

基于高通量测序技术分析肠道菌群在酒精性肝损伤小鼠中的变化

孙 玉,王惠惠,王晓宇,胡纯秋

摘要 目的 建立酒精性肝损伤小鼠模型,分析其肠道菌群变化,并探讨小鼠酒精性肝损伤可能机制。**方法** 6周龄小鼠随机分为对照组(Control组)和酒精组(EtOH组)。EtOH组使用 Lieber-DeCauli 液体饲料喂养 11 d 后再给予单次酒精灌胃建立慢性加急性酒精性肝损伤模型。Control组使用液体对照饲料喂养,并给予等热量糊精灌胃。灌胃后 9 h 收集血清、肝脏和肠道组织以及粪便样本。检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、三酰甘油(TG)水平;肝脏肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL-6、IL-8、IL-1 β mRNA 水平;观察肝脏和肠道 HE 染色病理改变;采用 Illumina 高通量测序检测粪便 α 多样性、 β 多样性及门、属水平物种构成变化。**结果** 与 Control 组相比,酒精暴露导致小鼠血清 ALT、AST 上升($P < 0.01$),肝脏 IL-6、IL-8、IL-1 β mRNA 升高($P < 0.01$)。HE 染色结果显示酒精暴露的小鼠肝脏出现脂肪空泡,有散在细胞坏死以及炎性浸润;肠道结构欠清晰、腺体萎缩,有炎症浸润。EtOH 组小鼠肠道菌群结构改变,菌门水平上,厚壁菌门(Firmicutes)丰度升高($P < 0.05$),菌属水平上,副萨特菌(Parasutterella)丰度减少($P < 0.05$),且以梭菌属中的 Clostridiaceae、Clostridium-sensu-stricto 为关键菌属。**结论** 酒精性肝损伤小鼠的肠道菌群构成发生变化,该变化可能与肝病发生相关。

关键词 酒精;肠道菌群;肝损伤

中图分类号 R 117

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0860-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.004

世界范围内,每年因饮酒造成的死亡人数超过 300 万,造成全球超过 5% 的疾病负担^[1]。长期饮酒造成肝脏损伤,可发展为酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)。ALD 在所有的肝脏疾病中发病率

及病死率最高^[2]。越来越多证据表明,肠道菌群在肝脏疾病的发病过程中发挥重要作用。肝脏和肠道由门静脉相连,一旦肠道菌群发生紊乱,肠道稳态被破坏,过量肠道抗原进入肝脏,会导致肝脏免疫耐受失衡,造成肝脏病变和损伤^[3]。已有研究^[4]表明 ALD 小鼠体内 Firmicutes 丰度下降, Bacteroidetes 丰度上升;但另有实验^[5]表明酒精暴露造成小鼠肠道 Firmicutes 丰度增加, Bacteroidetes 相对丰度下降。尽管已有研究^[6]表明肠道菌群与 ALD 发病密切相关,但肠道菌群多样性以及构成的具体变化尚存争议,仍需更多实验补充验证。该研究以慢性酒精喂养加急性酒精灌胃(Gao-Binge 模型)建立酒精性肝损伤小鼠模型,通过检测血清生化指标、肝脏炎症因子 mRNA 水平、肝脏和肠道病理形态学改变及肠道菌群测序分析确定酒精暴露对肠道菌群的影响,揭示肠道菌群在酒精性肝病发生中的作用,为酒精性肝损伤机制研究提供依据,以期为酒精性肝损伤患者的治疗提供新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 16 只 6 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 20 ~ 23 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。SPF 级动物房温度 20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,湿度维持(50 \pm 5)%,光照周期为 12 h/12 h 昼夜交替。该实验方案经安徽医科大学实验动物伦理审查委员会审核通过。

1.1.2 动物饲料 动物饲料均购自江苏南通特洛菲饲料科技有限公司。Control 组小鼠喂养 Lieber-DeCauli 酒精液体对照饲料(TP4030C)。能量构成为:碳水化合物 47%、脂肪 35%、蛋白质 18%。EtOH 组小鼠喂养 Lieber-DeCauli 酒精液体饲料(TP4030D),饲料能量构成为:碳水化合物 19%、脂肪 35%、蛋白质 18%和酒精 28%。

1.1.3 主要仪器 罗氏公司 RL7600D 全自动生化分析仪、石蜡切片机、全自动组织脱水机、组织包埋机、冷冻切片机均购自德国徕卡公司;OLYMPUS 显

2022-04-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81402676);安徽省自然科学基金(编号:15080850H187);安徽省博士后研究人员科研启动经费资助项目(编号:2016B141)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,合肥 230032

