文章编号:1000-5404(2010)11-1145-04

论著

S-腺苷蛋氨酸对内毒素性肝损害的保护作用

张 钊,龚建平 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 探讨S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)对内毒素(lipolmlysaccharide, LPS)性肝损害的保护机制。**方法** 100只BABL/c小鼠随机数字法均分为2组,LPS组:腹腔注射10 mg/kg的LPS;SAM组:在注射10 mg/kg LPS前2 h于小鼠腹腔内注射100 mg/kg SAM。记录两组小鼠存活率;光镜和电镜观察组织病理学改变;酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-10(IL-10)的浓度;免疫组织化学法(SABC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中Toll样受体4(TLR4)和肝X受体α(LXRα)的蛋白表达水平。**结果** 两组24、48、72、120 h存活率比较,SAM组显著高于LPS组[(80.0%、70.0%、60.0%、50.0%) *vs* (50.0%、40.0%、30.0%、30.0%),$P<0.05$],肝脏病理损害程度减轻;SAM组血清中TNF-α水平显著低于LPS组,差异有统计学意义[(1791.79±122.19) pg/ml对(718.83±53.27) pg/ml,$P<0.05$];SAM组血清中IL-10增加且高峰前移,与LPS组比较差异有统计学意义[(418.69±38.77) pg/ml对(347.09±31.37) pg/ml,$P<0.05$];SAM组肝组织中LXRα表达明显增加,而TLR4表达则明显减少,两者与LPS组比较差异均有统计学意义{Western blot灰度值[TLR4:(1.550±0.034)对(1.365±0.017),LXRα:(1.605±0.027)对(1.375±0.014)],$P<0.05$}。**结论** SAM能明显减轻LPS所致的肝损害,其机制可能与其降低肝脏各种细胞TLR4的表达,增强LXRα的表达,最终导致TNF-α水平降低和IL-10水平增高有关。

[关键词] S-腺苷蛋氨酸;内毒素;肝X受体α;Toll样受体4

[中图法分类号] R575; R392.3; R977.4 **[文献标志码]** A

Protective effect of S-adenosylmethionine against liver injury induced by lipopolysaccharides

Zhang Zhao, Gong Jianping (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To study the protective mechanism of S-adenosylmethionine (SAM) underlying liver injury induced by lipopolysaccharides (LPS). **Methods** One hundred BABL/c mice were randomly divided into LPS group and SAM group. Mice in LPS group were intraperitoneally injected with 10 mg/kg LPS, and the mice in SAM group were injected with 100 mg/kg SAM 2 h before receiving the same dose of LPS. The survival rate of mice in 2 groups was recorded in 24, 48, 72 and 120 h after LPS injection. Histopathological changes in liver of mice were examined in 0, 1, 3, 6, 12 and 24 h after LPS injection. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-10 (IL-10) levels in serum were measured by ELISA analysis at above time points. Expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and liver X receptor α (LXRα) in hepatic tissues was detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** SAM increased the survival rate of mice from 50.0%, 40.0%, 30.0%, and 30.0% before LPS injection to 80.0%, 70.0%, 60.0%, and 50.0% after its injection ($P<0.05$), and attenuated the LPS-induced pathologic changes in liver tissue. The serum TNF-α level was significantly lower in SAM group than in LPS group (718.83±53.27 *vs* 1791.79±122.19 pg/ml, $P<0.05$), while the serum IL-10 level was significantly higher in SAM group than in LPS group (418.69±38.77 *vs* 347.09±31.37 pg/ml, $P<0.05$) with its peaking shifted to the left. The expression level of LXRα in hepatic tissue was significantly higher while that of TLR4 in hepatic tissue was significantly lower in SAM group than in LPS group (gray value of Western blotting for TLR4: 1.550±0.034 *vs* 1.365±0.017, for LXRα: 1.605±0.027 *vs* 1.375±0.014, $P<0.05$). **Conclusion** SAM can significantly attenuate LPS-

[基金项目] 国家自然科学基金(30772098)

[通信作者] 龚建平,电话:(023)63693521,E-mail:gongjianping11@126.com

induced liver injury by reducing the expression of TLR4 and increasing the expression of LXRα in liver cells, and thus lead to TNF-α decreased and IL-10 increased.

