

· 论 著 ·

# 慢性应激大鼠外周血促炎细胞因子 和肠道微生态的变化

汪英<sup>1</sup>, 李锡春<sup>2</sup>, 黄佰彦<sup>3</sup>, 张杰<sup>3</sup>, 贺莎莎<sup>3</sup>, 邓窈窈<sup>3</sup>, 罗馨玫<sup>3</sup>, 刘杰<sup>3</sup>, 王雨晴<sup>3</sup>

1. 四川省人民医院肿瘤科, 四川 成都 610101; 2. 中航工业·成飞医院, 四川 成都 610092;

3. 四川大学华西医院肿瘤科, 四川 成都 610041

**摘要:** **目的** 通过观察慢性应激大鼠外周血促炎细胞因子的表达和肠道微生态的变化,探讨慢性应激对于其体内炎症和肠道微生物的影响。**方法** 对大鼠序贯采用束缚、强迫游泳和噪声三种刺激 48 d,分别将进行应激 18、33、48 d 时存活的大鼠作为慢性应激 1 组 ( $n=20$ )、慢性应激 2 组 ( $n=20$ ) 和慢性应激 3 组 ( $n=20$ );将未受实验应激原刺激的 20 只大鼠作为正常对照组。检测并比较 4 组大鼠一般状况、外周血的促炎细胞因子和肠道微生态状况。**结果** 对照组大鼠的饮食、精神与活动状态良好。3 个慢性应激组大鼠均呈现食欲不好、活动减少、毛发无光泽、精神萎靡和对外界刺激反应迟钝,大鼠上述症状、体征随应激时间的延长而明显,即按正常组、慢性应激 1、2、3 组之序,症状、体征依次加重。随应激程度的递增(正常组→慢性应激 1 组→2 组→3 组),大鼠血清白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  和干扰素(INF)- $\gamma$  mRNA 相对表达量递升( $P$  均  $<0.01$ );大鼠盲肠的肠杆菌和肠球菌定量[集落形成单位(CFU/g)]递升( $P$  均  $<0.01$ ),乳杆菌和双歧杆菌定量则递降( $P$  均  $<0.01$ )。**结论** 慢性应激可显著增加大鼠外周血促炎细胞因子水平和改变肠道微生态,变化程度与应激程度相关。降低促炎细胞因子水平和/或改善肠道微生态状态可能有利于改善其慢性应激状态。

**关键词:** 慢性应激; 大鼠; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 干扰素- $\gamma$ ; 肠道微生态

**中图分类号:** R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)10-1303-04

## Changes of pro-inflammatory cytokines in peripheral blood and intestinal microflora in chronic stress rats

WANG Ying\*, LI Xi-chun, HUANG Bai-yan, ZHANG Jie, HE Sha-sha,

DENG Yao-tiao, LUO Xin-mei, LIU Jie, WANG Yu-qing

\* Department of Oncology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610101, China

**Abstract: Objective** To investigate the influence of chronic stress on rat inflammation in vivo and intestinal microorganisms by observing the changes of pro-inflammatory cytokines in peripheral blood and intestinal microflora. **Methods** By being stimulated with bound, forced swimming and noise of sequential use for 48 days, the surviving rats at 18-, 33- and 48-day after stress were served as group 1, 2, 3 of chronic stress ( $n=20$  each), respectively. The rats unprovoked by experimental stressors were served as control group ( $n=20$ ). The general conditions, pro-inflammatory cytokines in peripheral blood and intestinal microflora conditions of rats in four groups were detected and compared. **Results** In rats of control group, the diet, mental state and activity were good. In rats of group 1, 2 and 3 of chronic stress, poor appetite, decreased activities, dull hair, mental sluggishness and slow response to external stimuli were observed. With the extension of stress time, the aforementioned symptoms and signs were more obvious in turn, namely, the aforementioned symptoms and signs were aggravated in order of control group and group 1, 2, 3 of chronic stress; the relative expression levels of serum interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (INF)- $\gamma$  mRNA increased in turn (all  $P < 0.01$ ); the amounts [colony forming unit (CFU)/g] of enterobacteria and enterococcus in rat cecum increased in turn (all  $P < 0.01$ ), while the amounts of lactobacillus and bifidobacterium in rat cecum decreased in turn (all  $P < 0.01$ ). **Conclusions**

Chronic stress can significantly increase the pro-inflammatory cytokines in peripheral blood and alter the intestinal microflora, and the degree of change is related to the degree of stress. The decrease of pro-inflammatory cytokines and/or the improvement of the intestinal microflora status will help to improve the state of chronic stress.

