DOI:10.16016/j.1000-5404.202105117

低剂量 LPS 通过上调巨噬细胞 TLR4 表达促进非酒精性脂肪性肝炎进展

于 洋[1],付晓燕[1,2],吴艳红[1],许 虎[1],杜宪红[1,3],吴沛恩[1],崔瑞翔[1],程丽霞[4],梁淑娟[1,2] 261053 山东 潍坊,潍坊医学院:山东省高校免疫学重点实验室[1],免疫学教研室[2],病原微生物教研室[3],第一附属医院内分泌科[4]

[摘要] **目的** 探讨 LPS 在促进非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)中的作用及相关机制。**方法** 6~8 周龄 B6.WT 小鼠分别给予正常饲料(ND 组)、高脂饲料(HFD 组)和 HFD 联合 LPS 注射(HFD+LPS 组)。HFD+LPS 组每周 1 次腹腔注射 LPS(0111:B4,1.25 μg/g 体质量),其他两组注射等体积生理盐水,饲养 10 周。酶法检测血清和肝组织 TG、TC、ALT、AST 水平,油红 O 染色观察肝内脂质沉积;ELISA 法、RT-qPCR 检测血清和肝组织 IL-1β、TNF-α、CCL5、CCL2、CCL4 水平;HE 染色观察肝组织病理变化和炎症细胞浸润;免疫荧光(immunofluorescence,IF)观察肝内巨噬细胞、中性粒细胞浸润及 TLR4 蛋白表达;流式细胞术(flow cytometry,FCM)观察肝脏浸润单个核细胞中巨噬细胞及中性粒细胞比例。**结果** HFD 组血清 TG、TC 水平显著高于 ND 组(P 均<0.05)。HFD+LPS 组肝内脂质沉积以及 TG、TC 水平显著高于 HFD 组(P 均<0.01),肝脏细胞空泡样变、炎症细胞浸润更为明显,NAS 评分(P<0.05)和肝脏单个核细胞数(P<0.01)显著高于 HFD 组。同时,IF 及 FCM 检测证实肝脏巨噬细胞、中性粒细胞浸润显著多于 HFD 组(P 均<0.05),HFD+LPS 组血清中 IL-1β、TNF-α、CCL5、CCL2、CCL4 水平显著高于 HFD 组(P<0.05);肝组织中 IL-1β、CCL5、CCL2 的蛋白和 mRNA 水平均显著高于 HFD 组(P 均<0.05)。免疫荧光结果提示 LPS 作用后肝组织中 TLR4 呈现明显的细胞膜转位,且 TLR4 与巨噬细胞共定位显示,HFD+LPS 组巨噬细胞表面 TLR4 表达显著高于 HFD 组(P<0.01)。**结论** LPS 通过诱导趋化因子及促炎因子释放,募集以巨噬细胞为主的炎性细胞浸润,从而加重 HFD 小鼠 NASH 进程;其机制可能与上调巨噬细胞表面 TLR4 表达有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎;高脂饲料;LPS;趋化因子;炎症因子;TLR4
[中图法分类号] R363.21;R392.3;R575.5 [文献标志码] A

Low-dose LPS promotes progress of non-alcoholic steatohepatitis by up-regulating TLR4 in macrophages

YU Yang[1], FU Xiaoyan[1,2], WU Yanhong[1], XU Hu[1], DU Xianhong[1,3], WU Pei'en[1], CUI Ruixiang[1], CHENG Lixia[4], LIANG Shujuan[1,3] [1]Key Laboratory for Immunology in Universities of Shandong Province, [2]Department of Immunology, [3]Department of Pathogenic Microbiology, [4]Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang Medical University, Weifang, Shandong Province, 261053, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and underlying mechanisms of lipopolysaccharide (LPS) in the promotion of non-alcoholic steatohepatitis. **Methods** Wild type B6 (B6.WT) mice aged 6~8 weeks were randomly divided into 3 groups and fed with normal diet (ND), high-fat diet (HFD) and HFD

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873883);国家自然科学基金青年项目(82000525);山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS065);潍坊市科技发展计划项目(2020YX011)

[通信作者] 梁淑娟,E-mail:liangshj@wfmc.edu.cn.
程丽霞,E-mail:wfnfmclx@163.com.

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

combined LPS injection (HFD+LPS), respectively. LPS (0111:B4, 1.25 μg/g body weight) was injected intraperitoneally to the mice of the HFD+LPS group once a week, and normal saline of same amount was given to the mice of the other 2 groups. After 10 weeks' feeding, the levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in the serum and liver tissue were detected by enzyme based assays. The lipid deposition in the liver was observed by oil red O staining. The levels of IL-1β, TNF-α, CCL5, CCL2 and CCL4 in the serum and liver tissue were measured by ELISA. The mRNA levels of IL-1β, TNF-α, CCL5, CCL2 and CCL4 in the liver tissue were detected by quantitative real time-PCR (RT-qPCR). The pathological changes of liver tissue and inflammatory cell infiltration were detected by HE staining. Infiltration of macrophages and neutrophils, and the expression of TLR4 in the liver tissue was analyzed by immunofluorescence (IF) assay. Proportion of macrophages and neutrophils in the liver was assessed by flow cytometry. **Results** The serum levels of TG and TC were significantly higher in the HFD group than the ND group ($P<0.05$). Their contents in the liver were markedly increased in the HFD+LPS group than the HFD group ($P<0.01$). The mice from the HFD+LPS group had more obvious vacuolar degeneration of liver cells, infiltration of inflammatory cells, higher NAS score ($P<0.05$) and larger number of infiltrated mononuclear cells ($P<0.01$) when compared with the HFD group. IF assay and flow cytometry proved that HFD + LPS treatment induced significantly obvious infiltration of hepatic macrophages and neutrophil accumulation ($P<0.05$). ELISA proved that HFD+LPS treatment increased serum levels of IL-1β, TNF-α, CCL5 and CCL2 ($P<0.05$), elevated mRNA levels of IL-1β, CCL5 and CCL2 in the liver tissue ($P<0.05$). IF revealed that TLR4 showed obvious cell membrane translocation in liver tissue after LPS treatment, and the co localization of TLR4 and macrophages showed that the expression of TLR4 on the surface of macrophages in HFD + LPS group was significantly higher than that in HFD group($P<0.01$). **Conclusion** LPS mediates intrahepatic infiltration of macrophages and neutrophils and aggravates the process of NASH in mice fed with HFD through upregulating TLR4 expression on macrophages to induce chemokines and inflammatory cytokines.

[**Key words**] non-alcoholic steatohepatitis; high-fat diet; lipopolysaccharide; chemokine; inflammatory cytokine; Toll-like receptor 4

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81873883), the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82000525), the Project of Medical Science and Technology Development Plan of Shandong Province (2018WS065), and the Project of Science and Technology Development Plan of Weifang City (2020YX011). Corresponding authors: LIANG Shujuan, E-mail: liangshj@wfmc.edu.cn; CHENG Lixia, E-mail: wfnfmclx@163.com.