[Key words] S-adenosylmethionine; lipopolysaccharides; liver X receptors α; toll like receptor 4

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772098). Corresponding author: Gong Jianping, Tel: 86-23-63693521, E-mail: gongjianping11@126.com

S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)是存在于人体所有组织和体液中的一种生理活性分子,它参与体内多种重要的生化反应,对于肝细胞再生、分化以及调节肝细胞对于各种损伤的敏感程度都是非常重要的[1],但其负性抑制炎症反应的作用机制尚不完全清楚[2]。现已知经典感染传导通路中,革兰阴性细菌细胞壁上的主要成分脂多糖(lipolmlysaccharide, LPS)通过与Kupffer细胞(kupffer cells, KCs)表面的跨膜受体Toll样受体4(toll like receptor 4, TLR4)等相结合后,引起传导通路下游肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等大量促炎症介质释放入血,导致全身性炎症反应及多器官功能损害[3],同时抑炎介质白细胞介素-10(IL-10)等水平也相应增高,参与抑制炎症反应。在上述炎症反应过程中,Kupffer细胞及肝脏成为内毒素的主要靶细胞和器官[4]。近期国内外研究的热点肝X受体(liver X receptors, LXR)α是一类与脂类代谢有关的核受体,位于巨噬细胞的LXRα主要在脂代谢中起重要作用,同时能负性调控巨噬细胞炎性基因的表达,明显抑制炎症反应[5-7],其作用机制的研究已取得了较大突破[8]。基于上述情况本实验拟通过观察SAM预处理对LPS作用下小鼠肝脏的LXRα和TLR4以及炎症通路中重要的下游促炎和抑炎细胞因子表达的影响,探讨SAM减轻LPS作用下肝脏的损伤和其作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

10~12周龄雌性清洁级健康BABL/c小鼠,体质量(18±1)g,由重庆医科大学实验动物中心提供;LPS(Escherichia coli, O111B4),购自美国Sigma公司;S-腺苷蛋氨酸购自美国Sigma公司;羊抗小鼠TLR4抗体购自Abcam公司(ab53629);羊抗小鼠LXRα抗体购自美国Santa Cruz公司(sc-1202);小鼠TNF-α、IL-10酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自北京赛驰生物科技有限公司。

1.2 实验分组

BABL/c小鼠100只,随机数字法均分为2组。LPS组:腹腔注射10 mg/kg的LPS,建立内毒素性肝损害动物模型[9]。SAM组:腹腔注入10 mg/kg LPS前2 h于小鼠腹腔内注射100 mg/kg的SAM,建立SAM预处理的内毒素性肝损害动物模型[10]。每组各取10只小鼠,分别观察记录LPS处理后24、48、72、120 h时动物的存活率;每组剩余动物分别在注射LPS后0、1、3、6、12、24 h时相点各随机取6只乙醚麻醉后取材实验检测[9]。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 组织病理学 光镜检查,取左肝外叶组织,常规石蜡包埋、HE染色;电镜检查,取左肝外叶组织,4%戊二醛固定,常规电镜制样,透射电镜观察。

1.3.2 免疫组织化学染色 取左肝外叶组织,按SABC法相应步骤检测TLR4和LXRα的蛋白表达水平及分布。

1.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot) 取左肝组织匀浆、离心提取组织蛋白,按Western blot操作方法检测TLR4和LXRα的蛋白表达水平。

1.3.4 血清中TNF-α和IL-10的含量测定 取静脉血,静置凝血,离心提取血清,按ELISA法相应步骤进行检测。

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0软件处理,部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较用 q 检验,组间比较用 t 检验,率的比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 SAM预处理对LPS攻击小鼠存活率的影响

