

脂多糖预处理减轻对乙酰氨基酚所致急性肝损伤

许元宝^{1,2} 徐德祥¹ 张程¹ 王华¹

摘要 目的 建立对乙酰氨基酚(APAP)引起小鼠急性肝损伤动物模型,探讨低剂量脂多糖(LPS)预处理对APAP引起急性肝损伤的作用。方法 ①选取ICR雄性小鼠20只,随机分成APAP组和LPS+APAP组。禁食后,APAP组经腹腔注射APAP(300 mg/kg);LPS+APAP组经腹腔注射先给予LPS(50 μg/kg) 3 h后再给予APAP(300 mg/kg),密切观察小鼠存活状况,72 h后取材,测生化指标,行肝组织HE染色。②ICR雄性小鼠随机分成APAP 0、0.5、6、12、24、72 h组和LPS+APAP 0、0.5、6、12、24、72 h组。禁食后,APAP组腹腔注射APAP(300 mg/kg);LPS+APAP组腹腔注射LPS(50 μg/kg) 3 h后再经腹腔注射APAP(300 mg/kg),分别在每组对应时点取材。分离血清测丙氨酸氨基转移酶(ALT),用Beutler改良法测肝脏谷胱甘肽(GSH)含量。结果 ①APAP组给药4 h左右小鼠开始出现死亡情况,72 h存活率为50%;LPS+APAP组72 h内无死亡。②低剂量LPS预处理能降低血清ALT($P < 0.05$),减少小鼠肝脏坏死情况($P < 0.01$)。③APAP组与LPS+APAP组肝脏GSH含量差异无统计学意义。结论 低剂量LPS预处理能显著减轻APAP引起的急性肝损伤,这种作用不是通过减弱N-乙酰苯醌亚胺(NAPQI)耗竭GSH而产生的,可能与其激活了机体的免疫应答,抑制了GSH耗竭的下游机制有关。

关键词 脂多糖; 对乙酰氨基酚; 急性肝损伤; 谷胱甘肽
中图分类号 R 971.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)03-0310-05

急性肝损伤(acute liver injury, ALI)一般是短期接触较大剂量肝毒物或肝脏功能不全时接触某种肝毒物引起,病理改变常见于肝细胞坏死、脂肪变性、胆汁淤积等^[1]。对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是过量引起急性肝损伤、肝衰竭的主要药物^[2-3],由于其在体内可被代谢生成高活性毒性产物N-乙酰苯醌亚胺(N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI),最终造成肝实质细胞坏死^[4-5]。脂多糖

(lipopolysaccharides, LPS)是革兰阴性杆菌细胞壁的主要组分之一,它由类脂A、核心多糖和特异性多糖三部分组成^[6-7]。近年来研究^[8-10]表明,LPS与细胞膜上相应受体作用后,启动信号传递、基因转录,表达和释放多种促炎因子。低剂量LPS刺激后所诱导的内毒素耐受可减轻大剂量内毒素所致肝损伤,但能否减轻APAP引起的急性肝损伤尚不明确。该课题拟在建立APAP引起小鼠急性肝损伤动物模型的基础上,探讨低剂量LPS预处理对APAP引起急性肝损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 化学试剂 APAP与LPS购自美国Sigma公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;标准饲料购于江苏省协同医药生物工程责任有限公司;其他试剂均购自美国Sigma公司。

1.2 实验动物 清洁级ICR雄性小鼠,6~8周龄,体重28~30 g,共92只,购自安徽医科大学实验动物中心。实验前适应性喂养1周,自由进食标准饲料,维持12 h光照和12 h黑暗的昼夜节律,温度20~25 ℃,湿度(50±5)%。实验方案获得了安徽医科大学实验动物伦理委员会的批准,在实验过程中对实验动物给予了人文关怀。

1.3 动物分组与处理 实验一:为观察LPS对APAP所致小鼠急性肝损伤存活率的影响,选取ICR雄性小鼠20只,随机分成APAP组和LPS+APAP组,每组10只。禁食10 h后,APAP组腹腔注射APAP(300 mg/kg);LPS+APAP组经腹腔注射先给予LPS(50 μg/kg) 3 h后再给予APAP(300 mg/kg)。给药后,两组均禁食不禁水,密切观察小鼠存活状况,72 h后剖杀剩余小鼠,摘眼球取血测生化指标,剪取部分肝脏组织用4%多聚甲醛固定做病理切片,其余肝脏组织放入-80 ℃冰箱中保存。实验二:为探讨LPS对小鼠APAP急性肝损伤作用发生与发展的时间过程,ICR雄性小鼠随机分成APAP 0、0.5、6、12、24、72 h组和LPS+APAP 0、0.5、6、12、24、72 h组,每组6只。禁食10 h后,APAP组腹腔注射APAP(300 mg/kg);LPS+APAP组腹腔注射

