

条件反射在抗体形成中的调节作用*

杜 念 兴

(南京农学院, 南京)

在免疫反应中,最早应用条件反射的是 Метальников 和 Шорин^[1] 二氏,其后 Выто-
дуников、Барыкина、Зейтленов、Острозская 等进一步证实了在免疫反应基础上建立条件
反射的可能性。当时巴甫洛夫对这些试验曾给予很高的评价。

但由于重复试验的资料相互矛盾和缺乏严密的对照,这些实验一直没有得到广泛的
承认。1950 年生理学家 Долин 和微生物学家 Крыло^[2] 合作,进行了一系列条件反射性
抗体和免疫定型的研究,取得了十分显著的成果。又一次引起了免疫条件反射研究的高
潮^[3-9]。

与此同时 Климентова 和 Шумакова 等^[10],在 1951—1957 期间,进行了多次条件反
射抗体的实验,没有获得肯定的结果。因此认为条件反射不能导致特异性抗体的形成,但
也不能全盘否定条件反射有可能通过内分泌系统的调节,促使淋巴系统释放出所贮存的
抗体,或促进浆细胞活动,因而一度增加体液中抗体的浓度。Здоровский 指出,条件反射
即或能刺激抗体的释放或形成,此种调节作用亦必然为非特异性的。

本试验的目的,除了验证条件反射在抗体形成中的调节作用外,并企图进一步证明条
件反射调节作用的非特异性,从而阐明在抗体形成中神经体液调节的作用。

材 料 和 方 法

试验动物 所有试验鸡均由本院鸡场供给,同一次试验所用的鸡均系同一批孵出的中雏,其品种、
性别、体重亦较一致。在试前采血,测定血清中新城病毒血凝抑制抗体 (NDV-HI 抗体),均为阴性。试
验前和试验间隙期在鸡场放牧饲养,试验期间改为笼饲。

新城疫苗 用 1 系新城病毒(弱毒)接种 10^{-3} 于 10 日龄鸡胚尿囊,在 24—48 小时内死亡者,置冰
箱冷冻 8 小时,采取鸡胚液(尿囊液,羊水混合液)保存于 -40°C 冰箱。

绵羊血球 新鲜绵羊抗凝全血加 Alsever 氏液,保存于 4°C 。用前洗涤 3 次,以生理盐水配成 15%
悬液,作免疫用。血球凝集试验用血球悬液,先配成悬液 (1%),然后用血球计计算悬液的红血球数,校
正其浓度使每毫升含血球 1.2×10^8 。

血清 自鸡翅静脉采血 0.8 毫升于事先吸有 1.2 毫升柠檬酸钠生理盐水的注射器内,混合后 1000
转离心 5 分钟,除去血球。此上清液即为 1:5 稀释的血浆。加 1/10,000 硫柳汞保存于 4°C 冰箱;或不
加防腐剂,置 -40°C 冰箱保存。用前 56°C 30 分钟灭活。用以上血浆代替血清对血清学效价并无影
响。

鸡血球 自固定的公鸡采血,随即注于 2% 柠檬酸钠生理盐水内。试前用生理盐水洗涤 3 次,稀释
成 0.5% 悬液,然后用血球计计算红血球数,校正其浓度使每毫升含血球 5×10^7 。

* 本试验承秦爱霞、王胜、江汉湖等同志协助工作,并承郑庚教授审阅,谢少文教授提出宝贵意见,特此致谢。
本文 1964 年 10 月 10 日收到。

血球凝集抑制試驗 血清自 1:5 开始倍量递增稀释至 1:640, 每管 0.25 毫升, 然后加 I 系新城病毒稀释液(含 4 个凝集单位) 0.25 毫升, 摇匀, 保温放置 20 分钟后, 再加鸡血球悬液 (5×10^7 /毫升) 0.5 毫升, 摇匀, 室温放置 45 分钟观察反应。

