

· 论 著 ·

乙酸乙酯对脂多糖诱导小鼠急性肝损伤的保护作用*

肖楠¹, 李静¹, 刘玉欣^{1△}, 王盈¹, 崔世怡¹, 杨更亮²

(1. 河北大学药学院细胞药理研究室, 保定 071002; 2. 河北省药物质量分析控制重点实验室, 保定 071002)

摘要:目的 探讨乙酸乙酯(EA)对 D-氨基半乳糖(GalN)/细菌脂多糖(LPS)诱导小鼠的充血型急性肝损伤的保护作用。方法 给受试 KM 小鼠皮下注射生理盐水、溶剂或 EA(0.4~1.0 g/kg), 30 min 后腹腔注射 GalN/LPS(800 mg/100 μg) · kg⁻¹ 连续观察 48 h, 记录动物死亡情况。同样处理的另一组动物在腹腔注射 GalN/LPS 之后不同时间点(1, 2, 4, 8, 12 h)分别采集血清和肝脏样本。测定 ALT、NO; 肝脏样本行标准 HE 染色, 观察形态学变化。结果 经 EA 0.6 g/kg 预处理 30 min 可以使 GalN/LPS 造成的 24 h 死亡率从 86.00% 降低至 14.30%; 明显抑制 GalN/LPS 引起的肝脏损伤, 并有效抑制了 GalN/LPS 诱导的 ALT、NO 的升高。结论 EA 对 GalN/LPS 造成的急性肝损伤有明显的保护作用。

关键词:乙酸乙酯; 半乳糖; 脂多糖类; 内毒素性休克; 一氧化氮

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.08.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)08-0729-03

Protective effect of ethyl acetate on D-galactosamine/lipopolysaccharide induced acute liver injury*

Xiao Nan¹, Li Jing¹, Liu Yuxin^{1△}, Wang Ying¹, Cui Shiyi¹, Yang Gengliang²

(1. Laboratory of Cell Pharmacology, College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Drug Quality Control Key Laboratory of Hebei Province, Baoding 071002, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of ethyl acetate on acute endotoxic hepatic injury. **Methods** The KM mice were administered saline, vehicle or ethyl acetate(0.4-1.0 g/kg) subcutaneously 30min before GalN/LPS(800 mg/100 μg) · kg⁻¹ injection(ip), recorded the mortality at 8, 12, 24, 48 h. Another group was killed at different time point(1, 2, 4, 8, 12 h after GalN/LPS injection), and the blood, liver samples were collected for analysis. The levels of NO and ALT in serum and liver were detected. A portion of the liver was fixed in 10% neutral formalin, processed by standard histological techniques, stained with hematoxylin and eosin. **Results** GalN/LPS-induced ALT, NO elevation could be effectively inhibited by ethyl acetate. 30 min pre-administration of ethyl acetate(0.6 g/kg) significantly decreased GalN/LPS-induced mortality from 86.00% to 14.30%. Pretreatment with ethyl acetate inhibited significantly liver damage induced by GalN/LPS. **Conclusion** Ethyl acetate has significant protective effects on GalN/LPS-induced liver injury.

Key words: ethyl acetate; GalN; lipopolysaccharides; endotoxin shock; nitric oxide

乙酸乙酯(ethyl acetate, EA)又称醋酸乙酯, 纯净的 EA 是无色透明有芳香气味的液体。其作为提取剂, 用于医药、有机酸等产品的生产。但是, 其应用于预防治疗肝脏疾病尚未见报道。Ulloa 等^[1]报道, 丙酮酸乙酯可以显著的抵御细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的出血性休克, 降低出血性休克导致的死亡率, 并且可以有效地抑制 TNF-α 的生成; 乙醇在急性暴露时可以降低 LPS 所致内毒血症引起的死亡率^[2], 抑制 TNF-α、IL-6、IL-1β、趋化因子(CXC)、游走抑制因子(MIF)、糖蛋白 130(gp130)的产生, 增加抗炎细胞因子 IL-10 的活性^[3-5]。EA 与丙酮酸乙酯有类似的化学结构, 且是由乙醇、乙酸化合而成, 因此本研究选用 EA 作为预防药物。如果能证明 EA 对肝脏急性损伤模型有保护作用, 就可以为其临床或保健食品应用提供依据。而对其作用机制的深入了解对理解 Toll 样受体 4(TLR4)传导通路的调控也具有一定的理论意义^[6]。

通过建立急性肝损伤动物模型, 研究肝病的发生机制, 对筛选保肝药物、探索保肝作用原理具有十分重要的意义。LPS 可引起肝损伤、内毒素性休克、弥漫性血管内凝血、多器官功能衰竭等病理过程^[7]。D-氨基半乳糖(D-Galactosamine, GalN)可增加小鼠对 LPS 敏感性, 引起小鼠急性肝脏损伤, 伴严重肝

