



亚健康状态大鼠的神经-免疫-内分泌机制的研究

徐孝平, 潘永明, 刘瑞敏, 寿旗扬, 贾临超, 周卫民, 朱科燕, 陈民利

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 探讨亚健康状态大鼠的神经-免疫-内分泌的机制。方法 取雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 36 只, 按体重随机分成 6 组, 即多因素组 (MF)、多因素干预组 (MFT)、热水游泳组 (WS)、睡眠不足组 (SD)、单纯束缚组 (PC) 和正常对照组 (C), 每组 6 只。分别采用热水游泳、饮食限制、睡眠剥夺、束缚等方式建立亚健康大鼠模型, 多因素干预组每日经口给予 300 mg/kg 的抗衰老片, 在造模 5 d 后处理动物, 并取大鼠血, 分别测定血清 5-羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA)、甲状腺激素 T_3 和 T_4 、睾酮 (T)、皮质酮 (CORT)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、白介素 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IFN- γ 含量以及 T 淋巴细胞亚群的变化, 并取脾脏测定 T、B 淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞活性变化。**结果** (1) 与正常对照组比, ①造模结束后多因素组大鼠血清 5-HT 明显降低 ($P < 0.05$), 而热水游泳组和单纯束缚组 5-HT 含量却升高显著 ($P < 0.01$), 且睡眠不足组和单纯束缚组血清 DA 含量降低显著 ($P < 0.05$); 同时各亚健康模型大鼠的血清 T_3 、 T_4 、CORT 和 ACTH 含量均显著升高 ($P < 0.01$), T/C 比值降低显著 ($P < 0.01$), 且睡眠不足组血清 T 降低明显 ($P < 0.05$); ②造模结束后多因素组的大鼠 IL-8 含量降低显著 ($P < 0.01$), 而热水游泳组和单纯束缚组 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IFN- γ 含量以及睡眠不足组 IL-1 β 、IL-2、IL-6 含量均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时显著降低各亚健康模型大鼠淋巴细胞增殖转化能力和 T 淋巴细胞亚群 CD3 $^+$ 、CD4 $^+$ 和 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 比值和 NK 细胞活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 (2) 与多因素组比, 抗衰老片干预后多因素干预组大鼠血清 DA 含量明显升高 ($P < 0.05$), 并能显著提高机体 T 淋巴细胞亚群 CD3 $^+$ 、CD4 $^+$ 数目和 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 比值 ($P < 0.01$), 降低血清 CORT 含量。**结论** 亚健康状态能引起大鼠 HPA 轴反应性失衡, 皮质醇释放过度, 引起内分泌的紊乱, 并能引起淋巴细胞功能降低, 出现明显机体免疫抑制现象; 而抗衰老片具有抗应激, 提高 T 细胞免疫功能, 改善情绪和内分泌紊乱的作用, 从而达到改善亚健康体质的目的。

【关键词】 神经递质; 免疫; 内分泌; 亚健康; 淋巴细胞亚群; 抗衰老片

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)08-0033-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.008.008

Study on the Mechanism of Neuro-Immuno-Endocrine System of Rats in Sub-Health State

XU Xiao-ping, PAN Yong-ming, LIU Rui-min, SHOU Qi-yang, JIA Lin-chao, ZHOU Wei-min, ZHU Ke-yan, CHEN Min-li
(Zhejiang Chinese Medical University Laboratory Animal Research Center/Comparative Medical Research Center, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of neuro-immuno-endocrine system of rats in sub-health state.

Methods Thirty-six male SPF Wistar rats were randomly divided into six groups: multi-factor group (MF), multifactor treatment group (MFT), warm water swimming group (WS), sleep deficiency group (SD), purely constraint group (PC)

【基金项目】 1. 浙江省中医“治未病”研究专项(中医证候亚健康大鼠模型的建立及其比较学研究, 2007WB022); 2. 受“浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目”资助。

【作者简介】 徐孝平(1978-), 男, 实验师, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: xxp0001@126.com。