绵羊血球凝集試驗 血清自 1:10 开始, 递增稀释至 1:5120, 每管 0.5 毫升, 然后加绵羊血球悬液 (1.2×10^8 /毫升) 0.5 毫升, 摇匀, 置 37°C 2 小时观察反应。

结 果

新城病毒 HI 抗体产生的条件反射试验

5 月龄小公鸡 6 羽分成两组。以注射 I 系新城疫苗为非条件刺激, 灯光、节拍器、试验操作和笼饲养条件等环境因素作为条件刺激。每次结合时先自翅静脉采血 0.8 毫升, 然后注射 10^{-3} 稀释的新城疫苗 1 毫升于胸肌内。注射后放于一铁笼内, 置暗室中, 室内开一红灯并放一节拍器(每分钟 120 次), 20 分钟后放回饲养笼。每次结合的时间和操作程序严格遵守同一规定。第 1 组(3 羽)每天结合 1 次, 共结合 22 次; 第 2 组(3 羽)每隔 1 天结合 1 次, 共结合 12 次。在结合过程中每隔 1 天测定血清中 HI 抗体效价, 以观察抗体产生情况。

在整个结合过程中, 试验鸡均系饲养在一大竹笼内, 于最后 1 次结合后, 放回原群饲养, 间隔 75 天, 待血清中 HI 价显著下降后进行条件反射试验。

所有试验鸡于进行单用条件刺激试验前一日, 由散放改为笼饲, 并采血测定 HI 效价。第 1 组 297 号和第 2 组 136 及 138 号 3 羽鸡经采血和用生理盐水作假注射后, 应用灯光、节拍器等条件刺激, 每天 1 次连续 2 天; 第 1 组 257 号和第 2 组 111 号 2 羽鸡, 单用疫苗注射 (10^{-3} 肌注 1 毫升); 第 1 组 238 号不用灯光、节拍器等刺激, 也不注射疫苗, 仅从大

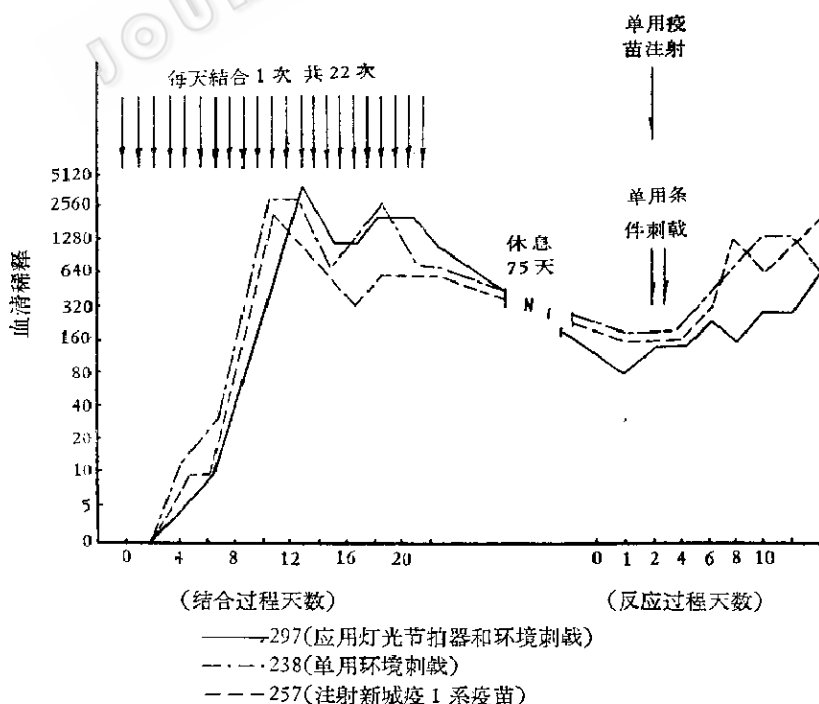


图 1 鸡新城疫血球凝集抑制抗体产生的条件反射试验之一

羣散放饲养改为笼饲和进行采血等操作观察单用环境刺戟是否能引起抗体产生。以上试验鸡于刺戟后 1、2、4、6、8、10 天各采血 0.8 毫升,以测定血清中 HI 抗体的动态。

