

青蒿琥酯对非酒精性脂肪肝 小鼠肝脏 TLR4 及 MyD88 表达的影响

白纪红¹ 梁志清^{2*} 赵日红³ 孟良燕² 甄瑞峰⁴ 薛利平²

摘要 目的 观察青蒿琥酯对非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 小鼠肝脏 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88) 和磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) 表达的影响。方法 70 只昆明小鼠随机分为正常对照组、模型组、青蒿琥酯高 [60 mg/(kg·d)]、中 [30 mg/(kg·d)]、低 [15 mg/(kg·d)] 剂量组。采用高脂饲料构建 NAFLD 小鼠动物模型,于给药后 12 周末处死,观察肝脏病理变化,酶法检测血清三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平,RT-PCR 法检测肝组织 TLR4、MyD88、PI3K mRNA 表达。结果 各青蒿琥酯剂量组小鼠血清 TG、TC 和 ALT 水平比模型组显著降低,肝脏脂肪变性明显减轻,肝组织 TLR4、MyD88 及 PI3K 表达量也显著降低 ($P < 0.01$ $P < 0.05$)。与正常对照组相比,模型组肝组织 TLR4、MyD88 及 PI3K 表达量显著升高 ($P < 0.01$),且三者有相同的变化趋势。结论 TLR4/MyD88 及其下游 PI3K/AKT 通路可能在 NAFLD 发病中起重要作用。青蒿琥酯可通过降低 TLR4、MyD88、PI3K mRNA 表达,减轻 NAFLD 小鼠肝脏脂肪变性程度,降低血脂,改善肝功能指标。

关键词 青蒿琥酯;非酒精性脂肪性肝病;Toll 样受体-4;小鼠

中图分类号 R 575.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1468-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.011

非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指无过量酒精摄入患者,肝细胞脂肪变性、脂质贮积及炎症细胞浸润、损伤和为特征临床病理综合征^[1]。炎症因子失衡是 NAFLD 发生发展过程中重要的病理生理基础。Toll 受体 4 (

Toll like receptor 4, TLR4) 通过一系列级联反应激活 NF- κ B, 促进炎症因子释放,在 NAFLD 的发生和发展中起着重要的作用^[2-3]。

课题组前期研究^[4]表明,青蒿琥酯能有效减轻 NAFLD 模型小鼠肝组织病理损伤程度,通过降低 NF- κ B、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 的产生,起到抗炎降脂作用。该研究通过观察青蒿琥酯对 NAFLD 模型小鼠血脂、血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、肝脏脂肪变性程度、肝脏 TLR4、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 及磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphoinositide-3 kinase, PI3K) mRNA 表达的影响,研究 TLR4/MyD88 及其下游 PI3K/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, AKT) 信号通路在 NAFLD 的作用,探讨 NAFLD 的发生机制,以及青蒿琥酯干预 NAFLD 的作用机制和效果,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 桂林医学院实验动物中心提供的 SPF 级昆明小鼠 70 只,雄性,17~22 g。自由饮水进食,动物实验室内:室温 22~25 $^{\circ}$ C,相对湿度 50%~60%,每天光照和黑夜分别 12 h。

1.1.2 主要药物和试剂 注射用青蒿琥酯 (桂林南药股份有限公司),临用前 5% 碳酸氢钠注射液 1 ml 溶解,加 5% 葡萄糖注射液稀释至所需浓度;蛋黄粉 (亳州市红日蛋制品有限责任公司);丙硫氧嘧啶 (南通净化制药股份有限公司);胆固醇 (深圳市石金谷科技有限公司); β -actin、TLR4、MyD88、PI3K 引物 (美国 Invitrogen 公司); β -actin: 3'-CAAGCAG-GAGTACGATGAGT-5' (上游), 3'-AAACGCAGCT-CAGTAACAGT-5' (下游); TLR4: 3'-AGTGCCAGT-CAGGGTCATT-5' (上游), 3'-AAACTCCCCAGC-CCTTTATG-5' (下游); MyD88: 5'-CTGGCCTGAG-CAACTAGGAC-3' (上游), 5'-TGTCCCAAAGGAAA-CACACA-3' (下游); PI3K: 5'-GGGAGCAGTTGGT-

2017-04-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81260078); 广西自然科学基金 (编号: 2012GXNSFAA276038、2014GXNSFAA118152); 广西医药卫生自筹经费计划课题 (编号: Z2015367)

