

天敌应激下小鼠血浆皮质酮、巨噬细胞产生 NO、IL-1 β 水平与脑不对称性*

赵丽纯 苏 芸 李康生**

(汕头大学医学院微生物学与免疫学教研室, 汕头 515031)

摘要 为探讨天敌应激下脑不对称性对小鼠 HPA 轴活性及巨噬细胞功能的影响, 通过伸爪取食法将 Balb/c 小鼠分为左利、右利、双利组, 分别暴露在鼠类天敌——猫急性应激 (45 min, 1 次)、慢性应激 (45 min/次, 每天 1 次, 连续 14 天) 刺激后, 分别用 EIA 法、硝酸还原酶法、ELISA 法测定了血浆皮质酮、腹腔巨噬细胞培养上清中一氧化氮 (nitric oxide, NO)、IL-1 β 水平. a. 血浆皮质酮水平: 急性应激下, 右利、双利组小鼠血浆皮质酮升高, 右利组更为显著, 左利组呈下降趋势, 右利、双利组显著高于左利组及相应正常对照组 ($P < 0.05$); 慢性应激下, 右利、双利组显著高于相应正常对照组, 左利、双利组也显著高于急性应激下相应组 ($P < 0.05$). b. NO 水平: 急性应激下, 左利组腹腔巨噬细胞培养上清中 NO 无显著变化, 右利、双利组呈升高趋势, 右利显著高于左利 ($P < 0.05$); 慢性应激中, 三组 NO 水平均显著高于相应正常对照组 ($P < 0.05$). c. IL-1 β 水平: 急性应激下, 左利组 IL-1 β 水平显著低于相应正常对照组, $P < 0.05$; 慢性应激下, 左利、双利组与正常对照组相比均有所降低, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), 右利组则显著高于相应正常对照组 ($P < 0.05$). 上述研究结果提示, 小鼠在暴露于天敌——猫应激下, 脑不对称可影响 HPA 轴活性及巨噬细胞功能.

关键词 天敌应激, 脑不对称, 皮质酮, 一氧化氮, IL-1 β

学科分类号 R392.9

近年来心理、精神因素在疾病的发生、发展中的作用日益受到关注. 研究表明精神应激因素能够引起机体免疫功能改变而导致机体健康状况恶化, 如在感染性疾病及创伤的治疗中发现负向情绪可直接影响疾病的治疗效果等^[1,2]. 下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 活化而导致的糖皮质激素增加是精神、物理或免疫刺激等因素诱导的应激反应的主要特点. HPA 轴是中枢神经系统与免疫系统的连接枢纽之一, 其活性受脑不对称影响^[3,4]. 在个体、群体水平的研究均已证实脑以不对称方式调节机体的神经-免疫-内分泌功能^[5,6]. 但到目前为止尚未见有关精神应激下脑不对称性对 HPA 轴活性及巨噬细胞功能影响的报道. 据此, 本文以天敌应激作为精神应激因素, 通过伸爪取食法建立脑不对称性动物模型, 从小鼠血浆皮质酮及腹腔巨噬细胞产生 NO、IL-1 β 的能力等方面探讨了天敌应激下脑不对称性对 HPA 轴活性及巨噬细胞功能的影响, 从而揭示精神应激下脑不对称性对神经免疫内分泌网络的影响规律.

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 Balb/c 小鼠, 雌性, 4 周龄, 由第一军医

大学实验动物中心提供. 在本校清洁级实验动物中心喂养, 5 只/笼, 自由饮水摄食, 每天保持 12 h 明暗环境. 天敌应激实验中所用的猫购于动物市场.

1.2 主要试剂

新生小牛血清、RPMI-1640 (GIBCO 公司, USA)、皮质酮测定试剂盒 (R&D 公司, USA)、NO 测定试剂盒 (南京建成生物工程公司)、IL-1 β 测定试剂盒 (BD Biosciences 公司, USA).