同时另取 2 羽只接种一次新城疫苗,亦未结合过条件刺戟的鸡,应用灯光、节拍器和改变饲养环境等因素刺戟后,按上法测定 HI 价作为对照。

结果除 2 羽未结合条件刺戟的对照鸡外,所有第 1 组和第 2 组的鸡均出现明显的抗体上升。应用灯光、节拍器等条件刺戟的 3 羽鸡,其中第 2 组 2 羽(136、296 号)抗体升高较明显,较反应前提高 8—16 倍。第 1 组的 297 号鸡抗体上升较缓,为反应前的 4 倍。仅改变饲养环境而不应用灯光等刺戟的 297 号鸡亦出现明显的抗体反应升高达反应前 8 倍。所有试验鸡均于刺戟后第 4—6 天抗体上升达最高峰,第 8—10 天时显著回降。单独运用疫苗的 2 羽鸡,抗体上升更为明显,达反应前 16—32 倍,在最后一次测定时尚有继续升高趋势。另 2 羽事前未结合条件刺戟的对照鸡,在应用灯光刺戟后,其 HI 价始终稳定在 1:20—1:40 之间,未见有明显的波动。

在结合过程和应用条件刺激后,各试验鸡 HI 抗体的动态变化见图 1、2。

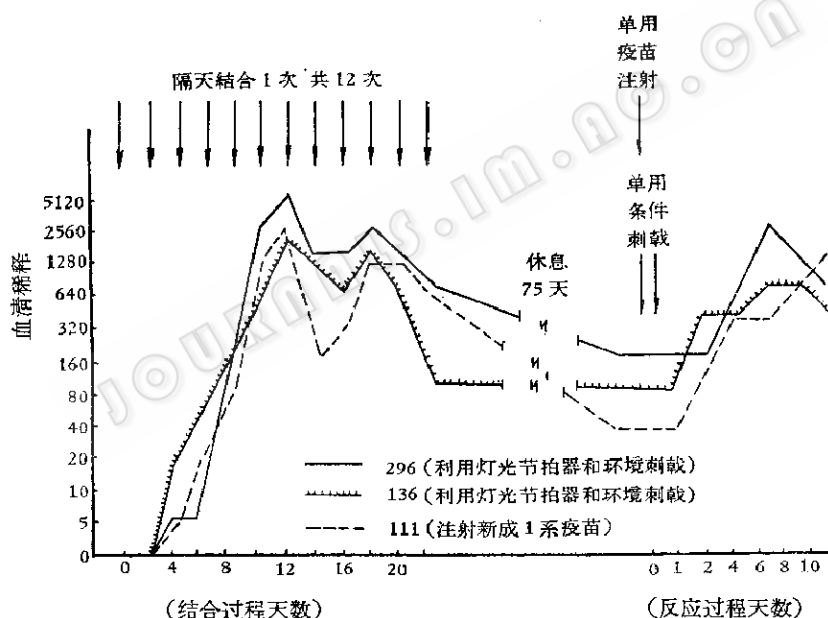


图2 鸡新城疫血球凝集抑制抗体产生的条件反射试验之二

强化后二次条件反射试验

5 月龄小公鸡 1 羽(284), 同上法注射新城疫苗, 并结合灯光、节拍器等条件刺戟, 每天 1 次共结合 15 次。在最后 1 次注射后休息 2 日, 自翅静脉采血测定 HI 抗体, 以后每周采血 1 次, 至抗体下降后进行条件反射试验, 自最后 1 次结合至正式试验共间隔 60 天。反应前采血测定 HI 抗体, 然后按最初试验时的操作, 用生理盐水代替疫苗注射, 注射后应用灯光、节拍器等条件刺戟, 连续两天。以后每隔 1 天采血, 测定 HI 抗体, 共测 10 次, 此为第 1 次条件反射试验。结束第 1 程条件反射试验后, 再按原来操作, 以疫苗注射和条件刺戟结合进行强化。每天 1 次, 共强化 3 次。然后再休息 70 天, 至抗体显著降低后, 同上法进行第 2 次条件反射实验。其结果如图 3。可见在强化后, 进行第 2 次条件反射时, 抗