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD)是一种与胰岛素抵抗和遗传易感密切相关的代谢应激性肝损伤,主要病理特征为肝细胞内甘油三酯(Triglyceride, TG)异常聚集[1]。其疾病谱系包括:非酒精性单纯性脂肪肝(non-alcoholic simple fatly liver, NAFL)以及由其演变的非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)和非酒精性脂肪性肝硬化。近年来,随着饮食结构西方化,摄入食品中以脂肪、糖类(蔗糖或果糖)为代表的高热量食物和饮品所占比例明显增加,NAFLD 发病率也逐年递增。NASH 是 NAFLD 疾病谱中关键性的进展阶段[2],是肝硬化甚至肝细胞肝癌等严重致死性疾病的重要危险因素[3]。因此,明确 NASH 发病机制对 NAFLD 治疗及减缓恶化有重要意义。

相关研究指出,高脂肪和高糖饮食能够改变肠道菌群,出现肠道菌群失调或紊乱,此时肠道内革兰阴性菌过度生长会引起内源性内毒素(endotoxin)释放增加。高脂饮食通常也会引起肠黏膜屏障的破坏,由于"肠肝轴"的存在,肠腔内的脂多糖(Lipopolysacchrides, LPS)可以通过肝门静脉进入血液循环。进入血液循环的 LPS 可导致全身炎症[4],从而影响相应器官疾病的发生,例如循环型 LPS 可以加重动脉粥样硬化[5]。肝脏是 LPS 进入循环前首先被累及的器官之一,已经有研究表明,肠道菌群紊乱导致的持续性低浓度 LPS

在 NASH 中起着重要作用,但相关机制尚不完全明确。为此,本研究在高脂饮食基础上对小鼠进行低剂量 LPS 腹腔注射,进一步探讨内源性 LPS 在 NASH 进展中的作用及相关机制,以期为 NASH 的临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周雄性野生型 B6.WT(C57BL/6)小鼠(购于潍坊医学院动物实验中心,46 只,体质量 18~20 g)饲养在无特定病原体环境中,恒温(20±2)℃、恒湿(50±2)%、明暗各 12 h,所有动物研究根据潍坊医学院动物保护与使用委员会批准的方案进行。

1.1.2 动物饲料 高脂饲料(货号 MD12033,供能比:蛋白质 20%、脂肪 60%、碳水化合物 20%)购自江苏美迪森生物医药有限公司。大小鼠繁殖饲料(供能比:蛋白质 24.02%、脂肪 12.95%、碳水化合物 63.03%)购自北京科奥协力饲料有限公司。

1.1.3 试剂 LPS(0111:B4)、ORO 粉末购自美国 Sigma-Aldrich;TG、TC、ALT 和 AST 测试盒购自南京建成生物工程研究所。用于免疫荧光(immunofluorescence,IF)检测的大鼠抗小鼠 F4/80-Alexa Fluor647(F4/80-647)、大鼠抗小鼠 IgG 购自美国 Abcam,山羊抗大鼠 IgG(H+L)-FITC 购自美国 Invitrogen,山羊抗兔 IgG(H+L)-Alexa Fluor 647 购自英国 Jackson ImmunoResearch,兔抗小鼠 IgG 抗体购自美国 Biorbyt。用于流式细胞术(flow cytometry,FCM)检测的大鼠抗小鼠 CD16/CD32 抗体、CD11b-PE、Ly6C-FITC、Ly6G-APC 均购自美国 Biolegend。RIPA 裂解液、肝组织 TG 检测盒购自北京普利莱基因技术有限公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,小鼠 IL-1β、TNF-α 检测试剂盒购自美国 eBioscience,小鼠 CCL4、CCL5 检测试剂盒购自中国 Absin 公司,小鼠 CCL2 检测试剂盒购自达科为有限公司,反转录试剂盒购自美国 Thermo scientific,qPCR 试剂盒购自美国 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养及分组 取 6~8 周龄的 B6.WT 雄性小鼠,分别给予正常饮食(ND 组)与高脂饮食(HFD 组),自建模开始,HFD+LPS 组每周 1 次腹腔注射 LPS(1.25 μg/g 体质量),ND 组和 HFD 组注射等体积生理盐水,干预 10 周处死小鼠,每组至少 4 只,实验重复 3 次。

1.2.2 酶法检测血清、肝组织匀浆中 TG、TC 水平 收集小鼠血清,依据试剂盒说明书检测 TG、TC 水平。准确称取新鲜肝脏组织,按照 1 mg 组织加 20 μL 裂解液,冰水浴条件下机械匀浆,根据试剂盒说明书检测 TG、TC 含量,并用蛋白浓度进行校正。

1.2.3 油红 O 染色观察肝组织脂质沉积 收集小鼠新鲜肝组织,OCT 包埋后液氮快速冰冻,进行冰冻切片,厚度 5 μm。60%异丙醇快速固定后,PBS 冲洗,油红 O 染色 8 min,苏木精复染后用 50%甘油封片,光学显微镜下观察并采集图像,观察肝组织脂质沉积情况,并用 Image J 软件对其进行定量分析。

1.2.4 酶法检测血清中、肝组织中 ALT、AST 水平 收集小鼠血清;准确称取新鲜肝脏组织,按照 1 mg 组织加 9 μL 生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,取上清。依据试剂盒说明书分别检测血清与肝脏组织中 ALT、AST 的水平,并用蛋白浓度进行校正。

1.2.5 HE 染色观察肝脏组织炎症浸润 末次注射 LPS 12 h 处死小鼠,将新鲜肝脏组织置于 4%多聚甲醛固定过夜,常规石蜡包埋后进行切片,切片厚度 5 μm,经二甲苯及梯度酒精脱蜡水化后,用苏木精染色 5 min,伊红复染后封片,光学显微镜下观察并采集图像,观察肝脏组织炎症浸润情况。同时,采用美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组指南中的 NAFLD 活动评分(NAFLD activity score,NAS)[6] 对 NASH 的严重程度进行评估。

1.2.6 ELISA 检测血清、肝组织中 IL-1β、TNF-α、CCL5、CCL2、CCL4 水平 末次注射 LPS 6 h 后收集小鼠血清,检测 IL-1β、TNF-α、CCL5、CCL2、CCL4 的水平,操作过程严格按照说明书进行。准确称取新鲜肝脏组织,按照 1 mg 肝脏组织加入 10 μL 与蛋白酶抑制剂预混的 RIPA 裂解缓冲液,冰水浴条件下机械匀浆,12 000×*g*,4 ℃离心 10 min,取上清液。BCA 定量法检测组织抽提物的蛋白浓度。选择适量肝脏组织抽提物检测 IL-1β(500 μg)、TNF-α(500 μg)、CCL5(12.5 μg)、CCL2(500 μg)、CCL4(50 μg)的水平,操作过程严格按照说明书进行。

1.2.7 IF 检测肝脏组织巨噬细胞、中性粒细胞沉积及 TLR4 蛋白表达 将 OCT 包埋的冰冻组织进行切片,厚度为 5 μm,冷丙酮固定 10 min,10%山羊血清封闭 1 h,用于后续检测。F4/80-Alexa Fluor 647(1:50)为直标抗体,4 ℃孵育过夜;大鼠抗小鼠 Gr-1 抗体(1:100)、兔抗小鼠 TLR4 抗体(1:200)为间标抗体,同

时设置 Isotype 组,加入各自抗体同种属、同型、同来源、同型的免疫球蛋白作为对照,用以排除假阳性。4 ℃孵育过夜后加入山羊抗大鼠 IgG(H+L)-FITC(1∶400)室温孵育 1 h,DAPI 染色 5 min,PBS 洗涤后加抗荧光淬灭剂封片,置于荧光显微镜下观察。

1.2.8　RT-qPCR 检测肝脏中 IL-1β、TNF-α、CCL5、CCL2、CCL4 mRNA 水平　　采用 RT-qPCR 检测相关基因 mRNA 表达。利用 TRIzol-氯仿法提取小鼠肝脏组织 RNA,测定 RNA 浓度及纯度。以 5 μg RNA 进行反转录,反应体系为 20 μL。取 2 μL 反转录产物 cDNA 进行检测,引物序列由上海铂尚生物技术有限公司合成(见表 1),总反应体系为 20 μL,以 GAPDH 作为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 IL-1β、TNF-α、CCL2、CCL5、CCL4 的 mRNA 水平变化。

