

# 急性低氧下去甲肾上腺素 对大鼠淋巴细胞转化的调节作用\*

白海波 杜继曾\*\*

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;

\*\*浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

## 摘 要

本研究以模拟高原低氧方法, 观察低氧作用于大鼠细胞免疫功能以及去甲肾上腺素 (NE) 对免疫作用的调节机制。实验结果: 与对照相比, 7 km 急性低氧 24 h 淋巴细胞转化下降 41% ( $P < 0.01$ ); 5 km 低氧暴露时间为 7 d, 20 d 时, 低氧抑制淋巴细胞转化, 分别下降 34% 和 60% ( $P < 0.01$ ); 侧脑室注入 5 nmol/L NE, 淋巴细胞转化比对照下降 29% ( $P < 0.01$ ); 7 km 10 h 低氧暴露时, 侧脑室注入酚妥拉明 (phentolamin) 25  $\mu\text{g}/\text{rat}$  则使低氧抑制淋巴细胞转化从 42% 提高到 21% ( $P < 0.05$ ); 侧脑室注入 5 nmol/L NE, 血液 CRF 水平升高, 脑室注入酚妥拉明后则降低; 7 km 24 h 低氧, 下丘脑儿茶酚胺水平升高, 血液 CRF 水平也升高; 7 km 10 h 低氧暴露的脾淋巴细胞加入不同浓度的 CRF 体外培养, 呈现出浓度依赖性淋巴细胞转化下降现象。因而, 本研究提示: 低氧可抑制淋巴细胞转化, NE 参与急性低氧下对大鼠细胞免疫功能的神经内分泌调节, 其调节作用可能与 CRF 有关系。

**关键词:** 低氧; 淋巴细胞转化; NE 免疫调节; CRF

应激可通过中枢神经系统改变免疫反应, 对此, 人们已无疑义。中枢神经系统与免疫系统之间的内在联系目前比较公认的是中枢通过神经内分泌和植物性神经两条通路调节免疫功能。前者主要以神经肽和激素为媒介, 后者主要以神经递质为媒介<sup>[1]</sup>。在神经内分泌通路中人们对下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴进行了大量研究, 认为这一轴系是多种应激改变免疫功能的机制之一<sup>[2]</sup>。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, 其抑制作用与中枢促肾上腺皮质释放激素 (CRF) 有密切关系<sup>[3]</sup>。本文观察了交感神经递质去甲肾上腺素 (NE) 在低氧下对大鼠细胞免疫功能的调节作用及其与 CRF 的关系。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 健康雄性、鼠龄基本一致的 SD (Sprague Dawley) 大鼠, 体重 150~200 g, 由本所实验动物房提供, 鼠种源系中国科学院上海实验动物中心。

1.2 主要试剂 CRF 及 CRF 抗血清购自美国 Peninsula Laboratories Inc. 公司, 羊抗兔  $\gamma$ -球蛋白为美国 Calbioche-behring 公司产品, Con A 为 Sigma 产品,  $^{125}\text{I-Na}$  及  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶

1996-04-29 收稿 1996-06-17 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

啉核苷( $^3\text{H-Tdr}$ )由中国原子能科学研究院生产。

1.3 低氧模拟 实验动物随机分组,每组 6 只放入开放式减压舱,140 m/min 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。

1.4 T-淋巴细胞转化(全血法) 肝素抗凝全血,充分混匀,种入 96 孔板(20  $\mu\text{l}$ /孔)。设 3 复孔,每孔加入含 Con A(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的 RPMI-1640 营养液 0.2 ml,37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养 72,64 h 后加入  $^3\text{H-Tdr}$  18.5 kBq,再经 8 h 后将孔内容物收获于玻璃纤维滤纸,依次经生理盐水,无水乙醇处理,80  $^{\circ}\text{C}$  烘干,液闪计数,结果以 cpm 值表示。

1.5 血液 CRF 水平测定 肝素抗凝全血 0.4 ml 冷冻干燥后用 0.01 mol/L HCl 0.2 ml 溶解,取 0.1 ml 测定,测定采用本室建立的方法<sup>[1]</sup>。

