

· 论 著 ·

对乙酰氨基酚致大鼠急重症药物性肝损伤的细胞因子变化研究*

何玲玲¹, 黄庭龙¹, 谢 龙^{2△}

(福建医科大学附属第二医院: 1. 重症医学科; 2. 核医学科, 福建 泉州 362000)

【摘要】目的 了解大鼠模型中对乙酰氨基酚致肝急性损伤的细胞因子变化, 为临床提供诊疗思路。

方法 将 12 只雄性 SD 大鼠, 平均分为空白组和对乙酰氨基酚组(实验组)各 6 只。实验组每只大鼠用 750 mg/kg 对乙酰氨基酚腹腔注射, 12 h 后可造模成功, 观察大鼠肝组织损伤程度; 空白组不作任何处理。检测 2 组血清白细胞介素-6(IL-6)水平及肝组织谷草转氨酶(AST)/谷丙转氨酶(ALT)的表达及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、趋化因子(CXCL)-10 的 mRNA 表达水平。结果 实验组大鼠肝脏损伤评分[(5.3 \pm 0.8)分]高于空白组(0 分), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验组大鼠肝脏组织 AST、ALT 水平[分别为(107.6 \pm 16.7)、(35.1 \pm 5.2)U/g]低于空白组[分别为(178.8 \pm 21.6)、(58.9 \pm 6.8)U/g], 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。实验组大鼠血清中 IL-6 的表达水平[(67.9 \pm 4.8)pg/mL]明显高于空白组[(4.8 \pm 0.4)pg/mL], 差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验组大鼠肝脏组织中 TNF- α 、CXCL-10 表达水平[分别为(3.34 \pm 0.50)、(4.15 \pm 0.54)]均高于空白组[分别为(1.00 \pm 0.14)、(1.00 \pm 0.15)], 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 对乙酰氨基酚可造成大鼠药物性肝损伤, 检测血清 IL-6 水平、肝组织中 AST、ALT 的表达及 TNF- α 、CXCL-10 的 mRNA 表达水平变化有助于疾病的诊断。

【关键词】急重症; 对乙酰氨基酚; 药物性肝损伤; 细胞因子; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.22.002 中图法分类号: R575.3

文章编号: 1009-5519(2024)22-3786-05

文献标识码: A

Study on the changes of cytokines in rats with acute and severe drug-induced liver injury induced by acetaminophen*

HE Lingling¹, HUANG Tinglong¹, XIE Long^{2△}

(1. Department of Critical Care Medicine; 2. Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian 362000, China)

【Abstract】Objective To understand the changes of cytokines in acetaminophen-induced acute liver injury in rat models, and to provide ideas for clinical diagnosis and treatment. Methods A total of 12 male SD rats were equally divided into blank group and acetaminophen group (the experimental group), with six rats in each group. Each rat of experimental group was intraperitoneally injected with 750 mg/kg acetaminophen. After 12 hours, the model was successfully established. The degree of liver tissue injury of rats was observed. The blank group with nothing. The levels of serum interleukin-6 (IL-6), the expression of aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT), and the mRNA expression levels of TNF- α and CXCL-10 (in two groups) were detected. Results The liver injury score of rats in the experimental group [(5.3 \pm 0.8)scores] was higher than that in the blank group (0 score), and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The levels of AST and ALT in liver tissue of rats in the experimental group [(107.6 \pm 16.7), (35.1 \pm 5.2)U/g] were lower than those in the blank group [(178.8 \pm 21.6), (58.9 \pm 6.8)U/g], and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). The expression level of IL-6 in serum of rats in the experimental group [(67.9 \pm 4.8)pg/mL] was significantly higher than that in the blank group [(4.8 \pm 0.4)pg/

* 基金项目: 福建省自然科学基金项目(2021J01277)。

作者简介: 何玲玲(1987-), 硕士研究生, 主治医师, 主要从事重症感染、重症超声研究工作。△ 通信作者, E-mail: xielong@fjmu.

mL], and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The expression levels of TNF- α and CXCL-10 in liver tissue of rats in the experimental group [(3.34 \pm 0.50) and (4.15 \pm 0.54), respectively] were higher than those in the blank group [(1.00 \pm 0.14) and (1.00 \pm 0.15), respectively], and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Acetaminophen can cause drug-induced liver injury in rats. Detecting the changes of serum IL-6 level, the expression of AST and ALT in liver tissue and the mRNA expression of TNF- α and CXCL-10 are helpful for the diagnosis of the disease.

