

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.006

他莫昔芬对小鼠急性肝衰竭的预防作用的探讨*

罗满生¹,刘丽平²,彭德林³,张荣山¹,肖作森¹,戴 薇¹,林 燕^{1△}

(1.南昌大学附属赣州医院检验科,江西赣州 341000;2.南昌大学附属赣州医院院内感染控制科,江西赣州 341000;3.江西省吉安市吉州区白塘医院检验科 343009)

[摘要] **目的** 探讨他莫昔芬(TAM)对 D-氨基半乳糖(D-Gal)/脂多糖(LPS)诱导小鼠急性肝衰竭(ALF)的预防作用。**方法** 20 只小鼠分正常组、ALF 模型组(ALF 组)、TAM+ALF 组(TAM 组)、ALF+N-乙酰半胱氨酸组(NAC,NAC 组)4 组,每组 5 只。除正常组外其他 3 组分别腹腔注射向日葵油、TAM、向日葵油,连续 3 d,每天 1 次;最后 1 次处理后 12 h,注射 D-Gal/LPS,同时 NAC 组随即注射 NAC。7 h 后采集标本,并分别测定血清转氨酶、肝组织还原性/氧化性谷胱甘肽(GSH/GSSG)、丙二醛(MDA);单核巨噬细胞分化相关蛋白-2(Mmd-2)检测采用 Western blot 和免疫组织化学。**结果** 造模后 7 h ALF 组血清转氨酶显著高于其他组,差异有统计学意义($P<0.05$);TAM 组、NAC 组 GSH/GSSG 显著高于 ALF 组,MDA 水平明显低于 ALF 组,差异有统计学意义($P<0.05$);TAM 组 Mmd-2 表达明显升高,ALF 组表达降低($P<0.05$)。**结论** TAM 可减轻 D-Gal/LPS 诱导的 ALF,其与抗氧化应激和 Mmd-2 上调有关。

[关键词] 他莫昔芬;肝功能衰竭,急性;氧化性应激**[中图分类号]** R392.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)01-0023-04

Discussion of the prevention of tamoxifen on murine acute liver failure*

LUO Mansheng¹, LIU Liping², PENG Delin³, ZHANG Rongshan¹, XIAO Zuomiao¹, DAI Wei¹, LIN Yan^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Ganzhou Hospital Affiliated to Nanchang University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China; 2. Department of Nosocomial Infection, Ganzhou Hospital Affiliated to Nanchang University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Baitang Hospital of Jizhou District, Ji'an, Jiangxi 343009, China)

[Abstract] **Objective** To observe the prevention effects of tamoxifen (TAM) on acute liver failure (ALF) induced by D-galactosamine/lipopolysaccharides (D-Gal/LPS). **Methods** The experimental mice were randomly divided into the control group, the ALF group, the TAM+ALF treatment group (the TAM group) and the ALF+N-acetylcysteine (NAC) treatment group (the NAC group). Except for the control group, mice were given sunflower oil, TAM, oil respectively once a day for three days. 12 hours after the last treatment, mice were given D-Gal/LPS. And NAC solution was instantly injected into the mice in the NAC group. 7 hours afterwards, mice were sacrificed and specimens were collected for serum transaminases, hepatic glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) and malondialdehyde (MDA) detection. Western blot and immunohistochemistry (IHC) were employed to assess monocyte to macrophage differentiation-associated-2 (Mmd-2). **Results** Compared to others, the ALF group demonstrated increased ALF significantly ($P<0.05$). Both the TAM group and the NAC group displayed raising ratio of GSH/GSSG and decreasing MDA, which differ from the ALF group statistically ($P<0.05$). Among all groups, the TAM group showed an elevated level of hepatic Mmd-2 and the ALF group showed a lower level ($P<0.05$). **Conclusion** TAM prevented D-Gal/LPS-induced ALF effectively, which might be related to its hepatic anti-oxidation and resistance to Mmd-2 up-regulation.

