基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001433

肥胖对脓毒症小鼠模型的肝脏损害作用及其对炎症反应的影响

周玉庆，陈 翔
（重庆市急救医疗中心肝胆外科，重庆 400014）

【摘 要】**目的**：探讨肥胖对脓毒症小鼠肝损害和炎症反应的影响。**方法**：6 周龄 C57BL/6J 野生型雄性小鼠 80 只随机分为高脂饮食组（HFD 组，40 只）和普通饮食组（ND 组，40 只），饲养 6 周后称重，测葡萄糖耐量，比色法检测肝脏甘油三酯（triglyceride，TG）水平。采用盲肠结扎穿刺（cecal ligation-peferation，CLP）法构建脓毒症模型，观察小鼠生存率，取血浆和肝脏组织，HE 染色观察小鼠肝脏组织，采用酶联免疫法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测谷丙转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、瘦素（leptin）、脂联素（adiponectin）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor，TNF-α）、白介素-6（interleukin-6，IL-6）及 IL-10 的表达，RT-PCR 检测活化蛋白（activator protein-1，AP-1）mRNA 的表达。**结果**：HFD 组小鼠体质量明显重于 ND 组小鼠[(34.867 ± 1.465) vs. (25.678 ± 1.761)，t=-9.827，P=0.000]，负荷实验示：HFD 组与 ND 组相比，血糖水平更高（F=200.921，P=0.000），肝脏甘油三酯水平更高（t=31.793，P=0.000）。肥胖小鼠相对于普通饮食小鼠脓毒症时生存率更低，生存时间更短（P=0.037）。经 CLP 处理后，肥胖小鼠血浆瘦素水平仍明显高于非肥胖小鼠[(27.64 ± 5.16) vs. (7.12 ± 2.91) ng/mL，F=95.141，P=0.000]，而脂联素在肥胖小鼠脓毒症时表达降低[6 h ND 组 vs. HFD 组：(8 445.344 ± 3 245.632) vs. (2 434.532 ± 2.012)，t=2.660，P=0.000]。脓毒症时小鼠血浆 TNF-α、IL-6、IL-10 表达均增加[TNF-α：(2.017 ± 1.071) vs. (170.698 ± 37.705)，t=8.137，P=0.001；(2.760 ± 0.853) vs. (122.080 ± 19.520)，t=13.553，P=0.000；IL-6：(19.955 ± 3.500) vs. (404.752 ± 50.701)，t=18.070，P=0.000；(15.975 ± 4.022) vs. (533.064 ± 104.866)，t=11.032，P=0.000；IL-10：(79.810 ± 7.042) vs. (277.156 ± 124.213)，t=4.335，P=0.012；(120.678 ± 7.172) vs. (214.111 ± 85.322)，t=3.925，P=0.020]，但肥胖小鼠相对非肥胖小鼠 TNF-α 和 IL-10 表达降低[TNF-α：(170.698 ± 37.705) vs. (122.080 ± 19.520)，t=0.981，P=0.356；IL-10：(277.156 ± 124.213) vs. (214.111 ± 85.322)，t=3.216，P=0.031]。血浆 ALT 的水平在肥胖的脓毒症小鼠中明显高于非肥胖的脓毒症小鼠[(132.774 ± 45.662) vs. (236.633 ± 42.782)，t=2.831，P=0.045]。CLP 刺激后，AP-1 在非肥胖小鼠活性增加，但在肥胖小鼠中活性增加更显著[ND 0 h vs. 6 h，(1.069 ± 0.404) vs. (1.653 ± 0.184)，F=32.886，P=0.000；6 h ND vs. HFD：(1.653 ± 0.184) vs. (5.021 ± 0.623)，F=29.189，P=0.000]。**结论**：高脂饮食诱导的肥胖小鼠在脓毒症时生存率低，肝脏损伤较重，炎症反应降低，这可能与 AP-1 活性增加有关。

【关键词】脓毒症；肥胖；肝损害；炎症反应
【中图分类号】R575.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-28

Effects of obesity on liver injury and inflammatory response in septic mouse model

Zhou Yuqing, Chen Xiang
(Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing Emergency Medical Center)

【Abstract】***Objective***: To explore the role of obesity in sepsis-induced liver injury and inflammation. ***Methods***: The experimental groups consisted of 80 male C57BL/6 mice at 6 weeks of age. Animals were randomized to HFD(n=40) or ND(n=40) for 6 weeks, then they were weighed. Glucose tolerance tests were measured. The liver triglyceride levels were determined by colorimetric assay kit. Poly microbial sepsis was induced by cecal ligation-peferation (CLP) and mice were monitored for survival. Plasma and liver tissues were collected. HE staining was used to observe the liver tissue of mice. The levels of alanine aminotransferase (ALT), leptin, adiponectin, TNF-α, IL-6 and IL-10 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). RT-PCR was used to detect the expression of activator protein-1 expression. ***Results***: The body weight of HFD group was significantly higher than that of ND group[(34.867 ± 1.465) vs. (25.678 ± 1.761), t=-9.827, P=0.000].

