源性 CRF (1 μ g/rat), 可抑制溶血素形成和 IgG 产生, 溶血素形成抑制 8.6%, IgG 产生抑制 14.0%; 7 km 低氧大鼠侧脑室给予 CRF 受体阻断剂 (α -helicalCRF (9-41)) 50 μ g 对低氧抑制溶血素形成有一定的阻断作用, 可部分阻断低氧抑制 IgG 产生, 使 IgG 产生的抑制率由 24.2% 提高到 12.1%; 大鼠腹腔注射 1 μ g CRF 对溶血素形成和 IgG 产生无影响; 与假手术组比, 大鼠在摘除双侧肾上腺后, 低氧对溶血素形成仍抑制 6.6%。因而, 本研究认为低氧对初次和再次体液免疫均产生抑制作用, 而且抑制作用发生在体液免疫的起始阶段, 其抑制作用与中枢 CRF 升高有关。

关键词: 低氧; 体液免疫; CRF 免疫调节

应激引起一系列神经内分泌反应, 导致免疫功能改变, 其中 CRF (corticotropin releasing factor) 是中枢内机体对应激反应的一个调节者, 脑内 CRF 的升高可导致细胞免疫功能下降^[1,2]。我们以往的实验也表明, 低氧应激抑制大鼠的淋巴细胞转化, 其抑制作用与中枢 CRF 有密切关系^[3]。本文旨在扩展我们以往的研究, 探讨低氧对大鼠体液免疫的作用, 并观察了 CRF 在其中的免疫调节作用。

1 材料与 方法

1.1 实验动物 健康雄性、鼠龄基本一致的 Wistar 大鼠, 体重 200 \pm 40 g, 由本所实验动物房提供, 鼠源系中国科学院上海实验动物中心。高原鼠兔雌雄兼用, 体重 120 g 左右, 捕自青海湖地区, 运至实验室, 自然光照饲养一月后用于实验。

1.2 主要试剂 大鼠 CRF 及 CRF 受体阻断剂 α -helical CRF (9-41) 购自美国 Peninsula Laboratories Inc. 公司, 鸡卵白蛋白 (Sigma), 辣根过氧化物酶联羊抗大鼠 IgG 抗体 (IgG-

1996-01-22 收稿 1996-04-01 修回

*国家自然科学基金 (No. 39470277) 和中国科学院上海生理研究所低氧生理开放研究实验室资助项目

HRP) 和 TMB-ELISA 购自美国生命技术公司, Con A 为 Sigma 产品, Maxisorp 96 孔免疫板为丹麦 Nunc, Copenhagen 产品。

1.3 低氧模拟 实验动物随机分组, 每组 6 只放入减压舱, 以 140 m/min 的速度升至所需海拔高度 (5 km 和 7 km), 减压至所需时间。动物于舱内可自由取食和饮水, 每日 9 时清舱。低氧时间终了, 晨 9 时出舱并迅速断头收集血样, 操作中尽量避免动物应激。

1.4 溶血素测定 参照文献^[4]略改动, 简述之: 动物腹腔注射 0.2 ml 2% 绵羊红细胞 (SRBC), 实验时间结束时尾静脉采血 20 μ l 与 1 ml 生理盐水混和, 离心取上清 0.5 ml, 加入 5% SRBC 0.25 ml 和豚鼠补体 0.5 ml, 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后离心取上清 1 ml 与 Dribkin's 试剂混匀, 用 Bio-Rad Model 450 酶标仪在 550 nm 读取光密度值。

1.5 IgG 抗体的 ELISA 法 Maxisorp 96 孔板用卵白蛋白 (2.0 μ g/孔) 室温 18 h 包被, 经含 0.1% BSA 的 0.025 mol/L PBS 封闭后, 用含 0.05% Tween-20 洗涤。卵白蛋白腹腔免疫 (3 μ g/kg) 的动物尾静脉采血 20 μ l, 用 PBS (含 0.1% BSA, 0.05% Tween-20) 适当稀释后每孔加入 100 μ l, 室温孵育 10 h, 洗涤 3 次, 加辣根过氧化物酶标羊抗大鼠 IgG (1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗涤, 每孔加 TMB-ELISA 底物, 室温反应 30 min, 加入 H₂SO₄ 终止反应后用 Bio-Rad Model 450 酶标仪在 450 nm 读取光密度值。

1.6 数据处理 采用均数差异性检验 (*t* test) 和方差分析 (ANOVA)。

2 结 果

2.1 不同海拔, 不同低氧时间低氧对大鼠溶血素形成的作用

大鼠低氧 10 d, 5 km 海拔抑制 10.3% ($P < 0.05$), 7 km 海拔抑制 21.9% ($P < 0.01$); 经 SRBC 腹腔再次免疫后, 持续低氧 10 d, 5 km 海拔抑制 4.2% ($P < 0.05$), 7 km 海拔抑制 4.6% ($P < 0.05$), (图 1)。

