

脓毒症小鼠肝脏功能的改变及 Leptin 保护作用的研究

颜光涛*, 薛 辉, 林 季, 郝秀华, 张 凯, 王录焯
(解放军总医院基础医学研究所生化研究室, 北京 100853)

[摘要] **目的:** 研究脓毒症对肝功能及相关酶活性的影响, 探讨 Leptin 在急性炎症反应中的作用。 **方法:** 建立小鼠盲肠结扎致脓毒症模型, 设立假手术组、脓毒症组、Leptin 保护组(腹腔内注射 0.1 mg/kg Leptin)和消炎痛(吲哚美辛)保护组(腹腔内注射 2 mg/kg 消炎痛)。于脓毒症后 6 h 和 12 h, 采用放射免疫法测量肝组织匀浆液中 Leptin 水平, 采用 96 孔分光光度法检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)及髓过氧化物酶(MPO)、谷胱甘肽-S 转移酶(GST)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、超氧化物歧化酶(SOD)等 4 种与自由基合成、解毒和嘌呤生成代谢相关的酶的水平, 同时以 H-E 染色法观察肝组织病理学改变。 **结果:** 与假手术组相比, 脓毒症组伤后 12 h 血清 ALT 明显上升($P < 0.05$), 6 h 时无显著改变。Leptin 保护组在 12 h 时可见 ALT 显著低于脓毒症组水平($P < 0.05$), 消炎痛保护组在 6 h 和 12 h 时有 ALT 下降, 但无显著差异。Leptin 保护组和消炎痛保护组肝组织内 MPO 活性没有显著变化, 但 GST 和 SOD 活性明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), 同时 XOD 活性明显增加($P < 0.05$)。另外, 脓毒症组肝内 Leptin 有下降趋势, Leptin 保护组肝内 Leptin 水平有所恢复, 而消炎痛保护组肝内 Leptin 水平也有所恢复, 但在 12 h 时与脓毒症组有显著差异($P < 0.05$)。 **结论:** Leptin 对脓毒症造成的肝功能损害有明显保护效应, 其保护作用可能涉及肝细胞代谢过程中氧化-还原反应、氧自由基形成和解毒功能的调节。

[关键词] Leptin; 脓毒症; 丙氨酸氨基转移酶

[中图分类号] R392.32 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0268-04

Changes of hepatic function in sepsis mice and protective effects of Leptin on it

YAN Guang-tao*, XUE Hui, LIN Ji, HAO Xiu-hua, ZHANG Kai, WANG Lu-huan (Research Laboratory of Biochemistry, Basic Medical Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of sepsis on hepatic function and corresponding enzymes in mice and to explore the role of Leptin in acute inflammation. **Methods:** Mice sepsis models were established through cecum ligation and perforation. Mice were divided into sham-operation, sepsis, leptin-protection (peritoneal injection of 0.1mg/kg Leptin) and indomethacin-protection (peritoneal injection of 2 mg/mg indomethacin) groups. Six and twelve hours after sepsis, leptin levels in liver homogenate were detected by radioimmunoassay; serum alanine aminotransferase (ALT) and 4 enzymes in liver homogenate, myeloperoxidase (MPO), glutathin-S-transferase (GST), xanthine oxidase (XOD) and superoxide dismutase (SOD), all related with synthesis of free radicals, detoxication and purine metabolism, were detected by 96 well spectrophotometry. H-E staining was used to examine the histopathologic changes of liver. **Results:** Compared with the sham group, sepsis group had an increased serum ALT level ($P < 0.05$) at 12 h after sepsis, but not at 6 h. Serum ALT was significantly lower in Leptin-protection group than in sepsis group 12 h after sepsis ($P < 0.05$). Indomethacin injection had no obvious effect on serum ALT at either 6 h or 12 h after sepsis. Both leptin and indomethacin had no significant effect on hepatic MPO activity, but decreased GST ($P < 0.01$) and SOD ($P < 0.05$) activities and increased XOD ($P < 0.05$) activity. Leptin decreased in sepsis mice but recovered after leptin injection. Indomethacin injection also recovered Leptin level and the level was significantly higher than that of sepsis group at 12 h ($P < 0.05$). **Conclusion:** Leptin has obviously protective effect on sepsis-induced hepatic injury, the mechanism of which may be related to oxidoreductive reaction, synthesis of oxygen free radicals and detoxication in the metabolic process of hepatic cells.