1.6 下丘脑儿茶酚胺水平测定 参照文献[5]采用荧光分光光度法测定。下丘脑用 0.2 mol/L 1 ml 高氯酸匀浆 10 000 g 离心,上清液加入 1.0 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  中和,取上清液 0.3 ml 加入 20  $\mu\text{l}$  20 mmol/L 铁氰化钾和 100  $\mu\text{l}$  1,2-diphenylethylenediamine(DPE)40  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h,冰浴终止反应,用岛津 RF-540 荧光分光光度计在发射波长 345 nm 激发波长 485 nm 狭缝 10 nm 条件下测定。

1.7 数据处理 采用非配对计量资料的  $t$  检验和方差分析,多重比较采用 Student-Newman-keuls 检验。

## 2 结 果

### 2.1 急性低氧对大鼠 T-淋巴细胞转化与血液 CRF,下丘脑儿茶酚胺水平的作用

7 km 海拔急性低氧暴露 24 h,与对照组比较,T-淋巴细胞转化下降 41%( $P<0.01$ ),同时血液 CRF 水平从 14.94  $\mu\text{g}/\text{ml}$  升高到 148.86  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $P<0.01$ ),下丘脑儿茶酚胺水平也从  $6.59\pm 0.21$  ng/mg 湿重升高到  $7.53\pm 0.31$  ng/mg 湿重,比对照升高了 14.3%( $P<0.05$ )。

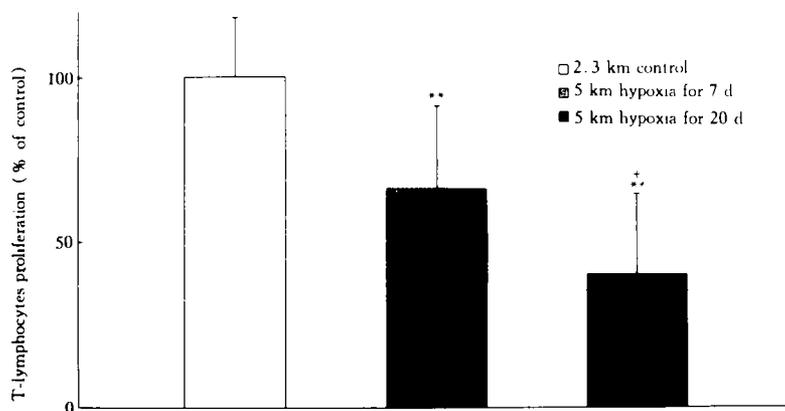


图 1 5 km 不同低氧时间对 T-淋巴细胞转化的作用

Fig. 1 Effect of hypoxia at 5 km for 7 d and 20 d on T-lymphocytes proliferation  
n=5. \*\* $P<0.01$  vs 2.3 km control; \* $P<0.05$  vs 7 d.

## 2.2 慢性低氧对大鼠 T-淋巴细胞转化的作用

5 km 慢性低氧暴露 7 和 20 d, T-淋巴细胞转化分别下降 34% 和 60% ( $P < 0.01$ ) (图 1), 7 d 与 20 d 比较下降 39% ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 侧脑室注入 NE 及 phentolamin 大鼠 T-淋巴细胞转化与血液 CRF 水平

侧脑室注入 5 nmol/L NE, T-淋巴细胞转化与对照相比下降 29% ( $P < 0.01$ ), 侧脑室注入  $\alpha$ -受体阻断剂 phentolamin 25  $\mu\text{g}/\text{rat}$  则使 7 km 10 h 低氧暴露造成的低氧抑制 T-淋巴细胞转化有所减弱, 抑制率由 42% 减轻到 21% ( $P < 0.05$ ) (图 2), 血液 CRF 水平在侧脑室注入 NE 后明显升高, 注入 phentolamin 后则降低 (图 3)。

