

·论著·

肠外营养导致大鼠肝细胞炎症因子及受体基因表达的变化及临床意义

吴卫卫 汪 健 黄顺根

【摘要】 目的 长期应用全胃肠外营养(total parenteral nutrition,TPN)相关肝胆功能损害的发病机制仍不清楚。本研究旨在观察不同营养途径下,大鼠肝脏炎症因子及其受体基因表达的差异,以进一步探讨炎症细胞因子及其受体在 TPN 相关肝损伤中的作用及可能机制。方法 选择 12 只雄性 SD 大鼠,随机分为 TPN 组(6 只)和生理盐水对照组(6 只),7 d 后应用基因芯片方法比较两组大鼠肝脏的炎症细胞因子及受体基因表达的差异。结果 与正常对照组比较,TPN 4 d 组大鼠表达上调的基因有 IL1r2、IL-1 β 、IL1m、IL-18、TGF- α 、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 1il、TNF-sf6、IFN- γ bp、Cxc12、Ccl2、Ccl4、Cysl。表达下调的基因有 Bmp2、XCR1、FGF10、FGF2、IL-15、TGF- β 2、Seya11、FGF1、IL-10 α 、LTa、Bambi、Caspase1、Cxc110、FGF16、FGF21、Frag1、TNFs4。结论 TPN 后大鼠肝脏处于免疫抑制状态,对免疫应答的反应迟钝,IL-18、TGF- α 、IL-18 升高可能与 TPN 相关肝脏损伤有关。

【关键词】 胃肠外营养;全;肝细胞;炎症趋化因子类;大鼠

Parenteral Nutrition Leads to Alteration of Inflammation Cytokines and Receptors Gene Expression in the Rat *WU Wei-wei, WANG Jian, HUANG Shun-gen.* Department of Pediatric Surgery, Affiliated Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, 215003, China

[Abstract] Objective Total parenteral nutrition has been widely used during the past thirty years. It has been found to be an effective and relatively safe method for supplying energy and nutrients to patients with intestinal dysfunction, however, long-term TPN induces a high rate of liver disease in infants. The goal of this experiment was to further study the role of inflammation cytokines and receptors and the potential mechanism of TPN-induced hepatocyte injury by investigating the differential expression of the inflammatory cytokine genes and receptors. **Methods** Twelve infant (22 ~ 28 days old) male SD rats weighing 90 ~ 100 g were randomly divided into two groups ($n = 6$). The control group received an oral diet, while the total parenteral nutrition group received continuous TPN infusion through a silastic catheter inserted in the right jugular vein. After 7 days part of the liver was taken for the examination of inflammatory cytokines and receptors gene expression with the oligo gene microarray to analyse the differential expression of the genes in the rats receiving TPN infusion. **Results** Compared with the control group, the 7-day TPN group was associated with an up-regulation of IL1 α IL-1 β IL1m IL-18 TGF- α TGF- β 1 TGF- β 2 TGF- β 3 TGF- β 1il TNF- α IFN- γ p Col4 Cyr1, and a down-regulation of Bmp2 XCR1 FGF10 FGF2 IL-15 TGF- β 2 Scya11 FGF1 IL-10 α LTa Bambi Caspase1 Cxcl10 FGF16 FGF21 Frag1 TNF α 4. **Conclusions** The rats after TPN show immune suppression in the liver and a slow immune response. The up-regulation of IL-1 β , TGF- α and IL-18 may be related to TPN-induced liver injury.

【Key words】 Parenteral Nutrition; Total; Hepatocytes; Chemokines; Rats

随着营养液配方的不断改进和输注技术的不断完善,全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)的耐受性及安全性得到了改善,但长期应用 TPN 导

致肝胆功能损伤仍是 TPN 治疗的重要并发症^[1,2]。本研究通过建立 TPN 肝损伤的大鼠模型,利用基因芯片技术,在转录组学水平上,观察不同营养途径下,肝脏相关炎症因子及其受体基因的表达,探讨这些变化的炎症因子及其受体在 TPN 相关肝损害中的作用,为临床上预防和治疗 TPN 相关并发症提供依据。

材料与方法

一、实验动物及分组

12 只雄性 SD 大鼠, 体重 225 ~ 250 g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 随机分为两组: A 组 6 只, 为生理盐水对照组; B 组 6 只, 为 TPN 组。

二、实验方法及检测指标

大鼠术前禁食 12 h, 不禁水, 称重, 术野用 8% Na₂S 脱毛, 10% 水合氯醛按 300 mg/kg 腹腔注射麻醉, 麻醉成功后, 仰卧固定于小型工作台上。用安尔碘消毒皮肤, 纵形切开大鼠右侧颈部, 游离右颈外静脉并结扎远端, 将硅胶管内气体排净, 夹闭右颈外静脉近端, V 型切开静脉后插入硅胶管约 1.5 cm, 进入上腔静脉后固定, 用 12 号针头由右颈外侧皮下穿至背部两肩胛间脱毛处穿出, 引导直径 1.0 mm 的硅胶管由大鼠背部经皮下穿至右颈侧, 接自制旋转装置。