作者介绍：周玉庆，Email：zyq321zyq@126.com，
研究方向：肝胆外科学。
通信作者：陈 翔，Email：chenxiang996666@163.com。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1712.050.html (2017-11-28)

Glucose tolerance test: compared with the ND group, the HFD group had higher blood glucose levels and higher hepatic triglyceride levels (F=200.921, P=0.000; t=31.793, P=0.000). Obese mice had a lower survival rate and a shorter survival time (P=0.037) than ND mice in sepsis. After CLP treatment, the levels of plasma leptin in obese mice were still significantly higher than those in non-obese mice [(27.64 ± 5.16) ng/mL vs. (7.12 ± 2.91) ng/mL, F=95.141, P=0.000], while adiponectin expressions were decreased in obese mice [6 h ND group vs. HFD group: (8 445.344 ± 3 245.632) vs. (2 434.532 ± 2.012), t=2.660, P=0.000]. The expressions of TNF-α, IL-6 and IL-10 were increased in septic mice [TNF-α: (2.017 ± 1.071) vs. (170.698 ± 37.705), t=8.137, P=0.001; (2.760 ± 0.853) vs. (122.080 ± 19.520), t=13.553, P=0.000; IL-6: (19.955 ± 3.500) vs. (404.752 ± 50.701), t=18.070, P=0.000; (15.975 ± 4.022) vs. (533.064 ± 104.866), t=11.032, P=0.000; IL-10: (79.810 ± 7.042) vs. (277.156 ± 124.213), t=4.335, P=0.012; (120.678 ± 7.172) vs. (214.111 ± 85.322), t=3.925, P=0.020], but the expression of TNF-α and IL-10 in obese mice was lower than that in non-obese mice [TNF-α: (170.698 ± 37.705) vs. (122.080 ± 19.520), t=0.981, P=0.356; IL-10: (277.156 ± 124.213) vs. (214.111 ± 85.322), t=3.216, P=0.031]. Plasma ALT levels were significantly higher in obese sepsis mice than in non-obese sepsis mice [(132.774 ± 45.662) vs. (236.633 ± 42.782), t=2.831, P=0.045]. Although AP-1 activity increased in mice without obesity at 6 h after CLP, AP-1 activity was significantly higher in mice with obesity than in mice without obesity after CLP [ND 0 h vs.6 h: (1.069 ± 0.404) vs. (1.653 ± 0.184), F=32.886, P=0.000; 6 h ND vs. HFD: (1.653 ± 0.184) vs. (5.021 ± 0.623), F=29.189, P=0.000]. ***Conclusion***: High fat diet induced obese mice in sepsis have low survival rate, severe liver injury, decreased inflammatory response, which may be related to increased activity of AP-1.

【Key words】sepsis; obesity; liver injury; inflammatory response

脓毒症是指感染引起宿主反应失调导致危及生命的器官功能障碍[1]。脓毒症严重危害人类健康，是导致重症患者死亡的主要原因之一。在美国，脓毒症的发病率正在以每年 1.5%的速度增长，每年新增脓毒症 75 万例，大约有 25 万脓毒症患者死于脓毒症及其并发症，其病死率高达 25%~50%[2]。研究显示：我国每年至少新增脓毒症患者 568 万例，在过去十年估计在医院脓毒症的病死率为 26%[3]。随着生活水平的提高，肥胖人群在人口中所占的比例逐年升高，肥胖是一个重大的公共卫生问题，它与许多疾病密切相关，其中包括脓毒症[4]。严重脓毒症患者中 34%的患者超重，24%的患者患有肥胖或重度肥胖。与正常体质量脓毒症患者相比，肥胖脓毒症患者住院时间延长，住院花费增多，机械通气时间延长[5]。但是，肥胖脓毒症患者的死亡率却低于非肥胖脓毒症患者[6]，于是有人提出肥胖矛盾理论，即肥胖是心血管疾病、高血压、感染等疾病的危险因素，但肥胖病人发生感染等情况时，可能预后更好。脓毒症患者中肥胖对人体的影响尚存在争议，但无论肥胖是保护性的还是有损害性的，由于肥胖的高流行性，进一步研究脓毒症时肥胖对机体应激状态的影响十分必要。

瘦素和脂联素是肥胖患者中特异表达升高的因子，在能量代谢和免疫调节中发挥着重要作用。瘦素通过 Janus 激酶/信号传导及活化转录因子（JAK/STAT3）通路发挥作用[7]。脂联素是一种胰岛素增敏激素，近来发现脂联素能够通过激活 IL-10 抑制 HMGB1 而发挥强有力的抗炎作用[8]。本文就肥胖影响脓毒症患者预后及病理生理机制作进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 由重庆医科大学实验动物中心提供 80 只 SPF 级 C57BL/6J 野生型雄性小鼠，6 周龄，随机分为 2 组：高脂饮食组（HFD 组，D12492，60%的能量由脂肪提供，n=40）和正常饮食组（ND 组，D12450J，10%的能量由脂肪提供，n=40），饲养 6 周。这些小鼠喂养于重庆医科大学实验动物中心 SPF 动物房，其环境无病原体，平均湿度 60%，平均温度 25 ℃，每日光照周期 12 h/12 h，自由饮水饮食。

