

丁酸钠对内毒素性肝损伤小鼠炎症因子表达的影响

刘庆春, 张峰, 黄川锋, 李永格, 夏西超

南阳医学高等专科学校基础医学部, 河南 南阳 473000

摘要: **目的** 探讨丁酸钠预处理后内毒素性肝损伤小鼠肝脏的病理改变及其对炎症因子表达的影响。**方法** 昆明小鼠 72 只随机分为 6 组, 每组 12 只。联苯双酯组(联苯双酯溶液, 剂量为 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 丁酸钠低剂量组(丁酸钠溶液 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中剂量组(丁酸钠溶液 $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和高剂量组(丁酸钠溶液 $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 正常组(等容积生理盐水)和模型组(等容积生理盐水)均灌胃给药, 1 次/d, 连续 7 d。于给药第 8 天, 除正常组外, 各组通过脂多糖建立内毒素肝损伤模型, 造模后 6 h, 处死小鼠取肝脏, HE 染色观察肝脏病理学改变, 实时聚合酶链反应(Real-time PCR)分析肝脏肿瘤坏死因子(TNF)- α 、干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-4 和 IL-10 的 mRNA 水平。**结果** 与正常组和联苯双酯组相比, 模型组小鼠肝细胞出现肿胀、大量炎性细胞浸润、肝索结构紊乱等肝损伤病理学改变。与模型组相比, 丁酸钠各剂量组小鼠肝细胞肿胀明显减轻, 炎性细胞浸润减少, 肝索结构较正常。与正常组小鼠相比, 模型组的小鼠肝组织促炎因子 INF- α 、IFN- γ 和抗炎因子 IL-4、IL-6 mRNA 表达水平增高(P 均 < 0.01)。与模型组相比, 丁酸钠低、中和高剂量组 TNF- α 和 IFN- γ mRNA 的表达水平降低(P 均 < 0.01), 而抗炎因子 IL-4 和 IL-10 mRNA 的表达水平增高(P 均 < 0.01), 但丁酸钠各剂量组之间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** 丁酸钠可能通过下调促炎因子的表达和上调抗炎因子的表达保护内毒素性肝损伤。

关键词: 丁酸钠; 小鼠; 内毒素性肝损伤; 促炎因子; 抗炎因子

中图分类号: R-33 R 575 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)06-0954-03

内毒素血症是临床上比较常见的危重病症, 其致病因素为内毒素, 即脂多糖(lipopolysaccharide)。脂多糖可以激活巨噬细胞, 释放肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 和干扰素(interferon, IFN)- γ 等促炎因子, 引起炎症反应; 同时, 机体生成白细胞介素(IL)-4 和 IL-10 等抗炎因子, 抑制炎症反应。肝脏是机体毒素降解和代谢的主要器官, 同时也成为内毒素血症时最易受损的器官^[1]。

丁酸钠(sodium butyrate)存在于哺乳动物肠道细胞中, 由厌氧菌分解结肠中未被消化的碳水化合物产生, 为结肠上皮细胞提供能量^[2]。丁酸钠的抗炎作用引起了学者的广泛兴趣, 有报道丁酸钠能减轻急性溃疡性大肠炎的炎症和黏膜损伤^[3]; 有研究发现, 丁酸钠能抑制人单核细胞中 IL-12 的分泌, 并促进生成 IL-10^[4]; 但丁酸钠在内毒素性肝损伤中作用的研究少见报道。本研究建立小鼠内毒素性肝损伤模型, 旨在探讨丁酸钠对内毒素性肝损伤小鼠促炎与抗炎因子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制备 72 只健康雄性昆明小鼠, 体重 20~25 g, 购于河南省实验动物中心, 自由给水和饮食。随机分为 6 组: 正常组、模型组、联苯双酯组、丁酸钠低、中和高剂量组, 每组 12 只。各组均采用灌胃的给药方法: 联苯双酯组灌胃联苯双酯溶液, 剂量为 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 丁酸钠低、中和高剂量组均给予 60 g/L 丁酸钠溶液, 剂量分别为 300、600、1200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。正常组和模型组灌胃等容积生理盐水。各组每天给药 1 次, 连续 7 d。于给药第 8 天, 除去正常组, 其余 5 组小鼠均腹腔注射脂多糖诱导内毒素肝损伤模型, 剂量为 10 mg/kg。6 h 后采血, 并制备血清, 取小鼠肝脏, 一部分用 4% 多聚甲醛固定, 余下保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2 主要试剂 脂多糖(美国 Sigma 公司); 丁酸钠(国药集团化学试剂有限公司); 联苯双酯滴丸(浙江万邦药业股份有限公司)。Trizol 试剂、RTase M-MLV, dNTP mixture、SYBR Premix Ex TaqTM等(大连宝生物工程股份有限公司), 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 肝脏组织形态学观察 取部分肝组织, 用