表 1　RT-qPCR 引物序列

基因		序列(5′→3′)	产物长度/bp
IL-1β	正义	GACGGACCCCAAAAGATGAA	283
	反义	ATGGGAACGTCACACACCAG	
IL-8	正义	AGATACCGCCACGTTCTGAC	252
	反义	GAAATGGAGAGGCATCCGG	
TNF-α	正义	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	88
	反义	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG	
CCL5	正义	GCTCCAATCTTGCAGTCGTG	242
	反义	GAGCAGCTGAGATGCCCATT	
CCL2	正义	GACCCGTAAATCTGAAGCTAATGC	117
	反义	AATTAAGGCATCACAGTCCGAGTC	
CCL4	正义	CCAGGGTTCTCAGCACCAAT	122
	反义	TTGGAGCAAAGACTGCTGGT	
GAPDH	正义	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	131
	反义	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	

1.2.9　FCM 检测小鼠肝脏单个核细胞中的巨噬细胞及中性粒细胞　　200 目尼龙网上低温研磨新鲜肝脏组织,离心去除杂质及肝实质细胞,通过红细胞裂解液去除红细胞,40% Percoll 梯度分层,800×*g* 离心 25 min,升速 5、降速 0,以收集肝脏单个核细胞,进行计数。取 1×10^6 个细胞,加入抗小鼠 CD16/CD32 抗体 1 μL 封闭 15 min,加入相应细胞群的检测抗体:CD11b-PE、Ly6C-FITC 抗体标记巨噬细胞;CD11b-PE、Ly6G-APC 抗体标记中性粒细胞。避光染色 30 min,PBS 洗涤细胞后,用 FCM buffer 重悬细胞经 200 目尼龙网过滤,经流式细胞仪检测。

1.3　统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.1 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

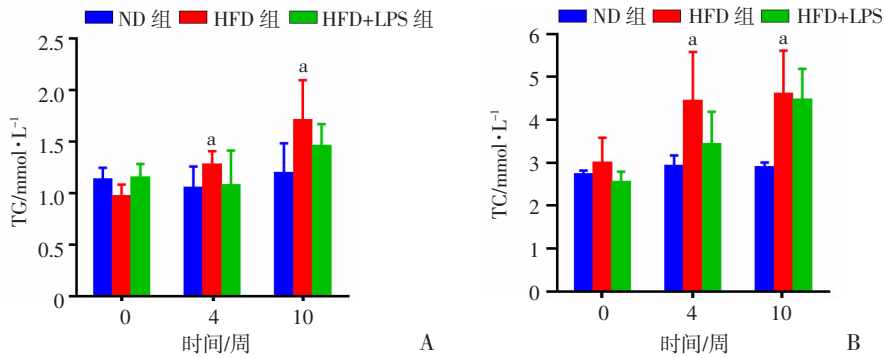
2　结果

2.1　LPS 联合 HFD 对血清中脂代谢指标 TG、TC 水平的影响

建模 4 周后,动态检测模型小鼠血清 TG、TC 水平,每次均选择在 LPS 注射前采样。结果显示:建模 4 周开始,HFD 组小鼠血清 TG($P<0.05$,图 1A)、TC($P<0.05$,图 1B)水平升高,显著高于 ND 组,提示建立的模型成功。随后比较 HFD 组与同期 HFD+LPS 组小鼠以上指标差异,结果显示,两组小鼠 TG、TC 水平无明显差异($P>0.05$)。

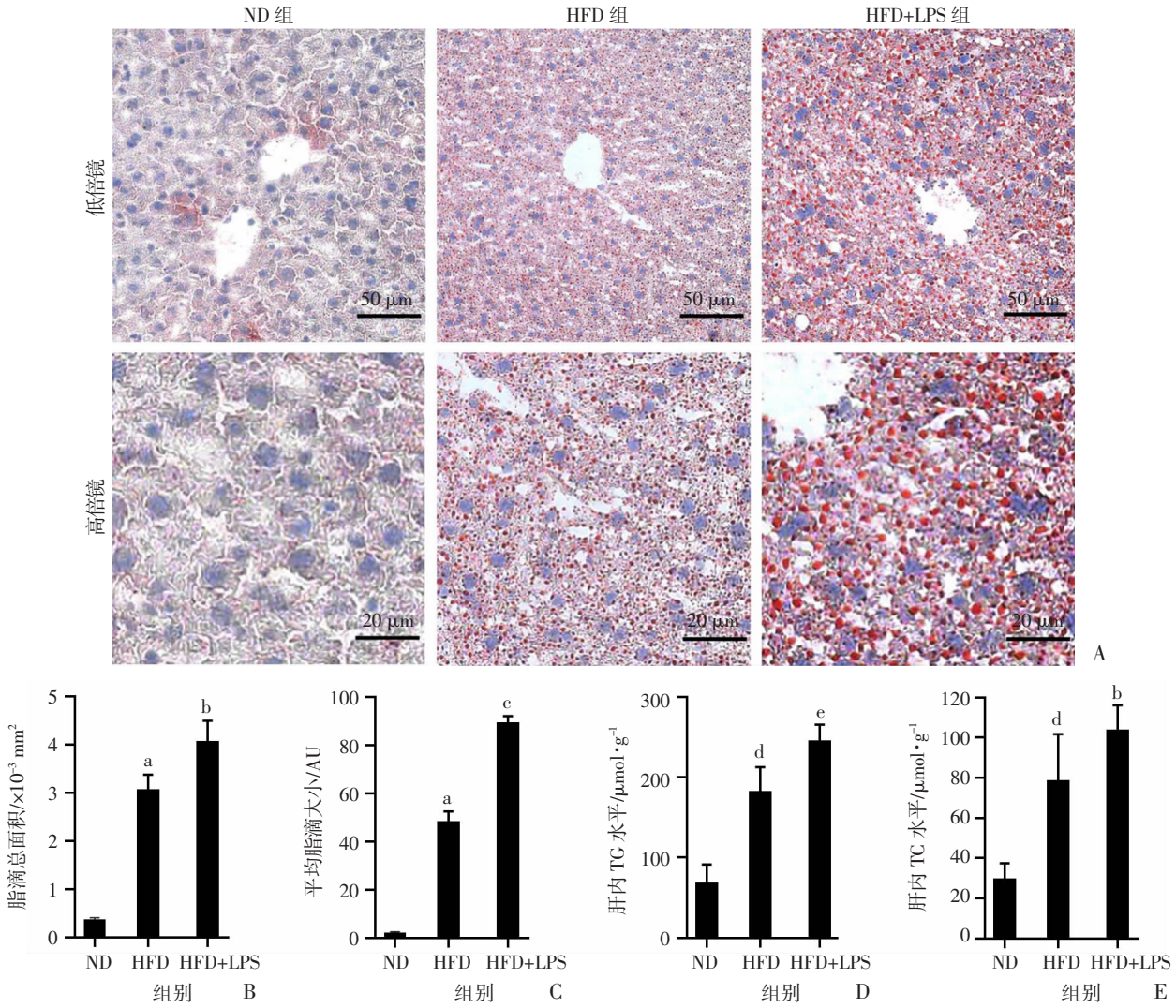
2.2　LPS 联合 HFD 对小鼠肝内脂质沉积的影响

干预 10 周,处死小鼠,油红 O 染色检测肝组织内脂质沉积,HFD+LPS 组小鼠肝内脂滴沉积明显高于 HFD 组(图 2A)。Image J 定量分析,HFD+LPS 组小鼠肝脏脂质沉积面积($P<0.05$,图 2B)与平均脂滴大小($P<0.001$,图 2C)皆高于 HFD 组。检测各组小鼠肝内 TG、TC 水平,HFD+LPS 组肝内 TG($P<0.01$,图 2D)、TC($P<0.01$,图 2E)水平显著高于 HFD 组。以上提示,LPS 加重 HFD 诱导的 NASH 小鼠肝组织内脂质沉积。



a:$P<0.05$,与 ND 组比较

图 1　干预 10 周后小鼠血清 TG(A)、TC(B)水平变化　(ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD +LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.000\ 1$,d:$P<0.01$,与 ND 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.001$,e:$P<0.01$,与 HFD 组比较