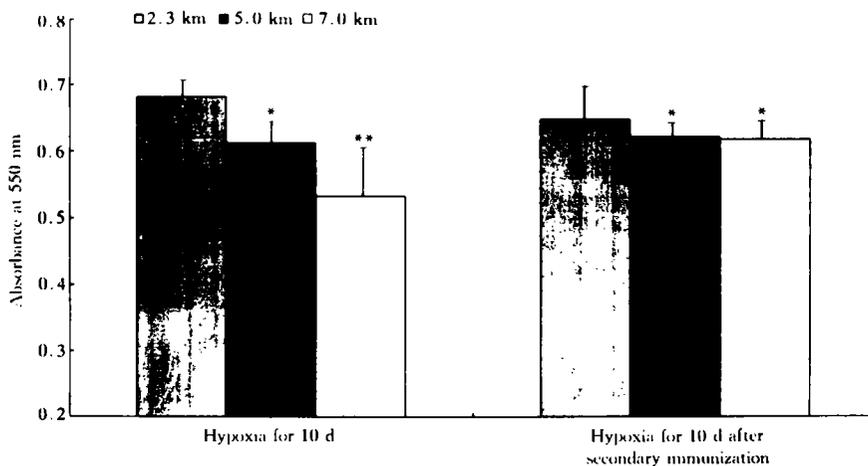


图 1 低氧对大鼠溶血素形成的抑制作用

Fig. 1 Suppression of hemolysin forming by hypoxia in rats

$\bar{x} \pm s$, $n=6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

2.2 不同海拔，低氧 8 d 后低氧对高原鼠兔溶血素形成的作用

5 km 和 7 km 低氧暴露 8 d，高原鼠兔不表现低氧抑制溶血素形成的现象，相反，溶血素有升高趋势，但未达到统计学显著意义。

2.3 免疫 2 d 后再低氧对大鼠溶血素形成的作用

大鼠经 SRBC 腹腔免疫 2 d 后，5 km 海拔低氧 5 d 和 8 d，未表现低氧抑制作用。

2.4 CRF 的免疫调节作用

大鼠侧脑室注入外源性 CRF 1 μg，可抑制溶血素形成和 IgG 产生，抑制率分别为 8.6% (图 2) 和 14.0% (P<0.05) (图 3)。

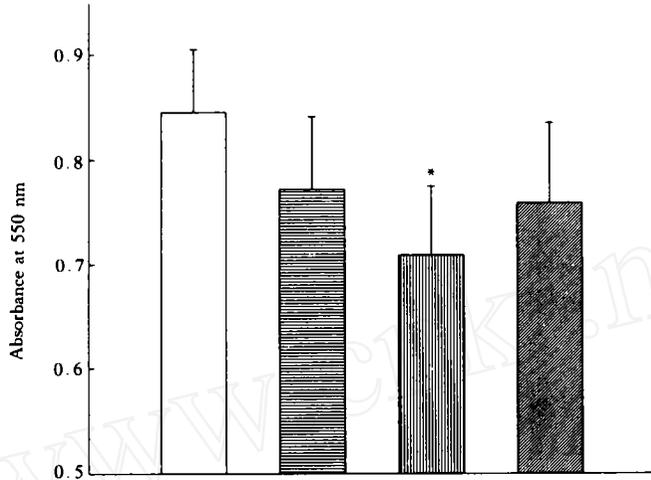


图 2 脑室注射 CRF 及低氧注射 CRF 受体阻断剂对大鼠溶血素形成的作用
Fig. 2 Effects of central CRF (1 μg, icv), hypoxia and antagonism by α-helical CRF (9-41) on hemolysin formation

$\bar{x} \pm s, n=7. * P<0.05$ vs control. □ Control; ▨ CRF; ▩ Hypoxia; ▤ Antagonism.

