

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.005
网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20190529.1622.017.html(2019-05-31)

益生菌对急性肝内胆汁淤积模型大鼠肝损伤的保护作用及机制研究^{*}

王菊平¹,马姝丽¹,李小芹²,周 方²
(郑州大学附属儿童医院/河南省儿童医院/郑州儿童医院:1.药学部;2.消化科,郑州 450000)

[摘要] **目的** 分析益生菌对急性肝内胆汁淤积模型大鼠肝损伤的保护作用及其机制。**方法** 60 只幼年雄性 SD 大鼠分为正常组、模型组与干预组,每组各 20 只。干预组大鼠每天 1 次行益生菌 4.2×10^8 个活菌数/kg 灌胃,正常组与模型组给予同等量温生理盐水灌胃。模型组与干预组第 5 天开始建立急性肝内胆汁淤积模型,造模后 48、72 h 分别处死大鼠,取血行总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸(D-LA)检测,取肝组织测定核因子- κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达。**结果** 造模后 48、72 h 模型组及干预组血清 TBIL、DBIL、ALT、DAO、D-LA 水平和肝组织 NF- κ B、TNF- α 表达均显著高于正常组,且干预组低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 益生菌能有效保护急性肝内胆汁淤积模型大鼠肝损伤,其机制可能与益生菌下调血清 DAO、D-LA 及肝组织 NF- κ B、TNF- α 表达有关。**[关键词]** 胆汁淤积,肝内;鼠李糖乳杆菌;化学性与药物性肝损伤;药理作用分子作用机制**[中图法分类号]** R969.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)14-2356-04

Protective effect and mechanism of probiotics on liver injury in rats with acute intrahepatic cholestasis^{*}
WANG Juping¹,MA Shuli¹,LI Xiaoqin²,ZHOU Fang²
(1. Department of Pharmacy;2. Department of Gastroenterology,Children's Hospital
Affiliated to Zhengzhou University/Henan Children's Hospital/Zhengzhou
Children's Hospital,Zhengzhou,Henan 450000,China)

[Abstract] **Objective** To analyze the protective effect and mechanism of probiotics on liver injury in rats with acute intrahepatic cholestasis. **Methods** Sixty juvenile male SD rats were divided into the normal group,the model group and the intervention group,with 20 rats in each group. Rats in the intervention group were treated by gavage with probiotics 4.2×10^8 viable count/kg once a day,while the normal group and the model group were treated with the same volume of warm normal saline. The model of acute intrahepatic cholestasis was established in the model group and the intervention group on the fifth day. The rats were killed at 48 and 72 h after modeling. Blood was collected to detect the total bilirubin (TBIL),direct bilirubin (DBIL),alanine aminotransferase (ALT),diamine oxidase (DAO) and D-lactic acid (D-LA). Liver tissues were collected to detect the expressions of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results** The levels of serum TBIL,DBIL,ALT,DAO and D-LA,NF- κ B and TNF- α in the model group and the intervention group were significantly higher than those in the normal group at 48 and 72 h after modeling,and the intervention group was lower than the model group,there was statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Probiotics can effectively protect liver injury in rats with acute intrahepatic cholestasis. The mechanism may be that probiotics down-regulate serum DAO,D-LA,NF- κ B and TNF- α expression in liver tissues. **[Key words]** cholestasis,intrahepatic;lactobacillus rhamnosus;chemical and drug induced liver injury;molecular mechanisms of pharmacological action

肝内胆汁淤积发生与肝细胞功能异常、胆管损伤密切相关,典型症状为黄疸、大便浅黄,实验室指标中胆红素上升^[1-2]。急性肝内胆汁淤积好发于儿童,特别是婴儿,是导致其残疾或死亡的主要原因^[3]。临床治疗以熊去氧胆酸等药物治疗为主,价格较高,且部分患儿无效。

益生菌可促使肠道菌群生态平衡,其常用于肠道感染防治^[4]。相关报道发现益生菌对慢性酒精性肝损伤、胆汁淤积性黄疸有一定疗效^[5-6]。但目前关于益生菌对急性肝内胆汁淤积性肝损伤疗效的相关报道较少。本研究对 α -异硫氰酸萘酯(ANIT)致急性肝内胆汁淤积幼鼠模型行益生菌预处理,检测二胺氧化

