糖原合成激酶-3 对肝硬化失代偿患者脂多糖介导的过度炎症反应的影响

范声春,徐 龙,罗 盼

摘要 目的 探讨糖原合成激酶-3(GSK-3)在脂多糖(LPS)诱导肝硬化患者外周血单核细胞(PBMCs)炎症反应中的作用。方法 将不同分期的肝硬化患者 PBMCs 分为对照组、LPS 组、SB216763 组、SB216763 + LPS 组,收集细胞培养上清液,采用 ELISA 法检测上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)与白细胞介素 10(IL-10)的表达水平。结果 所有研究对象中,LPS 组 TNF- α 和 IL-10 含量明显高于对照组($P < 0.01$),SB216763 + LPS 组 TNF- α 和 IL-10 的含量较 LPS 组明显降低($P < 0.01$)。肝硬化失代偿期并腹膜炎患者、LPS 组的 TNF- α 含量显著高于肝硬化代偿期患者($P < 0.05$),而 IL-10 的表达水平与代偿期患者比较无明显改变。在 SB216763 + LPS 组、肝硬化失代偿期并腹膜炎患者 TNF- α 和 IL-10 的含量与肝硬化代偿期患者无明显差异。另外,TNF- α 的表达水平随 Child-Pugh 分级和 MELD 评分增加逐渐升高,而 IL-10 的表达水平却无明显变化。结论 抑制 GSK-3 的活性可以减少 TNF- α 和 IL-10 的分泌,为肝硬化失代偿期合并腹膜炎患者的治疗提供了一个新思路。

关键词 糖原合成酶激酶-3;脂多糖;失代偿期肝硬化

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)03-0406-04

肝硬化失代偿患者内毒素血症发生率可达到 46.5%~75.9%^[1],细菌产物如脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)暴露在血液循环的早期,体内免疫细胞促炎因子分泌增多和抗炎因子分泌减少^[2]。LPS 通过激活单核/巨噬细胞与 TLR4 受体结合再激活核转录因子 κ B(nuclear transcription factors,NF- κ B),NF- κ B 进而诱导多种炎症因子的表达介导炎症反应。糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3,GSK-3)是广泛存在于真核生物体内的丝/苏氨酸激酶家族,参与细胞的生长、活化和凋亡。最近研究^[3]显示,GSK-3 参与人类的炎症疾病,主导炎症

因子的产生,对 NF- κ B 的活性调节起到很重要的作用,在调节炎症细胞因子和抗炎细胞因子之间的平衡中起关键作用。该研究旨在探讨 GSK-3 活性在维持 LPS 诱导乙肝肝硬化失代偿患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)分泌促炎因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor,TNF- α)和抗炎因子白细胞介素 10(interleukin-10,IL-10)平衡调节中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 研究对象为南昌市第九医院住院患者,肝硬化失代偿期患者合并腹膜炎 30 例、肝硬化失代偿期 30 例、肝硬化代偿期患者 15 例,临床资料见表 1。乙型肝炎后肝硬化诊断参考《慢性乙肝防治指南(2010 版)》,排外心、肺、脑、肾等器官实质性病变;腹膜炎诊断标准:①不同程度的发热、寒战、腹痛、腹部压痛及反跳痛;②腹水中性多形核细胞数 $> 0.25 \times 10^9/L$;③腹水培养阳性/阴性;④腹水迅速增加、利尿效果不佳^[4]。CTP 评分依据 Child-Turcotte-pugh 分级,A 级 5~6 分,B 级 7~9 分,C 级 > 9 分,MELD 评分即终末期肝病评分, $MELD = 9.6 \times \ln[\text{肌酐}(\text{mg/dl})] + 3.8 \times \ln[\text{胆红素}(\text{mg/dl})] + 11.2 \times \ln(\text{INR}) + 6.4 \times \text{病因}$:胆汁淤积性和酒精性肝硬化为 0,其他病因为 1。

表 1 临床资料

项目	肝硬化代偿期 (n=15)	肝硬化失代偿期 (n=30)	肝硬化失代偿期 并腹膜炎(n=30)
年龄	44(30~61)	51(42~65)	54(35~68)
性别(男/女,n)	8/7	16/14	18/12
Alb(g/L)	43(36~50)	34.0(26~45.7)	28.8(19.1~40)
TBil($\mu\text{mol/L}$)	19.1(10~36)	48.9(17.1~136)	118(27~399)
PTA	90%(69%~100%)	62%(36%~104%)	43%(18%~109%)
WBC($10^9/L$)	5.89(2.45~8.44)	3.92(2.12~7.76)	7.15(0.99~17.44)
ALT(U/L)	46(26~129)	57(36~180)	87(37~189)
CTP 评分	6.7(5~9)	7.3(5~9)	11.07(7~13)
MELD 评分	4.42(2~10)	7.27(5~12)	16.00(2~29)