2015-01-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81373495, 81172711)

作者单位:¹安徽医科大学公共卫生学院卫生毒理学系,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院药剂科,合肥 230022

作者简介:许元宝,男,硕士研究生;

徐德祥,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: xudex@126.com

LPS(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ,3 h 后再经腹腔注射 APAP(300 mg/kg)。给药后,禁食不禁水,分别在每组对应时点(0、0.5、6、12、24、72 h)取材。分离血清用于生化检测,取部分肝组织用于病理检查,其余置于 -80°C 冰箱中保存。

1.4 血清生化指标检测 小鼠血液样品室温静置1 h后,3 500 r/min 离心15 min,取上清液,用ALT试剂盒测定血清ALT活性,测定方法采取改良赖氏法。

1.5 HE染色法观察肝组织病理学变化、计算肝脏坏死面积比例 取部分受试动物同部位肝组织,置于4%多聚甲醛中固定。经乙醇溶液脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、5 μm 连续切片、HE染色、中性树脂封片后,于光学显微镜下观察肝脏组织病理改变。同时拍摄($\times 100$)病理图片,使用美国国立卫生研究院Image J软件(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)测量坏死区域面积和目标肝小叶总面积,计算坏死面积比例。

1.6 肝脏组织GSH含量检测 称取0.1 g小鼠肝脏组织,运用Beutler改良法测定肝脏GSH含量。

1.7 统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件处理,定量实验资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法选用方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 LPS对小鼠存活率的影响 选取ICR雄性小鼠20只,随机分成APAP组和LPS+APAP组。两组在给药前,体重差异无统计学意义,两组小鼠状态良好。APAP组经腹腔注射APAP(300 mg/kg);LPS+APAP组经腹腔注射先给予LPS(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ,3h后再给予APAP(300 mg/kg)。给药后,单纯APAP组小鼠精神状态持续萎靡,活动量明显减少,对外界刺激反应迟钝。给药4 h左右小鼠开始出现死亡情况,72 h存活率仅为50%;LPS+APAP联合处理组,在腹腔注射APAP后,小鼠状态出现轻度萎靡,活动量减少,4 h后,小鼠精神状态好转,活动量有所恢复,72 h内无死亡。见图1。

2.2 LPS对小鼠体重、肝重及ALT的影响 为了探讨LPS对小鼠APAP急性肝损伤作用发生与发展的时间过程,对禁食10 h后的ICR小鼠腹腔注射APAP(300 mg/kg) ,LPS+APAP组提前3 h给予腹腔注射LPS(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 预处理,并分别在每组对应时点(0、0.5、6、12、24、72 h)取材,测定生理及生化指标,结果见表1。