作者单位: 桂林医学院附属医院¹ 研究生科、² 感染性疾病科、³ 新生儿科、⁴ 老年内科 桂林 541001

作者简介: 白纪红 女 副主任药师;

赵日红 男 主治医师 硕士 责任作者 E-mail: 714603133

@qq.com

* 对本文具有同等贡献

GACATCT-3'(上游), 5'-CTACCCATCACAGCACAT-GG-3'(下游)。2×PCR MasterMix(北京天根生物科技有限公司); RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司); 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司); Percoll 液(美国 GE healthcare 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模及分组

雄性昆明小鼠 70 只, 随机分为正常对照组 20 只, 高脂饮食组 50 只。正常对照组普通饲料喂养, 高脂饮食组喂以高脂饲料, 高脂饲料按照以下配方配制: 72.8% 的普通配合饲料、0.2% 的丙硫氧嘧啶、5% 的蔗糖、2% 的胆固醇、10% 的猪油、10% 的蛋黄粉。喂养 4 周后随机抽取正常对照组和高脂饮食组各 10 只, 通过肝脏病理变化确定造模是否成功。造模成功后, 高脂饮食组随机分为模型组、青蒿琥酯 3 个剂量组: 高 [60 mg/(kg·d)], 中 [30 mg/(kg·d)], 低 [15 mg/(kg·d)] 剂量组, 10 只/组, 继续喂养。青蒿琥酯腹腔注射给药, 模型组及正常对照组给予生理盐水作为对照, 给药时间为 12 周。

1.2.2 标本采集

药物干预 12 周后处死各组小鼠, 通过腹主动脉取血、离心处理, 取上清液, 血清标本 -80 °C 冰箱保存。取肝左叶, 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、连续切片、HE 染色, 镜下观察肝脏脂肪变性程度。其余肝脏组织 -80 °C 冰箱保存, 用以 RT-PCR 法检测肝组织相应 mRNA 表达。

1.2.3 肝组织病理检查

病理科医师单盲阅片, 分为 5 个等级: 阴性(-): 未见含有脂滴的肝细胞, +: 脂肪变肝细胞占细胞总数 < 1/3, ++: 脂肪变肝细胞占细胞总数 1/3 ~ 2/3, +++: 脂肪变肝细胞占细胞总数 > 2/3, ++++: 几乎全部是脂肪变肝细胞。

1.2.4 酶法测定血清三酰甘油 (triacylglycerol, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、ALT 水平

所有血清标本同批处理, 所用仪器: 日立全自动生化分析仪 7600 型全自动生化检测仪。

1.2.5 RT-PCR 法检测 TLR4、MyD88、PI3K 的 mRNA 表达

严格按试剂盒说明书的步骤操作, 提取肝组织总 RNA 及逆转录合成 cDNA, PCR 扩增。反应条件: 94 °C、3 min 94 °C、30 s 55 °C、30 s, 延伸 72 °C、30 s 循环 35 次, 最后 72 °C、5 min 终止延伸。PCR 产物经凝胶电泳、全自动凝胶成像分析, TLR4、MyD88 及 PI3Ks 表达的相对水平计算: 相应条带光密度值/内参 β -actin 条带光密度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行分析,

等级资料采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验, 以 χ^2 值表示检验统计量, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝组织脂肪变性的比较

① 正常对照组: 10 只均为(-), 肝细胞排列整齐, 结构完整, 以中央静脉为中心, 呈放射状排列, 细胞核居中, 胞质丰富; ② 模型组: 4 只为(++), 6 只为(++), 肝细胞排列紊乱, 肝细胞中至重度水肿, 胞质内出现大小不等的脂滴, 细胞核被挤向一侧; ③ 青蒿琥酯高剂量组 4 只为(++), 6 只为(+); ④ 青蒿琥酯中剂量组 1 只为(++), 5 只为(++), 4 只为(+); ⑤ 青蒿琥酯低剂量组 2 只(++), 5 只为(++), 3 只为(+), 肝细胞脂肪变性得到改善, 脂滴数量较模型组小鼠明显减少, 但低剂量组略多于高、中剂量组。见图 1。