脏充血和坏死, 甚至出现死亡^[8]。因此, 本研究采用小鼠 GalN/LPS 急性肝损伤动物模型, 探讨 EA 对 GalN/LPS 诱导急性肝损伤发生的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究采用清洁级 KM 小鼠, 购自河北省实验动物中心 [许可证号: SCXK(冀)2008-1-003, 合格证编号: 911098; 912043; 912110]。实验采用 4~5 周龄小鼠, 动物房室温 21.8 °C, 12 h 人工黑暗/光照周期, 自由采食和饮水, 实验前禁食 12 h, 体质量(20.3±0.177)g。本研究遵循的程序符合国家及提供实验动物单位制定的有关实验动物福利的规定和制度。

1.2 方法

1.2.1 实验药品 GalN、LPS、RIPA 组织/细胞裂解液: R0020, 北京索莱宝科技有限公司; 无水乙醇: 分析纯, 天津(香港)新通精细化工有限公司; 乙酸钠: 分析纯, 天津市天大化工实验厂; EA: 分析纯, 天津启伦化学科技有限公司; 磷酸: 分析纯, 北京化工厂; 磺胺: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; N-1-萘基乙二胺二盐酸盐: 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 亚硝酸钠: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醛:

分析纯,张家口市化学试剂厂。

1.2.2 实验药品的配制 (1)LPS:在无菌环境中用无菌生理盐水配制成 5 mg/mL 的 LPS 原液,37 °C 水浴 30 min,-80 °C 冻存备用。实验前根据预实验结果配制 GalN/LPS(800 mg/100 μg)·kg⁻¹]溶液。(2)EA 溶液:按照 EA:乙醇:水(V:V)6:3:1 比例配制 EA 溶液。(3)格里斯(Griess)试剂:用双蒸水溶解试剂,配制成含 1.0%磺胺、0.1%N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐、2.5%磷酸的 Griess 试剂,放置在锡箔包裹的棕色瓶中用磁力搅拌棒搅拌 1 h 完全溶解,4 °C 保存备用^[9]。

1.2.3 实验处理 将 KM 小鼠随机分为 4 组:空白对照组、模型组(GalN/LPS)、EA 治疗组(EA+GalN/LPS)、溶剂对照组。空白对照组、模型组小鼠颈后皮下注射生理盐水(5 mL/kg);EA 治疗组颈后皮下注射 EA 溶液(0.4~1.0 g/kg);溶剂对照组颈后皮下注射乙醇(0.26 g/kg)。30 min 后,除空白对照组腹腔注射生理盐水外,各组腹腔注射 GalN/LPS(800 mg/100 μg)·kg⁻¹。在注射 GalN/LPS 后 1、2、4、8、12 h 分别眼眶后静脉采血并处死动物。采集血清和每只动物的部分肝脏样本置于-80 °C 冰箱储存以备测,另一部分肝脏样本使用 10%甲醛溶液固定,以备制作石蜡切片。

1.2.4 样本中 NO 的测定 取-80 °C 冻存的肝脏组织,用锡箔纸包裹,浸入液氮急速冷冻,用研钵研磨后取适量组织样本置于 1.5 mL 离心管中,按照每 20 毫克组织样本加入细胞裂解液/蛋白酶抑制剂 200 μL/2 μL 的比例加入试剂。使用超声细胞破碎仪 2 号变幅杆,10% 功率,工作/暂停以 1 s/3 s 时间间隔进行破碎,直至组织成匀浆状。将匀浆状样本于 4 °C、15 000 r/min 离心 5 min。取上清液用于 NO 检测。

采用 Griess 试剂法测定血清和肝组织提取液中 NO 的含量。取 50 μL 样品加入 96 孔板中,再加入 50 μL Griess 试剂,室温放置 10 min,于酶标仪上 540 nm 处测定各孔 OD 值。根据同一 96 孔板上系列浓度的亚硝酸钠(1~100 μg/mL)绘制的标准曲线计算 NO 的含量。

1.2.5 血清中 ALT 的测定 按照日立 7020 型全自动生化分析仪说明书测定血清中 ALT 活性。当测定值过高时用生理盐水适当稀释。

1.2.6 肝脏组织石蜡切片的制作 肝脏样本经 10%甲醛溶

液固定,石蜡包埋、切片及 HE 染色,制成肝脏样本石蜡切片。使用 BI-2000 医学图像分析系统进行拍照以及图像分析。

1.3 统计学处理 使用 Origin6.0 计算标准曲线,使用 SPSS Statistics17.0 软件进行数据分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t* 检验判断差异是否有统计学意义。