【通讯作者】 陈民利(1963-), 女, 教授, 硕导, 研究方向: 比较医学。E-mail: minlichen01@yahoo.com.cn。

and control group (C), six animals in each group. Respectively, using warm water swimming, dietary restrictions, sleep deprivation and constraint to establish sub-health rat models, and daily orally administered 300 mg/kg anti-aging tablet in the MFT group. At 5 days after modeling, the levels of serum 5-HT, DA, T₃, T₄, T, CORT, ACTH, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ and T lymphocyte subsets were detected, and changes of T and B lymphocyte proliferation and NK cell activity in the spleen were also determined. **Results** (1) Compared with the control group, ① Serum 5-HT in the MF group was significantly reduced ($P < 0.05$), while 5-HT in the WS and PC groups was significantly increased ($P < 0.01$), and the serum DA content in the SD and PC groups was significantly decreased ($P < 0.05$). At the same time, the serum T₃, T₄, CORT and ACTH contents in each sub-health model rats were significantly increased ($P < 0.01$), T/C ratio was significantly decreased ($P < 0.01$), and the serum T in the SD group was significantly lowered ($P < 0.05$); ② Serum IL-8 content in the MF group was significantly reduced ($P < 0.01$), while the serum IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 and IFN- γ levels in the WS and PC groups, and IL-1 β , IL-2 and IL-6 levels in the SD group were all significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the lymphocyte proliferation and T lymphocyte subsets CD₃₊, CD₄₊, CD₄₊/CD₈₊ ratio and NK cell activity were significantly reduced in all sub-health model rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (2) Compared with the MF group, the administration of anti-aging tablets induced significantly increased serum DA content in the MFT group ($P < 0.05$), and significantly improved the T lymphocyte subsets CD₃₊, CD₄₊, CD₄₊/CD₈₊ ratio ($P < 0.01$), and lowered serum CORT content. **Conclusions** Sub-health state can lead to imbalances of the rat HPA axis, excessive cortisol release, endocrine disorders, reduced lymphocyte function and immune inhibition, while anti-aging tablets have anti-stress effects, enhancing T cell immune function and ameliorating emotional and endocrine disorders, so as to achieve the purpose of improving the sub-healthy physique.

【Key words】 Neurotransmitter; Immune; Endocrine; Sub-health; Lymphocyte subsets; Anti-aging tablets; Rats

随着社会科技不断发展,人们的生活节奏的日益加快和社会竞争日趋激烈,人们遭受的情绪应激逐渐增多,严重影响了人们的生活质量和工作效率。世界卫生组织(WHO)提出,亚健康状态是健康与疾病之间的临界状态^[1],全球调查结果显示,全世界真正健康的仅占5%,确诊有疾病的占20%,而75%则处于亚健康状态。在美国医学界已将亚健康与艾滋病一起列为21世纪人类健康的最大敌人^[2]。

目前认为亚健康状态是由于心理、生理、社会三方面因素导致机体的神经系统、内分泌系统、免疫系统整体协调失衡、功能紊乱而致,而亚健康发生发展的主要因素包括不良的生活方式和习惯、精神过度紧张和不良的心理因素刺激、环境污染的不良影响以及机体的生物学因素(个性特征和遗传因素)有关^[3]。我们前期已根据亚健康形成的主要原因,采用单纯束缚、热水游泳、部分睡眠剥夺和饮食不节等造模因素复制亚健康状态大鼠模型,研究发现亚健康状态大鼠出现明显的心理因素的改变和疲劳等症状,胸腺系数的明显降低则表明亚健康状态具有免疫抑制的现象,且氧化应激亦参与亚健康的形成过程。可见,机体的神经系统、内分泌系统、免疫系统整体协调失衡、功能紊乱可能是亚健康形成的主要机制。为证实亚健康状态神经-免疫-内分泌的作用机制,本研究对亚健康状态大鼠的神经递

质、内分泌激素和免疫指标进行了观察,探讨亚健康状态大鼠的神经-免疫-内分泌轴变化情况,为亚健康状态的生理病理机制的深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,体质量为 150 g ~ 170 g,36 只,购于中科院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物公司[SCXK(沪)2007-0005],饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障系统内[SYXK(浙)2008-0115],环境温度为(23 ± 1)℃,相对湿度为 50% ~ 65%,饲喂全价营养颗粒饲料,自由饮水。

1.2 主要仪器与试剂

BIO-Rad 酶标仪(美国 BIO-Rad 公司),蔡司 ZEISS 荧光倒置显微镜(蔡司公司),Thermo CO₂ 细胞培养箱(Thermo 公司);Epics Altra 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、甲状腺激素 T₃、T₄、睾酮(T)、皮质酮(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、白介素 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IFN- γ 试剂盒由 Bio-rad 公司提供,RPMI-1640 培养基购自 Gibco,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)、刀豆蛋白 A(ConA)均为进口分装,PMS

购自 SIGMA, 淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司, NAD、INT 均购自 Amresco, YAC-1 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。抗衰老片由正大青春宝药业有限公司提供(批号: 080320)。CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 试剂盒: CD3⁺: FITC 标记, CD4⁺: PE 标记, CD8⁺: PE 标记, 均由美国 eBioscience 公司生产; 红细胞裂解液, 杭州联科生物技术有限公司生产。