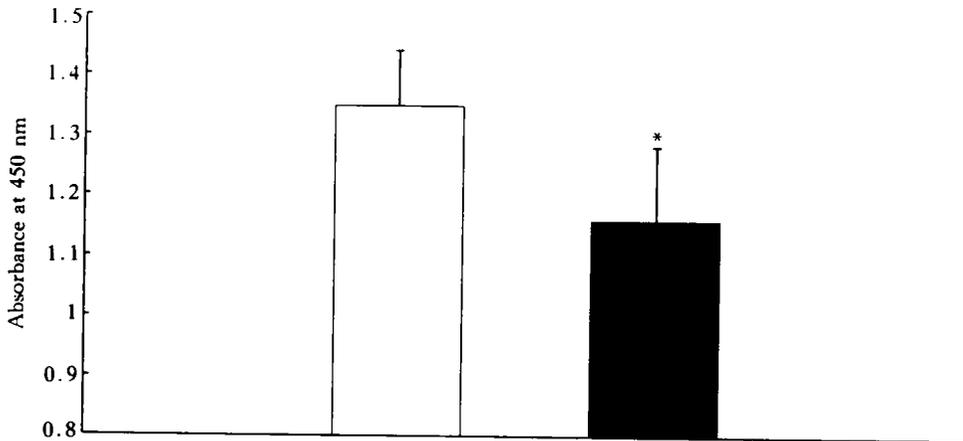


图 3 脑室注射 CRF (1 μg, icv) 对 IgG 抗体产生的作用
Fig. 3 Effect of central CRF (1 μg, icv) on IgG antibody responses to chicken egg albumin

$\bar{x} \pm s, n=6. * P<0.05$ vs control. □ Control; ▨ CRF.

7 km 低氧侧脑室给予 CRF 受体阻断剂对低氧抑制溶血素形成有一定的阻断作用,可部分阻断低氧抑制 IgG 产生,抑制率由 24.2% 提高到 12.1% ($P < 0.05$) (图 4); 大鼠腹腔注入 CRF 对溶血素形成和 IgG 产生无影响。

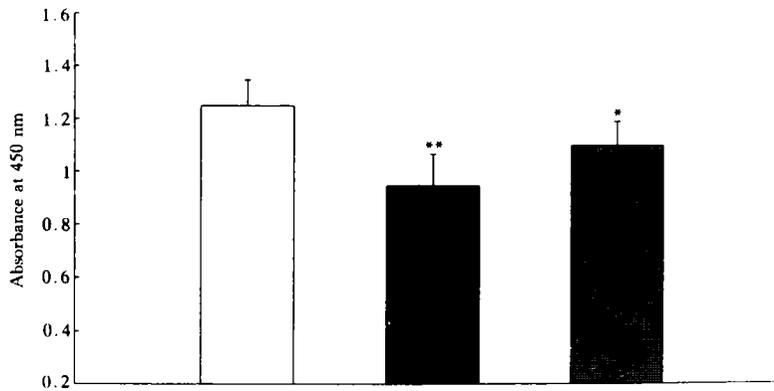


图 4 CRF 受体阻断剂对低氧抑制 IgG 抗体产生的阻断作用

Fig. 4 Effect of hypoxia and antagonism by α -helical CRF (9-41) on IgG antibody responses to chicken egg albumin

$\bar{x} \pm s$, $n=7$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs control. □ Control; ▨ Hypoxia; ▩ Antagonism.

2.5 低氧对肾上腺摘除大鼠溶血素形成的作用

大鼠摘除双侧肾上腺,与假手术组比,低氧对溶血素形成仍抑制 6.6% ($P < 0.05$) (见图 5)。

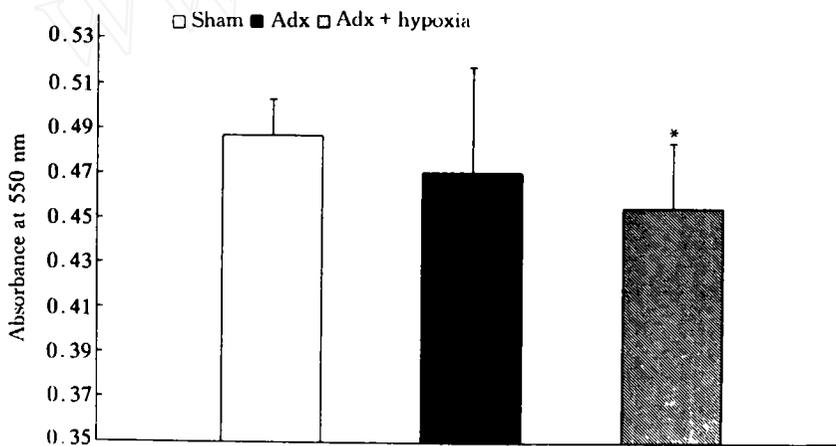


图 5 低氧对肾上腺摘除大鼠溶血素形成的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of hemolysin formation by hypoxia after adrenalectomized rats