1.3 左利、右利、双利动物模型的建立

动物适应环境一周后经伸爪取食法区分为左利、右利和双利三组. 方法概述如下: 小鼠禁食 12 ~ 18 h 后, 置于测试盒内, 以小饲料块经伸爪取食模型盒中央的小管逗引小鼠伸爪取食, 记录 50 次伸爪取食中伸右爪次数, 即为右利分 (right paw entry, RPE). 两周内共测试 4 次, 平均记分 1 ~ 20 分为左利鼠 (left-pawed mice), 21 ~ 29 分为双利鼠 (ambidextrous-pawed mice), 30 ~ 50 分为

* 国家自然科学基金资助项目 (30271211 和 30371315) 和汕头大学研究与发展基金资助项目 (L00011).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 0754-8900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

收稿日期: 2004-03-18, 接受日期: 2004-03-30

右利鼠 (right-pawed mice)^[4]. 剔除实验过程中不伸爪取食者. 行为测试及最后的实验均在上午 10 时开始进行.

1.4 猫暴露天敌应激实验

将左利、右利、双利鼠随机分配到正常对照、急性、慢性天敌应激组. 每天上午 9:00~10:00 进行一次猫暴露应激实验. 每天仅在应激实验结束后, 猫进食一次, 以保证实验中猫处于饥饿状态. 首先将天敌应激组小鼠放入 13 cm×25 cm×15 cm 铁丝笼, 再置于 90 cm×150 cm×80 cm 猫笼内. 将猫引入笼内 45 min. 在实验期间, 猫可在笼内自由活动. 小鼠笼的铁丝网可阻止猫的攻击, 小鼠可通过视、听和嗅觉体验到猫的存在. 急性应激组完成一次应激, 慢性应激组连续 14 天、每天应激一次. 最后一次应激后, 快速断头取血, 无菌制备小鼠腹腔巨噬细胞.

1.5 血浆皮质酮的测定

用含肝素的离心管收集小鼠血液, 4 000 r/min, 离心 15 min, 分离血浆, -20℃ 保存. 采用 EIA 法皮质酮测定试剂盒测定皮质酮含量. 首先用试剂盒提供的类固醇置换剂处理样品, 以游离血浆中与类固醇结合蛋白结合的皮质酮. 在预先以驴抗羊多克隆抗体包被的 96 孔板中依次加入标准品或 1:200 稀释的待测样品、与碱性磷酸酶结合的皮质酮、羊抗皮质酮多克隆抗体, 室温下反应 2 h, 水平震荡 200 r/min. 而后洗板 5 次, 加入 pNPP, 室温下反应 1 h, 波长 405 nm 测定结果, 制作标准曲线, 计算皮质酮含量.

1.6 腹腔巨噬细胞培养上清的收集及培养

常规方法收集各组小鼠腹腔巨噬细胞, 以含 5% FCS 的 RPMI-1640 配制成浓度为 1×10⁶/ml 的细胞悬液, 培养于 24 孔板, 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育 24 h, 收集培养上清, -20℃ 保存, 待测巨噬细胞产生 NO、IL-1β 量.

1.7 NO 水平的测定

采用硝酸还原酶法检测 NO. 简述如下: 用硝酸还原酶将上清中硝酸根离子 (NO₃⁻) 还原为亚硝酸根离子 (NO₂⁻), 进而在酸性条件下用 Griess 试剂与之反应测定标准曲线, 按试剂盒说明书进行测试, 测定亚硝酸盐量, 以代表 NO 水平.

1.8 IL-1β 水平的测定

采用小鼠 IL-1β ELISA 试剂盒, 按说明书使用. 在 450 nm 波长下, 读取吸光度值 (A). 用 SPSS 软件绘制标准曲线, 计算各样本 IL-1β 含量.

1.9 统计方法
SPSS 软件进行单因素方差分析.

2 结 果

2.1 Balb/c 小鼠左利、右利、双利模型的建立

共 100 只 Balb/c 小鼠接受伸爪取食训练, 3 只始终未伸爪取食, 从实验中剔除, 97 只小鼠用于本实验. Balb/c 小鼠行为不对称大致呈 U 型分布, 极左和极右利小鼠较多. 其中左利鼠 49 只, 双利鼠 13 只, 右利鼠 35 只. 左利鼠的 RPE 分主要在 0~10 分之间, 右利鼠的 RPE 分主要在 45~50 分之间 (表 1).