作者简介:孙 玉,女,硕士研究生;

胡纯秋,女,副教授,责任作者,E-mail:huchunqiu@163.com

显微镜购自日本奥林巴斯公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 16只6周龄小鼠适应性喂养1周后,随机分配到对照组(Ctrl组)和酒精组(EtOH组),每组8只;造模过程包括5d液体饲料适应期,6d酒精液体饲料过渡期(酒精液体饲料与对照液体饲料混合的比例分别为(1:2、1:1、2:1)、10d酒精饲料造模期和单次5g/kg酒精灌胃(Ctrl组灌胃9mg/kg麦芽糊精溶液)。灌胃9h后麻醉小鼠取材,收集血清和组织进行后续检测。

1.2.2 血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、三酰甘油(triglyceride, TG)检测 取血后于常温静置2h,离心3500 r/min,15 min,分离血清后,使用全自动生化分析仪测定血清ALT、AST以及TG含量。

1.2.3 HE染色 取新鲜组织,迅速置于4%多聚甲醛内固定,制作石蜡包埋。制备4mm切片,进行苏木精和伊红染色,封片,光学显微镜下观察(×200)。肠道病理评分参考DIELEMAN评分标准^[7]。

1.2.4 实时荧光定量PCR实验(qRT-PCR) 根据TRIzol试剂盒说明书,提取肝脏组织总RNA,稀释后确定RNA纯度并定量至0.5 μg/μl,逆转录成cDNA后,用1 μl cDNA上机扩增,以18S为内参,以EtOH组与Ctrl组的比值来表示肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、IL-1β mRNA水平(表1)。

表1 各基因的引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
18S	F:CATTCGCCGCTGGAAATTCCTT R:GCATTCGAATCGGTACTAGCC
TNF-α	F:GCCCTCAGACCTCAGATCATCTTCT R:GCTACGACCGCTCGGCTACAG
IL-1β	F:GCAACTGTTCTCTGAAGTCAACT R:ATCTTTTGGGGTCCGTCACACT
IL-6	F:TACTGCTTCTCTACGCCCAATTTCC R:TTGCTCTTAGCCACTCTCTTC
IL-8	F:TGCAGAGCCATTTTACTGCAACAG R:CATTCGCCGCTGCAAAATTCCTT

1.2.5 16S rDNA测序 造模结束时,采取无菌方法收集粪便,从每组随机选取5~6个粪便样品进行检测。利用QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒提取粪便总基因组DNA,取30 ng合格的DNA样品加引物,引物序列为515 F:GTGGCAGCMGCCGGGTAA,

806 R:GGACTACHVGGGTWCTAAT,配置成PCR反应体系后对V3+V4区域进行扩增,扩增条件为95℃、3 min,循环30次(95℃、45 s,56℃、45 s,72℃、45 s),72℃、10 min,4℃静置,纯化后的扩增产物溶于Elution Buffer,贴上标志完成建库,以HiSeq2500测序系统的PE250模式上机测序,将原始数据存储于序列数据库,用于后续分析。

1.2.6 肠道菌群测序结果分析 α多样性分析采用估计物种总数的Chao指数和综合评估群落丰富度及均匀度的Shannon指数;β多样性分析采用主坐标分析(principalco ordinatesanalysis, PCoA),使用相似性分析分别从门和属水平比较各组小鼠肠道菌群组成差异。采用组间群落差异分析(LDA effect size, LEf Se)确定各组小鼠菌群样本之间有显著差异的类群。

1.3 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 22.0 统计软件进行分析,组间差异采用两独立样本t检验,以 $P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况 两组小鼠均无死亡现象,EtOH组小鼠最后1次灌胃后出现嗜睡、瘫倒等醉酒症状,7h后逐渐恢复意识。Ctrl组小鼠情况良好、行动正常。

2.2 酒精对小鼠体质量的影响 酒精对小鼠体质量的影响见图1。EtOH组小鼠实验期间体质量呈下降趋势,且造模后期有较大幅度下降,由于Ctrl组遵循等热量喂养原则,Ctrl组小鼠体质量与EtOH组保持一致趋势,后期波动较为平稳。造模结束时,EtOH组相较于Ctrl组体质量降低($t = 5.728, P < 0.01$)。表明摄入酒精对小鼠体质量有一定影响。