两组小鼠在LPS处理后24、48、72、120 h时的存活率:LPS组为50.0%、40.0%、30.0%、30.0%;SAM组为80.0%、70.0%、60.0%、50.0%,两组间同时点存活率差异有统计学意义($P<0.05$)。

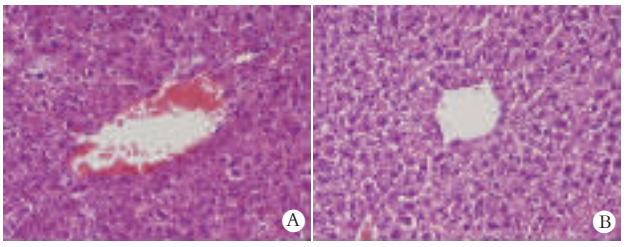
2.2 SAM预处理对肝组织病理形态学的影响

2.2.1 光镜结果显示 LPS组3 h时,肝细胞出现不同程度肿胀、中央静脉淤血扩张、肝血窦淤血、空泡样变性、汇管区有炎性细胞浸润,12 h时可见中央静脉内有血栓形成、少量肝细胞核出现固缩,24 h时肝组织出现点片状、大片状坏死甚至肝窦结构被破坏;SAM组与LPS组在同时点上形态学比较,肝细胞肿胀、空泡样变性、中央静脉淤血扩张及血栓形成明显减轻,汇管区炎性细胞浸润减少,未见大片状坏死及肝窦结构的破坏(图1)。

2.2.2 电镜结果显示 LPS组3 h时,可见大量次级溶酶体,表面突起增多,胞内髓鞘样结构增多,凋亡小体易见,12 h时肝细胞脂肪变,糖原颗粒增多,线粒体空化及固缩,24 h时染色质边集、核脆裂,内皮细胞肿胀;SAM组,肝实质细胞病变较同时点LPS组轻(图2)。

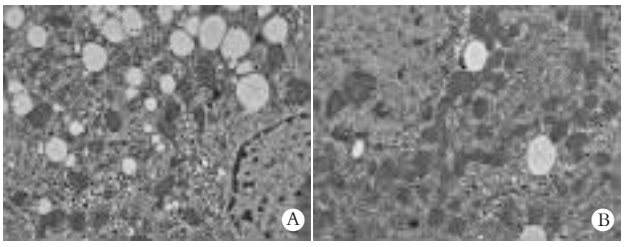
2.3 SAM预处理对肝组织TLR4蛋白表达的影响

免疫组织化学结果显示:LPS组1、3、6 h时肝细胞、Kupffer细胞内可见棕黄色颗粒,主要分布于肝血窦周围,随时间的推移棕黄色颗粒增多;SAM组阳性反应细胞也主要分布于肝血窦周围,3h时染色细胞最多,SAM组和同时点LPS组比较染色细胞数目少且染色程度轻(图3)。Western blot结果显示:3 h时,SAM组肝组织中TLR4的表达较同时点LPS组明显减少,差异有统计学意义[灰度值:(1.550±0.034)对(1.365±0.017),$P<0.05$(图4)]。



