

阿片受体介导大鼠海马内脑啡肽 对细胞免疫功能的调节³

高娜

(首都医科大学生理教研室, 北京 100054)

王阿敬 杨渝珍 胡谋先 谢虹

(同济医科大学实验医学研究中心, 武汉 430030)

摘要 以刀豆蛋白 A (Con A) 刺激的脾淋巴细胞增殖活性及自然杀伤细胞 (NK cell) 活性为细胞免疫功能检测指标, 观察了阿片受体阻断剂纳洛酮 (Naloxone, NLX) 对大鼠海马内微量注射甲硫脑啡肽所致的免疫功能增强作用的影响。结果发现: (1) 海马内微量注射白细胞介素 1 (IL21) 诱导剂 (细菌内毒素) 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 50 ng/1 μ l) 可降低机体免疫功能。(2) 双侧海马内预先注射甲硫脑啡肽 (M2ENK, 浓度: 10 μ g/ μ l) 各 1 μ l, 可阻止脑内 LPS 降低免疫功能的作用。(3) 脑啡肽的这种作用可被阿片受体阻断剂纳洛酮 (10 μ g/1 μ l) 阻断。(4) 海马内单纯注射纳洛酮对机体免疫功能也起抑制作用。上述结果提示, 海马内脑啡肽对免疫功能的增强作用是通过阿片受体介导的。

关键词: 神经免疫调节; 海马; 脑啡肽; 阿片受体

学科分类号: R97716, R322181, R446163

近年来研究发现, 海马结构除了参与情感、情绪、记忆、行为和机体内分泌活动的调节外, 在神经免疫调节中也具有重要作用^[1]。其中可能有神经肽、多种神经递质和不同细胞因子的参与, 而内源性阿片肽, 尤其是 M2ENK 被认为起着重要的介导作用。近来我们发现, 双侧海马内微量注射脑啡肽可以增强大鼠细胞免疫功能并抑制海马内白细胞介素 1 (IL21) 基因表达, 其机制可能与脑内 IL21 产物的减少并进而对下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 产生抑制效应有关^[2,3]。但脑啡肽在中枢调节机体免疫功能中是否主要通过阿片受体起作用尚不清楚。本文在以往工作的基础上, 进一步在整体动物观察了阿片受体在中枢内脑啡肽调节细胞免疫功能中的作用。

实验在 Wistar 大鼠进行, 雌雄不拘, 体重 200 ~ 250 g, 由本校实验动物中心提供。LPS, M2ENK 及纳洛酮购自 Sigma 公司。10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射麻醉后, 在立体定位仪上向动物双侧海马背侧经微量进样器分别注入药物 1 μ l。实验分为: 生理盐水对照组; 脂多糖组; 甲硫脑啡肽加脂多糖组; 预先给予纳洛酮再给予脑啡肽加脂多糖组; 单纯纳洛酮组。各种药物浓度为: M2ENK 10 μ g/ μ l, LPS 50 ng/ μ l, 纳洛酮 10 μ g/ μ l。每种药物注射均由微操纵器控制在 8 ~ 10 min 之间, 注射后 30 min 断头处死动物, 取脾, 分离脾淋巴细胞, 观察 Con A 刺激的脾淋巴细胞增殖活性及 NK 细胞活性。所得结果应用 *t* 检验。

1998201216 收稿 1998205211 修回

³国家自然科学基金资助课题 (No1 39270250)

Con A 刺激脾淋巴细胞增殖活性的检测 海马内注射药物后 30 min, 无菌操作下取脾脏, 用淋巴细胞分层液, 分离脾脏单个核细胞, 调节细胞密度为 2×10^5 /ml 后, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ l, 其中 Con A 刺激组每孔加入 5 μ g/ml 的 Con A 及含 10% 小牛血清的 1640 培养液各 50 μ l。自发增殖对照组每孔仅加入含 10% 小牛血清的 1640 培养液 100 μ l。置 5% CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 以 MTT 法检测 Con A 刺激的脾淋巴细胞的增殖活性, 用酶标仪测定 570 nm 波长下的 OD 值, 详见参考文献^[2]。为避免淋巴细胞自发增殖作用的干扰, 本实验采用 Con A 刺激脾淋巴细胞净增值为检测指标, 即 Con A 刺激脾淋巴细胞增殖组与自发增殖对照组的 OD 值之差。