[Key words] Acute and severe; Acetaminophen; Drug-induced liver injury; Cytokines; Rats

对乙酰氨基酚是发达国家导致急性重症肝损伤最常见的原因,在北美占肝衰竭的 45.7%,在英国占 65.4%。这类急性肝损伤容易在数天或数周内演变为急性肝衰竭^[1-3],病情发展迅速,发生大规模肝细胞破坏,可出现进行性黄疸、肝性脑病和严重的凝血异常等多样临床表现,死亡率极高,可达 80.0%;其中脑水肿、败血症和多器官衰竭是主要的死亡原因^[4-6],治疗效果不佳。目前,对急性肝损伤的防治仍是一个严峻课题,有研究显示这类肝损伤及体内细胞因子变化可能是可预测的,白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、趋化因子(CXCL)-10 可能参与肝细胞损伤^[7-9],在对乙酰氨基酚介导的肝损伤中的具体机制尚不明确。因此,本研究通过分析相应动物模型中的 IL-6、TNF- α 、CXCL-10 炎症因子,探讨肝损伤机制,为临床提供诊疗思路,以期改善患者预后。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 对乙酰氨基酚(大连美仑生物有限公司,批号 B353231337769);谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号 C009-2-1、C010-2-1);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 C0105S);大鼠 IL-6 检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号 MM-0190R2);RNAiso Plus(北京宝日生物技术有限公司,货号 9109);cDNA 合成超级预混液(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司,货号 E047-01A);荧光定量试剂盒 SYBR qPCR SuperMix Plus(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司,货号 E096-01B)。

1.1.2 主要仪器 台式低温高速离心机;自动组织脱水机、包埋机、包埋机冷台(湖北孝感阔海医疗科技有限公司);轮转式切片机(赛默飞世尔仪器有限公司);摊片烤片机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司);荧光定量聚合酶链反应(qPCR)仪(美国 ABI 公司);PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);微量紫外可见分光光度计(北京百泰克);K3 酶标仪(广东丹利科技有

限公司);霉菌培养箱(上海力辰邦西仪器科技有限公司)。

1.2.3 动物 共 12 只雄性 SD 大鼠[生产厂家:斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0010],每只重 190~200 g。实验方案和动物使用规章制度经本院生物医学伦理委员会审查批准通过[伦理批号:(2021)福医附二伦理审字(172)号]。

1.2.4 动物分组、建模 将所有大鼠平均分为空白组和对乙酰氨基酚组(实验组),各 6 只;实验组每只大鼠用 750 mg/kg 对乙酰氨基酚腹腔注射,12 h 后可造模成功^[10]。空白组不做任何处理。

1.2.5 动物取材、检测 造模结束后取血清进行后续酶联免疫吸附试验(ELISA)检测;取用肝脏组织,分成 2 份,1 份用多聚甲醛固定,常规石蜡切片后,进行后续 HE 染色实验,观察肝损伤程度,每只大鼠肝组织随机选取 1 张切片,染色病理结果由病理科医生按照肝脏损害情况进行评分,包括:肝细胞脂肪变性 3 分(大泡性 1 分,小泡性 2 分),肝细胞性胆汁淤积 1 分,凋亡小体 1 分,嗜伊红白细胞浸润 2 分,中央静脉炎和(或)门静脉炎 1 分,上皮内肉芽肿 1 分,铁沉着 1 分,总计 10 分^[11-12]。1 份组织取材采用 qPCR 检测各组肝组织中 TNF- α 、CXCL-10 的 mRNA 表达水平(GAPDH 引物由福州尚亚生物合成,引物序列见表 1)。采用 ELISA 检测 IL-6 水平,以及生化检测肝组织中 AST、ALT 的表达。

表 1 引物序列

| 基因 | 序列(5'-3') |
|---------------|-----------------------------------|
| GAPDH | Forward: ACGGCAAGTTCAACGGCACAG |
| | Reverse: GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC |
| TNF- α | Forward: CTCAAGCCCTGGTATGAGCC |
| | Reverse: CTCCAAAGTAGACCTGCCCCG |
| CXCL-10 | Forward: TGCAAGTCTATCCTGTCCGC |
| | Reverse: TCTTTGGCTCACCGCTTCA |

1.3 统计学处理 应用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,并由

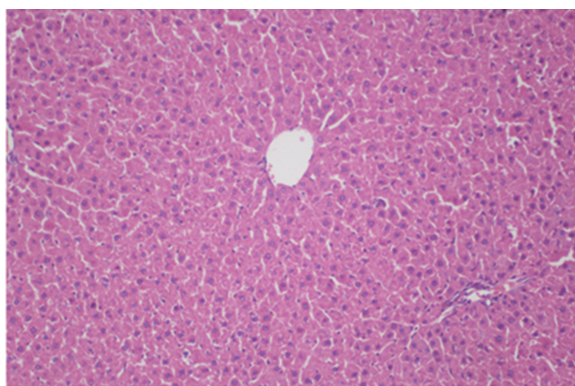
GraphPad prism 9.0 软件进行绘图分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

