

以兔抗鼠淋巴细胞血清为非条件 刺激的条件性免疫抑制*

林文娟** 陈极寰

A.J. Husband

(中国科学院心理研究所脑-行为研究中心,北京 100101) (Department of Veterinary Pathology, University of Sydney, NSW 2006)

摘要 采用一种生物类免疫抑制剂—兔抗鼠淋巴血清(rabbit anti-rat lymphocyte serum, ALS)为非条件刺激(UCS)、糖水为条件刺激(CS),以双瓶给水法置于鼠笼前端饮用偏好侧。在一次性CS—UCS结合训练后,单独再次给予CS,使卵清蛋白(OVA)免疫过的大鼠表现出脾淋巴细胞对有丝分裂原PWM的增殖反应降低、血抗OVA抗体的总量及脾内抗OVA抗体生成细胞的减少。但动物未表现出条件性味觉厌恶的行为反应。这些结果表明条件性免疫抑制与味觉厌恶性行为条件反射没有必然联系,并非是厌恶行为反应或情绪应激的伴随产物,UCS也并非必需具有感觉的毒副作用。条件性免疫抑制是脑高级神经活动调节免疫功能的结果。

关键词 兔抗鼠淋巴细胞血清,味觉厌恶,条件刺激,条件反射性免疫抑制,大鼠。

分类号 B845

近年来,中枢神经系统与免疫系统各自独立调节的传统观念受到了挑战^[1~3]。大量证据提示,免疫功能受神经精神活动的调节,其中条件反射性免疫调节的研究是一个重要方向^[4~8]。在这一领域中大部分工作采用味觉厌恶性条件反射的动物行为模式进行条件性免疫抑制的研究,即使用具毒副作用性胃肠道效应的免疫抑制药物如环磷酰胺、环孢霉素A等作为非条件刺激(unconditioned stimulus, UCS)^[6~8],与新奇味觉物质通常是糖精水的摄入作为条件刺激(conditioned stimulus, CS),经过一次或多次结合,单独给予糖水时造成动物对糖精水的厌恶性反应,并强化了非条件刺激所产生的免疫抑制效应。在这些研究中条件性的免疫抑制反应(CIS)伴随着味觉厌恶行为性条件反射(CTA)的建立。故有人称条件反射性免疫为行为免疫。但我们发现CIS与CTA的表现方式和时程并不同步^[9],并提出:从两者性质上看,条件反射性免疫功能变化产生的过程与经典的巴甫洛夫条件反射基本一致,即通过条件反射训练,将无关刺激转化为具非条件刺激的性质,条件性反应与非条件性反应同质。而味觉厌恶性条件反射是一种情绪学习模式,这一种学习反应更具操作性条件反射的性质,这里的条件性

反应与非条件性反应不同质。故CIS不是CTA的产物,与CTA也不一定相互伴随出现。

为进一步验证我们的看法,本工作采用一种非厌恶性免疫抑制剂作为非条件刺激。兔抗鼠淋巴血清(rabbit anti-rat lymphocyte serum, ALS)被证实是一种生物免疫抑制剂,它能导致淋巴细胞的减少和非特异性免疫应答力的降低,但并不伴有明显的毒性作用^[10,11]。检验ALS是否可作为有效的UCS建立条件反射性免疫应答,将对分析和理解条件反射性免疫的实质有所助益。为此,本实验采用ALS为非条件刺激,糖水为条件刺激,从体液免疫功能和细胞免疫功能两方面观察条件反射性免疫应答。

1 材料与方法

1.1 实验对象

32只雄性Wistar大鼠,体重约320克,鼠龄约120天。单笼饲养,温度控制在 $22^{\circ} \pm 1^{\circ}C$,12小时光/暗交替,每天早8点开始照明。动物入实验室后先经10天适应期以适应新环境,此期间动物自由饮水、取食。动物在其适应期进行卵清蛋白(OVA100 μ g/只)的免疫。随后是14天的控制饮期。每天在同一时间将两个水瓶置于每个笼子的前