1.3 动物分组及处理方法

所有大鼠适应性饲养一段时间后, 按体重随机分成 6 组, 即多因素(热水游泳、睡眠剥夺、饮食限制等因素)组、多因素药物干预组、热水游泳组、睡眠不足组、单纯束缚组和正常对照组, 每组 6 只。各组分别作以下造模处理: (1) 多因素组(multifactor group, MF): 大鼠每天上午 8:00 在水温 43℃ ± 0.5℃ 的水槽中游泳 3 min, 之后迅速捞起并擦干身体, 放回饲养笼, 在上午 9:00 ~ 19:00 将大鼠放置睡眠剥夺装置中剥夺睡眠 10 h, 随后放回饲养笼中, 并在晚上 19:00 加入足量的普通饲料, 暴食 1 h, 20:00 取出剩余饲料, 连续 5 d; (2) 多因素干预组(multifactor treatment group, MFT): 造型方法与多因素组相同, 并于每天上午 7:50 给予 300 mg/kg 抗衰老片浸膏粉, 连续 5 d; (3) 热水游泳组(warm swimming group, WS): 每天上午 8:00 在水温(43 ± 0.5)℃ 的水槽中游泳 3 min, 之后迅速捞起并擦干身体, 放回饲养笼; 上午 8:30, 下午 15:30 加足饲料并更换水瓶, 连续 5 d; (4) 睡眠不足组(sleep deficiency group, SD): 每天 9:00 ~ 19:00 睡眠剥夺 10 h; 上午 8:30, 下午 15:30 加足饲料并更换水瓶, 连续 5 d; (5) 单纯束缚组(purely constraint group, PC): 每天下午 14:00 ~ 17:00 放于自制束缚桶里限制大鼠活动 3 h, 连续 5 d; (6) 正常对照组(control group, C) 即不处理: 每天上午 8:30, 下午 15:30 加足饲料并更换水瓶, 正常饲养。所有动物造模处理 5 d 后麻醉处死。亚健康大鼠模型的确定: 经血生化、组织病理等检查, 均未发现亚健康状态大鼠出现明显的病理变化, 但大鼠已表现出精神萎靡、疲劳、反应迟钝、活力减退等。

1.4 指标观察

1.4.1 大鼠神经递质、内分泌和免疫指标的测定: 大鼠麻醉后, 腹主动脉取血, 离心, 分离血清, 采用 ELISA 法测定血清 5-HT、DA、T₃、T₄、T、CORT、ACTH、IL-1β、IL-2、IL-6、IL-8 和 IFN-γ 含量。

1.4.2 T、B 淋巴细胞增殖能力测定: 无菌条件下取大鼠的脾脏, 加适量 Hank's 液研磨, 以 200 目不锈钢网滤过, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 Hank's 液重复洗涤 2 次。收集脾细胞, 加适量 RPMI 1640 培养液混悬, 以 0.4% 台盼兰拒染法计数, 活细胞数不小于 95%, 加 RPMI 1640 完全培养液稀释, 并调整细胞浓度至 1 × 10⁷ 个/mL。于 96 孔微量板中, 每孔加 100 μL 脾细胞悬液(1 × 10⁷ cell/mL) 和等体积的 ConA 溶液(终浓度为 5 μg/mL)、LPS 溶液(终浓度为 10 μg/mL) 或 RPMI 1640 培养液, 重复 3 孔。另设空白对照组。37℃、5% CO₂ 培养 44 h 后, 各孔加入 50 μL MTT 溶液(2 mg/mL), 继续培养 4 h。1 000 r/min 离心 5 min, 弃去各孔上清液, 分别加 150 μL 酸性 DMSO 溶液, 振荡, 于室温暗处放置 15 min, 以酶标仪于波长 578 nm 处测定 A 值, 并按下式计算刺激指数(SI): SI(刺激指数) = 加有丝分裂原培养物的 A 值/不加有丝分裂原培养物的 A 值。

1.4.3 NK 细胞活性测定: 实验前 24 h 将靶细胞 YAC-1 传代培养, 应用前以 Hank's 液洗 3 次, 用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度为 2 × 10⁵ 个/mL。无菌取脾, 制备脾细胞悬液, 用 Hank's 液洗 2 次, 每次离心 10 min(1 000 r/min)。弃上清液将细胞浆弹起, 加入 0.5 mL 灭菌水裂解红细胞, 20 s 后再加入 0.5 mL 2 倍 Hanks 液及 8 mL Hanks 液, 离心 10 min(1 000 r/min), 用 1 mL 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液重悬, 用 1% 冰醋酸稀释后计数, 调整细胞浓度为 1 × 10⁷ 个/mL。将靶细胞加入 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 试验孔加入 100 μL 脾细胞(效靶比 50:1), 自然释放孔加入 100 μL 培养液, 最大释放孔加入 100 μL 2% NP40, 37℃ 培养 4 h, 离心, 取上清液 100 μL 置 96 孔酶标板中, 加入 LDH 基质液 100 μL, 反应 8 min, 以 30 μL 1 mol/L 的 HCl 终止反应, 在酶标仪 492 nm 处测定 A 值。