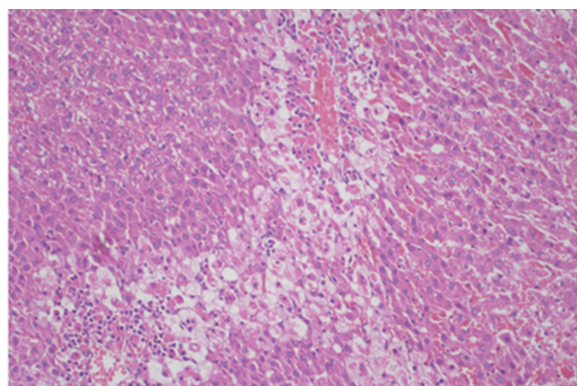
2.1 各组大鼠 HE 染色结果 空白组大鼠肝细胞结构正常,形态清晰且大小均一,无炎症细胞浸润,未见变性和坏死等明显异常;实验组大鼠肝细胞大小不

一,肝窦充血,亚大块肝细胞肿胀,嗜酸性变,部分细胞溶解形成点状及灶状肝细胞坏死,伴炎细胞浸润。见图 1。

2.2 各组大鼠肝脏损伤评分比较 实验组大鼠肝脏损伤评分 $[(5.3 \pm 0.8)$ 分]高于空白组(0 分),差异有统计学意义($P < 0.01$)。



空白组



实验组

图 1 各组大鼠肝组织病理形态学变化(HE 染色,200×)

2.3 各组大鼠肝脏组织 AST、ALT 检测结果比较 实验组大鼠肝脏组织中 AST 水平 $[(107.6 \pm 16.7)$ U/g]低于空白组 $[(178.8 \pm 21.6)$ U/g],差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验组大鼠肝脏组织中 ALT 水平 $[(35.1 \pm 5.2)$ U/g]低于空白组 $[(58.9 \pm 6.8)$ U/g],差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠血清 IL-6 检测结果比较 实验组大鼠血清中 IL-6 的表达水平 $[(67.9 \pm 4.8)$ pg/mL]明显高于空白组 $[(4.8 \pm 0.4)$ pg/mL],差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 各组大鼠肝脏组织 qPCR 检测结果比较 实验组大鼠肝脏组织中 TNF- α 、CXCL-10 表达水平[分别为 (3.34 ± 0.50) 、 (4.15 ± 0.54)]均高于空白组[分别为 (1.00 ± 0.14) 、 (1.00 ± 0.15)],差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

对乙酰氨基酚是临床常用药物,常规剂量是安全的,但药物过量时可引起人或动物的肝毒性。机体在摄入超过肝脏代谢阈值的对乙酰氨基酚后的 8~12 h 内,可迅速产生损伤,约 72 h 达到峰值^[1]。本研究中,实验组大鼠的病理切片可看到肝细胞明显肿胀、坏死,炎症细胞浸润,病理评分明显高于空白组。ALT 和 AST 是评估肝细胞损伤的重要指标之一,ALT、AST 分别存在于肝细胞的细胞质及胞质线粒体中,当肝细胞受损时,其内部的 ALT、AST 释放入血,故而肝损伤时肝组织 ALT、AST 活性下降^[13]。本研究结

果显示,对乙酰氨基酚可显著降低肝组织中 ALT 和 AST 的水平。急性肝损伤时肝细胞损伤或者死亡, TNF- α 、IL-6 等多种细胞因子及生物活性介质可协同引起肝细胞损伤,IL-6、TNF- α 被认为是关键因子,可以调节机体对肝脏毒物的敏感性^[14-15]。

IL-6 是参与机体炎症反应发生、发展过程的重要炎症细胞因子,其在血清中水平升高表明机体存在炎症反应^[8,16]。本研究显示,对乙酰氨基酚实验组血清 IL-6 水平普遍高于空白组,可能由于肝脏内皮细胞和 Kupffer 细胞在 IL-6 刺激下产生其他细胞因子,加速中性粒细胞生成氧自由基产物,增强细胞间黏附,间接损害组织及细胞,促进炎症的进展^[17]。进而引起肝炎、纤维化和肝硬化。IL-6 是一种多酚细胞因子,可以介导炎症免疫反应和慢性炎症,IL-6 与其受体 IL-6R 结合,激活 JAK 酪氨酸酶,形成磷酸化 STAT3,参与肝损伤过程中免疫反应。IL-6/STAT3 信号通路通过调节 bax、bcl-2 等凋亡相关蛋白来影响细胞凋亡,导致肝细胞损伤^[18-21]。

