

中药对情绪应激小鼠胸腺细胞凋亡的影响^{*}

★ 杨军平 侯静 (江西中医学院附属医院 南昌 330006)

摘要:目的:探讨条件反射箱应激不同时间对小鼠胸腺细胞的破坏及凋亡的影响,通过加味逍遥丸加以干预,揭示中药对应激所致免疫功能变化的调节作用。方法:利用条件反射箱诱发的应激模型,观察应激3、5、7天以及加味逍遥丸干预后胸腺功能的变化状况。结果:应激3、5、7天组小鼠胸腺重量、胸腺指数、糖皮质激素水平、TFAR19蛋白平均荧光度、Annexin-V单阳性细胞及Annexin-V和PI双阳性细胞与对照组相比达显著性($P<0.05$)。结论:条件反射箱应激是一种急性负性情绪应激,应激的性质较平缓。应激通过神经内分泌免疫网络而影响胸腺功能,加味逍遥丸可调节应激反应而对胸腺的损伤起保护作用。

关键词:条件反射箱应激;胸腺;细胞凋亡;加味逍遥丸

中图分类号:R 965 **文献标识码:**A

心理应激是由于个体在生活适应过程中,因环境要求与自身应付能力不平衡所引起的一种身心紧张状态,这种紧张状态倾向于通过非特异的心理和生理反应所表现出来。慢性心理应激对机体所造成的心身损害越来越引起人们的重视。

胸腺是重要的中枢免疫器官,充当着免疫和内分泌调节的双重角色,在神经-内分泌-免疫调节网络中,胸腺是中枢通路的桥梁,作为免疫-内分泌器官与神经系统的联结物构成了神经-内分泌-胸腺轴^[1]。应激所致胸腺结构与功能的变化越来越受到研究者的重视。

中医学脏象及七情学说认为,对于情志变化尤其在调节情志因素(心理应激)引起的各种变化时,肝起着主要作用,中医学所论之“肝失疏泄,气机紊乱”是慢性心理应激反应的主要病理变化^[2,3],因此,中医学的理论与临床实践为探讨调肝治法方药抗心理应激损伤提供了基础和依据。

本研究的目的是采用心理应激模型,探讨心理应激对机体自身的免疫器官的影响,对建立和维持免疫系统的平衡和稳定具有重要的作用。

1 试验材料

1.1 实验动物 昆明种小鼠180只,由中国人民解放军军事科学院动物中心提供,雌雄各半,体重(25 ± 1)g,年龄为10月龄,在适应环境期间,所有动物可自由摄食和饮水,明暗为自然光线,室温(24 ± 1)℃。

1.2 实验仪器 采用北京大学心理系生物心理学实验室自制的条件反射箱,FACScalibur流式细胞仪(BECTONDickinson公司)

1.3 试剂 Annexin-V细胞凋亡试剂(购于北京宝赛生物技术生物有限公司,批号030305);TFAR-19相关蛋白试剂和方法由北京大学医学部人类疾病基因研究中心提供。

2 方法

2.1 造模 实验时,将一只电击鼠放入底部有电栅的小室中,对其进行电击,电击的频率和强度是:电压20V,电流强

度 $<1\text{mA}$,持续时间5秒,间隔时间15秒,共60次,总时间为20分钟。在电击的同时,将一只进行情绪应激的小鼠放入另一小室中,不给电击,但电击鼠的反应如跑动、跳跃、嘶叫等会给情绪应激小鼠的听觉、视觉和嗅觉以强烈刺激,使其产生恐惧、害怕和紧张的情绪。对照组的小鼠只是放置在条件反射箱中相同的时间,没有电击鼠在旁边作为应激源。

2.2 动物分组 动物随机分为12组,分别为给生理盐水、给加味逍遥丸、情绪应激+水和情绪应激+加味逍遥丸组,各组按给药和应激时间分为3、5、7天组。动物称重后,按组放置不同的实验间,单笼喂养。

2.3 给药 从应激开始即给药,正常对照和给药对照从观察第一天开始给药,直至试验结束。加味逍遥丸成人用量为12g/日,按中剂量算为300mg/100g动物,情绪应激组情绪应激期间每日给药一次,浓度0.09g/mL,量为0.8mL。

