维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)02-0119-05

酒精性肝病大鼠Kupffer细胞CD14蛋白的表达及其在肝损害中的作用

戴立里[1]，龚建平[2]，左国庆[1]，吴传新[2]，李生伟[2]，刘长安[2]
（1. 重庆医科大学第二临床学院消化内科；2. 重庆医科大学第二临床学院普外科 重庆 400010）

【摘 要】目的：观察大鼠酒精性肝病时Kupffer细胞（KCs）CD14蛋白和基因的表达及其在肝损害中的作用。方法：随机将Wistar大鼠分为乙醇喂养组（剂量5－12g/kg/24h）和葡萄糖对照组。4周和8周活杀分离KCs，用流式细胞仪（FCM）测定细胞膜上CD14蛋白的表达。同时用逆转录多聚酶联反应（RT-PCR）测定KCs中CD14 mRNA的表达；用酶联免疫法（ELISA）测定血浆中TNF-α和IL－6浓度变化；测定血浆内毒素及血浆中转氨酶（ALT）水平变化，并观察肝脏形态学改变。结果：乙醇组大鼠4周时KCs膜上已明显表达CD14蛋白和CD14 mRNA，8周时其表达进一步增强，显著高于对照组($P<0.05$)。乙醇组4周和8周时血浆TNF-α浓度、IL－6浓度及内毒素浓度均明显高于对照组($P<0.05$)。乙醇组肝组织发生显著的病理变化，对照组肝组织无明显病理变化。结论：乙醇能诱导大鼠肝脏KCs膜CD14蛋白和CD14 mRNA的表达显著增强，血浆中细胞因子TNF－α和IL－6浓度增加，引起肝脏形态改变和功能损害。

【关键词】酒精性肝病；Kupffer细胞；脂多糖受体CD14；蛋白表达
【中国图书分类法分类号】R-33；R575 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-10-15

The expression of lipopolysaccharide receptor CD14 protein on Kupffer cells of the rats with alcoholic liver disease

DAI Lili, et al
(Department of Digestive Disease, Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To observe the expression of CD14 protein and its mRNA on Kupffer cells (KCs) and evaluate the role of CD14 protein in the pathogenesis of liver injury in the rats with alcohol-induced liver disease (ALD). *Methods*: Twenty eight Wistar rats were divided into two groups: ethanol-fed group and control group. Ethanol-fed group were fed ethanol(dose of 5~12/kg/24h) and control group received dextrose instead of ethanol. Two groups were sacrificed at 4w and 8w. KCs were isolated and expression of CD14 protein and its mRNA on KCs were determined with flow cytometric (FCM) analysis or the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Levels of tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin(IL)-6 in plasma were determined with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Levels of endotoxin and alanine transaminase(ALT) in blood were measured also, and liver pathology was observed under light and electron microscopy. *Results*: In ethanol-fed rats, ethanol administration led to a significant expression in CD14 protein and its mRNA compared with the control group($P<0.05$) at 8 week. In ethanol group, concentrations of TNF-α, IL-6 and plasma endotoxin levels were increased dramatically than in the control rats at two time points. In liver section from ethanol-fed rats, there was marked pathological changes but there was no change in control group. *Conclusion*:In ethanol-fed rats, ethanol administration led to a significant expression of CD14 protein and its mRNA, and increase of TNF-α and IL-6 levels, which may result in the pathological changes of liver tissue and hepatic functional damages.
【Key words】Alcohol-induced liver disease; Kupffer cell; Lipopolysaccharide; Receptor CD14; Protein expression

以前的研究显示脂多糖(LPS)结合蛋白(LBP)和脂多糖受体CD14在酒精性肝病（ALD）所致的肝损害中起重要作用。CD14是存在于单核/巨噬细胞表面的一种膜蛋白，其分子量为55-kD，主要功能是识别LPS，在LPS介导单核/巨噬细胞激活中起重要作用[1-4]。LPS-LBP与CD14的结合能促使单核/巨噬细胞激活并释放多种细胞因子，诱导肝脏损害[5,6]。但是ALD时肝KCs能否表达CD14蛋白和CD14

