

7-羰基-脱氢表雄酮对慢性轻度应激 BALB/c 小鼠免疫系统的影响

刘雁勇, 杨楠, 孔令娜, 左萍萍*

(中国医学科学院、中国协和医科大学 基础医学研究所, 北京 100005)

摘要: 目的 建立慢性轻度应激动物模型, 观察 7-羰基-脱氢表雄酮 (7- α -DHEA) 对该模型免疫系统功能的影响。方法 通过对 BALB/c 小鼠连续 4 周施加 7 种应激原, 建立慢性轻度应激动物模型。采用淋巴细胞增殖实验和 NK 细胞杀伤实验评价免疫功能的变化。结果 4 周慢性应激处理后, 小鼠 T 淋巴细胞对 Con A 刺激增殖反应、NK 细胞杀伤活性及血清中 T_3 和 T_4 水平明显下降。7- α -DHEA $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能显著提高小鼠 T 淋巴细胞对 Con A 刺激增殖反应, 并显著提高 NK 细胞杀伤活性及应激小鼠血清中 T_3 和 T_4 浓度。结论 7- α -DHEA 能显著改善慢性应激引起的免疫功能低下。

关键词: 7-羰基-脱氢表雄酮; 慢性轻度应激; 淋巴细胞增殖反应; NK 细胞杀伤活性

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)12 - 0881 - 04

Effects of 7- α -DHEA treatment on the immunoreactivity of BALB/c mice subjected to chronic mild stress

LIU Yan-yong, YANG Nan, KONG Ling-na, ZUO Ping-ping*

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract: **Aim** To determine whether 7- α -dehydroepiandrosterone (7- α -DHEA) can reverse the hyp immunity in BALB/c mice exposed to chronic mild stress. **Methods** A chronic mild stress animal model was established by subjecting BALB/c mice to a stressful regimen arranged in an unpredicted manner for 4 consecutive weeks. Immunological function alternations under chronic mild stress were assessed by lymphocytes proliferative response to mitogens and NK cell lysis activity test. **Results** The studies showed the correlation between the state of depression and abnormalities in the immune response, such as a decrease of T lymphocytes proliferative response to Con A and suppression of cytotoxic of NK cell. Meanwhile, significant decrease of T_3 and T_4 levels was also observed. When stressed mice were daily given 7- α -DHEA $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, lymphocyte proliferative response and the NK cell activity were significantly enhanced and the decreased levels of T_3 and T_4 were restored in the stressed mice. **Conclusion** 7- α -DHEA can improve the depressive symptoms and hyp immunity of BALB/c mice induced by chronic mild stress as its parent DHEA.

Key words: 7- α -dehydroepiandrosterone; chronic mild stress; lymphocyte proliferative response; NK cell lysis activity

研究表明,慢性应激能诱发情感疾患,如抑郁症等,并降低机体免疫力而导致肿瘤发生率升高,因此引起广泛重视^[1,2]。脱氢表雄酮(DHEA)是肾上腺皮

质合成量最大的甾体激素,重度抑郁症患者脑脊液中 DHEA 含量与正常人相比明显下降,经过 DHEA 治疗后抑郁症状明显改善^[3]。但由于 DHEA 体内能够转化为睾酮和雌激素,妇女使用时可能诱发多毛症和多囊卵泡症而使其应用受到限制^[3,4]。7- α -DHEA 是 DHEA 的代谢产物,它不能激动雄激素受体,从而减少了副作用^[4,5]。

收稿日期: 2002-12-18.