体的产生较第 1 次条件反射更为快速而明显。见图 3。

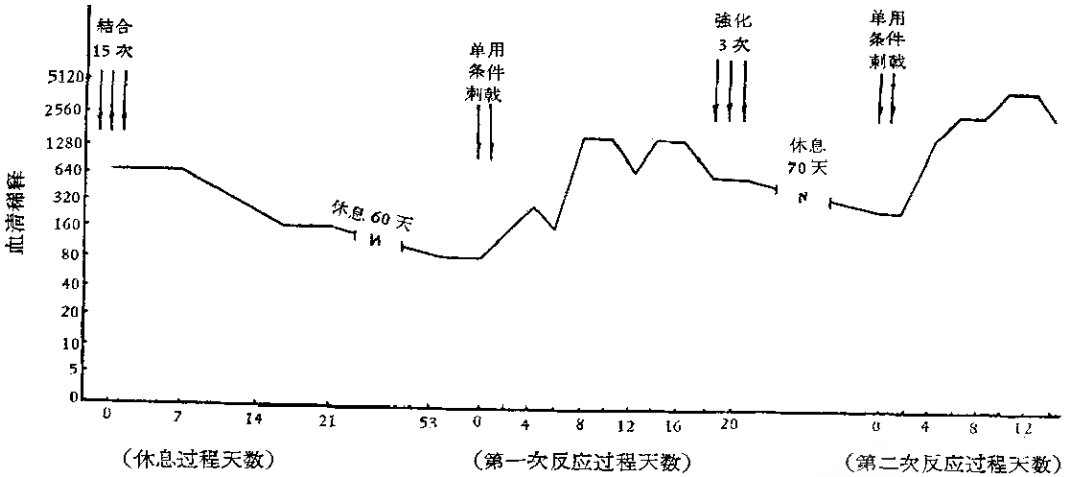


图 3 鸡新城疫血凝抑制抗体二次条件反射试验

条件反射抗体形成的特异性试验

4 月龄寿光种小母鸡 12 羽, 用 I 系新城疫苗 10^{-3} 肌注免疫。间隔 45 天后, 取其中 6 羽进行异种抗原刺激(绵羊血球)和条件刺激相结合。结合时以笼饲环境、注射操作、灯光和节拍器等作条件刺激, 以静脉注射 15% 绵羊红血球 1 毫升作非条件刺激, 每天结合 1 次, 共 12 次。最后 1 次结合后放回原鸡群饲养。间隔 40 天后, 进行条件反射试验。

试验操作同前, 结合条件刺激的 6 羽试验鸡, 以其中 4 羽(3483、3486、484、3464)单用条件刺激; 另 2 羽(3487、3457)静脉注射 15% 绵羊红血球 1 毫升, 不用条件刺激, 作抗原刺激对照。其余 6 羽同时用新城疫苗免疫的鸡分成两组: 一组(3614、3938、3918、3725)以生理盐水假注射, 并应用灯光、节拍器等刺激; 另一组(3914、3915)不用任何刺激, 各鸡均按上法测定 HI 抗体, 作为抗体稳定性对照。

以上各鸡均于试验前一天, 和应用条件刺激后 1、2、4、6、8 天各采血 0.8 毫升, 分离血清, 所有血清样品贮存于 -40°C 冰箱, 至全部血样采出后, 测定新城病毒 HI 抗体和抗