1.1.2 试剂 小鼠饲料 D12492（供能比：脂肪 60%，蛋白 20%，碳水化合物 20%）、D12450J（供能比：脂肪 10%，蛋白 20%，碳水化合物 70%）购自 Research diets 公司；血糖仪购自罗氏公司；甘油三酯比色法试剂盒购自南京建成生物研究所；瘦素、脂联素酶联免疫法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒购自苏州卡尔文生物科技有限公司；鼠肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor，TNF-α）、白介素-6（interleukin-6，IL-6）、IL-10 购自上海沪尚生物有限公司（进口分装）；鼠 ALT ELISA 试剂盒购自南京建成公司；RNA 逆转录试剂盒购自 Takara 公司；PCR 引物购自宝生物工程大连（有限）公司；TRIzon 总 RNA 提取试剂购自康为世纪公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脓毒症模型的建立 小鼠高脂饮食或正常饮食 6 周

后采用盲肠穿刺结扎(cecal ligation and puncture,CLP)的方法建立感染性休克脓毒症小鼠模型,具体方法如前所述[9]。CLP 后,每只小鼠立刻皮下注射无菌生理盐水 0.6 mL 进行液体复苏,6 h 后收集小鼠的血浆和肝脏进行相应的指标检测。

1.2.2 生存分析 HFD 组和 ND 组(n=12)经 CLP 处理后,每隔 6 h 观察 1 次小鼠的存活情况,观察 48 h。

1.2.3 小鼠葡萄糖耐量实验 HFD 组小鼠和 ND 组小鼠经 6 周小鼠饲料 D12492 和 D12450J 饲养后,空腹 6 h 后,小鼠给予腹腔注射葡萄糖溶液(2 g/kg),分别于注射前(即 0 min),注射后 15、30、60 及 120 min 取尾静脉血检测血糖(250 μL)。小鼠肝脏称重,然后将肝脏切碎后检测甘油三酯含量,甘油三酯采用比色法测定。

1.2.4 肝组织形态学观察 取相同部位的小鼠肝脏组织,4%甲醛固定,石蜡包埋,切片,行 HE 染色,光镜下观察不同组小鼠肝脏组织形态学变化。

1.2.5 酶联免疫法检测 ALT、脂肪因子及炎症因子 摘除小鼠眼球取血,经离心后取上清血浆样品保存于-80 ℃保存。血浆中 ALT、瘦素、脂联素及炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-10 浓度使用 ELISA 测定,操作严格按照各试剂盒说明书进行。

1.2.6 RT-PCR 检测活化蛋白(activator protein-1,AP-1)mRNA 的表达 小鼠肝脏组织中总 RNA 的提取如前所述[10],取 1 μL RNA 采用 PrimeScript RT Reagent Kit(Takara)反转录制备 cDNA,使用 PCR 仪器进行扩增,检测 AP-1 mRNA的表达。最终数据用 2-DDCt 法计算 mRNA 的相对表达量。

根据基因信息进行引物设计,得到的序列如下见表 1。

表 1 AP-1 mRNA 引物

Tab.1 AP-1 mRNA primer

基因		引物序列
AP-1	正义链	5'-AAACGACCTTCTACGACGATG-3'
	反义链	5'-TCGGAGGTGCGGCTTCAGATT-3'

1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS 19.0 和 GraphPad 5 做统计学分析和作图。服从正态分布的计量资料结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,生存分析采用 Log-rank test 比较 HFD 组和 ND 组生存率差异,Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。多组数据间比较采用重复测量方差分析;两组独立样本间数据比较采用独立样本 t 检验;在两个时间点的分组比较中,若第一时间点的组间比较均衡(t 检验且 P>0.05),采用 t 检验(后时间点的独立样本 t 检验、单组内时间点的前后对照的配对 t 检验);若第一时间点的组间比较不均衡(t 检验且 P<0.05),则采用协方差分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 高脂喂养诱导小鼠肥胖模型

本研究以高脂喂养诱导小鼠超重来模拟人类饮食诱导的肥胖。为了确定此模型是否可以代表人类肥胖,将 12 只 6 周龄小鼠随机分为 HFD 组(6 只)和 ND 组(6 只),这些小鼠在饮食干预前体质量无统计学差异[(21.776 ± 1.379) vs. (21.230 ± 1.159),t=0.824,P=0.429,n=6,图 1]。饮食干预 6 周后,HFD 组小鼠体质量明显重于 ND 组[(34.867 ± 1.465) vs. (25.678 ± 1.761),t=-9.827,P=0.000,图 1]。负荷实验示:HFD 组与 ND 组相比,血糖水平更高(表 2)。HFD 组与 ND 组相比,肝脏甘油三酯升高更加明显[(80.684 ± 4.007) vs. (21.645 ± 2.152) mg/dL,t=31.793,P=0.000,n=6,图 2]。这些结果表明用高脂喂养小鼠模型可以模拟人类饮食诱导的肥胖和葡萄糖耐受不良。

