

基础研究 论著

条件反射性细胞免疫抑制及其作用时程的实验研究

李杰¹, 林文娟², 李波¹, 卫星²

(1. 中国科学院心理研究所脑-行为研究中心,北京 100101;

2. 中国科学院心理健康重点实验室,北京 100101)

摘要:目的 了解条件反射性免疫抑制作用及其作用时程的特点。方法 利用条件反射性免疫抑制的动物模型,以糖精水为条件刺激(CS),免疫抑制剂-环磷酰胺为非条件刺激(UCS)观察了两次性CS-UCS条件结合训练后,再次呈现条件刺激诱导条件反射性味觉厌恶反应(CTA)和条件反射性免疫抑制(CIS)对细胞免疫功能的动态调节作用。结果 CTA可以稳定形成直至第30天,而在条件训练后再次给予条件刺激诱导CIS产生对细胞免疫功能的抑制作用在第5天可观察到有明显的统计学意义的差异,而在第15天表现为抑制作用减弱及第30天消退的现象。结论 味觉厌恶性条件反射和条件反射性免疫抑制反应在表现时程效应和表现方式上并不同步,条件反射性免疫抑制反应并不是味觉厌恶性条件反射的伴随反应,两者在脑中的调节机制可能相互各自独立。

关键词:条件反射性免疫抑制;细胞免疫;时程效应;大鼠

Time phases of conditioned cellular immunosuppression in rats Li Jie, LIN Wenjuan, LI Bo, et al. Brain-behavior Reseach Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101 China

Abstract: **Objective** To understand the nature of the conditioned immunosuppression (CIS) and examine the time phase of CIS and conditioned taste aversion (CTA). **Methods** Cyclophosphamide was used as an unconditioned stimulus (UCS) and saccharin was used as the conditioned stimulus (CS). Both CTA and CIS as assessed by cell proliferation were examined by one re-exposure to CS at intervals of 5, 15, 30 days after two trials of CS-UCS pairing. **Result** CTA occurred and the level remained at the every interval testing. However, CIS occurred obviously only on the 5th day after conditioning. CIS was attenuated on the 15th day and disappeared on the 30th day after conditioning. **Conclusion** There was no association between the conditioned immunosuppression and the conditioned taste aversion. Both of them have their own modulation mechanism in the center nervous system.

Key words: Conditioned immunosuppression; Conditioned taste aversion; Time phases; Rat

中图分类号: B845 文献标识码: A 文章编号: 1005-8559(2003)05-481-03

许多研究者用行为模式诱导出对体液免疫、细胞免疫、移植物抗宿主反应和NK细胞杀伤活动等免疫功能的条件反射性免疫抑制作用^[2-6],为了更全面地了解条件反射性免疫抑制作用的特点,本实验利用经典条件反射性免疫抑制的动物模型,观察了两次性CS-UCS条件结合训练后,不同时程再次呈现条件刺激诱导CIS对细胞免疫功能的动态调节作用。

材料与方法

一、实验动物

75只雄性Wistar大鼠,体重200~250g,鼠龄60d左右,购于北京医科大学实验动物中心。所有动物均单笼饲养,控制室温(22±1),12h光暗交替(7:00~19:00照明)。进入实验室最初4d为适应环境期,自由进食和饮水,并每日被抚摸2~3min以适应实验人员的操作。随后7天为定时饮水期,在此期间每天8:30给动物饮水,30min后撤走水瓶。

二、实验程序

开始实验的当日即条件反射训练日(第01天),所有大鼠被随机分成3组,条件刺激组(CS),非条件刺激对照组(UCS)和对照组(CS0),各组动物数见表1。给CS组动物一瓶自来水和一瓶0.25%SAC,饮30min

后撤走水瓶,立即腹腔注射免疫抑制剂-环磷酰胺(cyclophosphamide,CY)(50mg/kg,溶解于生理盐水至浓度20mg/ml)。UCS组动物饮用两瓶自来水,30分钟后腹腔注射相同剂量的CY。CS0组动物饮一瓶自来水和一瓶0.25%SAC,饮用30min后腹腔注射相应剂量的生理盐水。第2天(第02天)完全重复第1天的训练程序。然后分别在训练后第5、15和30d再次呈现单纯条件刺激,即给予CS和CS0组动物一瓶SAC和一瓶自来水,而给UCS组动物两瓶自来水,30min后撤走水瓶,腹腔注射生理盐水。24h后处死各组动物,取脾脏作淋巴细胞转化实验。同时记录条件反射训练和条件刺激测试当天动物SAC或清水的饮用量,整个实验程序如表1所示。

