

酒精性脂肪肝中库普弗细胞表型变化的探讨

程 希^{1,2,3} 胡超杰^{1,2,3} 李晚霞^{1,2,3} 黄 成^{1,2,3} 李 俊^{1,2,3}

摘要 目的 通过建立小鼠酒精性脂肪肝(AFL)的模型,并采用肝脏原位灌流,分离出形态良好、具有生物学活性的库普弗细胞(KCs),研究其在AFL中的作用。方法 采用Lieber-DeCarli液体饮食加一次急性酒精灌胃,建立小鼠AFL模型。造模周期为16d,于第16天灌胃9h后处死小鼠,取小鼠肝脏、血清及KCs。检测各组血清谷丙转氨酶/谷草转氨酶(ALT/AST)、肝匀浆、血清中总胆固醇/三酰甘油(TG/TC)水平变化和肝脏病理切片HE、油红染色。选取原位灌流的方法分离KCs,采用流式细胞术分析KCs表型及组成的改变。荧光实时定量PCR(qRT-PCR)检测组织及提取细胞中各细胞因子水平。结果 ALT/AST、TG/TC等反应肝损伤的指标模型组显著高于对照组,HE及油红染色结果与之一致,表明小鼠AFL模型建立成功。肝脏原位灌流每只小鼠细胞得率约 $1.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个。以小鼠巨噬细胞表面标记分子F4/80及白细胞共同抗原CD45双标设门,流式细胞术分析F4/80和CD45双阳性细胞,在模型中肝脏固有CD68⁺细胞显著降低,并出现大量的浸润单核细胞。qRT-PCR结果显示,在肝组织及原代KCs中细胞因子,肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)水平显著升高。结论 小鼠AFL模型建立成功,肝脏原位灌流法细胞得率较高,AFL的发病可能与KCs构

成、表型改变,与细胞因子升高介导外周单核细胞浸润有关。
关键词 酒精性脂肪肝;原位灌流;库普弗细胞;细胞因子
中图分类号 R 967; R 965.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0149-05

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是全球发病率和死亡率较高的慢性肝病。文献^[1-2]报道,大部分的酗酒者都会形成脂肪肝,其中有20%~40%会发展为更严重的ALD。饮酒所造成酒精性肝损伤比较显著^[3]。然而,饮酒如何影响ALD进展的机制尚不明确。库普弗细胞(kupffer cells, KCs)作为肝脏内定居的巨噬细胞主要功能是清除病原体,产生各种促炎因子^[4],其在酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AFL)发病过程中起到了非常重要的作用。一方面,血液中的酒精能够刺激KCs;另一方面,内毒素也能够刺激KCs活化,释放细胞因子及氧自由基。文献^[5-7]报道,KCs可以分为炎症浸润(CD11b⁺)与组织固有(CD68⁺)两群,共同参与机体炎症和疾病的调控。CD11b⁺主要功能是分泌各种细胞因子,CD68⁺主要功能则是修复和吞噬^[8]。KCs在疾病发展中的作用不同,且在AFL中这两群细胞是如何变化还鲜少有报道。该研究建立AFL模型,提取原代KCs,旨探讨CD11b⁺与CD68⁺两群细胞和AFL发病的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康的40只C57BL/6雄性小鼠,清洁级,9~10周龄(体重 ≥ 20 g),由安徽医科大学实验动物中心提供。饲养于安徽医科大学药学院动

2014-10-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81273526);安徽省教育厅基金项目(编号:KJ2012A156);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH145);安徽医科大学博士科研启动基金(编号:XJ201118)

作者单位:安徽医科大学¹药学院、²肝病研究所,合肥 230032

³安徽省创新药物产业共性研究院,合肥 230032

作者简介:程 希,女,硕士研究生;

李 俊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lj@ahmu.edu.cn

bladder cancer patients. Methylation levels of the candidate genes were quantified using the urine sediments from 28 bladder cancer patients, 30 healthy volunteers and 10 infected urinary calculi patients by quantitative methylation-specific polymerase chain reaction(qMSP). The four most efficacious and reliable biomarkers were selected after the sensitivity and specificity of each biomarker were further calculated and inspected. **Results** The sensitivities of PCDH17, POU4F2, TCF21 and ZNF154 in the detection of bladder cancer were 46.43%, 92.86%, 39.29% and 46.43% respectively; the specificities of these biomarkers were 95.00%, 97.50%, 97.50% and 100.00% respectively. POU4F2 appeared as the best biomarkers among the four, showing a sensitivity of 92.86% and a specificity of 97.50%. **Conclusion** Bladder cancer can be detected by a biomarker panel by using qMSP depending on the urine samples from patients.