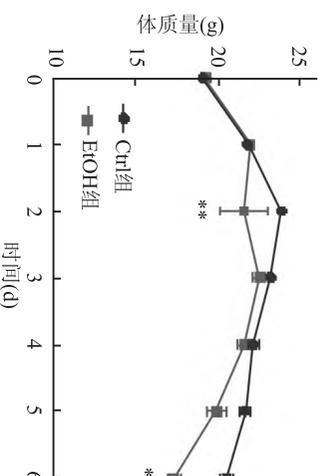


图1 酒精对小鼠体质量的影响
与Ctrl组比较: ** $P < 0.01$

2.3 酒精对小鼠肝脏损伤的影响 相较于Ctrl组,

EtOH组肝脏指数无升高趋势($t = 0.064, P = 0.951$) (图2A)。与Ctrl组ALT、AST相比,EtOH组血清ALT、AST活性升高($t = 3.097, P = 0.015; t = 5.324, P = 0.001$) (图2B、C)。EtOH组TG相较于Ctrl组有升高趋势,但差异无统计学意义($t = 1.571, P = 0.209$) (图2D)。HE染色后显示EtOH组小鼠小叶界限不清,肝索排列紊乱,可见清晰的脂肪空泡,同时观察到散在的细胞坏死以及炎症浸润(图2E)。Ctrl组小鼠肝小叶结构正常,肝索放射状排列,肝窦及肝细胞未见明显病理理性损伤。

2.4 酒精对小鼠肝脏炎症因子基因表达的影响

与Ctrl组相比,EtOH组小鼠肝脏TNF- α mRNA有升高趋势,但差异无统计学意义($t = 2.737, P = 0.069$),IL-6、IL-8、IL-1 β mRNA相对表达量均升高($t = 3.858, P = 0.008; t = 10.237, P < 0.01; t = 11.960, P < 0.01$) (图3)。

2.5 酒精对小鼠肠道病理改变的影响

EtOH组小鼠结肠黏膜表面不光滑、结构欠清晰,腺体排列紊乱,萎缩,可见炎症浸润。Ctrl组小鼠结肠组织表面光滑,且腺体排列整齐,无明显充血或水肿现象。EtOH组与Ctrl组结肠病理学评分差异有统计学意义($t = 7.155, P < 0.01$)。见图4。

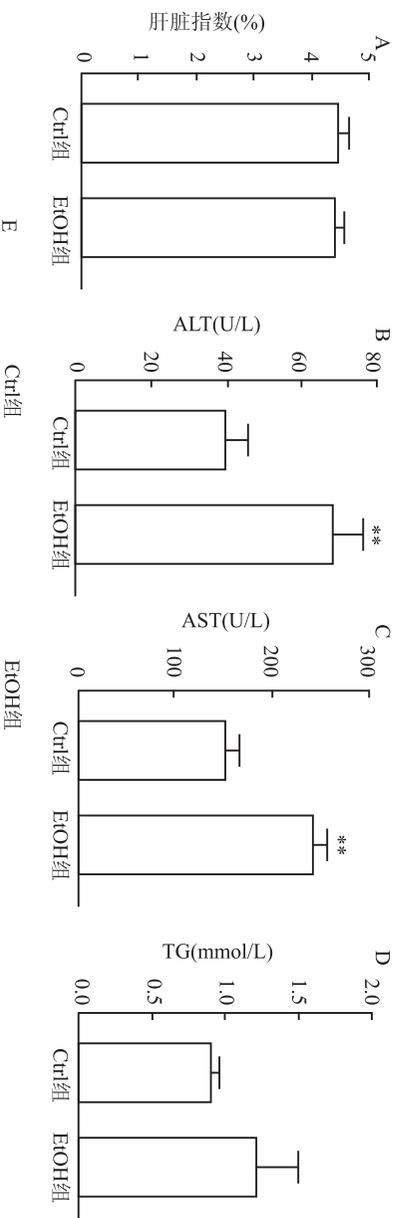


图2 酒精对小鼠肝脏损伤的影响

A: 肝脏指数; B: 血清 ALT 水平; C: 血清 AST 水平; D: 血清 TG 水平; E: 肝脏 HE 染色 $\times 200$; 与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$

