

## 褪黑激素对小鼠免疫功能的影响

### Effect of Melatonin on Immune Function in Mice

曾雪瑜\*

Zeng Xueyu

彭树勋

Pang S. F.

(香港大学医学院生理系, 香港沙宣道)

(Faculty of Medicine, University of Hong Kong, Sassoon Road, Hong Kong)

**摘要** 采用<sup>3</sup>H-TdR 掺入法和溶血素测定法观察褪黑激素 (Mt) 对刀豆素 (Con A) 诱导小鼠脾淋巴细胞增殖和半数溶血值 (HC<sub>50</sub>) 的影响。结果表明, Mt 于光周期傍晚腹腔注射 0.01、0.05、0.1 mg/kg 能明显促进 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖, 提高可的松抑制的脾淋巴细胞增殖及环磷酰胺抑制的半数溶血值。提示 Mt 具有免疫增强作用和对抗应激引起的免疫抑制作用, 在临床医学上具有广阔应用前景。

**关键词** 褪黑激素 淋巴细胞增殖 半数溶血值 (HC<sub>50</sub>)

**Abstract** The effects of proliferative responses of melatonin (Mt) on splenocytes stimulated by Con A and HC<sub>50</sub> value in mice are studied using <sup>3</sup>H-TdR infiltration and hemelysin mensuration. The results show that in medium light (ML), Intraperitoneal (ip) 0.01, 0.05, 0.1 mg/kg Mt can significantly facilitate proliferative responses of splenocytes stimulated by con A in normal mice and, can enhance the proliferation of splenocytes inhibited by cortisone and HC<sub>50</sub> value inhibited by cyclophosphamide. The results indicate that Mt possessed potential immunity and anti-tress function.

**Key words** melatonin, proliferation of splenocytes, HC<sub>50</sub> value

褪黑激素 (Melatonin, 简称 Mt), 结构是 N-乙酰 5-甲氧色胺 (N-Acetyl-5-methoxytryptamine), 分子量 232.3 g, 是松果体内生物合成的一种吲哚类激素, 具有较广泛的生理活性作用, 与个体发育、生殖、催眠、维持脑内稳定有重要关系<sup>[1]</sup>。在临床上, 某些疾病如肿瘤、癫痫等的发生、发展与 Mt 独特昼夜节律分泌有密切相关<sup>[2]</sup>, 并具有免疫调节功能<sup>[3,4]</sup>。本文观察腹腔注射 (ip) Mt 对小鼠免疫功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物: 雄性 C<sub>57</sub>BL/6, BALB/C 小鼠, 均由香港大学试验动物中心供给。

1.1.2 样品: Mt (Sigma Chemical Company), 溶解于无水乙醇中, 用生理盐水稀释所需浓度。

1.1.3 试剂: 刀豆素 A (Con A) (Sigma Chemical Company); <sup>3</sup>H-TdR 185 GBq/mmol·L<sup>-1</sup> (Amersham, Buckinghamshire, England), 用生理盐水稀释至

370 kBq/mL。

1.1.4 培养液: RPMI 1640 粉内含 L-谷氨酰胺 (Gibco, Gaithersburg USA cat), 10.4 g 溶解于 1000 mL 双蒸水中, 内加青一链霉素, 最终浓度为 100 单位/mL 和 1 mol/L Hepes 缓冲液 20 mL, 用 NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 7.2~7.4, G-6 滤器除菌后低温保存, 临用前加入 10% 小牛血清 (Flow Lab, North Ryde, NSW, Australia cat), 即为完全培养液。

1.1.5 闪烁液: 1000 mL 甲苯中加入 6 g ppo (2,5-二苯基恶唑) 和 0.4 g popop [1, 4双 (5-苯基恶唑基-2)]。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠脾淋巴细胞增殖反应<sup>[5,6]</sup>