Table 1 Distribution of paw preference in the population of Balb/c mice

Group	RPE	Number
Left-pawed mice	0~10	39
	11~20	10
Ambidextrous-pawed mice	21~29	13
Right-pawed mice	30~40	9
	41~50	26

RPE: right paw entry, it represents the times of catching food with right paw in 50 reaches.

2.2 血浆皮质酮水平

如图 1 所示: 正常对照组中, 左利、右利、双利组血浆皮质酮水平无显著性差异 (每两组比较 *P* 值均大于 0.05); 急性应激组中, 左利组呈下降趋势, 右利、双利组显著高于左利组及相应的正常对照组, *P* 值均小于 0.05, 其中右利组升高更为显

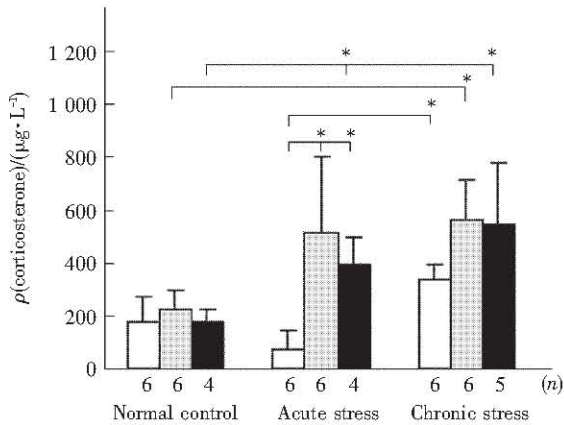


Fig. 1 Plasma levels of corticosterone in left-pawed, right-pawed and ambidextrous Balb/c mice after predator stress. The number of animals per group (n) is indicated below histograms. * *P* < 0.05. □: left-pawed mice; ▨: right-pawed mice; ■: ambidextrous-pawed mice.

著；慢性应激组内 3 组呈右利 > 双利 > 左利，但无显著性差异，右利、双利组显著高于相应的正常对照组，左利、双利组也显著高于急性应激中的相应组 ($P < 0.05$)。

2.3 腹腔巨噬细胞产生 NO 水平

如图 2 所示：正常对照左利、右利、双利组的腹腔巨噬细胞体外培养上清中 NO 水平无显著差异；急性应激组中，呈右利 > 双利 > 左利，右利显著高于左利 ($P < 0.05$)；慢性应激中，3 组 NO 水平均增高，其中左利、右利、双利组均显著高于相应正常对照组 ($P < 0.05$)。

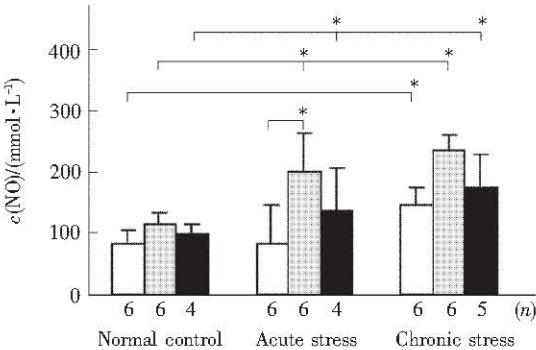


Fig. 2 The level of NO in the supernatants of cultured peritoneal macrophages in left-pawed, right-pawed and ambidextrous Balb/c mice after predator stress. The number of animals per group (n) is indicated below histograms. * $P < 0.05$. □: left-pawed mice; ▨: right-pawed mice; ■: ambidextrous-pawed mice.

