

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.15.001

• 基础研究 •

PH797804 对小鼠急性肝衰竭的保护作用及机制研究*

陈 炯¹ 于合国² 徐 凌¹ 贾蓉蓉¹ 王玉刚¹ 施 敏^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院附属同仁医院消化内科 上海 200050;

2 复旦大学生殖与发育研究院 上海市计划生育科学研究所 国家卫生健康委员会计划生育药具重点实验室 上海 200032)

摘要 目的: 研究 PH797804 对脂多糖 /D- 氨基半乳糖氨 (Lipopolysaccharide/D-galactosamine, LPS/D-Gal) 诱导的急性肝衰竭 (Acute liver failure, ALF) 小鼠的保护作用及机制。**方法:** 将 64 只小鼠随机分成四组, 每组 16 只。腹腔注射 LPS/D-Gal 诱导建立小鼠 ALF 模型, 设立生理盐水对照组(a)、LPS/D-Gal 诱导模型组(b)、LPS/D-Gal 诱导和 PH797804 干预组(c)及 PH797804 处理对照组(d)。观察小鼠 48 h 内的存活率, 检测血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的含量, HE 染色组织切片观察肝脏病理变化, Elisa 检测血清中 TNF- α 和 IL-6 的表达水平, 并对各组小鼠肝组织进行高通量转录组测序以探寻作用机制, 采用 Real-time PCR 法验证测序结果。**结果:** 相比于 ALF 模型组小鼠, PH797804 处理后 c 组小鼠 48 h 存活率从 20 % 提高至 80 %, 小鼠肝脏组织病理学异常显著改善, 血清中 ALT、AST 含量较 ALF 模型组相比显著降低 ($P < 0.01$), 血清中 TNF- α 和 IL-6 等促炎细胞因子含量较 ALF 模型组相比显著降低 ($P < 0.01$)。RNA 测序结果提示 PH797804 对 LPS/D-Gal 诱导小鼠 ALF 的保护作用主要与抑制炎症反应相关。Real-time PCR 验证了测序结果的可靠性。**结论:** PH797804 对 LPS/D-Gal 诱导的小鼠 ALF 具有保护作用, 其作用机制可能与抑制炎症反应有关。

关键词: PH797804; 急性肝衰竭; 细胞因子; 炎症

中图分类号: R-33; R575.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)15-2801-07

Protective Effect and Mechanism of PH797804 on Acute Liver Failure in Mice*

CHEN Jiong¹, YU He-guo², XU Ling¹, JIA Rong-rong¹, WANG Yu-gang¹, SHI Min^{1Δ}

(1 Department of Gastroenterology, Shanghai Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200050, China; 2 Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai, 200032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect and mechanism of PH797804 on Lipopolysaccharide/D-galactosamine (LPS/D-Gal) induced acute liver failure (ALF) in mice. **Methods:** Sixty-four mice were randomly divided into four groups, 16 in each group. ALF model of mice induced by intraperitoneal injection of LPS/D-Gal, the four groups were normal saline control group (a), LPS/D-Gal induction model group (b), LPS/D-Gal induction and PH797804 pretreatment group (c), PH797804 control group (d). The survival rate of mice was observed within 48 hours, and the contents of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were detected, the hepatic pathological changes were observed by HE staining tissue sections, and the expression levels of TNF- α and IL-6 were detected by Elisa. The high-throughput transcriptome sequencing was performed on the liver tissue of each group to explore the mechanism of action, and the sequencing results were verified by Real-time qPCR. **Results:** Compared with the ALF model group, the 48-hour survival rate of mice in group c after PH797804 treatment increased from 20% to 80%, the liver histopathological abnormalities of mice were significantly improved, the content of ALT and AST in serum were obviously lower than that in ALF model group ($P < 0.01$). And the content of proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 in serum were significantly lower than that in ALF model group ($P < 0.01$). In addition, RNA sequencing results suggested that the protective effect of PH797804 on LPS / D-Gal-induced ALF in mice is mainly related to inhibiting the inflammatory response. Real-time PCR verified the reliability of the sequencing results. **Conclusions:** PH797804 has protective effect on LPS / D-Gal-induced ALF in mice, and its mechanism may be related to inhibiting inflammatory response.