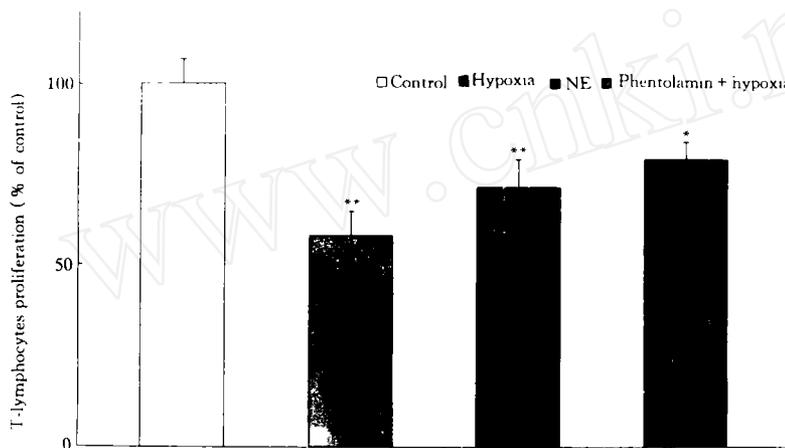


图 2 大鼠侧脑室注入 NE 及 phentolamin 对大鼠 T-淋巴细胞转化的作用

Fig. 2 Effects of icv injection of NE and phentolamin during 7 km 10 h hypoxia on T-lymphocytes proliferation

$n = 5$ . \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  vs control.

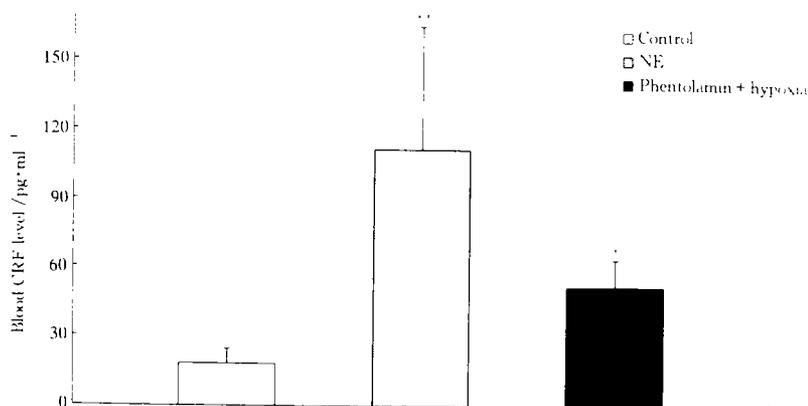


图 3 大鼠侧脑室注入 NE 及 phentolamin 对血液 CRF 水平的影响

Fig. 3 CRF level in blood of rats after icv injection of NE and phentolamin during 7 km for 10 h hypoxia

$n = 5$ . \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  vs control.