基金项目: 国家科技部重点 973 项目(J2000571008).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 65296404,

E-mail: zuopp@public3.bta.net.cn

本研究用慢性轻度应激模型观察 7- α -DHEA 对其免疫系统的影响,并探讨其作用机理。

材料与方法

试剂及仪器 DHEA、刀豆素(Con A)、脂多糖(LPS)购自 Sigma 公司;RPMI 1640 及胎牛血清为 Gibco BRL 公司产品。7- α -DHEA 为白色针状结晶,由本实验室合成,并经过结构确定,分子量为 302.4,纯度为 98%。小鼠自发活动箱及视频采集系统均由北京杰日欧公司研制。

实验动物及分组给药 健康 BALB/c 小鼠,8 周龄,体重(21 \pm 2) g, δ , 购自中国医学科学院实验动物研究所。动物单独饲养,(25 \pm 1) $^{\circ}$ C 明暗各 12 h, 自由摄食。动物适应环境 3 d, 经禁食禁水 3 h 后测定 1 h 内 2% 蔗糖溶液饮用量,共取得 6 条饮用基线。并根据动物单位体重蔗糖溶液饮用量均匀分组($n=12$): 对照组(control), 模型组(stress), 5 mg \cdot kg $^{-1}$ 7- α -DHEA 组(stress + 7OD-L), 15 mg \cdot kg $^{-1}$ 7- α -DHEA 组(stress + 7OD-H), 5 mg \cdot kg $^{-1}$ DHEA 组(stress + DHEA-L), 15 mg \cdot kg $^{-1}$ DHEA 组(stress + DHEA-H)。各组动物于应激处理当日 08:00 ip 芝麻油或用该溶媒配制的 7- α -DHEA 或 DHEA 悬液 5 mg \cdot kg $^{-1}$, 连续 4 周。

应激程序 本实验采用 Monleon 等^[7]建立的小鼠应激程序并稍加改动。每周应激程序包括两次食物剥夺(12 h), 两次饮水剥夺(14 h), 两次彻夜光照, 两次 14 h 湿笼饲养, 两次 5 min 游泳, 两次 30 min 倒悬, 两次配对饲养(17 h)。以上应激原随机组合实施, 连续进行 4 周。对照组也饲养于同样环境中, 但不接触处理组动物和应激原。

动物自发活动测定 4 周慢性应激处理结束后, 在安静环境中将各组 BALB/c 小鼠分别放入自发活动箱内, 观察慢性应激及 7- α -DHEA 和 DHEA 补充对其自发活动的影响。

小鼠脾脏 T 及 B 淋巴细胞增殖实验^[8] 自发活动测定结束后, 将小鼠断头处死。按常规制备小鼠脾细胞悬液, 于 96 孔培养板每孔加入细胞悬液($2 \times 10^5 \cdot L^{-1}$) 100 μ L 和 2 mg $\cdot L^{-1}$ Con A 或 20 mg $\cdot L^{-1}$ LPS 100 μ L。对照孔用完全培养基代替 Con A 或 LPS。实验和对照均设 4 复管。培养板置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 条件下培养 72 h, 培养终止前 8 h, 每孔加入 3 H-TdR(放射比活度 0.93 TBq \cdot mmol $^{-1}$) 37 kBq, 随后于细胞收集器上收获细胞, 滤膜烘干, 加入闪烁液 5 mL 置于液闪计数仪上测定。

NK 细胞活性测定^[9] 用培养液调整细胞数 $4 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 以小鼠淋巴瘤 YAC-1 细胞为靶细胞, 在 96 孔培养板上每孔加入脾细胞悬液 75 μ L, 按效应细胞: 靶细胞 = 50: 1 加入 YAC-1 靶细胞悬液 75 μ L, 另设效应细胞和靶细胞对照。每孔 150 μ L, 设 4 平行管, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 条件下培养 10 h, 采用 MTT 法测定 A 值, 按下列公式计算 NK 细胞杀伤活性:

$$\left[1 - \frac{A_{570\text{杀伤孔}} - A_{570\text{效应细胞对照孔}}}{A_{570\text{靶细胞对照孔}}} \right] \times 100\%$$

血清 T $_3$ 和 T $_4$ 水平的检测 血清中 T $_3$ 和 T $_4$ 含量测定采用中国原子能研究院提供的双抗体¹²⁵I 放射免疫分析试剂盒。加样顺序参考试剂盒说明。

