

川芎嗪联合乙酰半胱氨酸对慢性应激大鼠外周促炎细胞因子和肠道微生物的影响[△]

汪 英*(四川省医学科学院/四川省人民医院城东病区肿瘤科,成都 610075)

中图分类号 R378;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0476-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.12

摘要 目的:考察川芎嗪联合乙酰半胱氨酸(NAC)对慢性应激大鼠外周促炎细胞因子和肠道微生物的影响。方法:将正常大鼠作为正常对照组,将慢性应激大鼠分为模型组、NAC组(60 mg/kg)和川芎嗪+NAC组(15 mg/kg+60 mg/kg),每组20只,ig相应药物15 d。记录各组大鼠一般检查情况,检测血清中白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (INF- γ)水平,检测肠道菌群。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠呈现慢性应激症状,血清中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、INF- γ 水平均增强;肠道中的大肠埃希菌和肠球菌增加,乳杆菌和双歧杆菌减少($P<0.05$)。与模型组比较,NAC组和川芎嗪+NAC组大鼠慢性应激症状减轻,上述指标均改善($P<0.05$),其中川芎嗪+NAC组效果优于NAC组($P<0.05$)。结论:川芎嗪联合NAC可通过降低促炎细胞因子水平和改善肠道微生物生态来改善大鼠慢性应激状态。

关键词 川芎嗪;乙酰半胱氨酸;慢性应激;大鼠;促炎细胞因子;肠道微生物

Effects of Ligustrazine Combined with N-acetylcysteine on Peripheral Pro-inflammatory Cytokines and Intestinal Microflora of Chronic Stress Rat

WANG Ying(Dept. of Oncology, the East Ward, Sichuan Academy of Medical Science/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610075, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of ligustrazine combined with N-acetylcysteine (NAC) on the peripheral pro-inflammatory cytokines and intestinal microflora of chronic stress rat. METHODS: Normal rats were included in normal control group, and chronic stress model rats were divided into model group, NAC group (60 mg/kg) and ligustrazine+NAC group (15 mg/kg+60 mg/kg), with 20 rats in each group. They were given relevant medicine intragastrically for 15 d. The general inspection of rats were recorded in each group. Level of IL-6, IL-1 β , TNF- α and INF- γ in serum were detected, and intestinal microflora was measured. RESULTS: Compared with normal control group, chronic stress symptom of rats were found in model group, and level of IL-6, IL-1 β , TNF- α and INF- γ in serum were enhanced; *Escherichia coli* and *Enterococcus* in intestine were increased, while *Bacterium lacticum* and *Bacillus bifidus* were decreased ($P<0.05$). Compared with model group, chronic stress symptom of rats were relieved in NAC group and ligustrazine+NAC group, and above indexes were all improved ($P<0.05$); ligustrazine+NAC group was better than NAC group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Ligustrazine+NAC can improve chronic stress of rats by decreasing pro-inflammatory cytokines and improving the intestinal microflora.

KEYWORDS Ligustrazine; N-acetylcysteine; Chronic stress; Rat; Pro-inflammatory cytokines; Intestinal microflora

随着人们生活和工作压力的增大,机体长期处于慢性应激状态,严重影响人们的身心健康。慢性应激的发病与生物、心理和社会等多因素有关,严重时可致人死亡^[1]。探讨慢性应激对于体内炎症和肠道微生物的影响对于分析慢性应激的发病、预防及治疗具有重要意义。*N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC),简称乙酰半胱氨酸,早期用于黏液溶解,随着人们的深入研究,NAC已作为临床广泛使用的抗氧化剂,具有明显的抗氧化和抗炎效应。川芎嗪(Ligustrazine)是伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong*)的有效成分^[2],川芎嗪能直接清除具细胞毒性作用的自由基,具有一定的抗氧化和抗炎作用^[3]。有研究显示,川芎嗪与NAC联用治疗肺纤维化、

肝硬化,均获得良好疗效^[4]。本文通过考察川芎嗪与NAC联用对慢性应激大鼠的外周血促炎细胞因子和肠道微生物状态的影响,为二者临床联用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

M15全自动酶标分析仪(上海纤检仪器有限公司);FA1104电子天平(上海天平仪器厂);TGL-16G离心机(上海安亭科学仪器厂,离心半径:16 cm)。

1.2 药品与试剂

盐酸川芎嗪片(丽珠集团利民制药厂,批号:1508012,规格:每片50 mg);NAC颗粒(海南赞邦制药有限公司,批号:1580101,规格:每袋0.1 g);白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (INF- γ)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(美国Invitrogen公