本研究还发现,在对乙酰氨基酚相关肝损伤动物模型中,肝组织 TNF- α 表达水平增高,提示 TNF- α 可能参与对乙酰氨基酚诱导的肝损伤,TNF- α 是由活化的巨噬细胞、NK 细胞及 T 淋巴细胞分泌释放,TNF- α 的生物学活性占 TNF 总活性的 70%~95%。通过提高中性粒细胞的吞噬功能,促进炎症细胞分化作用,血中迅速增多的 TNF- α 会引起急性肝损伤。TNF- α 可参与细胞线粒体的损伤作用、诱导肝细胞凋

亡,对肝窦内皮细胞产生毒性作用,导致内皮细胞肿胀、坏死,加重肝组织损伤^[21-22]。TNF- α 和 IL-6 可激活肝细胞凋亡通路,诱导一氧化氮合酶的表达及过氧亚硝基的生成,形成恶性循环^[23]。

CXCL-10 与其他趋化因子受体相互作用通过级联反应触发白细胞整合素的构象变化,来促进其与内皮细胞上表达的黏附分子相互作用,协调和介导了免疫细胞进入受损或病变器官,在肝脏炎症、坏死过程中起到了重要作用^[24-25]。既往临床研究也表明,CXCL-10 可能在非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、丙型肝炎病毒诱发的肝病、乙型肝炎病毒感染引起的肝硬化中发挥致病作用,抑制 CXCL-10 活性可以特异性减少浸润性炎症单核细胞减轻 Con A 诱导的肝炎;敲除 CXCL-10 功能可以与肥胖无关的方式预防饮食诱发的 NASH。本研究中实验组肝组织 CXCL-10 表达水平明显高于空白组,说明 CXCL-10 在对乙酰氨基酚导致药物性肝损伤过程中起着重要作用,表明肝脏中产生的 CXCL-10 发挥着重要的致病作用^[26-29]。

综上所述,AST、ALT、TNF- α 、IL-6、CXCL-10 等指标与对乙酰氨基酚药物性肝损伤的病情危重程度有明显相关性,可作为肝损伤程度的重要指标。本研究显示,对乙酰氨基酚能有效降低肝脏中 AST、ALT 的酶活力,并可能通过激活一系列细胞因子,形成复杂的炎性因子协调作用,引起肝脏组织损伤,而有关通路有待探讨。急重性药物性肝损伤是较常见的肝脏疾病,细胞因子变化迅速,在临床工作中其可为肝损伤早期诊治提供助力,对提高诊疗、患者预后具有重要意义。但本研究也存在一定局限性,本实验对象为 SD 大鼠,每组样本量较小,可能导致统计测试的效能不足,限制了研究结果的普适性。另外,本研究中空白组未接受任何实验操作,未与已知有效的处理实验进行比较,可能无法证明实验操作或处理的有效性,因此在未来的实验设计中应采用更大的样本量、增加阳性对照或阴性对照,提高统计效能,减少遗漏对实验干预真实效果的评估。同时考虑不同物种与人类在药物反应和疾病发生机制上的差异,未来的研究可以选择与人类在生物学特征上更为相似的动物模型,以提高研究的准确性和相关性。