作者介绍：戴立里（1952－ ），男，副教授，硕士，
主要研究方向：肝纤维化和肝硬化的实验研究。
课题基金：国家自然科学基金资助课题（No. 39970719）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

mRNA及CD14蛋白在ALD所致肝脏损害中的作用仍不清楚。本研究用乙醇喂养大鼠建立酒精性肝病动物模型，观察肝KCs膜CD14蛋白及CD14 mRNA的表达，探讨CD14蛋白在ADL所致肝脏损害中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型及其分组

28只雌性Wistar大鼠，体重180～220g，随机分为乙醇喂养组和葡萄糖喂养对照组。乙醇喂养组大鼠用乙醇（剂量5g/kg/24h～12g/kg/24h）加入饮水中喂养，对照组饮水中加入等量的葡萄糖，两组大鼠分别于4周和8周后活杀取材，每组每时相点7只动物。经尾静脉抽取血标本，再取相同部位肝组织分别存放于-70℃保存待测。

1.2 血标本的检测

1.2.1 血浆内毒素含量的测定 用鲎试剂基质偶氮显色法。鲎试剂盒从上海生化所购买，具体方法按试剂盒说明书进行。

1.2.2 血清中ALT的测定 用常规生化法。

1.2.3 血浆中细胞因子的测定 用酶联免疫法（ELISA）测定TNF-a和IL-6的含量，试剂盒购于北京邦定泰克公司。

1.3 肝脏形态学观察

1.3.1 每组每时相点取三只动物肝组织常规HE染色，光镜观察其形态学变化。

1.3.2 每组每时相点取两只动物肝组织，2.5%戊二醛固定，常规电镜制样，透射电镜观察肝组织超微结构的变化。

1.4 KCs的分离和培养

按照龚建平等[7]介绍的方法进行。主要步骤为：门静脉灌注Hanks'平衡液后切除肝脏，用0.5%的Ⅳ型胶原酶溶液（Sigma）进行灌注消化，然后彻底冲洗，放入装有含5%胎牛血清（FCS）的RPMI培养基的塑料培养皿中。37℃下，在95%的O_2和5%的CO_2中孵育3h后，用吸管清除悬浮细胞后得KCs，测定其纯度大于90%，活力大于95%。

1.5 KCs膜CD14蛋白的表达

用FCM测定，具体方法参照龚建平等[8]介绍的方法进行。主要步骤为：先用抗CD14抗体（Santa Cruz公司产品）20μl与KCs孵育30min，再用FITC－山羊抗兔IgG孵育30min，冲洗，然后用FCM测定每份标本10 000个KCs中FITC阳性细胞数及平均荧光强度。

1.6 KCs中CD14 mRNA的测定

1.6.1 KCs中RNA的提取和cDNA的合成 用TRIZOL试剂盒（Life Technologies, USA）提取KCs中的总RNA，具体方法按试剂书说明进行。取0.5ml RNA用RT-PCA试剂盒（Roche, USA）将其逆转录为互补的DNA（cDNA），并于-70℃保存待测。

1.6.2 KCs中CD14 mRNA表达 用逆转录-多聚酶链聚合物反应（RT-PCR）测定，以β-Actin作为内参对照。CD14和β-Actin的mRNA引物由上海生工合成。

CD14的序列为：

上游(5'-CTCAACCTAGAGCCGTTTCT-3')，

下游(5'-CAGGATTGTCAGACAGGTCT-3')；

β-actin的序列为：

上游(5'-ACCACAGCTGAGAGGGAAATCG-3')，

下游(5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3')。

CD14和β-actin扩增的PCR产物大小分别为267bp和281bp。扩增条件是：93℃变性1min，57℃退火2min，71℃扩增1min，共30个循环。用1.5%琼脂糖电泳PCR扩增产物，EB染色，凝胶成像系统观察、照相，计算PCR产物的相对表达量，结果即PCR产物量以相对光密度（ROD）表示。

1.7 统计学处理

实验所得数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm S$）表示，用方差分析等方法进行处理，以$P<0.05$表示差异显著。

2 结 果

2.1 KCs膜上CD14蛋白的表达

对照组4周和8周时FITC－CD14阳性细胞数分别为4.45%和5.38%，平均荧光强度弱；乙醇组FITC－CD14阳性细胞数分别76.23%和89.42%，其平均荧光强度显著增强，与对照组比较有显著差异（$P<0.05$）（见图1）。