NK 细胞活性(%) = (反应孔 A - 自然释放孔 A) / (最大释放孔 A - 自然释放孔 A) × 100%

1.4.4 T 淋巴细胞亚群测定: 取血加抗体, 大鼠眼眶取血 1 mL, 用 EDTA_{K₂} 血常规管抗凝全血, 试管标号; 取 50 μL 抗凝全血, 分别加入试管①、试管②, 直接加至底部, 且不可触壁; 试管①统一加 5 μL 抗体 CD3⁺ 和 5 μL 抗体 CD4⁺, 试管②统一加 5 μL 抗体 CD3⁺ 和 5 μL 抗体 CD8⁺, 用振荡器混匀后暗室放置 20 ~ 30 min, 使抗体与血样充分结合; 避光常温 30 min 后, 加裂解液: 试管在振荡中加入 500 μL 裂

解液,在 30℃ 水浴中放置 15 min,使细胞充分裂解,达到透亮;裂解后,1 500 r/min 离心 5 min,倒去上清液,用 PBS 液洗两遍,加 1 mL PBS 液,1 500 r/min 离心 5 min,后倒去上清液;再加 1 mL PBS 液,1 500 r/min 离心 5 min;离心后倒去上液;加 500 μ L PBS 液,再用 Epics Altra 流式细胞仪检测。

1.5 数据统计学处理

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件包进行 ANOVA 单因素方差分析,并用 LSD 统计方法进行组间比较,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 亚健康模型大鼠血清 5-HT 和多巴胺含量的变化

与正常对照组比,造模 5 d 后多因素组的大鼠血清 5-HT 和 DA 含量均出现降低,其中血清 5-HT 降低显著 ($P < 0.05$),而热水游泳组、睡眠不足组和单纯束缚组的大鼠血清 5-HT 含量均出现升高和 DA 含量的降低,且以热水游泳组和单纯束缚组升高 5-HT 含量显著 ($P < 0.01$),同时,睡眠不足组和单纯束缚组的大鼠血清 DA 含量均显著降低 ($P < 0.05$);与多因素组比,抗衰老片干预后多因素干预组大鼠具有升高 5-HT 含量和 DA 含量的作用,其中 DA 升高显著 ($P < 0.05$),见表 1。

另外,与正常对照组比,造模 5d 后多因素组、热

表 1 各组亚健康模型大鼠血清 5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、甲状腺激素 T_3 、 T_4 含量的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab.1 The changes of 5-HT, DA, T_3 and T_4 contents in the sub-health rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别 Groups	5-羟色胺(5-HT) (ng/mL)	多巴胺(DA) (pg/mL)	T_3 (μ g/mL)	T_4 (μ g/mL)
多因素组(MF)	24.71 \pm 2.65*	110.10 \pm 14.38	11.55 \pm 4.08**	12.69 \pm 1.97*
多因素干预组(MFT)	29.32 \pm 6.73	135.03 \pm 6.37#	9.48 \pm 3.16**	12.47 \pm 2.51*
热水游泳组(WS)	38.60 \pm 4.48**	95.70 \pm 51.56	14.92 \pm 2.94**	17.29 \pm 1.41**
睡眠不足组(SD)	34.24 \pm 3.93	81.00 \pm 35.98*	16.07 \pm 3.85**	14.87 \pm 1.33**
单纯束缚组(PC)	37.29 \pm 3.42**	87.57 \pm 19.11*	17.93 \pm 2.38**	16.08 \pm 1.50**
正常对照组(C)	30.07 \pm 4.31	130.37 \pm 22.24	2.79 \pm 1.05	9.88 \pm 0.72

注:与正常对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;多因素组与多因素干预组比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared between MF and MFT groups, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表 2 各组亚健康模型大鼠血清 T、CORT、T/C 和 ACTH 含量的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab.2 The changes of T, CORT, T/C and ACTH contents in the sub-health rats

组别 Groups	睾酮(T) (ng/mL)	皮质酮(CORT) (ng/mL)	睾酮/皮质酮 T/C	促肾上腺皮质激素(ACTH) (pg/mL)
多因素组(MF)	10.48 \pm 2.66	273.05 \pm 53.37**	0.04 \pm 0.02**	198.14 \pm 25.17**
多因素干预组(MFT)	11.98 \pm 5.49	243.34 \pm 44.67**	0.05 \pm 0.02**	205.08 \pm 51.38**
热水游泳组(WS)	8.51 \pm 1.62	168.38 \pm 17.72**	0.05 \pm 0.02**	174.82 \pm 65.28**
睡眠不足组(SD)	6.90 \pm 1.18*	225.15 \pm 77.78**	0.03 \pm 0.01**	167.63 \pm 30.15**
单纯束缚组(PC)	9.35 \pm 2.50	301.29 \pm 80.05**	0.03 \pm 0.01**	206.22 \pm 94.00**
正常对照组(C)	13.18 \pm 4.24	31.91 \pm 13.81	0.42 \pm 0.27	56.68 \pm 28.09

注:与正常对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;多因素组与多因素干预组比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared between the MF and MFT groups, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

水游泳组、睡眠不足组、单纯束缚组大鼠的血清 T_3 、 T_4 均明显升高 ($P < 0.01$);与多因素组比,抗衰老片干预后多因素干预组的大鼠 T_3 、 T_4 含量均有降低趋势,但差异不显著 ($P > 0.05$),见表 1。