^{*} 基金项目:2015 年度河南省医学科技攻关计划项目(201503234)。 作者简介:王菊平(1984—),主管药师,硕士,主要从事临床药理学研究。

酶(DAO)、D-乳酸(D-LA)等肠黏膜屏障功能血清指标及肝细胞核因子- κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达,分析益生菌的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 断乳 2 周的健康、雄性清洁级 SD 大鼠 60 只,体质量 65~100 g,购自上海义森生物科技有限公司,由本实验室饲养,自由饮水。

1.1.2 药物、主要试剂及设备 益生菌-培菲康胶囊(上海信谊药厂有限公司,规格:0.21 g,国药准字 S10950032); α -萘异硫氰酸酯(α -naphthylisothiocyanate,ANIT,美国 Sigma 公司);总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(上海超研生物科技有限公司);DAO、D-LA 试剂盒(上海恒远生物科技有限公司),多克隆鼠抗 NF- κ B 抗体、多克隆羊抗 TNF- α 抗体(美国 Santa Cruz 公司);迈瑞 BS-350 全自动生化分析仪(武汉盛世达医疗设备有限公司);光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物配置 ANIT 使用前通过麻油制备为 1%溶液;益生菌胶囊、熊去氧胆酸片使用前通过温生理盐水稀释。

1.2.2 分组与造模 60 只 SD 大鼠适应性喂养 72 h,将其分为正常组、模型组与干预组,每组 20 只。干预组大鼠每天 1 次给予益生菌 4.2×10^8 个活菌数/kg 灌胃,正常组与模型组大鼠则行同等量温生理盐水灌胃。第 5 天模型组、干预组行 0.5%(50 mg/kg)ANIT 麻油混合液 10 g/L 灌胃构建急性肝内胆汁淤积模型,正常组不予以 ANIT 干预,仅给予等量麻油灌胃。为保证灌胃药物吸收的充分性,所有大鼠灌胃前后 12 h 内禁食,但不禁饮。造模后 48、72 h 分别处死大鼠,每组各 10 只。

1.2.3 标本采集 处死大鼠前对其注射 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg,腹腔逐一剪开,腹主动脉分离,抽取 3 mL 动脉血,以 3 000 r/min 离心 10 min,上清液提取后用于血清相关指标检测。取血后切取肝左叶组织,4%多聚甲醛固定。

1.2.4 血清相关指标检测 通过迈瑞 BS-350 全自动生化分析仪测定各组大鼠血清 TBIL、DBIL、ALT 水平;通过 ELISA 法测定血清 DAO、D-LA 水平。

1.2.5 肝组织检测 肝组织常规石蜡包埋,5 μ m 连续切片,脱水,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察肝组织病理情况。免疫组织化学法测定肝组织 NF- κ B、TNF- α 表达,SP 法免疫组织化学染色,苯二胺显色,苏木素复染,封片(细胞质或细胞核内存在棕黄色颗粒)。400 倍光学显微镜下观察,测定吸光度(A)值,重复测量 3 次,取平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用方差分

析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠情况 各组大鼠均存活,正常组大鼠活动、皮毛、尿液颜色均正常;模型组大鼠毛发无光泽,活动量减少,体质量降低,尿液为黄色;干预组大鼠活动、体质量较模型组显著改善。

2.2 各组大鼠血清肝功能指标比较 模型组、干预组造模后 48、72 h 血清 TBIL、DBIL、ALT 水平均明显高于正常组($P<0.05$),而干预组低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点血清 TBIL、DBIL、ALT 水平比较($\bar{x}\pm s$)

项目	造模后 48 h	造模后 72 h
TBIL(μ mol/L)		
正常组	20.48 $\pm$ 1.67	20.53 $\pm$ 1.59
模型组	155.12 $\pm$ 25.34 ^a	72.88 $\pm$ 27.00 ^a
干预组	80.27 $\pm$ 21.73 ^{ab}	40.76 $\pm$ 13.06 ^{ab}
DBIL(μ mol/L)		
正常组	5.89 $\pm$ 1.14	4.91 $\pm$ 0.58
模型组	48.52 $\pm$ 7.68 ^a	14.43 $\pm$ 4.62 ^a
干预组	20.12 $\pm$ 6.45 ^{ab}	10.21 $\pm$ 1.69 ^{ab}
ALT(U/L)		
正常组	2.71 $\pm$ 2.02	4.45 $\pm$ 1.83
模型组	42.69 $\pm$ 20.93 ^a	13.84 $\pm$ 7.91 ^a
干预组	21.23 $\pm$ 5.47 ^{ab}	6.37 $\pm$ 2.02 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与正常组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较