4% 甲醛溶液固定过夜,常规脱水,二甲苯透明、石蜡包埋、切片 2 μm,行 HE 染色,光学显微镜下观察肝脏组织形态学改变。

1.3.2 肝脏 TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 IL-10 的 mRNA 水平分析 采用 RNAiso Plus 提取小鼠肝组织总 RNA,其完整性和纯度分别用凝胶电泳和分光光度计检测。cDNA 第一链的合成按照 PrimeScript™ RT 试剂盒操作进行。引物由上海生工生物工程有限公司合成。TNF-α 的上游引物为 5'-ACT GGG CAT CCT TTG TCG G-3',下游引物为 5'-CTG TTG GTG AAG AGG TGC G-3'; IFN-γ 的上游引物为 5'-CCA ACG CAA AGC AAT AC-3',下游引物为 5'-GCA GGC AGG ACA ACC AT-3'; IL-4 的上游引物为 5'-CCC CTC TGT TCT TCC TGC TA-3',下游引物为 5'-GTT ACG GTC AAC TCG GTG C-3'; IL-10 的上游引物为 5'-GTG ATG CCC CAA GCT GAG A-3',下游引物为 5'-CAC GGC CTT GCT CTT GTT TT-3'; β-actin 的上游引物为 5'-CAT CCA CGA GAC CAC CTA CA-3',下游引物为 5'-GAA ATA CTG CCT CGC TCC CTC-3'。实时聚合酶链反应(Real-time PCR)分析 TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 IL-10 的 mRNA 水平,结果采用 2^{-ΔΔct}法进行分析。

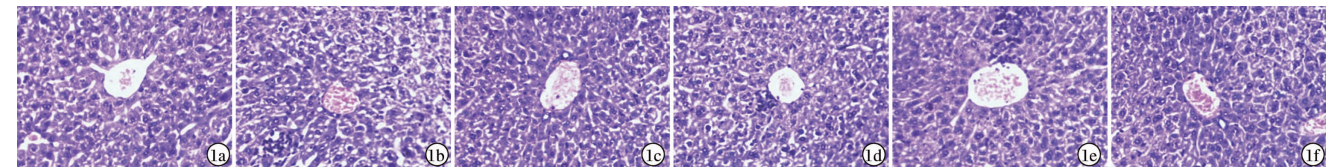
1.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件分析处

理数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏组织形态学观察 正常组小鼠的肝脏结构正常,肝脏细胞呈索状排列,细胞大小规则,细胞核圆润,细胞形态无改变(图 1)。与正常组和联苯双酯组小鼠肝脏相比,模型组小鼠肝细胞出现肿胀,大量炎性细胞浸润,肝索结构紊乱。丁酸钠低、中、高剂量组小鼠肝细胞肿胀较模型组明显减轻,炎性细胞浸润减少,肝索结构较正常(图 1)。

2.2 丁酸钠对肝脏组织 TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 IL-10 mRNA 表达的影响 与正常组小鼠相比,模型组的小鼠肝组织促炎因子 TNF-α、IFN-γ 和抗炎因子 IL-4、IL-10 mRNA 表达水平均增高(P 均 < 0.01)。与模型组相比,丁酸钠低、中和高剂量组 TNF-α 和 IFN-γ mRNA 表达水平均降低(P 均 < 0.01),而抗炎因子 IL-4 和 IL-10 mRNA 表达水平均增高(P 均 < 0.01)。丁酸钠低、中和高剂量 3 组间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。