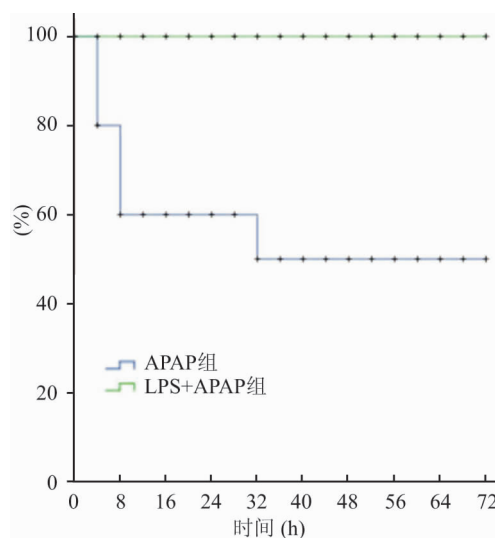


图1 LPS对小鼠存活率的影响

表1 LPS对小鼠体重、肝重及ALT的影响

组别	时间	体重(g)	肝重(g)	肝重/体重(%)	ALT(U/L)
APAP	0 h	35.95 \pm 3.54	1.78 \pm 0.11	4.96 \pm 0.00	17.93 \pm 3.89
	0.5 h	35.58 \pm 2.13	1.83 \pm 0.15	5.13 \pm 0.00	29.56 \pm 14.82
	6 h	34.12 \pm 3.82	1.73 \pm 0.41	5.19 \pm 0.01	1016.74 \pm 613.87**
	12 h	32.24 \pm 1.91	2.05 \pm 0.61	6.32 \pm 0.02*	2603.70 \pm 1595.31**
	24 h	31.76 \pm 0.60	2.16 \pm 0.60	6.82 \pm 0.02*	1619.08 \pm 4048.50**
LPS+APAP	0 h	35.87 \pm 2.30	2.00 \pm 0.13	5.57 \pm 0.00***	23.98 \pm 7.44
	0.5 h	35.20 \pm 2.09	2.00 \pm 0.21	5.68 \pm 0.01***	19.93 \pm 5.12
	6 h	32.13 \pm 2.63	1.79 \pm 0.19	5.56 \pm 0.00***	31.77 \pm 7.55##
	12 h	32.17 \pm 1.32	1.78 \pm 0.10	5.53 \pm 0.00***	181.10 \pm 158.38##
	24 h	31.72 \pm 3.87	1.60 \pm 0.11	5.08 \pm 0.01#	584.92 \pm 515.59##
72 h	26.66 \pm 1.26	1.21 \pm 0.22	4.53 \pm 0.01	39.48 \pm 7.67##	

与APAP 0 h相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与APAP各对应时点相比: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

通过时点效应关系实验发现,APAP组在0.5~24 h内随着药物作用时间的延长,小鼠的肝脏系数(肝重/体重 $\times 100\%$)、血清ALT值都呈逐渐升高趋势,在24 h时点,两者都达到最高值,与APAP 0 h相比,差异均有统计学意义。之后,小鼠的肝脏系数、ALT值逐渐下降,在72 h时点分别降至(5.36 \pm 0.01)%、(376.90 \pm 153.32) U/L。

LPS+APAP组在给予APAP处理后0~24 h内,与APAP 0 h相比,小鼠肝脏系数都有一定程度的增加,但没有呈现逐渐增高的趋势,而是在0.5 h时点达到最高,之后逐渐降低,在72 h时点已恢复正常;此外,与APAP组各对应时点进行比较后发现,12、24 h时点,小鼠的肝脏系数要低于APAP 12、24 h时点($P < 0.05$)。

在生化指标方面,经血清ALT检测,LPS+

APAP 组小鼠在给药后 ALT 值的变化趋势同 APAP 组相类似,逐渐增高,并在 24 h 时点达到最高值,但升高幅度显著低于 APAP 组,APAP 组与 LPS + APAP 组 ALT 峰值比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 LPS 对小鼠肝脏病理组织学的影响 给药后,随着 APAP 作用时间的延长,肝脏损伤情况进行性加重,坏死面积占比不断增高。APAP 组 6 h 时点,肝脏就出现明显的充血现象和典型的肝脏小叶中心坏死,坏死面积占 32.51%; 12 h 时点,肝小叶结构进一步遭到破坏,可见多处坏死,坏死面积占 51.25%; 24 h 时点,可见大面积坏死,坏死面积占 65.64%。而 LPS + APAP 组虽然肝脏损伤情况也呈进行性加重趋势,但与 APAP 组相同时点进行比较发现,LPS + APAP 组肝脏受损情况明显改善,24 h 坏死面积仅为 28.44%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

