

乌灵菌粉早期应用对创伤后应激障碍模型大鼠行为及海马组织中IL-1 β 、IL-6水平的影响^A

李凤蕾^{1*}, 杜菲², 吴迪³, 彭正午^{3#} (1.哈励逊国际和平医院药学部, 河北衡水 053000; 2.哈励逊国际和平医院B超室, 河北衡水 053000; 3.第四军医大学西京医院心身科, 西安 710032)

中图分类号 R749.92 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3478-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.07

摘要 目的:探讨乌灵菌粉早期应用对创伤后应激障碍(PTSD)模型大鼠行为及海马组织中白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6水平的影响。方法:50只SD大鼠随机分为对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性对照组(帕罗西汀, 10 mg/kg)及乌灵菌粉低、高剂量组(0.4、0.8 g/kg)。除对照组外,其他各组大鼠经增强型单次延长应激复制PTSD模型,造模后立即ig相应药物,每天1次,连续7 d。给药完成后第7天进行旷场实验(记录大鼠10 min内进入中央区次数、中央区探索时间百分比)、第8天进行高架十字迷宫实验(记录大鼠5 min内进入开臂次数百分比、开臂停留时间百分比)以观察大鼠的行为;随后处死大鼠,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠海马组织中IL-1 β 、IL-6的含量。结果:与正常组比较,模型组大鼠行为学指标均显著降低,海马组织中IL-1 β 和IL-6的含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,阳性对照组、乌灵菌粉高剂量组大鼠行为学指标均显著升高,海马组织中IL-1 β 和IL-6的含量均显著降低($P<0.05$),但乌灵菌粉低剂量组各指标则无显著变化($P>0.05$)。结论:高剂量乌灵菌粉可改善PTSD大鼠焦虑样行为,且这种作用可能与其降低海马组织中IL-1 β 、IL-6的水平有关。

关键词 乌灵菌粉;大鼠;创伤后应激障碍;行为;白细胞介素1 β ;白细胞介素6

Effects of Early Usage with Wulingjun Powder on the Behavior of Rats with Post-traumatic Stress Disorder and the Level of IL-1 β and IL-6 in Their Hippocampi

LI Fenglei¹, DU Fei², WU Di³, PENG Zhengwu³ (1.Department of Pharmacy, Harrison International Peace Hospital, Hebei Hengshui 053000, China; 2.B Ultrasonography Room, Harrison International Peace Hospital, Hebei Hengshui 053000, China; 3.Psychosomatic Department, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To discuss the effect of early usage with Wulingjun powder on the behavior of rats with post-traumatic stress disorder (PTSD) and the level of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in their hippocampi. **METHODS:** 50 SD rats were randomized into control group (normal saline), model group (normal saline), positive control group (paroxetine, 10 mg/kg) and the groups of low and high-dose (0.4, 0.8 g/kg) Wulingjun powder. The rats in all groups except for control group, were exposed to single prolonged stress for the establishment of PTSD models. Corresponding drugs were given ig immediately after such establishment, qd, for 7 consecutive days. An open field test (the times of the rats' entering the central area and the percentage of the time the rats spent in exploring the central area within 10 min were recorded) was conducted 7 days after giving drugs; and an elevated plus-maze test (the times of the rats' in opening arms and the percentage of the time the rats spent in opening arms within 5 min were recorded) was carried out 8 days thereafter, to observe the behavior of the rats. Then the rats were sacrificed to determine the level of IL-1 β and IL-6 in their hippocampi by ELISA. **RESULTS:** Compared to the normal group, the behavioral index of the rats in model group was significantly lower, and the level of IL-1 β and IL-6 in their hippocampi was significantly higher ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to model group, the behavioral index of the rats in positive control group and the group of high-dose Wulingjun powder was significantly higher, and the level of IL-1 β and IL-6 in their hippocampi was significantly lower ($P<0.05$), but no statistically significant difference was shown in all indexes in the group of low-dose Wulingjun powder ($P>0.05$). **CONCLUSIONS:** High-dose Wulingjun powder can improve the anxiety-like behavior of the rats with PTSD, which may be related to the reduction in the level of IL-1 β and IL-6 in the hippocampus.