A:肝脏油红 O 染色;B:Image J 定量分析脂滴总面积;C:Image J 定量分析平均脂滴大小;D:肝组织 TG 水平;E:肝组织 TC 水平

图 2 各组小鼠肝脏组织油红 O 染色观察结果及 TG、TC 水平定量分析 (ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD +LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)

2.3 LPS 联合 HFD 加重小鼠肝内炎症浸润

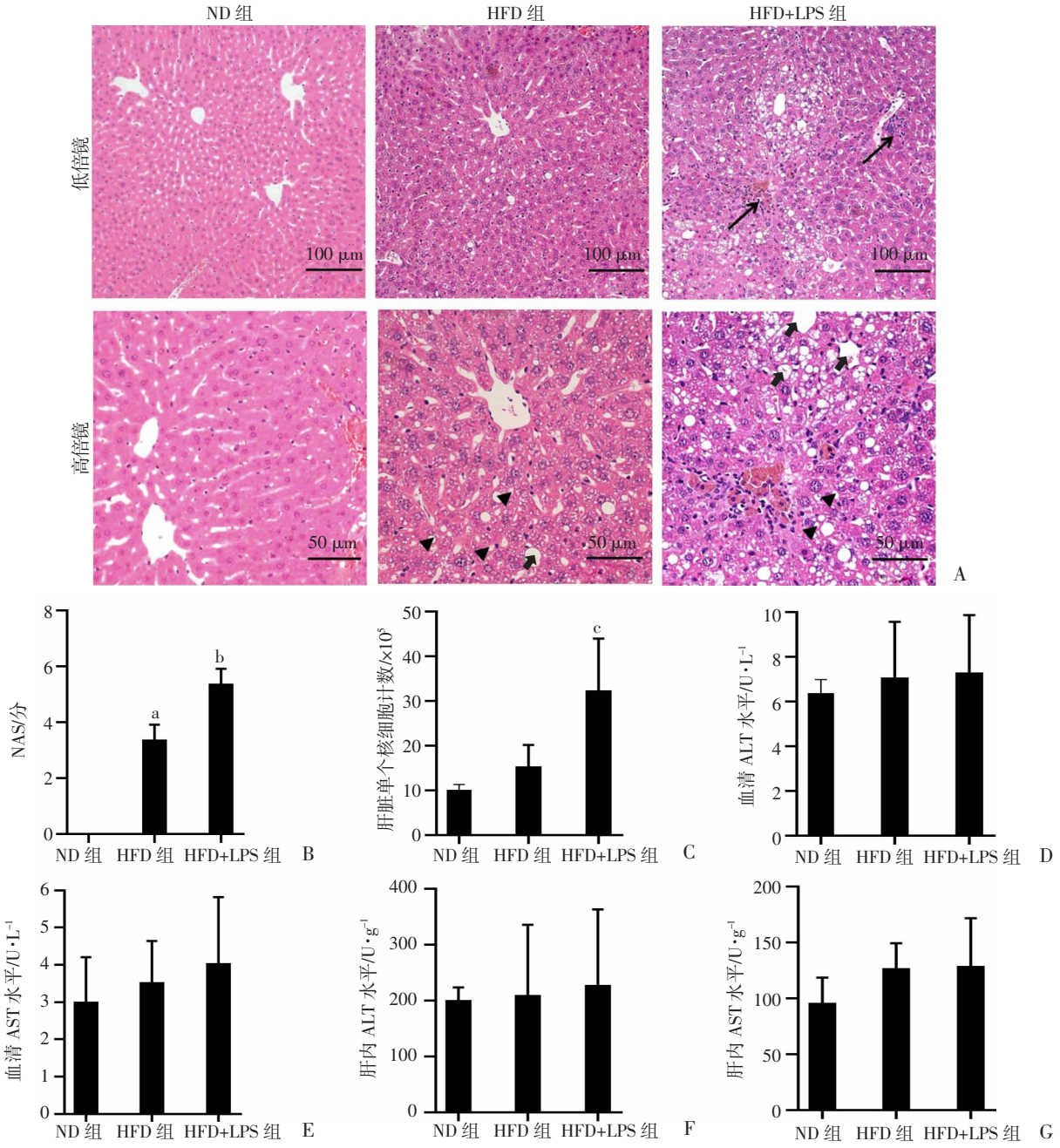
HE 染色观察结果表明,单纯 HFD 组肝脏组织结构紊乱,出现明显空泡样变,存在少量的炎性因子浸润,HFD+LPS 组肝脏组织脂肪样变及炎症细胞浸润皆显著高于 HFD 组(图 3A);HFD+LPS 组的肝组织 NAS 评分($P<0.05$,图 3B)及肝脏内单个核细胞计数均显著高于 HFD 组($P<0.01$,图 3C),提示 LPS 加重了 HFD 诱导的小鼠肝内炎症反应。但是,HFD+LPS 组小鼠血清、肝组织 AST、ALT 水平与 HFD 组无明显差异($P>0.05$,图 3D~G),提示在 NASH 早期,LPS 并未造成明显的肝脏损伤。

2.4 LPS 联合 HFD 促进小鼠肝内巨噬细胞、中性粒细胞浸润

采用 IF 技术观察小鼠肝脏组织原位巨噬细胞、中性粒细胞炎性浸润情况。结果显示,HFD 组肝脏组织中巨噬细胞($F4/80^+$)浸润明显多于 ND 组,但中性粒细胞($Gr\text{-}1^+$)无明显差异;HFD+LPS 组小鼠肝脏组织中性粒细胞($Gr\text{-}1^+$)、巨噬细胞($F4/80^+$)浸润显著高于 HFD 组(图 4、5)。同时,采用 FCM 技术检测肝脏中浸润的巨噬细胞和中性粒细胞情况,结果显示,HFD 组肝脏单个核细胞中 $CD11b^+Ly6C^+$巨噬细胞、$CD11b^+Ly6C^{hi}$ 单核细胞比例显著高于 ND 组,但 $CD11b^+Ly6G^+$中性粒细胞无显著性差异。而 HFD 联合 LPS 后 $CD11b^+Ly6G^+$ 中性粒细胞($P<0.000\ 1$,图 4)、$CD11b^+Ly6C^+$ 巨噬细胞($P<0.001$,图 5)、$CD11b^+Ly6C^{hi}$ 单核细胞($P<0.000\ 1$,图 5)显著高于 HFD 组。提示 LPS 存在导致以巨噬细胞为主的炎性细胞被募集至肝脏,可能是加重 HFD 所致 NASH 的重要因素。

2.5　LPS 联合 HFD 升高小鼠血清 IL-1β、TNF-α、CCL5、CCL2、CCL4 水平

IL-1β、TNF-α 被认为是 NASH 进展的主要细胞因子,检测结果显示:HFD+LPS 组血清 IL-1β($P<0.05$,图 6A)、TNF-α($P<0.001$,图 6B)水平显著高于 HFD 组,其中 IL-1β 变化较为显著。趋化因子作为继发性炎症因子,可促进单核-巨噬细胞募集。检测与巨噬细胞趋化相关因子 CCL5、CCL4、CCL2 的结果显示:HFD+LPS 组血清 CCL5($P<0.001$,图 6C)、CCL2($P<0.0001$,图 6D)、CCL4($P<0.01$,图 6E)水平高于 HFD 组,其中 CCL5、CCL2 变化更为明显。以上提示低水平 LPS 主要影响 IL-1β、CCL5、CCL2 加重全身炎症水平,从而进一步促进 NASH 发展。