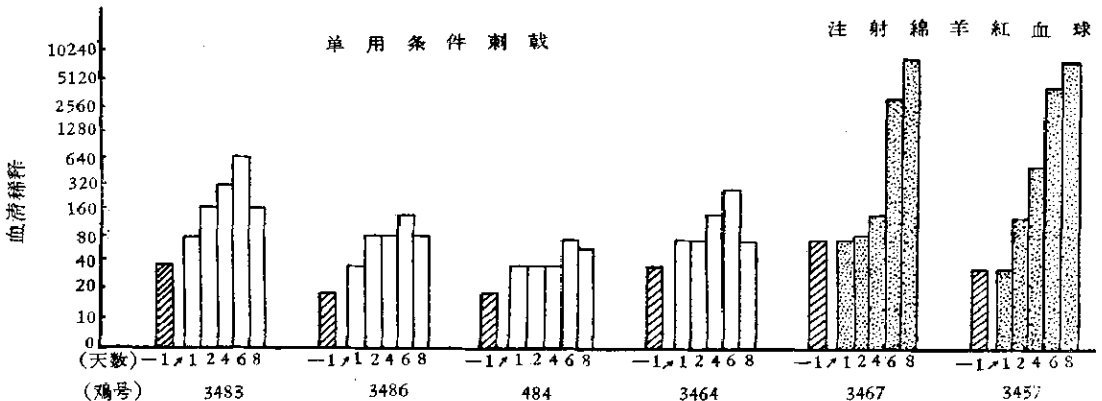


图 4 条件反射抗体形成的特异性试验之一——应用条件刺激和非条件刺激后血清中绵羊血球凝集素动态

绵羊红血球抗体。

试验鸡血清抗绵羊血球凝集素的测定结果如图 4。条件反射组各鸡抗体反应快，但增加幅度小，保持时间亦较短，在刺戟后一天开始升高，第 4—6 天达最高峯，抗体增加幅度为 4—6 倍，至第 8 天已显著回降。注射绵羊血球的 2 羽对照鸡抗体产生稍缓，但增加幅度大，达反应前 64—128 倍，且在第 8 天测定时尚有继续升高趋势。

新城病毒 HI 抗体的测定的结果如图 5，所有各试验鸡均见有不同程度的抗体升高，其反应曲线同上。无论应用条件刺戟或抗原刺戟(注射绵羊红血球)均能引起新城病毒 HI 抗体的非特异增高，二者并无区别。而所有未结合条件刺戟的对照组，应用条件刺戟后，HI 抗体均较稳定。