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81402402)

* 主治医师,博士。研究方向:恶性肿瘤靶向治疗的基础及临床。电话:028-87393927。E-mail:201178967@qq.com

司,批号:2014031A、201406E2、20150603、20150402);大肠埃希菌、肠球菌、乳杆菌、双歧杆菌选择性培养基(上海哈永生物科技有限公司,批号:20140203T、2014201、20140206、2014308)。

1.3 动物

SPF级健康大鼠,雌雄各半,体质量180~220 g,由四川省医学科学院动物研究所提供,合格证号:SCXK(川)-2008-24。本实验经院内伦理委员会同意。

2 方法

2.1 慢性应激大鼠模型的建立

2.1.1 束缚应激 采用自制的束缚筒。束缚筒分前后两部分,前部是薄铁皮卷成的圆锥形筒,长约5 cm,大口直径6 cm,小口直径2 cm,后部为圆锥形筒的大口处连接长30 cm的袖套,袖套口径10 cm。将大鼠从袖套驱入,使头部进入铁皮锥筒,固定大鼠,使之无活动空间,并悬放在斜度为15°的斜坡上,持续6 h。

2.1.2 强迫游泳应激 将大鼠置于深度为50 cm的水池中,水温为(25±2)℃。将大鼠尾部系相当于1/5体质量的负荷,直至衰竭,即大鼠鼻子没入水中8 s。

2.1.3 噪声应激 将大鼠放入噪声参数1 500 Hz、92 dB的环境中1 h。

将所有大鼠贯序进行上述3种应激刺激48 d建立慢性应激模型,第1、6、9、10、13、18、20、24、27、30、33、36、39、42、45、48天进行束缚应激,第2、5、8、12、15、17、21、23、25、29、31、35、38、41、43、47天进行强迫游泳应激,第3、4、7、11、14、16、19、22、26、28、32、34、37、40、44、46天进行噪声应激。

2.2 分组与给药

取正常大鼠作为正常对照组,将已建立慢性应激模型的大鼠分为模型组、NAC组(60 mg/kg)和川芎嗪+NAC组(15 mg/kg+60 mg/kg),每组20只。各给药组大鼠连续ig相应药物15 d,正常对照组和模型组大鼠ig给予生理盐水,ig体积为20 mL/kg。川芎嗪和NAC的给药剂量均按人临床常用剂量换算,给药顺序为先NAC,15 min后再给予川芎嗪。

2.3 指标检测

2.3.1 一般检查 记录实验过程中各组大鼠饮食情况、精神状态、自主活动、皮毛状况等。

2.3.2 ELISA法检测血清中IL-6、IL-1β、TNF-α、INF-γ水平 给药结束,所有大鼠禁食不禁水12 h,然后麻醉,断尾取血,每只5 mL,抗凝,-70℃保存。严格按试剂盒说明书要求操作,采用酶标分析仪检测各组大鼠外周血中IL-6、IL-1β、TNF-α、INF-γ水平。

2.3.3 平板培养法分析大鼠肠道菌群 给药结束,所有大鼠禁食不禁水12 h,断颈处死,开腹,游离盲肠,取内容物1 g,置于带玻璃珠的试管,加9 mL生理盐水,涡旋混匀制成匀浆。用生理盐水再稀释10倍,分别取稀释液

50 μL,均匀涂抹在大肠埃希菌、肠球菌、乳杆菌和双歧杆菌4种选择性培养基上,分别在37℃下培养24 h。计算单位质量盲肠内容物活菌集落数对数值(CFU/g)=lg{[样本质量(g)+稀释液体积(mL)]/样本质量×稀释倍数×菌落数×100}。

2.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。促炎细胞因子和肠道菌群等正态计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用LSD-*t*检验;大鼠例数和菌群数等计数资料采用例数或百分比(%)表示,组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计意义,检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 一般状况

正常对照组大鼠的饮食、精神与活动状态良好。其余各组大鼠均呈现不同程度的食欲不振、精神萎靡、活动减少、毛发无光泽、对外界刺激反应迟钝和体质量降低。其中模型组大鼠上述状况最明显,川芎嗪+NAC组大鼠状态较好,NAC组大鼠状态介于模型组和川芎嗪+NAC组之间。