三、脾淋巴细胞转化反应

在超净工作台内无菌取出脾脏,放入RPMI1640溶液(GIBCO公司产品)中,经过200目不锈钢网磨碎后,过尼龙布,用Hanks液洗3次,制成4×10⁶/ml细胞悬液,然后加入96孔平底板中(0.2ml/孔),并同时分别加入浓度为8(g/ml)刀豆素A(ConA),5(g/ml)脂多糖(LPS),2.5(g/ml)美洲商陆(PWM)和100(g/ml)植物血凝素(PHA),每一样品重复三个孔,然后放入CO₂孵育箱中(37℃,5%CO₂)培育,48小时后加入3H-甲基胸腺嘧啶(3H-TdR)1(Ci/孔),继续培养12小时,然后以多头细胞收获器收集细胞于玻璃纤维纸上,烘干后用

基金项目:国家自然科学基金和中国科学院重点基金以及中国科学院创新工程资助(KSCX2-2-03)

计数仪测定放射活性,以 cpm 值表示。

表1 对细胞免疫功能的条件反射性免疫抑制的实验程序

| 组别 | 条件反射训练 | 条件刺激 | 取样 | 条件刺激 | 取样 | 条件刺激 | 取样 |
|-----|-----------|--------------------------------|-----|---------------------------------|------|---------------------------------|------|
| | 第01和02天 | 第5天 | 第6天 | 第15天 | 第16天 | 第30天 | 第31天 |
| CS | SAC + CY | SAC + SAL (n ₅ = 9) | | SAC + SAL (n ₁₅ = 9) | | SAC + SAL (n ₃₀ = 9) | |
| UCS | WAT + CY | WAT + SAL (n ₅ = 8) | 脾脏 | WAT + SAL (n ₁₅ = 8) | 脾脏 | WAT + SAL (n ₃₀ = 8) | 脾脏 |
| CS0 | SAC + SAL | SAC + SAL (n ₅ = 7) | | SAC + SAL (n ₁₅ = 8) | | SAC + SAL (n ₃₀ = 9) | |

注:表中 n 为动物只数, n 为条件训练后第 5 天各动物数; n 为条件训练后第 15 天各动物数; n 为条件训练后第 30 天各动物数。CS:条件刺激组; UCS: 非条件刺激对照组; CS0: 糖精水对照组; SAC: 糖精水; CY: 环磷酸胺; SAL: 生理盐水

四、数据处理

两组间数据比较采用 t 检验, P < 0.05 为有显著性差异。

结果

一、训练前后 SAC 饮用量

在第一个条件反射训练日,所有 CS 和 CS0 动物 SAC 饮用量都很接近。训练后第 5 天再次单独给予 SAC, CS0 组动物饮用量显著增加, CS 组动物饮用量则明显减少,并显著低于 CS0 组的水平(图 1, t 检验, P < 0.0001)。训练后第 15 和第 30 天单独给予 SAC 时,所有 CS0 组动物的饮用量都接近于第 5 天单独给予条件刺激的水平,而 CS 组动物的饮用量则保持在显著低于 CS0 组的水平(图 2, 图 3, t 检验 P < 0.0001)。

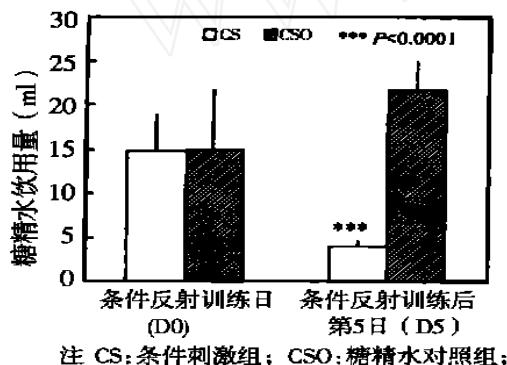


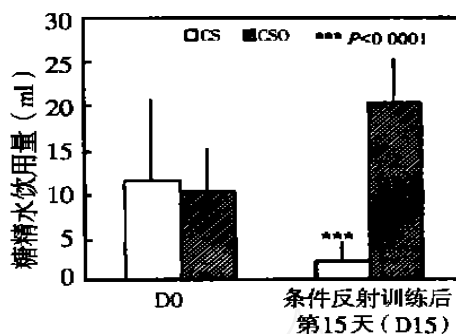
图1 条件反射训练前和训练后第 5 天再次条件刺激糖精水饮用量 (x ± s)

二、脾淋巴细胞增殖反应

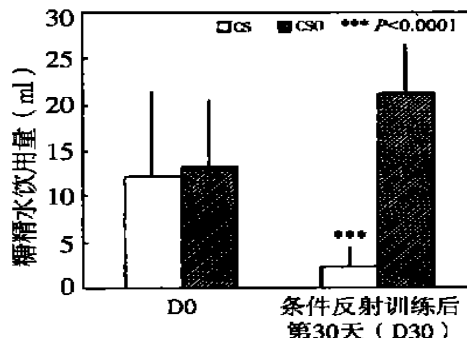
脾淋巴细胞对 ConA、PHA 和 PWM 的增殖反应的基础值在不同实验段有较大的批间差异,故每次测定 CS0 的值为 100%,以 CS 组和 UCS 组与 CS0 组的比值进行分析。