统计处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计处理用 SPSS 10.0 软件 ANOVA 分析, 多重比较方差齐性满足时用 Tukey 分析, 方差不齐时用 Dunnett T $_3$ 分析。P < 0.05 时认为有显著差异。

结果

1 慢性应激对动物体重的影响

健康 BALB/c 小鼠动物分组后称体重, 进行方差分析($F[5, 66] = 1.255$; $P > 0.05$), 结果显示分组随机化较好, 组间动物体重差异不大。4 周应激处理结束后, 再次称重, 计算动物体重增加值, 并进行方差分析。经过 4 周慢性应激处理后, 模型组动物体重增加与对照组动物相比虽有所减少, 但无统计学意义。

2 慢性应激对欣快感的影响

小鼠 4 周慢性应激处理后, 应激组小鼠蔗糖饮用量明显下降, 表明小鼠处于一种抑郁状态($P < 0.05$)。应激处理同时补充 7- α -DHEA 和 DHEA 15 mg \cdot kg $^{-1}$ 后, 小鼠蔗糖饮用量显著增加, 显示出其有明显抗抑郁作用($P < 0.05$), 见图 1。

3 慢性应激对动物自发活动的影响

经过 4 周慢性应激处理后, 小鼠自发活动明显下降, 被放入自发活动箱内后探究活动明显减少($P < 0.05$)。经 7- α -DHEA 5 及 15 mg \cdot kg $^{-1}$ 和 DHEA 5 mg \cdot kg $^{-1}$ 治疗后的应激小鼠自发活动显著增加($P < 0.05$), 见图 2。

4 慢性应激及 7- α -DHEA 和 DHEA 补充对免疫系统的影响

自发活动测定实验结束后, 将所有小鼠断头处死, 取胸腺称重, 结果显示应激小鼠和对照小鼠的胸腺重量没有明显差异。应激小鼠 T 淋巴细胞对 Con A 刺激增殖反应明显下降($P < 0.05$); 而应激小

鼠 B 淋巴细胞对 LPS 增殖反应没有明显影响。显示慢性应激主要影响细胞介导的免疫反应。每日补充 7- α DHEA 15 mg·kg⁻¹ 能够显著提高 T 淋巴细胞增殖反应 ($P < 0.05$)。NK 细胞杀伤实验结果显示, 应激小鼠 NK 杀伤活性明显下降 ($P < 0.05$)。经每日补充 7- α DHEA 15 mg·kg⁻¹ 及 DHEA 5 和 15 mg·kg⁻¹, 能显著增强 NK 细胞杀伤活性 ($P < 0.05$), 见表 1。

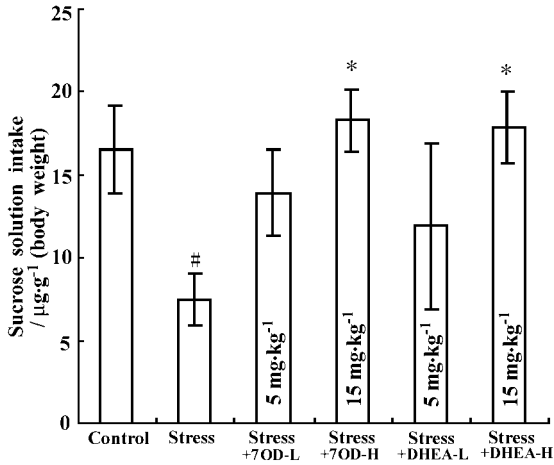


Figure 1 Effect of exposure to chronic mild stress and chronic treatment with 7- α DHEA (7OD) and DHEA on the 2% sucrose solution consumption by BALB/c mice in 1 h tests. The data are expressed as $\bar{x} \pm s$ for three trials, $n = 12$ for each group. Data were analyzed by one-way repeated measures ANOVA. # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs stress group

