



## 论文

# 高血氨大鼠服用乳酸菌后焦虑降低和认知功能改善

罗佳<sup>①②</sup>, 王涛<sup>①</sup>, 梁姗<sup>①②</sup>, 胡旭<sup>①</sup>, 李薇<sup>①②</sup>, 金锋<sup>①\*</sup>

① 中国科学院心理研究所心理健康重点实验室, 北京 100101;

② 中国科学院大学, 北京 100049

\* 联系人, E-mail: jinfeng@psych.ac.cn

收稿日期: 2013-08-26; 接受日期: 2013-09-25

日本 NSBJ 乳酸菌研究特别寄付金资助

**摘要** 相关证据表明, 高血氨(HA)引发的神经炎和五羟色胺(5-HT)系统异常可能是导致肝性脑病(HE)认知功能下降和焦虑症状的原因. 服用益生菌可能是治疗 HE 神经精神症状的有效措施, 因为益生菌在维护免疫系统平衡和调节 5-HT 系统活动中发挥了重要的作用. 检验了益生菌瑞士乳杆菌 NS8 改善 HA 大鼠认知功能下降和焦虑行为的有效性. 通过连续 4 周的腹腔注射醋酸铵造成 Sprague-Dawley 大鼠的高血氨. 然后让 HA 大鼠每日饮用添加了瑞士乳杆菌 NS8( $10^9$  CFU/mL)的饮水. Morris 水迷宫测试大鼠的认知功能, 高架十字测试大鼠的焦虑行为. 脑区神经炎的程度以炎症标记物诱导型一氧化氮合酶、前列腺素 E2 和白介素 1 $\beta$  的水平表示. 5-HT 系统的活动以 5-HT、5-HIAA(5-HT 的代谢物)以及色氨酸(5-HT 的前体物质)的水平表示. 益生菌处理显著地降低了 HA 大鼠的神经炎程度, 减少了 5-HT 系统的活动, 改善了认知功能和焦虑行为. 这些结果说明, 服用益生菌瑞士乳杆菌 NS8 是治疗 HA 大鼠认知功能下降和焦虑的有效方法.

**关键词**  
高血氨  
益生菌  
认知  
焦虑  
神经炎  
五羟色胺

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)是一种常发生于肝硬化后期的神经精神性综合征, 主要症状包括认知功能下降和情绪异常等<sup>[1,2]</sup>. 高血氨(hyperammonemia, HA)被认为是引发 HE 神经精神症状的主要原因, 其作用机制在动物和临床的研究中有所报道<sup>[3-5]</sup>. 大量的证据表明, HA 引发的神经炎可能是导致认知功能下降的直接原因<sup>[6,7]</sup>, 而 HE 患者中常见的一种情绪症状——焦虑<sup>[8]</sup>, 则可能和高血氨引发的五羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)代谢活动的异常有关<sup>[9-12]</sup>. 此外, 将色氨酸(tryptophan, TRP)代谢为犬尿氨酸(L-kynurenine, KYN)的犬尿氨酸代

谢途径可能也在 HA 引发的焦虑症中发挥了作用, 因为色氨酸是 5-HT 合成的前体物质<sup>[13-15]</sup>.

HA 的动物模型有助于阐明 HE 的发病机制和寻找合适的治疗措施<sup>[16]</sup>. HA 的模型动物主要有大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠(*Mus musculus*), 它们主要用于研究 HA 对脑功能的直接影响. 其中, 一种花费低、操作容易且能够很好模拟 HA 神经精神症状的动物模型是腹腔注射(intraperitoneal injection, i.p.)醋酸铵造成的 HA 大鼠<sup>[17-19]</sup>.

治疗 HE 的常规临床疗法主要以降低血氨为目的, 包括服用抗生素和非吸收类的糖类如乳果糖<sup>[20,21]</sup>.

引用格式: 罗佳, 王涛, 梁姗, 等. 高血氨大鼠服用乳酸菌后焦虑降低和认知功能改善. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 208-217

英文版见: Luo J, Wang T, Liang S, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat. *Sci China Life Sci*, 2014, doi: 10.1007/s11427-014-4615-4

然而, 由于副作用、毒性和依从性差等缺点, 这些疗法并非理想的 HE 疗法<sup>[22]</sup>. 益生菌(如乳酸菌)是对宿主(人类和动物)有益的活性微生物, 它们维护肠道菌群平衡和促进宿主身心健康. 益生菌可能是治疗 HE 神经精神症状的潜在理想制剂, 因为其具有抗炎功能<sup>[23,24]</sup>和调节 5-HT 系统活动的的能力<sup>[25]</sup>. 事实上, 已有动物和临床的研究报道了益生菌在改善认知能力<sup>[26]</sup>以及降低焦虑和抑郁症状中所发挥的有益作用<sup>[25,27-29]</sup>. 虽然如此, 到目前为止还不是十分清楚定植于肠道的益生菌究竟是如何对脑的活动和功能产生影响的.

因此, 本研究旨在评估益生菌瑞士乳杆菌 NS8 (*Lactobacillus helveticus* strain NS8)改善 HA 大鼠认知功能和焦虑行为的有效性. 已有研究报道, 瑞士乳杆菌具有抗炎功能, 并能够改善鼠类的脑功能和行为<sup>[30,31]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

实验使用的是限菌(specific pathogen free, SPF)级的雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(180~200 g)(维通利华, 北京). 所有大鼠单只生活在金属笼内, 放置于温度(20±2)°C, 相对湿度 50%~55%, 12 h/12 h 小时明暗周期的动物房内饲养. 大鼠自由饮用新鲜的无菌水和食用鼠类饲料. 实验包括 3 组(每组 6 只大鼠): (i) 无菌生理盐水腹腔注射、饮用无菌水的对照组(control group); (ii) 饮用无菌水的高血氨组(HA group); (iii) 高血氨大鼠服用乳酸菌组(HA+NS8 group). 实验流程通过了中国科学院心理研究所动物伦理委员会的审核.