[Key words] tamoxifen; liver failure, acute; oxidative stress

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是由众多因素引发的一种严重临床综合征,病死率高,机制不详,因此,ALF 机制及其治疗的研究一直是相关领域的热点。YOSHIKAWA 等^[1]发现在预防给药模式下

他莫昔芬(tamoxifen, TAM)能通过上调肝脏单核巨噬细胞分化相关蛋白-2(monocyte to macrophage differentiation-associated 2, Mmd-2)预防对乙酰氨基酚诱导的 ALF。而 ZHANG 等^[2]研究发现, TAM 除了

对此模型有预防作用外还可有效预防 D-氨基半乳糖 (D-galactosamine, D-Gal)/脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠 ALF, 尽管这两种肝损伤模型机制有所差异^[3]。此外, ZHANG 等^[2]还发现 TAM 可通过抗炎、抗细胞凋亡作用有效拮抗 D-Gal/LPS 诱发的 ALF。但有文献报道氧化应激产物活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在 D-Gal/LPS 诱发的 ALF 中发挥重要作用, 即通过细胞凋亡促进肝损伤。本研究旨在探讨 TAM 对 D-Gal/LPS 诱导小鼠 ALF 的保护作用与肝脏抗氧化应激、Mmd-2 表达的关系, 深入分析该模型发病机制, 为 TAM 抗临床 ALF 研究奠定基础, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂与仪器

TAM (T5648)、D-Gal (G0500)、LPS (L2630)、向日葵油 (S5007, Lot # MKCC1079)、N-乙酰半胱氨酸 (NAC, A7250, Lot # WXBC0011V) 购自美国 Sigma 公司; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒购自南京建成生物工程有限公司; 用于免疫组织化学和 Western blot 的兔源抗鼠 Mmd-2 单克隆抗体分别购自北京百奥莱博公司、美国 Abcam 公司, 抗 β -actin 兔源抗鼠一抗及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔二抗均购自北京中杉金桥生物技术公司。高速低温离心机 (艾本德, 5804R), 酶标仪 (Thermo, MULTISCAN GO), 凝胶成像仪 (FUSION FX, 法国), 显微镜 (奥林巴斯, IX71 + DP72), 低温冰箱 (Thermo 700Series)。

1.2 实验动物

20 只昆明系小鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体质量 (20 ± 2) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证 SYXK (赣) 2012-0001。

1.3 方法

1.3.1 分组

20 只小鼠分 4 组: 正常组、ALF 模型组 (ALF 组)、TAM + ALF 组 (TAM 组) 和 ALF + NAC 组 (NAC 组), 每组 5 只。其中 ALF 组、NAC 组腹腔注射向日葵油 0.2 mL, TAM 组注射 TAM (2 mg/kg, 溶于向日葵油)。所有组每天 1 次, 连续 3 d; 最后 1 次注射后, 禁食 12 h, 腹腔注射 D-Gal (800 mg/kg) 及 LPS (1 μ g) 造模, 其中 NAC 组随后腹腔注射 NAC (300 mg/kg)。造模 7 h 后采集小鼠外周血, 迅速分离血清置 -20 °C 冻存; 同时迅速采集肝脏, 分装后 -80 °C 冻存备用。

1.3.2 指标检测及方法

小鼠 ALT、AST 及肝组织 GSH、MDA 检测采用紫外分光光度法, 具体操作步骤参照试剂盒 (南京建成生物工程有限公司) 说明书, 测定双复孔。

采用匀浆-RIPA-蛋白酶抑制剂法提取肝组织总

蛋白, BCA 法定量。蛋白经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 并转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 (孔径 0.45 μ m), 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h、一抗 4 °C 孵育过夜、洗涤、孵育二抗, ECL 化学发光法自显影, 利用 FUSION FX 凝胶成像仪扫描拍照, β -actin 为内参。

另外, 采集后的部分肝组织迅速置 4% 中性甲醛溶液中固定 24 h, 石蜡包埋、切片 (5 μ m)。免疫组织化学染色法原位分析 Mmd-2 表达。切片经间接免疫-过氧化物酶法处理后 Meyer 苏木素复染 0.5~1.0 min。一抗稀释比例为 1:100, 二抗为 1:500。与本研究不相关专业人员阅片, 每组不少于 4 只, 每张切片观察高倍视野数目不少于 5 个, 计算各组阳性率 (%)。