2.4 动物处理 最后一天情绪应激结束后,立即对动物进行称重,然后断头取血,放置3小时后,离心(2000 r/min)20分钟,吸取上清液(血清),放入在 -86°C 冰箱保存备用。并在冰面上迅速取出胸腺,以如下方式计算脏器指数:脏器指数=脏器重量/小鼠体重(mg/g)。胸腺组织加5mL DMEM培养液用细胞匀浆器匀浆,收集胸腺细胞,分别进行Annexin-V凋亡试验和TFAR-19相关蛋白的检测。

2.5 血清糖皮质激素的检测 血清糖皮质激素含量的测定采用放免法,测试试剂盒为北京北方免疫试剂研究所生产的专用试剂盒。仪器为北京核仪厂生产的FT-646微机放免仪。

2.6 Annexin-V凋亡试验 (1)调整细胞浓度为 $5\times10^5\sim1\times10^6/\text{mL}$,取1mL;(2)冷的PBS洗2次, 1000 r/min ,4℃,10分钟;(3)加200μL Binding Buffer重悬及FITC 10μL、PI 5μL充分混匀;(4) 2000 r/min ,4℃,10分钟,去上清加500μL Binding Buffer重悬液。

2.7 TFAR-19相关蛋白检测 (1)调整细胞浓度为 $5\times10^5\sim1\times10^6/\text{mL}$,取1mL;(2)PBS洗2次, 1000 r/min ,4℃,10

* 江西省卫生厅科技项目资助(No.2004A100)

分钟;(3)3%多聚甲醛冰浴10分钟;(4)PBS℃洗2次,1 000 r/min,4℃,10分钟;(5)PBS-T溶液(0.15 mol/lPBS含0.2% Tween-20),37℃孵育15分钟;(6)PBS洗2次,1 000 r/min,4℃,10分钟;(7)100 μL胎牛血清,4℃,30分钟;(8)2.5 μL FITC标记的TFAR-19单抗,1 000 r/min,4℃,30分钟;(9)荧光细胞洗液(0.15mol/L PBS含0.1%的迭氮钠及2%的胎牛血清)洗2次,1 000 r/min,4℃,10分钟。去上清

加500 μL Binding Buffer重悬液。

2.8 数据处理 所有实验结果用SPSS软件包进行统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 描述,样品的显著性检验用方差分析和 t 检验。

3 结果

3.1 不同情绪应激时间对小鼠胸腺的影响及中药调节 见表1。

表1 不同情绪应激时间对小鼠胸腺重量及指数影响及中药调节

	n	胸腺重量/mg			胸腺指数		
		3天	5天	7天	3天	5天	7天
应激+生理盐水	10	100.00±14.76 [#]	99.00±14.14 [#]	98.00±17.29 [#]	4.09±0.93 [#]	4.08±0.52 [#]	4.06±1.07 [#]
应激+逍遥丸	10	105.00±19.69 [*]	108.00±16.19 [*]	111.00±14.33 ^{*##}	4.22±0.31 [*]	4.32±0.34 [*]	4.84±0.51 ^{*##}
单纯逍遥丸	10	135.00±14.29	134.00±12.86	131.00±13.37	5.19±0.38	5.15±0.35	5.03±0.43
单纯给生理盐水	10	137.30±19.66	137.00±19.17	137.00±19.17	5.27±0.36	5.27±0.34	5.27±0.34

注:与对照组相比,[#] $P<0.001$;^{*} $P<0.01$;与对应应激组相比,^{##} $P<0.05$ 。

3.2 不同情绪应激时间小鼠血清糖皮质激素含量的变化及中药调节 见表2。

表2 条件反射箱应激不同时间
对小鼠血清糖皮质激素含量的影响及中药调节

	n	糖皮质激素含量/mg·mL ⁻¹		
		3天	5天	7天
应激+生理盐水	10	18.28±5.52 [#]	19.36±4.24 [#]	21.76±5.96 [#]
应激+逍遥丸	10	16.12±1.75 ^{*#}	16.79±2.73 ^{*#}	17.19±4.69 ^{*#}
单纯逍遥丸	10	9.21±3.73	9.54±3.26	9.67±1.42
单纯给生理盐水	10	8.07±2.33	8.07±2.33	8.07±2.33