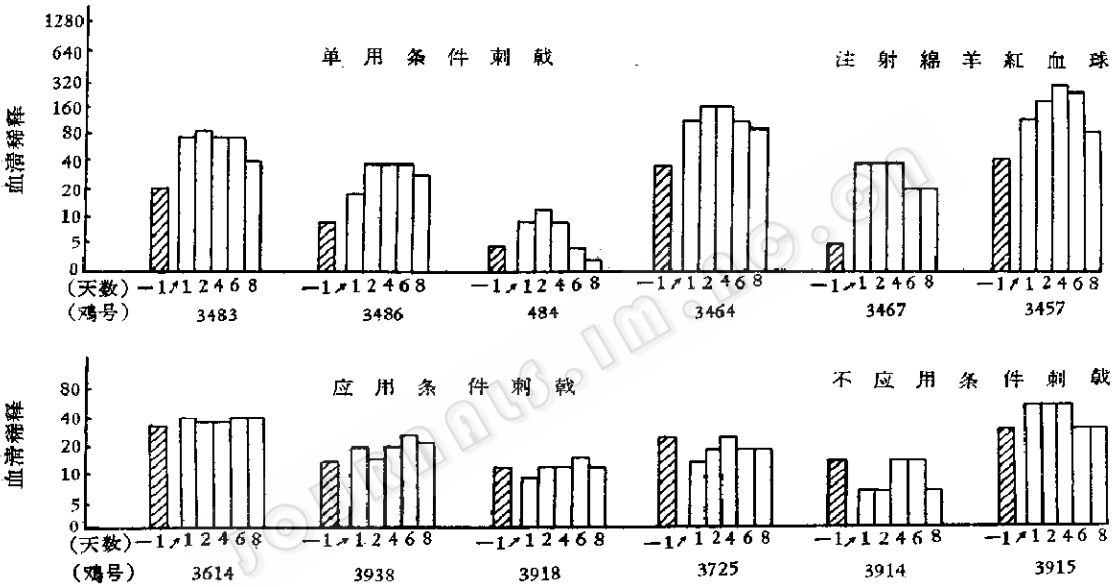


图 5 条件反射抗体形成的特异性试验之二——应用条件刺戟和非条件刺戟后血清中新城疫血凝抑制抗体的动态

讨 论

在以上几次条件反射抗体再次升高的实验中，所有应用条件刺戟的鸡都出现不同程度的抗体升高。除 2 羽(297、3486)反应较弱外，其余 7 羽抗体升高均十分明显。其中 1 羽只改变了饲养条件和进行采血等操作，抗体升高曲线与应用灯光等条件刺戟的鸡并无差异。这说明在免疫条件反射的形成中，综合的环境因素是构成条件作用的主要因素。因为抗原对脑皮层的刺戟是持续的，并不只出现在注射后的短时间内，只注意在注射后短期内结合某些特殊的条件刺戟，而不注意整个抗原作用时期的综合环境因素，是不符合条件反射的形成原则的。

本试验没有安排在预备试验时结合条件刺戟，而在正式试验时不应用条件刺戟的对照组，也正是因为考虑设置这样对照组不易严格控制。因为在正式试验时，不同的饲养环境、采血时的捕捉、固定、针刺等刺戟，都有可能引起条件反射。 Климентова 等^[10]所进行

的大量条件反射实验中,对照组有 66% 出现阳性结果,其原因可能在此。

在应用条件刺戟和非条件刺戟(注射抗原)后,抗体再次反应的动态曲线中,可以看出二者有明显区别;特别是在应用绵羊血球作抗原的一次试验中更为明显。应用条件刺戟后,抗体升高快,但幅度低,持续时间短;而应用非条件刺戟者反应稍迟,但幅度大、持续久。这一现象与 Berezhnaya^[11] 用福氏痢疾菌苗作非条件刺戟,以音响、节拍器、环境因素、时间因素等作条件刺戟,在家兔身上所进行的条件反射试验,其结果完全一致。Berezhnaya 在同一报告中指出,再次注射疫苗时,破坏大脑功能(实验性坏死)可使抗体产生显著抑制。因此认为高级神经系统,通过神经体液途径,对抗体的形成起重要的调节作用,并且认为这种调节机制是非特异性的。Ado^[12] 在抗体形成的神经体液调节一文中也一再指出,神经系统不能通过反射弧直接产生抗体,只能通过神经体液途径调节抗体形成,而这种调节作用必然是非特异性的。我们所做的条件反射特异性试验的结果,也证明条件反射对抗体产生的调节机制是非特异性的。条件刺戟虽然只与血球抗原的刺戟结合,但在以后应用条件刺戟时,不仅引起血球凝集素的增加,同时也引起了新城病毒 HI 抗体的再次升高。因此,我们认为条件反射性抗体的形成,很可能是抗体再次反应中的非特异性回忆反应的一种特殊类型。

Адо^[13] 报告用小剂量痢疾抗原作条件刺戟,与能引起体温升高的二硝基酚结合,形成条件反射。以后单独注射痢疾抗原即引起体温升高,同样注射小剂量大肠杆菌或伤寒杆菌亦能引起体温升高。这一试验从另一个角度证实了抗原刺戟可以与其他刺戟(条件刺戟或非条件刺戟)形成条件反射,同时也证明了抗原对大脑皮层的刺戟是非特异性的。