注:1a:正常组;1b:模型组;1c:联苯双酯组;1d:丁酸钠低剂量组;1e:丁酸钠中剂量组;1f:丁酸钠高剂量组。

图 1 肝脏组织的形态学改变(HE 染色,×200)

表 1 丁酸钠对小鼠肝脏组织 TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 IL-10 mRNA 表达的影响 (n = 12, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α	IFN-γ	IL-4	IL-10
正常组	0.52 ± 0.09	0.74 ± 0.08	1.03 ± 0.10	0.95 ± 0.11
模型组	2.66 ± 0.35 ^a	3.29 ± 0.31 ^a	1.71 ± 0.14 ^a	1.92 ± 0.13 ^a
联苯双酯组	1.38 ± 0.17 ^{ab}	1.87 ± 0.20 ^{ab}	2.68 ± 0.25 ^{ab}	3.25 ± 0.32 ^{ab}
丁酸钠低剂量组	1.19 ± 0.13 ^{ab}	1.51 ± 0.19 ^{ab}	2.45 ± 0.23 ^{ab}	3.09 ± 0.30 ^{ab}
丁酸钠中剂量组	1.35 ± 0.12 ^{ab}	1.73 ± 0.21 ^{ab}	2.64 ± 0.28 ^{ab}	2.98 ± 0.27 ^{ab}
丁酸钠高剂量组	1.23 ± 0.18 ^{ab}	1.95 ± 0.27 ^{ab}	2.72 ± 0.31 ^{ab}	3.12 ± 0.29 ^{ab}
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组相比,^a $P < 0.01$;与模型组相比,^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

内毒素血症与肝脏疾病的发生有密切关系,内毒素灭活能力下降诱发肝细胞死亡,导致或者加重肝脏疾病^[5-6]。肝脏既是清除内毒素的主要器官,也是内毒素血症时最容易受损的器官之一^[7-8]。目前认为,机体在出现炎症反应的同时,往往伴有抗炎反应。促炎因子和抗炎因子在疾病发展过程中相互作用、相

互拮抗^[9]。

本研究发现,模型组小鼠肝细胞出现肿胀,大量炎性细胞浸润,肝索结构紊乱。丁酸钠各剂量组小鼠肝细胞肿胀较模型组明显减轻,炎性细胞浸润减少,肝索结构较正常,这些结果表明,丁酸钠对内毒素性肝损伤具有保护作用。

TNF-α 作为致炎因子的代表,处于炎症反应的调控地位,也是肝细胞死亡和损害的主要调控因子^[10]。

研究发现,内毒素引起小鼠血清 TNF- α 明显升高,丁酸钠能明显抑制肝脏 TNF- α mRNA 的表达,说明丁酸钠可能对内毒素刺激 Kupffer 细胞释放 TNF- α 具有抑制作用,并由此减轻内毒素性肝损伤。此外, TNF- α 还能加强肝星状细胞的趋化性,促进星状细胞增生,并可诱导产生一系列炎症因子,间接对细胞产生损伤^[11]。

INF- γ 是一种主要由辅助性 T 细胞(Th)1 细胞分泌的前炎症介质,在缺血再灌注损伤发生发展过程中发挥重要作用^[12]。本实验中,与正常组相比,模型组小鼠促炎因子 IFN- γ mRNA 的表达显著增高,这是因为创伤可使肝脏局部出现炎症反应,促炎因子 IFN- γ 生成增多,参与了早期的炎症反应,刺激黏附分子生成所致。与模型组相比,丁酸钠低、中和高剂量组小鼠的 IFN- γ mRNA 的表达水平均明显下降,说明丁酸钠预处理能够抑制促炎因子 IFN- γ 的分泌和表达。