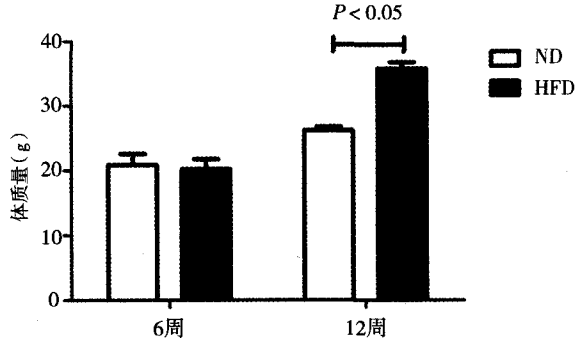


图 1 普通喂食小鼠和高脂饮食小鼠体质量比较

Fig.1 Comprison of body weight in mice fed a high-fat diet (HFD) or normal diet (ND)

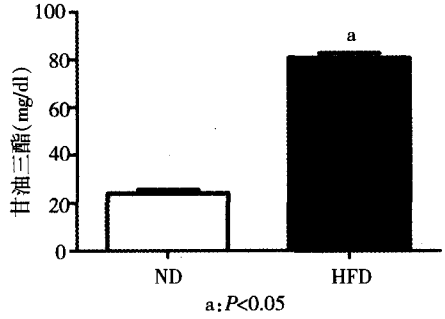


图 2 普通喂食小鼠和高脂饮食小鼠喂养 6 周时的肝脏甘油三酯水平

Fig.2 Hepatic triglyceride levels in mice fed a high-fat diet (HFD) or normal diet (ND) for 6 weeks

表 2 普通喂食小鼠和高脂饮食小鼠喂养 6 周时的葡萄糖耐量实验

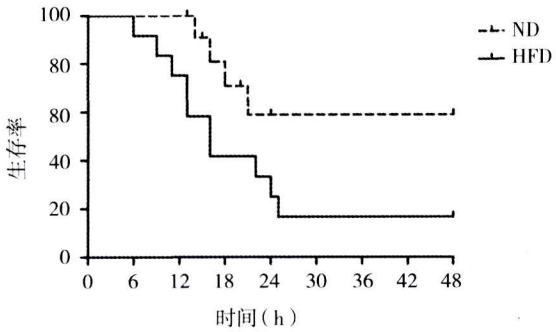
Tab.2 Glucose tolerance test in mice fed a high-fat diet (HFD) or normal diet (ND) for 6 weeks

分组	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
ND组	172.651 ± 10.474	220.780 ± 12.493	278.305 ± 19.144	264.754 ± 21.748	209.784 ± 20.358
HFD组	184.437 ± 10.115	272.955 ± 10.820	326.749 ± 25.825	314.124 ± 14.567	308.505 ± 19.021

注:$F_{组别}$ = 200.921,$P_{组别}$ = 0.000;$F_{时间}$ = 87.272,$P_{时间}$ = 0.000;$F_{交互}$ = 8.900,$P_{交互}$ = 0.000

2.2 生存分析

为确定肥胖小鼠患有脓毒症时的生存率，采用普通喂养小鼠和高脂饮食喂养的小鼠，饮食干预 6 周后，行CLP 处理，观察小鼠在 CLP 处理后 48 h 内的生存情况。本研究发现，肥胖小鼠相对于普通饮食小鼠生存率更低，生存时间更短（P=0.037，log-rank test，n=12，图 3）。



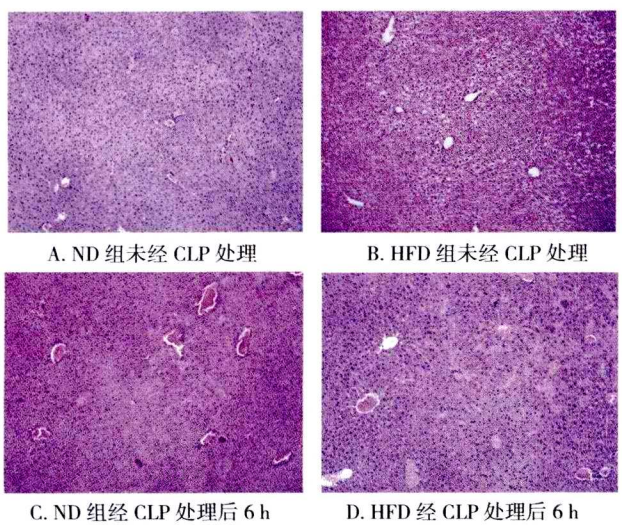
Log-rank检验，P<0.05 为有统计学差异，n=12

图 3 普通喂食小鼠和高脂饮食小鼠经 CLP 处理后的生存率比较

Fig.3 Comparison of survival rate between mice fed a high-fat diet（HFD）or normal diet（ND）for 6 weeks after CLP