**Key words:** Chronic Stress; Rat; Interleukin-1 $\beta$ ; Interleukin-6; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Interferon- $\gamma$ ; 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,可严重影响其身心健康<sup>[1]</sup>。慢性应激的发病应与生物、心理和社会等多因素有关,严重时可致人死亡<sup>[2-3]</sup>。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。本课题尝试以束缚、强迫游泳和噪声三种不同的应激交替制备三种不同程度的慢性应激大鼠模型,考察外周血促炎细胞因子和肠道微生物状态的变化,现将结果报告如下。

## 1 对象与方法

1.1 受试动物 SPF 级健康大鼠,体重 180 ~ 220g,雌雄兼有,由四川大学华西医院动物研究实验室培育提供。

1.2 慢性应激大鼠模型的制备 (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,后部为圆锥形筒的出口连接长 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)强迫游泳应激:将大鼠置于深度 50 cm 的水池中,水温为(25 ± 2) °C,将大鼠尾部系 1/5 体重的负荷,直至衰竭,即大鼠鼻子没入水中 8 s。(3)噪声刺激:将大鼠放入噪声参数 1 500 Hz,92 dB 环境,1 h/次。对所有大鼠序贯进行上述 3 种刺激持续 48 d,具体的刺激方案见表 1。

表 1 3 种刺激持续方案

刺激方式	时间(d)
束缚应激	1,6,9,10,13,18,20,24,27,30,33,36,39,42,45,48
强迫游泳	2,5,8,12,15,17,21,23,25,29,31,35,38,41,43,47
噪声刺激	3,4,7,11,14,16,19,22,26,28,32,34,37,40,44,46

1.3 分组 将未受实验应激原影响的 20 只大鼠作为对照组。将进行 6 轮应激(即 18 d)的 20 只存活大鼠作为慢性应激 1 组;将进行 11 轮应激(即 33 d)的 20 只存活大鼠作为慢性应激 2 组;将进行 16 轮应激(即 48 d)的 20 只存活大鼠作为慢性应激 3 组。3 个应激组除了进行应激期间,其余时间均自由进食进水。

### 1.4 指标检测

1.4.1 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测血清促炎细胞因子 具体检测白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  和干扰素(INF)- $\gamma$

mRNA 相对表达量。应激结束后,大鼠禁食不禁水 12 h。麻醉,断尾取血,5 ml/只,抗凝, - 70 °C 保存。提取血清总 RNA,检测总 RNA 的纯度和完整度,4 个细胞因子与 GAPDH 的引物均由上海生工生物工程技术有限公司完成,见表 2。以 PCR 反应获得 4 种细胞因子基因的相对表达,所有因子的循环条件均为:热盖温度 105 °C,95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,53 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 10 min,4 °C 冷却停止,细胞因子基因 mRNA 的相对表达量 = 细胞因子基因产物光密度/看家基因 GAPDH 产物光密度。

表 2 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  和内参 GAPDH 基因 cDNA 引物序列

基因	5' - 3'	长度(bp)
IL-1 $\beta$	上游 GGC TTA TTA CAG TGC CAA TG	572
	下游 GGA TCT ACA CTC TCC AGC TGT	
IL-6	上游 GCC CAT GCT ACA TTT GCC GAA G	246
	下游 CAG GAG CCC AGC TAT GAA CTC	
TNF- $\alpha$	上游 CCG AGT GAC AAG CCT GTA G	444
	下游 CAA TGA TCC CAA AGT AGA CCT	
INF- $\gamma$	上游 ACT ACT TCG GCC TAA CTC T	510
	下游 TAT TGC AGG CAG GAT GAC C	
GAPDH	上游 ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	532
	下游 TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	