结果表明训练后第 5 天再次给予 CS 后, CS 组脾淋巴细胞的 ConA 和 PWM 转化反应的 cpm 值比 UCS 组显著降低(t 检验 P < 0.05), PHA 转化反应的 cpm 值与 UCS 组比表现出更显著的降低(t 检验 P < 0.01); LPS 转化反应反应水平虽然低于 UCS 组,但未达到统计学的显著水平(P > 0.05),如图所示(图 4 ~ 图 7)。

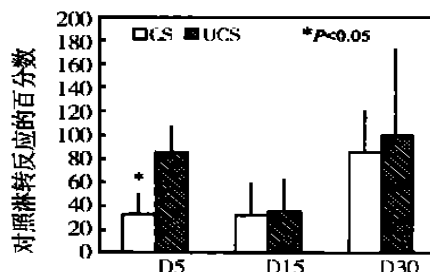
训练后第 15 天单独给予 CS 后, CS 组脾淋巴细胞除了对 PHA 转化反应的 cpm 值显著低于 UCS 组(图 5, t 检验 P < 0.05)外,对其他有丝裂原如 ConA、PWM 和 LPS 的增殖反应水平虽然显示出降低的趋势,但与 UCS 组比并无显著差异(t 检验 P > 0.05)。



注 CS: 条件刺激组; CS0: 糖精水对照组; 图2 条件反射训练前和训练后第 15 天再次条件刺激糖精水饮用量 (x ± s)



注 CS: 条件刺激组; CS0: 糖精水对照组; 图3 条件反射训练前和训练后第 30 天再次条件刺激糖精水饮用量 (x ± s)



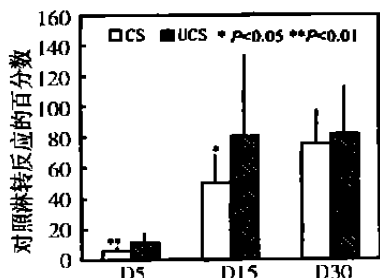
注: D5 训练后第 5 天给予 CS, D15 训练后第 15 天给予 CS, D30 训练后第 30 天给予 CS
CS: 条件刺激组; UCS: 非条件刺激对照组
图4 条件反射训练后第 5、15、30 天再次 CS 脾淋巴细胞对 ConA 的增殖反应 (x ± s)

训练后 30 天接受再次呈现 CS 后, CS 组与 UCS 组动物在脾淋巴细胞的 ConA、PHA、LPS 和 PWM 转化反应的 cpm 值无显著差异(t 检验 P > 0.05)。

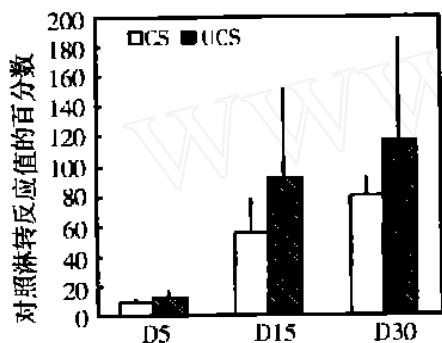
讨论

从训练前后动物饮用 SAC 量可以看出, CS0 组动物第 1 次饮 SAC 的量与 CS 组动物持平,再次给予 SAC 时饮用量显著增加,说明正常条件下,大鼠对 SAC 有明显偏好,但第 1 次饮用 SAC 对所有动物均是一种新

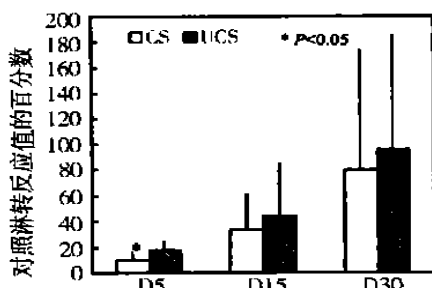
异刺激,饮用量比较低是动物正常的本能反应。而不论在训练后第 5 天还是第 30 天再次单独给予 SAC,CS 组动物饮用量均显著减少,表明 CS-UCS 结合训练使动物对 SAC 产生了强烈的厌恶反应,这种味觉厌恶性条件反射一经建立便非常稳定,即使在训练后 30 天仍然保持很高的水平。



注: D5 训练后第 5 天给予 CS, D15 训练后第 15 天给予 CS, D30 训练后第 30 天给予 CS
CS: 条件刺激组; UCS: 非条件刺激对照组
图 5 条件反射训练后第 5、15、30 天再次 CS 脾淋巴细胞对 PHA 的增殖反应 ($\bar{x} \pm s$)