A:肝脏组织 HE 染色　↑:示炎性浸润,▲:示空泡样变,⬆:示空泡融合;B:NAS 评分;C:肝脏单个核细胞计数;D:血清 ALT 水平;E:血清 AST 水平;F:肝组织 ALT 水平;G:肝组织 AST 水平　a:$P<0.0001$,与 ND 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 HFD 组比较

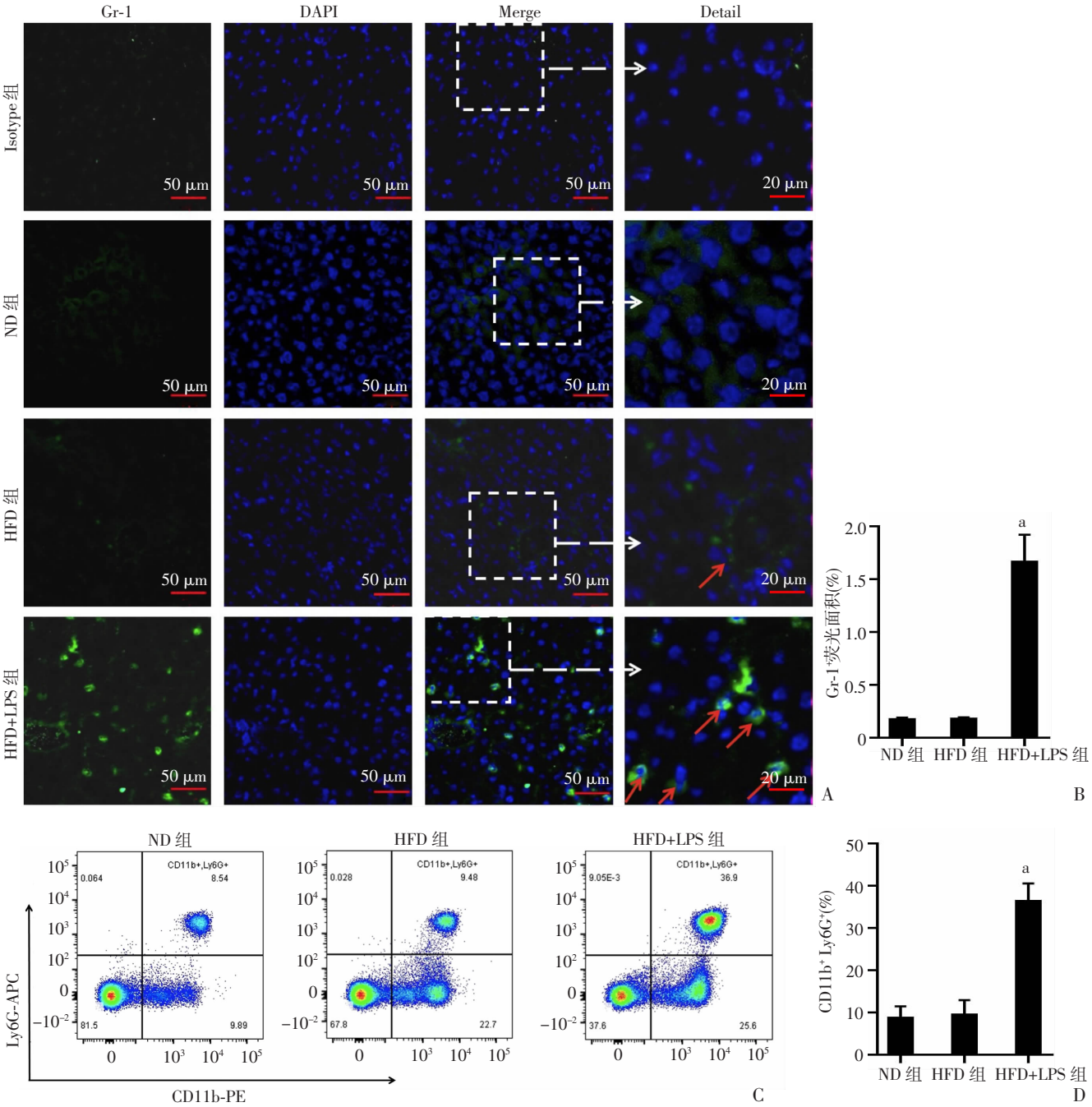
图 3　各组小鼠肝脏病理学观察及血清、肝脏组织 ALT、AST 水平对比　(ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD +LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)

2.6　LPS 联合 HFD 上调小鼠肝内 IL-1β、CCL5、CCL2 mRNA 表达

采用 RT-qPCR 检测小鼠肝脏组织内相关炎性和趋化性因子表达,结果显示:HFD+LPS 组肝内 IL-1β($P<0.05$,图 7A)mRNA 水平高于 HFD 组,而 TNF-α mRNA 无明显差异($P>0.05$,图 7B)。HFD+LPS 组 CCL5($P<0.001$,图 7C)、CCL2($P<0.05$,图 7D)mRNA 水平显著高于 HFD 组,CCL4 mRNA 无明显差异($P>0.05$,图 7E)。

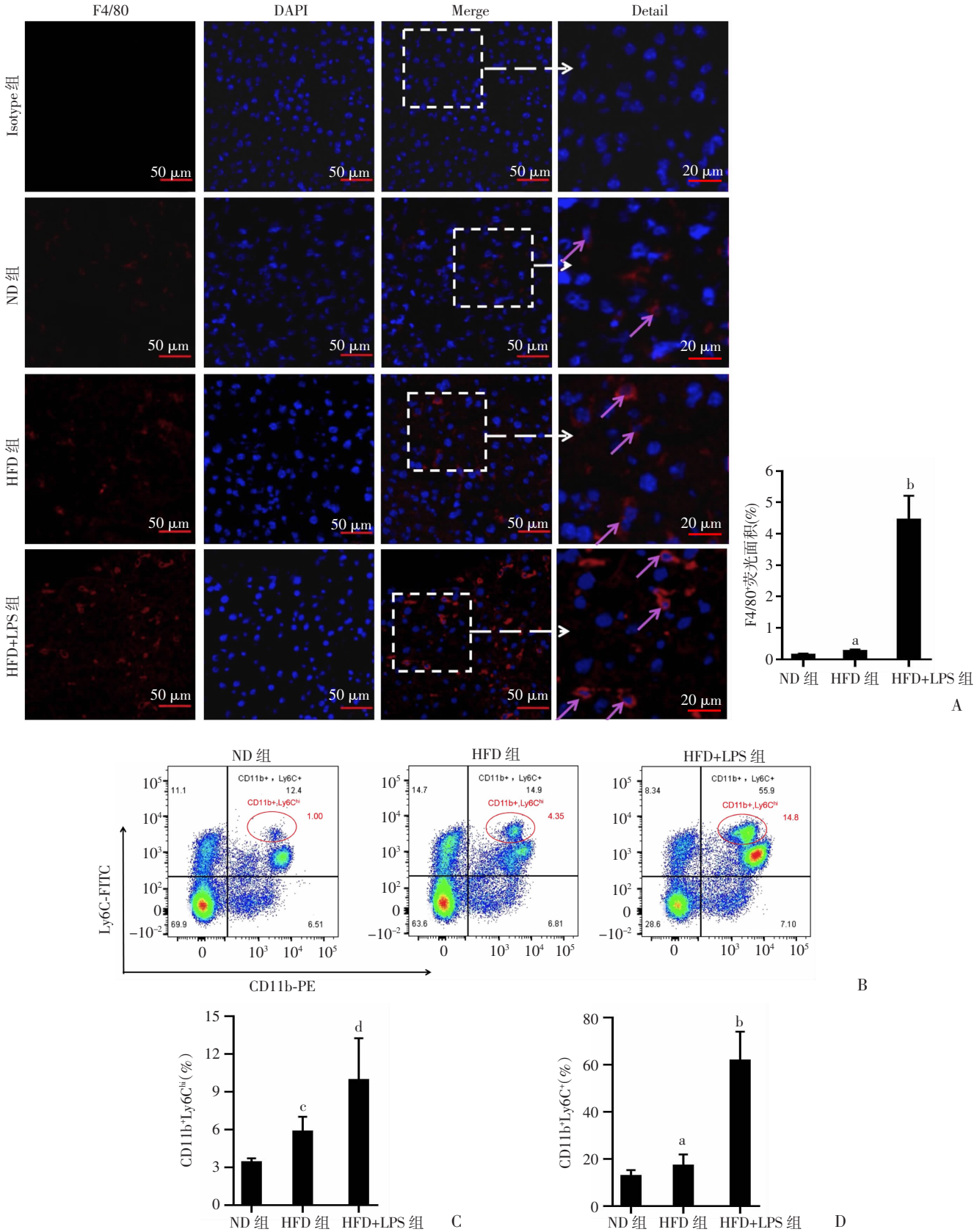
2.7　LPS 联合 HFD 促进小鼠肝内 IL-1β、CCL5、CCL2 蛋白表达