Key words bladder cancer; qMSP; hypermethylation; diagnosis

物房。

1.2 试剂 标准型 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料和匹配的对照液体饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)测试盒、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测试盒(南京建成生物工程研究所);总胆固醇/三酰甘油(total cholesterol/triglycerides, TG/TC)(长春汇力生物技术有限公司);IV型胶原酶、蛋白酶 E、Percoll、DNA 酶 I(美国 Sigma 公司);流式抗体 Anti-Mouse F4/80 Antigen FITC、Anti-Mouse CD11b PerCP-Cy5.5、Anti-Mouse CD16/CD32、Anti-Mouse CD68 PE(美国 Biologend 公司)。

1.3 仪器 FA2004A 电子天平(上海精天电子仪器厂);BT002100M 型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);Napco 26100 型 CO₂ 培养箱(美国杜邦公司);低速冷冻离心机(美国贝克曼公司);显微镜(日本 Olympus 公司);超净台(苏州净化有限公司);FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物模型的建立与处理 C57BL/6 小鼠 40 只随机分为正常组和模型组。模型组喂食 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料,含 67.4 ml/L 的无水乙醇(药用级),对照组喂匹配的对照液体饲料。每只小鼠喂食 30 ml/d。于第 16 天上午 7~9 h 酒精灌胃,9 h 后处死取肝脏标本。小鼠取血后静置,3 000 r/min 离心 20 min,收集血清。按试剂盒说明检测 ALT/AST、TG/TC 含量。油红染色观察肝组织中脂肪沉积,HE 染色观察肝脏病变程度。

1.5 KCs 的提取

1.5.1 灌流液的配制 灌注缓冲液浓缩液(perfusion buffer concentrate, PBC)(NaCl 103.75 g, KCl 6.25 g, Hepes 28.7 g, 水 350 ml + 4% NaOH 溶液 75 ml 加水至终体积为 500 ml);灌注缓冲液(perfusion buffer, PB)(稀释 40 ml 已提前配好的 PBC 至 1 L);保存缓冲液(含 1% 牛血清蛋白 PB);酶液(加 1 ml 5.474% CaCl₂ 溶液至 99 ml PB 中,用前再加入胶原酶 IV 和蛋白酶 E 各 35 mg);“100%”Percoll(Percoll 原液 13.5 ml + 10 × PBS 1.5 ml),50% Percoll(100% Percoll 10 ml + 1 × PBS 10 ml),25% Percoll(100% Percoll 5 ml + 1 × PBS 15 ml)。

1.5.2 肝脏灌流及细胞离心 水合氯醛(1%)麻醉小鼠、固定,小鼠背部用纸卷垫住,打开腹腔暴露肝脏,游离出门静脉和下腔静脉穿线。从门静脉插入针头,确保针头与血管平行,结扎。剪断下腔静

脉,调大灌流泵流速。待肝脏变白,将灌流液换成 0.035% 酶液,一般 25~30 ml,消化至肝脏表面有裂纹时,游离肝脏、撕碎、过滤后离心。4 °C, 697 r/min 离心 2 min,重复离心后取上清液;换 3 487 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 25% 的 Percoll 重悬,铺于 50% 的 Percoll 上;4 °C, 3 487 r/min 离心 30 min。离心结束后,吸取两层不同浓度 Percoll 中间的液体至于 50 ml 离心管中,加入 PBS 重悬,4 °C, 3 487 r/min 离心 10 min。弃上清液,并在沉淀中加入 10 ml 培养基。重悬后,待检测。

1.6 流式细胞术检测细胞得率和比例 取灌流所得细胞,离心后用少量生理盐水重悬,加入到流式管中,用抗小鼠 CD16/CD32 包被细胞,避光孵育 15 min 后,标记 F4/80、CD45、CD68 及 CD11b 流式抗体,孵育 15 min 后对各细胞群进行检测。