1.4.2 大鼠肠道菌群分析 应激结束后,禁食不禁水 12 h。麻醉,处死大鼠,打开腹腔,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,采用漩涡混合器混合成匀浆,用生理盐水再稀释 10 倍,分别取稀释液 50  $\mu$ l,均匀涂抹于 6 种培养基,分别为肠道需氧培养基、肠道厌氧培养基、肠杆菌选择性培养基、双歧杆菌选择性培养基、乳酸杆菌选择性培养基和肠球菌选择性培养基,分别在 37 °C 下进行 24 h 培养。计算每克盲肠内容物的活菌集落形成单位(CFU/g)的对数值 =  $\text{Log}\{[\text{标本重量}(\text{g}) + \text{稀释液量}(\text{ml})]/\text{标本重量} \times \text{稀释度} \times \text{菌落个数} \times 100\}$ 。

1.5 统计学处理 将所有数据输入 SPSS 15.0 软件包中。计数资料采用例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间总体均数比较采用单因素方差分析,多重比较采用 SNK- $q$  检验。 $\alpha = 0.05$  为检验水平。

## 2 结果

2.1 一般情况比较 正常组大鼠的饮食、精神与活动状态良好。3 个慢性应激组大鼠均呈现食欲不振、

表 3 4 组大鼠血清促炎细胞因子 mRNA 的相对表达量 (n = 20, × 100,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	INF- $\gamma$
对照组	24.5 ± 9.2	62.4 ± 8.1	43.3 ± 7.7	21.5 ± 4.2
慢性应激 1 组	95.6 ± 15.4 <sup>①</sup>	104.5 ± 13.5 <sup>①</sup>	86.5 ± 16.7 <sup>①</sup>	36.4 ± 11.1 <sup>①</sup>
慢性应激 2 组	108.9 ± 19.5 <sup>①②</sup>	118.4 ± 16.6 <sup>①②</sup>	92.4 ± 10.4 <sup>①②</sup>	43.8 ± 10.8 <sup>①②</sup>
慢性应激 3 组	128.4 ± 24.1 <sup>①②③</sup>	133.5 ± 17.2 <sup>①②③</sup>	105.2 ± 14.9 <sup>①②③</sup>	53.9 ± 13.5 <sup>①②③</sup>
F 值	127.9	91.3	86.4	92.7
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

注:与对照组比较,<sup>①</sup>P < 0.05;与慢性应激 1 组比较,<sup>②</sup>P < 0.05;与慢性应激 2 组比较,<sup>③</sup>P < 0.05。

表 4 4 组大鼠肠道菌群分析 (n = 20, CFU/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	肠杆菌	肠球菌	乳杆菌	双歧杆菌
对照组	5.3 ± 0.7	5.5 ± 0.4	6.7 ± 0.4	9.1 ± 0.4
慢性应激 1 组	6.0 ± 0.8 <sup>①</sup>	6.5 ± 1.2 <sup>①</sup>	6.3 ± 0.7 <sup>①</sup>	8.6 ± 0.7 <sup>①</sup>
慢性应激 2 组	6.7 ± 0.7 <sup>①②</sup>	7.4 ± 1.1 <sup>①②</sup>	5.7 ± 0.8 <sup>①②</sup>	8.2 ± 0.5 <sup>①②</sup>
慢性应激 3 组	7.6 ± 1.1 <sup>①②③</sup>	8.2 ± 0.9 <sup>①②③</sup>	5.2 ± 0.3 <sup>①②③</sup>	7.5 ± 1.1 <sup>①②③</sup>
F 值	27.3	29.9	25.3	17.3
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,<sup>①</sup>P < 0.05;与慢性应激 1 组比较,<sup>②</sup>P < 0.05;与慢性应激 2 组比较,<sup>③</sup>P < 0.05。