[KEY WORDS] Leptin; sepsis; alanine aminotransferase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 268-271]

Leptin 作为一种多功能的细胞因子, 除在摄食、体质量调节、能量代谢平衡等方面发挥重要作用外, 在生殖、妊娠、血管形成、免疫应答、炎症反应、创伤修复等方面也产生重要的中枢和外周调节作用^[1,2]。近年来有研究显示 Leptin 在烧伤和感染等过程中发挥保护脏器功能、维持机体内环境平衡的重要作

用^[3]。但这方面的研究甚少, 结果也不一致。究竟

[基金项目] 军队医学杰出中青年科研基金(04J018)。Supported by The Science Fund for Distinguished Young Scholars of the PLA(04J018)。

[作者简介] 颜光涛, 硕士, 研究员, 博士生导师。

* Corresponding author. E-mail: yan301@263.net

Leptin 能否发挥脏器功能保护,仍没有明确的答案。为此,我们设计了以腹腔直接给重组小鼠 Leptin,配合传统抗炎药消炎痛作对照,观察二者对脓毒症小鼠肝功能的保护作用及其肝组织内氧自由基、活性巯基和嘌呤代谢有关的酶活性的变化情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 昆明小鼠(雄性,体质量 25 g)购自军事医学科学院实验动物中心。实验前禁食 12 h,不禁水。随机分为假手术组、脓毒症组、Leptin 保护组、消炎痛保护组,每组包含 6 h 和 12 h 各一组,其中 6 h 各组为 10 只小鼠,12 h 各组为 11 只小鼠。

1.2 实验试剂 髓过氧化物酶(MPO)、谷胱甘肽-S 转移酶(GST)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(批次号 20050513);Leptin 购自英国 Peprotech 公司,消炎痛(吲哚美辛)购自美国 Sigma 公司;小鼠 Leptin 放射免疫分析药盒购自北京北方生物技术研究所。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 脓毒症模型的建立^[4] 实验前禁食 12 h,1%戊巴比妥钠 0.2 ml 腹腔内注射麻醉小鼠,无菌条件下切开小鼠下腹部正中约 1.5 cm,找出盲肠阑尾部结扎,用 5 号针头穿孔 2 个,将肠放回原位置后缝合。假手术组麻醉后切腹,并寻找到盲肠阑尾末端但不结扎和穿孔。Leptin 保护组和消炎痛保护组于缝合后腹腔内各注射 0.1 mg/kg 和 2 mg/kg Leptin 和消炎痛生理盐水溶液,12 h 组于 6 h 后再注射同量上述药物。脓毒症组和假手术组均在相应时间点注射不含药物的同体积生理盐水。在相应 6 h 和 12 h 后处死小鼠并收集各组血液,在 4℃ 条件下收集并冻存部分肝脏组织,另一部分贮存于 4% 甲醛溶液,分别作组织匀浆和病理切片 H-E 染色。

1.4 血清的收集和 ALT 的测定 小鼠经眼球摘除法收集血样,置 37℃ 水浴 20 min,再按 4℃、3 000 r/min 离心 10 min,分离血清待测。按试剂盒要求配制试剂,在 96 孔板上分别设置空白、质控、标准、样品孔,加血清样品 10 μ l、工作液 100 μ l,充分混匀后置 37℃ 反应 15 min,以空白液调零后于酶标仪比色。测量波长为 492 nm,参考波长为 620 nm,由测量软件读数并计算出实际浓度。