采用 ELISA 检测肝脏组织提取物中趋化因子和炎症性因子的水平。结果显示:HFD+LPS 组肝组织 IL-1β($P<0.05$,图 8A)、CCL5($P<0.05$,图 8C)、CCL2($P<0.05$,图 8D)水平高于 HFD 组,但 TNF-α、CCL4 无显著性差异($P>0.05$,图 8B、8E),这结果与 mRNA 分析结果相一致。综上结果提示,LPS 增加 HFD 小鼠肝内炎症因子水平。



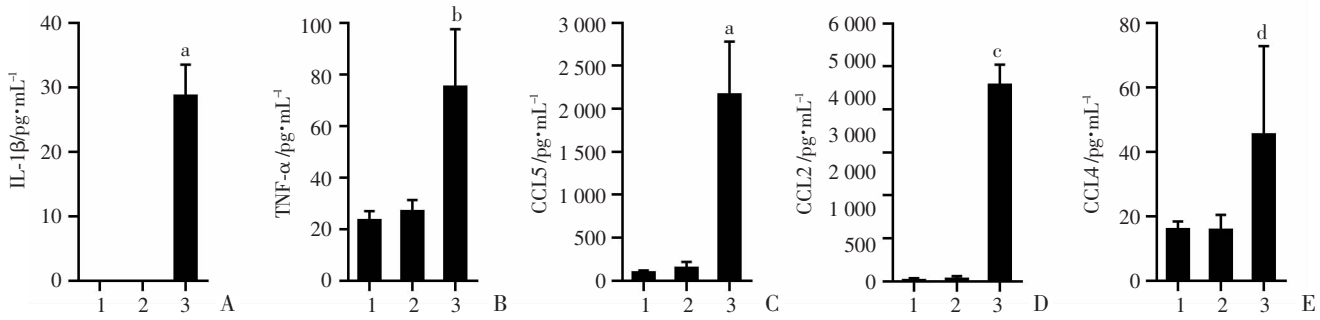
A:肝脏中性粒细胞(Gr-1$^+$)浸润免疫荧光观察　↑:示中性粒细胞;B:Image J 定量分析肝脏中性粒细胞(Gr-1$^+$)浸润程度;C:肝脏 CD11b$^+$Ly6G$^+$中性粒细胞流式细胞仪检测结果;D:肝脏 CD11b$^+$Ly6G$^+$中性粒细胞比例　a:$P<0.001$,与 HFD 比较

图 4　肝脏组织中中性粒细胞的浸润情况　(ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD +LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)



A:肝脏巨噬细胞(F480$^+$)浸润免疫荧光观察 ↑:示巨噬细胞;B:肝脏 CD11b$^+$Ly6C^{hi} 单个核细胞及 CD11b$^+$Ly6C$^+$ 巨噬细胞流式检测;C:肝脏 CD11b$^+$Ly6C^{hi} 单个核细胞比例;D:肝脏 CD11b$^+$Ly6C$^+$ 巨噬细胞比例 a:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 ND 组比较;b:$P<0.001$,d:$P<0.0001$,与 HFD 组比较

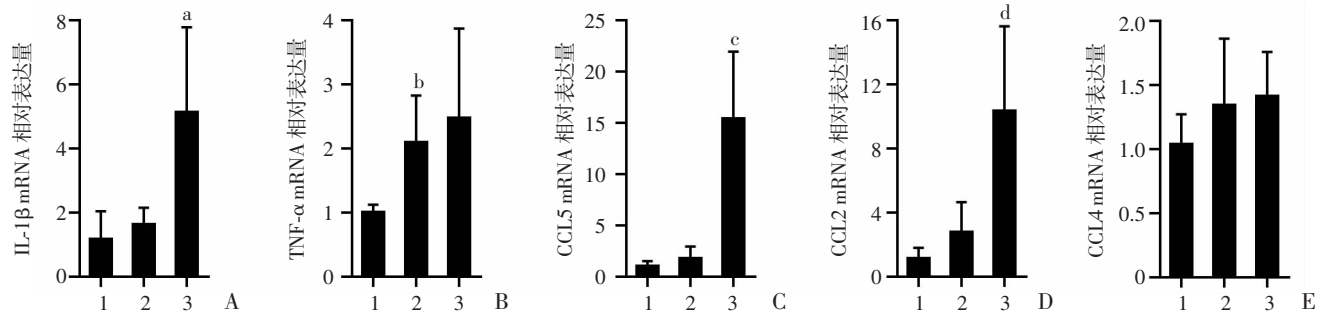
图 5 肝脏组织中巨噬细胞的浸润情况 (ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD +LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)



1:ND 组;2:HFD 组;3:HFD+LPS 组

A:IL-1β;B:TNF-α;C:CCL5;D:CCL2;E:CCL4; a:$P<0.001$,b:$P<0.05$,c:$P<0.0001$,d:$P<0.01$,与 HFD 组比较

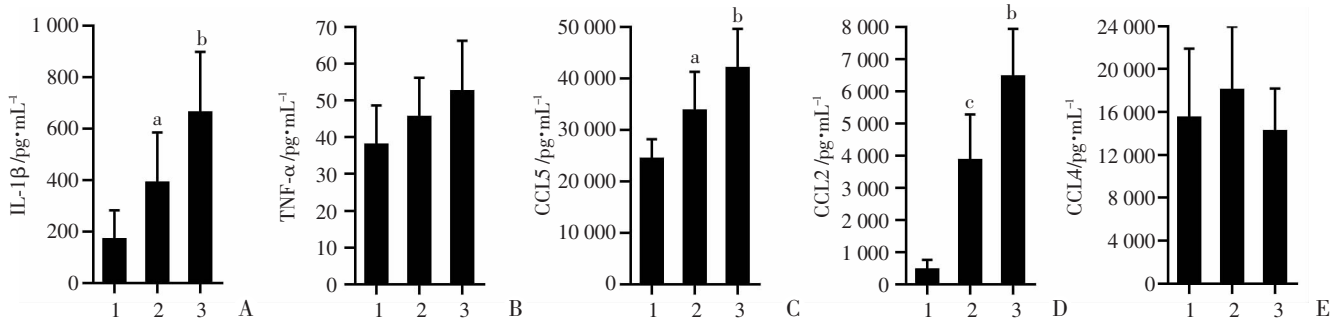
图 6 小鼠血清 IL-1β、TNF-α、C CL5、CCL2、CCL4 水平 (ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD+LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)