动物预先在暗 12 h, 光 12 h 的光循环周期中处理 7 d, 光周期 6:00~18:00, 暗周期 18:00~6:00, 试验在光中期进行。采用 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法。无菌取脾, 用 1640 完全培养液分散脾细胞, 1500 r/min 离心 5 min, 洗涤细胞 1 次, 重悬细胞, 将细胞浓度调至 5×10<sup>7</sup>/mL, 每培养管加入 5×10<sup>6</sup>/mL, Con A 10 μg/mL, 总量 1 mL, 设无 Con A 管及空白对照管。于二氧化碳培养箱 37℃ 培养 48 h, 收获前

1994-05-25 收稿; 1994-08-11 修回。

\* 广西中医药研究所, 南宁市古城路 20 号, 530022 (Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, 20 Gucheng Road, Nanning, Guangxi, 530022)

18 h 加50  $\mu\text{L}$   $^3\text{H-TdR}$  (终浓度为18.5 kBq/mL), 收获细胞过滤在玻璃纤维膜上(型号GF/B. Whatman, 2.5 m. 100 circles), 用液体闪烁仪测定 $5 \times 10^6$ 脾细胞cpm.

1.2.2 溶血素测定法: 采用徐学瑛法<sup>[7]</sup>.

1.2.3 数据统计方法: 数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, 实验结果均进行t检验.

## 2 结果

### 2.1 Mt对Con A诱导正常小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响

(1) 体内法. 选用 $10 \pm 2 \text{ g}$   $\delta$   $\text{C}_{57}\text{BL}/6$ 小鼠, 给药组于傍晚 ip Mt (0.01、0.05、0.1 mg/kg), 对照组 ip 生理盐水 qd  $\times 7$  d. 结果与对照组比较, Mt 0.01、0.05、0.1 mg/kg ip 均能明显增加 Con A 诱导的脾淋巴细胞增殖, 其作用呈量效关系 (图1).

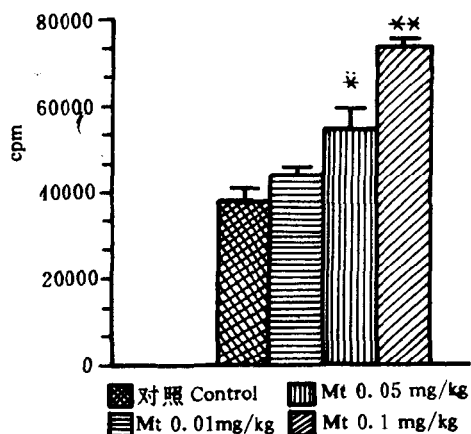


图1 ip Mt对Con A诱导脾细胞增殖反应的影响

Fig. 1 Effect of ip Mt on proliferative response of splenocytes stimulated by Con A in vivo ( $n > 7$ )

与对照组比较 Compared with control \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

(2) 体外法. $^3\text{H-TdR}$ 掺入法. 用 $10 \pm 2 \text{ g}$ 正常 $\delta$   $\text{C}_{57}\text{BL}/6$ 小鼠脾制备脾细胞, Mt外加, 浓度为 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ . 当Mt浓度为 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 时, 对Con A诱导脾淋巴细胞增殖无明显影响. 当Mt为 $1 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ 时, 其 $5 \times 10^6$ 脾细胞的cpm为 $54670 \pm 5376$ , 与Con A组 $129631 \pm 12176$ 比较有明显抑制作用.

### 2.2 Mt对可的松抑制小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响

选用 $10 \pm 2 \text{ g}$   $\delta$   $\text{C}_{57}\text{BL}/6$ 小鼠, 给药组 ip Mt 0.05、0.1、1 mg/kg, 对照组及可的松组 ip 生理盐水 (下同). Mt组和可的松组均于给药同时肌肉注射可的松

500  $\mu\text{g}/\text{鼠}$ , qd  $\times 7$  d. 结果, Mt 0.5、0.1 mg/kg 均能明显对抗可的松抑制的 Con A 诱导的脾淋巴细胞增殖反应 (图2).

