

心理应激的免疫抑制作用及其与神经内分泌反应的相关性*

邵 枫 林文娟 王玮雯

(中国科学院心理研究所脑-行为研究中心, 北京 100101)

摘 要 以给予经定时喂水训练大鼠空瓶刺激为情绪性心理应激源,研究了此情绪应激对大鼠特异性原发体液免疫反应的影响及其可能的作用机制。结果表明每次 10 分钟,共 14 次的情绪应激显著降低大鼠抗特异性抗原 OVA 的抗体水平及脾脏指数,而显著增高血肾上腺素、去甲肾上腺素和皮质酮水平。研究还发现去甲肾上腺素与抗特异性抗原 OVA 的抗体水平呈显著负相关。该研究证实了情绪性心理应激对大鼠体液免疫功能的抑制作用,并提示交感神经系统可能参与了此免疫调节作用。

关键词 情绪应激,原发体液免疫反应,交感神经系统。

分类号 B845

1 前 言

自 1957 年 Marsh 和 Brill 发现应激性刺激可提高小鼠对单纯疱疹病毒的易感性以来^[1],大量动物实验已证实了应激的免疫调节作用。以往的动物实验多集中在物理应激源如电击、束缚应激等的免疫调节作用。近年来人们越来越重视与人类自然应激源相接近的心理应激源的研究。例如 Lysle 等发现电击装置诱发的条件反射性应激(心理应激)可降低动物自然杀伤细胞(NK)活性及有丝分裂原反应^[2];我们实验室以前的工作亦同样证实了此心理应激+电击对大鼠特异性原发体液免疫反应的抑制作用。但在这些研究中心理应激源的给予均是在物理应激源之后,即心理应激源是对已受物理应激源影响的免疫系统发挥调节作用,因此心理应激源的免疫调节作用易受到物理应激源的干扰。为此我们设计了以给予定时喂水训练大鼠空瓶刺激为情绪性心理应激源,同时设置了单纯缺水的生理应激源,观察了大鼠情绪应激后抗特异性抗原 OVA 的抗体水平,脾脏、胸腺指数,外周血白细胞总数及血儿茶酚胺(肾上腺素和去甲肾上腺素)、皮质酮含量的变化,旨在建立一个稳定的心理应激源免疫调节作用的模

型,并进一步探讨交感神经系统和下丘脑-垂体-肾上腺(HPA 轴)是否参与此免疫调节作用。

2 材料和方法

2.1 动物

60 只雄性 Wistar 大鼠,体重 250—300 克,鼠龄 3 个月左右,购于中国科学院遗传所动物中心。每只大鼠单笼喂养,控制室温($20 \pm 3^\circ\text{C}$)和照明(12 小时照明/12 小时黑暗,每天早 7 时开始照明)。适应期内所有动物自由饮食、水,适应期后动物定时饮水、自由饮食,饲料由北京市实验动物中心提供。

2.2 实验程序

所有动物分成 3 组,即情绪应激组(ES)、生理应激组(PS)和对照组(C),其中 ES 组动物和 C 组动物在一个房间内单笼喂养,而 PS 组动物则在另一房间内单笼喂养。所有动物经 1 周适应期后,进行定时喂水训练 10 天(仅每天早 9:00—9:10 和晚 21:00—21:10 给予饮水,其余时间不给水)。第 18 天对所有动物进行免疫,抗原是用卵清蛋白(grade V ovalbumin, OVA; Sigma 公司产品)溶于磷酸缓冲液(PBS)($\text{pH} = 7.3$),再用等量的弗氏完全佐剂(Gibco 公司产品)乳化而成,浓度为 $200\mu\text{g}/\text{ml}$,每只

收稿日期: 2000-10-11。

* 中国科学院重点基金,创新工程基金(KSCX2-2-03)和国家自然科学基金重点基金(39830130)项目。

通讯作者: 林文娟, E-mail: linwj@psych.ac.cn.