KEYWORDS Wulingjun powder; Rats; Post-traumatic stress disorder; Behavior; IL-1 β ; IL-6

乌灵菌是子囊菌科、黑柄炭角菌属 *Xylaria nigrip* (Kl.) Sacc.的一种真菌。经现代生物工程技术深层发酵培养乌灵菌

丝体并进一步加工制成的乌灵菌粉,具有补肾健脑、养心安神等功效,目前已成为国家中药一类新药。有研究报道,乌灵菌粉可以通过调节5-羟色胺(5-HT)的水平改善卒中后抑郁模型大鼠的抑郁样行为^[1-2],同时具有抗焦虑的作用^[3-4]。此外,乌灵菌粉,尤其是其水提取物具有较强的抗炎活性,可以抑制一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶(COX)的表达水平^[5]。创伤后应激障碍(Post-traumatic stress disorder, PTSD)属于焦虑症范畴,

^A 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81401109)

* 主管药师。研究方向:精神药物作用机制。电话:0318-2183607。E-mail:13609161341@163.com

通信作者:主管技师,博士。研究方向:精神药理与毒理学。电话:029-89661593。E-mail:pengzhengwu1446@163.com

其发病机制可能与炎症反应异常相关,目前临床治疗以抗抑郁为主。近年来的研究显示,在经历创伤事件后立即给予相应的药物干预(早期干预),可以有效防止 PTSD 的发生^[6]。本研究采用增强型单次延长应激(Enhanced single prolonged stress, ESPS)复制 PTSD 大鼠模型,并以帕罗西汀为阳性对照药物,观察乌灵菌粉早期应用对该模型大鼠焦虑样行为的作用及其相关机制,为乌灵菌粉预防 PTSD 的发生提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

大鼠自发活动测试仪、高架十字迷宫(上海吉量软件科技有限公司);Multiskan Go 型酶联免疫读数仪、X1R 低温冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。

1.2 药品与试剂

乌灵胶囊(浙江佐力药业有限公司,批号:150207,规格:0.33 g/粒,将纯乌灵菌粉包装在胶囊内);帕罗西汀(德国 Sigma 公司,批号:P9623,纯度:>98%);白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海 SunRed 生物科技有限公司,批号:0120、0136)。

1.3 动物

清洁级成年 SD 大鼠 50 只,♂,体质量(180±20) g,购自第四军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(军)2012-0007,合格证号:SYZX-2016-02]。所有大鼠适应性饲养 1 周后开始实验。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

50 只大鼠按随机数字表法分为对照组(生理盐水,5 ml/kg)、模型组(生理盐水,5 ml/kg)、阳性对照组(帕罗西汀,10 mg/kg,剂量选择依据文献[7])和乌灵菌粉低、高剂量组(0.4、0.8 g/kg,剂量选择依据文献[3]和预实验),每组 10 只。除对照组外,其他各组大鼠采用 ESPS 复制 PTSD 模型,具体步骤如下:大鼠束缚 2 h 后,立即强迫性游泳(水深 40 cm,水温 22~24 ℃)20 min,休息 15 min 后,乙醚麻醉至意识丧失,麻醉清醒后足底电击 2 次(1 mA 持续 4 s,间隔 10 s)。造模成功的标志为造模结束后通过旷场实验和高架十字实验检测到大鼠明显的焦虑样行为,即进入中央区次数、中央区探索时间百分比、进入开臂次数百分比和开臂停留时间百分比均显著低于正常大鼠。造模结束后,各组大鼠立即 ig 相应药物,每天 1 次,连用 7 d。

2.2 各组大鼠行为测试

2.2.1 旷场实验 给药完成后第 7 d 上午 9:00—11:00 进行旷场实验。将大鼠放于旷场行为观察箱中(直径 47 cm×47 cm)适应 1 min 后,记录大鼠 10 min 内的运动轨迹,采用 Clever Sys 行为学分析软件分析大鼠的水平运动路程、进入中央区次数和中央区探索时间百分比。

2.2.2 高架十字迷宫实验 于旷场实验次日进行高架十字迷宫实验。将大鼠放于高架十字的中央平台上,鼠头朝向固定开臂,10 s 适应期后,开始记录其行动轨迹(5 min),记录大鼠进入开臂次数百分比和开臂停留时间百分比。

2.3 各组大鼠海马组织中 IL-1 β 、IL-6 含量测定

行为测试结束后处死大鼠,在冰上迅速分离海马组织,称取质量后加入体积比为 1:5 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)进行组织匀浆,然后将匀浆液在 4 ℃ 下,以离心半径为 22.5 cm、3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,ELISA 法测定海马组织中 IL-1 β 、

IL-6 的含量,测定过程严格按照试剂盒说明书操作。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件对所得数据进行分析。所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐时则采用 LSD-*t* 检验,方差不齐时则采用 Dunnett T3 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠旷场实验结果比较