收稿日期:2001-10-12。

*本研究受中科院创新项目(KSCX2-2-03)和国家自然科学基金项目(39830130,39770265)的资助。

**通讯作者,林文娟 E-mail: Linwj@psych.ac.cn

端,给水 15 分钟后撤走水瓶。控水期间,动物表现出饮水位置偏好。

1.2 实验程序

在条件反射训练日(第 0 天),将全部动物随机分成 3 组:条件反射组(Sac/ALS, $n = 12$)、条件刺激对照组(Sac/NRS, $n = 8$)、非条件刺激对照组(Wat/ALS, $n = 12$)。给予条件反射组大鼠(Sac/ALS)一瓶 0.25% 糖精水(Sac)和一瓶清水,糖精水瓶置于笼前动物的饮水位置偏好侧,饮用 15 分钟后给予腹腔内注射 ALS(0.2ml/只);条件刺激对照组(Sac/NRS)动物也饮用一瓶糖精水和一瓶清水,饮用 15 分钟后随即被注射无活性的正常兔血清(normal rabbit serum, NRS),剂量为 0.2ml/只,以控制喝糖精水以及注射血清等操作程序的影响;Wat/ALS 对照组饮用两瓶清水,15 分钟后立即腹腔注射与 Sac/ALS 等剂量的 ALS,以控制 ALS 的非条件性免疫抑制效应。在条件反射训练后第 8 天,给大鼠注射与初次免疫相等剂量的 OVA,注射后 4 小时,给 Sac/ALS、Sac/NRS 两组呈现 CS,也即同时给予清水和糖精水,而给 Wat/ALS 组两瓶清水。两天后(第 10 天),再次给 Sac/ALS、Sac/NRS 组动物呈现 CS。24 小时后,将其断头采集血及脾脏,分别用于测定 Con A 和 PWM 诱导的脾细胞增殖反应、抗 OVA Ig A 和 Ig 抗体总数及脾脏内抗 OVA 抗体生成细胞。整个实验期记录清水和糖精水的饮用量。条件反射实验程序见表 1。

表 1 条件反射实验程序

组别	条件反射训练日 第 0 天	条件刺激日 第 8 天	条件刺激日 第 10 天	取样日 第 11 天
条件反射组 ($N = 12$)	Sac + ALS	Sac	Sac	脾、血
条件刺激对照组 ($N = 8$)	Sac + NRS	Sac	Sac	脾、血
非条件刺激对照组 ($N = 12$)	Wat + ALS	Wat	Wat	脾、血

注: Sac 糖精水(Saccharin), Wat 水(water), ALS 兔抗鼠淋巴血清(rabbit anti-rat lymphocyte serum), NRS 正常兔血清(normal rabbit serum)。

1.3 抗 OVA 免疫球蛋白 A 和抗 OVA 抗体总数

将收集的体制成血清,用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法测抗 OVA IgA 及 Ig 抗体总数。将 Nunc 聚苯乙烯 96 孔平底板用 100 μ l OVA 包被(Sigma 化学公司生产,用 PBS 缓冲液配制成 1mg/ml 浓度),4 \times 下放置过夜,用 PBS(含 0.05% Tween)洗板两次,双蒸水洗一次。每孔加 100 μ l 1% 牛血清白蛋白(BSA),室温孵育 1 小时,洗板。将序列梯度稀释的待测血清(用含 0.05% Tween 的

PBS 溶液稀释)重复加入孔中,室温孵育 1 小时后洗板。用 1/4000 稀释度的羊抗鼠 IgA(用以测定 IgA)或 1/10000 羊抗鼠 Ig(G,A,M)(用以测定 Ig 总量)包被,剂量为 100 μ l/孔,室温下孵育 1 小时后再次洗板。加入浓度为 1mg/ml 的邻苯二胺(OPD)及 0.1 (hydrogen peroxide 底物缓冲液(100 μ l/孔),5 分钟后加 4M 硫酸(50 μ l/孔)终止反应。Titertek Multiscan 酶标仪(Flow Laboratory) 405nm 下读板、记录吸光度(OD)、以 ELISA 单位(EU)作标准曲线图。