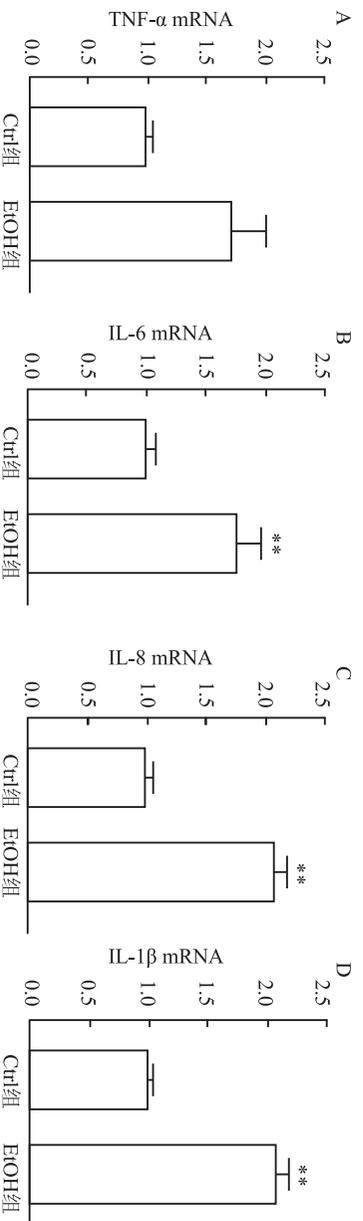


图3 酒精对小鼠肝脏炎症因子表达的影响

A: 肝脏 TNF- α mRNA 水平; B: 肝脏 IL-6 mRNA 水平; C: 肝脏 IL-8 mRNA 水平; D: 肝脏 IL-1 β mRNA 水平; 与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$

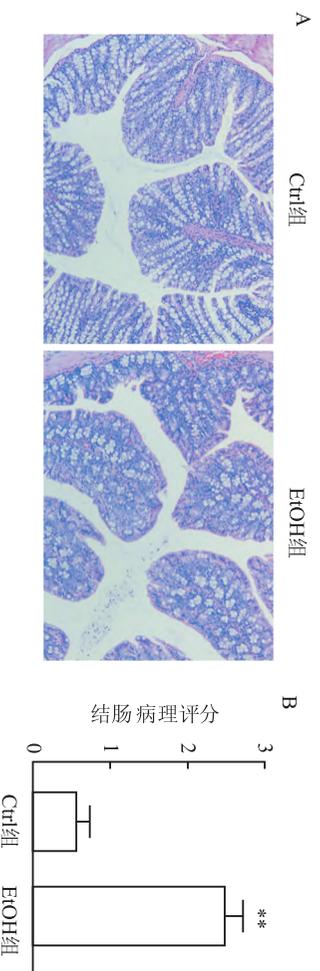


图4 小鼠结肠HE染色及病理评分

A:结肠HE染色 $\times 100$;B:结肠病理学评分;与Ctrl组比较:** $P < 0.01$

2.6 酒精对小鼠肠道菌群的影响

2.6.1 Alpha多样性分析 Alpha多样性分析是对单个样品中物种多样性的分析,图5中Alpha多样性相关指标Chao指数和Shannon指数显示,EtOH组与Ctrl组物种丰富度和均匀度差异无统计学意义($P > 0.05$)。

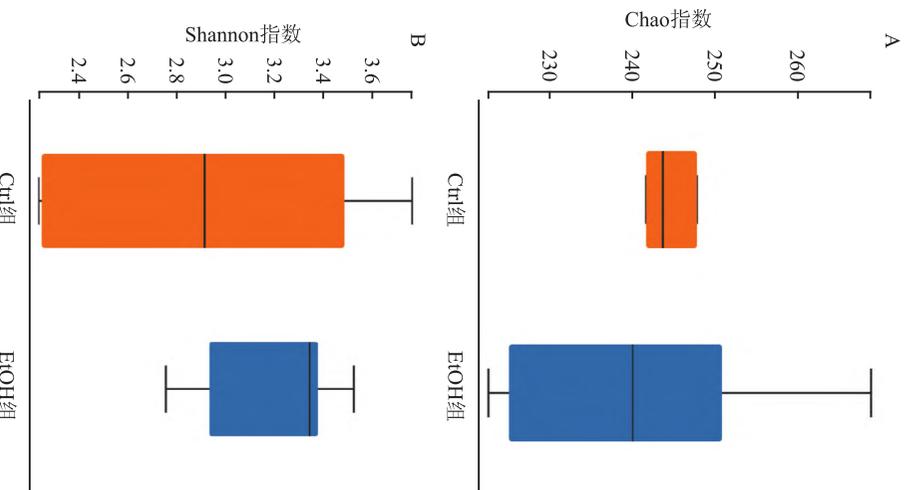


图5 Alpha多样性分析

A:Chao指数,B:Shannon指数

2.6.2 PCoA分析 PCoA分析即主坐标分析,用来研究样本群落组成的相似性或相异性。样本的物

种丰度和构成越接近,则在PCoA图中距离越近。PCoA1作为第1主坐标对肠道菌群的代表性为28.63%、PCoA2为第2主坐标,代表性为20.03%。PCoA2轴上可见EtOH组与Ctrl组距离相差较大且差异有统计学意义($R^2 = 0.176, P = 0.032$),见图6。表明两组小鼠肠道菌群的物种的丰度和构成存在差异。