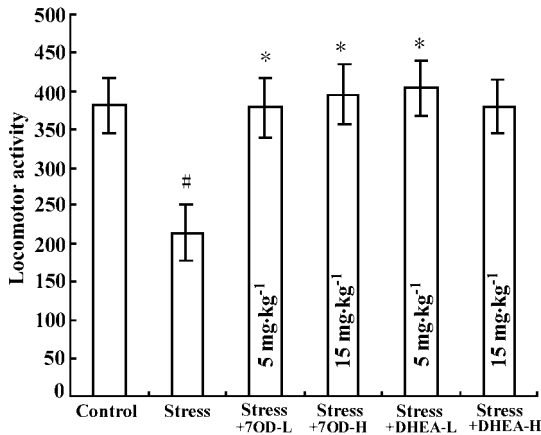


Figure 2 Effect of exposure to chronic mild stress and chronic treatment with 7- α DHEA and DHEA on locomotor activity of BALB/c mice. The data are expressed as $\bar{x} \pm s$ for three trials, $n = 12$ for each group. Data was analyzed by one-way repeated measures ANOVA. # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs stress group

Table 1 Effect of chronic mild stress and 7- α DHEA (7OD), DHEA treatment on splenocytes proliferation and natural-killer cell activity

Group / mg·kg ⁻¹	Splenocytes proliferation / min ⁻¹ ($\times 10^4$)	NK cell activity / %
Control	1.78 \pm 0.18	64 \pm 12
Stress	0.86 \pm 0.19 #	45 \pm 15 #
Stress + 7OD-L (5)	1.5 \pm 0.6	51 \pm 9
Stress + 7OD-H (15)	1.33 \pm 0.27 *	65.2 \pm 1.4 *
Stress + DHEA-L (5)	1.3 \pm 0.3	60.9 \pm 1.6 *
Stress + DHEA-H (15)	1.22 \pm 0.23	67 \pm 5 *

$n = 8$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs stress group

5 慢性应激对血清 T₃ 和 T₄ 水平的影响

4 周慢性应激使小鼠血清中 T₃ 和 T₄ 水平显著降低 ($P < 0.05$)。高剂量 7- α DHEA 和 DHEA 均能显著恢复血清中 T₃ 和 T₄ 水平 ($P < 0.05$), 见表 2。

Table 2 Effect of exposure to chronic mild stress and chronic treatment with 7- α DHEA and DHEA on T₃ and T₄ serum level

Group / mg·kg ⁻¹	Serum thyroid hormone levels	
	T ₃ / ng·L ⁻¹	T ₄ / μ g·L ⁻¹
Control	75 \pm 27	3.7 \pm 1.1
Stress	42 \pm 16 #	2.2 \pm 0.8 #
Stress + 7OD-L (5)	42 \pm 12	3.0 \pm 1.0
Stress + 7OD-H (15)	74 \pm 12 *	3.1 \pm 0.7 *
Stress + DHEA-L (5)	58 \pm 13	3.6 \pm 1.6
Stress + DHEA-H (15)	79 \pm 15 *	3.8 \pm 1.2 *

$n = 8$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs stress group

讨论

由 Willer 等发展的给动物随机施加多种应激原建立的慢性应激模型, 已被人们广泛接受为自然环境下诱导的实验性抑郁模型。本实验采用这种模型并稍加改进, 将动物单独饲养, 减少多只动物同养时对蔗糖溶液饮用测定的干扰。实验发现, 经过 4 周慢性应激处理后, 小鼠蔗糖溶液饮用量和自发活动显著下降, 表明小鼠欣快感缺失, 处于一种抑郁状态。

同时本研究显示, 应激小鼠 T 淋巴细胞对 Con A 刺激增殖反应能力下降, NK 细胞杀伤活性下降, 血清中 T₃ 及 T₄ 明显下降, 与临床发现老年重度抑郁症患者 NK 细胞活性显著下降^[2]相符。有关慢性应激影响免疫功能的可能机制很多, 例如下丘脑-垂体-肾上腺轴激活引起的糖皮质激素升高抑制免疫