1:ND 组;2:HFD 组;3:HFD+LPS 组

A:IL -1β;B:TNF-α;C:CCL5;D:CCL2;E:CCL4; a:$P<0.05$,c:$P<0.001$,d:$P<0.01$,与 HFD 组比较;b:$P<0.05$,与 ND 组比较

图 7 RT-qPCR 检测各组小鼠肝脏组织中 IL-1β、TNF-α、CCL5 、CCL2、CCL4 mRNA 表达 (ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD+LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)



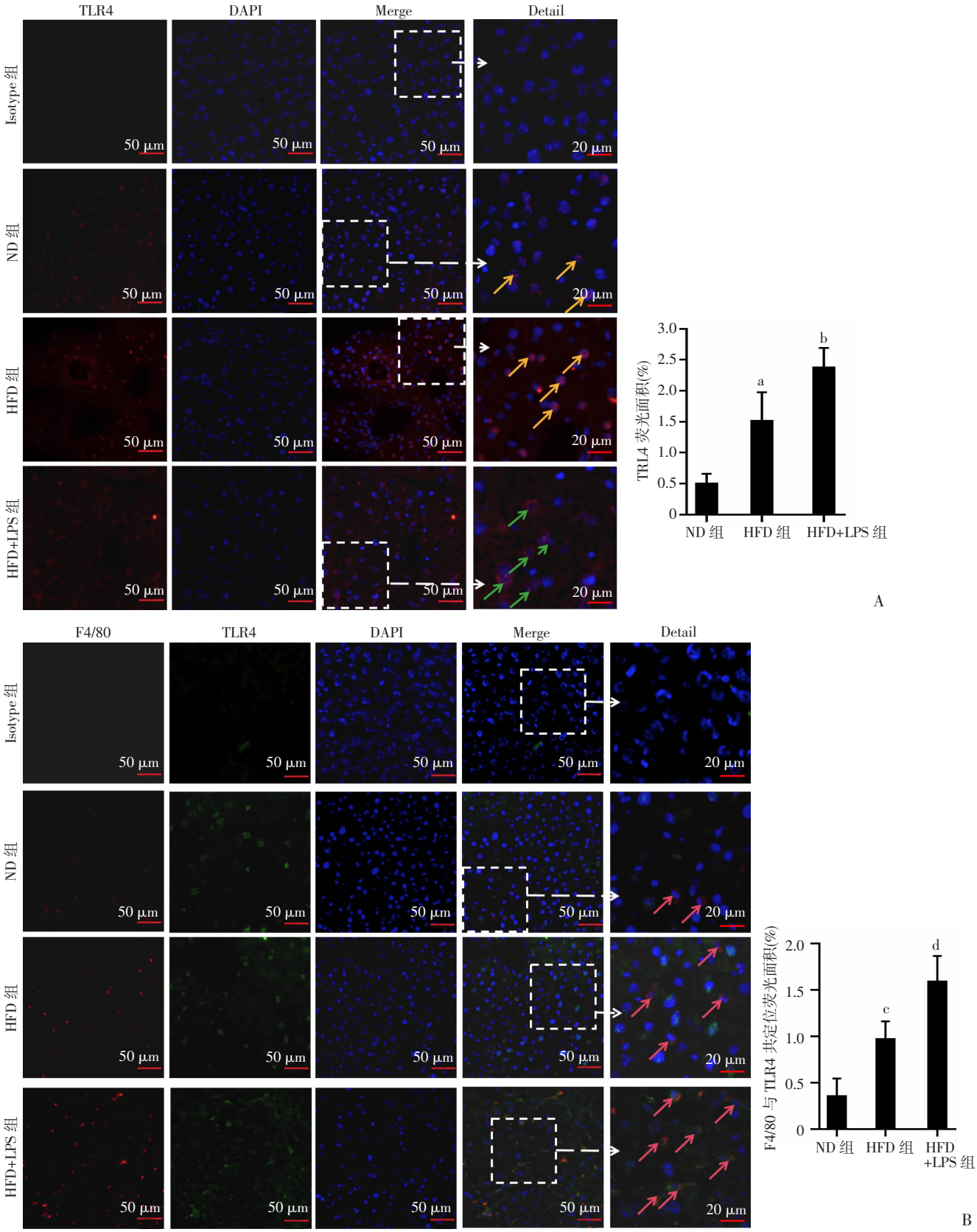
1:ND 组;2:HFD 组;3:HFD+LPS 组

A:IL-1β;B:TNF-α;C:CCL5;D:CCL2;E:CCL4;a:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 HFD 组比较;b:$P<0.05$,与 ND 组比较

图 8 ELISA 检测小鼠肝脏抽提物 IL-1β、TNF-α、CCL5、CCL2、CCL4 表达水平 (ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD +LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)

2.8 LPS 联合 HFD 诱导小鼠肝脏巨噬细胞表达高水平的膜型 TLR4

TLR4 是 LPS 作用的重要受体,为了深入探讨 LPS 诱导小鼠表达高水平炎症相关因子的机制,检测了肝脏组织中 TLR4 表达水平。结果显示:HFD 小鼠肝脏组织中 TLR4 蛋白主要表达于细胞内,水平高于 ND 组($P<0.01$);LPS 联合 HFD 作用后 TLR4 水平高于 HFD 组($P<0.05$),并出现明显的由细胞质向细胞膜的转位现象。此外,TLR4 与 F4/80 共定位染色结果显示,与 HFD 小鼠相比,HFD+LPS 组小鼠肝脏巨噬细胞表达 TLR4 蛋白水平升高($P<0.01$,图 9),提示 LPS 诱导的炎症因子释放和炎症浸润增加可能与上调巨噬细胞表达 TLR4 有关,这一机制可能在 NASH 过程中发挥重要作用。



a:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 ND 组比较;b:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 HFD 组比较

A:肝组织 TLR4 表达水平　黄色箭头示表达于细胞质的 TLR4 蛋白,绿色箭头示表达于细胞膜的 TLR4 蛋白;B:肝组织中巨噬细胞与 TLR4 表达共定位　粉色箭头示共定位的巨噬细胞与 TLR4 蛋白

图 9　各组小鼠肝脏组织免疫荧光共定位检测 TLR4 表达　(ND 组 $n=8$,HFD 与 HFD+LPS 组 $n=10$,$\bar{x}\pm s$)

3 讨论

由于 NAFLD 发病机制的复杂性,NASH 的发病并非单一因素作用的结果。包括神经内分泌、免疫炎症网络在内的"多重打击"理论,较准确地概括了从脂肪变性到 NASH 进展背后的病理生理因素[3]。高脂饮食作为第一次打击诱发了胰岛素抵抗与脂质沉积,线粒体功能障碍、内质网应激、炎症激活、肠道菌群、脂肪组织功能障碍、铁超载等因素导致第二次打击,脂肪变的肝细胞发生炎症、坏死、纤维化/硬化。已有研究[7]表明,NASH 患者小肠内细菌过度繁殖是造成患者体内 LPS 水平增高的主要原因。这些研究支持 LPS 与 NASH 发展密切相关,但相关机制尚不明确。