1.5 肝组织匀浆液的制备 取冻于 -80℃ 的组织块称重(0.08~0.4 g)放入盛有少量冰冷生理盐水的玻璃匀浆器中,在冰浴中上下转动研磨数十次,充

分研碎,使组织匀浆化。根据组织湿重补充生理盐水使匀浆液浓度相同。将匀浆液倒出少部分用于 MPO 的测定,剩余部分用 4℃、3 500 r/min 离心 20 min,取上清,用于测定其他指标。

1.6 MPO 的测定 按试剂盒要求配制各试剂,采用 96 孔板代替玻璃试管,改变各种试剂的体积后加样如下:取未离心的组织匀浆液 10 μ l、缓冲液 10 μ l、显色剂 150 μ l,加入 96 孔板中混匀,37℃ 水浴 30 min 后加入终止液 2.5 μ l,混匀后于 60℃ 水浴 10 min,取出后立即用酶标仪读取各孔 *D* 值,测量波长为 460 nm。

1.7 GST 的测定 按试剂盒要求配制各试剂。取基质液 30 μ l、组织匀浆上清液 10 μ l,加入 96 孔板中,混匀后于 37℃ 水浴 10 min,再加缓冲液、无水乙醇各 100 μ l,混匀后于 4℃、3 500 r/min 离心 10 min,取上清做显色反应。取 20 μ mol/L 谷胱甘肽标准品/上清液 100 μ l、缓冲液 100 μ l、显色剂 25 μ l,加入 96 孔板中混匀,室温放置 15 min,用酶标仪读取各孔 *D* 值,测量波长为 412 nm。

1.8 XOD 的测定 按试剂盒要求配置各试剂。取匀浆上清液 5 μ l、缓冲液 127 μ l,于 96 孔板中混匀后 37℃ 水浴 30 min,加入显色剂 100 μ l,混匀后用酶标仪读取各孔 *D* 值,测量波长为 530 nm。

1.9 SOD 的测定 按试剂盒要求配置各试剂。取组织匀浆上清液 5 μ l、缓冲液 130 μ l,加入 96 孔板中混匀,于 37℃ 水浴 40 min,加入显色剂 200 μ l,混匀后于室温放置 10 min,用酶标仪读取各孔 *D* 值,测量波长为 550 nm。本实验中样品需要稀释,稀释后浓度为 0.67%。

1.10 肝组织 Leptin 水平的放射免疫法分析 组织匀浆上清液样品测量标准点为 1.1、3.3、11、33、100、300 μ g/L,测量时加样 100 μ l,标准品及样品同 Leptin 抗体 100 μ l 及 ¹²⁵I-Leptin 100 μ l(计数约为 20 000 cpm)充分混匀后,于 4℃ 放置 24 h。再加免疫分离剂 500 μ l,混匀后室温反应 15 min,再按 4℃、2 830 r/min 离心 20 min,弃上清,测量沉淀的计数值并绘制标准曲线。

1.11 统计学处理 采用 Stata 7.0 统计分析软件处理。对于正态分布、样本之间方差齐的数据,采用参数统计分析(*t* 检验或单因素方差分析);不符合正态分布、样本之间方差不齐的数据,则采用非参数统计(秩和检验)。检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异显著标准。

2 结果

2.1 脓毒症后血清 ALT 的变化及 Leptin 对其的

影响 与假手术组相比,脓毒症后 12 h 血清 ALT 明显上升($P < 0.05$),6 h 时无显著改变。采用腹腔内注射 Leptin(0.1 mg/kg)在 12 h 时可见 ALT 显

著低于脓毒症组水平($P < 0.05$),消炎痛(2 mg/kg)保护在 6 h 和 12 h 时均未见 ALT 显著变化,如表 1 所示。

表 1 脓毒症后各组血清各检测指标及肝脏 Leptin 水平的改变

Tab 1 Changes of serum markers and hepatic leptin levels in all groups after sepsis

