

条件反射性抗体反应增强的动态分析 ——以 OVA 为非条件刺激物*

陈极震 林文娟 王玮雯 杨杰 邵枫

(中国科学院心理研究所脑-行为研究中心,北京 100101)

摘要 研究了条件反射性抗体反应增强模型的建立。被试为 49 只雄性成年 Wistar 大鼠,采用糖精水作为条件性刺激,一种蛋白抗原卵清蛋白作为非条件性刺激配给给予大鼠,两者结合后,在初次抗体应答下降阶段再次单独给予条件刺激,用酶联免疫吸附法分时段检测抗体水平的变化。发现条件组在条件刺激后 15,20,25 天左右抗体水平明显高于对照组。这一过程与初次抗体应答的规律类似。这些结果证实经一次条件训练,单独给予条件刺激能诱导出明显的条件反射性抗体反应增高。

关键词 条件反射性免疫增强,动态分析,卵清蛋白,大鼠。

分类号 B845

1 引言

神经系统可通过条件反射性机制抑制或增强免疫系统的活动^[1-5]。迄今条件反射性免疫抑制已被许多实验证实,而相对而言条件反射性免疫增强的研究则少得多,特别是以抗原作为非条件刺激物的条件反射性免疫应答增高就更少了。给动物一种新异味觉刺激(如糖精水等)作为条件刺激(conditioned stimulus, CS),随后立即注射抗原作非条件刺激(unconditioned stimulus, UCS),两者结合后单独再次给予 CS 即可诱导出一个抗原特异性的条件反射性免疫增强反应。

最早关于这方面的实验是 Metalnikov 和 Chornine(1926)做的,但未受关注^[6]。后来有人用抗原作 UCS 诱导出条件反射性肥大细胞分泌^[7]。Ader 等(1993)采用巧克力饮品作 CS,用一种蛋白性抗原 KLH(keyhole limpet hemocyanin, 钥孔血蓝素)作为 UCS,条件训练后再次给予 CS,结果单独 CS 刺激没有诱发出明显的条件反射性抗 KLH 抗体水平增高,需一个低于免疫剂量的 KLH 抗原和 CS 一起给予才行^[8]。林文娟、Husband 等人用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)作 UCS,糖精水作 CS,条件训练后 14 天

再次呈现 CS,4 天后取血测定发现单独 CS 诱导出了对 ovalbumin 的抗体免疫应答及 T 细胞增殖反应^[9,10]。这一实验首次提出了采用一次条件训练并单独糖精水刺激(CS)就诱导出免疫增强的模式,但该实验没有得到完全成功地验证,单独糖精水并没能诱导出显著的抗 OVA 抗体增高,而需配以小剂量的 OVA 才能诱导出明显的条件反射性免疫应答^[11,12]。此后,Alvarez - Borda 等(1995)用糖精水做条件性刺激、腹腔内注射 HEL(hen egg - white lysozyme)作为非条件性刺激,训练后再次单独给予糖精水诱导出了明显的抗 HEL 的 IgM、IgG 抗体增高,并且这一过程与正常的二次应答过程相类似^[13]。值得注意的是该实验程序选择在初次抗体反应已降至基底水平时再次单独给予 CS,并得到了比较稳定的验证^[14,15]。

总之,目前对抗原特异性条件反射性免疫应答增强的研究甚少,有限的几个实验采用的实验动物、抗原类型、实验程序也不尽相同。相比于正常的抗体生成,条件反射性抗体生成的水平要微弱得多,故建立一个稳定可靠的模型是比较困难的。有的实验是将 CS 和一个很小剂量的抗原一起给予从而诱导出抗体应答^[8,12]。Husband 等人虽然单独用 CS 诱

收稿日期:2002-10-03

通讯作者:林文娟,Email:Lin_wj@psych.ac.cn

*国家自然科学基金资助项目(批准号:39830130,39770265),中国科学院知识创新工程资助项目(批准号:KSCX2-2-03)。

导出了免疫增高,但需较大的样本含量,且差异显著性只达到临界范围。Alvarez - Borda 等的实验是在初次抗体反应已降至接近测不出时给予 CS。此外,目前还没有报告对条件反射性抗体增强的发生发展过程做一完整的描述。故本次实验同样用 OVA 作为非条件性刺激、糖精水作为条件性刺激,一次配对训练动物后,选择在初次抗体水平开始下降但仍处于较高水平的阶段给予单独的条件刺激,以检验一次训练后单独给予糖精水是否能引发一个显著的条件性抗体增高效应。并在条件刺激后连续分时段采血检测抗体水平,以动态观察这一反应的整个发生发展过程,为建立稳定可靠的模型提供依据。