2.3 各组小鼠肝脏组织病理学变化

未经 CLP 处理的 ND 组小鼠可见肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列，肝小叶结构清晰，肝细胞无变性、坏死，汇管区无炎性细胞浸润（图 4A）；未经 CLP 处理的 HFD 组小鼠可见肝细胞弥漫性水肿及明显脂肪变性，中央静脉无炎性细胞浸润（图 4B）；经 CLP 处理后 6 h 的 ND 组小鼠可见肝小叶结构破坏，肝细胞水样变性，中央静脉周围可见肝细胞片状坏死和炎细胞浸润（图 4C）；经 CLP 处理后 6 h 的 HFD 组小鼠与 c 组相比，肝细胞片状坏死相对增加，但中央静脉周围炎细胞浸润相对减少（图 4D）。



A. ND 组未经 CLP 处理　B. HFD 组未经 CLP 处理

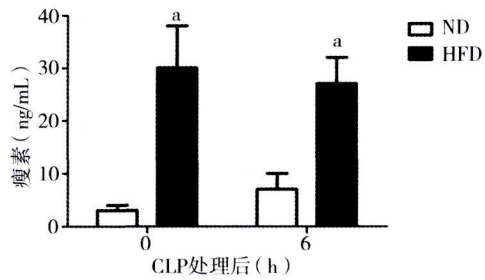
C. ND 组经 CLP 处理后 6 h　D. HFD 经 CLP 处理后 6 h

图 4 各组小鼠肝脏组织形态学观察（100×）

Fig.4 Pathological morphology of hepatic tissues of mice in each group（100×）

2.4 血浆脂肪因子

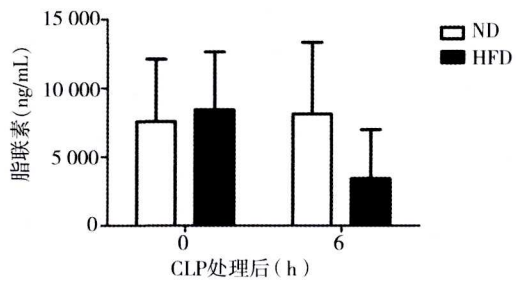
血浆中瘦素水平表达增加是肥胖的特征之一，与人类肥胖相似，肥胖小鼠血浆瘦素基线水平较非肥胖小鼠明显升高[0 h ND 组 vs. HFD 组：（2.832 ± 0.474）vs.（30.732 ± 8.562），t=7.740，P=0.000，n=5]。经 CLP 处理后，肥胖小鼠血浆瘦素水平仍明显高于非肥胖小鼠[（27.632 ± 5.161）vs.（7.122 ± 2.915）ng/mL，F=95.141，P=0.000，图 5]，说明瘦素水平的高低是由是否肥胖而非是否处于脓毒症状态而决定的。而脂联素作为一种抗炎因子，在肥胖小鼠脓毒症时表达降低[0 h ND 组 vs. HFD 组：t=1.390，P=0.112；6 h ND 组 vs. HFD 组：（8 445.344 ± 3 245.632）vs.（2 434.532 ± 2.012），t=2.660，P=0.022，图 6]。



a：与 ND 组比较，P=0.000

图 5 ND 组与 HFD 组瘦素水平比较

Fig.5 Comparison level of leptin between ND group and HFD group



a：与 ND 组比较，P<0.05

图 6 ND 组与 HFD 组脂联素水平比较

Fig.6 Comparison level of adiponectin between ND group and HFD group

2.5 高脂饮食在脓毒症时对炎症因子的影响

为了确定肥胖在脓毒症时炎症反应的影响，本研究检测了小鼠血浆中炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-10 的水平。无论是肥胖小鼠还是非肥胖小鼠，在 CLP 诱导的脓毒症时，血浆 TNF-α[（2.017 ± 1.071）vs.（170.698 ± 37.705），t=8.137，P=0.001；（2.760 ± 0.853）vs.（122.080 ± 19.520），t=13.553，P=0.000] 和 IL-6[（19.955 ± 3.500）vs.（404.752 ± 50.701），t=18.070，P=0.000；（15.975 ± 4.022）vs.（533.064 ± 104.866），t=11.032，P=0.000] 都明显增加。抗炎细胞因子 IL-10 在 CLP 刺激后表达明显增加[（79.810 ± 7.042）vs.（277.156 ± 124.213），t=4.335，

P=0.012；(120.678 ± 7.172) vs. (214.111 ± 85.322)，t=3.925，P=0.020]，而在肥胖的脓毒症小鼠中 IL-10 的表达明显低于非肥胖的脓毒症小鼠[6 h ND 组 vs. HFD 组：(277.156 ± 124.213) vs. (214.111 ± 85.322)，t=3.216，P=0.031，表 3]。

表 3 ELISA 技术检测各组炎症因子的表达(pg/mL)

Tab.3 Expression of cytokine in each group detected by ELISA(pg/mL)