各组小鼠肝组织脂肪变性改变差异有统计学意义 ($\chi^2 = 32.328, P < 0.001$), 根据各组平均秩次分析, 脂肪变性程度由重到轻的顺序为: 模型组、青蒿琥酯低剂量组、中剂量组、高剂量组。见表 1。

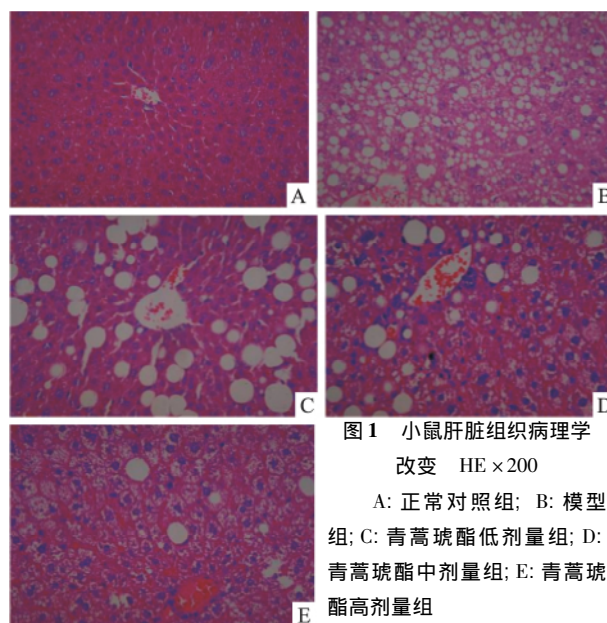


图 1 小鼠肝脏组织病理学改变 HE × 200
A: 正常对照组; B: 模型组; C: 青蒿琥酯低剂量组; D: 青蒿琥酯中剂量组; E: 青蒿琥酯高剂量组

2.2 小鼠血清 TG、TC、ALT 分析

与正常对照组相比, 模型组血清 TG、TC、ALT 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 青蒿琥酯高、中、低剂量组 TG、TC 下降 ($P < 0.05, P < 0.01$); 血清 ALT 仅高剂量显著降低 (TG: $F = -79.114$; TC: $F = -27.243$; ALT: $F = -13.110, P < 0.01$)。见表 2。

表1 各组小鼠肝组织病理改变的比较 (n=10)

组别	HE 染色脂肪变结果分级					平均秩次 (\bar{R})
	-	+	++	+++	++++	
正常对照	10	0	0	0	0	5.50
模型	0	0	6	4	0	38.90
青蒿琥酯低剂量	0	3	5	2	0	31.25
青蒿琥酯中剂量	0	4	5	1	0	28.25
青蒿琥酯高剂量	0	6	4	0	0	23.60

表2 两组小鼠血清 TG、TC、ALT 的值 (n=10 $\bar{x} \pm s$)

组别	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	ALT (U/L)
正常对照	0.56 ± 0.17	1.64 ± 0.37	33.89 ± 8.02
模型	1.84 ± 0.19**	3.58 ± 0.43**	53.22 ± 6.54**
青蒿琥酯低剂量	1.61 ± 0.17***	3.10 ± 0.47***	50.87 ± 7.96**
青蒿琥酯中剂量	1.35 ± 0.17***	2.46 ± 0.68***	47.77 ± 4.50**
青蒿琥酯高剂量	1.29 ± 0.15***	2.00 ± 0.37##	41.85 ± 6.30**

与正常对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与模型组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

2.3 小鼠肝脏 TLR4、MyD88 及 PI3K mRNA 表达的比较 与正常对照组比较,模型组 TLR4、MyD88 及 PI3K 相对表达量显著增高 (P < 0.01)。与模型组比较,青蒿琥酯中、高剂量组 TLR4、MyD88 及 PI3K 相对表达量显著降低 (P < 0.05, P < 0.01); 三者有着相同的变化趋势(图2)。