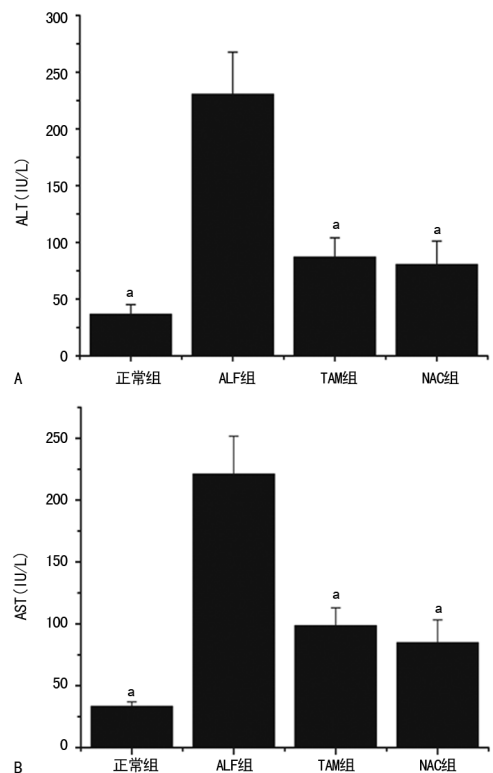
1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用单因素方差分析检验; 计数资料以频数或百分率表示, 比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

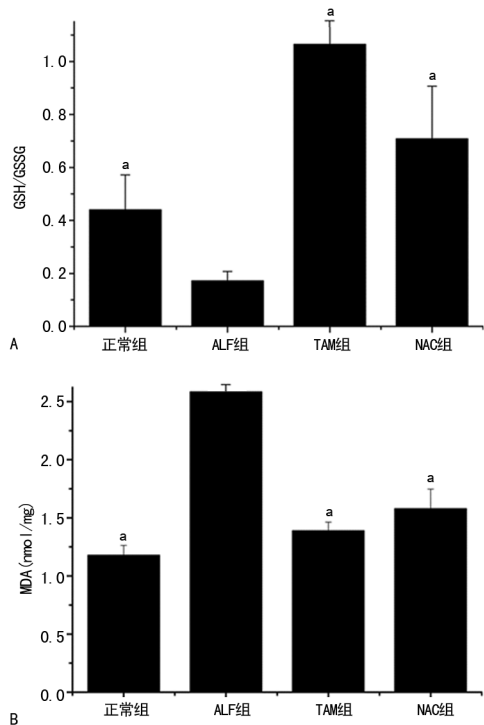
2.1 TAM 对血清 ALT、AST 的影响

ALT、AST 水平方面, ALF 组 ALT、AST (222.30、288.90 U/L) 水平较 TAM 组 (81.30、77.08 U/L) 和 NAC 组 (89.80、87.50 U/L) 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); TAM 组、NAC 组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。



A: ALT; B: AST; a: $P < 0.05$, 与 ALF 组比较

图 1 药物处理对血清 ALT、AST 水平的影响



A:GSH/GSSG;B:MDA;*: $P < 0.05$,与 ALF 组比较
图 2 药物处理对 GSH/GSSG 及 MDA 水平的影响

2.2 TAM 对肝脏 GSH/GSSG 及 MDA 水平的影响 TAM组 GSH/GSSG(1.067)水平显著高于 ALF组(0.173),差异有统计学意义($t = 5.337, P < 0.05$);其他各组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。在 MDA 水平方面,ALF 组(2.584 nmol/mL)较 TAM 组(1.390 nmol/mL)和 NAC 组(1.579 nmol/mL)显著升高,差异有统计学意义($t_1 = 6.930, t_2 = 5.830, P < 0.05$),见图 2。