### 1.2 高血氨大鼠模型

高血氨(HA)造模的具体做法是醋酸铵(Sigma-

Aldrich, 美国)溶于无菌生理盐水, 以 2.5 mmol/kg 体重的浓度给大鼠腹腔注射(i.p.), 每周 3 次, 隔天 1 次, 连续 4 周<sup>[19,32]</sup>.

### 1.3 瑞士乳杆菌 NS8 及其培养条件

瑞士乳杆菌 NS8(GenBank 登录号: JQ-013296.1)是由本实验室从内蒙古草原自然发酵的酸奶中分离得到. 菌种于-80 °C 保存在 DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS)液体培养基(Biokar Diagnostics, 法国)中. 使用前活化 2 次, 每次在 MRS 中 37°C 培养 18 h. 活化完成后, 离心 2 次(1500×g, 5 min), 去除上清液. 将收集的菌体以 10<sup>9</sup> CFU/mL 的浓度重悬于无菌水中<sup>[33]</sup>. HA 大鼠服用含有瑞士乳杆菌的饮水 2 周. 为了保持水中乳酸菌的高活力, 含有乳酸菌的饮水每天更换. 大鼠服用乳酸菌的量表示为它们饮用乳酸菌水的量.

### 1.4 实验流程

如图 1 所示, 适应 2 周后(1~2 周), 开始为期 4 周(3~6 周)的醋酸铵(HA 造模)或腹腔无菌生理盐水注射(对照处理). 随后, HA 大鼠服用乳酸菌水或无菌水 2 周, 对照大鼠饮用无菌水(7~8 周). 在第 9 周, 高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)测试大鼠的焦虑行为, Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)评估大鼠的学习和认知能力. 在服用乳酸菌和行为测试期间(7~9 周), 为了防止 HA 的自发恢复, 大鼠继续腹腔注射醋酸铵或无菌生理盐水. 在行为测试期间, 大鼠继续饮用乳酸菌水或是无菌饮用水.

HA 造模后(第 6 周), 采取大鼠尾静脉的血液样本(20 μL)用以测定血氨浓度. 乳酸菌处理后(第 8 周), 记录各组大鼠的日饮水量. 行为测试后的 24 h 内, 处死所有大鼠, 采取躯干血液样本和脑组织.

### 1.5 高架十字迷宫

高架十字迷宫<sup>[34]</sup>被广泛用于测定大鼠的焦虑行

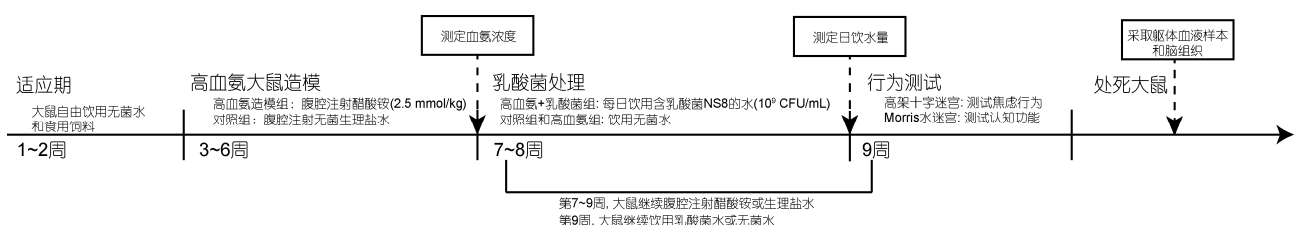


图 1 实验的流程图

为。进入开臂的次数和在开臂花费的时间是评估焦虑行为的指标, 表示为在测试的 5 min 内占进入开臂的总次数和在开臂花费总时间的百分比<sup>[34]</sup>。高架十字是由 2 个相对的开臂(10 cm 宽, 50 cm 长)和闭臂(10 cm 宽, 50 cm 长, 两侧和末端为 30 cm 高的墙)构成的十字结构、以及开臂和闭臂交叉形成一个中心区域(10×10 cm)组成, 离地面 50 cm。高架十字的材料是不透明的黑色聚丙烯。

大鼠被逐个面向开臂放在中心区域, 让其自由探索 5 min。大鼠 5 min 内的活动被置于高架十字正上方的摄像头所记录, 并用 ANY-Maze(Stoelting, 美国)视频跟踪系统进行分析, 计算大鼠进入开臂的次数和开臂花费时间的百分比。

### 1.6 Morris 水迷宫

Morris 水迷宫<sup>[35]</sup>是一个黑色不透明的圆形池(半径 140 cm, 深 55 cm), 里面装有水(20±1℃, 深 25 cm)。室内光照恒定, 并保证无光线反射在水池内。水面被 ANY-Maze software(Stoelting, 美国)划分为东北、东南、西北和西南 4 个象限。水迷宫周围设有不同图案形状的模式, 作为方向位置的标记物。实验前 1 天先将大鼠放入水池中(不放平台)自由游泳 2 min, 使其熟悉水迷宫环境。实验一共持续 6 天。

前 4 天是定位航行实验, 在西南象限中央放置平台(平台无色透明, 直径 11 cm, 没于水下 1.5 cm, 与圆心和池壁等距)。每只大鼠每天测试 4 次, 每天分上、下午 2 个时段, 每段训练 2 次。每次测试中将大鼠面向池壁轻轻放入水中, 分别从不同的入水点入水(东、南、西和北), 每次训练中各组大鼠入水点相同。记录大鼠在 2 min 内寻找到平台的时间(逃避潜伏期)。大鼠在水中游泳一段时间后爬上平台, 并在平台上停留时间超过 30 s, 则认为大鼠找到平台, 立即将大鼠从平台上移走, 软件系统将记录大鼠在水中游泳的时间。如果大鼠在 120 s 内未找到平台, 则将其引至平台, 并在平台上停留 30 s, 潜伏期记为 120 s。隐匿平台逃避潜伏期反映动物获得经验的能力, 即学习能力<sup>[35]</sup>。在整个实验中保持操作者位置及周围环境的相对稳定。第 5 天进行空间探索实验, 撤除平台, 然后在东北方向(距离隐藏平台最远的位置)将大鼠面向池壁放入水中。所有大鼠必须为同一入水点, 观察并记录 120 s 内动物在原平台象限搜索时间占总时间的百分比。空间探索实验只进行 1 次, 反