1.4 脾内抗 OVA 抗体生成细胞的测定

用组织免疫荧光染色法测定脾内抗 OVA 抗体生成细胞(Anti-OVA Containing Cells, AOCC)。取横断面约 2mm 的脾组织块,在 4 \times 下将组织块依次置于下列溶液中固定:95%乙醇 4 小时、100%乙醇若干天、二甲苯 2 小时。然后在室温下将组织块用石蜡包埋并制成 15 μ m 厚度的石蜡切片。在免疫荧光染色前切片要经 chromotrope stain 亲和染色的预处理以封闭细胞的自体荧光,然后在室温下切片再次用 OVA(1mg/ml)染色,加荧光素结合的兔抗 OVA 抗体。每一步在反应 20 分钟后用 PBS 洗 30 分钟。封固染过的切片并置于 Zeiss Universal 荧光显微镜下观察,40 倍物镜下扫描 30 个视野。每一视野 0.35mm 宽。

1.5 淋巴细胞增殖反应

将大鼠脾脏收集在盛有 RPMI1640 液的试管内,然后取出用不锈钢筛捣碎后放入含 5% 热失活胎儿腓肠血清(FCS)、100IU/ml 青霉素、100 μ l/ml 链霉素及 0.5% 无机盐的 PBS 缓冲液。在 PBS 中洗 3 次,在不含无机盐的 RPMI1640 培养基液中加入 0.2mM L-谷氨酰胺及 5 $\times 10^{-2}$ M-mercaptoethanol,制成浓度 1 $\times 10^6$ 细胞/ml 的细胞悬液。然后加入 96 孔平底板中,0.2ml/每孔,并同时分别加入 1/100 美洲商陆有丝分裂原(pokeweed mitogen, PWM)、3.12 μ g/ml 刀豆素 A(concanavalin, Con A)(Sigma)的 96 孔板中培养。每一样品三复孔,空白孔加 PBS 替代有丝分裂原,在 37 \times 、5% CO₂ 保湿环境中孵育 48 小时,掺入 0.5 μ ci 氚标记胸腺嘧啶核苷(³H-thymidine, ³H-TdR)孵育 24 小时后用多头细胞收集器收集,用 Racteta 液闪测定仪上测定放射活性以 cpm 值表示。

2 结果

2.1 味觉厌恶条件反射(CTA)

条件反射组 Sac/ALS 和糖精水对照组 Sac/

NRS 的糖精水饮用量见图 1a。双因素方差分析表明组间效应不显著, $F(1, 18) = 0.05, p > 0.05$; 日程效应也不显著, $F(2, 18) = 2.50, p > 0.05$; 两因素之间也无交互作用, $F(2, 18) = 4.03, p > 0.05$ 。虽然 Sac/NRS 组动物在再次给 CS 时其糖精水饮用量较条件反射训练日稍高, 但与 Sac/ALS 组无差异; 而 Sac/ALS 组在条件反射训练日和再次给 CS 时其糖精水饮用量几乎相等, 并未对 CS 产生显著味觉厌恶行为反应。三个实验组的液体饮用总量(糖精水 + 清水)的均值见图 1b。方差分析表明无显著组间效应, $F(2, 29) = 0.37, p > 0.05$; 日程效应 ($F(2, 29) = 2.83, p > 0.05$) 及交互作用 ($F(4, 29) = 1.78, p > 0.05$) 也都不显著, 表明全部三个实验组在所有条件下饮用的液体总量几乎相等, 无缺水或口渴的现象。

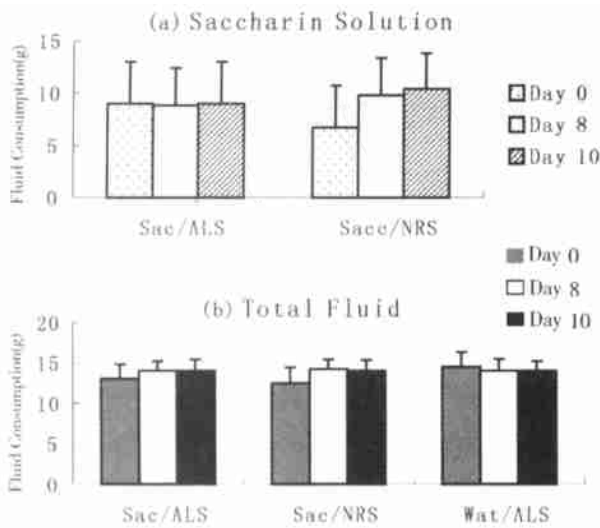


图1 各组动物糖精水和液体总量(糖精水 + 清水)的饮用量 ($M \pm SD$)