2.2 亚健康模型大鼠血清睾酮(T)、皮质酮(CORT)和促肾上腺皮质激素(ACTH)含量的变化

与正常对照组比,造模 5 d 后,各亚健康模型大鼠的睾酮 T 含量出现降低,其中睡眠不足组降低显著 ($P < 0.05$),同时各亚健康模型大鼠伴有皮质酮 CORT 和促肾上腺皮质激素 ACTH 含量的显著升高 ($P < 0.01$),且引起 T/C 比值降低显著 ($P < 0.01$);与多因素组比,抗衰老片干预后多因素干预组能升高 T、T/C 和降低 CORT 含量的趋势 ($P > 0.05$),见表 2。

2.3 亚健康模型大鼠血清 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IFN- γ 含量的变化

与正常对照组比,造模 5d 后多因素组的大鼠 IL-1 β 、IL-2、IL-6 有上升趋势,但 IL-8 和 IFN- γ 含量均有所降低,其中 IL-8 含量降低显著 ($P < 0.01$),而热水游泳组和单纯束缚组的大鼠 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IFN- γ 含量均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),睡眠不足组的大鼠 IL-1 β 、IL-2、IL-6 含量均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 IL-8 和 IFN- γ 含量虽有升高,但差异不显著 ($P > 0.05$);抗衰老片干预后多因素干预组与多因素组和正常对照组比差异均不显著 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 各组亚健康模型大鼠血清 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IFN- γ 含量的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.3 The changes of IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 and IFN- γ contents in the sub-health rats

组别 Groups	IL-1 β (pg/ml)	IL-2(pg/ml)	IL-6(pg/ml)	IL-8(pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
多因素组(MF)	183.03 \pm 6.76	336.79 \pm 16.72	329.96 \pm 36.19	601.14 \pm 58.37**	528.46 \pm 57.12
多因素干预组(MFT)	200.17 \pm 26.80	341.36 \pm 44.17	300.45 \pm 47.67	685.49 \pm 128.02	575.58 \pm 89.98
热水游泳组(WS)	220.80 \pm 22.54**	390.48 \pm 31.74**	390.06 \pm 43.40**	884.55 \pm 34.97*	722.29 \pm 65.04*
睡眠不足组(SD)	210.47 \pm 17.11**	386.30 \pm 40.98*	379.35 \pm 36.16**	836.94 \pm 75.75	636.27 \pm 66.62
单纯束缚组(PC)	218.42 \pm 18.64**	434.01 \pm 50.35**	439.05 \pm 26.25**	940.79 \pm 68.82**	751.44 \pm 100.10*
正常对照组(C)	173.24 \pm 10.90	320.27 \pm 34.45	289.74 \pm 32.64	759.97 \pm 94.87	605.09 \pm 92.44

注:与正常对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;多因素组与多因素干预组比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared between the MF and MFT groups, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.4 亚健康模型大鼠 NK 细胞、淋巴细胞增殖转化能力的变化

与正常对照组比,造模 5 d 后各亚健康模型大鼠 NK 细胞均有所下降,其中多因素组、多因素干预组、睡眠不足组、单纯束缚组降低显著($P < 0.05, P < 0.01$);而各亚健康模型大鼠淋巴细胞增殖转化能力均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);与多因素组比,抗衰老片干预后多因素干预组的大鼠 NK 细胞、淋巴细胞增殖转化能力均有所上升,但差异不显著($P > 0.05$),见表 4。

表 4 各组亚健康模型大鼠 NK 细胞、淋巴细胞增殖转化能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.4 The changes of NK cells and lymphocyte proliferation ability in the sub-health rats

组别 Groups	NK%	ConA	LPS
多因素组(MF)	41.08 \pm 6.07**	1.72 \pm 0.22**	1.05 \pm 0.03**
多因素干预组(MFT)	42.61 \pm 16.58*	1.81 \pm 0.12**	1.06 \pm 0.02**
热水游泳组(WS)	46.83 \pm 9.98	1.62 \pm 0.10**	1.06 \pm 0.04**
睡眠不足组(SD)	36.61 \pm 5.43**	1.79 \pm 0.21**	1.06 \pm 0.06**
单纯束缚组(PC)	32.26 \pm 6.69**	1.99 \pm 0.32*	1.08 \pm 0.04*
正常对照组(C)	62.20 \pm 11.16	2.42 \pm 0.46	1.19 \pm 0.11

注:与正常对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;多因素组与多因素干预组比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared between the MF and MFT groups, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.5 各亚健康模型大鼠 T 淋巴细胞亚群的变化

与正常对照组比,造模 5 d 后各亚健康模型大

鼠 T 淋巴细胞亚群 CD3 $^+$ 、CD4 $^+$ 和 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 比值显著降低($P < 0.01$),而 CD8 $^+$ 与正常对照组差异无显著性($P > 0.05$);与多因素组比,抗衰老片干预后多因素干预组的 CD3 $^+$ 、CD4 $^+$ 和 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 比值显著升高($P < 0.01$),见表 5。