Key words: PH797804; Acute liver failure; Cytokine; Inflammation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)15-2801-07

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81871912; 81970530); 上海市医学重点专科(ZK2019C012)

作者简介: 陈炯(1992-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 肝纤维化与急性肝衰竭, E-mail: bazinga_2333@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者: 施敏(1973-), 男, 硕士生导师, 主任医师, 主要研究方向: 肝纤维化基础与临床研究,

E-mail: SM1790@shtrhospital.com, 电话: 18121226606

(收稿日期: 2020-02-28 接受日期: 2020-03-24)

前言

急性肝衰竭(Acute liver failure, ALF)进展速度快,病程多变,是一种危及生命的疾病,ALF可导致肝细胞严重损伤和大量坏死,引起严重的肝功能障碍并导致多器官功能衰竭甚至死亡^[1]。目前尚未找到对ALF患者有效的治疗手段,尽管对于对乙酰氨基酚中毒、病毒性肝炎等特定原因引起的急性肝功能衰竭可以选择肝移植治疗,但其使用仍受到供体短缺和终身免疫抑制要求等原因的限制^[2-4]。因此,探索并寻找阻断ALF患者病情急速进展的新策略显得尤为重要。

目前越来越多的证据表明炎症是ALF的临床过程和结局的关键^[5-7]。ALF发病进展的病理基础的核心是肝脏炎症。一方面,大量的肝细胞死亡引发免疫细胞激活以及向肝脏募集,从而引起免疫介导的肝脏损伤;另一方面,炎症因子的激活和全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory responses syndrome, SIRS)会导致不良的抗菌反应,促进多器官功能衰竭^[8]。虽然ALF的诱发事件是肝细胞死亡,但由免疫介导肝损伤引起的SIRS及其伴随的多器官功能衰竭和复发性感染最终会导致患者死亡^[7]。无论何种病因,全身促炎免疫和抗炎免疫之间的平衡改变会导致ALF患者的器官衰竭和死亡。

P38 丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族广泛表达于多种细胞类型。P38 MAPK 家族目前已知包含 α 、 β 、 γ 和 δ 四种亚型,其中 α 亚型在促炎反应中发挥核心作用^[9]。PH797804是一种高选择性的P38 MAPK抑制剂(见图1-A)^[9-10],基础研究证明PH797804可阻断核因子 κ B受体活化因子配体(Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(Macrophage colony stimulating factor, M-CSF)诱导的原代大鼠骨髓细胞中的破骨细胞形成;口服PH797804可降低LPS诱导的Lewis大鼠和食蟹猴休克时的TNF- α 水平;在链球菌细胞壁提取物诱导的大鼠关节炎模型和胶原诱导的小鼠关节炎模型中,证实PH797804能抑制慢性炎症^[11]。PH797804已在人体I期研究中达到安全标准,并已广泛应用于治疗慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD),和类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)等炎症性疾病的临床试验中^[12,13]。吸入LPS可引起健康受试者中性粒细胞性气道炎症,研究证实跟安慰剂组和丙酸氟替卡松组相比,PH797804组能显著降低LPS刺激后的痰中性粒细胞百分比以及痰上清液和血浆中炎症介质(IL-6、MAP-1、MIP1 β 和CC16)的含量^[14]。另一项随机双盲多中心II期临床试验证实口服PH797804可使中、重度COPD患者肺功能参数和呼吸困难的改善优于安慰剂组^[15]。与抗逆转录病毒疗法联合使用时,PH797804可显著降低猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus, SIV)诱导的免疫激活,并保护免疫系统^[16]。这一系列试验证明了其具有良好的抗炎疗效和安全性。基于ALF是一种急速进展的炎症性疾病,因此抑制炎症反应可能是治疗和预防ALF的潜在机制。本研究拟以LPS/D-Gal诱导小鼠ALF模型,观察给予PH797804对ALF模型疾病进展的影响,阐明PH797804对实验性小鼠ALF的保护作用及可能机制,为临床防治ALF提供理论依据及新思路。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