Здоровский^[14] 在传染和免疫问题一书中,详细论述了神经系统在抗体产生中的作用。并且提出了:下视丘—垂体—肾上腺皮层调节抗体产生的示意图。谢少文^[15] 根据这一图意加上大脑皮层的作用,提出更为完善的神经体液调节途径。

根据设想抗体的形成可以有以下几个途径: 1) 抗原直接作用于淋巴系统的免疫活性细胞,刺戟相应免疫细胞繁殖分化(纯系细胞选择学说);或改变免疫活性细胞的酶系统(间接模版学说)从而形成与该抗原相应的抗体。这一途径是特异性的,甲抗原只能产生甲抗体。2) 抗原对神经系统的刺戟通过下视丘影响体液分泌活动的改变,调节免疫活性细胞的活性和增殖速度,从而影响抗体产生的量。3) 在免疫物体内,已存在有一定数量的特异性的免疫活性细胞。因此作用于神经系统的某些刺戟,在沒有抗原作用时,亦有可能通过神经体液的途径调节抗体产生和释放。4) 当抗原刺戟与其他外界刺戟(条件刺戟)反复结合,抗原刺戟有可能与其他刺戟形成条件反射。因此当单独应用条件刺戟时,亦有可能通过神经体液的作用促进免疫活性细胞的增殖,或促使淋巴系统释放贮存的抗体,因而一度地增加体液中抗体的浓度。所有神经体液途径的调节作用都是非特异性的。当动物体内存在两种特异性免疫活性细胞时,则刺戟后可同时促使两种抗体的形成。

不仅我们所做的试验完全符合以上假设。所有条件反射抗体形成试验中,阳性和阴性的结果,以及许多免疫学中不容易解释的现象:如穴位注射和针灸等对抗体产生的影响^[16];刺戟下丘脑引起凝集素效价的显著增高^[17];再次免疫时的非特异性回忆反应^[18,19];兴奋和抑制神经系统的药物对抗体产生的影响^[20];不同神经类型对抗体产生的影响^[21]等也都可以用神经体液调节学说加以解释。

近年来,抗体产生的细胞学说^[1]取得了巨大的成就,但单独根据细胞学说无法解释以上现象。因此,我们认为抗体形成的神经体液调节学说^[14]不仅与西方细胞学说不相矛盾,而是相互补充的,只有既看到在细胞水平上和分子水平上抗体形成的机制,又看到整体的神经体液系统对抗原刺激的反应过程,才能更好地、更全面地认识免疫学的各种现象。

结 论

雏鸡 6 羽接种新城疫 I 系疫苗作非条件刺激,灯光、节拍器和整个结合过程综合环境因素作条件刺激,每日或隔日 1 次,结合 12—22 次,休息 75 天,待 HI 抗体下降后,单独应用条件刺激就引起 HI 抗体的显著上升。用非条件刺激强化后,第 2 次应用条件刺激反应更为明显。

已免疫过的新城疫苗的雏鸡,再用绵羊血球作非条件刺激结合上述条件刺激,间隔 40 天后,单独应用条件刺激,不仅引起绵羊血球凝集素的升高,也同时引起新城病毒 HI 抗体的一度升高。