Marker	Time after sepsis	Sham group	Sepsis group	Leptin-protection group	Indomethacin-protection group
ALT(U/L)	6 h(n=10)	66.23±16.80	52.30±22.14	59.02±29.58	44.30±21.36
	12 h(n=11)	62.57±18.43	83.55±40.44*	61.05±20.92*▲	64.48±17.32
MPO(U/g)	6 h(n=10)	7.31±3.41	10.3±3.73■	8.95±2.84■	8.66±2.86
	12 h(n=11)	7.30±3.43	5.32±1.95	5.61±1.59	6.80±3.68
GST(U/mg)	6 h(n=10)	49.77±10.4	41.36±5.71	30.24±8.71▲▲	63.24±4.51▲▲
	12 h(n=11)	49.86±12.3	49.62±13.4	26.45±2.47▲▲	33.01±3.09▲▲
XOD(U/g)	6 h(n=10)	0.93±0.17	1.04±0.07	1.03±0.11	1.09±0.14
	12 h(n=11)	0.92±0.19	0.89±0.12	1.21±0.09*▲	1.19±0.18*▲
SOD(U/mg)	6 h(n=10)	11.18±0.59	14.46±0.54*	12.46±1.23▲	13.62±1.13
	12 h(n=11)	11.18±0.52	13.41±1.32*	11.30±0.71▲	10.14±0.39▲
Leptin(ng/mg)	6 h(n=10)	66.49±23.5	50.13±8.46	60.05±19.8	59.86±15.9
	12 h(n=11)	65.48±23.2	49.35±22.7	37.85±17.8	75.62±35.4△

* $P < 0.05$ vs sham group; ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ vs sepsis group; △ $P < 0.05$ vs Leptin-protection group; ■ $P < 0.05$ vs 12 h

2.2 脓毒症后肝 MPO 的变化及 Leptin 对其的影响 脓毒症后 6 h 肝脏内 MPO 活性有一定程度的提高,但没有统计学意义;但脓毒症后 12 h,肝 MPO 水平却有一定下降,显著低于 6 h($P < 0.05$)。Leptin 和消炎痛保护并没有明显影响肝脏 MPO 的活性,如表 1 所示。

2.3 脓毒症后肝 GST 的变化及 Leptin 对其的影响 脓毒症后 6 h,肝脏 GST 没有显著改变,但 Leptin 能显著降低肝脏 GST 水平($P < 0.01$)。相反,消炎痛显著提高 GST 水平。脓毒症后 12 h,肝 GST 仍无显著改变,但 Leptin 仍然显著降低组织中 GST 水平,此时消炎痛也转而降低 GST 活性。该结果提示:脓毒症发生后,Leptin 保护组在一定时间内 GST 水平保持降低,而消炎痛保护组则是先升后降的变化,如表 1 所示。

2.4 脓毒症后肝 XOD 的变化及 Leptin 对其的影响 脓毒症后 6 h,肝组织 XOD 活性并没有显著的改变,Leptin 和消炎痛保护也对其没有显著的影响。但 12 h 后肝经 Leptin 和消炎痛保护后,XOD 活性又有显著上升($P < 0.05$),提示 Leptin 和消炎痛对 XOD 活性有较强的影响,如表 1 所示。

2.5 脓毒症后肝 SOD 的变化及 Leptin 对其的影响 脓毒症后 6 h,肝组织 SOD 活性显著增强($P < 0.05$),Leptin 保护后 SOD 活性又有显著下降($P < 0.05$),消炎痛保护后有下降趋势,但无显著性。脓毒症发生 12 h 后,肝组织 SOD 活性仍然显著高于对照,但 Leptin 和消炎痛保护后 SOD 活性可有显