与对照组比较,模型组大鼠进入中央区次数和中央区探索时间百分比显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组、乌灵菌粉高剂量组大鼠进入中央区次数和中央区探索时间百分比显著增加($P < 0.05$),但乌灵菌粉低剂量组指标则无显著变化($P > 0.05$),详见表 1。

表 1 各组大鼠旷场实验结果比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Comparison of open field test results among all groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	旷场实验结果	
	进入中央区次数	中央区探索时间百分比, %
对照组	19.11 ± 5.14	27.45 ± 7.85
模型组	6.88 ± 3.12**	16.42 ± 4.35*
阳性对照组	16.18 ± 5.62*	25.22 ± 4.52*
乌灵菌粉低剂量组	8.87 ± 3.42*	18.63 ± 5.51
乌灵菌粉高剂量组	14.95 ± 7.83*	23.18 ± 6.25*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group,

* $P < 0.05$

3.2 各组大鼠高架十字迷宫实验结果比较

与对照组比较,模型组大鼠进入开臂次数百分比、开臂停留时间百分比均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组、乌灵菌粉高剂量组大鼠进入开臂次数、开臂停留时间百分比显著升高($P < 0.05$),但乌灵菌粉低剂量组指标则无显著变化($P > 0.05$),详见表 2。

表 2 各组大鼠高架十字迷宫实验结果比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Comparison of elevated plus-maze test results among all groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	高架十字迷宫实验结果	
	开臂进入次数百分比, %	开臂停留时间百分比, %
对照组	35.11 ± 7.92	18.32 ± 5.54
模型组	20.19 ± 5.21**	9.98 ± 4.11*
阳性对照组	32.22 ± 4.52*	16.77 ± 4.53*
乌灵菌粉低剂量组	24.22 ± 6.24	11.31 ± 4.65
乌灵菌粉高剂量组	30.11 ± 6.14*	15.94 ± 6.31*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group,

* $P < 0.05$

3.3 各组大鼠海马组织中 IL-1 β 、IL-6 含量测定结果比较

与对照组比较,模型组大鼠海马组织中 IL-1 β 、IL-6 的含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组、乌灵菌粉高剂量组大鼠组织中 IL-1 β 、IL-6 的含量显著降低($P < 0.05$),但乌灵菌粉低剂量组指标则无显著变化($P > 0.05$),详见表 3。

4 讨论

PTSD 是受到异于寻常的威胁性、灾难性的心理创伤导致的一种延迟性、持续性的精神障碍,其发病率呈现逐年上升的

表3 各组大鼠海马组织中IL-1 β 、IL-6水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mg}$)

Tab 3 Comparison of IL-1 β and IL-6 level in the hippocampus among all groups of rats($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mg}$)

组别	IL-1 β	IL-6
对照组	3.22 \pm 0.88	25.94 \pm 7.34
模型组	5.12 \pm 0.91*	40.15 \pm 8.11**
阳性对照组	3.55 \pm 1.05 [#]	27.89 \pm 4.78 [#]
乌灵菌粉低剂量组	4.35 \pm 0.75	34.65 \pm 6.94
乌灵菌粉高剂量组	3.98 \pm 0.94 [#]	31.55 \pm 9.88 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$

趋势^[4]。在创伤事件发生后如何有效地进行早期干预是预防PTSD的关键^[8]。帕罗西汀为5-HT再摄取抑制剂,已有研究显示,帕罗西汀对糖尿病合并焦虑抑郁有一定的改善作用^[9],帕罗西汀片早期干预对PTSD的预防具有可靠的临床疗效^[10],且基础研究也证实其可改善PTSD模型大鼠焦虑样行为和空间学习记忆能力^[7]。

本研究结果显示,与模型组比较,阳性对照组、乌灵菌粉高剂量组大鼠进入中央区次数、中央区探索时间百分比、进入开臂次数百分比、开臂停留时间百分比均显著升高,但乌灵菌粉低剂量组各指标则无显著变化。这提示0.8 g/kg的乌灵菌粉能显著改善大鼠的焦虑样行为(根据体表面积法换算,成人用药剂量约为22 mg/kg),而0.4 g/kg的乌灵菌粉并不能缓解大鼠的焦虑样行为。此外,乌灵菌粉高剂量组上述指标与阳性对照组比较差异无统计学意义,提示乌灵菌粉早期应用有缓解PTSD症状的作用,但是这一作用与乌灵菌粉的剂量有关。