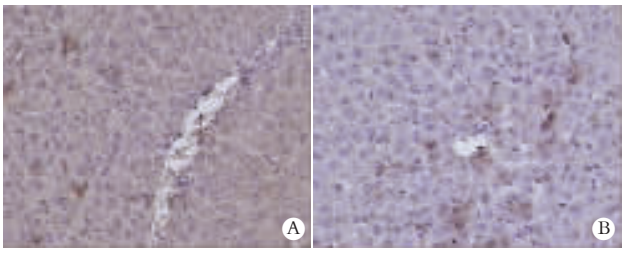
A：LPS 组；B：SAM 组

图 1　光镜观察两组小鼠 12 h 时肝组织病理形态学变化　（HE ×400）



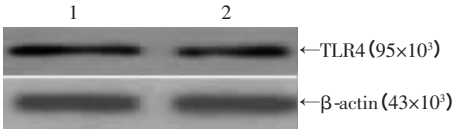
A：LPS 组；B：SAM 组

图 2　电镜观察两组小鼠 12 h 时肝组织病理形态学变化　（TEM ×12 000）



A：LPS 组；B：SAM 组

图 3　免疫组织化学观察两组小鼠 3 h 时肝组织 TLR4 蛋白表达　（SABC ×200）

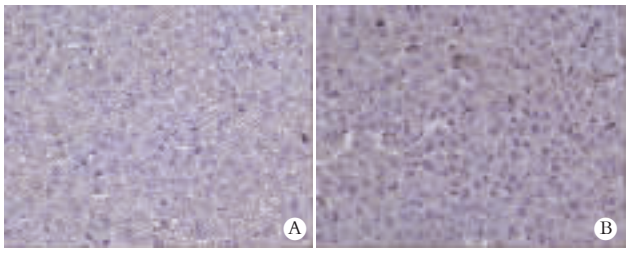


1：LPS 组；2：SAM 组

图 4　Western blot 检测 3 h 时 TLR4 蛋白表达水平

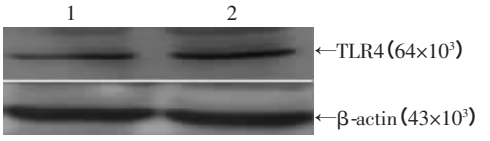
2.4　SAM 预处理对肝组织 LXRα 蛋白表达的影响

免疫组织化学结果显示：LPS 组和 SAM 组 3、6、12 h 时内皮细胞、Kupffer 细胞内可见棕黄色颗粒，主要分布于肝血窦周围，随时间的推移阳性表达增加，SAM 组和同时点 LPS 组比较染色细胞数目多且染色程度深（图 5）。Western blot 结果显示：12h 时，SAM 组肝组织中 LXRα 的表达较同时点 LPS 组明显增加，差异有统计学意义［灰度值：（1.605 ± 0.027）对（1.375 ± 0.014），$P<0.05$、］（图 6）。



A：LPS 组；B：SAM 组

图 5　免疫组织化学观察两组小鼠 12 h 时肝组织 LXRα 蛋白表达　（SABC ×200）



1：LPS 组；2：SAM 组

图 6　Western blot 检测 12 h 时 LXRα 蛋白表达水平

2.5　SAM 预处理对血清中细胞因子含量的变化影响

SAM 组 TNF-α 的含量明显低于同时点的 LPS 组，差异有统计学意义（表 1）；SAM 组 IL-10 的含量明显高于同时点的 LPS 组，差异有统计学意义，且增长幅度远大于 LPS 组，含量高峰也提前至 12 h 时出现（表 2）。

表 1　SAM 预处理对血清中 TNF-α 的影响（pg/ml，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
LPS 组	61.04 ± 6.77	360.21 ± 23.99	1791.79 ± 122.19	1373.28 ± 87.16	632.51 ± 60.27	240.77 ± 34.55
LPS + SAM 组	62.89 ± 6.51	299.91 ± 29.44[a]	718.83 ± 53.27[a]	542.91 ± 40.86[a]	241.70 ± 22.72[a]	178.11 ± 20.83[a]

a：$P<0.05$，与 LPS 组比较

表 2　SAM 预处理对血清中 IL-10 的影响（pg/ml，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
LPS 组	24.39 ± 4.45	28.69 ± 5.37	42.83 ± 6.16	109.71 ± 14.49	213.51 ± 26.06	347.09 ± 31.37
LPS + SAM 组	25.27 ± 4.46	46.91 ± 6.59[a]	74.61 ± 13.10[a]	208.12 ± 20.13[a]	418.69 ± 38.77[a]	354.51 ± 23.88[a]

a：$P<0.05$，与 LPS 组比较

3　讨论

尽管有种类繁多的抗生素类药物，但全身剂量性的使用抗生素其直接后果是在迅速杀死细菌的同时导致短时间内大量 LPS 释放入血，引起严重的全身性炎症反应，所以内毒素血症至今仍是临床治疗中的难点，脓毒症患者的死亡率也高达 28%[11]。上述事实说明，寻找研究对 LPS 损害抑制的方法和药物是非常重要的。本实验所得结果结论可以为内毒素性肝损害的临床治疗提供新的思路和手段。