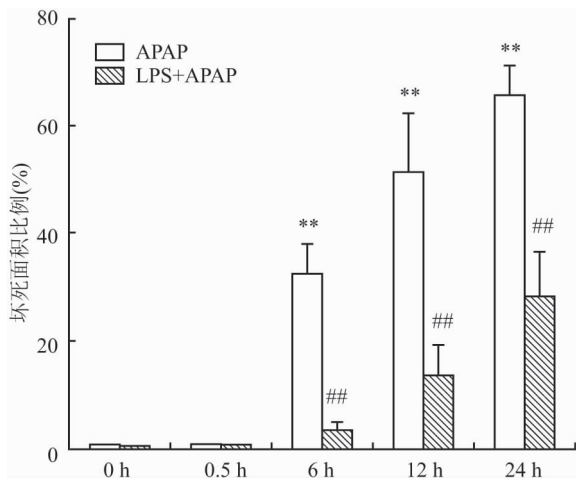


图 2 LPS 对小鼠肝脏坏死面积的影响

与 APAP 0 h 相比: ** $P < 0.01$; 与 APAP 各对应时点相比: ### $P < 0.01$

2.4 LPS 对小鼠肝脏 GSH 的影响 通过时点效应关系实验,对不同时点小鼠肝脏组织的 GSH 含量进行测定后发现,LPS + APAP 组 0 h 时点 GSH 含量为 $(0.90 \pm 0.15) \mu\text{mol/g}$,APAP 组 0 h 为 $(0.92 \pm 0.20) \mu\text{mol/g}$,差异无统计学意义,提示单纯给予 LPS 对肝脏 GSH 含量没有影响。但是在给予 APAP 0.5 h 时,两组 GSH 浓度都迅速下降至谷值,APAP 组 $(0.36 \pm 0.21) \mu\text{mol/g}$,LPS + APAP 组 $(0.37 \pm 0.17) \mu\text{mol/g}$,差异无统计学意义,但同 APAP 0 h 相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。之后,两组的 GSH 含量逐渐升高恢复。见图 4。

3 讨论

APAP 是非甾体解热镇痛药的代表性药物,由于其能够抑制前列腺素 (prostaglandin, PG) 的合成而具有退热、缓解轻、中度疼痛的作用,临床上主要用于发热、关节痛、神经痛等。近年来,伴随着药物的广泛应用,因 APAP 过量或长期使用而导致的 ALJ 事件的发生率呈逐年增长的趋势。据统计 APAP 相关的急性肝衰竭发生率已达 42%,由此引发了严重的公共健康安全问题^[3,11]。因此,建立 APAP 急性肝损伤模型,研究其毒性机制,具有极其重要的意义。

本研究中,选取了 ICR 雄鼠作为实验动物,给药前予以禁食处理,排除了摄取食物对小鼠 GSH 合成及贮备的影响^[12]。给药方案设定为腹腔注射中等剂量的 APAP 300 mg/kg,结果在生存曲线试验中 72 h 小鼠存活率为 50%,同时与 APAP 0 h 相比,小鼠 ALT、病理组织学、坏死面积比例等肝损伤指标呈明显的时间效应关系,表明过量 APAP 能引发小鼠肝功能降低、炎症反应甚至肝坏死。

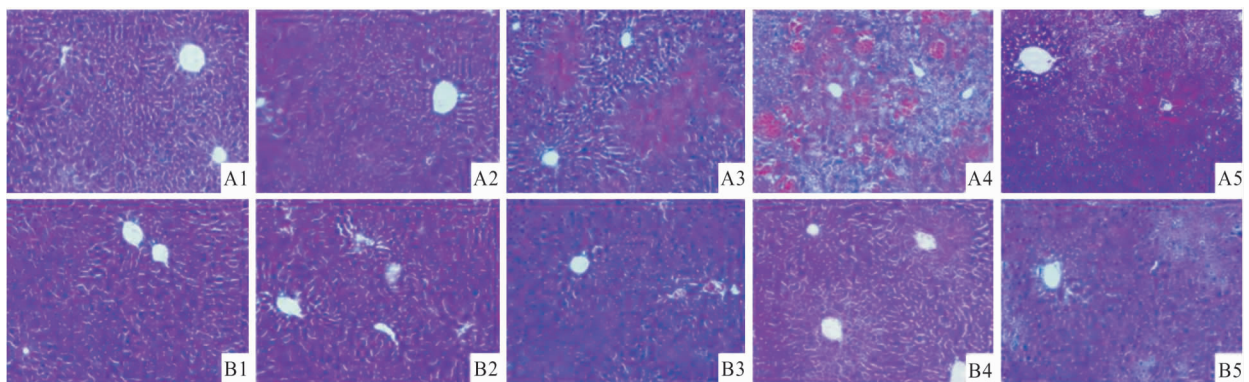


图 3 LPS 对小鼠肝脏病理组织学的影响 HE × 100

A: APAP 组; B: LPS + APAP 组; 1: 0 h; 2: 0.5 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 24 h