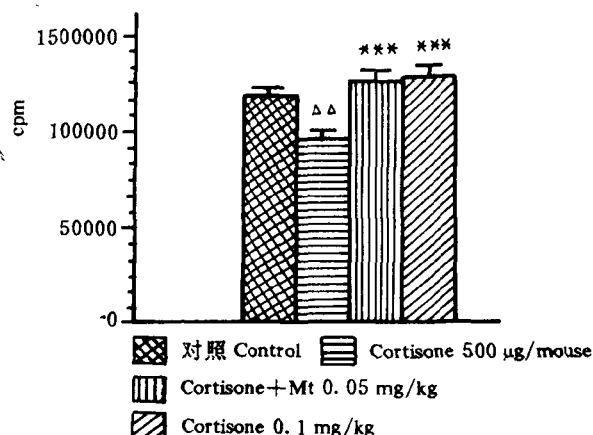


图2 ip Mt提高可的松抑制的Con A诱导的脾细胞增殖反应

Fig. 2 Proliferative response of ip Mt to lifting splenocytes which have been stimulated with Con A ( $n > 4$ ) and inhibited by cortisone in vivo

与对照组比较 Compared with control  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与可的松组比较 Compared with cortisone \*\*\*  $P < 0.001$

### 2.3 Mt对小鼠溶血素的影响

选用18~22 g BALB/C小鼠, 给药组 ip Mt 0.1、1 mg/kg, 设对照组及环磷酰胺组 (cy), qd  $\times 5$  d. Mt和环磷酰胺组于免疫第1、3天皮下注射环磷酰胺20 mg/kg, 免疫第6天取小鼠血清测定溶血素. 结果, Mt 1 mg/kg能明显提高环磷酰胺抑制的 $\text{HC}_{50}$  (表1).

表1 褪黑激素对溶血素形成的影响

Table 1 Effect of melatonin on hemolysin formation

| 组别<br>Group                        | 剂量<br>Doses<br>(mg/kg $\times$ d) | 动物数<br>No.<br>animals | 半数溶血值<br>$\text{HC}_{50}$<br>( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--|
| 对照<br>Control                      |                                   | 10                    | 173.27 $\pm$ 56.85                                       |
| 环磷酰胺<br>Cyclophosphamide           | 20 $\times$ 2                     | 8                     | 42.85 $\pm$ 17.03 <sup>+</sup>                           |
| 环磷酰胺+Mt<br>Cyclophosphamide<br>+Mt | 20 $\times$ 2 + 1 $\times$ 5      | 7                     | 60.03 $\pm$ 13.54 <sup>*</sup>                           |
|                                    | 20 $\times$ 2 + 0.1 $\times$ 5    | 6                     | 42.31 $\pm$ 13.62  |

Mt = melatonin; 与对照组比较 Compared with control, +  $P < 0.001$ ; 与环磷酰胺组比较 Compared with cyclophosphamide, \*  $P < 0.05$ .

(下转第79页 Continue on page 79)

表11列出相同条件下层面铺1:2.5常态混凝土砂浆的层面抗剪(断)强度比不铺砂浆的好。因此,在混凝土初凝或作冷缝处理时采用,此措施有利于RCC层面结合。

## 5 结论

岩滩大坝RCC材料组成,有低水胶比(0.54)、低水泥用量(55 kg/m<sup>3</sup>)、高粉煤灰掺量(65%)、高石粉微集料含量(94 kg/m<sup>3</sup>)特征。其碾压工作性、技术性、经济性与质量优良。

粉煤灰、石粉微集料,应被视为RCC的重要组成部分。有条件时,应首选优质粉煤灰与具亲水性岩性的石灰岩人工砂、石料,砂的石粉含量最优为15%,在12%~18%范围为好。