检测指标	分组	时间（h，CLP 处理后）		t/P 值
		0	6	
TNF-α	ND组	2.017 ± 1.071	170.698 ± 37.705	8.137，0.001
	HFD组	2.760 ± 0.853	122.080 ± 19.520	13.553，0.000
	t 值	1.211	0.981	
	P 值	0.260	0.356	
IL-6	ND组	19.955 ± 3.500	404.752 ± 50.701	18.070，0.000
	HFD组	15.975 ± 4.022	533.064 ± 104.866	11.032，0.000
	t 值	1.670	2.135	
	P 值	0.134	0.100	
IL-10	ND组	79.810 ± 13.422	277.156 ± 124.213	4.335，0.012
	HFD组	120.678 ± 20.762	214.111 ± 85.322	3.925，0.020
	t 值	2.230	3.216	
	P 值	0.092	0.031	

2.6 高脂饮食在脓毒症时对肝损伤的影响

为了确定高脂饮食饲养后肝脏炎症与肝损伤相关，检测了血浆中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase，ALT)的表达。无论是肥胖小鼠还是非肥胖小鼠，在 CLP 诱导的脓毒症时，血浆 ALT 表达显著增加[(82.742 ± 32.534) vs. (132.774 ± 45.662)，t=5.748，P=0.004；(58.743 ± 34.745) vs. (236.633 ± 42.782)，t=5.248，P=0.001]。其中血浆 ALT 的水平在肥胖的脓毒症小鼠中明显高于非肥胖的脓毒症小鼠[6 h ND 组 vs. HFD组：(132.774 ± 45.662) vs. (236.633 ± 42.782)，t=2.831，P=0.045，表 4]。这些结果表明，肥胖小鼠在脓毒症时有更严重的肝脏炎症反应和肝损伤。

表 4 检测血浆 ALT 水平(U/L)

Tab.4 Plasma ALT levels were measured(U/L)

分组	时间（h，CLP 处理后）		t/P 值
	0	6	
ND组	82.742 ± 32.534	132.774 ± 45.662	5.748，0.004
HFD组	58.743 ± 34.745	236.633 ± 42.782	5.248，0.001
t 值	2.021	2.831	
P 值	0.078	0.045	

2.7 肥胖小鼠肝脏 AP-1 的活化

转录因子 AP-1 作为导致肥胖相关炎症的重要因子，参与炎症的信号转导。在肥胖小鼠的肝脏中 AP-1 DNA 结合活性大于非肥胖小鼠。CLP 刺激后，AP-1 在非肥胖小鼠活性增加，但在肥胖小鼠中活性增加更明显[0 h ND 组 vs. HFD 组：(1.069±0.404) vs. (1.735±0.369)，t=3.949，P=0.004；6 h ND 组 vs. HFD 组：(1.653±0.184) vs. (5.021 ± 0.623)，F=29.189，P=0.000，表 5]。

表 5 CLP 处理后 AP-1 mRNA 的表达

Tab.5 mRNA expression of AP-1 after CLP

分组	时间（h，CLP 处理后）	
	0	6
ND组	1.069 ± 0.404	1.653 ± 0.184
HFD组	1.735 ± 0.369	5.021 ± 0.623
F/t 值	3.949	29.189
P 值	0.004	0.000

3 讨 论

脓毒症是一种高致命性疾病，是导致重症患者死亡的主要原因之一，严重威胁人类的健康。曾经认为脓毒症是过度炎症反应所致的组织器官损伤。随着人们对脓毒症研究的深入，逐渐认识到脓毒症的病理生理机制十分复杂，而器官损害在脓毒症中的重要地位逐渐被认可，并于 2016 年推出了基于“器官损害”为核心的脓毒症 3.0 新定义[1]。新定义强调感染导致的器官功能障碍，反映了比普通感染更复杂的病理生理状态。其中，脓毒症时的肝脏损害是目前临床上容易忽略的，但目前急性肝损害在脓毒症救治中的地位已经得到大幅度的提升。肥胖是脓毒症常见的伴随基础疾病，目前全球有超过 1 000 万肥胖人群，肥胖的流行导致肥胖患者脓毒症的发生率逐年增加。肥胖常伴随慢性炎症反应及免疫功能紊乱。然而，关于肥胖对脓毒症预后的影响尚存在争议。1 项超过 62 000 例危重病人的 Meta 分析示，与非肥胖患者相比，肥胖患者需要更长的重症监护室住院时间和机械通气天数[11]。肥胖的儿科患者在心肺手术后具有更低的生存率[12]。然而，最近有研究发现，脓毒症患者中轻中度肥胖患者的预后比非肥胖患者更好，具有更低的死亡率，病态肥胖预后最差。于是有人提出肥胖矛盾理论，即肥胖是心血管疾病、高血压、感染等疾病的危险因素，但肥胖病人发生感染等情况时，可能预后更好[6]。脓毒症患者中肥胖对人体的影响尚存在争议，进一步研究肥胖对肝脏损害作用及其对炎症反应的影响，对于揭示脓毒症的发病机制，指导临床治疗具有重要意义。