3.2 血清中促炎细胞因子表达

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α、INF-γ水平均升高($P < 0.05$)。与模型组比较,NAC组和川芎嗪+NAC组大鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α、INF-γ水平均降低($P < 0.05$)。与NAC组比较,川芎嗪+NAC组大鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α、INF-γ水平均降低($P < 0.05$)。各组大鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α、INF-γ水平的测定结果见表1。

表1 各组大鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α、INF-γ水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 20, \text{ng/L}$)

Tab 1 Level of IL-6, IL-1β, TNF-α and INF-γ in serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 20, \text{ng/L}$)

组别	IL-6	IL-1β	TNF-α	INF-γ
正常对照组	62.4±8.1	24.5±9.2	43.3±7.7	21.5±4.2
模型组	133.5±17.2*	128.4±24.1*	105.2±14.9*	53.9±13.5*
NAC组	118.4±16.6 ^a	108.9±19.5 ^a	92.4±10.4 ^a	43.8±10.8 ^a
川芎嗪+NAC组	104.5±13.5 ^{a,b}	95.6±15.4 ^{a,b}	86.5±16.7 ^{a,b}	36.4±11.1 ^{a,b}
<i>F</i>	91.3	127.9	86.4	33.8
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^a $P < 0.05$;与NAC组比较,^b $P < 0.05$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.05$; vs. model group,^a $P < 0.05$; vs. NAC group,^b $P < 0.05$

3.3 对肠道菌群的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠盲肠中的大肠埃希菌和肠球菌增加($P < 0.05$),乳杆菌和双歧杆菌减少($P < 0.05$);NAC组大鼠盲肠中的双歧杆菌减少($P < 0.05$)。与模型组比较,NAC组和川芎嗪+NAC组大鼠盲肠中的大肠埃希菌和肠球菌减少($P < 0.05$),乳杆菌和双歧杆菌增加($P < 0.05$)。与NAC组比较,川芎嗪+

NAC组大鼠盲肠中的大肠埃希菌和肠球菌减少($P < 0.05$),乳杆菌和双歧杆菌增加($P < 0.05$)。各组大鼠肠道菌群的测定结果见表2。

表2 各组大鼠肠道菌群的测定结果($\bar{x} \pm s, n=20, \text{CFU/g}$)

Tab 2 Determination results of intestinal microflora in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=20, \text{CFU/g}$)

组别	大肠埃希菌	肠球菌	乳杆菌	双歧杆菌
正常对照组	5.3±0.7	5.5±0.4	6.7±0.4	9.1±0.4
模型组	7.6±1.1*	8.2±0.9*	5.2±0.3*	7.5±1.1*
NAC组	6.7±0.7 [#]	7.4±1.1 [#]	5.7±0.8 [#]	8.2±0.5 ^{#*}
川芎嗪+NAC组	6.0±0.8 ^{#a}	6.5±1.2 ^{#a}	6.3±0.7 ^{#a}	8.6±0.7 ^{#a}
F	27.3	29.9	25.3	16.9
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与NAC组比较,^a $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. NAC group, ^a $P < 0.05$

4 讨论

慢性应激是打破了机体本来存在的促炎与抗炎反应的平衡,迫使机体反馈性地处于免疫抑制状态,表现在促炎因子水平的增加,如IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等。慢性应激可维持过度的促炎反应,诱发全身的炎症反应,TNF- α 与IL-1 β 可直接刺激并激活炎症细胞,如IL-6和血小板活化因子等大量分泌,触发级联反应,炎症细胞又可作用于血管内皮细胞,使得白细胞聚集在炎症部位,激活中性粒细胞参与炎症,诱导细胞凋亡,引起微循环障碍,临床表现为兴趣和活动降低,严重者可致休克或死亡^[5-6]。INF- γ 作为效应性的细胞因子,具有增强中性粒细胞和巨噬细胞抑制微生物的活性,慢性应激大鼠体内INF- γ 水平增加也提示了T细胞参与炎症过程^[7]。机体为控制炎症反应的规模,免疫系统会释放IL-4与IL-10等炎细胞因子代偿性抗炎,适度地抗炎可达到保护机体的作用,但持续性地抗炎可抑制免疫,使机体防御反应持续下调,反馈性地促进感染,影响预后^[8-9]。本文结果显示,与模型组比较,NAC组和川芎嗪+NAC组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、INF- γ 水平均降低。其中NAC减少炎症因子的机制较复杂,如清除自由基增加机体抗氧化应激能力、与谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)结合分解清除过氧化物、降低脂质过氧化物水平、阻止核因子 κ B(NF- κ B)通路激活、抑制促炎细胞因子等。与NAC比较,川芎嗪的抗炎作用多为直接途径,如川芎嗪可直接抑制TNF- α 表达,且可抑制TNF- α 引起的细胞间黏附分子1(ICAM-1)表达,减少白细胞和单核巨噬细胞聚集,达到保护内皮细胞的目的。另外,川芎嗪还可调控和稳定代谢多种细胞因子及构成的网络失常状态,降低脂质过氧化反应的代谢产物表达,如丙二醛(MDA)。川芎嗪联合NAC治疗慢性应激的机制可能是通过抑制活性氧激活、减轻氧化损伤、降低炎症因子水平,进而改善慢性应激程度。