RCC设计龄期应不低于90 d,以90 d或180 d龄期评价掺粉煤灰RCC的技术、经济性,稳定、合理。

根据岩滩大坝RCC质量检验统计结果,砼配合比强度的 $R_{\text{配}} = R_{\text{设}} + \sigma$ ,  $\sigma$ 取3.5~4.0 MPa;以90 d或180 d龄期评价强度匀质性,以 $\sigma < 4$ 或4.5 MPa,离差系数 $C_v < 0.15$ 或0.17为优良,是合适的。

碾压砼层面抗剪(断)试验的 $f'_l$ 、 $c'$ 数据表明:作好RCC配合比试验设计与施工质量的严格控制,是可满足RCC高坝设计要求的。

## 参考文献

- 1 黄云生,张治文.岩滩水电站碾压混凝土大坝的设计与施工.红水河,1990(3):9.
- 2 惠荣炎等.岩滩水电站大坝工程碾压混凝土变荷性能试验报告.北京:水利水电科学研究院,1990.
- 3 蔡继勋.岩滩围堰RCC特性与配合比设计.北京:RCC专委会94研讨会议资料,1994.

(责任编辑:梁积全)

(上接第42页 Continue from page 42)

## 3 讨论

本试验,ip Mt能明显增加Con A诱导正常小鼠脾淋巴细胞增殖反应,提高可的松抑制的小鼠脾淋巴细胞增殖及环磷酰胺抑制的半数溶血值 $HC_{50}$ ,与文献[8]报道Mt能对抗药理剂量的皮质酮或环磷酰胺引起的免疫抑制作用相一致,提示ip Mt具有免疫增强和对抗应激引起的免疫抑制作用。Mt可能是体内重要的神经免疫调节激素<sup>[9]</sup>。

处于免疫低下的肿瘤患者,临床上以Mt和白细胞介素-2(IL-2)联合用药治疗,可降低IL-2的毒性,提高治疗作用,这可能与Mt的免疫调节作用有关<sup>[10,11]</sup>,可见Mt在临床医学上具有广阔的应用前景。

## 参考文献

- 1 徐叔云,许杜娟,魏委等.松果体研究的某些进展.中国临床药理学杂志,1991,7(1):13~19.
- 2 应水旺,张家驹.褪黑激素对脑机能的影响.生理科学进展,1987,18(3):251.
- 3 Masetroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. The pineal gland and the circadian, opiate immunoregulatory role of melatonin. Ann n y Acad Sci, 1987, 496: 67~77.

- 4 Fraschini F, Scaglione F et al. Melatonin and immunity. Acta Oncol, 1990, 29(6):775~776.
- 5 Pawlikowski M, Lyson K et al. Effect of benzodiazepines on the proliferation of mice spleen lymphocytes in vitro. J Neural Transm, 1988, 73(2):161~166.
- 6 张罗修,贾永锋,干翠宝等. K-硒华卡拉胶对免疫抑制小鼠淋巴细胞增殖及抗体形成细胞的影响(英文).药理学报,1993,28(8):561~566.
- 7 徐学瑛,李元,许津.一个改进的体液免疫测定方法——溶血素测定法.药理学报,1979,14(7):443~445.
- 8 Masestroni GJW, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland immunity, circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. J Neuroimmunol, 1986, 13(1):19~30.
- 9 Pierpaoli W, Maestroni GJW. Melatonin: A principal neuroimmunoregulatory and antistress hormone; its anti-aging effects. Immunol Lett, 1987, 16(3,4):355~361.
- 10 Lissoni P, Brivio F, Barni S et al. Neuroimmunotherapy of human cancer with interleukin-2 and the neurohormone melatonin; its efficiency in preventing hypotension. Anticancer Res, 1990, 10(6):1759~1761.
- 11 Lissoni P, Barni S, Crispino S et al. Endocrine and immune effects of melatonin therapy in metastatic cancer patients. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989, 25(5):789~795.

(责任编辑:蒋汉明)