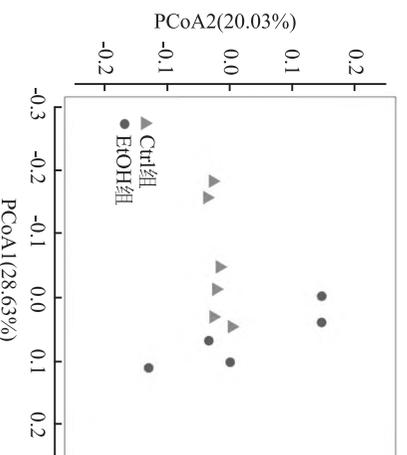


图6 PCoA分析

2.6.3 肠道菌群门水平丰度分析 两组小鼠肠道菌群主要由6个菌门构成,且两组均以 *Bacteroidetes* 和 *Firmicutes* 为主要菌门,其他菌门丰度较低。与Ctrl组相比,EtOH组 *Bacteroidetes* 差异无统计学意义($P > 0.05$),而 *Firmicutes* 相对丰度升高($t = 1.265, P = 0.036$)。进一步比较 *Firmicutes/Bacteroidetes*,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图7。

2.6.4 肠道菌群属水平丰度分析 Ctrl组和EtOH组中由11个菌属构成,且可知的优势菌属均为 *Akkermansia*,且EtOH组丰度有下降趋势,但差异无统计学意义($t = 1.384, P = 0.053$)。与Ctrl组相比,EtOH组 *Parasutterella* 相对丰度降低($t = 3.201, P = 0.016$)。见图8。

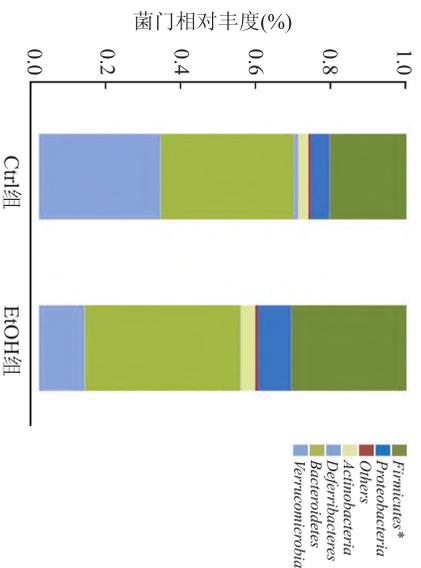


图7 肠道菌群水平丰度分析与 Cntl 组比较: *P < 0.05

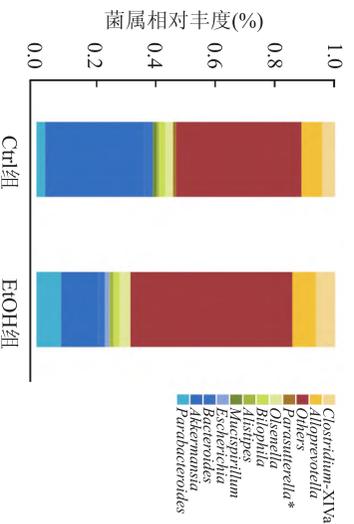


图8 肠道菌群水平丰度分析与 Cntl 组比较: *P < 0.05

2.6.5 LEf Se 差异分析结果 采用 LEf Se 筛选 Cntl 组和 EtOH 组之间有差异的物种。当 LDA 值超过设定值 (默认设定值为 2) 则认为该物种是构成 Cntl 组与 EtOH 组肠道菌群差异的生物标志物。Clostridium-XVIII ($P = 0.035$) 在 Cntl 组中富集, Clostridiaceae 和 Clostridium-sensu-stricto ($P = 0.015$, 0.015) 在 EtOH 组中丰度较低。见图 9。