注: Sac/ALS: 条件反射组; Sac/NRS: 条件刺激对照组; Wat/ALS: 非条件刺激对照组。

Day 0: 条件反射训练日, Day 8: 条件反射训练后第 8 天呈现 CS; Day 10: 条件反射训练后第 10 天呈现 CS。

2.2 脾淋巴细胞增殖反应

图 2 为三个实验组脾淋巴细胞在 Con A & PWM 刺激下的增殖反应。单因素方差分析表明: 三组动物脾淋巴细胞对 ConA (刺激 T 细胞) 的增殖反应方面无显著的差异, $F(2, 29) = 0.30, p > 0.05$, 但 Sac/ALS 组表现出条件性免疫抑制的趋势。对 PWM (刺激 T, B 细胞) 的增殖反应三组动物有显著差异, $F(2, 29) = 3.75, p < 0.05$ 。Post hoc Newman-Keuls 分析表明: PWM 刺激的增殖反应中 Sac/ALS 组明显低于 Sac/NRS 组 ($p < 0.05$)。

该结果表明条件反射作用强化了 ALS 对 T, B 细胞免疫反应的总抑制效应。

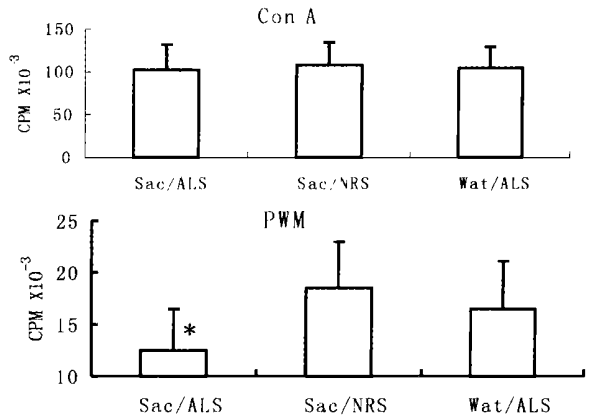


图2 各组动物脾淋巴细胞对 Con A 和 PWM 转化反应 ($M \pm SD$)
注: Sac/ALS: 条件反射组; Sac/NRS: 条件刺激对照组; Wat/ALS: 非条件刺激对照组;

*与 Sac/NRS 与 Wat/ALS 比, $p < 0.05$

2.3 抗 OVA Ig A 及 Ig 抗体生成总量

三组动物血清抗 OVA IgA 和抗 OVA Ig 总量见图 3。单因素方差分析表明三组动物抗 OVA Ig 总量有显著组间差异, $F(2, 29) = 4.12, p < 0.05$ 。Post hoc Newman-Keuls 分析比较中, Sac/ALS 组的 Ig 抗体总量均显著低于 Sac/NRS 组和 Wat/ALS 组 ($p < 0.05$)。抗 OVA IgA 的抗体量则无统计学上的组间差异, $F(2, 29) = 0.67, p > 0.05$, 但 Sac/ALS 组表现出条件性免疫抑制的趋势。这些结果提示, 条件反射对体液免疫的影响更能在免疫抑制过程的总体变化上体现。

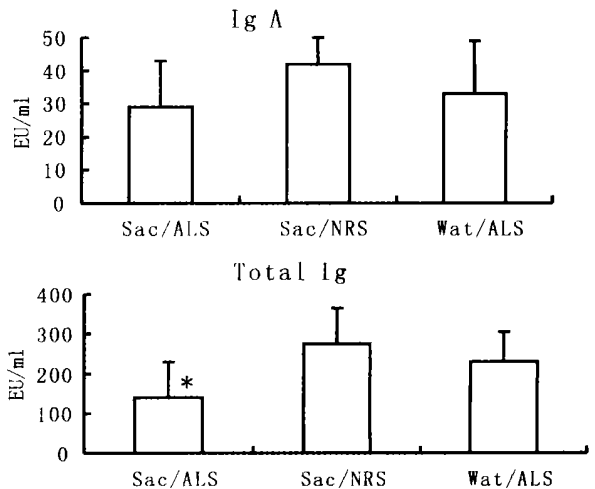


图3 各组动物抗 OVA IgA 和 Ig 总量水平 ($M \pm SD$)