LPS 通过 CD14 和 MD2 与 TLR4 结合，从而启动细胞内的信号转导通路，激活巨噬细胞，导致全身性炎症反应[12,13]。有实验表明，TLR4 基因敲除的小鼠能够耐受 LPS 的刺激[14]，所以 TLR4 是整个 LPS 信号跨膜传导通路的必经门户，是炎症反应得以发生的关键蛋白受体。LPS 信号跨膜传递激活炎症传导通路后经过一系列复杂的细胞内外生化反应[15]，导致各种促炎介质（如 TNF-α）和抑炎介质（如 IL-10）的大量释放，因此 TNF-α 和 IL-10 是反映炎症程度的重要下游生化学细胞因子指标[16]。另外，机体发生炎症反应时，LXRα 作为一类重要抑炎性核受体启动、参与抑制炎症反应[17]。现已证实，LXRα 活化后能抑制由 LPS 诱导的一系列炎症因子的释放[18]。近期研究表明，可能是 LXRα 抑制 LPS 信号跨膜传导通路中 IRF3、GRIP1 的表达，同时降低通路中 IRAK-4 和 NF-κB 的蛋白表

达水平,从而发挥抗炎效应[19]。

本实验表明,两组小鼠肝脏病变(光镜、电镜的结果)随着时间推移进行性加重,在同时点上比较,SAM组较LPS组病变程度明显减轻,说明SAM有效的减轻了内毒素性肝损害。比较两实验组ELISA所检测小鼠血清中TNF-α和IL-10的结果(同时间点比较,SAM组TNF-α含量低于LPS组,IL-10则相反),从生化学细胞因子的角度说明SAM能有效的减轻炎症反应。SAM明显提高存活率的实验结果现象也可以证明上述结论。

比较两实验组TLR4结果,SAM组较LPS组TLR4蛋白的表达水平明显降低,故我们认为SAM能有效的抑制炎症反应是其可以明显降低LPS信号跨膜传递的关键蛋白受体TLR4的表达来实现的。从本实验LXRα的结果来看,SAM组较LPS组LXRα蛋白的表达水平明显增加,不难得出:SAM能有效的增强LXRα蛋白的表达,而LXRα是一类与脂类代谢和负性调控巨噬细胞炎性基因有关的核受体,故我们认为SAM能通过增强抑炎性核受体LXRα蛋白的表达,导致TNF-α水平降低和IL-10水平增高,从而明显抑制炎症反应,减轻LPS所致的肝损害。

综上所述,SAM负性调节炎症反应的作用是通过多种有效途径来实现的:SAM可以明显降低TLR4的表达,同时能增强LXRα的表达,以上两种作用最终导致TNF-α水平降低和IL-10水平增高。下调促炎介质TNF-α水平,使其在炎症反应中的后续事件不能发生[20]。上调抑炎介质IL-10水平,使其通过抑制Th-1细胞和单核细胞活化而减少炎性介质TNF-α等的生成[21],从而发挥抗炎作用。TNF-α水平降低和IL-10水平增高所致后果既是本实验得出的结论:SAM能明显抑制炎症反应,减轻LPS所致的肝损害。

参考文献:

[1] Ara A I, Xia M, Ramani K, *et al*. S-adenosylmethionine inhibits lipopolysaccharide-induced gene expression via modulation of histone methylation[J]. Hepatology, 2008, 47(5): 1655 - 1666.