映动物保持经验的能力, 即记忆能力。第 6 天进行可视平台实验, 排除实验处理因素、动物实验感觉、视觉、知觉及运动功能的差异对空间学习记忆的影响。平台升至水面上 2 cm, 置于区别隐藏平台的不同位置(东南), 记录大鼠的逃避潜伏期及游泳速度。

### 1.7 检测血氨浓度

血氨浓度用便携式血氨测定仪(Blood Ammonia Checker AA-4120, ARKRAY, 日本)进行检测, 检测范围是 10~400 μg/dL。

### 1.8 测定神经炎的程度

为了测定神经炎的程度, 本研究分离出前额叶、海马和小脑, 并测定其中的炎症标记物的水平, 包括诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)和白介素 1beta(interleukin-1β, IL-1β)。选择这几个脑区是因为它们参与了认知和情绪活动的调控<sup>[36,37]</sup>。按照之前 Desbonnet 等人<sup>[25]</sup>提出的方法对各脑区进行分离和匀浆。具体方法是: 在冰上迅速分离出的各脑区, 称重, 液氮速冻, 然后转到-80℃冻存。分析时, 将各脑区放入含有蛋白酶抑制剂(AMRESCO, 美国)的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L)中匀浆, 离心(3000×g, 10 min, 4℃)。用酶联免疫试剂盒(RapidBio Lab, 美国)按照说明书的步骤, 测定脑上清液的 iNOS, PGE2 和 IL-1β 的浓度。

### 1.9 测定脑区 5-HT 的代谢活动

用酶联免疫试剂盒(RapidBio Lab, 美国)按照说明书的步骤, 测定前额叶、海马和小脑上清液中五羟色胺(5-HT)及其代谢物五羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA)的浓度。

### 1.10 测定血浆中色氨酸的代谢途径

躯干血收集到事先标记的 EDTA-抗凝管中, 然后离心(1500×g, 10 min, 4℃)取上清血浆, 冻存于-80℃。

血浆中色氨酸(Trp), 及其代谢物犬尿氨酸(Kyn)和犬喹啉酸(kynurenic acid, KA)的浓度用 ELISA 试剂盒(RapidBio Lab, 美国)进行测定。

### 1.11 统计分析

结果均表示为  $\bar{x} \pm SE$ , 使用 SPSS 统计软件 17.0(SPSS, 美国)对数据进行分析。除了 Morris 水迷

宫前4天学习能力的结果外,其他数据统计均采用单向方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA).采用双向方差分析(two-way ANOVA)来检测 Morris 水迷宫的学习天数和各组处理以及它们的交互效应对大鼠学习能力的影响.方差齐性检验采用 Levene 测试.组间差异的事后分析(post hoc analysis)采用 Tukey HSD 检验.  $P < 0.05$  被认为达到统计差异显著.

## 2 结果

### 2.1 各组的每日饮水量没有显著差异

服用乳酸菌 2 周后测定的每日饮水量的结果表明,各组大鼠的饮水量没有显著差异,分别是对照组:  $(41.3 \pm 1.7)$  mL, HA 组:  $(42.3 \pm 3.4)$  mL, HA+NS 组:  $(48.3 \pm 4.1)$  mL.

### 2.2 血氨浓度

HA 造模后,HA 组和 HA+NS8 组大鼠的血氨浓度分别达到  $(130.8 \pm 8.9)$   $\mu\text{g/dL}$  和  $(147.8 \pm 12.5)$   $\mu\text{g/dL}$ ,显著 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.01$ )高于对照组  $(28.2 \pm 3.4)$   $\mu\text{g/dL}$  的血氨浓度.

### 2.3 益生菌增加了 HA 大鼠进入高架十字开臂的次数百分比

和对照组相比,HA 大鼠在开臂花费时间  $((5.3 \pm 2.1)\% \text{ vs. } (30.2 \pm 4.5)\%, P < 0.05)$ 和进入开臂次数的百分比  $((12.3 \pm 4.5)\% \text{ vs. } (43.4 \pm 5.4)\%, P < 0.05)$ 显著地减少了(图 2A 和 B).HA 大鼠服用乳酸菌后,和 HA 大鼠相比,进入开臂次数的百分比显著地 ( $P < 0.05$ )增

加到了  $(39.7 \pm 2.1)\%$ (图 2B),而开臂所花时间的百分比没有显著改变.

### 2.4 益生菌改善了 HA 大鼠在 Morris 水迷宫测试中的学习和记忆能力

在 4 天的定位航行实验中,各组大鼠找到隐藏平台的逃避潜伏期具有显著差异 ( $P < 0.01$ )(图 3).虽然各组在第 1 天没有表现出差异,但从第 2~4 天,HA 大鼠找到隐藏平台的逃避潜伏期和对照组相比显著地增加了(第 2 天:  $(110.1 \pm 5.9)$  s vs.  $(53.2 \pm 5.7)$  s,  $P < 0.01$ ; 第 3 天:  $(96.5 \pm 10.2)$  s vs.  $(14.2 \pm 2.3)$  s,  $P < 0.01$ ; 第 4 天:  $(109.1 \pm 7.8)$  s vs.  $(10.3 \pm 1.3)$  s,  $P < 0.01$ )(图 3).HA 大鼠服用乳酸菌后和 HA 大鼠相比,逃避潜伏期显著地 ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ )减少了(第 2 天:  $(45.9 \pm 4.4)$  s, 第 3 天:  $(11.3 \pm 1.5)$  s, 第 4 天:  $(5.7 \pm 0.4)$  s),说明乳酸菌改善了 HA 大鼠的学习能力(图 3).此外,学习天数和不同处理的交互效应也达到了显著水平 ( $P < 0.01$ ).