3 讨论

NAFLD 是重要的代谢综合征,发病率不断升高,是诱发多种疾病的重要危险因素,如:冠心病、糖尿病、中风等^[5],同时随着病情的发展可以进展为脂肪性肝炎、肝硬化甚至肝癌,严重威胁人类健康及生活质量。但目前为止其发病机制尚不明确,也没有特效的治疗和干预方法。发病机制中提出“二次打击”学说^[6]:一次打击包括高脂饮食、肥胖及胰岛素抵抗等因素;在一次打击基础上诱发的氧化应激、脂质过氧化进行二次打击,最终导致脂肪浸润、肝细胞损害、炎症、坏死甚至纤维化。其中炎症因子失衡及相应机制在一次及二次打击中均发挥重要的作用,逐渐成为 NAFLD 研究领域的热点。根据相关文献及课题组前期研究^[7-9]显示:TLR4 是诱发天然免疫的重要因子,广泛分布于免疫和非免疫细胞,在 NAFLD 小鼠模型中 TLR4 表达升高,活化的 TLR4 通过激活和调节 NF-κB,促进 TNF-α、IL-6 等各类炎症因子释放,从而引起强烈的炎症反应,提示 TLR4 炎症通路参与 NAFLD 发生发展,同时 LPS 可通过 TLR4/MyD88 信号途径活化枯否细胞,引发胰岛素抵抗。此外,在 TLR4/MyD88 信号介导的巨噬细胞炎症反应过程中,其下游通路 PI3K/AKT 信号途径

的参与发挥了重要作用^[10-13]。

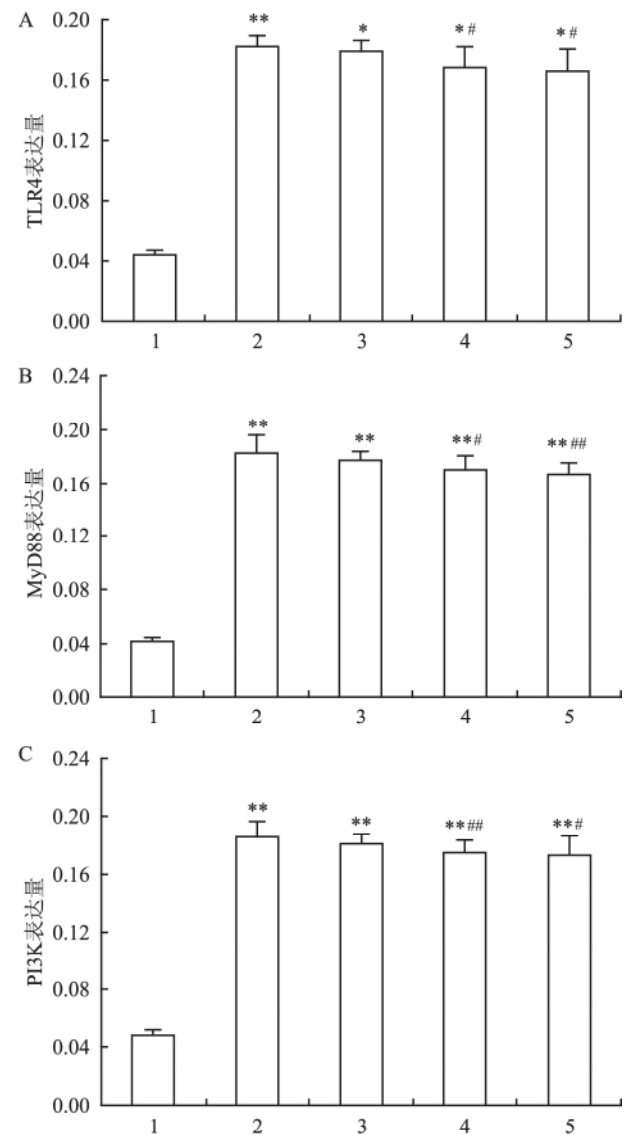


图2 RT-PCR 法检测各组小鼠小鼠肝脏 TLR4、MyD88 及 PI3K mRNA 表达

A: TLR4; B: MyD88; C: PI3K; 1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 青蒿琥酯低剂量组; 4: 青蒿琥酯中剂量组; 5: 青蒿琥酯高剂量组; 与正常对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与模型组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

青蒿琥酯是青蒿素的衍生物,其水溶性较好,课题组前期研究^[4]表明,青蒿琥酯能够有效减轻 NAFLD 模型小鼠肝组织病理损伤程度,通过降低 NF-κB、TNF-α 的产生,起到明显的抗炎及一定的降脂作用。

本研究通过不同剂量青蒿琥酯对 NAFLD 模型小鼠进行干预治疗,观察其对肝脏脂肪变性程度及肝脏 TLR4/MyD88 介导的 PI3K/AKT 信号通路重要因子 mRNA 表达的影响。结果表明:不同剂量的青