3 讨论

亚健康态是介于健康与疾病两个状态之间,是稳态的相对失衡的状态,此时,神经、内分泌、免疫系统呈现一定紊乱,自主调节能力降低,人体出现疾病症状,但物理生化检查往往难以发现明显体征异常。已有研究发现,5-HT 是中枢及外周神经系统的重要神经递质,且在调节机体的情绪方面具有相当重要的作用,但 5-HT 对 HPA 轴的调节作用,目前尚存在争议。已有研究表明 5-HT 的增加对失眠、精神状态、感知能力和肌肉疲劳程度等都可能产生影响,5-HT 活性增强可能与慢性疲劳综合征有关^[4];相反,亦有研究认为抑郁状态、抑郁症时人体内 5-HT 含量显著降低^[5],詹向红等^[6]的研究发现愤怒应激能使 5-HT 水平降低。本实验结果显示,热水游泳组、睡眠不足组和单纯束缚组的大鼠血清 5-HT 含量明显升高,而多因素组的大鼠血清 5-HT 含量则显著降低,均可表明各亚健康状态大鼠的情绪出现明显的变化,且 5-HT 含量变化趋势的不同可能与应激程度和因素有关。另外,本研究结果亦

表 5 各组亚健康模型大鼠 T 淋巴细胞亚群的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.5 Changes of T lymphocyte subpopulations in the sub-health rats

组别 Groups	CD3 $^+$ (%)	CD4 $^+$ (%)	CD8 $^+$ (%)	CD4 $^+$ /CD8 $^+$
多因素组(MF)	51.65 \pm 5.91**	31.88 \pm 4.12**	19.67 \pm 1.87	1.62 \pm 0.14**
多因素干预组(MFT)	74.98 \pm 4.78##	52.20 \pm 4.66##	20.90 \pm 1.52	2.50 \pm 0.19##
热水游泳组(WS)	64.90 \pm 2.60**	43.60 \pm 1.57**	19.67 \pm 1.64	2.23 \pm 0.15**
睡眠不足组(SD)	63.10 \pm 2.58**	42.27 \pm 2.70**	19.10 \pm 0.60	2.21 \pm 0.14**
单纯束缚组(PC)	65.22 \pm 4.07**	43.32 \pm 2.70**	20.13 \pm 1.46	2.15 \pm 0.07**
正常对照组(C)	73.37 \pm 1.19	51.48 \pm 1.20	19.42 \pm 1.62	2.67 \pm 0.23

注:与正常对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;多因素组与多因素干预组比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared to control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared between the MF and MFT groups, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

显示,各亚健康状态大鼠的血清 DA 含量均明显降低,DA 作为一种中枢神经递质,也参与调控精神活动,研究表明,在反复长期心理应激情况下,能使大量的 DA 被耗竭,最终导致 DA 含量的降低^[5],而 DA 活性的降低,可使肌肉活动的协调能力降低,导致疲劳加剧,可见,各亚健康状态的大鼠出现明显的情绪波动和疲劳状态,提示亚健康状态能引起单胺类神经递质的异常,可能是亚健康状态的生理病理机制之一。

现代医学研究表明,下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴能调控促肾上腺皮质激素、肾上腺糖皮质激素(GC)的分泌,进而影响与应激有关的行为、神经内分泌免疫活动,慢性心理应激可使血液中皮质酮持续升高,引起血液中糖皮质激素积累,造成内分泌代谢过分增加^[7]。甲状腺激素 T₃、T₄是反映甲状腺功能的重要指标,本实验结果显示,各亚健康状态的大鼠血清甲状腺激素 T₃、T₄以及皮质酮(CORT)和促肾上腺皮质激素(ACTH)含量升高,睾酮(T)含量降低,引起 T/CORT 比值的降低,提示亚健康状态能引起下丘脑-垂体-甲状腺轴、下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴和下丘脑-垂体-性腺轴功能紊乱,使甲状腺激素、皮质酮与睾酮分泌异常,导致内分泌代谢出现紊乱。但 CORT 的分泌又可以反馈抑制 ACTH 和促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)的生成,形成了 HPA 轴的环行调节通路,但在应激的作用下,上述负反馈抑制效应减弱,从而出现 ACTH 和 CORT 的分泌增加,导致 HPA 轴功能的亢进^[8],从而使亚健康大鼠产生紧张、焦虑、愤怒或抑郁的情绪变化和行为的改变,以及免疫力和记忆能力的下降等。