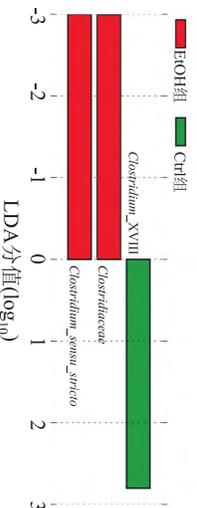


图9 LEf Se 差异分析

3 讨论

酒精性肝病作为全球重大公共卫生问题, 建立完善、可靠的酒精性肝损伤模型是研究其发病机制和探索其防治方法的重要前提。目前常用的酒精肝损伤动物模型主要包括慢性酒精喂养模型、胃内灌

注酒精模型、急性酒精灌胃模型以及慢性酒精喂养加一次急性灌胃的 Gao-Binge 模型。该研究采用 Gao-Binge 模型, 不仅缓解了慢性酒精喂养时间过长导致的病死率较高问题, 又避免了急性酒精灌胃模型病理改变效果微弱的缺点, 同时高度还原人类饮酒方式, 短期内可造成更严重的肝脏损伤^[8]。

血清 ALT、AST 升高被广泛认为是酒精性肝损伤的显著性标志。过量酒精刺激肝脏时, 乙醇代谢产生自由基侵袭肝细胞膜以及线粒体膜, 引起膜通透性增大, 释放 ALT、AST 入血。脂质代谢异常引起的脂肪肝堆积是 ALD 最早的表现形式^[9]。该研究结果显示, 与 Cntl 组相比, EtOH 组小鼠血清 ALT、AST 大幅升高, TG 有升高趋势, 但差异无统计学意义。该研究中酒精暴露并没有引起小鼠肝指数的变化。白云峰等^[10]利用 BALB/c、C57 和 C3H 3 种不同品系小鼠建立酒精性肝动物模型, 比较各项肝损伤指标后表明, C57 品系小鼠肝指数虽无明显变化, 但由于其对酒精厌恶性更低, 血清 ALT、AST、TG 升高更显著, HE 染色呈现病理改变更严重, 仍是最理想的实验动物品系。该研究中 EtOH 组小鼠肝脏病理切片也有不同程度的脂肪空泡、炎症浸润, 与血清结果变化基本一致。以上结果说明该研究成功建立酒精性肝损伤模型。

肠道菌群失调导致的肠道屏障功能障碍、细菌位移、内毒素血症是 ALD 发生的中心环节^[11]。长期大量酒精暴露造成肠道菌群失调, 肠道屏障破坏, 内毒素进入肠腔与 Toll 样受体及 NOD 样受体结合, 激活 NF- κ B 通路, 释放大量包括 TNF- α 、IL-1 β 在内的炎症因子, 同时可以与 IL-6、IL-8 等相互作用发生炎症级联效应, 从而促进肝脏损伤^[12]。Park et al^[13]研究表明, 酒精喂养小鼠的肠道上皮细胞结构丢失、肠绒毛及隐窝变形。该研究同样表明, 酒精暴露可致小鼠结肠结构欠清晰、腺体萎缩, 出现炎症浸润。同时发现 EtOH 组小鼠肝脏 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等炎症因子水平升高。Engen et al^[4]研究表明 ALD 小鼠体内 Firmicutes 下降, Bacteroidetes 和 Verrucomicrobia 数量上升, 而 Lin et al^[5]同样利用酒精喂养小鼠发现 Firmicutes 丰度增加, Bacteroidetes 相对丰度下降。该研究表明, 酒精暴露虽然对小鼠肠道菌群多样性无较大影响, 但在改变菌群构成方面有很大作用。在菌门水平上, EtOH 组小鼠肠道 Bacteroidetes 无明显变化, 而 Firmicutes 丰度增加。进一步比较 Firmicutes/Bacteroidetes, 差异无统计学意义。在菌属水平上, EtOH 组肠道 Parasutterella 丰度下降。

*Firmicutes*是一种常见的革兰阳性菌,能够通过加重脂质沉积导致肝脏损伤^[14]。*Parasutterella*作为肠道健康粪便核心微生物之一,与炎症性肠病、脂肪肝等疾病发生密切相关^[15]。进一步 LEf Se 差异分析显示,与 Ctrl 组相比,EtOH 组以 *Clostridiaceae* 和 *Clostridium-sensu-stricto* 为其重要菌种,*Clostridium-XVIII* 则为 Ctrl 组中的重要菌种。而许文琦等^[16]利用酒精喂养建立大鼠酒精肝模型,发现毛螺菌科和瘤胃球菌属-1 为酒精作用下肠道发挥作用的重要菌属,原因可能是不同动物品种的肠道菌群结构和丰度本就存在一定差异,因此,在酒精作用下发挥作用的菌群也有所不同。由此可知,酒精暴露未影响肠道菌群多样性,但改变了肠道菌群结构,并可能通过上调小鼠肠道 *Firmicutes* 丰度、减少 *Parasutterella* 相对丰度,且以 *Clostridiaceae* 和 *Clostridium-sensu-stricto* 为重要菌属,影响肠道健康,改变肠道屏障功能。