近年研究表明,促炎性细胞因子的改变可能是PTSD发病的机制之一^[11]。PTSD患者血清中IL-6和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平升高,血浆中TNF- α 和IL-1 β 水平也高于对照人群^[12],而PTSD患者经抗抑郁治疗后血清中IL-1 β 的水平降低^[13]。此外,海马组织的结构和功能的变化也是PTSD发病机制之一^[14],且海马组织中促炎症细胞因子IL-1 β 和IL-6及其相关的分子途径可能参与了PTSD发生的病理生理过程^[15]。本研究结果显示,模型组大鼠海马组织中IL-1 β 和IL-6的水平显著高于对照组;给予高剂量的乌灵菌粉后,IL-1 β 和IL-6的水平显著降低,与模型组比较差异有统计学意义,与阳性对照组比较差异无统计学意义;而给予低剂量的乌灵菌粉后,IL-1 β 和IL-6的水平与模型组比较差异无统计学意义。这与大鼠行为学结果相一致,提示乌灵菌粉对大鼠焦虑样行为的改善作用与其降低大鼠海马中IL-1 β 和IL-6的水平有关。

综上所述,乌灵菌粉对PTSD大鼠的焦虑样行为具有一定的改善作用,且这一作用可能与其具有抗炎作用有关。但本研究没有观察乌灵菌粉作用的相关分子信号通路,不清楚其对促炎性细胞因子水平的调节是直接作用还是间接作用。后续研究拟观察炎症相关信号通路表达的变化,以进一步阐明乌灵菌粉改善大鼠焦虑样症状的机制及炎症细胞因子在PTSD发生、发展中的相关作用机制。

参考文献

[1] 张宸豪,李文贵,顾芳,等.乌灵菌粉治疗脑卒中后抑郁的疗效观察[J].临床神经病学杂志,2014,27(1):61.

[2] 裘涛,陈眉,陶水良,等.乌灵菌粉对脑卒中后抑郁大鼠海马区单胺类神经递质及行为学改变的影响[J].中国新药杂志,2007,16(11):857.

[3] 杨楠,郝文字,刘雁勇,等.乌灵菌胶囊抗焦虑作用的行为学实验研究[J].中国民族民间医药,2010,19(5):27.

[4] Li D, Zheng J, Wang M, et al. Wuling powder prevents the depression-like behavior in learned helplessness mice model through improving the TSPO mediated-mitophagy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, doi: 10.1016/j.jep.2016.03.065.

[5] Ko HJ, Song A, Lai MN, et al. Immunomodulatory properties of *Xylaria nigripes* in peritoneal macrophage cells of Balb/c mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(3):762.

[6] Levkovitz Y, Fenchel D, Kaplan Z, et al. Early post-stressor intervention with minocycline, a second-generation tetracycline, attenuates post-traumatic stress response in an animal model of PTSD[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25(1):124.

[7] 刘小兵,杨仲利,黎燕,等.帕罗西汀对创伤后应激障碍模型大鼠的影响[J].临床精神医学杂志,2011,21(6):365.

[8] 陈怡环,吴迪,陈冠婕,等.迷迭香酸早期干预对创伤后应激模型大鼠行为及海马IL-1 β 和IL-6水平的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2013,22(6):503.

[9] 金庞,程韬,陈静.帕罗西汀单用及与阿普唑仑联用治疗糖尿病合并焦虑抑郁的对照研究[J].中国药房,2015, 26(18):2495.

[10] 王怀海,谭庆荣,王志忠,等.帕罗西汀预防创伤后应激障碍对照研究[J].临床精神医学杂志,2009,19(1):1.

[11] Breen MS, Maihofer AX, Glatt SJ, et al. Gene networks specific for innate immunity define post-traumatic stress disorder[J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(12):1538.

[12] Guo M, Liu T, Guo JC, et al. Study on serum cytokine levels in posttraumatic stress disorder patients[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2012, 5(4):323.

[13] von KR, Hepp U, Kraemer B, et al. Evidence for low-grade systemic proinflammatory activity in patients with posttraumatic stress disorder[J]. *J Psychiatr Res*, 2007, 41(9):744.

[14] Tucker P, Ruwe WD, Masters B, et al. Neuroimmune and cortisol changes in selective serotonin reuptake inhibitor and placebo treatment of chronic posttraumatic stress disorder[J]. *Biol Psychiatry*, 2004, 56(2):121.

[15] Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, et al. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35(3):744.

(收稿日期:2016-04-01 修回日期:2016-07-13)

(编辑:刘明伟)