1.7 荧光实时定量 PCR (fluorescent real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 检测肝组织和细胞中各细胞因子 mRNA 表达水平。应用 TRIzol 试剂盒提取肝组织及原代提取 KCs 中总 RNA,通过分光光度法测定 RNA 溶液的吸光度(optical density, OD)来测定 RNA 的含量和纯度($OD_{260}/OD_{280} > 1.8$)。逆转录成 cDNA 后,用 qRT-PCR 仪检测其中各细胞因子的 mRNA 表达水平。IL-6 上游引物:5'-GAGGAT-ACCACTCCCAACAGACC-3',下游引物:5'-AAGTG-CATCATCGTTGTTTCATACA-3';TNF- α 上游引物:5'-TGTCCCTTTCACTCACTGGC-3',下游引物:5'-CATCTTTTGGGGGAGTGCCT-3';磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)上游引物:5'-GGACCTCATGGCCTACATGG-3',下游引物:5'-TAGGGCCTCTTTGCTCAGT-3';转录生长因子(transforming growth factor, TGF- β)上游引物:5'-GGACTCTCCACCTGCAAGAC-3',下游引物:5'-CTGGCGAGCCTTAGTTTGG-3';白介素-10(interleukin-10, IL-10)引物:5'-GCTGCCT-GCTTACTGACT-3',下游引物:5'-CTGGGAAGT-GGGTGCAGTTA-3';单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein, MCP-1)上游引物:5'-TCAGCCAGATGCAGTTAACCG-3',下游引物:5'-TGATCCTCTTGTAGCTCTCCAGC-3'。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 小鼠肝体比、肝匀浆及血清中 TC、TG 水平变

化 造模完成后分别称取对照组和模型组的小鼠体重、肝重,计算小鼠肝体比。模型组肝体比明显高于对照组,提示肝脏有病变,差异有统计学意义($P < 0.01$)。造模完成后,收集肝组织及血清。检测肝匀浆(肝组织匀浆后收集的上清液)及血清中 TC、TG 水平。模型组肝匀浆血清中 TC、TG 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($t = 4.144 P < 0.01$),见表 1。

表 1 小鼠肝体比、肝匀浆、血清中 TC/TG 水平($\bar{x} \pm s, n = 40$)

项目	对照组	模型组
肝体比	0.043 3 ± 0.002 7	0.052 3 ± 0.004 6**
TC(mmol/L)		
血清	2.722 4 ± 0.080 5	5.182 4 ± 0.233 8**
肝匀浆	0.894 3 ± 0.061 1	3.134 2 ± 0.110 7**
TG(mmol/L)		
血清	1.282 6 ± 0.027 2	2.065 6 ± 0.039 7**
肝匀浆	2.195 1 ± 0.058 5	5.550 8 ± 0.113 2**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 小鼠血清 ALT、AST 变化 检测血清中酶的活性的改变可以反映肝脏的功能情况,当肝细胞受损时,肝细胞内的 ALT、AST 释放入血,血清 ALT、AST 活性会升高。因此,这两种酶的活性升高成为肝功能受损的特异性指标。结果显示,模型组较对照组血清 ALT、AST 水平明显升高,差异有统计学意义($t = 6.055 P < 0.01$),见图 1。

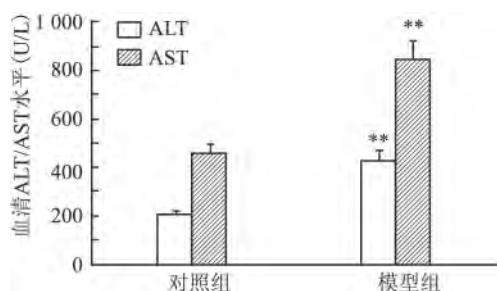


图 1 小鼠血清 ALT、AST 水平

与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 肝脏油红染色及 HE 染色 取小鼠肝组织,用 OCT 冰冻包埋剂包埋, -80 °C 保存。切片后油红染色 苏木精复染;蓝色部分为细胞核,红色部分为脂肪。对照组油红染切片中基本不见红色脂肪组织部分,而模型组中可见大量红色脂肪组织,提示肝脏脂肪病变明显,造模成功。HE 染色结果显示,正常组肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐;模型组肝脏可见明显脂肪空泡,肝脏结构紊乱。见图 2。