撤去隐藏平台后,大鼠在原平台所在象限的游泳时间的百分比代表其记忆能力.HA 大鼠相对于对照组在目的象限的游泳时间的百分比明显减少  $((22.7 \pm 0.7)\% \text{ vs. } (32.4 \pm 0.8)\%, P < 0.01)$ (表 1),而乳酸菌显著 ( $P < 0.01$ )增加了 HA 大鼠在目的象限的游泳时间百分比  $((35.5 \pm 1.2)\%)$ (表 1).在可视平台测试中,各组大鼠找到可视平台的逃避潜伏期和游泳速度均没有差异(表 1),说明大鼠学习和记忆能力的差异不是由不同的游泳能力造成的.

### 2.5 益生菌降低了 HA 大鼠相关脑区 PGE2 和 IL-1 $\beta$ 的水平

HA 大鼠和对照组相比,小脑  $((25.5 \pm 1.5)$  U/g vs.

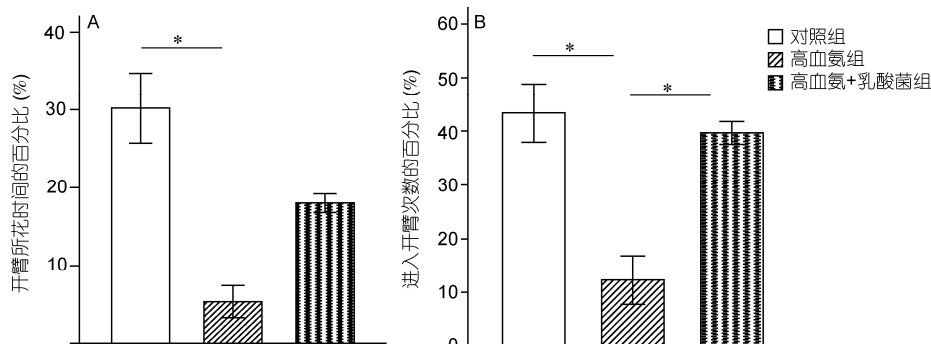


图 2 益生菌改善了 HA 大鼠的焦虑行为

A: 大鼠在高架十字开臂花费时间的百分比; B: 大鼠进入高架十字开臂次数的百分比. 数据表示为  $\bar{x} \pm \text{SE}$ . \*:  $P < 0.05$

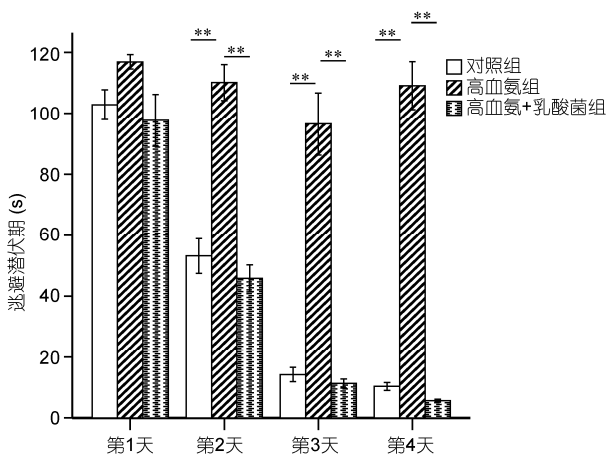


图 3 益生菌改善 HA 大鼠在 Morris 水迷宫测试中的学习能力

训练第 1~4 天找到隐藏平台的逃避潜伏期是大鼠学习能力的指标。数据表示为  $\bar{x} \pm SE$ . \*\*:  $P < 0.01$

(19.5±1.0) U/g,  $P < 0.01$ ), 而不是海马和前额叶的 iNOS 浓度显著地增加了(图 4A). 乳酸菌处理对各脑区 iNOS 的浓度没有影响.

HA 大鼠和对照相比, 小脑((2204.0±36.5) pg/g vs. (1787.0±59.5) pg/g,  $P < 0.01$ ) 和 海 马 ((2282.0±83.0) pg/g vs. (1901.0±95.0) pg/g,  $P < 0.05$ ) 而 不是 前 额 叶 的 PGE2 浓度显著地升高(图 4B). 服用乳酸菌可以显著地使 HA 大鼠小脑( $P < 0.01$ )的 PGE2 水平降低到(1560.5±162.5) pg/g, 海马( $P < 0.01$ )的 PGE2 水平降低到(1688.0±44.5) pg/g(图 4B).

HA 大鼠和对照组相比, 小脑((175±8.0) pg/g vs. (119.0±4.5) pg/g,  $P < 0.01$ )、海马((183.5±10.0) pg/g vs (134.0±9.0) pg/g,  $P < 0.01$ )和前额叶((187.5±1.5) pg/g vs. (107.0±8.5) pg/g,  $P < 0.01$ )的 IL-1 $\beta$  浓度显著增加了(图 4C), 而服用乳酸菌可以显著地( $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ )使得升高的 IL-1 $\beta$  浓度分别降低到(109.5±7.5)

pg/g(小脑)、(123.0±10.0) pg/g(海马)和(126.0±10.0) pg/g(前额叶)(图 4C).