2.3 各组大鼠 DAO、D-LA 水平比较 模型组、干预组造模后 48、72 h 血清 DAO、D-LA 水平均明显高于正常组($P<0.05$),且干预组低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠血清 DAO、D-LA 水平比较($\bar{x}\pm s$)

项目	造模后 48 h	造模后 72 h
DAO(U/L)		
正常组	56.68 $\pm$ 9.10	54.57 $\pm$ 8.68
模型组	102.24 $\pm$ 12.12 ^a	90.36 $\pm$ 10.24 ^a
干预组	85.02 $\pm$ 11.60 ^{ab}	76.47 $\pm$ 9.36 ^{ab}
D-LA(μ mol/L)		
正常组	4.36 $\pm$ 0.65	4.25 $\pm$ 0.71
模型组	10.24 $\pm$ 1.81 ^a	7.13 $\pm$ 1.78 ^a
干预组	6.52 $\pm$ 2.05 ^{ab}	4.90 $\pm$ 0.65 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与正常组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较

2.4 肝组织病理观察 正常组大鼠肝脏外观、颜色均正常,显微镜下肝小叶显示清晰,无肝细胞病变发生。模型组大鼠肝脏外观显著肿胀,显微镜下肝小叶轮廓模糊,大量炎性细胞浸润汇管区,肝细胞嗜酸性

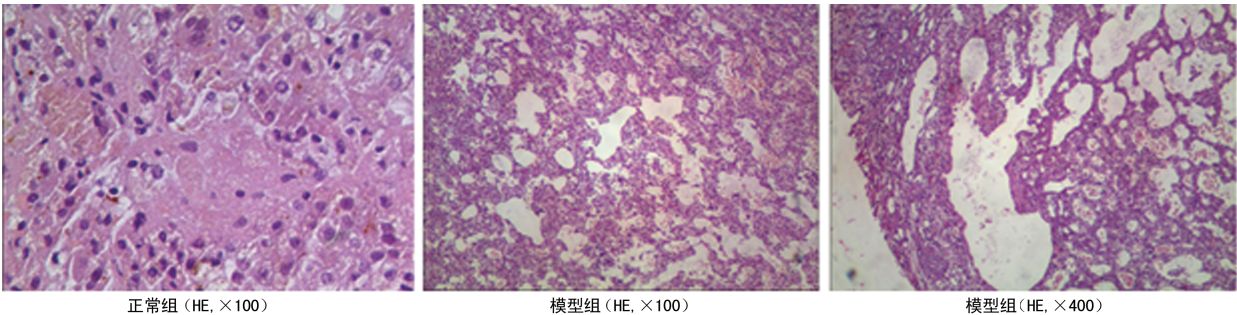


图 1 各组动物典型的肝组织病理图片

变、点状坏死,造模后 48 h 上述症状进一步加重,造模后 72 h 上述症状有所缓解。干预组大鼠肝脏病变较模型组明显减轻,见图 1。

2.5 各组大鼠肝组织 NF-κB、TNF-α 表达比较 模型组、干预组造模后 48、72 h 肝组织 NF-κB、TNF-α 表达均明显高于正常组 ($P<0.05$),且干预组低于模型组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织 NF-κB、TNF-α 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)		
项目	造模后 48 h	造模后 72 h
NF-κB		
正常组	0.045±0.020	0.042±0.018
模型组	0.281±0.042 ^a	0.216±0.051 ^a
干预组	0.200±0.054 ^{ab}	0.132±0.039 ^{ab}
TNF-α		
正常组	0.057±0.021	0.050±0.023
模型组	0.263±0.049 ^a	0.176±0.070 ^a
干预组	0.184±0.056 ^{ab}	0.120±0.015 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与正常组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较

3 讨 论

肝内胆汁淤积主要由胆汁分泌过多、排泄异常引起,胆汁过分堆积易损伤肝细胞,而肝细胞损伤会对肠黏膜造成不同程度的影响,引发肠道功能紊乱,严重时可能导致全身炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能衰竭,威胁患者生命^[7-8],为此修复机体肠黏膜屏障至关重要。此外,急性肝内胆汁淤积发生后 NF-κB、TNF-α 等细胞因子水平明显上升,诱导炎症反应,也会破坏肠黏膜屏障。