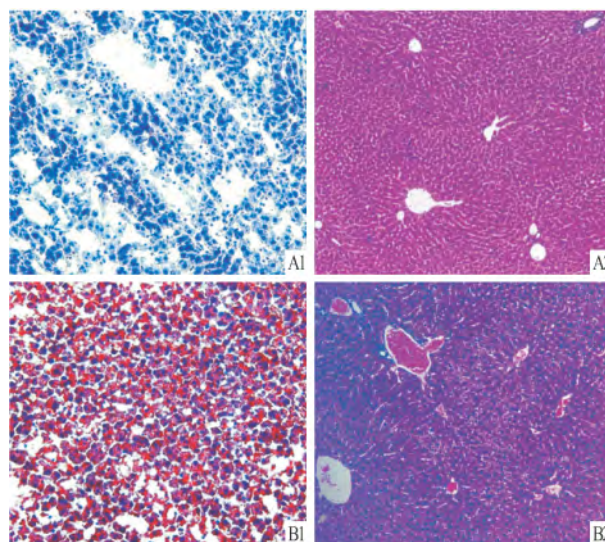


图 2 小鼠肝脏油红、HE 染色结果

A: 对照组; B: 模型组; 1: 油红染色 × 200; 2: HE × 100

2.4 流式细胞术检测 CD11b⁺、CD68⁺ 两群细胞比例 用小鼠巨噬细胞表面标记分子 F4/80 及白细胞共同抗原标记分子 CD45 双标提取的原代 KCs,方框中为 F4/80⁺ 和 CD45⁺。流式细胞术结果显示,模型组中 KCs 比例明显减少。选取对照组和模型组中 F4/80、CD45 双阳性的细胞分析。对照组 CD11b⁺ CD68⁺ 的细胞占全部巨噬细胞的 90.1%,模型组双阳性的细胞占 53.7%,同时存在 CD11b⁺ CD68⁻ 细胞,比例约 45.2%。见图 3。

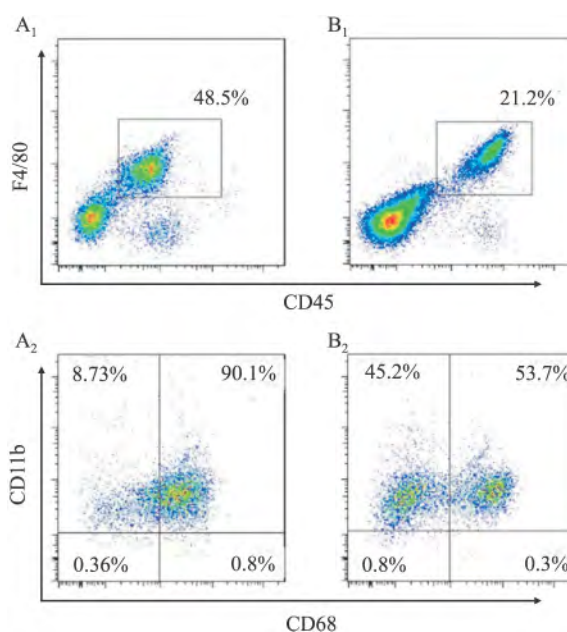


图 3 流式细胞术检测原代提取 KCs 两群细胞比例

A: 对照组; B: 模型组; 1: F4/80 和 CD45 双标流式图; 2: F4/80 和 CD45 双阳性细胞中 CD11b、CD68 比例

2.5 肝组织及原代 KCs 细胞因子 mRNA 表达水平 收集肝组织及原代提取 KCs,提取各自 mRNA,采用 qRT-PCR 检测对照组和模型组中各细胞因子 mRNA 表达水平。肝组织中 TNF- α 、IL-6、MCP-1 mRNA 的表达水平均有明显升高,其中 MCP-1 的升高显著 ($P < 0.01$)。在原代提取的 KCs 中,TNF- α 、IL-6、MCP-1 mRNA 的表达水平也都有升高,且 MCP-1 mRNA 的水平也升高 ($P < 0.01$)。而 IL-10、TGF- β 的 mRNA 表达水平则有少量降低或者无明显变化。见图 4。