表1 实验程序

时间	组别	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
9:00—9:10	ES组	N	N	ES	ES	N	ES	ES	N	N	N	ES	N	N	N	ES
	PS组	N	N	PS	PS	N	PS	PS	N	N	N	PS	N	N	N	PS
21:00—21:00	ES组	ES	ES	N	ES	N	N	N	ES	ES	N	ES	ES	ES	N	
	PS组	PS	PS	N	PS	N	N	N	PS	PS	N	PS	PS	PS	N	

注: N: 正常饮水; ES: 空瓶刺激; PS: 单纯缺水; O: OVA注射日。

大鼠腹腔注射 $100\mu\text{g} / 0.5\text{ml}$ OVA。从免疫当天 (day 0) 晚 21:00—21:10 开始给予情绪应激刺激, 具体方法为在定时喂水期间给予 ES 组动物空瓶刺激诱发其情绪应激, 刺激的给予是无规律的, 一天一次 (早或晚) 或一天两次 (见表 1); PS 组动物在 ES 组接受空瓶刺激的同时亦无水喝, 但无空瓶刺激以排除生理缺水的影响; C 组动物则一直定时饮水, 同时观察 3 组动物在此期间的行为表现。这样连续给予两周, 于免疫后第 14 天给予 ES 动物情绪刺激后不撤空瓶立即对所有动物断头取血、胸腺和脾脏。

2.3 指标测定

血清抗 OVA IgG 抗体测定采用标准酶联免疫吸附法 (ELISA), 酶标仪为美国 BIO-RAD 公司产品 (基本步骤如下: ①用浓度为 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的 OVA 包被 96 孔板, 在 4°C 下过夜, 用含 0.05% Tween20 的 PBS 洗板 2 次, 双蒸水洗 1 次; ②用含 $0.005\mu\text{l}$ Tween 20/ ml 的 1% BSA 即牛血清白蛋白在室温下封闭 1 小时, 洗板同上; ③将稀释度为 1:100 的待测血清及 BSA 加入 96 孔板中, $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 室温下放置 1 小时, 洗板同上; ④用 BIO-RAD 公司生产的过氧化物酶标记的羊抗-鼠 IgG 在室温下包被 1 小时, $50\mu\text{l}/\text{孔}$, 洗板同上; ⑤将底物加入 96 孔板中, $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 室温下放置 5 分钟, 直到颜色充分显现; ⑥用 2N 硫酸终止反应, $50\mu\text{l}/\text{孔}$; ⑦在酶标仪上读吸光度 OD 值); 血清皮质酮测定采用免疫放射分析法, 测试药盒为美国 DPC 公司生产的 ^{125}I 标记的大鼠皮质酮专用药盒 COAT-A-COUNT, 仪器为 GC-911- γ 放射免疫计数器; 血浆儿茶酚胺测定采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography HPLC) 分析法, 仪器为日本岛津 10A 系列高效液相色谱仪。外周血白细胞总数测定应用 JXJ-6 白细胞分类计数器显微镜下计数; 脾脏、胸腺指数为脾、胸腺重量 mg 与体重 g 之比值。

2.4 统计方法

各组间数据比较和相关性分析应用 SPSS 统计

软件, one-way analysis of variance (ANOVA) 比较组间差异, $p < 0.05$ 为差异显著, 进一步 post-hoc 分析两组间差异采用 LSD, $p < 0.05$ 为差异显著。

3 结 果

3.1 情绪应激对大鼠抗 OVA 抗体水平和脾脏指数的影响

如图 1 所示, one-way ANOVA 分析表明抗 OVA 抗体水平组间差异显著 ($F = 3.563, p = 0.036$), 进一步 post-hoc 分析表明 ES 组抗 OVA 抗体水平较 PS 组显著降低 ($p = 0.012$), 其余组间无差异 ($p > 0.05$)。脾脏指数 (脾脏指数以公式: 脾重 $\text{mg} /$ 体重 g 计算) 的 one-way ANOVA 分析亦表明组间差异显著 ($F = 10.835, p = 0.000$), 进一步 post-hoc 分析表明 ES 组脾脏指数较 C 组和 PS 组均显著降低 ($p = 0.000, p = 0.01$), 而 C 组和 PS 组间无差异 ($p = 0.064$) (见图 2)。结果说明情绪应激可抑制大鼠特异性原发体液免疫反应。