NK 细胞活性测定 效应细胞制备与分离脾淋巴细胞方法相同, 调节细胞密度至 5×10^6 /ml 备用。靶细胞为活性大于 95% 的 Yac21 细胞。实验前收集 Yac21 细胞, 分别用 Hank's 液及 10% 小牛血清 RPMI 1640 液洗涤, 调整细胞浓度为 5×10^5 /ml, 台盼蓝染色检测活细胞数, 要求活细胞数大于 95%。以 LDH 稀释法测定 NK 细胞活性, 每份样品同时做 3 个复孔, 按表 1 所示加样至 96 孔培养板, 置 5% CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h。取出后每孔加入含 10% 小牛血清的 1640 液 50 μ l, 混匀离心, 每孔中取 100 μ l 上清液置于另一 96 孔板对应孔中, 32 $^{\circ}$ C 预温后, 每孔加入 100 μ l LDH 底物液, 放置 3 min, 加 1% 柠檬酸 30 μ l 终止反应, 酶标仪 (570 nm) 测定 OD 值。

$$\text{NK 活性} = \frac{\text{实验孔 OD 值} - \text{自然释放孔 OD 值}}{\text{最大释放孔 OD 值} - \text{自然释放孔 OD 值}} \times 100\%$$

表 1 NK 细胞活性检测程序

Table 1 Detecting procedure of NK cells activity

Well	Yac21 cells	Effective cells	1% NP ₄₀	New bovine serum + 1640
Test	100 μ l	100 μ l	—	—
Native release	100 μ l	—	—	100 μ l
Maximum release	100 μ l	—	100 μ l	—

11 海马内注入脑啡肽及脂多糖对 Con A 刺激的脾淋巴细胞增殖反应的影响

生理盐水双侧海马内注射组, Con A 刺激脾淋巴细胞增殖反应的净增值 (OD_{570nm}) 为 0.1035 ± 0.01013 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, 下同, $n = 29$); 双侧海马内各注射脂多糖 50 ng, 其净增值为 0.1024 ± 0.01009 ($n = 29$), 与盐水对照组比较, 差别显著 ($P < 0.05$), 表明海马内注射 LPS 对脾淋巴细胞增殖活性具有抑制性影响。甲硫脑啡肽加 LPS 组为 0.1047 ± 0.01011 ($n = 29$), 与 LPS 组比较差别非常显著 ($P < 0.01$), 提示脑啡肽可增强脾淋巴细胞增殖活性。海马双侧预先注射纳洛酮, 再于海马内分别注射脑啡肽及 LPS (表 2, 第 4 组) 的净增值仅为 0.1021 ± 0.01009 ($n = 33$), 与单纯脑啡肽加 LPS 组 (表 2, 第 3 组) 比较差别非常显著 ($P < 0.01$), 表明纳洛酮可以阻断脑啡肽的作用。

21 海马内单纯注射纳洛酮对 Con A 刺激的脾淋巴细胞增殖反应的影响

为探讨海马内源性阿片肽对机体细胞免疫功能的影响, 于大鼠双侧海马内各注射纳洛酮 10 μ l, 注射后 30 min Con A 刺激的脾淋巴细胞净增值 (OD_{570nm}) 为 0.1095 ± 0.01017 ($n = 20$), 与

盐水对照组净增值 0.1142 ± 0.01013 ($n = 20$) 比较, 差别显著 ($P < 0.105$)。

表 2 Con A 刺激的脾淋巴细胞增殖反应净增值 (OD_{570nm}值)

Table 2 Proliferation values of splenic lymphocytes stimulated by Con A (OD_{570nm})

Group	Drugs	Proliferation values
1	Saline	0.1035 \pm 0.01013
2	LPS	0.1024 \pm 0.01009 ³
3	M2ENK+LPS	0.1047 \pm 0.01011 ³³
4	NLX+M2ENK+LPS	0.1021 \pm 0.01009 ³³³

³ $P < 0.105$ compared with NS control group; ³³ $P < 0.101$ compared with LPS group; ³³³ $P < 0.101$ compared with M2ENK+LPS group; $P > 0.105$ between 4 and 2 groups.