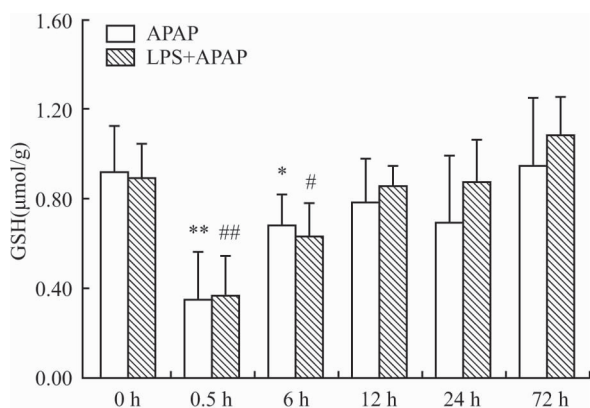


图4 LPS对小鼠肝脏GSH的影响

与APAP 0 h比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与LPS + APAP 0 h组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

通过生存曲线实验发现,给药后APAP组小鼠精神状态持续萎靡、活动量减少,而LPS + APAP组小鼠的精神状态、活动量要明显优于APAP组,持续观察72 h,APAP组存活率为50%,而LPS + APAP组则无死亡情况出现,表明低剂量LPS预处理能显著提高小鼠的存活率。另一方面,在给药后,APAP组与LPS + APAP组在血清ALT值、病理组织学等肝损伤指标方面都有随着APAP作用时间的延长而逐渐升高或加重的趋势,但是LPS预处理组损伤程度要明显轻于APAP组,显示低剂量LPS预处理能显著减轻APAP所致ALJ。

而APAP的毒性与其代谢产物相关,正常剂量下,只有少量的APAP通过I相代谢,经肝脏细胞色素P450(cytochromeP450, CYP450)系统(CYP2E1、1A2、3A4)氧化生成亲电子高活性代谢产物NAPQI,并与肝内具有还原性的谷胱甘肽(GSH)进一步结合生成水溶无毒性的APAP谷胱甘肽结合物由肾脏排出。但当机体摄入过量的APAP时,剩余的APAP会生成大量高活性代谢产物NAPQI。过量的NAPQI会耗竭肝细胞内能与其结合形成共价产物的GSH,当GSH消耗70%~80%左右时,剩余的NAPQI则与细胞膜分子反应,进而导致氧化应激反应、线粒体异常和DNA损伤等造成ALJ甚至坏死^[4-5]。

氧化应激最早被认为APAP肝毒性的重要机制之一。研究^[12]表明,GSH耗竭后,导致细胞内过氧化物含量的增加,并与亚铁离子发生氧化还原反应生成高活性羟基自由基(芬顿机制),氧化脂质,导致脂质和蛋白质、核酸过氧化。此外,还有研究^[13-14]表明一氧化氮及诱导型一氧化氮合酶也参与了APAP的氧化应激。线粒体通透性(mitochondrial permeability transition, MPT)改变是APAP肝毒

性的另一个重要机制^[15],氧化剂促进MPT,体内超氧化物水平增高,钙稳态改变。伴随膜通透性的改变,线粒体肿胀,减少ATP合成。另有研究^[16]报道炎症因子的激活,JNK信号通路也都参与了APAP的毒性作用机制。

为了探究LPS是否通过减弱NAPQI耗竭GSH而发挥减轻肝毒性的作用,笔者对小鼠肝脏组织GSH的含量进行了测定,结果显示两组小鼠都产生了GSH的耗竭,表明LPS预处理对小鼠肝脏GSH含量没有影响,提示其可能不是通过抑制APAP的代谢而产生的作用。LPS预处理产生的这种效应可能与其激活了机体的免疫应答,抑制了GSH耗竭的下游机制有关。

综上所述,低剂量LPS预处理能显著减轻APAP引起的ALJ,这种作用不是通过减弱NAPQI耗竭GSH而产生的,可能与其激活了机体的免疫应答,抑制了GSH耗竭的下游机制有关。