1.2 试剂 胎牛血清、RPMI-1640 培养基购自美国

2015-12-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81160065)

作者单位:南昌大学附属感染病医院(南昌市第九医院)慢性肝病科,南昌 330002

作者简介:范声春,男,硕士,主治医师;

徐 龙,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xulong791@126.com

Hyclone 公司;人 TNF- α 、人 IL-10 ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司;GSK3 抑制剂 SB216763 购自美国 Selleck 公司;LPS 购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法 用无菌无热原抗凝试管采集研究对象新鲜外周静脉血 2 ml,立即在实验室超净台内采用淋巴细胞分离液(Ficoll 分层液、密度 1.077 ± 0.01)运用密度梯度离心法($1\ 500\ \text{r/min}$,30 min)分离提取出 PBMCs,对每一份标本新鲜分离出来 PBMCs 用 PBS 洗涤 2 次后,立即进行细胞计数及台盼蓝染色法计算细胞活力,对细胞计数及活力符合要求的样本 PBMCs 移入 2 ml 含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,细胞密度调整为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。将 2 ml 含 PBMCs 的细胞混悬液均分成为对照组、LPS 组(单予 LPS 刺激)、SB216763(GSK3 抑制剂)组(单予 SB216763 处理)、SB216763 + LPS 组(先予 SB216763 处理后予 LPS 刺激),每组细胞悬液 0.5 ml,分别将 4 组细胞悬液移入 24 孔板内。对照组孔内不加任何刺激物;LPS 组加入终浓度为 $1\ \mu\text{g/ml}$ 的 LPS;SB216763 组加入终浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ SB216763;SB216763 + LPS 组加入终浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ SB216763 预先处理 1 h 后再加入终浓度为 $1\ \mu\text{g/ml}$ 的 LPS 刺激 20 h。各组组刺激结束后收集细胞悬液移入离心管低速离心($1\ 000\ \text{r/min}$,10 min)后吸取上清液分装入 EP 管内,放置 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备检。细胞因子 TNF- α 、IL-10 的定量测定采用 ELISA 试剂盒(双抗体夹心法)。取出细胞培养上清液、TNF- α 、IL-10 ELISA 试剂盒放置室温平衡,然后按操作步骤酶标仪测定细胞因子水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计分析软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较采用方差分析,两组间的比较采用 LSD 法(多组间方差齐)和

Dunnett T3 法(多组间方差不齐)进行。

2 结果

2.1 研究对象 PBMCs 分泌 TNF- α 的比较 与肝硬化代偿期患者比较,肝硬化失代偿期患者无明显变化,而失代偿肝硬化并腹膜炎患者 LPS 组 TNF- α 分泌量明显增加,LPS 刺激组 $F = 15.93$,SB216763 + LPS 组 $F = 6.15$,($P < 0.01$),提示失代偿肝硬化并腹膜炎患者促炎因子 TNF- α 随着病情加重分泌持续增加。LPS 组 TNF- α 含量明显高于对照组和 SB216763 组($P < 0.01$);与 LPS 组比较,SB216763 + LPS 组 TNF- α 含量明显下降($P < 0.01$)。提示抑制 GSK 的活性可以明显减少 TNF- α 的分泌。见表 2。

2.2 研究对象 PBMCs 分泌 IL-10 的比较 各研究对象 PBMCs,与肝硬化代偿期患者比较,肝硬化失代偿期和肝硬化失代偿期并腹膜炎患者 LPS 组 IL-10 含量无明显差异,提示失代偿期抗炎因子 IL-10 无明显升高。与对照组比较,LPS 组 IL-10 含量明显升高,LPS 刺激组 $F = 10.22$ ($P < 0.01$);与 LPS 组比较,SB216763 + LPS 组 IL-10 含量明显下降,SB216763 + LPS 组 $F = 6.04$ ($P < 0.01$),提示抑制 GSK 的活性可以明显减少 IL-10 的分泌。见表 3。