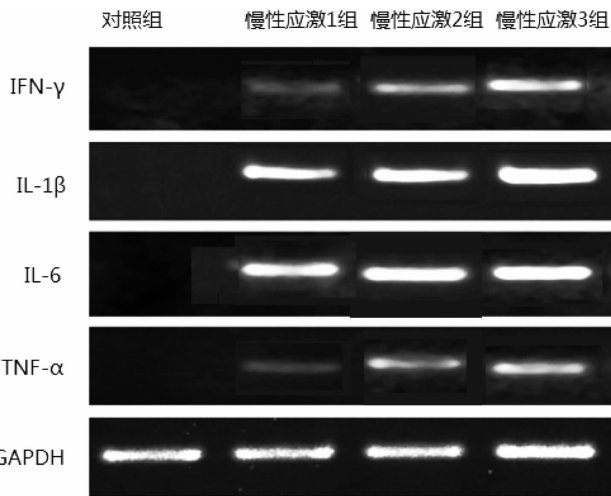


图 1 慢性应激大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  PCR 扩增结果

球菌定量在各应激组大鼠均显著高于对照组 (P 均 < 0.05), 乳杆菌和双歧杆菌定量在各应激组大鼠均显著低于对照组 (P 均 < 0.05), 各应激组之间两两比较也均有统计学差异 (P 均 < 0.05)。见表 4。

### 3 讨论

慢性应激打破了原本存在的促炎反应和抗炎反应平衡, 使机体处于免疫抑制状态, 表现在促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6<sup>[4]</sup>、TNF- $\alpha$  和血小板活化因子等增高。一般认为, 应激导致的感染或创伤可导致上述促炎因子的释放, 用以清除感染原或保护损伤组织; 慢性应激诱导炎症细胞因子<sup>[5]</sup>, 可维持过度的促炎反应, 导致全身的炎症反应, 其中, TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  可直接激活炎症细胞, 启动级联反应, 促进如 IL-6 和血小板活化因子等分泌, 作用在血管内皮细胞, 还可促进白细胞在炎性部位聚集, 激活中性粒细胞参与炎症, 诱导细胞凋亡, 引起微循环障碍, 实验动物表现为兴趣和活动降低, 食欲减低及性驱动力减弱, 严重者可致休克或死亡<sup>[6-8]</sup>。彭云丽<sup>[9]</sup>、曹莉莎<sup>[10]</sup> 研究认为慢性应激所引发的促炎因子水平的增高还可表现为不同程度的抑郁, 给予抗抑郁药有助于改善慢性应激的临床症状, 本课题虽然未纳入抑郁指标检测, 但实验大鼠显示精神萎靡和对外界刺激反应迟钝, 从行为学方面可能也表达了类似抑郁的情绪。

INF- $\gamma$  是重要的效应性细胞因子, 由 T 细胞和 NK 细胞产生, 可增强巨噬细胞和中性粒细胞的抗微生物活性, 慢性应激大鼠体内 INF- $\gamma$  水平增高也提示 T 细胞参与炎症过程<sup>[11]</sup>。虽然机体为防止炎症反应, 免疫系统可释放 IL-10 和 IL-4 等炎症细胞因子实

活动减少、毛发无光泽、精神萎靡和对外界刺激反应迟钝, 大鼠上述症状、体征随应激时间的延长而明显, 即按正常组、慢性应激 1、2、3 组之序, 症状、体征依次加重。

2.2 大鼠血清促炎细胞因子 mRNA 相对表达量的变化 大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  mRNA 相对表达量, 随应激程度的递增 (正常组 → 慢性应激 1 组 → 2 组 → 3 组) 而递升 (P 均 < 0.01), 即 4 种细胞因子 mRNA 相对表达量在各应激组大鼠均显著高于对照组 (P 均 < 0.05), 各应激组之间两两比较也均有统计学差异 (P 均 < 0.05)。见表 3 和图 1。