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

3 讨 论

本研究的结果表明,低氧对大鼠初次和再次体液免疫功能产生抑制作用,并且肾上腺摘除后低氧抑制作用仍存在,这与我们以前的实验结果相似^[3],表明肾上腺皮质激素在低氧

造成的体液免疫抑制过程中作用不显著。Irwin 的电刺激应激实验也表明,CRF 抑制天然杀伤细胞的活性与垂体肾上腺轴关系不大^[5]。大鼠免疫 2 d 后再低氧,不产生体液免疫的抑制作用,提示低氧抑制作用发生体液免疫的起始阶段,我们推测低氧可能影响了巨噬细胞的抗原呈递作用。Jiang 的寒冷应激小鼠实验就发现巨噬细胞 Ia 抗原表达消失^[6]。我们的结果在临床上似有一定意义,即疫苗注射应在机体应激发生以前进行,应激过程中进行某种疫苗注射对机体的保护作用可能不充分。

本研究发现的低氧对大鼠体液免疫的抑制作用与 CRF 的中枢作用有关,而非 CRF 的外周效应。因为 CRF 侧脑室注射虽有可能通过血脑屏障到达外周而结合于免疫细胞上的 CRF 受体,但外周给予 1 μg CRF 并未产生抑制效应。此外,低氧时给予 CRF 受体阻断剂可部分阻断低氧对体液免疫的抑制作用,高原鼠兔下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴对低氧不应答,CRF 不升高,故低氧对体液免疫未产生抑制作用,这些结果支持低氧对体液免疫的抑制因素之一是中枢 CRF 升高并通过 CRF 受体而实现的结论。

本文未能对中枢 CRF 抑制体液免疫的通路进行探讨,有文献报道,中枢 CRF 通过激活交感神经系统而介导细胞免疫抑制作用^[7]。

参 考 文 献

- [1] Jain R, Zwicker D, Hollander CS. Corticotropin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat. *Endocrinology*, 1991, 128: 1329~1336
- [2] Strausbaugh H, Irwin M. Central corticotropin releasing hormone reduces cellular immunity. *Brain Behav Immun*, 1992, 6: 11~17
- [3] 白海波,杜继曾. 促肾上腺皮质激素释放因子介导低氧应激抑制淋巴细胞转化的实验研究. *中国应用生理学杂志*, 1995, 11: 201~204
- [4] 徐学瑛,李元,许津. 一个改进的体液免疫测定方法溶血素测定法. *药学报*, 1979, 14: 443~445
- [5] Irwin M, Vale W, Rivier C. Central corticotropin releasing factor mediates the suppressive effect of stress on natural cytotoxicity. *Endocrinology*, 1990, 126: 2837~2844
- [6] Jiang CG, Morrow-Tesch JL, Beller DI, et al. Immunosuppression in mice induced by cold water stress. *Brain Behav Immun*, 1990, 4: 278~291
- [7] Irwin M, Hauger RL, Brown M, et al. CRF activates autonomic nervous system and reduces natural killer cytotoxicity. *Am J Physiol*, 1991, 255: R744~R747

INHIBITION EFFECT OF HYPOXIA ON HUMORAL IMMUNITY OF RATS

BAI HAI-BO, DU JI-ZENG, JIA HONG-WEI

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

ABSTRACT

To study the effect of hypoxia on humoral immunity function of rat and *Ochotona curzoniae* (pika), the specific antibody production to novel antigen IgG and immunore-sponse to sheep red blood cell (hemolysin forming) were measured. The results show that hypoxia at altitude of 5 km and 7 km for 10 d resulted respectively in 10.3% ($P < 0.05$) and 21.9% ($P < 0.05$) decrement in hemolysin formation in rats, as compared with the control group kept at 2.3 km. When the rats were secondarily immunized and kept at the same hypoxia for 10 d, the reduction in hemolysin formation was 4.2% ($P < 0.05$) and 4.6% ($P < 0.05$) for the two respective altitudes. These changes, however, were not found in pikas. When rats were immunized two days before hypoxia, 5 km hypoxia for 5 d and 8 d failed to suppress hemolysin formation. Intracerebroventricular (icv) injection of CRF (1.0 $\mu\text{g}/\text{rat}$), decreased hemolysin formation and production of IgG by 8.6% ($P < 0.05$) and 14.0% ($P < 0.05$) respectively, but intraperitoneal (ip) injection of CRF (1.0 $\mu\text{g}/\text{rat}$) had no effect. On the other hand, icv injection of CRF receptor antagonist (α -helical CRF (9-41), 50 $\mu\text{g}/\text{rat}$) prior to 7 km hypoxia caused a hypoxia-induced suppression of IgG production from 24.2% to 12.1% ($P < 0.05$). Adrenalectomy in rats lowered hemolysin formation by 6.6% ($P < 0.05$). The above results demonstrate that hypoxia suppresses humoral immunity function and alters initial antigen processing probably through an increase of CRF in the central nervous system.

Key words: hypoxia; IgG antibody; hemolysin formation; immunoregulation; corticotropin-releasing factor