

# 脑不对称性对 Balb/c 小鼠海马 IL-6 水平的 影响\*

罗燕玲 李康生\*\*

汕头大学医学院微生物学及免疫学教研室, 广东 汕头 515031

**摘要** 研究了 Balb/c 小鼠海马内细胞因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 含量与脑不对称的关系。实验采用伸爪取食法将小鼠区分为左利、右利和双利鼠, 分别于腹腔注射细菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 或无菌生理盐水 (Saline, NS), 2 h 后快速断头, 冰上快速分离两侧海马, 制备海马脑组织匀浆, 用 ELISA 法测定海马中 IL-6 蛋白含量。结果表明: 正常对照组中海马 IL-6 水平为右利鼠明显高于左利鼠 ( $P=0.001$ ), 左利鼠又明显高于双利鼠 ( $P=0.001$ ), 两侧海马之间无明显差别; 注射 LPS 2 h 后, 海马 IL-6 总体水平没有变化, 只在右利小鼠右侧海马 IL-6 含量明显升高 ( $P<0.05$ ), 明显高于左利 ( $P<0.001$ ) 和双利 ( $P<0.001$ ), 双利 Balb/c 小鼠两侧海马 IL-6 水平明显低于右利和左利小鼠。上述结果提示, 在正常生理状态下及 LPS 刺激后引起的海马 IL-6 水平变化均与脑不对称性有关 [动物学报 50 (5): 765 - 769, 2004]。

**关键词** 海马 IL-6 脑不对称

## Brain lateralization influence interleukin-6 levels in the hippocampus of Balb/c mice\*

LUO Yan-Ling, LI Kang-Sheng\*\*

Department of Microbiology and Immunology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, Guangdong, China

**Abstract** We studied cytokine interleukin-6 (IL-6) levels in the hippocampus of Balb/c mice with brain lateralization. Using paw preference tests, the right-pawed, left-pawed and ambidextrous mouse model was established. Two weeks after the session of paw preference testing, each mouse in the lipopolysaccharide (LPS) group was injected intraperitoneally with 5  $\mu$ g LPS dissolved in 0.5 ml saline. Each mouse in the control group was injected with 0.5 ml saline only. The mice were sacrificed by decapitation 2 h after the injection of LPS or saline. The whole left and right hippocampus were rapidly removed and separated on ice, then quickly frozen on dry ice. All samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until the time of homogenization. Each hippocampus was weighed and homogenized in 0.01 mol phosphate-buffered saline (4  $\times$  10<sup>3</sup> weight/volume). The homogenate was centrifuged (10 000 r/min, 15 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ), and the supernatant was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The IL-6 levels of tissue homogenates were measured using mouse IL-6 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits purchased from Pharmingen. In saline treated mice, there were significantly differences among the three groups: IL-6 level in hippocampus of right-pawed group was higher than that of left-pawed group ( $P=0.001$ ), and IL-6 level of left-pawed group was higher than that of ambidextrous mouse group ( $P=0.001$ ). There were no significantly differences between bilateral hippocampus. In LPS treated mice, total IL-6 level of Balb/c mice had no change, but the IL-6 level in right hippocampus of right-pawed increased significantly compared with that in right hippocampus of left-pawed ( $P<0.001$ ) and ambidextrous mice ( $P<0.001$ ). The results indicate that IL-6 levels in hippocampus of physiological condition and in bilateral hippocampus after treatment of LPS are correlated to brain lateralization [*Acta Zoologica Sinica* 50 (5): 765 - 769, 2004].

**Key words** Hippocampus, IL-6, Brain lateralization

2004-01-14 收稿, 2004-05-07 接受

\* 国家自然科学基金 (No. 30271211, No. 30371315)、中法先进研究计划 (PRA B97-03)、汕头大学研究与发展基金 (No. L00011) 资助项目 [This research was funded by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 30271211, No. 30371315), Association Franco-Chinoise pour la Recherche Scientifique and Technique (PRA B97-03), Funds for Scientific Research and Development of Shantou University (No. L00011)]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: ksli@stu.edu.cn