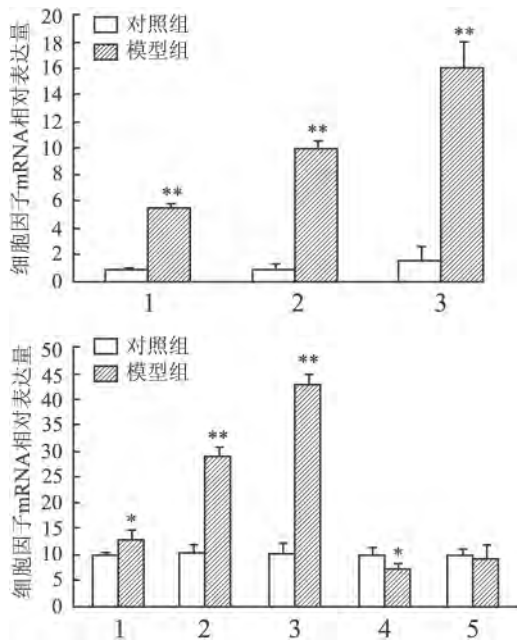


图4 肝组织及原代提取的 KCs 中各细胞因子表达水平

A: 肝组织; B: 原代提取的 KCs; 1: TNF- α ; 2: IL-6; 3: MCP-1; 4: IL-10; 5: TGF- β ; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

采用 Lieber-DeCarli 液体饲料造模,因其在造模过程中由小鼠自行取食,建立小鼠 AFL 模型较传统连续灌胃 6 周的 AFL 模型^[8]更加方便、易行,造成的 AFL 模型比较明显,并且这种模型与长期饮酒造成的肝脏疾病患者很相似。实验中反映肝损伤的指标肝体比、TG/TC、ALT/AST 的水平,在造模 16 d 时,模型组明显高于对照组。同时,油红及 HE 染色中模型组可见明显脂肪沉积和空泡,组织疏松。通过在经典的 KCs 提取的方法^[9-10]上进行了改进:一方面在操作过程中,减少了酶的用量,节约了试剂;并且在实际操作中发现,可将方法中分离后再消化

的步骤省略,仅需在体灌注即可获得很好的消化结果。另一方面,将 3 层的密度梯度离心中将细胞悬液铺于 25% 的 Percoll 后再铺于 50% 的 Percoll 上,改进为将细胞直接与 25% 的 Percoll 混匀后铺于 50% 的 Percoll 上,将 3 层梯度离心改为 3 层,离心过后可见明显的 3 层分层,吸取中间层,可明显提高细胞得率。

KCs 发育来源于骨髓,在炎症和防御的过程中起重要作用,在组织中可根据对环境的应答获得不同的功能表型。文献^[5]报道,在正常与病理状态下,KCs 中 CD68⁺ 及 CD11b⁺ 这两群的比例功能并不完全相同。流式细胞术结果显示,通过原位灌流提取 KCs,AFL 模型中 F4/80⁺ 与 CD45⁺ 细胞,以及各自 CD68⁺、CD11b⁺ 两群细胞比例较对照组发生了很大变化,与文献^[6]报道一致。两组共表达 F4/80⁺ 和 CD45⁺ 细胞提示,在正常情况下,CD68⁺ 的肝脏巨噬细胞占到了绝大多数,达 90.1%;而在 AFL 模型中,CD68⁺ 的细胞减少至 53.7%,CD68⁻ 细胞则明显上升,这群 CD68⁻ 细胞主要为浸润的单核细胞。

肝组织 qRT-PCR 结果显示,在模型中促炎的细胞因子,例如 TNF- α 、IL-6、MCP-1 mRNA 表达水平明显升高,提示酒精刺激可引起机体的炎症反应。同时,原代提取 KCs 的 qRT-PCR 结果表明在 AFL 模型中,KCs 分泌促炎因子,例如 TNF- α 、IL-6、MCP-1 mRNA 的水平明显升高;而相对抑炎的细胞因子如 IL-10、TGF- β 的 mRNA 表达水平就有少量降低或无明显变化。肝组织、原代 KCs 中 MCP-1 mRNA 的水平均有显著升高,作为诱导单核细胞浸润的细胞因子,其升高可能与模型中 CD11b⁺ 及 CD68⁺ 细胞增加有关。本研究显示,AFL 模型中 CD68⁺ 这群细胞可能在进行吞噬和修复功能后自身发生了凋亡,也有可能是在疾病的发展过程中 MCP-1 等促炎因子分泌增加介导外周单核浸润,但还未来得及转化为巨噬细胞,因而仅表现为 CD11b⁺、CD68⁻。