2.2 KCs中CD14 mRNA的表达

两组大鼠KCs中CD14 mRNA的表达见图2。对

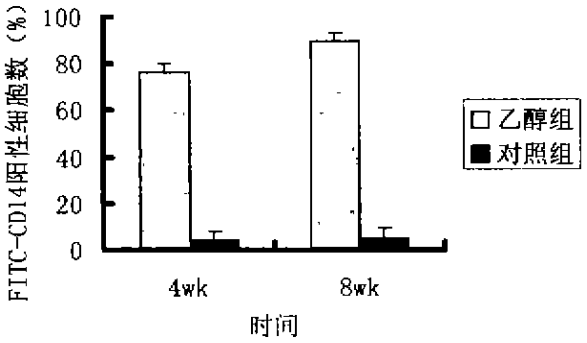


图1 FITC-CD14阳性细胞数 *$P<0.05$，vs对照组

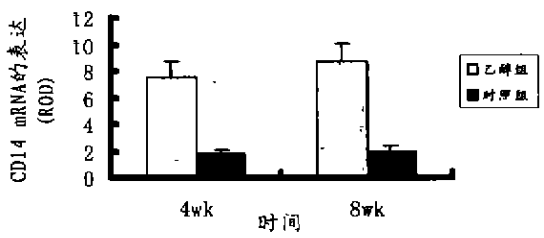


图2 两组KCs中CD14 mRNA的表达

*$P<0.05$,vs 对照组

维普资讯 http://www.cqvip.com

照组大鼠4周和8周KCs CD14 mRNA的表达均不明显。乙醇组KCs中 CD14 mRNA在4周时已明显表达，8周时其表达进一步增加，与对照组相比差异显著（$P<0.05$）。

2.3 血中内毒素和ALT含量变化

乙醇组大鼠在4周和8周时血浆内毒素浓度分别129 ± 21 pg/ml and 187 ± 35 pg/ml，明显高于对照组的48 ± 9 pg/ml and 53 ± 11 pg/ml($P<0.05$)，大约是对照组的2倍和3倍（图3）；乙醇组血清 ALT 浓度为112 ± 15 IU/L 和 147 ± 22 IU/L，也明显高于对照组的31 ± 12 IU/L and 33 ± 9 IU/L($P<0.05$)（图4）。

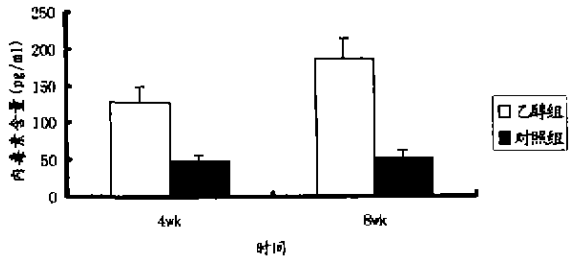


图3 两组血浆内毒素浓度变化

*$P<0.05$, vs 对照组

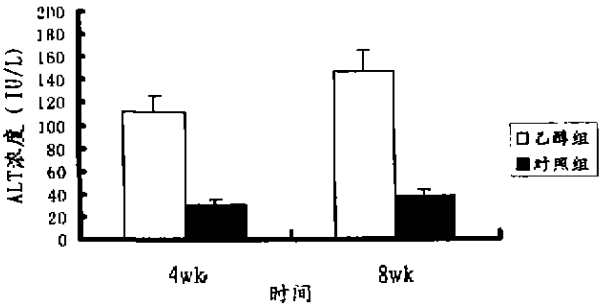


图4 两组血浆ALT含量变化

*$P<0.05$, vs 对照组

2.4 血浆中细胞因子的变化

乙醇组4周和8周时血浆TNFa浓度分别为326 ± 42pg/ml和402 ± 51pg/ml，IL－6浓度为387 ± 46pg/ml和413 ± 51pg/ml，明显高于对照组的86 ± 12 pg/ml，97 ± 13 pg/ml和78 ± 11pg/ml及73 ± 10 pg/ml($P<0.05$)（图5、图6）。