参考文献

- [1] STRAVITZ R T, LEE W M. Acute liver failure [J]. *Lancet*, 2019, 394(10201): 869-881.
- [2] REUBEN A, TILLMAN H, FONTANA R J, et al. Outcomes in adults with acute liver failure between 1998 and 2013: an observational cohort study[J]. *Ann Intern Med*, 2016, 164(11): 724-732.
- [3] BERNAL W, HYYRYLAINEN A, GERA A, et al. Lessons from look-back in acute liver failure? A single centre experience of 3300 patients [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 74-80.
- [4] 王丽, 杜冬华, 李忠浩, 等. 驴乳清蛋白通过抑制 MAPK 和 NF- κ B 信号通路缓解对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(7): 76-81.
- [5] BOWER W A, JOHNS M, MARGOLIS H S, et al. Population-based surveillance for acute liver failure[J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102(11): 2459-2463.
- [6] GERMANI G, THEOCHARIDOU E, ADAM R, et al. Liver transplantation for acute liver failure in Europe: outcomes over 20 years from the ELTR database [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(2): 288-296.
- [7] PENG Y, GONG J P, LIU C A, et al. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(19): 2890-2893.
- [8] 邵宇云, 王涵, 王潇, 等. Notch1 在对乙酰氨基酚诱导的肝损伤中的作用及机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(10): 1350-1355.
- [9] ISHIDA Y, KONDO T, TSUNNEYAMA K, et al. The pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55 in acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 15(1): 59-67.
- [10] 明雅南, 李春敏, 张静怡, 等. 对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤和肝衰竭模型中线粒体基因组转录改变[J]. *肝脏*, 2016, 21(6): 447-451.
- [11] LIU Y Q, LI P, WANG F F, et al. Comparison of diagnostic accuracy of 3 diagnostic criteria combined with refined pathological scoring system for drug-induced liver injury [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(41): e22259.
- [12] 胡锡琪. 大蒜多糖 C 对免疫性肝损伤小鼠血清及肝组织 ALT, AST 的影响[J]. *咸宁学院学报(医学版)*, 2005, 19(1): 24-25.

- [13] 赵骥,郑敏,鲍翠玉,等. 大蒜多糖 C 对免疫性肝损伤小鼠血清及肝组织 ALT、AST 的影响[J]. 咸宁学院学报(医学版),2005,19(1):24-25.
- [14] JAESCHKE H,GORES G J, CEDERBAUM A I, et al. Mechanisms of hepatotoxicity[J]. *Toxicol Sci*,2002,65(2):166-176.
- [15] MALIK G,WILTING J,HESS C F, et al. PECAM-1 modulates liver damage induced by synergistic effects of TNF- α and irradiation[J]. *J Cell Mol Med*,2019,23(5):3336-3344.
- [16] SUN Y, GU J, LIU R, et al. IL-2/IL-6 ratio correlates with liver function and recovery in acute liver injury patients[J]. *APMIS*,2019,127(6):468-474.
- [17] SCHMIDT-ARRAS D, ROSE-JOHN S. IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy[J]. *J Hepatol*,2016,64(6):1403-1415.
- [18] NASEEM S, HUSSAIN T, MANZOOR S. Interleukin-6: a promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*,2018,39(1):36-45.
- [19] 姚传霞,王怡雯,龚丹丹,等. 人源抗 TLR4 抗体 IgG2 对对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(5):645-651.
- [20] ZHANG J X, LI N, XU Q Y, et al. Kupffer cell depletion attenuates IL-6/STAT3 mediates hepatocyte apoptosis in immunological liver injury of trichloroethylene sensitized mice[J]. *Int Immunopharmacol*,2020,88(1):106897.
- [21] LACOUR S, GAUTIER J C, PALLARDY M, et al. Cytokines as potential biomarkers of liver toxicity[J]. *Cancer Biomark*,2005,1(1):29-39.
- [22] SHUH M, BOHORQUEZ H, LOSS G E J, et al. Tumor necrosis factor- α : life and death of hepatocytes during liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Ochsner J*,2013,13(1):119-130.
- [23] JAESCHKE H, FISHER M A, LAWSON J A, et al. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model [J]. *J Immunol*,1998,160(7):3480-3486.
- [24] TOMITA K, FREEMAN B L, BRONK S F, et al. CXCL10-Mediates macrophage, but not other innate immune cells-associated inflammation in murine nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Sci Rep*,2016,6(1):28786.
- [25] SINGH K P, ZERBATO J M, ZHAO W, et al. Intrahepatic CXCL10 is strongly associated with liver fibrosis in HIV-Hepatitis B co-infection[J]. *PLoS Pathog*,2020,16(9):e1008744.
- [26] NAGAKI M, IWAI H, NAIKI T, et al. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor- α are associated with fatality in fulminant hepatitis [J]. *J Infect Dis*,2000,182(4):1103-1108.
- [27] 蒙光义,王冬晓,彭评志,等. 电针足三里对对乙酰氨基酚诱发大鼠肝损伤炎症细胞因子的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志,2015,21(5):575-577.
- [28] LI B H, GARSTKA M A, LI Z F. Chemokines and their receptors promoting the recruitment of myeloid-derived suppressor cells into the tumor [J]. *Mol Immunol*,2020,117:201-215.
- [29] DAI S, LIU F M, QIN Z N, et al. Kupffer cells promote T-cell hepatitis by producing CXCL10 and limiting liver sinusoidal endothelial cell permeability [J]. *Theranostics*,2020,10(16):7163-7177.

(收稿日期:2024-06-26 修回日期:2024-08-23)