## 2.6 益生菌降低了 HA 大鼠 5-HT, 而不是 5-HIAA 水平

HA 相对于对照组, 不影响大鼠小脑、海马和前额叶的 5-HT 水平(图 5A), 但显著提高了这 3 个脑区 5-HIAA 的浓度(小脑: (77.5±4.0) pg/g vs. (50.0±4.0) pg/g,  $P < 0.01$ ; 海马: (78.5±5.0) pg/g vs. (56.0±5.5) pg/g,  $P < 0.05$ ; 前额叶: (75.0±4.0) pg/g vs. (56.0±4.5) pg/g,  $P < 0.05$ )(图 5B). 服用乳酸菌 HA 大鼠和 HA 大鼠相比, 3 个脑区的 5-HIAA 浓度没有显著变化(图 5B), 但 5-HT 在小脑( $P < 0.01$ )和海马( $P < 0.01$ )的浓度显著地降低了(图 5A).

## 2.7 益生菌对 HA 大鼠犬尿氨酸代谢途径的影响

HA 相对于对照组, 显著增加了血浆中色氨酸的浓度((30280±1089) pmol/mL vs. (23590±1260) pmol/mL,  $P < 0.01$ ), 减少了犬尿氨酸/色氨酸((0.0121±0.00061) vs. (0.0253±0.001),  $P < 0.01$ )和提高了犬喹啉酸/犬尿氨酸((1.4±0.09) vs. (0.8±0.1),  $P < 0.01$ )的比值(图 6A 和 B). 而服用乳酸菌的 HA 大鼠和 HA 大鼠相比, 血浆中的犬尿氨酸/色氨酸(0.022±0.001)和犬喹啉酸/犬尿氨酸(0.9±0.06)的比值则分别显著地提高( $P < 0.01$ )和降低了( $P < 0.05$ )(图 6B).

## 3 讨论

本研究发现, 慢性 HA 将导致大鼠出现认知功能下降和焦虑行为, 支持 HA 是引发 HE 神经精神症状原因的这一观点. 此外, HA 大鼠服用益生菌后认知功能和焦虑行为均得到显著改善, 说明瑞士乳杆菌 NS8 可能是治疗由 HA 引发的神经精神症状的有效制剂.

表 1 各组大鼠在 Morris 水迷宫中的记忆能力和游泳能力<sup>a)</sup>

	在原平台区域游泳时间的百分比	找到可见平台的逃避潜伏期(s)	游泳速度(cm/s)
对照组	32.4±0.8	5.2±0.2	10.0±0.4
高血氨组	22.7±0.7**	5.2±0.6	10.1±0.8
高血氨+乳酸菌组	35.5±1.2##	4.9±0.3	10.4±0.8
方差分析	$P < 0.01$	$P = 0.600$	$P = 0.962$

a) 在原平台所在象限的游泳时间的百分比(第 5 天)表示大鼠的记忆能力, 找到可视平台的潜伏期和游泳的速度(第 6 天)表示大鼠的游泳能力. 数值表示为  $\bar{x} \pm SE$ . \*: 和对照组的差异达到显著水平; #: 和 HA 组的差异达到显著水平. \*\*:  $P < 0.01$ ; ##:  $P < 0.01$

### 3.1 乳酸菌改善认知功能和缓解神经炎

动物研究的结果使得 HA 损害认知功能的机理逐渐明确. 研究发现, 门腔静脉分流(portocaval

shunts, PCS)的大鼠在 Y 迷宫测试中的认知功能受损, 这类大鼠同时具有 HA 和神经炎<sup>[36]</sup>. 给予 PCS 大鼠布洛芬(一种抗炎药物)治疗后, 虽然 HA 没有明显改变,

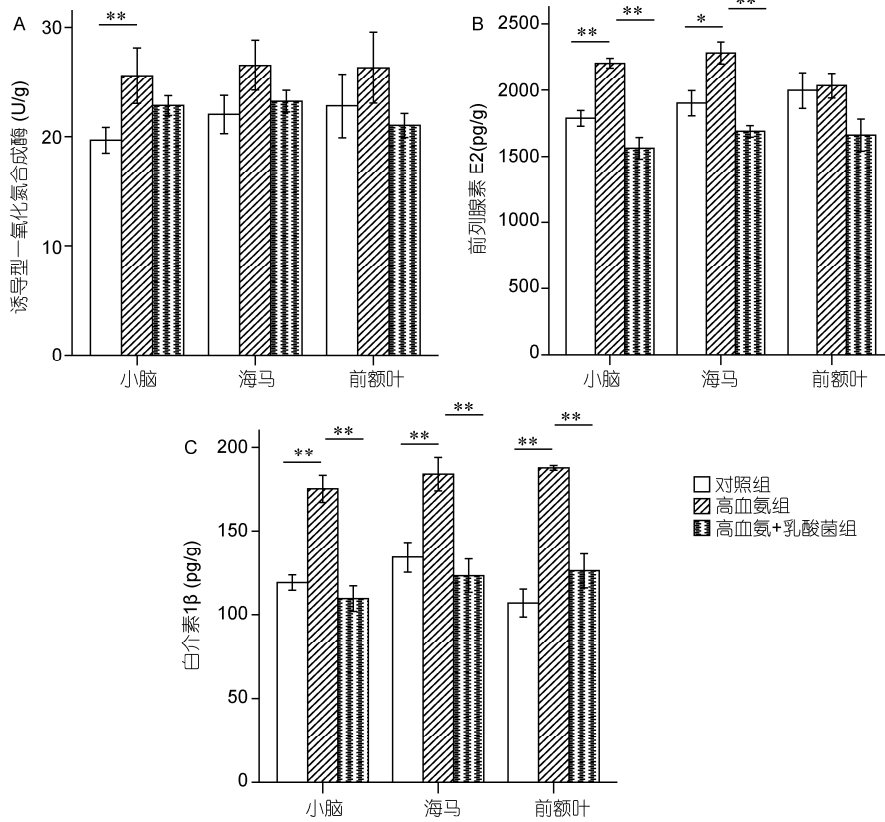


图4 益生菌降低了 HA 大鼠的神经炎

神经炎以炎症标记物诱导型一氧化氮合成酶(A)、前列腺素 E2(B)和白介素 1β(C)在小脑、海马和前额叶的浓度. 数据表示为  $\bar{x} \pm SE$ . \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$