2.3 肝硬化失代偿患者中 Child-Pugh 分级对 TNF- α 、IL-10 分泌的影响 在肝硬化失代偿患者中 Child-Pugh 分级 A、B、C 级 TNF- α 的表达水平差异有统计学意义($F = 4.75$, $P = 0.017$)。与 A 级比较,B 级 C 级 TNF- α 的表达水平显著升高($t = 2.32$ 、 3.14 , $P < 0.01$)。在肝硬化患者中 Child-Pugh 分级 A、B、C 级 IL-10 的表达水平差异有统计学意义($F = 5.46$, $P = 0.01$)。与 A 级比较,C 级 IL-10 的表达水平显著降低($t = 3.135$, $P < 0.05$)。结果显示,随

表 2 研究对象 PBMCs 上清液中 TNF- α (pg/ml)表达水平($\bar{x} \pm s$)

项目	n	对照组	LPS 组	SB216763 组	SB216763 + LPS
肝硬化代偿期	15	6.55 $\pm$ 4.05	244.73 $\pm$ 106.84 ^{##}	6.45 $\pm$ 4.32	116.28 $\pm$ 49.05 ^{**}
肝硬化失代偿期	30	4.17 $\pm$ 3.52	269.76 $\pm$ 109.90 ^{##}	4.70 $\pm$ 3.57	119.01 $\pm$ 48.11 ^{**}
肝硬化失代偿期并腹膜炎	30	6.32 $\pm$ 4.61	356.73 $\pm$ 105.72 ^{##}	7.79 $\pm$ 5.43	158.22 $\pm$ 72.62 ^{**}

与对照组比较:## $P < 0.01$;与 LPS 组比较:** $P < 0.01$

表 3 研究对象 PBMCs 上清液 IL-10(pg/ml)表达水平($\bar{x} \pm s$)

项目	n	对照组	LPS 组	SB216763 组	SB216763 + LPS 组
肝硬化代偿期	15	10.32 $\pm$ 7.91	1534.57 $\pm$ 563.89 ^{##}	16.38 $\pm$ 13.73	328.29 $\pm$ 141.99 ^{**}
肝硬化失代偿期	30	15.60 $\pm$ 23.24	1641.66 $\pm$ 901.96 ^{##}	14.09 $\pm$ 12.39	235.02 $\pm$ 156.35 ^{**}
肝硬化失代偿期并腹膜炎	30	46.52 $\pm$ 30.3	1843.77 $\pm$ 568.78 ^{##}	33.38 $\pm$ 25.45	275.44 $\pm$ 69.91 ^{**}

与对照组比较:## $P < 0.01$;与 LPS 组比较:** $P < 0.01$

着病情进展, TNF- α 的分泌逐渐增加, IL-10 分泌无明显变化, 提示抗炎和促炎因子之间已经出现失衡。见表 4。

表 4 研究对象 Child-pugh 分级与 LPS 刺激后 TNF- α 、IL-10 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
A 级	6	248.30 $\pm$ 25.24	1 839.22 $\pm$ 520.24
B 级	31	281.94 $\pm$ 33.89*	1 764.34 $\pm$ 602.36
C 级	23	385.01 $\pm$ 79.14**	1 639.76 $\pm$ 549.72*

与 A 级比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 在肝硬化失代偿患者中 MELD 评分对 TNF- α 、IL-10 分泌的影响 在肝硬化失代偿患者中 MELD 评分 < 9 、 $9 \sim 19$ 、 $19 \sim 29$ 分的 TNF- α 含量比较, $F = 6.775$, $P = 0.002$, 与 A 组比较, B 组和 C 组 TNF- α 的含量明显增多 ($P < 0.05$), 见表 5。MELD 评分 < 9 、 $9 \sim 19$ 、 $19 \sim 29$ 分的 IL-10 含量比较, $F = 3.315$, $P = 0.051$, 与 A 组比较, B 组和 C 组 IL-10 含量明显减少 ($P < 0.05$), 见表 5。根据 MELD 评分患者的结果显示, 随着评分的增加, TNF- α 含量分泌逐渐增加, 而抗炎因子 IL-10 的分泌却无明显变化, 提示抗炎和促炎因子之间出现失衡。

表 5 研究对象 MELD 评分与 LPS 刺激后 TNF- α 、IL-10 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
A (< 9)	26	272.76 $\pm$ 49.34	1 868.12 $\pm$ 660.23
B ($\geq 9 \sim 19$)	26	343.71 $\pm$ 30.29*	1 735.54 $\pm$ 599.36*
C ($\geq 19 \sim 29$)	8	365.62 $\pm$ 79.34*	1 716.71 $\pm$ 629.27*