© 2004 动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

脑不对称是生物界多样性的表现之一 (Neveu et al., 1998a)。按用手的习惯可以把动物分为左利手者、右利手者和双利手者。手不对称是脑不对称的表现, 一般认为左利手者为右优势脑, 右利手者为左优势脑, 双利手者两侧脑无明显优势。用原位杂交检测到细胞因子白细胞介素-6 (IL-6) 在大脑皮层和海马密度最高, 说明 IL-6 在皮层和海马神经元的分化和功能中起重要作用 (Gadient and Otten, 1994)。本室前阶段工作表明大脑皮层 IL-6 与脑不对称有关 (Fu and Li, 2001; Fu et al., 2003), 那么大脑皮层下重要结构海马 IL-6 含量是否也存在左右侧不对称的现象? IL-6 总体水平及左右侧不对称的现象在左利者、右利者和双利者之间是否一致? 在生理病理情况下海马细胞因子有无变化? 为了深入研究这些问题, 我们建立了 Balb/c 小鼠脑不对称模型, 测定了正常生理状态和 LPS 刺激模拟临床革兰氏阴性菌感染机体免疫系统受到应激的状态下海马中 IL-6 含量的变化, 探讨了海马 IL-6 水平与脑不对称的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 脑不对称动物行为学检测

Balb/c 健康小鼠, 雌性, 4 周龄, 清洁级, 由上海西普尔必凯动物实验有限公司供应。每笼 5 只, 自由饮水取食, 每天保持 12 h 明暗环境。小鼠适应环境 1 周后经伸爪取食法按右利分 (Right paw entry, RPE) 给每只小鼠评分, 每只小鼠共评分 4 次, 第 1 次为训练, 不计分; 后 3 次按平均右利分计算, 将小鼠区别为左利鼠、右利鼠和双利鼠 3 组, 具体方法参见文献 (高明霞等, 2000)。伸爪取食试验及杀鼠均在上午 9:00 时进行。Balb/c 小鼠共 81 只, 用伸爪取食法区分出左利小鼠 33 只 (RPE 在 0 - 20 之间), 右利小鼠 36 只 (RPE 在 30 - 50 之间), 双利小鼠 12 只 (RPE 在 21 - 29 之间)。随机选取左、右利鼠各 12 只, 双利鼠 12 只全部用于实验。左利小鼠的 RPE 主要在 (1 - 15) 之间, 右利小鼠的 RPE 在 (35 - 50) 之间 (图 1)。行为测试 3 次一致率为 80%, 2 次一致率为 96.7%。

### 1.2 海马匀浆液的制备

脑不对称动物行为学检测 1 周后将左利鼠、右利鼠和双利鼠随机分为 LPS 组和正常对照组, LPS 组每只小鼠以 LPS 5  $\mu$ g/0.5 ml NS、正常对照组以 0.5 ml NS 腹腔注射。2 h 后快速断头, 迅速分离

出左右双侧叶海马, 加入 10 倍体积的 4 PBS 缓冲液, 充分研磨制备小鼠海马匀浆液, 10 000 g, 4 离心 15 min, 取上清 -70 保存待测。

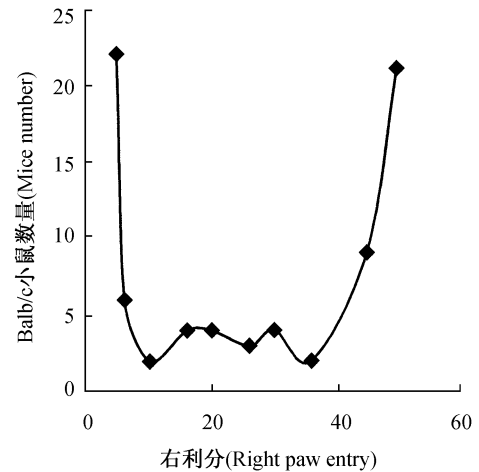


图 1 Balb/c 小鼠 RPE (Right paw entry) 分布

Fig. 1 Distribution of paw preference in the population of Balb/c female mice

Paw preference is represented as the RPE scores.