著的下降,提示 Leptin 和消炎痛的保护作用可能与下调 SOD 活性有关,如表 1 所示。

2.6 脓毒症后肝组织 Leptin 水平的变化 脓毒症后 6 h,肝组织中 Leptin 水平有下降趋势,但无显著性。Leptin 和消炎痛保护后,未见肝组织有 Leptin 的显著上升,但 12 h 后 Leptin 保护组肝内 Leptin 水平却表现为下降,而消炎痛保护组提高 Leptin 水平,两者之间有显著差异($P < 0.05$),说明消炎痛直接抗炎恢复 Leptin 的效果比外源性 Leptin 保护的效果要好,如表 1 所示。

2.7 脓毒症后肝组织切片病理染色的变化 脓毒症后 6 h 肝细胞即肿大,肝细胞索和肝实质间隙缩小;12 h 后肝细胞损害加重,经 Leptin 和消炎痛保护后,相应时间点细胞肿胀有所缓解,如图 1 所示。

3 讨论

关于 Leptin 同炎症、感染的关系,近来有很多报道,有的发现 Leptin 缺乏小鼠(ob/ob)对革兰阴性杆菌抵抗力明显下降而增强内毒素的敏感性和致死率^[5]。直接按 10~50 μg/kg 注射 Leptin(i. p. tid)持续 1、3、5、10、21 d,可显著减轻胰腺炎的发生和病损^[6]。将内毒素注射于猴和绝经妇女,Leptin 水平在最初 5 h 内并无增加,但在 24 h 后却显著增加^[7]。这项研究结果非常吻合我们最近的发现,即大鼠肠缺血/再灌注损伤后早期(30 min)血清 Leptin 水平比实验前有显著下降,随时间的延长而逐步增加^[8]。

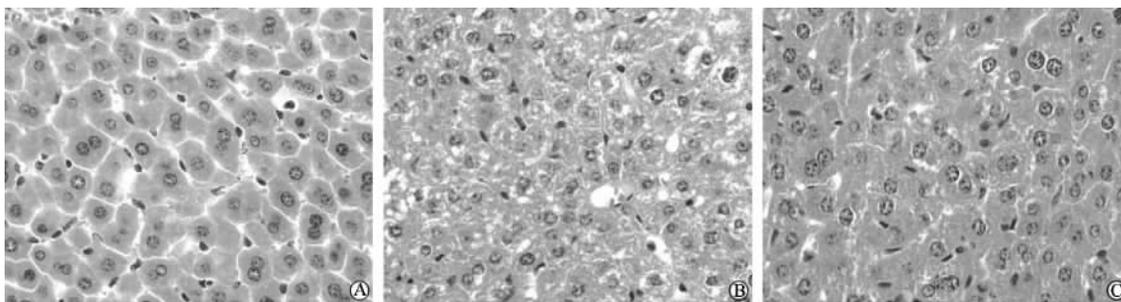


图 1 12 h 时 Leptin 对脓毒症肝脏损伤的保护效应

Tab 1 Protective effect of leptin on hepatic injury after sepsis (H-E, ×200)

A: Sham group; B: Sepsis group; C: Leptin group

同 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症细胞因子有所不同, Leptin 在早期对 LPS 的诱导是下调趋势, 推测可能是 Leptin 作为一种消耗性应激蛋白, 或者 Leptin 合成一过性抑制所致。我们的最新结果证明内毒素抑制 ECV-304 细胞释放 Leptin, 而血小板活化因子和 Ca^{2+} 载体 A_{23187} 却没有这种作用, 进一步又发现磷脂酶 A_2 抑制剂能逆转内毒素对 Leptin 释放的抑制效应(未发表资料)。结果证明, 早期体内外内毒素对 Leptin 的抑制可能是炎症发展过程中的重要现象。