益生菌为一种常见微生态制剂,在胆汁淤积性肝病、肠道菌群改善等方面应用较多,补充有效剂量益生菌一方面可刺激肠道内有益菌生长,另一方面可经多种途径抑制肠道内致病菌生长、黏附、浸润,有利于肠道内菌群恢复,同时可促进胆汁排泄,抑制炎症因子产生或释放,改善肠黏膜屏障功能^[9]。相关文献发现益生菌能保护酒精性肝损伤,这与其对肠道微环境调整,增强肠道屏障功能有关^[10]。谢基明等^[11]研究发现益生菌可能通过抑制 TLR4/ERK 通路,使过氧化物酶体增殖剂激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors,PPARs)上调以发挥保护急性肝

损伤的目的。根据肝内胆汁淤积发病机制及相关研究,笔者对与肠黏膜屏障功能相关的指标(D-LA、DAO、织 NF-κB、TNF-α)进行分析,其中 D-LA、DAO 分别为细菌发酵的代谢产物和肠黏膜上层绒毛细胞内酶,肠黏膜被损坏时,D-LA、DAO 被大量释放到血液,致使血清 D-LA、DAO 水平显著上升。为此临床常将这两项作为肠道屏障功能评价的血清指标。肝内胆汁淤积发生时多伴肠源性内毒素血症,可刺激机体 NF-κB、TNF-α 等炎症因子释放^[12],而上述因子会损伤相关结构及功能,进而损伤机体肠黏膜屏障功能。NF-κB 是一种在人体内多种细胞中分布的转录因子,可多向调控基因转录。一旦细胞被胞外信号刺激,会激活单个或多个信号传递途径,致使 IκB 被磷酸化、泛素化,且经由 26S 蛋白酶降解和 NF-κB 解离^[13]。NF-κB 被激活,快速由细胞质移动至细胞核,与前炎症细胞因子(如 TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等靶基因相关序列结合,基因转录启动,促使 TNF-α 等大量释放,放大初始炎症信号。NF-κB 活化后对 TNF-α 等炎症介质触发,引发瀑布样级联反应。TNF-α 被证实通过下调闭合蛋白表达,以损坏肠黏膜屏障^[14]。

ANIT 为间接肝毒剂,通过肝细胞毒性、膜脂质过氧化反应等促使肝细胞及胆管上皮细胞损伤、坏死,同时可造成小叶间胆管附近炎症出现,导致胆管阻塞,胆汁淤积明显,且伴肝实质细胞损害^[15]。本实验通过 ANIT 造模,操作简单,与人类肝内胆汁淤积表现一致性较高。本研究结果发现,ANIT 所致急性肝内胆汁淤积大鼠模型成功,大鼠血清 TBIL、DBIL、ALT、DAO、D-LA 水平比正常组明显上升,可见胆汁淤积会导致肝损伤,影响肠道黏膜功能。本研究模型组、干预组造模后 72 h 肝功能及其他相关指标比造模后 48 h 均有所下降,与熊小丽等^[7]报道相符。分析其原因:ANIT 诱导肝内胆汁淤积形成中在胆汁内与还原性谷胱甘肽结合,随时间推移,结合的 ANIT 慢慢解离排泄,进而 72 h 后肝脏胆汁淤积有所改善,这为今后药物干预设立关键时间点提供了依据。此外,本研究发现与模型组比较,干预组造模后 48、72 h 血清 TBIL、DBIL、ALT 水平均显著低,提示益生菌能明显改善 SNIT 所致肝内胆汁淤积大鼠肝损伤程度。分

析其原因可能与益生菌下调血清 DAO、D-LA 水平及 NF-κB、TNF-α 表达有关。益生菌通过调整肠道内菌群,改变肠道微生态环境,减轻了炎性反应,促进了肠道黏膜屏障功能修复,进而有利于胆汁淤积症状缓解及肝功能恢复。

综上所述,益生菌可通过下调血清 DAO、D-LA 水平及 NF-κB、TNF-α 表达,减轻炎性反应,修复肠黏膜屏障功能,达到治疗肝内胆汁淤积的目的。

参考文献

[1] FISCHLER B,LAMIREAU T. Cholestasis in the new-born and infant[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2014,38(3):263-267.

[2] 荀蕾,卢秉久. 痘清颗粒对急性肝内胆汁淤积模型大鼠肝功能的保护作用及其机制研究[J]. 中国药房,2016,27(13):1794-1796.