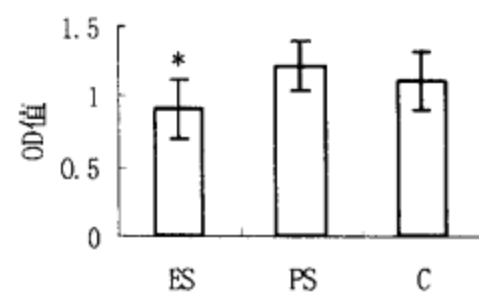


图1 情绪应激对抗体水平 ($M \pm SD$) 的影响

注: ES: 情绪应激组; PS: 生理应激组; C: 对照组下同。

抗体稀释度: 1:100。OD 值: 吸光度 (490nm)

*: $p < 0.05$, 与 PS 组相比较。

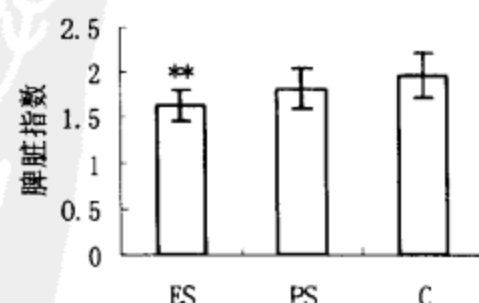


图2 情绪应激对脾脏指数 ($M \pm SD$) 的影响

注: ** $p < 0.01$, 与 PS 和 C 组相比较。

3.2 情绪应激对大鼠胸腺指数和外周血白细胞总数的影响

one-way ANOVA 分析表明胸腺指数(胸腺指数以公式:胸腺重量 mg/体重 g 计算)组间无显著差异($F = 3.115, p = 0.053$)(见图 3);而外周血白细胞总数(个/mm³)则差异显著($F = 3.604, p = 0.036$),进一步 post-hoc 分析表明 ES 组和 PS 组均较 C 组显著减少($p = 0.027, p = 0.022$),而 ES 组和 PS 组间比较无差异($p = 0.873$)(图 4)。

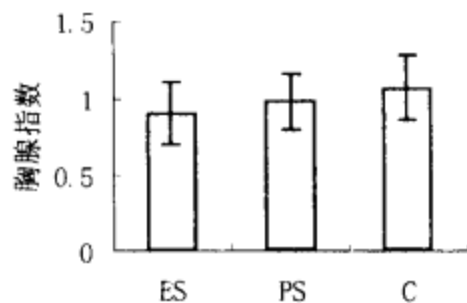


图3 情绪应激对大鼠胸腺指数(M±SD)的影响
注 * $p < 0.05$, 与对照组相比较。

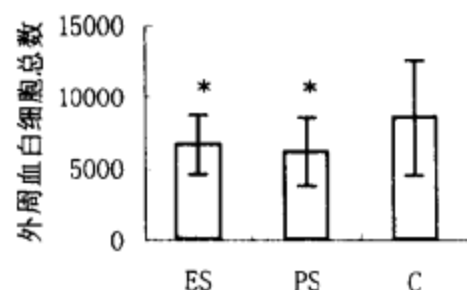


图4 情绪应激对大鼠外周血白细胞总数(M±SD)的影响

3.3 情绪应激对大鼠血儿茶酚胺和皮质酮的影响

one-way ANOVA 分析表明肾上腺素、去甲肾上腺素和皮质酮含量均存在组间显著性差异($F = 4.499, p = 0.018; F = 5.042, p = 0.012, F = 8.807, p = 0.002$),进一步 post-hoc 分析表明 ES 组肾上腺素含量较 C 组显著增高($p = 0.005$),ES 组和 PS 组间及 PS 组和 C 组间均无显著差异($p = 0.067, 0.388$)(图 5);ES 组去甲肾上腺素含量较 C 组和 PS 组均显著增高($p = 0.006, 0.016$),PS 组和 C 组间则无显著差异($p = 0.902$)(图 6);而 ES 组和 PS 组皮质酮含量均较 C 组显著增高($p = 0.001, 0.027$),ES 组和 PS 组间