2 材料与方法

2.1 实验对象

49 只雄性 Wistar 大鼠,体重约 220 ~ 250 克,鼠龄约 100 天。单笼饲养,温度控制在 $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, 12 小时光/暗交替,每天早 7 点开始照明。动物入实验室后先经适应期以适应新环境,此期间动物自由饮水、取食。单独取 2 只动物进行卵清蛋白 ($80\mu\text{g}/0.4\text{ml}/\text{只}$, grade V ovalbumin, OVA, Sigma 公司产品) 的免疫,随后每隔 5 天取其尾血测其抗体水平,以观察初次抗体生成的变化,并找到初次抗体生成水平开始下降的时段。适应期过后进入 5 天控制饮水期。每天在晚 9 点将两个水瓶置于每个笼子的前端,给水 15 分钟后撤走水瓶。喂水后抚摩动物约 2

分钟,以使其适应以后的实验操作。以后的条件反射性训练和条件刺激实验均在晚 9 点进行。

2.2 实验程序

在条件反射训练日(第 0 日),将 47 只动物随机分成 4 组:条件反射组(CS group, $n = 16$)、条件训练对照组(CS_0 group, $n = 8$)、非条件训练对照组(NC group, $n = 11$)和非条件反射组(UCS group, $n = 12$)。先给予 CS 和 CS_0 组大鼠(SAC/OVA)一瓶 0.25% 糖精水,5 分钟后加一瓶清水,一共饮用 15 分钟,立即腹腔内注射 OVA ($80\mu\text{g}/0.4\text{ml}/\text{只}$, grade V ovalbumin, Sigma 公司产品),采用这种给水方式的目的是:保证动物接受到糖精水这种新异刺激,同时用清水保证动物的正常液体所需;NC 和 UCS 组(Water/OVA)动物均给予两瓶清水,饮用 15 分钟后随即被注射相同剂量的 OVA。此后动物仍给予自由饮水,直到条件刺激日(第 30 日)的前 5 天,动物再次经过每晚 9:00 ~ 9:15 的控制饮水期。此时初次抗体水平处于开始下降但仍保持一定水平阶段(见图 1)。在条件刺激日,给 CS 和 NC 组动物糖精水,给水方式与条件训练日相同,随即注射 0.4ml 生理盐水; CS_0 和 UCS 组动物给予清水并注射生理盐水。此后全部动物一直自由饮水,并分时段连续采尾血(第 35、40、45、50、55、60、67、74 日)。血样经离心制备成血清,于 -20°C 保存,用酶联免疫吸附法(enzyme linked immune sorbent assay, ELISA)测定血清中抗 OVA IgG 抗体水平。实验程序见表 1。

表 1 实验程序

Group	Experimental Days		
	0	30	35,40,45,50,55,60,67,74
	Conditioning	Test trial	Samples
CS ($n = 16$)	SAC/OVA	SAC	Blood
CS_0 ($n = 8$)	SAC/OVA	Water	As above
UCS ($n = 12$)	Water/OVA	Water	As above
NC ($n = 11$)	Water/OVA	SAC	As above

注: SAC 糖精水(Saccerin); OVA 卵白蛋白血清(ovalbumin)

2.3 ELISA 法测定血清中抗 OVA IgG 水平

(1) 用浓度为 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的 OVA 包被 96 孔板,在 4°C 下过夜。用 PBS(含 0.05% 的 Tween20)洗板 2 次,再用双蒸水洗 1 次。(2) 将板甩干后,用 1% 的牛血清白蛋白(BSA,北京中山生物技术有限公司)(含 $0.005\mu\text{l}$ Tween20/ml)在室温下封闭 1 小时($100\mu\text{l}/\text{孔}$)。洗板(同上)。(3) 将 1:200 稀释的

待测血清加入 96 孔板中($100\mu\text{l}/\text{孔}$), 37°C 下孵育 1 小时。洗板(同上)。(4) 用辣根过氧化物酶标记的山羊抗 - 大鼠 Ig - G 抗体(北京中山生物技术有限公司)(稀释度 1:8000)在 37°C 下孵育 1 小时($50\mu\text{l}/\text{孔}$)。洗板(同上)。(5) 用自配的过氧化物酶底物加入 96 孔板($100\mu\text{l}/\text{孔}$),室温下放置约 5 分钟,到颜色充分显现,用 2N 硫酸中止反应($50\mu\text{l}/\text{孔}$)。在

酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)上读吸光度(OD 值)。过氧化物酶底物的配方为:A = 0.1M Na₂HPO₄; B = 0.04% 邻苯二胺(O-phenylenediamine, OPD)溶于 0.1M 柠檬酸。A 和 B 以 2:1 的比例混合后,加入 0.03% H₂O₂ 混合均匀即为工作液。

2.4 统计方法

各组动物在各个时点的抗体 OD 值用 SPSS 8.0 软件包中的多因素方差分析(GLM general factorial analysis of variance)进行分析。此外用单因素方差分析(One-Way ANOVA)的 post hoc Scheffe 分析在各个时点的组别差异。差异显著性设为 $p < 0.05$ 。

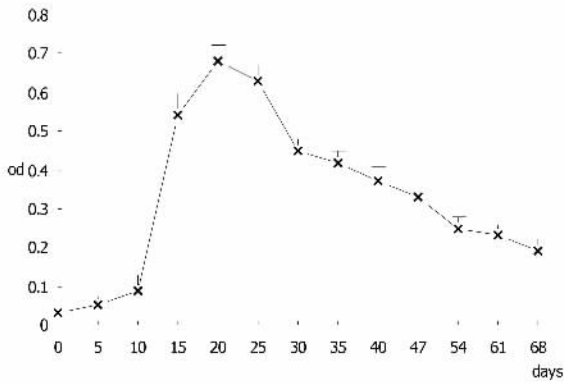


图1 OVA 免疫后初次抗体生成曲线 ($M \pm SE$)

3 结果

图1显示初次抗 OVA IgG 抗体生成的变化曲线,可以看出初次免疫后在 10 天左右抗体开始表达,15 天时水平急剧升高,20 天左右达到峰值,30 天下降较明显但表达仍较强烈,该时点被选作条件刺激日。

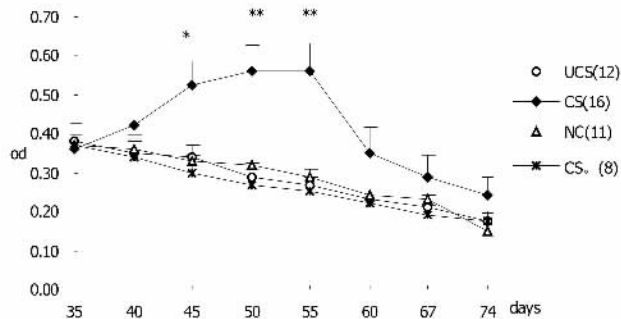


图2 条件刺激后 5、10、15、20、25、30、37、44 天抗 OVA IgG 抗体水平 ($M \pm SE$)

图2显示为各组动物在条件刺激后 5、10、15、20、25、30、37、44 天(即第 0、35、40、45、50、55、60、67、74 实验日)时的抗 OVA IgG 抗体表达的情况。

多因素方差分析显示有非常显著的组别差异(treatment effect, $F(3,314) = 16.992$; $p < 0.0001$)、取血时间差异(days effect, $F(7,314) = 9.502$; $p < 0.0001$)及交互作用(treatment \times days interaction, $F(21,314) = 1.774$; $p < 0.05$)。单因素方差分析显示在第 45、50、55 日有非常显著的组别差异:第 45 日, $F(3,43) = 5.155$, $p < 0.01$;第 50 日, $F(3,43) = 7.593$, $p < 0.001$;第 55 日, $F(3,43) = 7.542$, $p < 0.001$ 。进一步 Post hoc Scheffe 分析发现 CS 组的抗体 OD 值明显高于其他 3 个对照组:CS vs CS₀ 组(于第 45 日, $p < 0.05$;第 50 日, $p < 0.01$;第 55 日, $p < 0.02$);CS vs UCS 组(于第 45 日, $p < 0.05$;第 50 日, $p < 0.01$;第 55 日, $p < 0.01$);CS vs NC 组(于第 45 日, $p < 0.05$;第 50 日, $p < 0.02$,第 55 日, $p < 0.01$)。CS₀、UCS、NC 组在各个时点上没有明显差异($p > 0.05$)。