综上所述,酒精暴露造成的肝脏损伤小鼠,其肠道菌群发生变化,该变化可能与肝病的发生相关。该研究从肠道菌群变化入手,揭示其在酒精暴露致小鼠肝损伤中的作用,为探索酒精性肝病的预防和治疗方法提供新思路。

参考文献

- [1] Rojas H. Alcoholic liver disease: implications for the advanced practice provider -science direct [J]. J Nurse Pract, 2019, 15 (7): 506 - 10.
- [2] Trimble G, Zheng L, Mishra A, et al. Mortality associated with alcohol-related liver disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2013, 38(6): 596 - 602.
- [3] 王磊熙, 候静, 张德凯. 肠道稳态失调与肝脏疾病的关联 [J]. 医学综述, 2018, 24(7): 141 - 5, 150.
- [4] Engen P A, Green S J, Voigt R M, et al. The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbio-

- ta [J]. Alcohol Res, 2015, 37(2): 223 - 36.
- [5] Lin D, Jiang X, Zhao Y, et al. Komagataeibacter hansenii CGM-CC 3917 alleviates alcohol-induced liver injury by regulating fatty acid metabolism and intestinal microbiota diversity in mice [J]. Food Funct, 2020, 11(5): 4591 - 604.
- [6] Bluemel S, Wang L, Kuelbs C, et al. Intestinal and hepatic microbiota changes associated with chronic ethanol administration in mice [J]. Gut Microbes, 2019, 11(3): 265 - 75.
- [7] Dieleman L A, Palmen M J, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. Clin Exp Immunol, 1998, 114 (3): 385 - 91.
- [8] 胡纯秋, 徐德祥, 王国秀, 等. 维生素 D 缺乏对酒精性肝损伤小鼠影响 [J]. 营养学报, 2020, 42(5): 465 - 71.
- [9] Liu Y X, Liu M, Chen Q C, et al. Blueberry polyphenols ameliorate visible light and lipid-induced injury of retinal pigment epithelial cells [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(48): 12730 - 40.
- [10] 白云峰, 李晓娟, 李永纲, 等. 近交系小鼠酒精性脂肪肝模型建立的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(1): 8 - 11.
- [11] 池肇春. 肠道屏障功能障碍与酒精性肝病研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(19): 1179 - 92.
- [12] Milosevic I, Vujovic A, Barac A, et al. Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: a review of the literature [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2): 395.
- [13] Park J H, Jung I K, Lee Y, et al. Alcohol stimulates the proliferation of mouse small intestinal epithelial cells via Wnt signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 534: 639 - 45.
- [14] 吴冬雪, 李玉红, 裴盛斐, 等. 基于 16S rDNA 测序技术分析异烟肼致大鼠肝损伤中肠道菌群变化特征 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(9): 1374 - 8.
- [15] Ju T, Kong J Y, Paul S, et al. Defining the role of parasutterella, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota [J]. ISME J, 2019, 13(6): 1520 - 34.
- [16] 许文琦, 王生, 黄逸安, 等. 非酒精性脂肪肝与酒精性肝病大鼠肠道菌群比较研究 [J]. 世界临床药物, 2018, 39(1): 35 - 42.

Analysis of gut microflora changes in alcohol-induced liver injury in mice based on high-throughput sequencing technology

Sun Yu, Wang Huihui, Wang Xiaoyu, Hu Chunqiu

(Dept of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To analyze the changes of intestinal flora and explore the possible mechanisms of alcoholic liver injury in mice. **Methods** Six-week-old mice were randomly divided into control group (Ctrl group) and alcohol group (EtOH group). The EtOH group was fed with Lieber-DeCarli liquid feed for 11 days and then given a single alcohol gavage to establish a chronic and acute alcoholic liver injury model. The Ctrl group was fed with liquid control diet and given isocaloric dextrin by gavage. Serum, liver, intestinal tissue and fecal samples were collected 9 h after gavage. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and