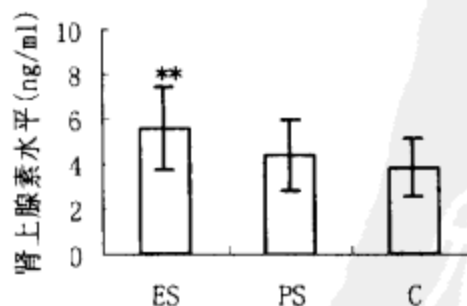


图5 情绪应激对大鼠肾上腺素含量(M±SD)的影响
注: ** $p < 0.01$, 与对照组相比较。

则无显著差异($p = 0.21$)(图 7)。结果表明情绪应激主要激活交感神经系统而释放儿茶酚胺类物质,单纯缺水的生理应激则主要激活 HPA 轴释放皮质酮。

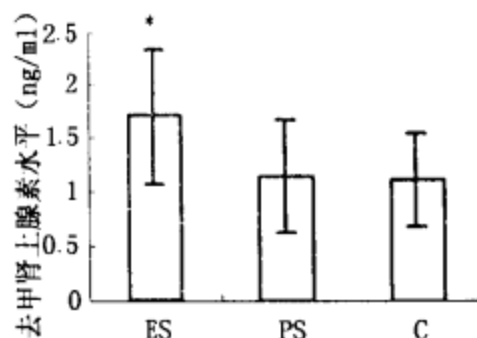


图6 情绪应激对大鼠去甲肾上腺素含量(M±SD)的影响
注: * $p < 0.05$, 与生理应激组和对照组相比较。

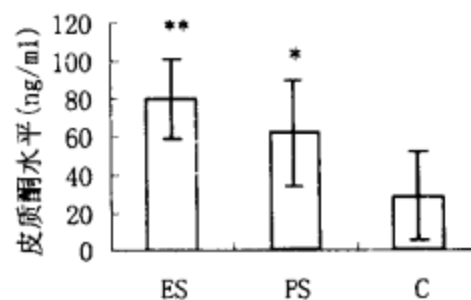


图7 情绪应激对大鼠皮质酮含量(M±SD)的影响
注 ** $p < 0.01$, 与对照组相比较, * $p < 0.05$, 与对照组相比较。

3.4 抗体 OD 值与去甲肾上腺素含量的相关性分析

SPSS 的相关性分析表明抗体 OD 值与去甲肾上腺素含量呈显著负相关($r = 0.564, p = 0.001$)(图 8)。结果提示交感神经系统可能参与了情绪应激的免疫调节作用。