#### 2.4 体外 CRF 对经过 7 km 10 h 低氧大鼠的脾 T-淋巴细胞转化的作用

7 km 10 h 低氧暴露的大鼠脾淋巴细胞加入不同浓度的 CRF 体外培养,呈现出浓度依赖的 T-淋巴细胞转化下降现象(图 4)。

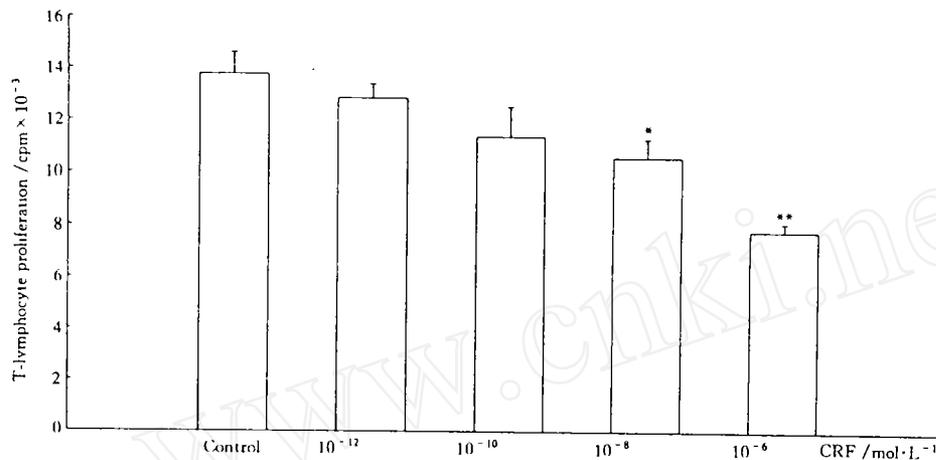


图 4 体外 CRF 对 7 km 低氧 10 h 大鼠脾 T-淋巴细胞转化的作用

Fig. 4 Effects of CRF on proliferation of rat T-lymphocyte at 7 km for 10 h hypoxia *in vitro*

$n=4$ . \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$  vs control.

### 3 讨 论

形态学的研究表明,免疫器官具交感神经支配,交感神经通过其递质 NE 经旁分泌和/或神经靶细胞直接接触的方式影响免疫功能<sup>[6]</sup>,实验还发现手术切断大鼠脾脏的交感神经后体液免疫应答增强,提示交感神经具有抑制免疫的效应<sup>[7]</sup>。

应激可引起交感神经的兴奋,该系统对急性低氧应激中的细胞免疫有无调节作用,至今尚未阐明,我们观察 NE 对 T-淋巴细胞转化的作用。观察到急性低氧时下丘脑儿茶酚胺水平升高,侧脑室注入 NE 可抑制 T-淋巴细胞转化,急性低氧侧脑室注入  $\alpha$  受体阻断剂酚妥拉明可部分反转 T-淋巴细胞转化功能的降低,表明中枢 NE 参与急性低氧下的细胞免疫调节。

本研究在探讨中枢 NE 参与急性低氧的细胞免疫调节的同时,检测了血液中 CRF 水平的变化,以期了解急性低氧下中枢 NE 的细胞免疫调节中是否与下丘脑神经肽 CRF 有一定关系。结果发现 7 km 10 h 急性低氧血液中 CRF 水平升高,侧脑室注入 NE,血液中 CRF 水平也升高,7 km 10 h 急性低氧时侧脑室注入 phentolamin 则降低,CRF 对体外培养的低氧大鼠脾 T-淋巴细胞转化呈明显的浓度依赖性递减的作用。这些观察提示,NE 参与的细胞免疫调节作用可能通过  $\alpha$  受体刺激 CRF 释放而发挥间接作用。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<sup>[8,9]</sup>。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<sup>[10]</sup>,在体实验表明, $\alpha_1$  和  $\beta$  受体参与介导 NE 和 E 对 CRF 释放的促进作用<sup>[11]</sup>。

本研究检测了血液中 CRF 水平,它反映的是血浆和血细胞中 CRF 含量之和。Yokoe 的实验认为外周血浆 CRF 来源于下丘脑,其变化可反映下丘脑中 CRF 的变化<sup>[12]</sup>;目前也有实验证明外周组织中也存在 CRF,大鼠胸腺和脾脏中即有 CRF mRNA 的表达<sup>[13]</sup>,它们被称为组织 CRF,应激时组织 CRF 也发生变化,因此,本研究的血液 CRF 水平变化可能反映了下丘脑和外周组织中 CRF 的综合变化。

关于 CRF 影响免疫机能的途径至少有两条:(1) CRF 通过刺激 ACTH 的释放而促进糖皮质激素(GC)的分泌,后两者均具有广泛的免疫抑制效应;(2) CRF 借助于免疫细胞膜上的受体而直接影响免疫细胞,有实验证明 CRF 抑制人外周血单个核细胞分泌 IL-1 $\beta$  及 IL-6,妊娠时 CRF 及 GC 在血浆中浓度均升高,故可能抑制母体对胎儿的免疫反应,鉴于 CRF 可由胸腺及脾脏等免疫器官合成,故外周 CRF 可能具有重要的生理性免疫调节作用。本研究中 CRF 究竟是经这两条途径还是经其中一条途径抑或其它途径影响了细胞免疫,有待于进一步研究。