机体在产生致炎反应的同时,往往伴有抗炎反应^[13]。IL-4 和 IL-10 则主要由 Th2 细胞分泌,可通过下调 Th1 细胞因子的表达而发挥抗炎作用。IL-4 由 Th2 细胞产生,可促进 B、T 淋巴细胞生长、分化及抗体表达,并且可以抑制 Th1 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 等细胞因子^[14]。Zhang 等^[15] 研究发现,内源性 IL-10 对肝纤维化起抑制作用。本实验中,与正常组相比,模型组小鼠抗炎因子 IL-4 和 IL-10 mRNA 的表达均显著增高;与模型组相比,丁酸钠低、中和高剂量组小鼠 IL-4 和 IL-10 mRNA 表达水平均明显增高,结果表明,在炎症反应发生时,机体产生一定的抗炎因子与之抗衡,而丁酸钠处理组则会产生更多的抗炎因子,从而使促炎与抗炎因子相互拮抗,减少对肝脏的损害。

综上所述,丁酸钠预处理可以明显抑制内毒素肝损伤小鼠的炎症反应,可能通过复杂的细胞因子调控网络,直接或间接地下调 Th1 细胞因子的产生,并上调 Th2 细胞因子,抑制促炎因子 TNF- α 和 IFN- γ 的分泌和表达,促进抗炎因子 IL-4 和 IL-10 的释放与表达,介导致炎介质与抗炎介质的平衡。但在本实验中丁酸钠不同剂量组之间无明显差别,其量效关系还有待进一步研究。

参考文献

[1] Cermanova J, Kadova Z, Dolezelova E, et al. Deferoxamine but not dexrazoxane alleviates liver injury induced by endotoxemia in rats

[J]. Shock, 2014, 42(4):372-379.

- [2] Iida T, Kawato T, Tanaka H, et al. Sodium butyrate induces the production of cyclooxygenases and prostaglandin E2 in ROS 17/2.8 osteoblastic cells [J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(7):678-686.
- [3] Vieira EL, Leonel AJ, Sad AP, et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(5):430-436.
- [4] Säemann MD, Böhmig GA, Osterreicher CH, et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production [J]. FASEB J, 2000, 14(15):2380-2382.
- [5] Song E, Fu J, Xia X, et al. Bazhen decoction protects against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice [J]. PLoS One, 2014, 9(9):e107405.
- [6] 庞文箫,李勇军,李勇文,等. 蝉翼藤中甲基阿魏酸对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠模型的影响 [J]. 中国药房, 2015, 26(1):21-24.
- [7] Yokoi T. New perspectives and understanding in drug-induced liver injury considering drug metabolism and immune and inflammation-related factors [J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2014, 144(1):22-27.
- [8] 夏西超,归改霞,刘长海,等. 20-羟蜕皮甾酮对小鼠四氯化碳肝损伤的影响 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(24):4537-4538,4544.
- [9] Dong D, Xu L, Han X, et al. Effects of the total saponins from Rosa laevigata Michx fruit against acetaminophen-induced liver damage in mice via induction of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis [J]. Molecules, 2014, 19(6):7189-7206.
- [10] Zhang S, Yang N, Ni S, et al. Pretreatment of lipopolysaccharide (LPS) ameliorates D-GalN/LPS induced acute liver failure through TLR4 signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10):6626-6634.
- [11] 孙凯,马开富. 重型肝炎患者血浆置换前后患者肝功能与 TNF- α 、IL-4 变化的临床意义 [J]. 现代预防医学, 2014, 41(2):368-369,372.
- [12] Tao X, Wan X, Xu Y, et al. Dioscin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats through inhibition of oxidative-nitrate stress, inflammation and apoptosis [J]. Transplantation, 2014, 98(6):604-611.
- [13] 黄学桂,包旻,赵冰封. 依达拉奉对肝损伤模型小鼠的肝保护作用研究 [J]. 中国药房, 2015, 26(13):1785-1787.
- [14] Pires DA, Marques PE, Pereira RV, et al. Interleukin-4 deficiency protects mice from acetaminophen-induced liver injury and inflammation by prevention of glutathione depletion [J]. Inflamm Res, 2014, 63(1):61-69.
- [15] Zhang NN, Huang NY, Zhou XK, et al. Protective effects of IL-4 on Bacillus Calmette-Guerin and lipopolysaccharide induced immunological liver injury in mice [J]. Inflamm Res, 2012, 61(1):17-26.

收稿日期:2016-03-13 修回日期:2016-04-05 编辑:周永彬