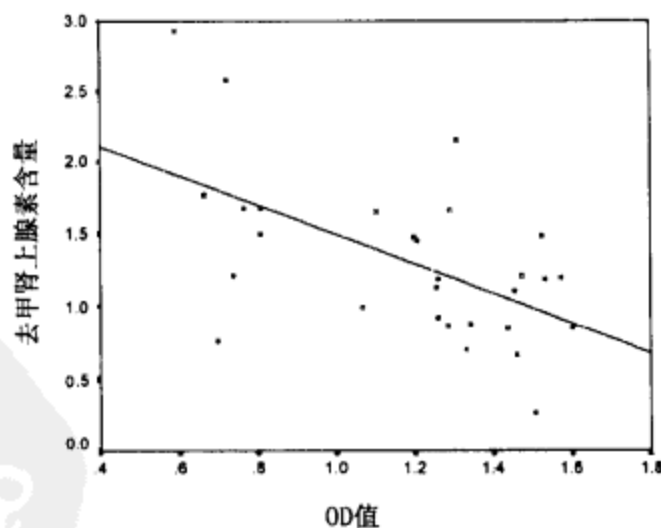


图8 抗体OD值与去甲肾上腺素含量的直线相关图

4 讨论

4.1 情绪应激对体液免疫反应的抑制作用

尽管应激的免疫抑制作用已为各国学者所接受,但目前有关心理应激源的免疫调节作用尤其是

其对体液免疫功能的调节作用的报道很少。Croiset G等的研究发现与足电击训练相结合的情绪应激降低大鼠体外有丝分裂原反应和体内绵羊红细胞(SRBC)体液免疫反应^[1];常青等的研究亦表明以电击装置为信号刺激的条件反射性心理应激源抑制大鼠有丝分裂原反应^{*}。在上述有限的报道中实验动物在被给予心理应激源之前均接受过物理应激源(足电击)的刺激,即心理应激源是作用于已被物理应激源影响的免疫系统,故难以证实心理应激源对正常免疫系统反应的作用。我们的实验则在抗原免疫当天即给予经定时喂水训练的情绪应激组大鼠空瓶刺激(情绪应激源),以诱发情绪性心理应激,而同样经定时喂水训练的生理应激组大鼠,既无水喝,又无空瓶刺激,以排除单纯缺水的生理应激作用,同时观察了应激后动物的行为和内分泌改变来确定其应激状态。根据实验结果,一方面,行为观察证实情绪应激组动物被给予空瓶刺激后表现出明显的攻击性行为,如咬笼子和空瓶,生理应激组动物仅有个别表现出探求行为,但无攻击性行为;另一方面情绪应激组动物皮质酮、肾上腺素及去甲肾上腺素水平均较对照组显著升高,其中去甲肾上腺素水平亦较生理应激组显著增高,而生理应激组动物仅表现为皮质酮水平较对照组显著增高。这些观察结果表明空瓶刺激可激活情绪应激组动物的HPA轴和交感神经系统,使其处于强烈的情绪应激状态,而单纯缺水仅引起HPA轴变化却不影响交感神经系统,说明单纯缺水仅诱发动物的生理应激反应,而其情绪应激反应很微弱,可忽略不计,因此本实验观察的是情绪应激对正常体液免疫反应的影响。实验结果表明,与生理应激组相比较,情绪应激组动物抗特异性抗原OVA的抗体OD值、脾脏指数显著降低,而对照组和生理应激组间无显著性差异,这证明了情绪应激对特异性原发体液免疫反应的抑制作用,而单纯生理性缺水应激则对此反应无明显作用。

4.2 交感神经系统与情绪应激的免疫调节作用

根据我们的实验结果,情绪应激组肾上腺素、去甲肾上腺素水平较生理应激组显著提高,且去甲肾上腺素含量与抗体值呈显著负相关,这提示此情绪应激的免疫抑制作用与交感神经系统激活相关。

传统理论认为下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴是应激引起免疫抑制作用的机制,而应激引起的糖皮质激素升高是其免疫抑制作用的重要调节介质^[4]。

近年来Keller等的研究结果表明,应激能引起双侧肾上腺切除动物的体外淋巴细胞有丝分裂原反应降低^[5],这证实应激的免疫抑制作用并不是单纯的HPA理论。随着研究的不断深入,人们发现应激的作用机制及其复杂,除HPA轴外,还涉及交感神经系统、各种肽类物质及细胞因子的活性,其中以交感神经系统(SNS)研究最多^[6]。早在70年代初期,大量文献已证实了SNS与免疫系统间形态学和功能性的联系,近年来大量啮齿动物的实验亦证明SNS参与了应激对免疫系统的调节作用。例如Naysmith P.M.G等证实了外周 β 肾上腺素能受体阻断剂nadolol能逆转由应激引起的脾淋巴细胞有丝分裂原反应降低^[7];还有大量研究表明外周神经节阻断剂6-OHDA可显著抑制原发性抗体反应和免疫记忆形成^[8]。那么SNS是如何对免疫系统发挥作用的?目前大量研究证实中枢(骨髓和胸腺)和外周(脾和淋巴结)淋巴器官上均存在直接的交感神经纤维支配^[9],且淋巴细胞膜上存在 α 和 β 肾上腺素能受体^[10],这为SNS对免疫系统发挥调节作用提供了解剖学基础。应激过程中SNS激活引起的儿茶酚胺释放可能通过以下几种途径调节免疫系统功能:引起脾、骨髓周围平滑肌收缩,从而使得其中贮存的淋巴细胞释放入末梢血中;引起淋巴细胞亚型重新分配,即带有较高密度的 β 肾上腺素能受体的淋巴细胞释放入循环中^[11];儿茶酚胺与淋巴细胞结合还可抑制外周淋巴细胞迁移入淋巴器官中^[12]。但本实验中SNS是如何参与情绪应激的免疫抑制作用有待于进一步实验证实。