营养液采用“全合一”方式, 在无菌条件下统一配制, 每 72 h 更换新配制的营养液, 配方组成同文献^[3]。置管后即通过恒流微泵持续输注静脉营养液, 手术当日输液量为 20 g, 术后第 1 天为 40 g, 第 3 ~ 6 天为 60 g。

TPN 持续 7 d 后, 停用静脉营养液, 持续输注 6 h 生理盐水, 麻醉后打开腹腔, 取新鲜肝组织, 组织块以生理盐水清洗干净, 取 50 ~ 100 mg 置于液氮内罐内储存。自心脏抽取血液约 2 mL 做肝功能检查。另取部分肝脏组织, 行病理检查和电镜检查。

三、Oligo GEArray 基因芯片实验操作步骤

1. 总 RNA 提取: 取 100 mg 肝组织样本, 加入 1 mL 的 RNA 抽提试剂 TRIzol (Invitrogen), 匀浆后抽提 RNA。

2. RNA 质量检测: 紫外吸收测定法测定在分光光度计 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, 以计算其浓度并评估 RNA 的纯度; 使用甲醛电泳试剂进行变性琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 的纯度及完整性。

3. 合成 cDNA: 按照逆转录酶 (Invitrogen) 使用说明, 将样本中的 RNA 逆转录成 cDNA。

4. 芯片杂交: 将 Oligo GEArray 基因芯片加入 GEArray 杂交液做预杂交, 洗去杂交液后加入用 TrueLabeling-AMP 试剂盒制备的生物素标记的 cRNA 样品, 旋转杂交后洗膜。

5. 化学发光检测: 将膜以 GEAb 封闭液 Q 封闭 40 min 后, 加入链亲和素偶联的碱性磷酸酶 (AP) 并

洗膜, 经 CDP-Star 化学发光底物孵育后 X-射线胶片曝光。

6. 图像采集和数据分析: 使用 CDP-Star 孵育过后, 芯片即可用于图像采集。通过 X 胶片和台式扫描仪获得化学发光的芯片图像, 使用网上提供的综合型 GEArray 表达分析配套软件 (GEArray Expression Analysis Suite) 进行完整的芯片数据分析。

四、统计学处理

全部数据采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计由 SPSS 13.0 软件完成, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一、体重情况

实验结束时 A 组 6 只全部存活, TPN 组实验第 5 天死亡 1 只, 解剖发现置管处出现营养液外渗。两组大鼠体重于实验后较实验前均增加 ($P < 0.01$)。A 组大鼠的体重较 TPN 组增加更为显著 ($P < 0.05$), 如表 1 所示。

表 1 两组体重变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	初始重量 (g)	处死时重量 (g)
A 组	95.6 ± 3.2	121.8 ± 10.3 *
B 组	95.5 ± 4.1	116.4 ± 7.4 *

注: * $P < 0.05$

二、肝生化检查结果

大鼠总胆红素、直接胆红素、间接胆红素和谷丙转氨酶等两组比较没有明显差异, 谷草转氨酶 (AST): B 组 (249.87 ± 134.62) 较 A 组 (74.05 ± 39.47) 明显升高 ($P < 0.05$)。

三、肝脏病理和电镜下结果

大体标本未见明显异常, 光镜下 A 组肝脏结构形态正常, B 组肝脏见少量炎性细胞浸润, 有局灶性肝细胞轻度变性坏死, 肝细胞索结构紊乱, 肝细胞脂肪变性、空泡化。电镜下 A 组未见明显异常, B 组见少量淋巴细胞浸润, 肝血窦、毛细胆管扩张, 有淤胆, 微绒毛脱落, 线粒体基质增生, 肝细胞及基质细胞萎缩、核染色质边集, 可见凋亡小体。

四、肝脏组织中炎症因子及其受体基因的表达情况

本研究 B 组大鼠较于 A 组大鼠表达变化的基因见表 2 ~ 3。

表 2 B 组表达上调的基因(较 A 组表达量 >2 倍 $\bar{x} \pm s$)

基因(TPN 后上调)	与正常对照比值的自然对数
Ccl2(NM_031530)	1.751 5 \pm 2.528 62
Cxcl2(NM_053647)	2.173 3 \pm 2.317 86
Il18(NM_019165)	1.100 9 \pm 1.452 21
Il1 β (NM_031512)	1.105 1 \pm 0.391 14
Il1r2(NM_053953)	4.105 3 \pm 2.404 74
Il1m(NM_022194)	1.122 2 \pm 1.380 94
Ccl4(NM_053858)	4.206 9 \pm 2.261 14
Tgfa(NM_012671)	1.080 6 \pm 1.312 45
Tgfb1(NM_021578)	2.268 3 \pm 2.282 55
Tgfb1l(XM_341934)	1.014 6 \pm 0.507 33
Tgfb2(NM_031131)	1.559 0 \pm 1.053 60
Tnfsf6(NM_012908)	1.649 8 \pm 1.202 90