综上所述,CD68 及 CD11b 两群的比例改变以及各自不同的功能在 AFL 的疾病过程中起到了非常重要的作用。然而 AFL 的发病具体机制,尚待进一步研究。

参考文献

[1] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1572 -

- 85.
- [2] 朱仁敏, 张程, 陈熙, 等. Kupffer 细胞在果糖引起的非酒精性脂肪肝中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(3): 257-60.
- [3] Lachenmeier D W, Monakhova Y B, Rehm J. Influence of unrecorded alcohol consumption on liver cirrhosis mortality[J]. *World J Gastroenterol* 2014, 20(23): 7217-22.
- [4] 黄艳, 黄成, 李俊. 肝纤维化病程中 Kupffer 细胞分泌的细胞因子对肝星状细胞活化增殖、凋亡的调控[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 9-13.
- [5] Davies L C, Rosas M, Jenkins S J, et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation[J]. *Nat Commun* 2013, 4: 1886.
- [6] Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, et al. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages[J]. *J Leukoc Biol* 2013, 94(6): 1325-36.
- [7] Zimmermann H W, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury[J]. *Front Physiol* 2012, 3: 56.
- [8] Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon M A, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109(46): E3186-95.
- [9] 张劲松, 吴铁, 邹丽宜. 小鼠酒精性脂肪肝模型的建立[J]. 中外健康文摘, 2011, 8(30): 96-8.
- [10] 朱荣涛, 魏思东, 李培志, 等. 小鼠 Kupffer 细胞分离及细胞培养[J]. 医学分子生物学杂志, 2011, 8(6): 484-8.

The study of kupffer cells phenotypic changes in alcoholic fatty liver

Cheng Xi^{1,2,3}, Hu Chaojie^{1,2,3}, Li Wanxia^{1,2,3}, et al

(¹*School of Pharmacology*, ²*Institute for Liver Diseases of Anhui Medical University Hefei* 230032;

³*Anhui Innovative Drug Research Institute of Industry Common Hefei* 230032)

Abstract Objective Establish the model of alcoholic fatty liver in mice and isolate the biological activity kupffer cells (KCs), in order to study its role in the alcoholic fatty liver disease. **Methods** C57BL/6 mice were fed with the Lieber-DeCarli diet for 16 days plus one time of acute alcohol lavage, to establish the model of alcoholic fatty liver. Tissue specimens were collected on the sixteenth day after gastric lavage 9 h later. To verify whether the model was established successfully by detecting the level of serum alanine aminotransferase/glutamic oxalacetic transaminase (ALT/AST) and total cholesterol/triglycerides (TG/TC), the level of TG/TC of liver tissue homogenate and liver pathological section HE and oil red staining. KCs were isolated by in situ perfusion, and the cell yield and cell changes were detected by flow cytometry. Cytokine levels of organization and the primary cell were detected by qRT-PCR. **Results** The model response to liver injury index of ALT/AST was higher than that of control group, meanwhile HE and oil red staining results were consistent with that. So the alcoholic fatty liver model was successfully established in mice. Cell yield of each mouse was about $1.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$, KCs were double-labeled by murine macrophage cell surface marker F4/80 molecule and white blood cells surface antigen molecules CD45, F4/80 and CD45 double positive cells were selected to flow analysis. Data showed that natural CD68⁺ was significantly lower in the model, a large number of the infiltration of mononuclear cells were elevated. Florescent real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) results showed that cytokine, tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein (MCP-1) level increased significantly in liver tissue and primary cell. **Conclusion** The model of alcoholic fatty liver is successfully established and there is a high yield of cells in situ perfusion. The incidence of alcoholic fatty liver may be relative to hepatic macrophages constitute and phenotypic changes, associated with elevated cytokine mediated infiltration of peripheral mononuclear cells.

Key words alcoholic fatty liver; in situ perfusion; kupffer cells; cytokines