2.3 肠道菌群培养结果分析 随应激程度的递增 (正常组 → 慢性应激 1 组 → 2 组 → 3 组), 大鼠盲肠的肠杆菌和肠球菌定量递升 (P 均 < 0.01), 乳杆菌和双歧杆菌定量则递降 (P 均 < 0.01), 即肠杆菌和肠

施代偿性抗炎,适度抗炎可达到保护机体作用,但持续性抗炎(血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  持续性低水平)可抑制免疫,机体防御反应持续下调,反馈性地促进感染,影响预后<sup>[12-13]</sup>。

各种肠道细菌的数量以及群间的相互作用构成了肠道的微生态,与人体健康息息相关。本课题采用三种刺激方式交替式地制备了慢性应激大鼠模型,结果显示慢性应激大鼠的肠道菌群平衡破坏,肠道微生态失调,表现在肠球菌与肠杆菌的数量明显增加,双歧杆菌与乳杆菌的数量降低,提示三种慢性刺激影响了大鼠的消化道功能,如头低位束缚,体液向上半身转移,血流速度及血流量改变,消化道运动相对减少,影响消化液分泌,而消化液分泌可控制食糜的构成,影响肠道内容物的性状,直接或间接影响肠道微生态;研究显示肠蠕动对细菌生长具有调控作用,当头低位束缚时,肠蠕动降低,食物在结肠的滞留时间延长,肠内腐败菌增殖增加,对肠道益生菌也产生了不利影响,导致肠道微生态失调,这一点也印证了运用益生菌可减轻大鼠面对急性心理应激时的过度反应<sup>[14-16]</sup>。噪声与强迫游泳刺激,表现在神经内分泌的变化,当刺激长期存在时,神经内分泌系统功能可进入衰竭期,促肾上腺皮质激素释放激素升高,垂体促肾上腺皮质激素降低,降低机体应激反应,影响消化功能<sup>[17]</sup>。

综上所述,慢性应激大鼠可表现为外周血促炎细胞因子高水平,肠道微生态失衡,变化程度与应激程度相关,降低促炎细胞因子水平和/或改善肠道微生态状态可能有利于改善慢性应激状态。

## 参考文献

[1] Tsigos C, Chrousos GP. Chronic stress at work and the metabolic syndrome: prospective study [J]. *BMJ*, 2006, 332(7540): 521 - 525.  
 [2] 邓晓丰. 不同电针对慢性应激大鼠海马和血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.

[3] 刘伟志, 依宇琴, 王伟, 等. 长期慢性应激人员睡眠质量和人格特征调查 [J]. *第二军医大学学报*, 2013, 34(12): 1345 - 1349.  
 [4] Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, et al. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(15): 9090 - 9095.  
 [5] Sahin C, Albayrak O, Demirel GY, et al. P. 4. e. 001 Sub-chronic stress not only induces pro-inflammatory cytokines but also activates NLRP3 inflammasome in rats [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24: S618 - S619.  
 [6] 郭纯, 蔡光先, 刘柏炎, 等. 百事乐胶囊对慢性应激抑郁模型小鼠血清 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2012, 32(11): 24 - 26.  
 [7] 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.  
 [8] 尚立芝, 谢文英, 张良芝, 等. 爱罗咳嗽宁对 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.  
 [9] 彭云丽. 慢性应激诱发抑郁行为的炎性机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.  
 [10] 曹莉莎. 非甾体抗炎药尼美舒利对 CUMS 大鼠抑郁行为的影响 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2014.  
 [11] 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.  
 [12] 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.  
 [13] 邱小嫒. 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.  
 [14] 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.  
 [15] 马良. 黄酒对慢性应激大鼠肠道微生物的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(5): 553 - 555.  
 [16] 房财富. 肠激安胶囊对 IBS-D 模型大鼠“脑肠轴异常”调控作用的分子机制及相关差异蛋白的分析 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.  
 [17] 冀建伟. 双歧杆菌对应激大鼠肠道菌群及促肾上腺皮质激素释放激素的影响 [D]. 郑州: 郑州大学, 2010.

收稿日期: 2016-05-07 修回日期: 2016-05-30 编辑: 王国品