为探讨低水平 LPS 对 NASH 的影响及其相关机制,本研究利用高脂饲料饲喂小鼠,建立 NASH 模型,并长期腹腔注射低剂量 LPS。结果显示,低水平 LPS 加剧 NASH 小鼠肝组织内脂质沉积,出现大量脂滴空泡融合及明显的肝细胞气球样变。肝组织 HE 染色表明 LPS 明显促进肝内炎性浸润,这些数据均支持 LPS 在 NASH 发生发展中发挥了重要作用。但 HFD+LPS 组血清和肝组织内 ALT、AST 水平与 HFD 组无显著差异,可能的原因是此阶段肝细胞损伤不明显,仍然处于早期炎细胞浸润反应,这与非酒精性脂肪性肝病防治指南[8](2018 版)认为的血清 ALT 正常并不意味着无肝组织炎症损伤相一致。近年来,越来越多的研究指出,巨噬细胞、中性粒细胞募集在多种慢性肝脏疾病中发挥作用[9]。肝内固有免疫细胞亚群变化参与影响脂代谢紊乱的关键过程[10],关注 LPS 诱导的固有免疫紊乱对肝脏脂肪代谢的影响具有重要意义。据此,本研究采用 IF 原位观察小鼠肝脏内巨噬细胞、中性粒细胞浸润情况,发现 HFD+LPS 组小鼠肝脏原位巨噬细胞、中性粒细胞浸润显著多于 HFD 组。同时,FCM 结果显示,HFD+LPS 组小鼠肝脏内巨噬细胞与中性粒细胞比例均明显增多。据此推断循环中的巨噬细胞与中性粒细胞由于内毒素作用被募集至肝血窦进而影响脂肪代谢过程。研究表明, $CD11b^{+}Ly6C^{+}$ 中 $Ly6C^{hi}$ 细胞群可分化为组织炎症巨噬细胞,是造成肝脏细胞损伤的浸润性巨噬细胞的前体细胞,表达炎症趋化因子受体、模式识别受体与细胞因子[11]。LPS 联合 HFD 刺激,小鼠肝脏内 $CD11b^{+}Ly6C^{hi}$ 细胞比例显著高于 HFD 组,这提示 LPS 诱导 NASH 肝脏中促炎性巨噬细胞增加。

趋化因子在募集免疫细胞向组织浸润过程中发挥关键作用,系由上游炎症介质如 IL-1 或 TNF 诱导产生的继发性炎症介质[12]。临床资料显示,NASH 患者体内 CCL2、CCL4、CCL5 等水平高于健康人群[13]。对趋化因子与 NAFLD 关系的分析提示,CCL2、CCL4 浓度升高与 NAFL 或 NASH 密切有关[14]。游离脂肪酸的增加和 TLRs 的激活通过 NF-κB 促进 CCL2 的产生,从而趋化单核细胞造成肝脏损伤[15]。而肝细胞产生的 CCL5 能够促进 NAFLD 发生肝纤维化[16]。综合以上结果,说明 LPS 导致 HFD 小鼠全身及肝组织内炎症因子及趋化因子水平升高。由此推测,LPS 可能主要通过诱导 IL-1 β、CCL2、CCL5 高表达,导致炎症反应加重进而促进疾病进展。但是,以上炎症和趋化因子的细胞来源仍需进一步确认。

TLR4 是 LPS 触发巨噬细胞免疫应答的关键受体[17],LPS 触发 TLR4 后将刺激巨噬细胞分泌大量炎症因子[18],因而在炎症反应中扮演重要角色。研究表明,NASH 和 NAFL 患者肝组织中 $TLR4^{+}$ 巨噬细胞水平升高,且与 LPS 水平呈正相关,提示 LPS 可能活化 $TLR4^{+}$ 巨噬细胞诱导炎症反应[19]。本研究结果显示:HFD+LPS 组小鼠肝脏中巨噬细胞浸润数量、肝脏中 TLR4 表达水平皆显著高于 HFD 组。利用免疫荧光共定位分析证实,HFD+LPS 组小鼠肝脏内巨噬细胞与 TLR4 呈现共定位模式,且 TLR4 出现明显的由细胞质向细胞膜的转位。综合以上数据,本研究提示 LPS 不仅能够通过增加肝脏内巨噬细胞浸润,还能通过上调巨噬细胞表面 TLR4 的表达,导致炎性和趋化性因子释放增加,从而加剧肝内脂代谢相关炎症损伤,促进 NASH 进程。靶向 LPS 激发的促进 NASH 相关机制将为临床该类疾病的预防和治疗提供有力依据和潜在靶点;同时这一问题背后的深入机制仍需要进一步研究予以解析。

参考文献:

[1] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, *et al*. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908-922. DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9.

[2] RINELLA M E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review[J]. JAMA, 2015, 313(22): 2263-2273. DOI: 10.1001/jama.2015.5370.

[3] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, *et al*. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11-20. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109.

[4] YEH C F, CHEN Y H, LIU S F, *et al*. Mutual interplay of host immune system and gut microbiota in the immunopathology of atherosclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): E8729. DOI: 10.3390/ijms21228729.

[5] RATZIU V, HARRISON S A, FRANCQUE S, *et al*. Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor-α and -δ, induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening[J]. Gastroenterology, 2016, 150(5): 1147-1159. e5. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.01.038.

[6] WIGG A J, ROBERTS-THOMSON I C, DYMOCK R B, *et al*. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Gut, 2001, 48(2): 206-211. DOI: 10.1136/gut.48.2.206.

[7] JINDAL A, BRUZZÌ S, SUTTI S, *et al*. Fat-laden macrophages modulate lobular inflammation in nonalcoholic steatohepatitis (NASH)[J]. Exp Mol Pathol, 2015, 99(1): 155-162. DOI: 10.1016/j.yexmp.2015.06.015.

[8] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(5): 947-957. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2018.05.007.

National Group on Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease of Chinese Society of Hepatology of Chinese Medical Association, Fatty Liver Expert Committee of Chinese Medical Doctor Association. Guidelines of prevention and treatment for nonalcoholic fatty liver disease: A 2018 update[J]. J Clin Hepatol, 2018, 34(5): 947-957. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2018.05.007.

[9] BAECK C, WEI X, BARTNECK M, *et al*. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C(+) macrophage infiltration in mice[J]. Hepatology, 2014, 59(3): 1060-1072. DOI: 10.1002/hep.26783.

[10] 吴剑平, 肖海英, 郑雪莲, 等. 白介素25及其相关因子在非酒精性脂肪肝患者血清及肝内的表达及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(01): 83-90. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202005286.

WU J P, XIAO H Y, ZHENG X L, *et al*. Expression and significance of interleukin 25 and its related factors in serum and liver of patients with non-alcoholic fatty liver[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(01): 83-90. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202005286.

[11] WESOLOWSKI S R, KASMI K C, JONSCHER K R, *et al*. Developmental origins of NAFLD: a womb with a clue[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(2): 81-96. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.160.

[12] GRAVES D T, JIANG Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1995, 6(2): 109-118. DOI: 10.1177/10454411950060020101.

[13] MARRA F, TACKE F. Roles for chemokines in liver disease[J]. Gastroenterology, 2014, 147(3): 577-594. e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.06.043.

[14] PAN X F, CHIWANDA KAMINGA A, LIU A Z, *et al*. Chemokines in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and network meta-analysis[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1802. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01802.

[15] MIURA K, YANG L, VAN ROOIJEN N, *et al*. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 302(11): G1310-G1321. DOI: 10.1152/ajpgi.00365.2011.

[16] LI B H, HE F P, YANG X, *et al*. Steatosis induced CCL5 contributes to early-stage liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease progress[J]. Transl Res, 2017, 180: 103-117. e4. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.08.006.

[17] BESSONE F, RAZORI M V, ROMA M G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(1): 99-128. DOI: 10.1007/s00018-018-2947-0.

[18] 刘彦, 吴皓, 龚建平, 等. 阻断Kupffer细胞的TIM-4蛋白功能对小鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 041(001): 48-55. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201806145.

LIU Y, WU H, GONG J P, *et al*. Inhibition of TIM-4 in Kupffer cells alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 041(001): 48-55. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201806145.

[19] CARPINO G, DEL BEN M, PASTORI D, *et al*. Increased liver localization of lipopolysaccharides in human and experimental NAFLD[J]. Hepatology, 2020, 72(2): 470-485. DOI: 10.1002/hep.31056.

(**收稿**:2021-05-24;**修回**:2021-06-27)

(编辑 吴培红)