2.5 肝脏病理学变化

乙醇组4周时光镜下见肝细胞内出现大小不等的空泡样脂肪变性，肝窦内有较多白细胞，但未见明显的炎细胞浸润和坏死病灶形成；乙醇喂养8周后，肝细胞脂肪变性更加明显，并有较多的炎症细胞浸润及坏死灶出现。电镜下乙醇组4周时肝细胞内有较多局灶性的胞浆变性及髓鞘样结构形成，肝

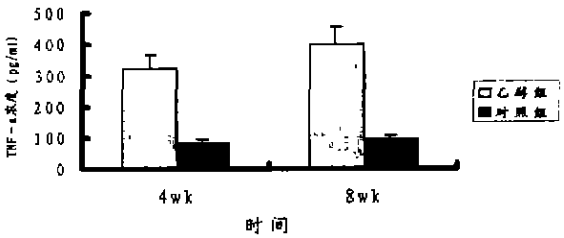


图5 两组血浆中TNF-a浓度变化

*$P<0.05$, vs 对照组

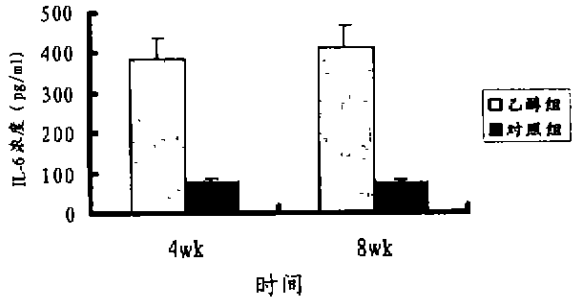


图6 两组血浆中IL-6浓度变化

*$P<0.05$, vs 对照组

细胞核膜变得不规则，胞浆高尔基器增多，线粒体空化，核糖体减少，肝窦内皮细胞明显肿胀，8周时上述变化更加明显（图7，图8）。对照组大鼠光、电镜下肝组织无明显的病理学变化。

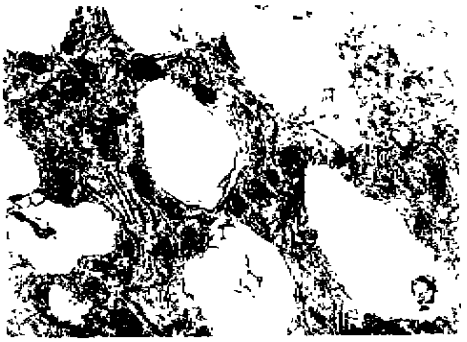


图7 乙醇组4周时肝细胞胞浆中有较多的空泡样变性及髓鞘样结构形成。（TEM×10000）

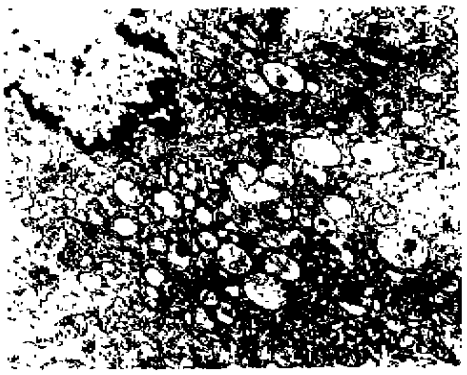


图8 乙醇组8周时肝细胞核膜变得不规则，胞浆高尔基器增多、线粒体空化、核糖体减少。（TEM×4000）

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

现已证明，酒精性肝病时肝脏损害的程度与乙醇的剂量和作用时间呈正相关[9]，雌性大鼠比雄性大鼠对乙醇具有更高的敏感性[10]。乙醇对肝脏的损害主要是通过内毒素的作用而实现的，乙醇对肝脏的毒性作用与血浆中内毒素的水平密切相关[1,11]。然而，乙醇所致肝细胞损害确切的机制尚不清楚。内毒素或LPS必须通过与血浆中LBP及细胞膜上CD14结合才能行使其生物学功能[3~6]。以前的研究显示、ADL时肝脏组织中LBP和CD14蛋白及其基因的表达明显增高[1]，LBP和CD14两种蛋白是促使LPS与单核-巨噬细胞相互作用的细胞基础和分子基础，血中的LBP能认识和结合LPS，与之形成LPS-LBP复合物。而单核-巨噬细胞膜上的CD14受体蛋白能识别LPS－LBP复合体并激活这些细胞，产生各种细胞因子如肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素类、前列腺素及其它可溶性细胞介质[9,11,12]、在早期肝脏损害中起关键作用[13,14]。但是肝组织中CD14蛋白的确切来源尚不完全清楚。