2 结果

2.1 EA 对 GalN/LPS 诱导急性肝损伤大鼠死亡率的影响 经 EA(0.6 g/kg)预处理 30 min 的小鼠对由 GalN/LPS 诱导的内毒素休克有明显的保护作用,可以显著地降低内毒素休克所导致的小鼠死亡率。模型组小鼠 24 h 的死亡率为 86.00%,经 30 min EA(0.6 g/kg)预处理的小鼠 24 h 的死亡率仅为 14.30%(表 1)。EA 0.4 g/kg 的剂量在 24 h 时死亡率上升是由于过低的 EA 剂量不足以对 GalN/LPS 诱导的死亡率产生足够的保护作用。因此 EA 预处理对 GalN/LPS 诱导急性肝损伤的死亡率的降低有显著作用。

2.2 EA 对 GalN/LPS 诱导急性肝损伤的保护作用

2.2.1 EA 抑制 GalN/LPS 诱导的血清中 ALT 升高 EA 对 GalN/LPS 所诱导的 ALT 的升高有明显的抑制作用(表 2)。与空白对照组比较,模型组血清中 ALT 明显增高($P < 0.01$),经 EA 预处理 30 min,与模型组比较,8、12 h 时明显降低($P < 0.05$),溶剂对照组与模型组比较无明显差异。

表 1 EA 对 GalN/LPS 诱导急性肝损伤大鼠死亡率的影响(%)

组别	8 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	0.00*	0.00**	0.00**	0.00**
溶剂对照组	20.20	72.60	79.00	90.30
模型组	24.60	70.20	86.00	93.00
EA 治疗组				
1.0 g/kg	—	—	41.70*	—
0.8 g/kg	—	—	25.00*	—
0.6 g/kg	0.00**	4.80**	14.30**	19.00**
0.4 g/kg	—	—	33.33*	—

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$,与模型组比较;—:表示未测。

表 2 EA 对 GalN/LPS 诱导血清中 ALT 的影响($\bar{x} \pm s$, μg/mL)

组别	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h
空白对照组	50.8±11.0	51.1±11.6	52.1±10.8	51.7±12.0**	52.0±12.0**
溶剂对照组	—	—	—	—	12 995.0±154.76
模型组	40.0±15.5	44.0±7.5	52.1±13.6	6 553.3±2 811.2	19 613.3±1 577.2
EA 治疗组	28.0±8.0	32.6±8.0	40.0±14.1	60.0±37.9*	5 640.8±2 410.8**

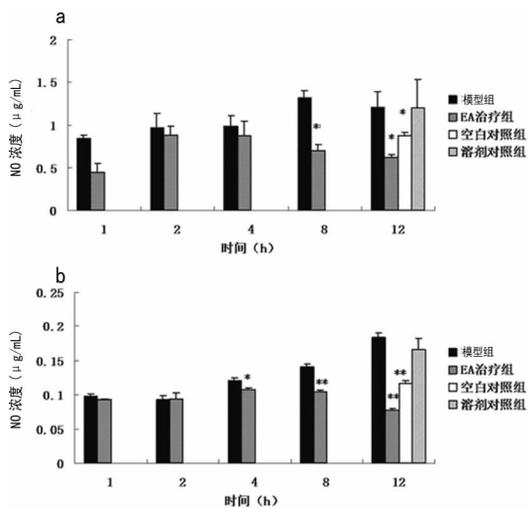
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与模型组比较;—:表示未测。

2.2.2 EA 保护 GalN/LPS 诱导的肝组织损伤 肝脏出血型急性坏死是 GalN/LPS 诱导的内毒素休克的主要症状之一。空白对照组小鼠肝脏组织可见肝小叶结构正常,可见中央静脉周围呈放射状、索窦状结构,肝细胞正常,未见异常改变,肝血窦正常无充血(插 I 图 1a)。模型组小鼠肝脏切片可见弥漫性肝细胞坏死,肝小叶结构紊乱,肝血窦明显扩张淤血(插 I 图 1b)。EA 预处理 30 min 可明显改善 GalN/LPS 诱导的肝损伤(插 I 图 1c),肝淤血和肝细胞坏死少见。溶剂对照组切片肝

细胞破碎、坏死、中央静脉弥漫性充血,与模型组比较,无明显差异(插 I 图 1d)。

2.2.3 EA 对 GalN/LPS 诱导急性肝损伤 NO 水平的抑制作用 鼠腹腔注射 GalN/LPS 后(图 2a)8 h 时,模型组血清 NO 浓度上升并维持在较高水平。EA 治疗组血清 NO 水平未见明显上升($P < 0.05$)。12 h 时溶剂对照组与模型组比较,未见明显差异。肝脏 NO 水平 12 h 时,模型组达到最高值(图 2b),EA 治疗组肝脏 NO 水平均未明显升高($P < 0.01$)。溶剂对