[3] 江玲,单庆文,王琳琳,等. 益生菌治疗对婴儿胆汁淤积性肝病肠道菌群及相关细胞因子的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2015,30(12):945-948.

[4] CUNNINGHAM R S,AHRNÉ S,JOHANN L R,et al. Effect of probiotic bacteria on microbial host defense, growth,and immune function in human immunodeficiency virus type-1 infection[J]. Nutrients, 2011,3(12):1042-1070.

[5] 梁惠,吕锐,傅泳,等. 益生菌对大鼠酒精性肝损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国药理学通报,2016,32(7):991-997.

[6] 刘圣烜,黄志华,林莉. 益生菌对胆汁淤积性黄疸大鼠小肠上皮细胞紧密连接蛋白的影响[J]. 中国微生态学杂志,2010,22(5):434-438.

[7] 熊小丽,鄢素琪,秦欢,等. 大黄素预处理对幼龄大鼠肝内胆汁淤积的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志,2016,18

(2):165-171.

[8] 席明名,王俐,汤倩,等. 茵黄合剂提取物对肝内胆汁淤积模型大鼠胆汁分泌和肝脏功能的改善作用[J]. 中国药房,2016,27(28):3936-3938.

[9] KOMATSUZAKI N,SHI M J. Effects of live lactobacillus paracasei on plasma lipid concentration in rats fed an ethanol-containing diet[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012,76(2):232-237.

[10] 武岩峰,张晓磊,张予心,等. 益生菌通过调整正常菌群缓解酒精性肝损伤的研究进展[J]. 微生物学通报,2015,42(10):1988-1993..

[11] 谢基明,王玉珍,张威,等. 益生菌 L. Casei hang 对大鼠急性肝损伤的保护作用及其对 TLR4-ERK-PPAR-γ 通路的影响[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(9):910-913.

[12] 顾维,张启春,王俐,等. 茵黄合剂对肝内胆汁淤积大鼠肝脏 GABA 通路及胆汁转运体的影响[J]. 药学与临床研究,2017,25(1):42-45.

[13] NEISH A S,GEWIRTZ A T,ZENG H,et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination[J]. Science, 2000,289(5484):1560-1563.

[14] MANKERTZ J,TAVALALI S,SCHMITZ H,et al. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma[J]. J Cell Sci,2000,113(11):2085-2090.

[15] DING L L,ZHANG B F,ZHAN C S,et al. Danning tablets attenuates α-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis by modulating the expression of transporters and metabolic enzymes[J]. BMC Complement Altern Med,2014,14(1):249.

(收稿日期:2019-01-10 修回日期:2019-04-02)

(上接第 2355 页)

[10] IWASAKI T,IMADO T,KITANO S,et al. Hepatocyte growth factor ameliorates dermal sclerosis in the tight-skin mouse model of scleroderma[J]. Arthritis Res Ther, 2006,8(6):R161-167.

[11] WU M H,YOKOZEKI H,TAKAGAWA S,et al. Hepatocyte growth factor both prevents and ameliorates the symptoms of dermal sclerosis in a mouse model of scleroderma[J]. Gene Therapy,2004,11(2):170-180.

[12] KAWAGUCHI Y,HARIGAI M,HARA M,et al. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor (C-Met) in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis[J]. J Rheumatol,2002,29(9):1877-1883.

[13] SHERRIFF T R,OHTA A,MORITO F,et al. Antifibrotic effects of hepatocyte growth factor on scleroderma

fibroblasts and analysis of its mechanism[J]. Mod Rheumatol,2006,16(6):364-371

[14] BOGATKEVICH G S,LUDWICKA-BRADLEY A,HIGHLAND K B,et al. Impairment of the antifibrotic effect of hepatocyte growth factor in lung fibroblasts from African Americans:possible role in systemic sclerosis[J]. Arthritis Rheum,2007,56(7):2432-2442.

[15] 康小龙,何承辉,刘晶,等. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠Ⅲ型胶原表达的影响[J]. 中国医科大学学报,2016,45(8):688-691.

[16] 康小龙,何承辉,田红林,等. 刺山柑总生物碱乳膏外用对系统性硬皮病小鼠组织纤维化的改善作用[J]. 中国现代应用药学,2016,33(1):32-35.

(收稿日期:2019-01-12 修回日期:2019-04-04)