注: Sac/ALS: 条件反射组; Sac/NRS: 条件刺激对照组; Wat/ALS: 非条件刺激对照组。

*: 与 Sac/NRS 比, $p < 0.05$ 。

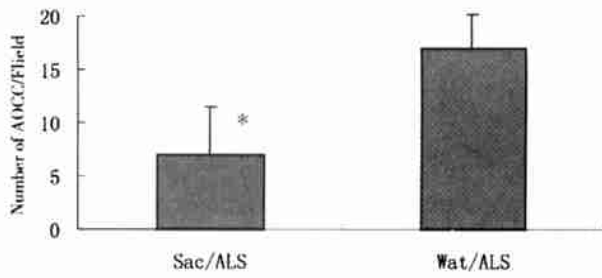


图4 条件反射组与非条件反射组动物脾内抗 OVA 抗体生成细胞数 ($M \pm SD$)

注: Sac/ ALS: 条件反射组; Sac/ NRS: 条件刺激对照组; Wat/ ALS: 非条件刺激对照组

*与 Wat/ ALS 比, $p < 0.05$

2.4 脾脏内抗 OVA 抗体生成细胞(AOCC)

如图 4 所示, Sac/ ALS 组的 AOCC 数目只是 Wat/ ALS 组的一半, t 检验差异显著 ($p < 0.05$)。该结果与 Sac/ ALS 组抗 OVA Ig 总量显著低于 Wat/ ALS 组的结果一致。这再次证明条件反射组动物条件反射性免疫抑制的建立。

3 讨 论

自 Ader 和 Cohen 1975 年报道了条件性免疫抑制现象以来^[13], 大量研究利用味觉厌恶模式在各种系的大鼠和小鼠上诱导出了各种各样的条件反射性免疫抑制效应^[4-8], 证明味觉厌恶学习模式是建立条件反射性免疫抑制的有效手段; 条件反射性免疫抑制是可重复的现象。但在以往大部分研究中, 基本上是用药物性而非生物性免疫抑制剂作为非条件刺激, 且条件反射性味觉厌恶反应 (CTA) 与条件反射性免疫抑制 (CIS) 交织在一起, 因而 CIS 被看做是脑高级神经活动调节免疫功能的证据并不完全令人信服, 不少学者认为这可能是动物对糖精水的厌恶反应或情绪应激的产物。

本实验表明生物性免疫抑制剂 ALS 作为 UCS 时, 也能建立条件性的免疫抑制效应。条件反射组动物其脾细胞对 PWM 的增殖反应, 及血和脾抗 OVA 抗体生成量都得到了条件反射性免疫调节, 也即使 OVA 免疫过的动物在细胞免疫功能和体液免疫功能上都建立了 CIS。但 ALS 作为 UCS 建立的 CIS 并不伴有条件反射性味觉厌恶行为, 如结果所示, 条件反射组动物与糖精水对照组动物在再次呈现 CS 时所喝的糖精水量无明显差异。故本实验条件下条件反射组动物的免疫反应的调节即 CIS 不受味觉厌恶行为反应或情绪应激的影响, 提示条件反