2.3 TAM 处理对肝脏 Mmd-2 水平的影响 与正常组比较,ALF 组 Mmd-2 水平下降;与 ALF 组比较,TAM 组 Mmd-2 水平明显增强,见图 3。免疫组织化学结果显示与 ALF 组比较,TAM 组肝脏 Mmd-2 阳性率显著增强,差异有统计学意义($t = 21.32, P < 0.05$),见图 4。

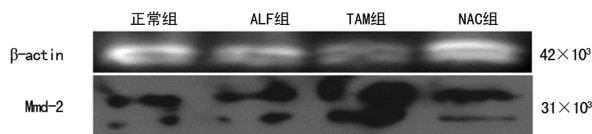
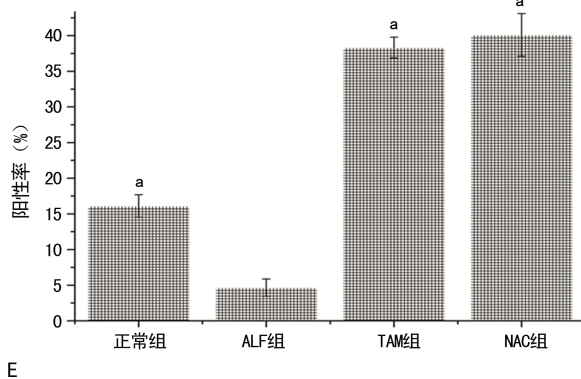
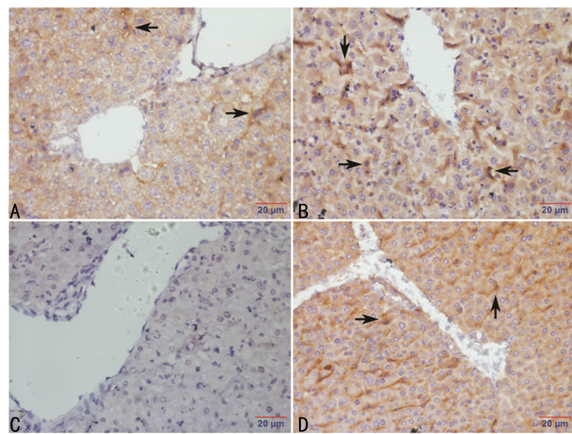


图 3 药物处理对肝脏 Mmd-2 表达情况



A:正常组;B:ALF组;C:TAM组;D:NAC组;E:各组 Mmd-2 表达水平;*: $P < 0.05$,与 ALF 组比较;箭头:TUNEL 染色阳性细胞
图 4 肝组织 Mmd-2 免疫组织化学情况($\times 400$)

3 讨论

ALF 是一种临床常见的肝损伤综合征,除保守支持治疗和肝移植外尚无其他有效治疗措施。因此,探索有效防治 ALF 的药物或策略仍然是 ALF 研究领域的热点。

由于临床症状和大致病理表现等方面与细菌(尤其革兰阴性菌)感染后引起的 ALF 相似,近 30 年来 D-Gal/LPS 诱导的 ALF 模型广泛用于 ALF 机制和相关药物开发研究^[4-5]。现已明确,该 ALF 模型主要是在 D-Gal(核酸生物合成抑制剂)作用下肝细胞 mRNA 合成受阻前提下肝脏巨噬细胞受细菌 LPS 刺激后分泌大量促炎症因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、趋化因子等^[6]。TNF- α 既可

通过活化核因子- κ B(nuclear factor, NF- κ B)促进肝细胞增殖、生存,也可在肝细胞生物合成抑制时引发细胞凋亡,导致 ALF^[7]。研究表明,TNF- α 诱导的肝细胞凋亡在一定程度上依赖氧化应激产物 ROS,因为后者是肝细胞凋亡过程中 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)持续活化的重要因素^[8]。因此,抗氧化应激已逐渐成为一些抗肝损伤研究的重要策略。

TAM 是一种选择性雌激素受体调节剂,其活性发挥具有组织选择性特点,可结合肝细胞雌激素受体 α 并发挥雌激素样作用^[9],而雌激素也是一种典型抗氧化药物。以此推论,TAM 也可能具有抗氧化应激功能。YOSHIKAWA 等^[1]发现在提前给药模式下