多种肠道微菌构成了复杂而又动态平衡的肠道微生态。本文采用束缚、游泳和噪音等3种刺激方式成功制备了慢性应激大鼠模型,大鼠的肠道菌群平衡被破坏,表现在有害菌的数量增加和有益菌的数量减少,前者如大肠埃希菌与肠球菌,后者如乳杆菌与双歧杆菌,提示3种慢性刺激影响了大鼠消化道功能^[10-11]。NAC可直接降低十二指肠与回肠黏膜中IL-2、IL-6与前列腺素E2(PGE₂)表达,降低空肠黏膜IL-2和PGE₂,提高十二指肠黏膜GSH-Px活性,达到抑制肠道免疫应激的目的^[12]。川芎嗪通过改善微循环、抗缺血缺氧和抗氧自由基等多种作用改善胃肠黏膜微循环,抑制氧自由基生成,维护肠道屏障功能^[13]。川芎嗪与NAC联用可明显增强慢性应激大鼠肠道微生态的改善效果。

综上,慢性应激可明显增加外周促炎细胞因子和改变肠道微生态;川芎嗪联合NAC可通过降低促炎细胞因子水平和改善肠道微生态状态从而改善慢性应激状态,但两药联用增效的机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 彭静.丁酸钠对慢性应激模型大鼠空间学习记忆能力的影响[J].中国药房,2016,27(16):2233-2235.
- [2] 何效平,王贤英.HPLC法测定复脉定颗粒中盐酸川芎嗪的含量[J].中国药房,2016,27(9):1270-1271.
- [3] 王牡丹,曹海军,李善高,等.川芎嗪注射液治疗酒精性肝纤维化的临床疗效及安全性评价[J].中国临床药理学杂志,2016,32(9):778-780.
- [4] 张辉,杨永俊,朱金山,等.川芎嗪联合乙酰半胱氨酸治疗肝硬化40例临床观察[J].实用肝脏病杂志,2010,15(5):382-383.
- [5] 何小艳,马存贞,伊凡,等.养阴活胃合剂对慢性萎缩性胃炎模型大鼠血清炎症因子的影响[J].新疆医科大学学报,2015,38(2):129-132,136.
- [6] 尚立芝,谢文英,张良芝,等.爱罗咳喘宁对COPD大鼠肺组织炎症因子及氧化应激的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(24):168-171.
- [7] 田蕊.慢性社会隔离性应激对人血清细胞因子的影响[D].杭州:浙江理工大学,2014.
- [8] 李卫,边艳青.外周炎症及慢性应激对认知功能的影响及影响机制[J].免疫学杂志,2014,30(7):650-653.
- [9] 邱小妮.肠易激综合征肝郁脾虚型与血管活性肠肽及IL-12/IL-10表达的相关性研究[D].福州:福建中医药大学,2014.
- [10] 罗贝贝.重复束缚应激致小鼠肠道屏障功能障碍的干预研究[D].上海:上海体育学院,2014.
- [11] 马良.黄酒对慢性应激大鼠肠道微生物的影响[J].中国微生物生态学杂志,2013,25(5):553-555.
- [12] 伍国华.N-乙酰半胱氨酸对脂多糖刺激仔猪肠道免疫应激和抗氧化能力的影响[D].武汉:武汉工业学院,2012.
- [13] 王波,宋怀宇,杨建荣.肠道屏障功能障碍的干预研究进展[J].世界华人消化杂志,2011,19(21):2251-2256.

(收稿日期:2016-05-28 修回日期:2016-10-06)

(编辑:邹丽娟)