2.4 腹腔巨噬细胞产生 IL-1β 水平

如图 3 所示：正常对照组腹腔巨噬细胞体外培养上清中 IL-1β 水平呈左利 > 双利 > 右利趋势，左

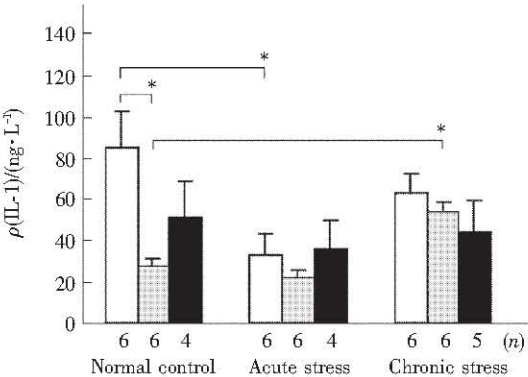


Fig. 3 The level of IL-1β in the supernatants of cultured peritoneal macrophages in left-pawed, right-pawed and ambidextrous Balb/c mice after predator stress. The number of animals per group (n) is indicated below histograms. * $P < 0.05$. □: left-pawed mice; ▨: right-pawed mice; ■: ambidextrous-pawed mice.

利显著高于右利组 ($P < 0.05$)；急性应激下，左利组 IL-1β 水平降低，与正常对照组相比 $P < 0.05$ ；慢性应激下，左利、双利组与正常对照组相比均有所降低，但无统计学意义 ($P > 0.05$)，右利组则显著高于相应正常对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

脑的左右半球在解剖结构、功能等方面具有不对称性，是一个普遍存在的生物学现象。研究证实，脑以不对称方式调节机体的神经-免疫-内分泌功能，如部分切除小鼠左侧或右侧大脑皮质对其免疫功能产生相反作用。脑中的多种神经内分泌激素的分布（如 ACTH、泌乳素等）、HPA 轴的活性也受脑不对称性影响^[3,4]。群体水平研究也发现，左利个体自身免疫性疾病发病率较高^[5]。通过伸爪取食法区分将小鼠区分为左利、右利、双利鼠，是研究脑不对称影响神经-免疫-内分泌系统相互作用关系的理想模型，其克服了损毁脑内核团、截断神经束路等方法研究脑不对称性的局限性及损伤所带来的应激反应。本研究中 Balb/c 小鼠的行为不对称模式呈 U 型分布，与以往研究结果相一致^[3]。

神经、免疫、内分泌系统以各自独特的方式在维持机体内环境稳定中发挥重要作用。三大系统间存在着极为复杂的网络联系，而细胞因子、神经肽和激素等为神经免疫内分泌系统共同的化学语言或信息分子。神经系统可通过下丘脑-垂体-肾上腺轴调节免疫系统的功能。HPA 轴对人体的免疫系统是非常重要的，它保护机体免受过度免疫反应的损害。精神、物理或免疫刺激等因素诱导的应激反应亦可调节 HPA 轴活性，影响机体的免疫功能。动物实验及临床研究结果表明：负向情绪下体内淋巴细胞数减少、丝裂原诱导的淋巴细胞增殖能力及 NK 活性降低；不良情绪也影响个体对病毒感染等疾病的敏感性，并延迟术后的伤口愈合等^[7,8]。

天敌应激为研究精神心理应激因素的较理想动物模型。其不同于精神应激实验研究中常采用社交性隔离、电刺激、束缚等方法，排除了躯体因素的干扰，较好地模拟了动物所处的自然环境。在天敌应激下，被应激动物通过视觉、听觉、嗅觉等感受到生命威胁的存在，产生一系列行为、生理反应^[9]。本研究中以鼠类的天敌——猫作为应激因素，通过测定小鼠血浆皮质酮水平判定 HPA 轴的活化程度，证实脑不对称性可影响天敌应激下小鼠 HPA 轴的活性；在急性应激下，右利、双利组的

HPA 轴活性显著增加, 右利组更为显著, 而左利组 HPA 轴呈一定的抑制状态; 慢性应激下, 各组 HPA 轴活性均增加, 右利、双利更为显著. 提示: 天敌应激下脑不对称性可影响 HPA 轴活性, 与右利个体相比, 左利个体 HPA 轴对应激的反应能力相对较低. 我们的结果, 有助于理解在流行病学研究中观察到的左利人群中过敏性疾病发病年龄较早以及过敏性疾病、自身免疫性疾病发病率较高等现象^[10,11].