[2] Sufrin J R, Finckbeiner S, Oliver C M. Marine-derived metabolites of S-adenosylmethionine as templates for new anti-infectives[J]. Mar Drugs, 2009, 7(3): 401 - 434.

[3] Giamarellos-Bourboulis E J, Baziaka F, Antonopoulou A, et a1. Clarithromycin co-administered with amikacin attenuates systemic inflammation in experimental sepsis with Escherichia coli [J]. Int J Antimicrob Agents, 2005, 25(2): 168 - 172.

[4] Ogushi I, Iimuro Y, Seki E, *et al*. Nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides prevent endotoxin-induced fatal liver failure in a murine model[J]. Hepatology, 2003, 38(2): 335 - 344.

[5] Joseph S B, Castrillo A, Laffitte B A, *et al*. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors[J]. Nat Med, 2003, 9(2): 213 - 219.

[6] Birrell M A, Catley M C, Hardaker E, *et al*. Novel role for the liver X nuclear receptor in the suppression of lung inflammatory responses[J]. J Biol Chem, 2007, 282(44): 31882 - 31890.

[7] Terasaka N, Hiroshima A, Ariga A, *et al*. Liver X receptor agonists inhibit tissue factor expression in macrophages[J]. FEBS J, 2005, 272(6): 1546 - 1556.

[8] 欧志兵, 黄庆勇, 孙科, 等. LXRα通过下调IRF3、GRIP1负性调控Kupffer细胞中LPS诱导的炎症反应机制[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(5): 848 - 851.

[9] 游海波, 王强, 李旭宏, 等. 甘氨酸对内毒素性肝损害保护作用的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(8): 574 - 577.

[10] 郭志刚, 何晓顺, 熊俊, 等. S-腺苷蛋氨酸对大鼠缺血再灌注肝脏能量代谢的影响[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2007, 14(2): 181 - 184.

[11] Christ-Crain M, Morgenthaler N G, Struck J, *et al*. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study[J]. Crit Care, 2005, 9(6): R816 - R824.

[12] Moriya T, Fukatsu K, Maeshima Y, *et al*. Nutritional route affects ERK phosphorylation and cytokine production in hepatic mononuclear cells[J]. Ann Surg, 2007, 245(4): 642 - 650.

[13] Lauer S, Kunde Y A, Apodaca T A, *et al*. Soluble MD2 increases TLR4 levels on the epithelial cell surface[J]. Cell Immunol, 2009, 255(1/2): 8 - 16.

[14] Su G L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(2): G256 - G265.

[15] Yamamoto M , Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling[J]. Mol Immunol, 2004, 40(12): 861 - 868.

[16] Menezes G B, Lee W Y, Zhou H, *et al*. Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10 [J]. J Immunol, 2009, 183(11): 7557 - 7568.

[17] Morello F, Saglio E, Noghero A, *et al*. LXR-activating oxysterols induce the expression of inflammatory markers in endothelial cells through LXR-independent mechanisms[J]. Atherosclerosis, 2009, 207(1): 38 - 44.

[18] Myhre A E, Agren J, Dahle M K, *et al*. Liver X receptor is a key regulator of cytokine release in human monocytes[J]. Shock, 2008, 29(4): 468 - 474.

[19] 王丁, 苗春木, 龚建平. 肝X受体激动剂对脂多糖诱导的炎症反应相关因子IRAK-4和NF-κB的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(4): 293 - 295, 298.

[20] Thomas P, Lazure D A, Moussa R, *et al*. Identification of two novel LPS-binding proteins in Kupffer cells: implications in TNF-alpha production[J]. J Endotoxin Res, 2006, 12(6): 352 - 357.

[21] Zhong J, Deaciuc I V, Burikhanov R, *et al*. Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1762(4): 468 - 477.

(**收稿**:2009-12-08;**修回**:2010-01-05)

(编辑 王 红)