表 3 B 组表达下调的基因(较 A 组基因表达量 <0.5 倍 $\bar{x} \pm s$)

基因(TPN 后表达下调)	与正常对照比值的自然对数
Bmp2(NM_017178)	-3.014 4 \pm 0.907 77
Casp1(NM_012762)	-1.075 6 \pm 1.633 39
Xcr1(XM_236740)	-2.367 3 \pm 1.086 22
Cxcl10(NM_139089)	-1.004 3 \pm 1.802 97
Fgf1(NM_012846)	-1.368 8 \pm 0.956 84
Fgf10(NM_012951)	-2.978 8 \pm 0.779 01
Fgf16(NM_021867)	-1.050 4 \pm 0.847 42
Fgf6(NM_131908)	-1.065 7 \pm 0.717 98
Fgfr2(XM_341940)	-2.539 1 \pm 0.817 20
Frag1(NM_053895)	-1.044 4 \pm 1.344 49
Il10ra(NM_057193)	-1.337 9 \pm 0.461 28
Il15(NM_013129)	-3.123 8 \pm 1.276 37
Il2r β (NM_013195)	-1.144 2 \pm 2.166 47
Lta(NM_080769)	-2.336 6 \pm 2.192 63
Scya11(NM_019205)	-2.505 0 \pm 1.643 09
Tgfb2(NM_031132)	-1.504 2 \pm 0.710 69
Tnfa4(NM_053552)	-2.043 6 \pm 2.038 88

讨 论

本研究通过建立 TPN 肝损伤的大鼠模型,利用基因芯片技术,在转录组学水平上,观察不同营养途径下,大鼠肝脏相关炎症因子基因及其受体的表达情况,结果发现在表达变化的因子中,有些是炎症趋化因子及受体如 Cxcl2、Ccl2、Ccl4、XCR1、Cxcl10、Scya11,它们能诱导单核细胞、粒细胞等免疫细胞向特定组织部位浸润和积聚,并在炎症细胞的黏附及机体的防御反应中起重要作用;有些是炎症细胞因子及其受体,如 IL-1 β 、IL-18、IL-15、Lta、IL1m、

IL1r2、TNF-sf6、IL-10ra、TNFs4、Caspase1、Il2r β 、TGF- β ,它们具有免疫调节、抗感染等作用,也可介导强烈炎症反应等对机体有害的病理作用。TPN 后大鼠肝脏存在炎症反应,负向调控因子及受体 TGF- β 、IL-10ra、IL1m、IL1r2 的表达上调,而抗感染炎症因子 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等的表达没有明显变化,可能提示 TPN 后大鼠肝脏处于免疫抑制状态,对免疫应答反应迟钝,与 M. Tomoyuki 等的研究结果一致^[3]。

白细胞介素 18(IL-18)是最近发现的一种新细胞因子,具有广泛的生物学活性,是内毒素致肝损害的重要诱导因子^[4-5]。已知 IL-18 能通过 γ -干扰素(IFN- γ)诱导 α -干扰素(IFN- α)的表达,形成一个由 IL-18、IFN- γ 和 IFN- α 组成的细胞因子级链引起肝脏损害。但内毒素诱导的肝损害并不完全由这个细胞因子级链引起。已知 Fas-Fas 配体(FasL)系统与某些肝损害有关^[6],而 IL-18 能增强 Th1 细胞的 FasL 介导的细胞毒作用。本实验中,TPN 大鼠肝脏的 IL-1 β 、TGF- α 、IL-18 的基因表达量升高,我们可以推测 IL-1 β 、TGF- α 、IL-18 升高可能与 TPN 大鼠肝脏的损伤密切相关。

面对潜在的损伤因素时,为了保护肝细胞的完整性,适当的肝细胞凋亡和增殖是必要的。TPN 相关的肝损伤可见肝细胞的凋亡和坏死显著增加,肝细胞增殖减少^[7]。而肝细胞增殖对修复肝损伤是必不可少的。本研究中,TPN 大鼠肝脏有些与修复有关生长因子的表达发生了变化,如 TGF- α 、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 1l、TGF- β r2、FGF10、FGF1、FGF16、FGF6、FGFR2、Frag1。还有一些其它因子如 Bmp2,可能与 TPN 相关骨病的发生有关。骨病在接受 TPN 的患者中很常见。主要表现为骨密度降低、血碱性磷酸酶升高、高钙血症、骨痛、骨折等。本模型中 Bmp2 与 FGF2 的基因表达均下调,从基因水平上解释了 TPN 骨病的发生,其机制仍有待进一步研究。

综上所述,TPN 大鼠与正常大鼠肝脏细胞中炎症因子及其受体的基因表达存在差异,提示 TPN 后大鼠肝脏免疫防御功能受到抑制,IL-1 β 、TGF- α 、IL-18 升高可能与 TPN 相关肝脏损伤有关。

参 考 文 献

- 1 Cavicchi M, Beau P, Crenn P, et al. Prevalence of liver disease and contributing factors in patients (下转第 93 页)