综上所述,本实验证实了情绪应激抑制大鼠特异性原发体液免疫反应,且交感神经系统可能参与了此免疫抑制作用。

参 考 文 献

- 1 Ader R. Historical perspectives on psychoneuroimmunology. In: Friedman H, Klein TW, Friedman AL ed. Psychoneuroimmunology, Stress, and Infection. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, 1996. 1-24
- 2 Lysle D T, Cunnick J E, Kucinski B J. Characterization of immune alteration induced by a conditioned aversive stimulus. Psychobiology, 1990, 18:220-226
- 3 Croiset G, Heijnen C J, Veldhuis H D et al. Modulation of the immune response by emotional stress. Life Science, 1987, 40(8):775-782
- 4 McEwen BS, Biron CA, Brunson KW et al. The role of

* 常青. 杏仁中央核在应激导致的大鼠细胞免疫及内分泌改变中的中介作用研究. 北京大学博士学位论文, 心理学系, 1998.

- adrenocorticoids as modulates of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interacts. *Brain Research Review*, 1997, 23:79—133
- 5 Keller S E, Weiss J M, Schleifer S J et al. Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. *Science*, 1983, 221:1301—1304
- 6 Kusnecov A, Rabin B S. Mechanisms of Stress-induced Host Defense Alterations. In: Berczi I, Szelenyi J ed. *Advances in Psychoneuroimmunology*. New York: Plenum Press, 1994, 323—331
- 7 Naysmith J D, Ortega P M G, Elson C J. Rat Erythrocyte-induced Antierythrocyte Autoantibody Production and Control in Normal Mice. *Immunology Review*, 1981, 55:55
- 8 Besedovsky H O, Rey A D. Immune-Neuro-Endocrine Interactions, Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*, 1998, 17(1):65—101
- 9 Felten D L, Felten S Y, Bellinger D L et al. Noradrenergic Lymphatic Neural Interactions With the Immune System: Structure and Function. *Immunology Review*, 1987, 100: 225—260
- 10 Mills P J, Diusdale J E. The Promise of Adrenergic Receptors Studies in Psychophysilogic Research II: Applications, Limitations, and Progress. *Psychosomatic Medicine*, 1993, 55:448—457
- 11 Bachen E A, Manuck S B, Cohen S et al. Adrenergic Blockade Ameliorates Cellular Immune Responses to Mental Stress in Humans. *Psychosomatic Medicine*, 1995, 57:366—372
- 12 Ottaway C A, Husband A J. Central Nervous System Influences on Lymphocyte Migration. *Brain Behavior Immunity*, 1992, 6:97—116

THE EFFECT OF EMOTIONAL STRESS ON THE PRIMARY HUMORAL IMMUNITY OF RATS: INTERACTION WITH THE SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM

Shao Feng Lin Wenjuan Wang Weiwen

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

Abstract

The effect of exposure to emotional stress on the primary humoral immune function(antiovallum antibody level and spleen index), the endocrine response (corticosterone level, epinephrine and norepinephrine levels), the behavioral changes (exploring, grooming and attacking behavior) was studied in adult male Wistar rats. Emotional stress was induced by randomly giving empty water bottles to rats trained to drink water at two set times each day. Emotional stress were given 14 times, ten minutes per each time during experimental period. Results showed that firstly, empty water bottles induced significant attacking behavior (biting the empty water bottle and cage shed) in rats of emotional stress group, secondly emotional stress decreased the weight of the spleen and the level of specific anti-OVA IgG antibody and increased the levels of epinephrine, norepinephrine and corticosterone. A negative correlation between antibody levels and level of norepinephrine was also found. Together with the previous work in our laboratory, the results demonstrated that emotional stress suppressed the specific primary humoral immunity of rats. The sympathetic nervous system may be involved in this immunomodulation.

Key words emotional stress, antibody, norepinephrine, epinephrine, corticosterone.