本研究的慢性低氧同样抑制 T-淋巴细胞转化,此种低氧条件下神经内分泌是如何调节 T-淋巴细胞转化的,本文未作探讨。推测可能与动物营养不良有关。本实验发现 7 km 低氧 7 d,体重比对照明显下降,低氧 20 d 则更低,而 7 km 急性低氧 1 d,无体重下降现象,提示慢性低氧可使大鼠呈现营养不良状态。而营养不良大鼠的 T-淋巴细胞转化功能下降<sup>[14]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Blalock JE, Smith EM. The immune system: Our mobile brain? *Immunol today*, 1985, **6**: 115~117
- [2] Bateman A, Singh A, Kral T, et al. The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr Rev*, 1989, **10**: 92~112
- [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] 杜继曾,尤治秉. 高原鼠兔下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子的放射免疫测定. *兽类学报*, 1992, **12**: 223~229
- [5] 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
- [6] Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunological Reviews*, 1987, **100**: 225~260
- [7] Besedovsky HO, del Rey AE, Sorkin E, et al. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell Immunol*, 1979, **48**: 346~355
- [8] Plotsky PM, Cunningham ET, Widmaier EP. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev*, 1989, **10**: 437~458
- [9] Guillemin V, Conte-Devolx B, Szafarczyk A, et al. The corticotropin-releasing factor release in rat hypophysial portal blood is mediated by brain catecholamines. *Neuroendocrinology*, 1987, **46**: 143~146
- [10] Plotsky PM. Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology*, 1987, **121**: 924~930
- [11] Szafarczyk A, Malaval F, Laurent A, et al. Further evidence for a central stimulatory action of catecholamines on adrenocorticotropin release in the rat. *Endocrinology*, 1987, **121**: 883~892
- [12] Yokoe T, Audhya T, Brown C, et al. Corticotropin-releasing factor levels in the peripheral plasma and hypothalamus of the rat vary in parallel with the pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 1988, **123**: 1348~1354
- [13] Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc*

*Natl Acad Sci USA*, 1993, 15: 7104~7108

- [14] 郭长江,徐琪寿,韦京豫等.蛋白质营养不良大鼠血浆蛋白水平与细胞免疫功能的动态变化.营养学报,1996,18: 30~34

*Acta Physiologica Sinica*

1997, 49 (3), 261~266

## NOREPHINEPHRINE REGULATION OF T-LYMPHOCYTE PROLIFERATION OF RAT DURING ACUTE HYPOXIA

BAI HAI-BO, DU JI-ZENG

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

\* Biological and Technical Department, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

### ABSTRACT

Interaction between the immune and neuroendocrine systems has long been noted. In the present study, the role of norepinephrine (NE) in immunoregulation of rats during simulated hypoxia in hypobaric chamber was examined. It was found that 7 km for 24 h of hypoxia inhibited T-lymphocyte proliferation by 41%. 7 d and 20 d of hypoxia, simulating 5 km altitude, reduces T-lymphocyte proliferation respectively 34% and 60%. Intracerebroventricular (icv) injection of  $5 \times 10^{-6}$  mol/L NE decreased T-lymphocyte proliferation by 29%. ICV injection of phentolamine 25  $\mu$ g/rat prior to 7 km for 10 h hypoxia attenuated the hypoxia-induced suppression of T-lymphocyte proliferation from 42% to 21%. In addition, 7 km 10 h hypoxia increased CRF levels in blood and catecholamines in hypothalamus. An increased circulation CRF level was also noted after NE injection (icv) of  $5 \times 10^{-6}$  mol/L. Hypoxia corresponding 7 km altitude for 10 h stimulates spleen-lymphocytes incubated with CRF, but T-lymphocyte proliferation decreased with increasing CRF concentration. These findings suggest that hypoxia inhibits T-lymphocyte proliferation probably through an immune inhibition action by CRF-NE.

**Key words:** hypoxia; T-lymphocyte proliferation; NE; immunoregulation; CRF