射性免疫在脑中有特异的调节机制。我们曾证明 CTA 与 CIS 的表现方式和表现时程并不同步, 本实验结果与我们以往的发现相吻合^[9]。不同的是, 在以往用环磷酸胺为 UCS 的工作中曾观察到, 只有进行过两次 CS - UCS 结合训练而不是一次训练的动物才表现出明显的条件性免疫抑制效应。而本实验中, 一次 CS - UCS 结合训练即能使动物在细胞免疫功能和体液免疫功能上表现出明显的条件性免疫调节效应, 这可能与作为 CS 的糖精水被置放在动物饮水偏好侧, 因而加强了 CS 的信号作用有关。CS 呈现的时程也可能是另一重要原因。为选择合适的时机呈现 CS, 实验前对 ALS 的免疫抑制效应进行了预试。在预实验中, 分别在动物 (各组 $N = 4$) 注射了 ALS (剂量 0.2ml/只) 或相等剂量的 NRS 后的 5 天、10 天和 20 天观察脾淋巴细胞对 ConA 和 PWM 的增殖反应, 发现 ALS 对脾淋巴细胞对 ConA 和 PWM 的增殖反应的抑制效应在注射后 5 天非常显著 (与 NRS 组比 t 检验均为 $p < 0.01$), 10 天时免疫抑制效应下降 (t 检验 $p > 0.05$ 和 < 0.2), 20 天时消失 (见图 5)。考虑到当 ALS 的非条件性免疫抑制效应很强时可能掩盖由 CS 引起的条件性抑制效应, 使较小的条件性免疫抑制效应难以显著地表现出来, 故本实验将条件刺激选择在条件反射训练后第 8 天和第 10 天进行。Alvarez-Borda 等也发现, 当用抗原引起的非条件性抗体反应趋于微弱甚至检测不出时, 给予条件刺激才诱发出明显的条件性抗体

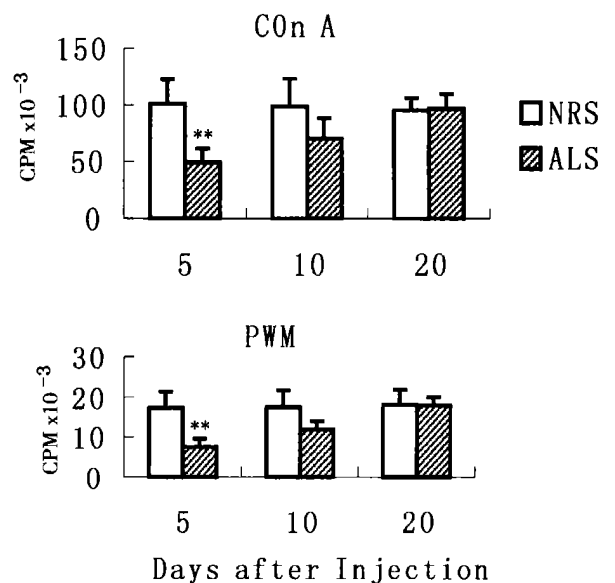


图5 ALS 对动物脾淋巴细胞对 ConA 和 PWM 的转化反应 ($M \pm SD$) 的非条件性免疫抑制
注: **与 NRS 比, $p < 0.01$

反应^[13]。

另需提出的是,在以往有关条件性免疫抑制的研究中大多采用一瓶液体的给水方式,这就很难排除在再次单独呈现 CS 时因味觉厌恶而使糖精水饮用量不足所造成的渴因素的影响。本实验采用了两瓶液体(糖精水和清水)同时给水方式,即便动物建立了 CTA 而少饮糖精水也可以从喝清水中得到补充,从而排除可能的渴因素的干扰。Smotherman 等证实两瓶水方式能消除渴应激或喝还是不喝糖精水的矛盾所致的肾上腺皮质酮的升高^[14]。事实上,本实验中条件反射组动物不论是糖精水饮用量还是液体的总饮用量与其相应的对照组均无差异。因此, CIS 是条件刺激的作用,对 CIS 的合理解释是脑中 CS—UCS 的偶联过程,而非情绪应激或厌恶行为或饮水量不足的影响。CIS 的机制可能是中枢神经系统储存了对条件刺激(CS)的知觉信息,该刺激与 UCS 的免疫抑制反应性相偶联,CS 再次呈现时就产生一个直接信号激活免疫系统引起反应。已有研究提示某些脑区在条件性免疫抑制的建立中起着重要作用^[15]。