本研究的主要目的是观察乙醇喂养大鼠时肝KCs膜上CD14蛋白及mRNA的表达以及CD14蛋白在ALD所致肝脏损害中的作用。发现乙醇喂养大鼠血浆中内毒素水平明显高于对照大鼠，KCs膜上CD14蛋白及KCs中CD14 mRNA表达明显增强，伴有细胞因子TNF－a和IL－6显著升高，同时也伴有血清中ALT升高及肝脏出现脂肪变性、坏死及炎性细胞浸润等肝脏功能与形态损害等改变。血浆内毒素含量增高的原因可能与乙醇肠粘膜通透性增加，肠道大量内毒素通过门静脉进入血循环所致。而CD14基因的表达可能与乙醇喂养大鼠肝脏内的炎症反应和坏死有关，这些变化与文献报道一致[15]。Yin等[16]发现乙醇能诱导大鼠表达CD14基因和CD14蛋白，而这些基因或蛋白的表达能增加大鼠肝脏对乙醇的敏感性，增加肝脏KCs释放TNF-α、氧自由基、白介素及其它因子释放，最终导致肝细胞损害[17~20]。因此，我们认为KCs中CD14基因及蛋白的增高造成KCs激活并释放多种细胞因子如TNF－a和IL－6可能是乙醇诱导肝细胞损害的重要机制之一。

已证实内毒素血症时是肝细胞产生急性期反应蛋白的主要部位，但ALD时肝组织中CD14蛋白和CD14 mRNA表达增高的机制尚不完全清楚。目前已知CD14基因和CD14蛋白主要由单核-巨噬细胞表达和产生[8]，酒精性肝病时肝内单核-巨噬细胞来源有两类，一类是肝内固有的巨噬细胞即KCs，第二类是炎症反应时血循环中浸润到肝脏的单核细胞和巨噬细胞等，它们均能表达高水平的CD14基因和产生CD14蛋白[19,20]。两类细胞均可能增加对内毒素的敏感性，导致核转录因子NF-kB的激活和前炎症性细胞因子的产生和释放，最终诱导肝脏细胞损害。

总之，本研究发现乙醇能导致大鼠肝Kcs膜CD14蛋白和CD14 基因明显增高，增高的CD14基因与蛋白显著增强KCs对内毒素的敏感性，释放大量细胞因子，最后导致肝脏形态改变和功能损害。

参 考 文 献

[1] Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y, et al,Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2000; 24(4 S):48-54.

[2] Amura CR, Kamei T, Ito N, et al. Differential regulation of lipopolysaccharide(LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins [J]. J Immunol, 1998; 161: 2552-2560.

[3] Soler-Rodriguez AM, Zhang H, Lichenstein H, et al. Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14 [J]. J Immunol, 2000; 164: 2674-2683.

[4] Giambartolomei GH, Dennis VA, Lasater BL. Induction of pro-and anti-inflammatory cytokines by borrelia burgdorferi lipoproteins in monocytes is mediated by CD14 [J]. Infect Immun, 1999; 67: 140-147.

[5] Lichtman SN, Wang J, Lemasters JJ. LPS receptor CD14 participates in release of TNF- α in RAW264.7 and peritoneal cells but not in Kupffer cells [J]. Am J Physiol, 1998; 275: 39-46.

[6] Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery [J]. Surgery, 2000; 127: 117-126.

[7] 龚建平，韩本立. 肝脏细胞的分离、培养和鉴定技术[J]. 世界华人消化杂志，1999;7(5):417-419.

[8] 龚建平，徐明清，李 昆，等. 内毒素介导Kupffer细胞脂多糖受体CD14的表达[J]. 第三军医大学学报，2001;23(4):425-428.

[9] Bautista AP. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophages inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver [J]. Hepatology, 1997; 25: 335-342.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[10] Limuro Y, Frankenberg MV, Arteel GE, et al. Female rats exhibit greater susceptibity to early alcohol-induced injury than males [J]. Am J Physiol, 1997; 111: 1186-1194.