4 讨论

上述结果表明,条件反射组(CS 组)动物经一次条件训练后,在初次抗体应答减弱但仍保持一定水平时,单独给予条件刺激(糖水)诱导出了条件反射性抗 OVA IgG 抗体增加。分时段连续检测外周血中抗体水平描述了这一特异性反应的整个动态过程。在条件刺激后约 15 天左右出现明显的条件反射性抗体水平增高,20、25 天左右达到峰值,以后明显下降逐渐接近正常水平。这一过程与初次免疫应答的基本规律是类似的,但是反应的程度要微弱得多。

1975 年 Ader 和 Cohen 报告了第一个设计严密的行为性条件反射性免疫抑制(conditioned immunosuppression, CIS)模型,引起了西方学者的广泛关注,促进了一门新兴交叉学科——心理神经免疫学(Psychoneuroimmunology)的形成。这一研究通过神经性传入信号诱导出免疫性改变,从而证实了神经系统可以调节免疫系统的活动,这两个系统是相互影响和联系的^[16]。此后大量工作证实 CIS 是稳定可靠的模型,并在其基础上发展了条件反射性免疫增强模型。条件反射性免疫增强研究进一步为神经、免疫两大系统之间存在相互调节提供了证据,同时通过研究该模型发生发展的机制从而探索脑对免疫系统的作用机制,不失为一种有效的重要的方法。此外,人们期望也许可以利用这一模型产生的特异性无毒副作用的免疫药理学效应,在临床上提高免疫细胞活性,增强机体抗肿瘤、感染等疾病的能力。

相比于 CIS 和其他条件反射性免疫细胞功能增强的模型,因其没有免疫抑制剂和免疫细胞兴奋剂的加入,以抗原作为非条件性刺激的特异性抗体增加模型更适用于脑和免疫系统相互调节的机制学研究^[1,4,13]。

本实验室于 1993 年第一次报告了以 OVA 作为非条件刺激、经一次条件训练、单独条件刺激就诱导出条件反射性免疫增强的模式^[9,10]。但重复该模式没有成功,在一次条件训练后,需要一个很小剂量的抗原配合糖精水才能诱导出明显的条件反射性抗体水平增高^[12]。这与 Ader 的实验模式类似,说明条件反射性的免疫增强效应是比较微弱的。因其是在初次免疫应答之后产生的,故有实验提出在初次应答降至最低水平(几乎为零)的时候给予条件刺激容易诱发出该效应,这样使条件反射性的免疫应答处于一个低基础值的背景上从而得以更显著地显示出来^[13,14]。本次实验借鉴了这一经验,经过预先绘制初次抗 OVA 抗体的生成曲线,发现在免疫后 14 天时抗体水平处于急剧增高阶段,以往的实验都是在此时给予再次条件刺激,而 30 天左右抗体下降较明显,但仍保持一定的水平,考虑到 CS/UCS 信号结合的保持时间,故选择在此时给予再次条件刺激,结果观察到了明显的条件反射性抗体水平增高。综合以往的实验,在初次抗体应答升高、下降及降至零水平时给予条件刺激都能诱发出条件反射性抗体应答增强,表明条件刺激诱发的条件反射性免疫增强效应是客观存在的,但在初次抗体应答下降以后再诱发这一效应也许更能明显地表现出该效应的条件发射性作用。

本次实验通过连续分时段检测外周血中抗 OVA IgG 抗体水平,动态地观察了再次单独条件刺激(糖精水)引发的条件反射性抗 OVA 抗体增加的整个过程及规律。类似于初次抗体应答的规律,条件反射性抗体应答在条件刺激后并不立刻显著表达,而是在刺激后 15 天时才明显地观察到,以后经过高峰期(20 左右)开始下降接近对照组水平。说明这一条件反射性抗体应答现象是与初次抗体应答规律类似的,而条件刺激具有了特异性抗原刺激的效应。