首先，本研究以高脂喂养诱导小鼠超重来模拟人类饮食诱导的肥胖。通过此模型来进一步探究脓

毒症时机体的生理病理变化，并确定肥胖在脓毒症时肝脏损害和炎症反应的作用。研究发现，肥胖能够影响炎症因子的表达。与脓毒症非肥胖小鼠相比，脓毒症肥胖小鼠血浆瘦素表达增加而脂联素表达降低，肥胖小鼠有更明显的肝损害和高表达的 AP-1，肥胖小鼠在经 CLP 刺激后具有更高的死亡率。多项研究表明，肥胖能够增加脓毒症模型中的炎症表达和死亡率[13]。这与本研究一致。但也有一些研究发现，使用更长时间的高脂饮食喂养小鼠，在脓毒症模型中不升高死亡率，并表现出肥胖对炎症反应的保护作用[14-15]。这反映了高脂饮食的持续时间的不同，肥胖对脓毒症结局的影响也不同，其具体机制仍不清楚。

瘦素是由脂肪细胞分泌，并在调节食欲和能量稳态中发挥重要作用[16]。本研究与之前的研究都表明肥胖小鼠会增加瘦素的表达[17]。与非肥胖小鼠相比，肥胖小鼠在脓毒症模型中瘦素表达同样明显升高。瘦素对人体具有保护性作用，缺乏瘦素的小鼠更易被感染并增加炎症反应。外源性给予脓毒症非肥胖小鼠瘦素能够提高生存率[15]。瘦素还可以直接作用于单核细胞，导致 IL-1 受体拮抗剂（IL-1 receptor antagonist，IL-1Ra）的表达和分泌增加。本研究发现，脂联素在肥胖小鼠脓毒症时相对于非肥胖小鼠表达明显降低，而非肥胖小鼠无明显变化。脂联素是一种脂肪来源的活性蛋白，属于免疫负性调节因子，其抗炎作用主要通过抑制炎症因子的表达得以实现[18]。近期的研究表明，外源性脂联素能够明显降低脓毒症小鼠的炎症反应，并改善预后[19]。本研究显示脓毒症时肥胖小鼠生存率较非肥胖小鼠低，脂联素表达也降低，这些研究都表明脂联素对脓毒症炎症反应具有一定的保护作用。

本研究还发现，相较于非肥胖小鼠，肥胖小鼠脓毒症时 TNF-α 和 IL-10 表达均降低，而肝脏损伤标志物 ALT 表达增加。说明肥胖小鼠在脓毒症时炎症反应相对较轻，而肝脏损害较重。肥胖小鼠脓毒症时血浆细胞因子降低，这一现象可能会造成小鼠免疫抑制，从而增加死亡率[20]。

AP-1 活性在脓毒症非肥胖小鼠中增加，而在肥胖小鼠中 AP-1 活性增加更为显著。肥胖能够增加患者患有非酒精性脂肪肝的风险。与单纯肥胖患者相比，患有非酒精性脂肪肝的肥胖患者其肝脏 NF-κB 和 AP-1 活性增强[21]。增加 NF-κB 和 AP-1 活性与胰岛素抵抗有直接关系。游离脂肪酸刺激原代小鼠肝脏细胞会导致 AP-1 活性增强。本研究发现，肥胖小鼠相比非肥胖小鼠，肝脏甘油三酯水平更高，这可能与激活 AP-1 有关。AP-1 是信号转导通路中重要的转录因子复合物，能与许多基因上的 AP-1 位点结合，在细胞中发挥转录作用。脓毒症时活化的转录因子 AP-1 与血红素氧合酶-1（HO-1）基因启动子区的 AP-1 结合位点结合，可导致 HO-1 表达上调并发挥细胞保护作用。肥胖影响脓毒症的机制十分复杂，其具体机制还需要进一步的研究。

综上所述，高脂饮食诱导的肥胖小鼠在脓毒症时生存率低，肝脏损伤较重，炎症反应降低，这可能与 AP-1 活性增加有关。本研究提示，肥胖患者脓毒症时肝脏损害相对较重，在临床中针对肥胖的脓毒症患者，尤其需注意保护患者的肝脏。在进一步的研究中，需明确肥胖、AP-1 及严重脓毒症预后的关系，阐释 AP-1 对严重脓毒症患者的影响，发现改善患者预后的新方法。

参 考 文 献

[1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810.

[2] Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States[J]. Crit Care Med, 2013, 41(5): 1167-1174.

[3] Liao X, Du B, Lu M, et al. Current epidemiology of sepsis in mainland China[J]. Ann Transl Med, 2016, 4(17): 324.

[4] Brown CV, Neville AL, Salim A, et al. The impact of obesity on severely injured children and adolescents[J]. J Pediatr Surg, 2006, 41(1): 88-91.

[5] Prescott HC, Chang VW, O' Brien JM Jr, et al. Obesity and 1-year outcomes in older Americans with severe sepsis[J]. Crit Care Med, 2014, 42(8): 1766-1774.

[6] Hogue CW Jr, Stearns JD, Colantuoni E, et al. The impact of obesity on outcomes after critical illness: a meta-analysis[J]. Intensive Care Med, 2009, 35(7): 1152-1170.