功能等^[10]。目前已有许多研究者将目光转向甲状腺素对免疫功能的调节作用,如甲状腺功能低下的人群循环系统中淋巴细胞数目下降,经过甲状腺素补充后,细胞数目得到恢复^[11]。在本研究中发现经过4周慢性应激处理后,应激小鼠血清中 T₃ 及 T₄ 水平与淋巴细胞功能变化趋势一致。

当应激小鼠每日补充 7- α -DHEA 和 DHEA 后,蔗糖溶液饮用量和自发活动均得到恢复,显示 7- α -DHEA 与 DHEA 一样有明显抗抑郁作用。同时 T 淋巴细胞增殖反应和 NK 细胞杀伤活性增强,血清 T₃ 及 T₄ 明显升高,表明 7- α -DHEA 与 DHEA 均对慢性应激引起的免疫功能低下具有增强作用。

肾上腺皮质是 DHEA 的主要来源,中枢神经系统也可以合成 DHEA,因此这些甾体也被命名为“神经甾体”。研究表明这些神经甾体可以调节 NMDA 能、DA 能、胆碱能及 Sigma 等受体功能,参与学习记忆、条件性恐惧应激反应^[12,13],中枢对抗糖皮质激素作用^[14]。前期研究发现,慢性应激小鼠下丘脑和海马两部位 Sigma 受体明显上调,而皮层和海马部位胆碱能 M 受体下调(另文发表),因此认为 7- α -DHEA 及 DHEA 可能通过与脑内多神经递质受体发生作用,调节下丘脑-垂体-甲状腺轴而发挥免疫调节作用。

References:

- [1] Kubera M, Basta-Kaim A, Holan V, *et al.* Effects of mild chronic stress as model of depression on the immunoreactivity of C57BL/6 mice [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1998, **20** (12): 781 - 789.
- [2] Miller GE, Cohen S, Herbert TB. Pathways linking major depression and immunity in ambulatory female patients [J]. *Psychosom Med*, 1999, **61**(6): 850 - 860.
- [3] Bloch M, Schmidt PJ, Danaceau MA, *et al.* Dehydroepiandrosterone treatment of midlife dysthymia [J]. *Biol Psychiatr*, 1999, **45**(12): 1533 - 1541.
- [4] Mortola JF, Yen SS. The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, **71**(3): 696 - 704.
- [5] Anderson E, Lee MT, Lee G. Cytogenesis of the ovarian follicle of the rat: ultrastructural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone [J]. *Anat Rec*, 1992, **234**(3): 359 - 382.
- [6] Miyamoto H, Yeh S, Lardy H, *et al.* Δ^5 -Androstenediol is natural hormone with androgenic activity in human prostate cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(19): 11083 - 11088.
- [7] Monleon S, D' Aquila P, Parra A, *et al.* Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine [J]. *Psychopharmacology*, 1995, **117**(4): 453 - 457.
- [8] Silberman DM, Wald M, Genaro AM. Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response, participation of serum thyroid hormone and corticosterone [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, **2**(4): 487 - 497.
- [9] He JS, Li RZ, Zong TY. Methodological research on MTT reduction assay for NK cells activity [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1996, **12**(6): 356 - 358.
- [10] Maier SF, Watkins LP, Fleshner M. Psychoneuroimmunology, the interface between behavior, brain and immunity [J]. *Am Psychol*, 1994, **49**(12): 1004 - 1017.
- [11] Cremaschi GA, Gorelik G, Klecha AJ, *et al.* Chronic stress influences the immune system through the thyroid axis [J]. *Life Sci*, 2000, **67**(18): 3171 - 3179.
- [12] Majewska MD. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance [J]. *Prog Neurobiol*, 1992, **38** (4): 379 - 395.
- [13] Bergeron R, Montigny C De, Debonnel G. Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors [J]. *J Neurosci*, 1996, **16**(9): 1193 - 1202.
- [14] Kalimi M, Shafagoj Y, Loria R, *et al.* Antiglucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) [J]. *Mol Cell Biochem*, 1994, **131**(1): 99 - 104.