注: D5 训练后第 5 天给予 CS, D15 训练后第 15 天给予 CS, D30 训练后第 30 天给予 CS
CS: 条件刺激组; UCS: 非条件刺激对照组
图 6 条件反射训练后第 5、15、30 天再次 CS 脾淋巴细胞对 LPS 的增殖反应 ($\bar{x} \pm s$)



注: D5 训练后第 5 天给予 CS, D15 训练后第 15 天给予 CS, D30 训练后第 30 天给予 CS
CS: 条件刺激组; UCS: 非条件刺激对照组
图 7 条件反射训练后第 5、15、30 天再次 CS 脾淋巴细胞对 PWM 的增殖反应 ($\bar{x} \pm s$)

在对脾淋巴细胞活性的检测中,ConA 和 PHA 所诱导的脾淋巴细胞增殖反应主要反映了 T 淋巴细胞的功能状态,LPS 诱导的增殖反应主要是 B 淋巴细胞功能的体现,而针对 PWM 的淋转反应是对 T、B 淋巴细胞综合能力的检验。对 UCS 组动物各种免疫指标的检测主要反映了 CY 对正常动物免疫功能的抑制作用随时间的变化过程。UCS 组动物在第 1 和第 2 次条件反射训练过程中仅仅腹腔注射了 CY,但上述各种有丝

裂原诱导的淋巴细胞转化反应在训练后第 5 天检测时显著低于 CS0 组,训练后第 15 天虽仍低于 CS0 组,但差异已不再显著,训练后 30 天则基本恢复到与 CS0 组相当的水平。这些结果说明 CY 在注射后 5 天内对 T、B 淋巴细胞的活性都有很强的抑制作用,15 天后抑制作用显著降低,30 天后细胞免疫功能已完全恢复正常。

训练后第五天再次呈现 CS 后,CS 组脾淋巴细胞的 ConA、PHA 和 PWM 转化反应均显著低于 UCS 组,表明 CS 增强了 UCS 对细胞免疫的抑制效应。训练后第 15 天再次给予 CS 时,各种有丝裂原所诱导的脾淋巴细胞转化反应虽然比较一致的低于 UCS 组,但差异没有达到显著水平,说明此时条件反射性免疫抑制作用已经开始消退。训练后第 30d 再次给予 CS,则对上述所有细胞免疫功能都没有明显的影响,说明在本实验条件下,CS 对细胞免疫功能的免疫抑制作用已经完全消退。

上述实验结果表明 CTA 可以稳定形成和长期保持,直至第 30 天由条件刺激诱导的 CTA 水平与第 5d 相似;而在条件训练后再次给予条件刺激诱导的细胞免疫功能的抑制作用可仅仅维持 5~15d,30d 后基本消失。这说明 CS 可非特异性地诱发细胞免疫功能的抑制,但这种免疫抑制作用相对比较短暂,并且与味觉厌恶反应不同步,证明条件反射性免疫抑制反应并不是味觉厌恶性条件反射的伴随反应。本次实验中获得条件性行为反应与免疫反应在不同时程分离的结果与我们实验室以往的工作推论相一致^[7]。即条件反射性免疫抑制反应并不是味觉厌恶性条件反射的伴随反应,条件反射性免疫抑制与味觉厌恶性条件反射在脑中的调节机制可能相互各自独立,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。有关脑的调节机制正在研究中。

[参考文献]

[1] Ader R, Cohen N. Behaviorally conditioned immunosuppression[J]. Psychosomatic Medicine, 1975, 37: 333-340.
[2] Hiramoto R, Rogers C, Demissie S, et al. The use of conditioning to probe for CNS pathways that regulate fever and NK cell activity[J]. Int J Neurosci, 1996, 84(1~4): 229-245.
[3] Klosterhalfen S, Klosterhalfen W. Classical conditioned effects of cyclophosphamide on white blood cell counts in rats[J]. Ann NY Acad Sci, 1987, 496: 569-577.
[4] Exton MS, Schult M, Donath S. Conditioned immunosuppression makes subtherapeutic cyclosporin effective via splenic innervation[J]. Am J Physiol, 1999, 276: 1710-1717.
[5] Von Hörsten 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]. J Neuroimmunol, 1998, 86: 193-201.
[6] Exton MS, Von Hörsten S, Strubel T, et al. Conditioned alterations of specific blood leukocyte subsets are reconditionable[J]. Neuroimmunomodulation, 2000, 7: 106-114.
[7] 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[J].心理学报,1998,Vol. 30(4): 418-422.

作者简介:李杰(1972-),女,毕业于天津中医学院,医学博士,现中国科学院心理研究所在站博士后,主要研究方向为心理神经免疫学。
收稿日期:2003-07-30 编辑校对:林立