对照组与模型组比较,无明显差异。



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 2 EA 对 GalN/LPS 诱导急性肝损伤 NO 水平的影响

3 讨 论

丙酮酸乙酯预处理小鼠可以有效抑制 LPS 诱导的急性肝损伤^[1],同时急性乙醇处理可以降低 LPS 诱导的动物死亡率^[10],而有类似结构的 EA 尚未见报道。EA(0.6 g/kg)在体内完全代谢之后,成为乙醇(0.314 g/kg)和乙酸,乙酸以乙酸钠(0.559 g/kg)的形式存在于体内。乙醇和乙酸钠剂量远远小于其抑制 LPS 诱导急性肝损伤的剂量,说明 EA 在体内单独作用,抑制 LPS 诱导的急性肝损伤。本研究结果显示,溶剂组没有效果的原因在于乙醇有对 LPS 诱导急性肝损伤的保护作用,但 0.26 g/kg 的剂量远小于乙醇其保护作用的剂量^[10]。EA 对小鼠进行预处理 30 min 可以有效降低 GalN/LPS 诱导的死亡率,同时可以有效降低血清中 ALT 水平以及血清、肝脏中 NO 水平。

GalN/LPS 可诱导生物体 NO 含量升高,随着时间的延长及肝损伤的加重,内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性被抑制,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达增加,持续产生大量的 NO,增加氧自由基的产生,造成细胞毒性作用^[11]。在 LPS 联合 GalN 所致急性肝损伤中,动物体内 iNOS mRNA 的表达不断增强,iNOS 蛋白持续表达,促进 NO 水平升高,增高的 NO 在内毒素性休克早期诱导肝细胞凋亡和肝损伤,抑制 NO 和 iNOS 的合成对急性肝损伤有保护作用^[12-13]。本实验结果显示,EA 抑制了 NO 的产生,推测其机制可能是抑制 iNOS 活性,有待进一步证实。

LPS 诱导的内毒素性休克与过量的细胞因子释放到循环系统中有关,以 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 为主的细胞因子以“细胞因子瀑布”的形式释放到生物体内^[14-15]。同时 LPS/GalN 诱导 NF- κ B 前致炎细胞因子通路激活也将导致严重的炎症反应^[16]。而 EA 可以明显抑制 GalN/LPS 诱导的内毒素性休克,推测 EA 对内毒素性休克中的保护作用涉及到细胞因子瀑布的阻断,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Ulloa L, Ochani M, Yang H, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation [J]. Proc Natl Acad Sci USA,

2002,99(19):12351-12356.
 [2] Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status[J]. Br J Anaesth,1996,77(1):110-117.
 [3] Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, et al. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients [J]. Hepatology, 1991, 13 (2): 267-276.
 [4] Szabo G, Mandrekar P, Catalano D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment [J]. J Leukoc Biol,1995,58(3):342-350.
 [5] Verma BK, Fogarasi M, Szabo G. Down-regulation of tumor necrosis factor alpha activity by acute ethanol treatment in human peripheral blood monocytes [J]. J Clin Immunol,1993, 13(1):8-22.
 [6] 刘鸿翔,刘虹. 内毒素耐受发生机制研究进展 [J]. 重庆医学,2006,35(9):850-852.
 [7] Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide; roles of the receptor complex [J]. Pharmacol Ther,2003,100(2):171-194.
 [8] Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(11): 5939-5943.
 [9] Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide; biochemistry, Pathophysiology and detections [J]. Am J Clin Pathol, 1993, 100 (5): 567-575.
 [10] Bautista AP, Spitzer JJ. Cross-tolerance between acute alcohol intoxication and endotoxemia [J]. Alcohol Clin Exp Res, 1996, 20(8): 1395-1400.
 [11] Ma T, Ischiropoulos H, Brass CA. Endotoxin-stimulated nitric oxide production increases injury and reduces rat liver chemiluminescence during reperfusion [J]. Gastroenterology, 1995, 108(2): 463-469
 [12] Yang F, Contois AS, Fang L. Nitric oxide-derived nitrate anion contributes to endotoxic shock and multiple organ injury/dysfunction [J]. Crit Care Med, 2002, 30(3): 650.
 [13] Liu TH, Robinson EK, Helmer KS. Does upregulation of inducible nitric oxide synthase play a role in hepatic injury? [J]. Shock, 2002, 18(6): 549-554.
 [14] Triantafyllou M, Triantafyllou K. Lipopolysaccharide recognition; CD14, TLRs and the LPS-activation cluster [J]. Trends Immunol, 2002, 23(6): 301-304.
 [15] Rhee SH, Hwang D. Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (44): 34035-34040.
 [16] 罗真春,黄燕,秦开秀,等. 核转录因子- κ B 在急性肺损伤小鼠中的动态表达 [J]. 重庆医学, 2009, 38(16): 2005-2006.