[11] Jarvelainen HA, Fang C, Ingelman-Sundberg M, et al. Effect of chronic coadminstration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines [J]. Hepatology, 1999; 29: 1503-1510.

[12] Baehr Vv, Docke W-D, Plauth M, et al. Mechanisms of endotoxin tolerance in patients with alcoholic liver cirrhosis: role of interleukin 10, interleukin 1 receptor antagonist, and soluble tumour necrosis factor receptors as well as effector cell desensitisation [J]. Gut, 2000; 47: 281-287.

[13] Kamimura S, Tsukamoto H. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease [J]. Hepatology, 1995; 21: 1304-1309.

[14]. Su GL, Rahemtulla A, Thomas P, et al. CD14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease [J]. Am J Pathol, 1998; 152: 841-849.

[15] 林 红，吕 淼，张义侠，等. 酒精性肝病大鼠模型的建立[J]. 世界华人消化杂志，2001;9(1):24-28.

[16] Yin M, Ikejima K, Wheeler MD, et al. Estrogen is involved in early alcohol-induced liver injury in a rat enteral feeding model [J]. Hepatology, 2000; 31:117-123.

[17] Kono H, Rusyn I, Yin M, et al. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease [J]. J Clin Invest 2000; 106(7):867-72.

[18] Kono H, Bradford BU, Rusyn I, et al. Development of an intragastric enteral model in the mouse: studies of alcohol-induced liver disease. Using knockout technology [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2000; 7:395-400.

[19] Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, et al. Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver [J]. Am J Physiol, 2000;27:G100-G106.

[20] 龚建平，韩本立. CD14在LPS介导Kupffer细胞激活中的作用[J]. 世界华人消化杂志，1999;7(10):875-877.

(上接第118页)

律失常明显增加，但近80%的死亡患者有QTc的明显延长，并且在死亡之前持续存在，提示QTc延长与预后不良有关。

我们以前对脑梗塞患者的观察及文献报道[6-8]发现大脑半球岛叶病变对心脏自主神经活性的影响是导致心脏病变的主要病理生理机制；右侧岛叶病变后心脏副交感神经活动减弱，心脏交感神经活动相对增强，快速心律失常增加；左侧岛叶病变对HRV反映的心脏自主神经活性变化无明显影响，但导致心电图ST-T改变明显增加。本观察发现右侧壳核和额顶颞叶出血引起HRV和快速心律失常的显著改变，左侧壳核和额顶颞叶出血对HRV无明显影响，但引起ST-T异常显著增加与前述研究发现是一致的，可能是因为壳核和额顶颞叶均紧邻岛叶，这些部位的出血几乎均会影响到岛叶或其传出纤维所致。其它部位出血对HRV的影响则可能是由于血肿较大时对HRV中枢调节及其下行通路的间接影响所致。本研究提示，对壳核和额顶颞叶出血患者应加强心电监护和心脏保护。

参 考 文 献

[1] 李长清，董为伟. 脑卒中对心脏的影响[J]. 国外医学内科学分册，1996;23:113-115.

[2] Mayer SA, LiMandri G, Sherman D, et al. Electrocardiographic markers of abnormal left ventricular wall motion in acute subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosurg, 1995; 83:889-896.

[3] 陈运贞，雷 寒，谢 杨，等. 检测心脏植物神经活性的定量方法[J]. 中华心血管病杂志，1992;20:101.

[4] Cheung RTF, Hachinski V. The insular and cerebrogenic sudden death[J]. Arch Neurol, 2000;57:1685-1688.

[5] 李长清，董为伟. 心率变异性的混沌特征与脑卒中患者猝死[J]. 中华内科杂志，2001;40:216.

[6] 李长清，董为伟. 急性脑梗死患者的动态心电图异常[J]. 中华内科杂志，1999;38:239-241.

[7] 李长清，董为伟. 急性大脑半球梗塞患者24小时心率变异性变化[J]. 中华心律失常学杂志，1999;3:22-24.

[8] Tokgozoglu SL, Batur MK, Topcuoglu MA, et al. Effects of stroke localization on cardiac autonomic balance and sudden death[J]. Stroke, 1999;30:1307-1311.