心理神经免疫学的研究表明,心理应激因素可通过影响中枢神经和内分泌系统来改变机体的免疫能力。结果显示,热水游泳组、睡眠不足组和单纯束缚组的大鼠血清 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 IFN- γ 活性均显著升高,而多因素组的大鼠血清 IL-1 β 、IL-2、IL-6 活性有上升趋势,但 IL-8 和 IFN- γ 活性均有所下降,从以上结果显示各亚健康状态大鼠 IL-1 β 、IL-2、IL-6 活性的升高,可能是由于亚健康状态形成过程中体内发热和骨骼肌的损伤,使得 IL-1 β 升高,参与刺激肌肉蛋白质的分解代谢。也有研究表明,IL-1 β 和 IL-6 除了参与调节免疫功能外,对机体的代谢功能亦有密切的联系^[9,10]。IL-1 β 作用于 HPA 轴引起 CORT 分泌增加,促进血糖升高的作用^[11],这与我们前面所研究的各亚健康大鼠血糖升高较为一致,表明亚健康状态大鼠的血清 IL-1 β 浓

度增加主要是促进 CORT 分泌以升高血糖,Albert Moraska^[12]认为机体处于应激状态时,IL-1 β 浓度的增加对免疫功能也有抑制作用。IL-2 主要由淋巴细胞亚群 TCD₄₊ 和 TCD₈₊ 产生,NK 细胞和 LAK 细胞也可产生,IL-1 β 亦能促进 T 细胞产生 IL-2^[7],而亚健康状态大鼠血清 IL-1 β 活性升高促进 IL-2 升高;另外,由于 HPA 轴调节激活 T 细胞分泌 IL-2,且在亚健康形成过程中皮质酮大量的释放亦会导致 IL-2 升高。IL-6 是一种致炎因子,由 Th2 细胞分泌,参与介导体液免疫功能,在炎症和感染时生成和释放增加。Nukina 等^[13]研究表明束缚应激可通过中枢和外周儿茶酚胺升高血浆 IL-6 的活性水平,亦有报道认为运动时的血浆细胞因子,尤其是 IL-6 主要来源于收缩的骨骼肌细胞,而不是免疫细胞,并认为运动过程中肌肉产生的 IL-6 有免疫抑制作用^[9],IL-6 可通过促进肾上腺皮质分泌 CORT,使血糖升高。IL-8 是一种由单核细胞、内皮细胞及巨噬细胞等产生的中性粒细胞激活蛋白,具有趋化和激活多形核白细胞作用,可升高细胞内 Ca²⁺ 的浓度等,研究发现 IL-8 在多器官功能障碍至衰竭的发展过程具有重要作用,并在创伤性疾病中机体 IL-8 活性明显升高^[14],但张银娥等^[7]研究认为慢性心理应激大鼠血清 IL-8 活性明显降低,本研究结果显示,热水游泳组、睡眠不足组和单纯束缚组的大鼠血清 IL-8 活性明显升高,而采用多因素造模的大鼠血清 IL-8 活性明显降低,可能与应激的程度和时间的不同,导致 HPA 轴反应性和皮质酮释放程度的差异所致,但 IL-8 活性的变化可表明亚健康状态形成过程炎症反应参与其中。IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌,介导细胞免疫反应,能诱导单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等 MHC II 类抗原的表达,使其参与抗原提呈和特异性免疫的识别过程。因此,IFN- γ 在细胞免疫中具有重要激活作用,有研究表明心理应激可引起循环血中 IFN- γ 的升高^[15],本研究结果显示,热水游泳组、睡眠不足组和单纯束缚组的大鼠血清 IFN- γ 活性均有所升高,证实各亚健康状态大鼠出现明显的心理应激变化,而卢莉等^[16]研究认为慢性应激组小鼠血清中 IFN- γ 水平明显下降,表明慢性应激可抑制 Th1 类细胞因子,使 Th1/Th2 的平衡向 Th2 偏移,从而引起机体的细胞免疫功能下降,导致机体的防御能力下降,而本研究的多因素组的大鼠血清 IFN- γ 活性亦出现下降趋势,提示可能由于应激程度和时间的不同,导致其介导的 HPA 轴和交感神经系统(SNS)通路在不同的造模过程中起决定性因素

有所不同。

另外,本研究采用脾淋巴细胞增殖实验和 NK 细胞释放实验进一步评估各亚健康状态大鼠的免疫状态,结果显示,亚健康状态的大鼠可抑制 ConA、LPS 诱导的脾细胞增殖反应;其中 ConA 诱导的脾细胞增殖反应可反映 T 细胞功能,LPS 诱导的脾细胞增殖反应可反应 B 细胞的功能,表明亚健康状态可引起 T、B 细胞功能的减退,提示细胞免疫和体液免疫功能降低;NK 细胞释放实验结果亦显示亚健康状态的大鼠 NK 细胞活性显著降低,即出现明显的机体细胞免疫功能的降低。T 细胞是机体内重要的免疫细胞,根据表面分子可分为 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 等,因此,机体内 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 数目的变化是机体免疫功能变化的重要标志,有研究表明,心理应激会引起机体 T 细胞亚群的数目减少^[17]。本研究结果显示,各亚健康状态大鼠 CD3⁺、CD4⁺ 数目明显减少,CD8⁺ 数目变化不明显,CD4⁺/CD8⁺ 比值显著降低,表明亚健康状态大鼠出现了明显的免疫抑制,这与罗威和傅京丽等^[18,19]报道临床慢性疲劳综合症患者 CD3⁺、CD4⁺ 数目明显减少较为一致。