[7] Kaplan JM, Nowell M, Lahni P, et al. Short-term high fat feeding increases organ injury and mortality after polymicrobial sepsis[J]. Obesity (Silver Spring), 2012, 20(10): 1995-2002.

[8] Elfeky M, Kaede R, Okamatsu-Ogura Y, et al. Adiponectin inhibits LPS-induced HMGB1 release through an AMP kinase and heme oxygenase-1-dependent pathway in RAW 264 macrophage cells[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 5701959.

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001456

高糖环境下 HIF1α-KIM1 信号通路对糖尿病肾病肾间质纤维化的影响

于 芳[1],李雅倩[2],党 勇[1]

(1. 安阳市人民医院肾内科,安阳 455000;2. 南昌大学第一临床医学院,南昌 330000)

【摘 要】目的:探讨高糖环境下缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF1α)-肾损伤分子-1(kidney injury molecule-1,KIM1)信号通路对糖尿病肾病肾间质纤维化的影响。**方法**:体外培养人肾小管上皮细胞,分为正常对照组、高糖组、转染对照组、HIF1α 转染组和 KIM1 转染组:①正常对照组(5.6 mmol/L 葡萄糖);②高糖组(30 mmol/L 葡萄糖);③转染对照组(30 mmol/L 葡萄糖+乱序的非特异性 siRNA);④HIF1α 转染组(30 mmol/L 葡萄糖+HIF1αsiRNA);⑤KIM1 转染组(30 mmol/L 葡萄糖+ KIM1 siRNA)。分析 HIF1α、KIM1、纤维连接蛋白(fiber link protein,FN)和Ⅰ型胶原蛋白(Ⅰ type COLlagen,COL-Ⅰ)的表达。**结果**:高糖组的的 HIF1α、KIM1、FN、COL-Ⅰ的蛋白相对表达量和 mRNA 相对表达量明显高于正常对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。HIF1α 转染组的 HIF1α、KIM1、FN、COL-Ⅰ的蛋白相对表达量和 mRNA 相对表达量明显低于转染对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。KIM1 转染组的 KIM1、FN、COL-Ⅰ的蛋白相对表达量和 mRNA 相对表达量明显低于转染对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。KIM1 转染组的 HIF1α 的蛋白相对表达量和 mRNA 相对表达量与转染对照组比较并无明显变化。**结论**:高糖环境下 HIF1α-KIM1 信号通路能够通过调控 FN、COL-Ⅰ等相关蛋白的表达影响糖尿病肾病肾间质纤维化的发生和发展。

【关键词】高糖;缺氧诱导因子-1α;肾损伤分子-1;糖尿病肾病;肾间质纤维化

【中图分类号】R587.1 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2017-01-10

作者介绍:于 芳,Email:13949525579@163.com,
研究方向:肾病的研究和治疗。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171130.1016.012.html
(2017-11-30)

[9] Hubbard WJ,Choudhry M,Schwacha MG,et al. Cecal ligation and puncture[J]. Shock,2005,24(s1):52-57.

[10] Chen C,Ridzon DA,Broomer AJ,et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res,2005,33(20):e179.

[11] Akinnusi ME,Pineda LA,El Solh AA. Effect of obesity on intensive care morbidity and mortality:a meta-analysis[J]. Criti Care Med,2008,36(1):151-158.

[12] Srinivasan V,Nadkarni VM,Helfaer MA,et al. Childhood obesity and survival after in-hospital pediatric cardiopulmonary resuscitation [J]. Pediatrics,2010,125(3):e481-488.

[13] Kaplan JM,Nowell M,Lahni P,et al. Short-term high fat feeding increases organ injury and mortality after polymicrobial sepsis[J]. Obesity,2012,20(10):1995-2002.

[14] Khan M,Patrick AL,Fox-Robichaud AE. Development of a murine model of early sepsis in diet-induced obesity[J]. Biomed Rse Int,2014,2014:719853.

[15] Siegl D,Annecke T,Johnson BL,et al. Obesity-induced hyperleptinemia improves survival and immune response in a murine model of sepsis[J]. Anesthesiology,2014,121(1):98-114.

[16] Halaas JL,Gajiwala KS,Maffei M,et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene[J]. Science,1995,269(5223):543-546.

[17] Frederich RC,Hamann A,Anderson S,et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice:evidence for diet-induced resistance to leptin action[J]. Nature medicine,1995,1(12):1311-1314.

[18] Yokota T,Oritani K,Takahashi I,et al. Adiponectin,a new member of the family of soluble defense collagens,negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages [J]. Blood,2000,96(5):1723-1732.

[19] Li S,Bao HG,Han L,et al. Effects of adiponectin on mortality and its mechanism in a sepsis mouse model[J]. J Investi Surgery,2012,25(4):214-219.

[20] Kaplan JM,Nowell M,Lahni P,et al. Obesity enhances sepsis-induced liver inflammation and injury in mice[J]. Obesity(Silver Spring),2016,24(7):1480-1488.

[21] Videla LA,Tapia G,Rodrigo R,et al. Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients[J]. Obesity(Silver Spring),2009,17(5):973-979.

(责任编辑:冉明会)