参考文献

- [1] 王心如. 毒理学基础[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 420.
- [2] Lee W M. Acetaminophen and the U. S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure [J]. Hepatology, 2004, 40(1): 6-9.
- [3] Larson A M, Polson J, Fontana R J, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study [J]. Hepatology, 2005, 42(6): 1364-72.
- [4] Larson A M. Acetaminophen hepatotoxicity [J]. Clin Liver Dis, 2007, 11(3): 525-48.
- [5] Hodgman M J, Garrard A R. A review of acetaminophen poisoning [J]. Crit Care Clin, 2012, 28(4): 499-516.
- [6] Park B S, Lee J O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes [J]. Exp Mol Med, 2013, 45: e66.
- [7] 董旭婷, 赵梅, 周璐, 等. 不同剂量维生素C对细菌内毒素致急性肝损伤的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(12): 1432-5.
- [8] Raetz C R, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 635-700.
- [9] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis [J]. Nature, 2002, 420(6917): 885-91.
- [10] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.
- [11] Lee W M. Acetaminophen toxicity: Changing perceptions on a social/medical issue [J]. Hepatology, 2007, 46(4): 966-70.
- [12] James L P, Mayeux P R, Hinson J A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(12): 1499-506.

(下转第318页)

vein. The changes of ST-segment at different time and the infarct size of rat heart were determined by electrocardiogram and TTC staining, respectively. Draw the dose-effect curve based on the inhibition rate of myocardial infarction. Then, the median effective dose (ED_{50}) and 95% confidence interval (95% CI) of vitexin and puerarin were calculated. **Results** Compared with MIRI group, vitexin within 0.75 ~ 12 mg/kg dose range and puerarin within 3 ~ 48 mg/kg dose range could inhibit the ST-segment elevation, reduce myocardial infarct size in a dose-dependent manner. ED_{50} of vitexin and puerarin inhibition the rate of myocardial infarction were respectively 5.321 mg/kg and 32.950 mg/kg in the rat model with MIRI, 95% CI were respectively 4.294 ~ 6.593 mg/kg and 24.690 ~ 43.970 mg/kg. **Conclusion** ED_{50} of vitexin inhibition the rate of myocardial infarction was significantly lower than puerarin. It suggests that vitexin is probably more effective in the rat model with MIRI than puerarin.

Key words vitexin; puerarin; myocardial ischemia/reperfusion injury; dose-effect relationship; ED_{50}

(上接第 313 页)

- [13] Michael S L, Mayeux P R, Bucci T J, et al. Acetaminophen induced hepatotoxicity in mice lacking inducible nitric oxide synthase activity[J]. *Nitric Oxide*, 2001, 5(5): 432-41.
- [14] Hinson J A, Roberts D W, James L P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2010 (196): 369-405.
- [15] Reid A B, Kurten R C, McCullough S S, et al. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(2): 509-16.
- [16] Xie Y, McGill M R, Dorko K, et al. Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 279(3): 266-74.

Lipopolysaccharides pretreatment reduces acetaminophen-induced acute liver injury in mice

Xu Yuanbao^{1,2}, Xu Dexiang¹, Zhang Cheng¹, et al

(¹Dept of Toxicology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To establish an animal model of APAP-induced acute liver injury in mice, and investigate the protective effect of acute liver injury caused by APAP on the low-dose LPS pretreatment. **Methods** ① 20 ICR male mice were randomly divided into APAP group and LPS + APAP group. APAP group was injected APAP (300 mg/kg); LPS + APAP group was injected intraperitoneally LPS (50 μ g/kg), 3 h later giving APAP (300 mg/kg). After administration, the mice survival situation was closely observed, 72 h later, biochemical indicator was measured. ② ICR male mice were randomly divided into APAP 0, 0.5, 6, 12, 24, 72 h groups and LPS + APAP 0, 0.5, 6, 12, 24, 72 h groups. APAP group was intraperitoneally injected with APAP (300 mg/kg); LPS + APAP group was injected with LPS (50 μ g/kg) 3 h before APAP (300 mg/kg). After administration, serum ALT and other indicator were measured at the corresponding time point. **Results** ① The survival rate of APAP group was 50% within 72 h; while LPS + APAP group had no deaths. ② Low-dose LPS pretreatment could reduce serum ALT ($P < 0.05$), reducing liver necrosis ($P < 0.01$). ③ APAP group and LPS + APAP group liver GSH content differences were not statistically significant. **Conclusion** Low-dose LPS pretreatment could significantly reduce the APAP-induced acute liver injury. Low-dose LPS pretreatment could not reduce GSH depletion, it may activate the body's immune response, and inhibit the downstream mechanisms of GSH depletion.

Key words lipopolysaccharides; acetaminophen; acute liver injury; glutathione