因此, 我们在整体动物的脓毒症模型上进一步开展了 Leptin 对肝功能影响的观察。最主要的发现是对小鼠注射微量 Leptin (80 μ g/kg) 即可对肝功能 ALT 有明显的保护作用, 其效果相似于消炎痛 (2 mg/kg) 的作用, 后者是一种经典的环氧化酶抑制剂, 主要作用是对抗内毒素诱导的发热致炎效应。消炎痛通过其他复杂因素间接引发 Leptin 消耗降低、表达增高, 而 Leptin 保护组肝脏 Leptin 水平低可能由于组织间差异导致。肝脏是重要的解毒器官, 12 h 时受脓毒症毒性影响大, 可能是导致 Leptin 表达下降的主要原因, 同我室其他实验证明的内皮细胞在 LPS 作用下表达 Leptin 受显著抑制一致。

我们发现 Leptin 对脓毒症肝功能具有保护效应。为进一步探讨可能的机制, 我们选择了 MPO、GST、SOD 和 XOD 等肝细胞表达多、活性高的酶来作观察对象。同时, MPO 又代表中性粒细胞在脏器中的数量和活性状态, 而 GST 和 SOD 则能反映脏器组织氧自由基和巯基代谢状态, XOD 则同嘌呤代谢相关。我们的结果证实脓毒症 6 ~ 12 h 肝内 Leptin 有下降趋势, 增加腹腔给药后能在一定程度上恢复肝内 Leptin 水平。这种改变对肝 MPO 影响不大, 但可降低 GST 和 SOD 活性, 增加 XOD 活性。这种变化的原因尚待进一步分析和研究, 但仍不明确这种酶活性变化是肝功能改善 (ALT 下降) 的原因抑或是结果。

总的看, Leptin 可能通过受体介导 JAK/STAT -3 途径增加能量代谢反应, 促进细胞蛋白、核酸合成, 增加细胞抗损伤和促修复能力等过程来维持机体内环境的稳定, 从而改善细胞功能^[9,10]。

[参考文献]

- [1] Lin J, Yan GT, Hao XH, et al. Effect of intestinal ischemia-reperfusion injury on protein levels of leptin and orexin-A in peripheral blood and central secretory tissues[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11:1000-1004.
- [2] Cakir B, Cevik H, Contuk G, et al. Leptin ameliorates burn-induced multiple organ damage and modulates postburn immune response in rats[J]. *Regul Pept*, 2005, 125:135-144.
- [3] Hobson KG, Havel PJ, McMurtry AL, et al. Circulating leptin and cortisol after burn injury: loss of diurnal pattern[J]. *J Burn Care Rehabil*, 2004, 25:491-499.
- [4] 陈立军, 尉承泽, 宋旭华, 等. 抗内毒素单抗下调脓毒症小鼠肠上皮细胞白细胞介素-1 转换酶基因表达及逆转肠上皮细胞凋亡的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20:132-133.
- [5] Mendoza-Nunez VM, Garcia-Sanchez A, Sanchez-Rodriguez M, et al. Overweight, waist circumference, age, gender, and insulin resistance as risk factors for hyperleptinemia[J]. *Obes Res*, 2002, 10:253-259.
- [6] Ceranowicz P, Warzecha Z, Dembinski A, et al. Protective and therapeutic effect of leptin in acute pancreatitis evoked by ischemia/reperfusion[J]. *Folia Med Cracov*, 2003, 44:93-108.
- [7] Landman RE, Puder JJ, Xiao E, et al. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88:1285-1291.
- [8] 林季, 颜光涛, 王录焕, 等. 肠缺血-再灌注损伤对 Leptin 蛋白质及 mRNA 水平的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 651-655.
- [9] Zabeau L, Defeau D, Vander HJ, et al. Functional analysis of leptin receptor activation using a Janus kinase/signal transducer and activator of transcription complementation assay[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18:150-161.
- [10] Erkasap S, Erkasap N, Koken T, et al. Effect of leptin on renal ischemia-reperfusion damage in rats[J]. *J Physiol Biochem*, 2004, 60:79-84.

[收稿日期] 2005-11-15

[修回日期] 2006-02-28

[本文编辑] 曹静