PH797804购自美国Selleck公司,纯度:99.07%;RAW 264.7细胞购自中国科学院上海细胞库,LPS、DMEM高糖培养基、青霉素购于美国sigma公司;胎牛血清购自美国Hyclone公司;CCK-8(Cell Counting kit-8)试剂盒购自日本Dojindo化学研究所;D-Gal购自上海阿拉丁生化科技公司;苏木素-伊红染色试剂盒购自上海威奥生物科技有限公司;TNF- α Elisa试剂盒购自美国R&D Systems公司,IL-6 Elisa试剂盒购自上海爱必信生物科技有限公司;ReverTra Ace qPCR RT Kit购自日本Toyobo公司,SYBR@ Green Real-Time PCR Master Mix购自吉泰依科赛生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及细胞分组处理 选用小鼠巨噬细胞系RAW 264.7,接种于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中常规培养,培养条件为37℃、5%CO₂。当细胞密度长至70%-80%左右传代换液。将传好代的RAW 264.7细胞与不同浓度的PH797804和/或LPS共同培养,共分为八组:正常对照组、LPS对照组以及六种不同浓度的PH797804和LPS共同培养组。其中PH797804浓度分别为:0.15 μ mol/L, 0.3 μ mol/L, 0.6 μ mol/L, 1.25 μ mol/L, 2.5 μ mol/L, 5 μ mol/L;LPS的终浓度为500 ng/mL。共同培养6 h后收取细胞培养上清保存于-80℃,待测。

1.2.2 细胞活力分析 采用CCK-8法检测细胞活力,以5 $\times$ 10³个细胞每孔的密度将细胞接种于96孔板中,在培养箱中预培养24 h,分别向每孔中加入不同浓度的PH797804和/或LPS(500 ng/mL)共同培养24 h,具体分组为:正常对照组、LPS对照组、不同浓度的PH797804单独处理组以及不同浓度的PH797804和LPS共同培养组,共十四组。其中PH797804浓度分别为:0.15 μ mol/L, 0.3 μ mol/L, 0.6 μ mol/L, 1.25 μ mol/L, 2.5 μ mol/L, 5 μ mol/L。LPS的终浓度为500 ng/mL。每组设6个重复孔。向每孔中加入10 μ L的CCK-8溶液,将培养板继续置于培养箱中孵育1-4 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

1.2.3 动物和急性肝衰竭模型的建立及药物干预 64只雌性ICR小鼠,6-8周龄,SPF级,体重20-22 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,饲喂于清洁级动物房(标准动物饲料及饮水,环境温度20-25℃,12/12 h的昼夜明暗交替时间)。所有动物实验均遵守上海市计划生育科学研究所动物伦理委员会相关规定。ICR小鼠随机分成4组,每组16只。分别为:生理盐水对照组(a)、LPS/D-Gal诱导模型组(b)、LPS/D-Gal诱导和PH797804干预组(c)及PH797804处理对照组(d)。a组:腹腔注射0.2 mL生理盐水,1 h后腹腔注射同等体积生理盐水;b组:腹腔注射0.2 mL生理盐水,1 h后腹腔注射溶解有LPS(250 μ g/kg)/D-Gal(450 mg/kg)的生理盐水0.2 mL;c组:腹腔注射溶解有PH797804(5 mg/kg)的生理盐水0.2 mL,1 h后注射b组同等剂量的LPS/D-Gal;d组:腹腔注射PH797804(剂量同c组),1 h后腹腔注射0.2 mL生理盐水。8 h后,每组各处死6只小鼠取材,一部分肝脏在液氮中快速冷冻,并保存于-80℃以备后续分析。另一部分肝脏用4%多聚甲醛固定、石蜡包埋。每组各剩余10只小鼠继续饲养,用以观察及统计各组小鼠

48 h 存活率。

1.2.4 血生化水平检测 给药 8 h 后断头取血法收集各组小鼠血液, 4℃静置过夜, 10000×g 离心 15 分钟, 取上层血清, 使用日本日立 7180 全自动生化分析仪检测小鼠血清 ALT 和 AST 水平。

1.2.5 细胞因子含量测定 Elisa 法检测细胞培养上清和小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 的含量, 操作步骤按照说明书进行, 经过包被、洗涤、封闭、加样品 / 标准品、检测抗体、显色和终止这一系列反应后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度, 并依据标准品吸光度值和浓度绘制标准曲线, 计算各样本待测细胞因子浓度。

1.2.6 肝组织切片的形态学观察 将小鼠肝组织室温固定于 4%多聚甲醛中 48 h, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋后, 制成厚度为 5 μm 的切片, 切片按照说明书进行苏木精-伊红(Hematoxylin & Eosin, HE)染色, 于光学显微镜下观察肝组织切片的形态变化。