TAM 能有效预防对乙酰氨基酚过量使用所导致的小鼠 ALF, 而是否与 TAM 抗氧化应激作用相关尚不知晓。在本研究中, TAM 组经连续 3 次 TAM 提前给药, 小鼠 ALF 症状及血清转氨酶水平都显著低于 ALF 组。组织病理学结果也表明, ALF 组肝损伤严重(如肝细胞界限不清、肝小叶结构破坏、单个核细胞浸润等), 而 TAM 组及 NAC 组表现均明显优于 ALF 组。另外, ALF 组肝脏氧化应激加剧, 如 GSH/GSSG 下降而 MDA 水平升高, 与其他文献报道一致^[10]。结果不但阐明氧化应激在该 ALF 模型发生、发展过程中的重要性, 而且提示 TAM 可能通过抗氧化应激预防、拮抗 ALF。

此外, 结果还提示 TAM 对该模型的保护作用似乎与肝脏 Mmd-2 表达上调相关, 这一结果也与 YO-SHIKAWA 等^[1]报道相似。因此, 笔者设想 Mmd-2 表达下调可能普遍存在于各类 ALF, 而 TAM 对该类肝损伤的拮抗性可能与 Mmd-2 表达上调有关。JIN 等^[11]研究表明, Mmd-2 可促进肝细胞增殖和生存, 其机制涉及 Ras 信号增强及细胞外调节蛋白激酶活性上调。

值得注意的是本研究中 NAC 组部分指标虽然明显好于 ALF 组, 但却不及 TAM 组。究其原因考虑可能有: NAC 使用剂量不够或 NAC 给药途径对实验结果有影响。

综上所述, 本研究提示 TAM 可有效减轻 D-Gal/LPS 诱导的 ALF, 其机制可能与 TAM 抗氧化应激及其对 Mmd-2 的上调作用相关。

参考文献

[1] YOSHIKAWA Y, MIYASHITA T, HIGUCHI S A, et al. Mechanisms of the hepatoprotective effects of tamoxifen against drug-induced and chemical-induced acute liver injuries[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(1): 42-

50.

- [2] ZHANG P, ZHANG M S, WAN M Q, et al. Tamoxifen attenuates lipopolysaccharide/galactosamine-induced acute liver failure by antagonizing hepatic inflammation and apoptosis[J]. *Immunol Invest*, 2017, 46(3): 284-294.
- [3] MAES M, VINKEN M, JAESCHKE H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 290(1): 86-97.
- [4] LUO M S, LIU D, ZHANG L M, et al. Protective effects of a novel trimerized sTNFR_{II} on acute liver injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(1): 88-92.
- [5] 陆杨, 胡冬梅, 文爱东, 等. 女贞总苷对急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(4): 588-589.
- [6] TUKOV F F, LUYENDYK J P, GANEY P E. The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide/ranitidine-induced inflammatory liver injury[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 100(1): 267-280.
- [7] WANG K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis regulated by nuclear factors[J]. *Cell Signal*, 2015, 27(4): 729-738.
- [8] HEINRICHS DORFF J, LUEDDE T, PERDIGUERO E, et al. P38 alpha MAPK inhibits JNK activation and collaborates with I kappa B kinase 2 to prevent endotoxin-induced liver failure[J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(10): 1048-1054.
- [9] JORDAN V C. The science of selective estrogen receptor modulators: concept to clinical practice[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(17): 5010-5013.
- [10] LIU Y Y, LI F, ZHANG L, et al. Taurine alleviates lipopolysaccharide-induced liver injury by anti-inflammation and antioxidants in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6512-6517.
- [11] JIN T, DING Q R, HUANG H, et al. PAQR10 and PAQR11 mediate Ras signaling in the Golgi apparatus[J]. *Cell Res*, 2012, 22(4): 661-676.

(收稿日期: 2018-05-22 修回日期: 2018-08-07)