### 1.3 海马匀浆液 IL-6 的检测

用双抗体夹心 ELISA 法检测, 使用 IL-6 ELISA 试剂盒 (Pharmingen 公司), 按说明书使用: 100  $\mu$ l 第一抗体 (1:250) 包被 ELISA 测定板, 4  $^{\circ}$ C, 过夜; 洗板 3 次; 10% 胎牛血清封闭 1 h; 洗板 3 次; 100  $\mu$ l 标准样品或待测样品加入上述各孔; 振荡 1 min, 封板膜封板, 室温孵育 2 h; 用洗涤液洗板 5 次; 100  $\mu$ l 链霉素化 HRP 连接的标记第二抗体加入各孔, 室温孵育 1 h; 洗板 7 次; 100  $\mu$ l 预先混匀的 TMB 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液加入各孔。室温避光孵育 30 min; 每孔再加入 2 mol 硫酸溶液 50  $\mu$ l 终止反应; 在酶标读数仪 (Bio-Rad, 3550-UV 型) 上读取吸光度 A 值 (测定波长 A 值-参考波长 A 值): 测定波长 450 nm, 参考波长 570 nm, A 值用 SPSS 软件绘出标准曲线, 计算各样本的值。

### 1.4 统计结果

用 SPSS 软件对左右侧海马 IL-6 独立样本 *t* 检验, 各组间进行两因素方差分析, 各组内进行单因素方差分析 (ANOVA), 方差齐者应用最小显著差法 (LSD), 方差不齐者应用 Dunnett's T3 法进行检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 正常生理组小鼠海马 IL-6 含量