表 3 NK 细胞活性

Table 3 Activity of NK cells (%)

Group	Drugs	Activity of NK cells / %
1	Saline	2019 \pm 414
2	LPS	1118 \pm 515 ³
3	M2ENK+LPS	3111 \pm 419 ³³
4	NLX+M2ENK+LPS	815 \pm 316 ³³³

³ $P < 0.01$ compared with NS control group; ³³ $P < 0.101$ compared with LPS group; ³³³ $P < 0.101$ compared with M2ENK+LPS group; $P > 0.105$ between 4 and 2 groups.

3.1 海马内注入脑啡肽及脂多糖对脾 NK 细胞活性的影响

生理盐水双侧海马内注射组, 脾 NK 细胞活性为 (2019 \pm 414) % ($n = 18$)。双侧海马内各注射脂多糖 50 ng, NK 活性为 (1118 \pm 515) % ($n = 18$), 与盐水对照组比较, 差别非常显著 ($P < 0.101$), 提示海马内注射 LPS 对脾 NK 细胞活性具有抑制性影响; 甲硫脑啡肽加 LPS 组为 (3111 \pm 419) % ($n = 18$), 与 LPS 组比较差别非常显著 ($P < 0.101$), 表明脑啡肽可抑制 LPS 对脾 NK 细胞活性的抑制作用。海马双侧预先注射纳洛酮组 (表 3, 第 4 组), 再注入脑啡肽及 LPS 其活性为 (815 \pm 316) % ($n = 18$), 与脑啡肽加 LPS 组 (表 3, 第 3 组) 比较, 差别非常显著 ($P < 0.101$), 而与 LPS 组比较差别不显著 ($P > 0.105$), 由于纳洛酮可以阻断脑啡肽抑制 LPS 诱导的免疫下调反应, 提示阿片受体可能参与介导脑内脑啡肽的免疫调控作用。

近年发现, 海马结构与机体的免疫系统之间存在相互调控关系。大鼠海马损毁后可增强 Con A 刺激的胸腺细胞和脾脏细胞增殖反应。此外, 海马脑区可参与调节机体的非特异性免疫反应^[1,4]。相反的报道认为海马对 HPA 轴有负向调节效应, 它对 ACTH 及皮质酮的分泌有抑制作用^[5], 最终导致免疫功能的增强。上述矛盾结果说明海马结构对免疫功能的调节作用是复杂的, 尚需深入研究。另一方面, 许多免疫细胞因子对海马的功能可产生影响, 如白细胞介素 1、2、肿瘤坏死因子 2、干扰素 2, 可抑制 LTP。上皮生长因子, 成纤维细胞生长因子等对 LTP 具有增强作用。此外, 白细胞介素 1、2、3 等分别对海马神经细胞钙内流、单胺的转化、胆碱能递质活性等产生影响^[6]。

脑啡肽具有免疫调节作用^[7~9], 在体及离体实验已证实, 小剂量可增强免疫功能, 大剂量则产生抑制效应。在生理条件下, 脑啡肽可能参与机体的免疫功能调节, 但其作用机制尚不明确。本室研究证实, 海马内给予脑啡肽可增强机体细胞免疫功能, 并能抑制细菌内毒素 LPS 所致的海马内白细胞介素 1 (IL21) 的基因表达。当海马内 IL21 基因表达受到抑制时, 脑内 IL21 合成减少, 导致 IL21 对 HPA 轴的激活效应减弱, 并通过降低血液中肾上腺皮质激素等的含量增强机体的免疫功能^[2,10,11]。

本文从整体水平进行实验,当海马内微量注射细菌内毒素脂多糖时可以抑制 Con A 刺激的脾淋巴细胞增殖反应及 NK 细胞活力,而海马内给予甲硫脑啡肽则能阻止脑内脂多糖对脾淋巴细胞增殖反应及 NK 细胞活力的抑制效应。当机体遭受感染时,中枢的内源性脑啡肽可能参与免疫功能的上调作用。脑啡肽增强免疫效应是否通过阿片受体起作用尚不明确。有研究报道,阿片肽对免疫系统的抗体生成, T2 淋巴细胞玫瑰花结及其增殖过程的调节作用有的通过阿片受体,有的并不通过阿片受体。本实验于海马内预先注射阿片受体阻断剂纳洛酮时,脑啡肽的免疫增强作用可被阻断,实验提示在整体条件下海马内脑啡肽对大鼠外周细胞免疫功能的调节是通过胶质细胞或神经细胞上的阿片受体介导的。此外,本实验还观察到双侧海马内单独给予纳洛酮,也可导致机体免疫功能的抑制,表明纳洛酮作用于脑内的阿片受体,使生理状态下中枢的内源性脑啡肽的免疫调节作用受到阻断。上述结果进一步证明,在生理条件下或当机体遭受感染时,阿片受体在中枢免疫调节中的重要作用。