注:与对照组相比,[#] $P<0.001$;与对应应激组相比,^{*} $P<0.05$ 。

3.3 不同情绪应激时间对胸腺细胞凋亡的影响及中药调节 见表3。

表3 应激不同时间小鼠胸
腺细胞凋亡TFAR19及Annexin-V蛋白的变化

	TFAR19 凋亡蛋白平均荧光度值		
	3天	5天	7天
应激+生理盐水	21.59±4.80 [#]	29.26±4.64 [#]	25.98±4.75 [#]
应激+逍遥丸	20.78±6.21	28.32±4.81	22.61±4.46 [#]
单纯逍遥丸	8.54±2.06	8.92±2.75	8.58±2.61
单纯给生理盐水	7.75±2.26	7.75±2.26	7.75±2.26
	Annexin-V		
	3天	5天	7天
应激+生理盐水	5.19±1.96	4.25±3.06	4.51±1.57
应激+逍遥丸	5.82±2.80	4.30±0.22	4.39±1.59
单纯逍遥丸	3.74±1.62	4.06±1.01	4.26±1.56
单纯给生理盐水	3.28±1.41	3.28±1.41	3.28±1.41
	凋亡蛋白百分率(%)		
	3天	5天	7天
应激+生理盐水	11.24±2.51 [#]	14.31±1.58 [#]	18.08±2.95 [#]
应激+逍遥丸	9.75±1.81	12.14±1.66	14.53±1.78 [#]
单纯逍遥丸	3.42±1.22	3.56±1.41	3.61±1.17
单纯给生理盐水	3.41±0.88	3.41±0.88	3.41±0.88

注:与对照组相比,[#] $P<0.001$;与对应应激组相比,^{##} $P<0.05$ 。

3 讨论

负性情绪(negative emotion)急性应激引起的负性情绪体验如焦虑、抑郁、痛苦、愤怒、惊恐等,可引起机体免疫功能改变而增加个体对疾病的易感性^[4]。糖皮质激素是HPAA的终末产物,常作为研究应激的最经典、最重要的指标之一。表2可见:条件反射箱应激3、5、7天后,小鼠糖皮质激素含

量升高,与对照组相比均有显著性差异($P<0.001$),与肖健^[5,6]报道的完全一致,说明机体出现了应激反应。

TFAR19蛋白是一种凋亡早期相关蛋白,在细胞凋亡过程中,TFAR19蛋白表达增多及快速核转位现象,在凋亡晚期,细胞内TFAR19蛋白的含量显著降低^[7,8]。表3可见:条件反射箱应激5天,TFAR19蛋白的荧光强度值为高峰,说明应激5天后走向凋亡晚期。应激给药组TFAR19蛋白的荧光强度与相对应的应激组相比,都有显著性改变。说明应激通过下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴而导致血浆糖皮质激素水平升高,并由此诱导胸腺细胞凋亡,削弱机体免疫机能。随条件反射箱应激时间的增加,Annexin-V蛋白的双阳性细胞百分率逐渐升高,凋亡进一步加重。但应激给药Annexin-V蛋白的双阳性细胞百分率与相对应应激组相比降低,应激7天给药组与相对应应激组相比有显著性差异($P<0.05$)。

参考文献

- [1]杨贵珍.“神经-内分泌-免疫调节网络”研究之我见[J].中国免疫学杂志,1990,6(2):120~122
- [2]周萍,朱文锋.七情学说与应激理论[J].医学与哲学,1995,16(9):484~485
- [3]周象贤,周萍.七情学说与应激理论之特征比较[J].医学与哲学,2001,22(6):49~50
- [4]Maes M,Song C,Lin A,et al.The effects of psychological stress on humans;increased cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety[J].Cytokine,1998,10:313
- [5]肖健,张晏,耿晓峰,吴振宇,等.应激引起不同年龄、性别和种类小鼠免疫器官退化的比较研究[J].北京大学学报,2000,36(5):725~731
- [6]张宴,肖健,耿晓峰,吴振宇,等.切断交感神经小鼠在情绪应激中免疫功能的改变[J].中国行为医学科学,2003,12(1):1~4
- [7]陈英玉,孙荣华,韩文玲,等.凋亡相关蛋白TFAR19在TF-1细胞凋亡中出现细胞核转位[J].北京大学学报(医学版),2001,33(2):97~100
- [8]Liu IT,Wang YG,Zhang YM,et al.TFAR19,a novel apoptosis related gene cloned from human leukemia cell line TF-1,could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal[J].Biochem Biophy Res commun,1999,254:203

(收稿日期:2006-02-27)