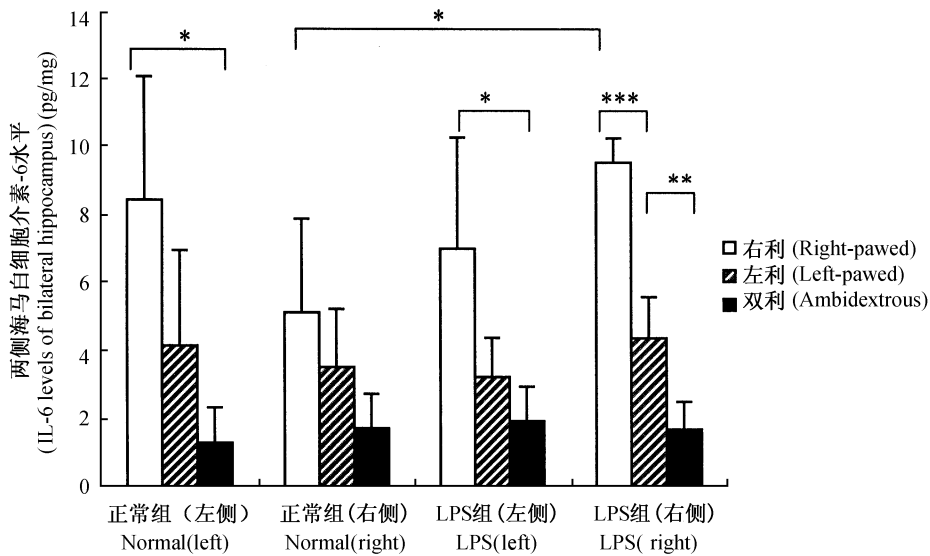


图 2 脑不对称 Balb/c 小鼠两侧海马 IL-6 蛋白水平

Fig. 2 IL-6 levels of bilateral hippocampus in brain lateral Balb/c mice

$n = 6$ . \*:  $P < 0.05$ . \*\*\*:  $P < 0.001$

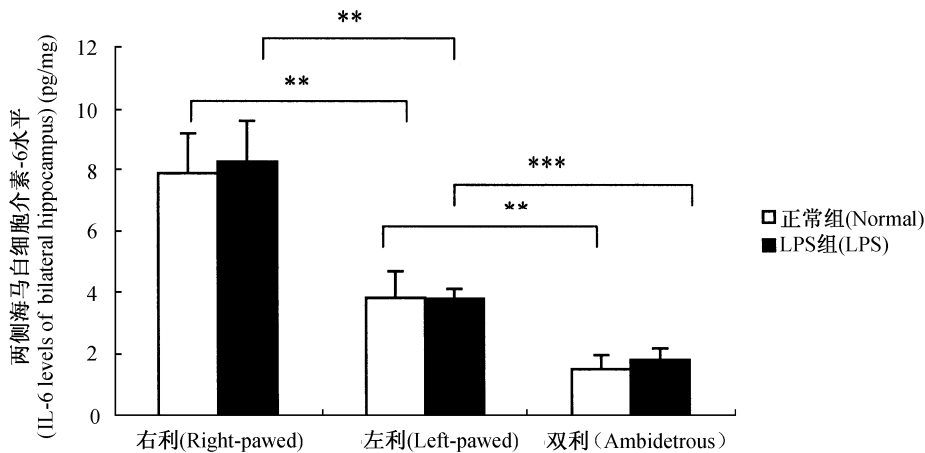


图 3 LPS 刺激前后 Balb/c 小鼠海马 IL-6 蛋白水平变化

Fig. 3 IL-6 levels of hippocampus in Balb/c mice before and after LPS injection

$n = 6$ ; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

对生理状况下 Balb/c 小鼠海马匀浆液中 IL-6 含量进行三因素方差分析显示: IL-6 水平与脑不对称有关 ( $P = 0.000$ ), 正常对照组左右两侧海马 IL-6 水平均为右利 > 左利 > 双利, 显著性检验为右利 > 双利 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。右利、左利小鼠左侧与右侧海马比较, 虽然 IL-6 水平差别无统计学意义, 但趋势均为左侧高于右侧; 而双利为右侧高于左侧 (图 2)。生理状况下海马中 IL-6 总体水平为右利 > 左利 ( $P = 0.001$ ) > 双利 ( $P = 0.001$ ) (图 3)。

## 2.2 LPS 注射后海马 IL-6 含量变化

对 LPS 刺激 2 h 后 IL-6 水平进行三因素方差

分析: 行为不对称与两侧海马无交互作用,  $F_{2,60} = 0.160$ ,  $P = 0.852$ , 脑不对称与 LPS 处理无交互作用,  $F_{2,60} = 0.935$ ,  $P = 0.398$ , 两侧海马与 LPS 处理有交互作用,  $F_{1,60} = 5.994$ ,  $P = 0.017$ 。

在行为不对称组中海马 IL-6 水平也是右利 > 左利 > 双利 ( $P < 0.05$ ), 以右侧海马变化最为明显, 右侧海马 LPS 刺激后统计学显示为: 右利 > 左利 ( $P < 0.001$ ) > 双利 ( $P < 0.001$ ) (图 2)。

LPS 刺激后右利、左利小鼠两侧海马 IL-6 水平变化趋势为左侧降低, 右侧升高, 以右利小鼠右侧海马升高最为显著 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。

LPS 刺激后右利、左利和双利小鼠海马 IL-6

总体水平为右利 > 左利 ( $P = 0.001$ ) > 双利 ( $P = 0.001$ ) (图 3)。

在不考虑脑不对称因素时, Balb/c 小鼠两侧海马 LPS 刺激前后无明显变化 (表 1)。

表 1 Balb/c 小鼠两侧海马 IL-6 蛋白水平变化

Table 1 IL-6 levels of bilateral hippocampus in Balb/c mice

	<i>n</i>	正常组 (Normal)	LPS 组 (LPS)	<i>P</i> *
左侧海马 (Left hippocampus)	18	4.627 ± 0.919	4.055 ± 0.691	0.625
右侧海马 (Right hippocampus)	18	3.459 ± 0.548	5.207 ± 0.809	0.084

\*: Balb/c 小鼠两侧海马 IL-6 在正常组和 LPS 组之间的比较。

\*: Compared between normal and LPS treated mice in bilateral hippocampus.

### 3 讨论

通过伸爪取食实验可将小鼠分为左利、右利和双利三种行为不对称动物。不同种系的小鼠有着不同的行为不对称分布模式: C57BL/6 小鼠的分布模式呈 U 型, 即大多数小鼠是左利或右利, 仅有少数是双利 (Neveu, 1996); C3H 小鼠大致呈正态分布; NZB 小鼠则有多种分布模式。我们的实验结果显示 Balb/c 小鼠行为不对称分布模式大致呈 U 型, 左利和右利鼠占了近 80%, 且极左和极右利小鼠较多, 左利鼠和右利鼠的数量大致相同, 其分布模式与 C57BL/6 较接近。这表明小鼠行为不对称的分布模式可能与其遗传背景有关, 种系不同其行为不对称分布模式亦可能不同。

脑结构和功能的不对称是普遍存在的生物学现象。狭义的脑不对称是指个体大脑左右两侧半球在解剖结构、递质分泌及功能上具有异质性。广义的脑不对称是指同一物种中不同个体的大脑在解剖结构、递质分泌及功能等方面的不同及其受大脑影响的其他系统功能的异质性。大脑功能的不对称研究起于 1861 年 Paul Broca 报道一个左侧大脑某区域损伤的病人患了失语症, 之后的研究证明左右侧大脑半球具有不同的功能分区。除了大脑皮层, 成对的神经内分泌器官如下丘脑、边缘系统和肾上腺也是以不对称的方式行使功能的 (Gerendai and Harlasz, 2001)。自从 20 世纪 80 年代 Geschwind and Galaburda (1985) 报道左利者有较高的自身免疫性疾病的发病率后, 脑不对称的概念扩展到了群体水平, 手功能不对称是脑不对称的反映, 由于神经内分泌免疫网络的存在, 研究者通过脑不对称动物模