单核巨噬细胞是免疫系统的组成部分. HPA 轴活化时产生的 ACTH、生长激素、P 物质、糖皮质激素等能够与单核巨噬细胞表面受体结合, 调节其功能, 如增加 NO、H₂O₂、细胞因子等产生^[12,13]. 单核巨噬细胞产生的 NO、细胞因子 IL-1 β 、IL-6 等亦为神经免疫内分泌双向信息交流的重要信息分子, 并介导多种生理、病理作用^[14]. 本研究通过硝酸还原酶法间接测定了样品中 NO 含量. 由于生物样品中 NO 含量很低且极不稳定, 在体内代谢很快转化为 NO₂ 和 NO, 因此很多研究通过测定反应体系中 NO₂ 水平, 间接反映 NO 含量. 虽然间接法具有简便易行等优点, 但由于体内 NO₂/NO₃ 来源复杂, 测定结果仅能在有限程度上反映 NO 的生成. 为了克服间接法的局限性, 发展了通过荧光^[15]、化学发光、电化学^[16]等手段和方法以直接测定样品中 NO 水平, 但这些方法需要一定的专用检测仪器, 限制了其广泛应用.

我们通过测定小鼠腹腔巨噬细胞培养上清中 NO、IL-1 β , 探讨了天敌应激下脑不对称性对单核巨噬细胞功能的影响及与 HPA 轴活性的相关性. 结果显示急性天敌应激下, 左利 Balb/c 小鼠巨噬细胞功能受到抑制, 而慢性应激下, 右利组巨噬细胞功能增加, 巨噬细胞功能的变化与 HPA 轴活性呈一定相关性. 提示脑不对称动物对应激反应的敏感性及应激下 HPA 轴活化程度的差异会影响到与神经免疫内分泌密切相关的巨噬细胞功能.

本研究证实, 天敌应激下脑不对称性可影响 HPA 轴活性及巨噬细胞功能, 为今后进一步探讨脑不对称性这一个体差异性在精神神经免疫学中的作用奠定了初步实验基础. 由于脑不对称性对免疫功能的影响受复杂的神经免疫内分泌网络调节, 而且应激反应作用于神经免疫内分泌系统的效应以应激源的种类、作用时间、强度的不同, 也存在着差异, 因此天敌应激等精神应激因素下, 脑不对称性对神经免疫内分泌的影响有待进一步深入系统

研究.

参 考 文 献

- 1 Rojas I, Padgett D A, Sheridan J F, *et al.* Stress-induced susceptibility to bacterial infection during cutaneous wound healing. *Brain Behav Immun*, 2002, **16** (1): 74 ~ 84
- 2 Kemeny M, Cohen F, Zegans L. Psychological and immunological predictors of genital herpes recurrence. *Psychosom Med*, 1989, **51** (2): 195 ~ 208
- 3 高明霞, 李康生, 董 菁, 等. 脑不对称 Balb/c 小鼠血浆 IL-1 β 、IL-6 及皮质酮水平变化. *中国免疫学杂志*, 2000; **16** (1): 19 ~ 22
Gao M X, Li K S, Dong J, *et al.* *Chin J Immuno*, 2000, **16** (1): 19 ~ 22
- 4 Neveu P J, Moya S. In the mouse, the corticoid stress response depends on lateralization. *Brain Res*, 1997, **749** (2): 344 ~ 346
- 5 Neveu P J. Lateralization and stress responses in mice: interindividual differences in the association of brain, neuroendocrine, and immune responses. *Behav Genetic*, 1996, **26** (4): 373
- 6 李求是, 杨贵贞. 小鼠脑皮质的分区免疫调节. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1986, **6** (3): 129
Li Q S, Yang G Z. *Chin J Microbiology Immunology*, 1986, **6** (3): 129
- 7 Cohen S, Frank E, Doyle W J, *et al.* Types of stressors that increase susceptibility to the common cold in healthy adults. *Health Psychol*, 1998, **17** (3): 214 ~ 223
- 8 Kiecolt-Glaser J K, Page G G, Marucha P T, *et al.* Psychological influences on surgical recovery: perspectives from psychoneuroimmunology. *Am Psychol*, 1998, **53** (11): 1209 ~ 1218
- 9 Blanchard R J, Nikulina J N, Sakai R R, *et al.* Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol Behav*, 1998, **63** (4): 561 ~ 569
- 10 Geschwind N, Behan P. Left-handedness: association with immune disease, migraine, and with developmental learning disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79** (16): 5097 ~ 5100
- 11 Betancur C, Velez A, Cabanieu G, *et al.* Association between left-handedness and allergy: A reappraisal. *Neuropsychologia*, 1990, **28** (2): 223 ~ 227
- 12 Palermo N J, Oliveira-D, Massoco C. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun*, 2003, **17** (1): 43 ~ 54
- 13 Shapira L, Frolov I, Halabi A, *et al.* Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their P. gingivalis LPS-stimulated secretion of nitric oxide. *J Periodontol*, 2000, **71** (3): 476 ~ 481
- 14 Lorsbach R B, Russell S W. A specific sequence of stimulation is to induce synthesis of the antimicrobial molecule nitric oxide by mouse macrophages. *Infect Immun*, 1992, **60** (5): 2133
- 15 田亚平, 沈文梅, Betts W. H. 荧光方法直接测定一氧化氮. *生物化学与生物物理进展*, 1999, **26** (3): 273 ~ 276
Tian Y P, Shen W M, Betts W. H. Direct measurement of nitric oxide by fluorometric method. *Prog Biochem Biophys*, 1999, **26** (3): 273 ~ 276
- 16 Kitamura Y, Uzawa T, Oka K, *et al.* Microcoaxial electrode for *in vivo* nitric oxide measurement. *Anal Chem*, 2000, **72** (13): 2957 ~ 2962