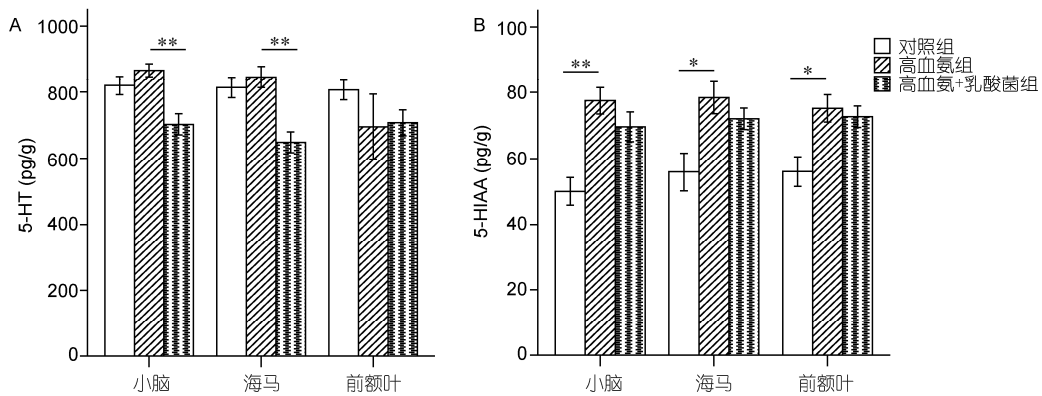


图5 益生菌使得 HA 大鼠增强的 5-HT 代谢活动恢复正常

5-HT(A)及其代谢物 5-HIAA(B)在小脑、海马和前额叶的浓度. 数据表示为  $\bar{x} \pm SE$ . \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$

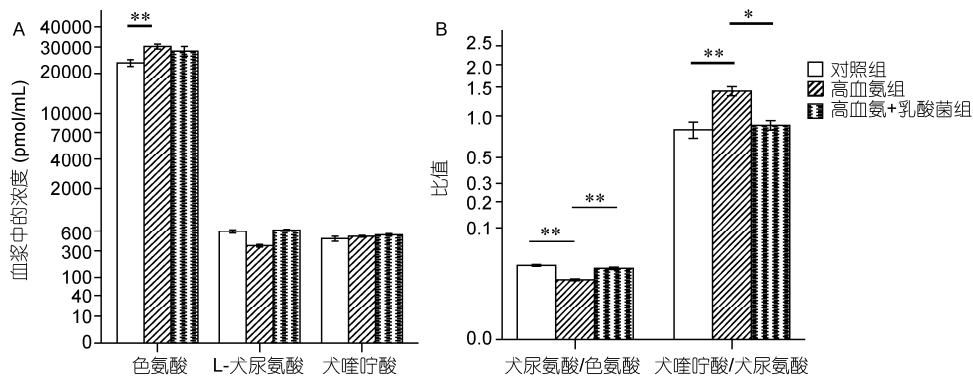


图6 服用益生菌使得HA大鼠异常的犬尿氨酸代谢途径恢复正常

A: 血浆中色氨酸、犬尿氨酸和犬唑啉酸的浓度; B: 血浆中犬尿氨酸/色氨酸和犬唑啉酸/犬尿氨酸的比值. 数据表示为  $\bar{x} \pm SE$ . \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$

神经炎显著降低且大鼠在 Y 迷宫中的学习能力得到显著改善<sup>[38]</sup>. 在另一个 HA 大鼠模型中, 研究者发现 HA 对认知功能的危害是由神经炎介导的<sup>[1]</sup>. 这些结果说明, HA 引发的神经炎是导致认知功能下降的原因. 本研究的结果支持这一观点, HA 导致大鼠的小脑、海马和前额叶发生神经炎, 并损害了大鼠的学习和记忆能力. 因此, 乳酸菌降低神经炎并改善认知能力的结果说明, 服用乳酸菌是改善 HA 大鼠认知功能的有效疗法.

HA 导致神经炎的一个主要机制是激活了中枢神经系统的小胶质细胞, 因为小胶质细胞的激活会引发促炎活性物质的产生和释放<sup>[1]</sup>. 有证据表明, 转录因子 NF- $\kappa$ B 在小胶质细胞的激活中扮演了重要的角色, 因为抑制 NF- $\kappa$ B 能够防止小胶质细胞的激活<sup>[39]</sup>. 因此, 乳酸菌可能是通过抑制 NF- $\kappa$ B 进而降低了 HA 大鼠的神经炎. 支持这一推论的相关证据表明, 乳酸菌的抗炎能力和抑制 NF- $\kappa$ B 的活性密切相关<sup>[40,41]</sup>.

### 3.2 乳酸菌改善焦虑行为和恢复 5-HT 代谢的正常活动

由于 5-HT 系统异常和焦虑症的发生密切相关<sup>[42]</sup>, HA 大鼠的焦虑行为可能是由中枢 5-HT 系统的失调导致. 本研究得到的结果支持这一观点, HA 大鼠小脑、海马和前额叶的 5-HT 代谢活动显著增强, 具体表现为 5-HIAA 水平升高而 5-HT 水平没有变化. 之前的另一项研究也发现了相似的结果, PCS 的 HA 大鼠也表现出 5-HIAA 水平的升高而 5-HT 水平未发生改变, 且高剂量的醋酸铵注射能够引发中枢 5-HT 水

平短暂性的升高<sup>[9,11]</sup>.