抗衰老片是目前国内有较大知名度的抗衰老中成药,具有抗氧化应激和提高免疫功能的作用^[20-23],本研究对多因素造模的大鼠采用抗衰老片干预后,结果显示,多因素干预组的大鼠明显升高血清 DA,提高机体 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺ 数目和 CD4⁺/CD8⁺ 比值的作用,降低血清 CORT 含量,提示抗衰老片具有抗应激,提高 T 细胞免疫功能,改善情绪和内分泌紊乱的作用。

参考文献:

[1] 王广仪. 微量元素与亚健康 [J]. 微量元素与健康研究, 2010, 27(4): 54-57.

[2] 董玉整. “亚健康”初探 [J]. 广州医学院报, 1988, 26(3): 77-78.

[3] 何宝先. 亚健康人群的健康管理及其干预措施 [J]. 河南预防医学杂志, 2009, 20(3): 224-225.

[4] 陈易新, 王天芳, 季绍良, 等. 慢性疲劳病理机制的实验研究—慢性束缚致大鼠慢性疲劳动物模型单胺类物质的改变及中药调节作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(4): 23-26.

[5] 李艳, 严灿, 史亚飞, 等. 反复心理应激大鼠血浆和下丘脑单胺神经递质的变化及加味四逆散的影响 [J]. 中药药理与临床, 2002, 18(1): 1-3.

[6] 詹向红, 李伟, 赵君攻, 等. 慢性愤怒应激对大鼠衰老进程及其神经内分泌免疫机制的影响 [J]. 中华中医药杂志,

2010, 25(1): 111-113.

[7] 张银娥, 宋辉, 杨惠芳, 等. 运动对慢性心理应激大鼠行为及血清皮质醇、IL-2、IL-8 的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 2007, 20(2): 79-85.

[8] Holsboer F. Prospects for antidepressant drug discovery [J]. Biol Psychol, 2001, 57(1/3): 47-65.

[9] 何伟. 运动与细胞因子的研究进展 [J]. 体育科学, 2005, 25(7): 63-67.

[10] Febbraio MA., Pedersen BK. Muscle-derived Interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles [J]. FASEB J, 2002, 16: 1335-1347.

[11] Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, et al. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage [J]. J Appl Physiol, 1999, 87: 1360-1367.

[12] Moraska A, Campisi J, Kien T. et al. Elevated IL-1 contributes to antibody suppression produced by stress [J]. J Appl Physiol, 2002, 93(6): 207-215.

[13] Nukina H, Sudo N, Aiba Y, et al. Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice [J]. J Neuroimmunol, 2001, 115:46-52.

[14] 梁红萍. 清热解毒法对肢体创伤患者血清细胞因子 IL-8、IL-1 β 、TNF- α 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1751-1752.

[15] Chida Y, Sudo N, Kubo C. Social isolation stress exacerbates autoimmune disease in MRL/lpr mice [J]. J Neuroimmunol. 2005, 158(1-2):138-144.

[16] 卢莉, 李敏芳 薛朝霞, 等. 慢性应激对小鼠心理行为及血清 IFN- γ 、IL-4 水平的影响 [J]. 中国健康心理学杂志, 2010, 18(8):1013-1014.

[17] 肖春梅, 尹玲. 中小负荷运动及慢性情绪应激对免疫机能的影响 [J]. 北京体育大学学报, 2007, 30(7): 919-921.

[18] 罗威, 肖红茂, 冯小武, 等. 慢性疲劳综合征对人体 T 淋巴细胞亚群及健康的影响 [J]. 现代诊断与治疗, 2007, 18(2): 114-115.

[19] 傅京丽. 慢性疲劳综合征与心身疾病 [J]. 辽宁医学杂志, 1999, 13(2): 68-69.

[20] 鲁珽, 潘永明, 冷晓霞, 等. 抗衰老片对实验性肾阳虚小鼠免疫功能的影响 [J]. 甘肃中医学院学报, 2011, 28(2): 8-11.

[21] 陶涛, 潘永明, 冷晓霞, 等. 抗衰老片对衰老大鼠学习记忆和自由基代谢的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(6): 751-753.

[22] 谢日青, 冷晓霞, 陈民利, 等. 束缚应激致亚健康状态大鼠氧自由基变化及中药干预作用 [J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(2):121-123.

[23] 肖慧, 冷晓霞, 陈民利, 等. 束缚应激致亚健康状态大鼠的行为学改变及中药的干预作用 [J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(2):124-128.

[修回日期]2012-06-05