The Correlation of Brain Asymmetry to The Level of Plasma Corticosterone and NO, IL-1 β Produced by Macrophage in Balb /c Mice Under Predator Stress *

ZHAO Li-Chun, SU Yun, LI Kang-Sheng **

(Department of Microbiology and Immunology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

Abstract The purpose was to investigate the influence of brain asymmetry on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the functions of macrophage under predator stress. The paw preference test was used to select right-pawed, left-pawed, and ambidextrous-pawed mice. After acute (45 min, once), chronic (45 min, once a day, for two successive weeks) predator stress by cats, mice were sacrificed and the blood and peritoneal macrophages were collected. The levels of plasma corticosterone and nitric oxide (NO), IL-1 β in the supernatants of cultured peritoneal macrophage were respectively detected by enzyme immunoassay (EIA), nitrate reductase method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed: (1) The level of plasma corticosterone. In the acute predator stress group, the levels of plasma corticosterone were higher in right and ambidextrous-pawed mice than that of left-pawed mice as well as corresponding normal control group ($P < 0.05$), and that of the right-pawed mice was the highest, but that was decreased in left-pawed mice; after chronic predator stress, in right and ambidextrous mice, the levels of corticosterone were higher than those of the corresponding normal control ($P < 0.05$), and the left-pawed and ambidextrous-pawed mice's were also higher than those of the corresponding acute predator stress group ($P < 0.05$). (2) Level of NO. In the acute predator stress group, the level of NO in the supernatants of cultured peritoneal macrophage in right pawed mice was significantly higher than that of left-pawed mice ($P < 0.05$); after chronic predator stress, those in left, right, and ambidextrous mice were higher than those of the corresponding normal control group ($P < 0.05$), and in right-pawed and ambidextrous-pawed mice were also higher than those of the corresponding acute predator stress group ($P < 0.05$). (3) Level of IL-1 β . In the acute predator stress group, the levels of NO in the supernatants of cultured peritoneal macrophage in left-pawed mice were significantly lower than that of the corresponding normal control ($P < 0.05$); after chronic predator stress, that in right-pawed mice was significantly higher than that of the corresponding normal control group ($P < 0.05$). In conclusion, brain asymmetry may affect the activity of HPA axis and the functions of macrophages in Balb/c mice exposed to their predator, cat, stress.

Key words predator stress, brain asymmetry, corticosterone, nitric oxide, IL-1 β

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30271211, 30371315) and Scientific Research and Development Foundation of Shantou University (L00011).

** Corresponding author. Tel/Fax: 86-754-8900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

Received: March 18, 2004 Accepted: March 30, 2004