3

3

3

本实验部分工作在实验医学研究中心分子生物学开放实验室进行,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Sheela DR, Namasicayam A, Prabhakaran K. Modulation of nonspecific immunity by hippocampal stimulation. *J Neuroimmunol*, 1993, **42**: 193 ~ 198.
- [2] Wang AJ (王阿敬), Yang YZ (杨渝珍), Wu YM (吴远明), et al. Effect of intrahippocampal microinjection of cellular immune function and brain IL21 gene expression in rat. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 1996, **48**: 348 ~ 354 (in Chinese with English abstract).
- [3] Wu YM (吴远明), Gao N (高娜), Xie H (谢虹), et al. Influence of enkephaline on interleukin21 gene expression in cultured hippocampal gliocytes of neonatal rat. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理和毒理学报), 1996, **10**: 200 ~ 203 (in Chinese with English abstract).
- [4] Brooks WH, Cross RJ, Roszman TL, et al. Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation. *Ann Neurol*, 1982, **12**: 56 ~ 61.
- [5] Reul JMHM, de Kloet ER. Two receptors systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 1985, **117**: 2505 ~ 2511.
- [6] Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system: actions and mechanisms of action. *TINS*, 1995, **18**: 130 ~ 136.
- [7] Miller GC, Murgu AJ, Plotnikoff NP. Enkephalins enhance active T2 cell rosettes from normal volunteers. *Clin Immunol Immunopathol*, 1984, **31**: 132 ~ 137.
- [8] Plotnikoff NP, Murgu AJ, Miller GC, et al. Enkephalin: immunomodulators. *Fed Proc*, 1985, **44**: 118 ~ 122.
- [9] Shen Y (沈奕), Zhang LM (张玲妹), Jiang JW (姜建伟), et al. Modulation of mouse splenic lymphocyte proliferation by μ -endorphin via opiate receptor. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 1992, **12**: 321 ~ 325 (in Chinese with English abstract).
- [10] Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*, 1994, **15**: 504 ~ 511.
- [11] Payne LC, Weigent DA, Blalock JE. Induction of pituitary sensitivity to interleukin21: a new function for corticotropin-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **198**: 480 ~ 484.

OPIOID RECEPTOR MEDIATED MODULATION OF INTRAHIPPOCAMPAL ENKEPHALIN INDUCED CELLULAR IMMUNE FUNCTION³

GAO NA

(*Department of Physiology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054*)

WANG AJING, YANG YUZHEN, HU MOUXIAN, XIE HONG

(*Reserch Center for Experimental Medicine, Tongji Medical University, Wuhan 430030*)

ABSTRACT

In the present work, the effect of intrahippocampal microinjection of opioid receptor antagonist naloxone on the enhancement of cellular immune responses induced by enkephalin was studied in rat. The results showed that (1) the proliferation activity of splenic lymphocytes stimulated by Con A and natural killer (NK) cell activity were decreased with microinjection of 1 μ l lipopolysaccharide (LPS, 50 ng/ μ l) into bilateral hippocampus; (2) the decrease of cellular immune responses induced by LPS could be inhibited by a preceding intrahippocampal injection of 1 μ l met-enkephalin (10 μ g/1 μ l); (3) the enhancement of cellular immune responses induced by met-enkephalin could be blocked by an opioid receptor antagonist naloxon (10 μ g/ μ l); and (4) cellular immune responses were also inhibited when naloxon was injected intrahippocampally alone. The above results suggest that the enhancement of cellular immune responses induced by enkephalin was mediated by opioid receptors in hippocampus.

Key words: neuroimmunomodulation; hippocampus; enkephalin; opioid receptor

³ Project Supported by the National Natural Science Foundation of China (No139270250)