型研究发现左利、右利和双利动物有着不同的神经内分泌及免疫学特征 (Neveu et al., 1989, 1997, 1998a)。我室前期的工作表明, 腹腔注射 LPS 后, 小鼠血浆 IL-1, IL-6, CS, TNF $\alpha$ , NO (Gao et al., 2000) 水平的变化及大脑皮质 IL-1, IL-6 含量 (Fu and Li, 2001), 小鼠单核巨噬细胞 IL-1, NO 的产生均与脑不对称有关, 即它们的产生水平在左利、右利和双利小鼠中均有明显的差异, 说明脑不对称与 HPA 轴-Mo/M $\phi$  调节有关 (Gao et al., 2002); 我室工作还提示大脑皮层 IL-1、IL-6 水平与脑不对称有关且有可能参与调节 HPA 轴功能活动。

80 年代以来的研究发现, 海马中的细胞因子 IL-6 可保护海马神经元, 使其免受兴奋性神经递质谷氨酸引起的细胞死亡, 而一向认为具有神经营养作用的神经生长因子却无此作用 (Yamada and Hatanaka, 1994); IL-6 可增加海马中 5-羟色胺、多巴胺神经递质的活性 (Zalcman et al., 1994); 长时程增强可以引起海马内 IL-6 升高约 20 倍, 说明 IL-6 参与了海马的学习记忆功能 (Jankowsky et al., 2000); 海马内注射 IL-6 可引起前列腺素 E2 的分泌增加, 后者参与了海马的炎症反应和早老性痴呆的发病过程 (Ma and Zhu, 1997)。以上研究结果说明海马中的细胞因子 IL-6 参与了许多生理和病理的过程, 在维持海马的功能和结构中具有重要的作用。

我们的试验结果显示: 脑不对称与海马细胞因子 IL-6 的水平有关。在生理状况下左利、右利和双利小鼠海马中的 IL-6 水平就存在着明显的差异, 表现为: 右利明显高于左利, 左利明显高于双利, 双利 Balb/c 小鼠海马中的 IL-6 水平比右利低了 4-5 倍。LPS 刺激前后海马 IL-6 蛋白水平变化虽然没有明显的统计学差异 (可能是我们使用 LPS 的剂量偏少所致), 但我们可以看到 IL-6 水平在两侧海马的比例发生了变化: 刺激前右利小鼠、左利小鼠两侧海马 IL-6 的趋势均为左侧高于右侧, 双利为右侧高于左侧; 刺激后右利、左利小鼠两侧海马 IL-6 水平变化趋势为左侧降低, 右侧升高, 特别是右利小鼠右侧海马 IL-6 水平明显升高。左利、右利和双利小鼠海马 IL-6 在正常生理状况下及 LPS 刺激后均有明显的差异, 说明脑不对称影响到了右侧海马 IL-6 的生理分布及右侧海马对 LPS 的反应性。目前我们对 LPS 注射引起 IL-6 在两侧海马分布改变的机理还不是很清楚, 可能是与皮质激

素受体在海马的不对称分布有关 (Morrow et al., 1993; Neveu et al., 1998b)。本室的研究发现: 左利、双利 Balb/c 小鼠海马细胞因子 IL-6 水平在生理和 LPS 刺激后均低于右利小鼠, 且 LPS 刺激后右利小鼠右侧海马 IL-6 水平明显升高。本工作初步揭示了脑不对称性可在分子水平影响海马的细胞因子 IL-6 的分布, 由于 IL-6 在海马中具有复杂的生物学效应, 脑不对称性对神经免疫内分泌网络的影响还与动物的种属、品系、性别及年龄等因素有关, 脑不对称性与神经免疫内分泌之间的关系及生物学意义尚有待进一步阐明。