与 A 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

GSK-3 β 通路在调节炎症细胞因子和抗炎症细胞因子之间的平衡中起关键作用。本研究观察了肝硬化代偿期和失代偿期患者外周血单核细胞 GSK-3 活性受抑制前后由 LPS 诱导 PBMCs 分泌的 TNF- α 、IL-10 表达水平的变化。GSK-3 活性未抑制时, 肝硬化代偿期患者、肝硬化失代偿期患者和失代偿合并腹膜炎患者 3 组不同的人群中, LPS 均可以诱导外周血单核细胞促炎因子 (TNF- α) 和抗炎因子 (IL-10) 的分泌增加。与肝硬化代偿期患者组比较, 肝硬化失代偿期合并腹膜炎组 TNF- α 含量明显升高, IL-10 含量无变化, 提示促炎细胞因子 (TNF- α) 过多的表达和抗炎因子 (IL-10) 的表达不足的特点是 LPS 刺激肝硬化免疫细胞的主要免疫反应特征, 即肝硬化终末期患者合并感染的炎症反应表现。

为了观察 GSK-3 β 活性对乙肝肝硬化患者外周

血单核细胞 LPS 介导炎症反应的影响, 实验中设置 GSK3 β 特异性抑制剂 SB216763 和 SB216763 + LPS 组, 当预先给予 SB216763 处理后再予 LPS 刺激时细胞因子的表达发生明显变化, 与 LPS 组比较, SB216763 + LPS 组即 GSK-3 活性受抑制后促炎因子 TNF- α 和抗炎因子 IL-10 表达均较受抑制前明显下降。GSK-3 抑制剂通过抑制其活性从而阻断了由 LPS 诱导 TLR4 介导的信号通路 (GSK-3 是该信号通路的关键节点), 因而信号无法向细胞核内传递从而减少 TNF- α mRNA 和 IL-10 mRNA 基因表达来调节其表达水平, 结果证实 GSK-3 的活性调控着促炎因子和抗炎因子的平衡, 从而决定了肝硬化失代偿期患者炎症反应的转归, 小鼠动物实验亦有类似结果^[5]。

有文献^[6]报道 GSK-3 可以激活 NF- κ B, NF- κ B 进入核内诱导多种炎症因子的表达, 包括 TNF- α 、IL-2、IL-1、IL-6、IFN- β 等, 其中 TNF- α 作用最为重要。促炎因子 TNF- α 过量表达而抗炎因子 IL-10 表达不足, 这种趋势在肝硬化失代偿合并腹膜炎患者的 PBMC 中表现更加明显^[7], 本实验结果表明, 随着病情加重 TNF- α 分泌持续增加, 而 IL-10 的分泌却无明显变化。TNF- α 等炎症因子本身对组织细胞具有损伤作用^[8], 同时还诱导免疫细胞产生其他炎症细胞因子及进一步刺激 PBMCs 产生 TNF- α 等促炎因子, 引起级联放大效应, 过量促炎细胞因子释放入血液循环产生一系列难以控制的全身瀑布式炎症反应^[9], 最终导致组织器官严重损伤。GSK-3 活性被其抑制剂 SB216763 抑制后由 LPS 诱导的细胞信号转导通路被阻断, NF- κ B 活性不能被激活, 继而导致由 NF- κ B 诱导的炎症细胞因子的产生减少^[10-11], 此时 IL-10 也能抑制由 LPS 诱导的 PBMCs 产生的促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6, 同时可直接抑制 PBMCs 的活性。本实验结果显示肝硬化患者 TNF- α 的表达水平随 Child-Pugh 分级和 MELD 评分增加逐渐升高, 而 IL-10 的表达水平却无明显变化。对合并和未合并腹膜炎的肝硬化失代偿患者进行了跟踪随访, 发现合并感染的 30 例患者中有 8 例放弃治疗感染恶化而死亡。这从临床上验证了肝硬化失代偿期患者合并感染后易导致失控性炎症反应, 如不及时有效的控制将导致患者病情恶化。

本文探讨了 GSK-3 在 LPS 诱导肝硬化患者 PBMCs 炎症反应中的作用, 既往相关报道多是以动物为实验对象, 而本研究选取了 3 种不同分期的肝硬化患者 PBMCs 为实验对象, 较动物实验更具临床意

义。在体外实验 LPS 刺激肝硬化失代偿期患者 PB-MCs 的特征反应是促炎因子过度表达和抗炎因子表达不足,特别是在并发腹膜炎的情况下,这种特征更加明显。其机制可能与 GSK-3 磷酸化缺陷而活性增强有关,导致促炎因子过度分泌从而产生全身难以控制的瀑布式炎症反应。体外应用 GSK3 抑制剂可以明显减少促炎因子 TNF- α 的产生,该作用在体内环境下和体外是否相同,需要体内实验进一步证实,本研究为肝硬化失代偿期患者并发或潜在感染的治疗提供了一个新的启发,进一步的机制还有待研究^[12]。