蒿琥酯有效减轻小鼠肝脏脂肪病变的程度; 血清 TG、TC、ALT 显著降低; 青蒿琥酯中、高剂量组 TLR4、MyD88 及 PI3K 相对表达量显著降低; 三者有着相同的变化趋势。

综上所述, 青蒿琥酯可减少 NAFLD 小鼠血清 TG、TC、ALT 的产生, 降低血脂、改善肝功能及肝组织病理变化, 从而对 NAFLD 起到一定的治疗作用。其作用机制可能与 TLR4/MyD88 及其下游 PI3K/AKT 相关通路有关, 具体机制仍有待于进一步研究证明。

参考文献

- [1] 刘晓琳, 茅益民. 从 NAFLD 临床实践到指南的推荐[J]. 肝脏, 2014, 19(6): 451-9.
- [2] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(7): 499-511.
- [3] 赵雪, 梁志清, 白纪红, 等. 高脂饮食法构建小鼠非酒精性脂肪肝模型雌雄 TLR4 及 IL-6 表达的差异[J]. 广东医学, 2013, 34(24): 3712-6.
- [4] 刘博峰, 周冬生, 梁志清, 等. 青蒿琥酯对非酒精性脂肪肝小鼠肝组织 NF- κ B、TNF- α 的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 23-6.
- [5] Long M T, Fox C S. The Framingham Heart Study-67 years of discovery in metabolic disease[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(3): 177-83.
- [6] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits" [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-5.
- [7] Sharifnia T, Antoun J, Verriere TG, et al. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309(4): G270-8.
- [8] 白纪红, 梁志清, 赵日红, 等. 银杏黄酮对非酒精性脂肪肝小鼠模型中 TLR4 和 NF- κ B 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(7): 1091-5.
- [9] Spruss A, Bergheim I. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(9): 657-62.
- [10] Lee J Y, Ye J, Gao Z, et al. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37041-51.
- [11] Laird M H, Rhee S H, Perkins D J, et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(6): 966-77.
- [12] Bauerfeld C P, Rastogi R, Pirockinaite G, et al. TLR4-mediated AKT activation is MyD88/TRIF-dependent and critical for induction of oxidative phosphorylation and mitochondrial transcription factor A in murine macrophages[J]. *J Immunol*, 2012, 188(6): 2847-57.
- [13] Bosmann M, Patel V R, Russkamp N F, et al. MyD88-dependent production of IL-17F is modulated by the anaphylatoxin C5a via the Akt signaling pathway[J]. *FASEB J*, 2011, 25(12): 4222-32.

Effect of artesunate on the expression of TLR4 and MyD88 in mice with non-alcoholic fatty liver disease

Bai Jihong¹, Liang Zhiqing², Zhao Rihong³, et al

(¹ Graduate Student Office, ² Dept of Infectious Diseases,

³ Dept of Neonatology, The Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001)

Abstract Objective To investigate the effects of artesunate on the expression of TLR4, MyD88 and PI3K in mice with non-alcoholic fatty liver disease. **Methods** 70 KM mice were randomly divided into the control group, model group, high [60 mg/(kg·d)], medium [30 mg/(kg·d)] and low [15 mg/(kg·d)] dosage of artesunate groups. Establishment of animal model of NAFLD mice by feeding with high fat diet. The appearance and pathological changes of liver was observed, serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT) were detected by enzymic method. TLR4, MyD88 and PI3K in hepatic tissue were tested by RT-PCR after 12 weeks of administration. **Results** Compared with the model group: the level of serum TG, TC, ALT, and the expression of TLR4, MyD88 and PI3K in the artesunate groups were decreased significantly. The hepatic steatosis was ameliorated markedly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of TLR4, MyD88 and PI3K in the model group were significantly increased compared with the control group ($P < 0.01$). There was similar change tendency in the expression of TLR4, MyD88 and PI3K in hepatic tissue. **Conclusion** TLR4/MyD88 and PI3K/AKT, the downstream pathway, can play important role in the development of NAFLD. Artesunate can decrease the hepatic steatosis, and serum lipid, improve the index of liver function by decrease the expression of TLR4, MyD88, PI3K in hepatic tissue.

Key word artesunate; non-alcoholic fatty liver disease; TLR4; mice