5 结 论

采用蛋白性抗原 OVA 作为非条件性刺激(UCS),糖精水作为条件性刺激(CS),两者经一次结合训练(CS/UCS)后,在初次抗 OVA 抗体应答开

始下降时给予再次条件刺激,通过连续分时段检测外周血中抗体水平的方式,观察到了条件反射性抗 OVA 抗体水平增加,且这一过程与初次抗体应答的规律类似。

参 考 文 献

- 1 Ader R, Cohen N. Psychoneuroimmunology: Conditioning and stress. *Annual Review of Psychology*, 1993, 44: 53 ~ 85
- 2 Ader R. On the development of psychoneuroimmunology. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 405(1-3): 167 ~ 176
- 3 Greer S. What's in a name? Neuroimmunomodulation or psychoneuroimmunology? *Annals New York Academy Sciences*, 2000, 917568 ~ 917574
- 4 Hiramoto R N, Rogers C F, Demissie S, Hsueh C M, Hiramoto N S, Lorden J F, Ghanta V K. Psychoneuroendocrine immunology: site of recognition, learning and memory in the immune system and the brain. *International Journal of Neuroscience*, 1997, 92(3-4): 259 ~ 285
- 5 Hsueh C M, Kuo J S, Chen S F, Huang H J, Cheng F C, Chung L J, Lin R J. Involvement of catecholamines in recall of the conditioned NK cell response. *Journal of Neuroimmunology*, 1999, 94(1-2): 172 ~ 181
- 6 Metalnikov S, Chorine V. R le des reflexes conditionnels dans l'immunité. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1926, 40: 893 ~ 900
- 7 MacQueen G M, Siegal S. Conditional immunomodulation following training with cyclophosphamide. *Behavioral Neuroscience*, 1989, 103(3): 638 ~ 647
- 8 Ader R, Kelly K, Moynihan J, Grota L J, Cohen N. Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus. *Brain Behavior and Immunity*, 1993, 7: 334 ~ 343
- 9 Lin W, King M, Husband A J. A conditioned behavioral learning activated antibody response to ovalbumin: New evidence for the communication between CNS and immunity. *Proceedings of the second Afro-Asian Psychological Congress*, 1993. 788 ~ 793
- 10 Husband A J, Lin W J, Madsen G, King M G. A conditioning model for immunostimulation: Enhancement of the antibody response to ovalbumin by behavioral conditioning in rats. In A. J. Husband (Ed.), *Psychoimmunology: CNS - Immune Interactions*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1993. 139 ~ 147
- 11 Boehm G W, Darp J D, Grota L J, Moynihan J A, Cohen N, Ader R. Failure to replicate conditioned enhancement of antibody production following single-trial learning paradigms using antigen as the unconditioned stimulus. *Neuroimmunomodulation*, 1999, 5: 67
- 12 Li B, Lin W, Wei X et al. Conditioned immunomodulation using antigen as the unconditioned stimulus. *Acta Psychologica Sinica*, 1997, 29(suppl): 34 ~ 38
(李波, 林文娟, 卫星等. 以抗原作为非条件刺激的条件反射性免疫调节的研究. *心理学报*, 1997, 29 增刊: 34 ~ 38)
- 13 Alvarez-Borda B, Ramirez-Amaya V, Perez-Montfort R, Bermudez-Rattoni F. Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, 1995, 64:

- 103 ~ 105
- 14 Victor Ramirez - Amaya, Federico Bermudez - Rattoni. Conditioned enhancement of antibody production is disrupted by insular cortex and amygdala but not hippocampal lesions. *Brain Behavior and Immunity*, 1999, 13: 46 ~ 60
- 15 Madden K S, Boehm G W, Lee S C, Grotta L J, Cohen N, Ader R. One - trial conditioning of the antibody response to hen egg lysozyme in rats. *Journal of Neuroimmunology*, 2001, 113: 236 ~ 239
- 16 Ader R, Cohen N. Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosomatic Medicine*, 1975 Jul - Aug, 37(4): 333 ~ 340

THE DYNAMIC ANALYSIS OF CONDITIONED ENHANCEMENT OF ANTIBODY RESPONSE TO OVALBUMIN

Chen Jihuan, Lin Wenjuan, Wang Weiwen, Yang Jie, Shao Feng

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

Abstract

To establish the model of conditioned enhancement of antibody production. Forty - nine male and adult Wistar rats were used. A novel taste of saccharin was served as the conditioned stimulus (CS) and an injection of a protein antigen ovalbumin as the unconditioned stimulus (UCS). After a CS/UCS pairing was made, animals were re - exposed to the CS alone. Blood samples were periodically collected by tail incisions after re - exposure to the CS. The level of anti - OVA antibody production was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the levels of anti - OVA antibody production of the group CS were significantly greater than the controls at the day 15, 20 and 25 after the CS presentation. The pattern of the conditioned anti - OVA IgG production was similar to that of the primary antibody response. The results reinforced the view that the enhancement of antibody production can be induced by single - trial Pavlovian conditioning where the CS alone is sufficient.

Key words conditioned immunoenhancement, dynamic analysis, rat, ovalbumin.