参考文献

- [1] Rinaldi L, Ferrari E, Marietta M, et al. Effectiveness of sepsis bundle application in cirrhotic patients with septic shock: a single-center experience [J]. J Crit Care, 2013, 28(2):152-7.
- [2] Coant N, Simon-Rudler M, Gustot T, et al. Glycogen synthase kinase 3 involvement in the excessive proinflammatory response to LPS in patients with decompensated cirrhosis [J]. J Hepatol, 2011, 55(4):784-93.
- [3] Amar S, Belmaker R H, Agam G. The possible involvement of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in diabetes, cancer and central nervous system diseases [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(22):2264-77.
- [4] Desai A P, Reau N, Reddy K G, et al. Persistent spontaneous bacterial peritonitis: a common complication in patients with spontaneous bacterial peritonitis and a high score in the model for end-stage liver disease [J]. Therap Adv Gastroenterol, 2012, 5(5):275-83.
- [5] Ko R, Jang H D, Lee S Y. GSK3 β Inhibitor Peptide Protects Mice from LPS-induced Endotoxin Shock [J]. Immune Netw, 2010, 10(3):99-103.
- [6] Wang H, Brown J, Gao S, et al. The Role of JAK-3 in Regulating TLR-Mediated Inflammatory Cytokine Production in Innate Immune Cells [J]. J Immunol, 2013, 191(3):1164-74.
- [7] Tapia-Abellán A, Ruiz-Alcaraz A J, Hernández-Caselles T, et al. Role of MAP Kinases and PI3K-Akt on the cytokine inflammatory profile of peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients [J]. Liver Int, 2013, 33(4):552-60.
- [8] Kothari N, Bogra J, Abbas H, et al. Tumor Necrosis Factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock [J]. Cytokine, 2013, 61(2):676-81.
- [9] Juskewitch J E, Platt J L, Knudsen B E, et al. Disparate roles of marrow-and parenchymal cell-derived TLR4 signaling in murine LPS-induced systemic inflammation [J]. Sci Rep, 2012, 2:918.
- [10] Martin M, Rehani K, Jope R S, et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3 [J]. Nat Immunol, 2005, 6(8):777-84.
- [11] Götschel F, Kern C, Lang S, et al. Inhibition of GSK3 differentially modulates NF- κ B, CREB, AP-1 and β -catenin signaling in hepatocytes, but fails to promote TNF- α -induced apoptosis [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(6):1351-66.
- [12] Hofmann C, Dunger N, Schölmerich J, et al. Glycogen synthase kinase 3- β : A master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation [J]. Inflamm Bowel Dis, 2010, 16(11):1850-8.

Effects of glycogen synthase kinase-3 on lipopolysaccharide induced excessive inflammatory response in patients with decompensated cirrhosis

Fan Shengchun, Xu Long, Luo Pan

(The Ninth Hospital of Nanchang Infectious Disease Hospital of Nanchang University, Nanchang 330002)

Abstract Objective To investigate the effect of Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) on inflammatory response mediated by LPS in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with decompensated cirrhosis. **Methods** PBMCs of different liver cirrhosis period patients were divided into control group, LPS group, SB216763 group and SB216763 + LPS group. ELISA was used to measure the levels of TNF- α and IL-10 in the culture supernatant of PBMCs. **Results** The levels of TNF- α and IL-10 in the LPS group were significantly higher than those of the control group ($P < 0.01$). Compared with LPS group, SB216763 + LPS group decreased the levels of TNF- α and IL-10 obviously in all research objects ($P < 0.01$). Compared with the liver cirrhosis compensatory period patients (15), the level of TNF- α increased obviously ($P < 0.05$), while the IL-10 level had no significant change in the LPS group of liver cirrhosis decompensated period combined with peritonitis patients (30). The level of TNF- α and IL-10 had no obvious difference in the SB216763 + LPS group of the two research objects. With Child-Pugh classification and MELD score increasing, the TNF- α level obviously raised, while the IL-10 level had no obvious change. **Conclusion** Inhibiting the activity of GSK-3 could reduce the secretion of TNF- α and IL-10. This provides a new idea for the treatment of liver cirrhosis decompensated period combined with peritonitis patients.

Key words GSK3; lipopolysaccharide; decompensated liver cirrhosis