事实上, 相关证据表明, 5-HT 系统活动的增强可能会增加焦虑的发生. Iversen<sup>[43]</sup>提出, 大脑 5-HT 浓度的升高会增强焦虑, 而降低 5-HT 水平则可以改善焦虑. 来自动物研究的结果也表明, 5-HT 转运体高表达的转基因大鼠的焦虑行为的减少和相关脑区 5-HT 水平的降低有关<sup>[44]</sup>. 因此, 乳酸菌降低脑区 5-HT 水平以及改善大鼠焦虑行为的结果说明, 瑞士乳杆菌 NS8 可能是治疗 HA 引发的焦虑症的有效措施.

### 3.3 乳酸菌恢复犬尿氨酸代谢途径的正常活动

HA 大鼠 5-HT 代谢活动的增强可能是由色氨酸水平的升高造成的, 因为中枢 5-HT 的合成依赖于其前体物质色氨酸. 研究发现, HE 病人外周色氨酸水平的升高和中枢 5-HT 系统活动的增强密切相关, 伴随着中枢色氨酸, 5-HT 和 5-HIAA 水平的升高<sup>[12,45]</sup>. 尽管乳酸菌对 HA 大鼠血浆中的色氨酸水平没有明显影响, 乳酸菌可能是通过增加了色氨酸的代谢从而降低了 5-HT 的活动, 因为乳酸菌显著增加了犬尿氨酸/色氨酸的比值.

色氨酸代谢的主要途径是犬尿氨酸途径, 色氨酸被吲哚胺-2,3-加双氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)代谢为犬尿氨酸<sup>[46]</sup>. 本研究中观察到的 HA 大鼠服用乳酸菌后犬尿氨酸/色氨酸比值的升高, 可能说明乳酸菌增强了 IDO 的活动. IDO 在多种细胞中都有表达, 并广泛参与调节免疫活动<sup>[47]</sup>. 例如, IDO 被发现具有抗炎的功能, 并在一个小鼠的结肠炎模型中表现出有益的保护作用<sup>[48]</sup>. 这些结果表明,

乳酸菌对 HA 大鼠焦虑行为的改善作用可能得益于乳酸菌的免疫调节功能, 其提高 IDO 的活性、增加色氨酸代谢、进而降低了 5-HT 系统的活动. Forsythe 等人<sup>[49]</sup>也观察到罗伊氏乳杆菌之所以可以减轻大鼠的呼吸道炎症, 是由于其增加了 IDO 的表达. 然而, 也有不一致的研究报道. 双歧杆菌和约氏乳杆菌被发现能够抑制抑郁模型大鼠的 IDO 活动<sup>[25,50]</sup>. 尽管如此, 需要强调的是在过敏性呼吸道炎症的大鼠模型中, 只有罗伊氏乳杆菌增强了 IDO 的活性而非唾液乳杆菌<sup>[49]</sup>, 说明不同的益生菌种甚至是不同的乳酸菌株可能对 IDO 产生不一样的影响. 此外, 犬尿氨酸的代谢物犬喹啉酸具有增强焦虑的作用, 因为它会

减少细胞外的谷氨酸水平<sup>[51,52]</sup>. 本研究观察到 HA 增加了犬喹啉酸/犬尿氨酸的比值, 而乳酸菌则降低了犬喹啉酸/犬尿氨酸比值, 再次为瑞士乳杆菌 NS8 的抗焦虑作用提供了证据.

总而言之, 本研究的结果表明, 瑞士乳杆菌 NS8 可以改善 HA 大鼠的认知功能下降和焦虑行为. 乳酸菌改善 HA 大鼠行为的有益作用可能源于它的免疫调节功能, 其降低了神经炎和 5-HT 的代谢水平. 因此, 乳酸菌的作用不仅局限于胃肠道, 而且能够调控脑的功能, 发挥治疗心理和精神疾病的有益作用. 对乳酸菌行为调节作用的进一步研究需要深入了解它的免疫调节功能.

## 参考文献

- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, et al. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 2010, 139: 675–684
- Brusilow S W. Hyperammonemic encephalopathy. *Medicine*, 2002, 81: 240–249
- Felipo V, Butterworth R F. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol*, 2002, 67: 259–279
- Lajtha A, Reith M E A. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers Press, 2008
- Basile A S, Jones E A. Ammonia and GABA-ergic neurotransmission: interrelated factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 1997, 25: 1303–1305
- Montoliu C, Piedrafita B, Serra M A, et al. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol*, 2009, 43: 272–279
- Gibertini M, Newton C, Friedman H, et al. Spatial learning impairment in mice infected with legionella pneumophila or administered exogenous interleukin-1 $\beta$ . *Brain Behav Immun*, 1995, 9: 113–128
- Wiltfang J, Nolte W, Weissenborn K, et al. Psychiatric aspects of portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 1998, 13: 379–389
- Erecinska M, Pastuszko A, Wilson D F, et al. Ammonia-induced release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes: differences between the effects on amines and amino acids. *J Neurochem*, 1987, 49: 1258–1265
- Murphy D L, Moya P R, Fox M A, et al. Anxiety and affective disorder comorbidity related to serotonin and other neurotransmitter systems: obsessive-compulsive disorder as an example of overlapping clinical and genetic heterogeneity. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*, 2013, 368: 20120435
- Bergqvist P B F, Hjorth S, Audet R M, et al. Ammonium acetate challenge in experimental chronic hepatic encephalopathy induces a transient increase of brain 5-HT release *in vivo*. *Eur Neuropsychopharm*, 1996, 6: 317–322
- Rössle M, Luft M, Herz R, et al. Amino acid, ammonia and neurotransmitter concentrations in hepatic encephalopathy: serial analysis in plasma and cerebrospinal fluid during treatment with an adapted amino acid solution. *Klin Wochenschr*, 1984, 62: 867–875
- Miura H, Ozaki N, Sawada M. A link between stress and depression: shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. *Stress*, 2008, 11: 198–209
- Vignau J, Costisella O, Canva V, et al. Impact of interferon alpha immunotherapy on tryptophan metabolism in patients with chronic hepatitis C. Results of a pilot studies on ten patients (in French). *Encephale*, 2009, 35: 477–483
- Laugeray A, Launay J M, Callebort J. Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. *Behav Brain Res*, 2010, 210: 84–91
- Butterworth R F, Norenberg M D, Felipo V, et al. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int*, 2009, 29: 783–788
- Lena P J, Subramanian P. Effects of melatonin on the levels of antioxidants and lipid peroxidation products in rats treated with ammonium acetate. *Pharmazie*, 2004, 59: 636–639
- Moroni F, Lombardi G, Moneti G, et al. The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *J Neurochem*, 1983, 40: 850–854