参 考 文 献

- Ader R, Cohen N, Felten D. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet*, 1995, 345: 99 ~ 103
- Besedovsky H O, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Rev*, 1996, 17(1): 64 ~ 102
- Lin Wenjuan. Review and research ideas on psychoneuroimmunology. *Acta Psychologica Sinica*, 1997, 29(3): 301 ~ 305
(林文娟. 心理神经免疫学的研究及其思路问题, *心理学报*, 1997, 29(3): 301 ~ 305)
- Hiramoto R, Rogers C, Demissie, et al. The use of conditioning to probe for CNS pathways that regulate fever and cell activity. *Int. J. Neuroscience*, 1996, 84: 229 ~ 245
- Exton M S, Von Horsten S, Strubel T, et al. Conditioned alterations of specific blood leukocyte subsets are reconditionable. *Neuroimmunomodulation*. 2000, 7: 106 ~ 114
- Klosterhalfen S, Klosterhalfen W. Classically conditioned effects of cyclophosphamide on white blood cell counts in rats. *Ann NY Acad Sci*, 1987, 496: 569 ~ 577
- Von Horsten S, Exton MS, Schult M, et al. Behaviorally conditioned effects of Cyclosporine A on the immune system of rats: specific alterations of blood leukocyte numbers and decrease of granulocyte function. *J Neuroimmunol*, 1998, 86: 193 ~ 201
- Exton MS, Schult M, Donath S. Conditioned immunosuppression makes subtherapeutic cyclosporin effective via splenic innervation. *Am J Physiol*, 1999, 276: 1710 ~ 1717
- Lin Wenjuan, Wei Xing, Guo Youjun, et al. Study on conditioned immunosuppression and conditioned taste aversion. *Acta Psychologica Sinica*, 1998, 30(4): 418 ~ 422
(林文娟, 卫星, 郭友军等. 味觉厌恶性条件反射与条件反射性免疫抑制的研究. *心理学报*, 1998, 30(4): 418 ~ 422)
- Gozzo J J, Rkowlenko M. Augmentation by donor bone marrow of the survival of neonatal skin transplants to ALS-treated recipients. *Transplant Proc*, 1987, 9: 470 ~ 471
- Markees T G, De Fazio S R, Gozzo J J. Prolongation of adult skin allograft survival by cotransplantation of neonatal skin in antilymphocyte serum and donor bone marrow cell-treated mice. *Transplantation*, 1990, 50: 911 ~ 914
- Ader R, Cohen N. Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosomatic Medicine*, 1975, 37: 333 ~ 340
- Alvarez-Border B, Ramirez-Amaya V, Perez-Montfort R, et al. Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiol. Learning Memory*, 1995, 64: 103 ~ 105
- Smotherman W P, Hennessey J W, Leviene S. Plasma corticosterone levels during recovery from LiCl produced taste aversions. *Behav Biology*, 1976, 16: 401 ~ 402
- Ramirez-Amaya V, Alvarez-Borda B, Ormsby CE, et al. Insular cortex lesion impair the acquisition of the conditioned immunosuppression. *Brain Behav Immun*, 1996, 10: 103 ~ 114

CONDITIONED IMMUNOSUPPRESSION TO RABBIT ANTI-RAT LYMPHOCYTE SERUM IN RATS

Lin Wenjuan , Chen Jihuan

(*Brain-Behavior Research Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*)

Alan Husband

(*Department of Veterinary Pathology, University of Sydney, NSW 2006*)

Abstract

Conditioned immunosuppression of rabbit anti-rat lymphocyte serum (ALS), a biological immunosuppressant, was assessed in the experiment using a two-bottle preference drinking procedure. The data showed that ovalbumine (OVA)-immunized rats conditioned by pairing a novel saccharin solution (CS) with an ip injection of ALS (UCS) showed conditioned immunosuppression in vitro PWM-induced spleen proliferation and in total anti-OVA Ig antibody production as well as in anti-OVA containing cells in spleen, but did not show conditioned taste aversion. These results suggested that there was no association between the conditioned taste aversion and the conditioned immunosuppressive responses and that the conditioned immunosuppression was not the concomitant of behavioral suppression, but the result of the CS-UCS associative learning mediated by the central nervous system.

Key words anti-rat lymphocyte serum, conditioned taste aversion, rat, conditioned immunosuppression.