以上结果说明抗原刺激有可能与其他刺激形成条件反射,以后单独应用条件刺激就可以通过神经体液途径,促进抗体的释放和形成,并证明条件性抗体的产生是非特异性的。

条件反射性抗体的产生反应快,但升高幅度低,持续时间短。与应用特异性抗原刺激所导致的抗体再次反应有明显区别。

参 考 文 献

- [1] Метальников, С. И. и Шорин, Г. И. (Metabucov et Shorine): *C. R. Soc. Biol.*, **99**, 1928.
- [2] Долин, А. О. и Крылов, В. Н.: *Журн. Высш. Нерв. Деят.*, **2**:547, 1952.
- [3] Стручковская, А. Л.: *Журн. Высш. Нерв. Деят.*, **3**:238, 1953.
- [4] Урин, А. Г. и Байдалиева, К. К.: *Журн. Высш. Нерв. Деят.*, **4**:355, 1954.
- [5] Дорошкевич, А. А.: *Журн. Высш. Нерв. Деят.*, **4**:108, 1954.
- [6] Крылов, Н. В. и Малиновский, О. В.: *Ж.М.Э.И.*, (9):92, 1961.
- [7] Лукьяненко, В. И.: *Ж.М.Э.И.*, (10):53, 1959.
- [8] Ильенко, В. И. и Ковалева, Г. А.: *Ж.М.Э.И.*, (7):108, 1960.
- [9] Джиуадзе, А. П., Джейраншвили, В. В., и Досычев, А. И.: *Журн. Высш. Нерв. Деят.*, **10**:598, 1960.
- [10] Здродовский, П. Ф.: *микробиология*, **2**:18, 1955.
- [11] Berczhnaya, N. M.: *Mechanisms of Antibody Formation*, 275, 1960.
- [12] Abo. A. D., Ishimova. L. M., Medunicin N. V., Ma Bao-li and Khc-chintsao: *Mechanisms of antibody Formation*, 260, 1960.
- [13] Адо, А. Д.: 13th Всесоюз Свезд. Гиг Эпид Микроб. Инфку.
- [14] Здродовский, П. Ф.: *Проблемы Инфекц. и Имму.*, 288, 1961.
- [15] 谢少文: *免疫学进展*, 1 页, 1962.
- [16] 杨贵贞、吴立克、唐珊熙: *免疫学进展*, 141 页, 1962.
- [17] Петровский, И. Н.: *Ж.М.Э.И.*, (7):103, 1961.
- [18] Weigle, W. O.: *Mechanisms of Antibody Formation*, 283, 1960.
- [19] Zdanov, M. V., Zakstelskaya, I. Ya. and Yefimova, V. E.: *Mechanisms of Antibody Formation*, 302, 1960.
- [20] Зильбер, А. А.: *Основы Иммуитета*, 207, 1958.

1) 无论直接模版学说、间接模版学说,或是细胞系选择学说都不外“抗原→免疫活性细胞→抗体”这一公式。因此,可以归结为抗体形成的细胞学说。

[21] Монашников, А. М.: *Жмэи.*, (2): 50, 1960.

THE REGULATION OF THE CONDITIONED REFLEX IN THE ANTIBODY FORMATION

TU NIEN-SIN

(*Nanking Agriculture College, Nanking*)

Six chicks were inoculated with NDV-1 strain vaccine as unconditioned stimulus, and combination with lamp-light, metronome (120 beats per minute) and complex environmental factors, which effected the fowls during the whole experimental period, served as conditioned stimuli. These two stimuli were employed for 12—22 times, with intervals of one or two days. 75 days after the final vaccine injection, and when the HI titer had decreased, the conditioned stimuli were applied alone, an increase in HI titer in the experimental fowls could be demonstrated. A more marked reaction was obtained, when the secondary conditioned stimuli were applied after they were strengthened with unconditioned stimulus and conditioned stimuli.

Twelve chicks, immunized with the New Castle disease vaccine, were injected the sheep erythrocytes as an unrelated unconditioned stimulus, to be used in combination with the conditioned stimuli described above. 40 days later, the conditioned stimuli singly could increase not only the titer of the haemolysin, but also the HI antibody against NDV.

The results indicated that the antigen stimulus might be combined with other stimuli to form conditioned reflex. Once this was established, the conditioned stimuli alone could induce the release or the formation of antibodies, through nervous and humoral regulations. It also proved that the formation of antibodies due to conditioned stimuli was non-specific.

The conditioned increase of antibody titer was rapid, but the range was low, the duration short, and was significantly different when compared with the secondary reaction induced by the specific antigen stimulus.