IL-6 在对乙酰氨基酚肝损伤后再生中的作用

郁福乾,宋莎莎,路燕,章礼久

摘要 目的 通过体外实验探讨白细胞介素(IL)-6在对乙酰氨基酚(APAP)所致急性肝损伤(ALI)后肝再生过程中的作用。方法 体外实验,培养 AML12 小鼠正常肝细胞,CCK-8 法检测不同浓度 APAP 药物和 IL-6 中和抗体(IL-6 Ab)作用于 AML12 细胞后细胞的活力,筛选出最适药物作用浓度;ELISA 测量 IL-6 浓度;Western blot 法检测 PCNA、CyclinD1、HGF 等肝脏再生相关蛋白水平;qRT-PCR 法检测 IL-6、PCNA、CyclinD1 mRNA 水平。GraphPad Prism 8.0 软件处理数据。结果 通过 CCK-8 数据,筛选 5 mmol/L 最适药物浓度造模以及 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IL-6 Ab 作用细胞。ELISA 试剂盒测量 IL-6 浓度,0.4、12、24、48 h IL-6 浓度分别为 0、1.794、2.264、1.658、1.086 pg/ml 。Western blot 结果,与 APAP 处理 AML12 细胞其他时间点相比,4 h APAP 组 CyclinD1 蛋白水平最高,12 h APAP 组 PCNA、HGF 蛋白水平最高($P < 0.05$)。与 4 h APAP 组相比,4 h APAP + IL-6 Ab 组 CyclinD1、p-STAT3 蛋白表达降低($P < 0.05$);与 12 h APAP 组相比,12 h APAP + IL-6 Ab 组 PCNA、HGF 表达减低($P < 0.05$)。qRT-PCR 结果,与 APAP 处理 AML12 细胞其他时间点相比,4 h APAP 组 IL-6、PCNA、CyclinD1 mRNA 水平达高

峰($P < 0.05$);与 4 h APAP 组相比,4 h APAP + IL-6 Ab 组 PCNA、CyclinD1 mRNA 水平降低($P < 0.05$)。结论 IL-6 Ab 通过中和 IL-6 抑制 STAT3 磷酸化进而抑制肝细胞再生,推测 IL-6 在 APAP 诱导的肝损伤后肝再生过程中可能起到促进作用。

关键词 对乙酰氨基酚;急性肝损伤;白细胞介素-6;IL-6 中和抗体;肝再生

中图分类号 R 329.4;R 333.4;R 575;R 977.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0866-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.005

药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是指由药物和(或)其代谢产物引起的肝脏损伤,其发病率近年来呈上升趋势,目前已是非感染性肝病的第 2 大病种^[1]。其中以对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)过量诱导的急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)最为常见^[2-3]。在肝脏损伤及修复再生过程中,炎症反应起至关重要的作用。炎症诱导的再生主要由炎症细胞释放的各种细胞因子和生长因子调控,目前研究较多的促炎细胞因子是白细胞介素(interleukin, IL)-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α ^[4]。体内研究表明 IL-6 和 TNF- α 在炎症反应早期介导肝损伤,但在后期能够促进肝脏再生^[5-6]。该研究旨在通过体外实验探讨 IL-6 在 APAP 所致急性肝损伤(acute liver injury, ALI)后肝再生过程中的作用。

2022-03-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81800524)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院消化科,合肥 230601

作者简介:郁福乾,男,硕士研究生;

章礼久,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:

zhanglijiu6336@163.com;

路燕,女,主治医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:luy-

ancathrine@163.com

triglyceride (TG) in serum and hepatic tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-8, IL-1 β mRNAs were measured. The pathological changes of liver and intestine were observed by HE staining. Illumina high-throughput sequencing was used to detect α diversity, β diversity and species composition at phylum and genus levels. **Results** Compared with the Ctrl group, alcohol exposure significantly increased serum ALT and AST in mice ($P < 0.01$), and obviously increased liver IL-6, IL-8 and IL-1 β mRNA ($P < 0.01$). HE staining showed that there were scattered cell necrosis and inflammatory infiltration in the liver of mice in EtOH group. The intestinal structure was not clear, the gland was atrophy, and there was obvious inflammatory infiltration. The structure of intestinal flora in EtOH group changed, *Firmicutes* abundance increased at phylum level($P < 0.05$), *Parasutterella* abundance decreased at genus level($P < 0.05$), and *Clostridiaceae* and *Clostridium-sensu-stricto* were the key genera. **Conclusion** The composition of intestinal microflora in mice with alcoholic liver injury changes, which may be related to the occurrence of liver disease.

Key words alcohol; gut microbiota; liver injury