### 参考文献 (References)

- Fu QL, Li KS, 2001. Selective distribution of IL-1 and IL-6 contents in the right and left cortices of Balb/c mice. *Acta Physiologica Sinica* 53 (2): 152 - 154
- Fu QL, Li KS, 2002. The correlations between plasma TNF $\alpha$ , NO, NOS levels and brain lateralization in mice. *Acta Physiologica Sinica* 54 (6): 513 - 518.
- Fu QL, Shen YQ, Gao MX, Neveu PJ, Li KS, 2003. Brain interleukin asymmetries and paw preference in mice. *Neuroscience* 116: 639 - 647.
- Gadient RA, Otten U, 1994. Identification of interleukin-6-expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats. *Neurosci. Lett.* 182 (2): 243 - 246.
- Gao MX, Li KS, Dong J, Neveu PJ, 2000. Strain dependent association between lateralization and lipopolysaccharide induced IL-1 and IL-6 production in mice. *Neuroimmunomodulation* 8: 78 - 82.
- Gao MX, Li KS, Dong J, Neveu PJ, 2000. The levels of plasma IL-1, IL-6, corticosterone of Balb/c mice with lateralization. *Chin. J. Immunol.* 16 (1): 19 - 21.
- Gao MX, Li KS, Fu QL, 2002. A study on the relationship between brain lateralization and macrophage secretion of IL-1 and NO in Balb/c mice. *Chin. J. Neurosci.* 18 (3): 607 - 610 (In Chinese).
- Gerendai I, Halasz B, 2001. Asymmetry of the neuroendocrine system. *News Physiol. Sci.* 16: 92 - 95.
- Geschwind N, Galaburda AM, 1985. Cerebral lateralization: biological mechanisms, associations, and pathology. A hypothesis and a program for research. *Arch. Neurol.* 42 (7): 634 - 654.
- Jankowsky JL, Derrick BE, Patterson PH, 2000. Cytokine responses to LTP induction in the rat hippocampus: a comparison of *In vitro* and *In vivo* techniques learn. *Mem.* 7: 400 - 412.
- Ma TC, Zhu XZ, 1997. Suppression of lipopolysaccharide-induced impairment of active avoidance and interleukin-6-induced increase of prostaglandin E2 release in rats by indomethacin. *Arzneimittelforschung* 47 (5): 595 - 597.
- Morrow LE, McClellan J, Conn CA, Kluger MJ, 1993. Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 264: 1 010 - 1 016.
- Neveu PJ, Betancur C, Barneoud P, 1989. Functional brain asymmetry and murine systemic lupus erythematosus. *Brain Res.* 498 (1): 159 - 162.
- Neveu PJ, Moya S, 1997. In the mouse, the corticoid stress response depends on lateralization. *Brain Res.* 749 (2): 344 - 346.
- Neveu PJ, Bluthé RM, Liege S, 1998a. Interleukin-1-induced sickness behavior depends on behavioral lateralization in mice. *Physiol. Behav.* 63 (4): 587 - 590.
- Neveu PJ, 1996. Lateralization and stress responses in mice: interindividual differences in the association of brain, neuroendocrine, and immune responses. *Behav. Genet.* 26 (4): 373 - 377.
- Neveu PJ, Liege S, Sarrieu A, 1998b. Asymmetrical distribution of hippocampal mineralocorticoid receptors depends on lateralization in mice. *Neuroimmunomodulation* 5 (1-2): 16 - 21.
- Yamada M, Hatanaka H, 1994. Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Res.* 643 (1-2): 173 - 180.
- Zalcman S, Green-Johnson JM, Murray L, Nance DM, Dyck D, Anisman H, Greenberg AH, 1994. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res.* 643 (1-2): 40 - 49.
- 付清玲, 李康生, 2001. Balb/c 小鼠左右两侧大脑皮质 IL-1、IL-6 含量的不对称性. *生理学报* 53 (2): 152 - 154.
- 付清玲, 李康生, 2002. 小鼠血浆 TNF $\alpha$ 、NO、NOS 与脑不对称性的关系. *生理学报* 54 (6): 513 - 518.
- 高明霞, 李康生, 董菁, 2000. 脑不对称 Balb/c 小鼠血浆 IL-1、IL-6 及皮质酮变化. *中国免疫学杂志* 16 (1): 19 - 21.
- 高明霞, 李康生, 付清玲, 2002. Balb/c 小鼠脑不对称性与其腹腔巨噬细胞分泌 IL-1, NO 间关系的研究. *中国神经科学杂志* 18 (3): 607 - 610.