- 19 Subash S, Subramanian P. Morin a flavonoid exerts antioxidant potential in chronic hyperammonemic rats: a biochemical and histopathological study. *Mol Cell Biochem*, 2009, 327: 153–161
- 20 Bajaj J S, Sanyal A J, Bell D, et al. Predictors of the recurrence of hepatic encephalopathy in lactulose-treated patients. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010, 31: 1012–1017
- 21 Flamm S L. Rifaximin treatment for reduction of risk of overt hepatic encephalopathy recurrence. *Therap Adv Gastroenterol*, 2011, 4: 199–206
- 22 Nicaise C, Prozzi D, Viaene E, et al. Control of acute, chronic, and constitutive hyperammonemia by wild-type and genetically engineered *Lactobacillus plantarum* in rodents. *Hepatology*, 2008, 48: 1184–1192
- 23 Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73: 444S–450S
- 24 Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 2000, 289: 1352–1355
- 25 Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, et al. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res*, 2008, 43: 164–174
- 26 Gareau M G, Wine E, Rodrigues D M, et al. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*, 2011, 60: 307–317
- 27 Benton D, Williams C, Brown A. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *Eur J Clin Nutr*, 2007, 61: 355–361
- 28 Rao A V, Bested A C, Beaulne T M, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog*, 2009, 1: 6
- 29 Bravo J A, Forsythe P, Chew M V, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16050–16055
- 30 Joo H M, Kim K A, Myoung K S, et al. *Lactobacillus helveticus* HY7801 ameliorates vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting fungal growth and NF- $\kappa$ B activation. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14: 39–46
- 31 Ohland C L, Kish L, Bell H, et al. Effects of *Lactobacillus helveticus* on murine behavior are dependent on diet and genotype and correlate with alterations in the gut microbiome. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38: 1738–1747
- 32 Gokcimen A, Kocak A, Gulle K, et al. The effects of allopurinol on rat liver and spleen tissues in a chronic hyperammonemia animal model. *Saudi Med J*, 2007, 28: 1648–1653
- 33 Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 518–526
- 34 Walf A A, Frye C A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, 2007, 2: 322–328
- 35 Wolfer D P, Stagljar-Bozicevic M, Errington M L, et al. Spatial memory and learning in transgenic mice: fact or artifact? *Physiology*, 1998, 13: 118–123
- 36 Monfort P, Cauli O, Montoliu C, et al. Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: therapeutical implications. *Neurochem Int*, 2009, 55: 106–112
- 37 Reznikov L, Fadel J, Reagan L. Glutamate-mediated neuroplasticity deficits in mood disorders. In: Costa e Silva J A, Macher J P, Olié J P, eds. *Neuroplasticity*. London: Springer Healthcare, 2009. 13–26
- 38 Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, et al. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*, 2007, 46: 514–519
- 39 Khasnavis S, Jana A, Roy A, et al. Suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activation and inflammation in microglia by a physically-modified saline. *J Biol Chem*, 2012, 287: 29529–29542
- 40 Riedel C U, Foata F, Philippe D, et al. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 3729–3735
- 41 Aragon G, Graham D B, Borum M, et al. Probiotic therapy for irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Hepatol*, 2010, 6: 39–44
- 42 Laugeray A, Launay J M, Callebert J, et al. Evidence for a key role of the peripheral kynurenine pathway in the modulation of anxiety- and depression-like behaviours in mice: focus on individual differences. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 98: 161–168
- 43 Iversen S D. 5-HT and anxiety. *Neuropharmacology*, 1984, 23: 1553–1560
- 44 Jennings K A, Loder M K, Sheward W J, et al. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci*, 2006, 26: 8955–8964
- 45 Dejong C H C, van de Poll M C G, Soeters P B, et al. Aromatic amino acid metabolism during liver failure. *J Nutr*, 2007, 137: 1579S–1585S
- 46 O'Connor J C, André C, Wang Y, et al. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediate the upregulation of Indoleamine

- 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus calmette-guérin. *J Neurosci*, 2009, 29: 4200–4209
- 47 Däubener W, Schmidt S K, Heseler K, et al. Antimicrobial and immunoregulatory effector mechanisms in human endothelial cells. Indoleamine 2,3-dioxygenase versus inducible nitric oxide synthase. *Thromb Haemost*, 2009, 102: 1110–1116
- 48 Gurtner G J, Newberry R D, Schloemann S R, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology*, 2003, 125: 1762–1773
- 49 Forsythe P, Inman M D, Bienenstock J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 15: 561–569
- 50 Valladares R, Bojilova L, Potts A H, et al. *Lactobacillus johnsonii* inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase and alters tryptophan metabolite levels in BioBreeding rats. *FASEB J*, 2013, 27: 1711–1720
- 51 Wu H Q, Pereira E F, Bruno J P, et al. The astrocyte-derived  $\alpha 7$  nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *J Mol Neurosci*, 2010, 40: 204–210
- 52 Cortese B M, Mitchell T R, Galloway M P, et al. Region-specific alteration in brain glutamate: possible relationship to risk-taking behavior. *Physiol Behav*, 2010, 99: 445–450