1.2.7 RNA 测序和生物信息学分析 分别从 a、b、c 组三组小

鼠肝组织中提取总 RNA, 利用带有 Oligo(dT) 的磁珠与 poly A 进行 A-T 碱基配对, 从总 RNA 中分离出 mRNA, 用于分析转录组信息, 测序实验采用 Illumina Truseq™ RNA sample prep Kit 方法进行文库构建。所有实验均在上海美吉生物技术有限公司 Illumina 测序平台进行。使用 RSEM 软件对基因的表达水平进行定量分析, 应用 DESeq2 软件, 将 a 组和 b 组以及 b 组和 c 组转录组测序结果进行比较, 筛选出 P-adjust 小于 0.05, 差异倍数(Fold change, FC)大于或等于 2 (P-adjust <0.05 & |log2FC| ≥ 1) 的基因。筛选出差异表达基因后, 利用 David 6.8 生物信息学平台对差异基因进行功能分类和信号通路富集。

1.2.8 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 提取肝组织 RNA, 使用 Nanodrop2000c 测定所提取 RNA 浓度和纯度。OD260/OD280 比值在 1.8 至 2.0 之间的 RNA 纯度高。用 Re-vertTra Ace PCR RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 并用 SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增和荧光定量。以 GAPDH 作为内参, 运用 2^{-ΔΔCT} 法分析实验结果。所有引物均由金唯智公司合成, 其序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primers used for Real-time PCR

Gene	Forward	Reverse
TNF-α	5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'	5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTAG-3'
IL-1β	5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3'	5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'
CCL4	5'-TTCCTGCTGTTCTCTTACACCT-3'	5'-CTGTCTGCCTCTTTTGGTCAG-3'
CCL5	5'-GTGCCCACGTCAAGGAGTAT-3'	5'-GGGAAGCTATACAGGGTCA-3'
GAPDH	5'-TCCAAGGAGTAAGAAACCCTGGAC-3'	5'-GTTATTATGGGGGTCTGGGATGG-3'

1.3 统计学处理

应用 SPSS 26.0 行统计学分析, 组间比较采用独立样本 t 检验。P<0.05 表示差异有统计学意义, P<0.01 表示差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 PH797804 对 RAW264.7 细胞活力的影响

采用 CCK8 法测定单独添加 PH797804 以及 PH797804 和 LPS 共同培养对 RAW 264.7 细胞活力的影响, 结果如图 1-B 所示。与正常对照组相比, 在存在或不存在 LPS 的情况下, PH797804 作用浓度在 0.15-5 μM 范围时, RAW 264.7 细胞活力均有明显增加的趋势, 说明 PH797804 对 RAW 264.7 细胞无毒性, 且对其增殖活力无明显影响, 因此, 确定 0.15-5 μM 作为后续研究的工作浓度。

2.2 PH797804 抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞促炎细胞因子的产生

如图 1-C 和 D 所示, 跟正常对照组相比, 单纯施用 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞可使细胞培养上清液中 TNF-α 和 IL-6 的含量显著升高 (P<0.01); 而 PH797804 处理 6 h 后可显著降低 TNF-α 和 IL-6 的产生, 并且在 0.15-5 μM 范围内, 浓度越高, 抑制作用越强。

2.3 PH797804 预处理可显著改善 LPS/D-Gal 诱导的急性肝衰

竭小鼠的肝脏损伤

如图 2-A 所示, d 组的 48 h 存活率与 a 组均为 100%, 而在给予 LPS/D-Gal 诱导小鼠 ALF 后, b 组小鼠 48h 存活率降低至 20% (2/10); 而 PH797804 预处理后, 小鼠存活率可提高至 80% (8/10)。证明 PH797804 预处理可显著提高 ALF 小鼠存活率。

肝组织切片 HE 染色结果显示 a 组和 d 组小鼠肝细胞形态正常, 排列规则, 肝小叶结构完整。相反, b 组小鼠肝脏组织出现明显的病理改变: 肝细胞呈大片状出血性坏死, 小叶结构破坏及大量的炎性细胞浸润。PH797804 干预后, 这些病理改变均得到了明显改善 (图 2-B)。在给予 LPS/D-Gal 刺激 8 h 后, 我们分别检测了四组小鼠血清 ALT 和 AST 水平。如图 2-C 所示, b 组小鼠的血清 ALT 和 AST 水平明显高于 a 组 (P<0.01), 而 c 组小鼠的血清 ALT 和 AST 水平较 b 组相比明显降低 (P<0.01), 此外, 肝酶水平在 a 组和 d 组间没有显著差异。与体外结果一致, PH797804 预处理还能显著降低 c 组小鼠血清中由于 LPS/D-Gal 刺激引起上调的 TNF-α 和 IL-6 的浓度 (P<0.01), 见图 2-D。综上所述, PH797804 预处理可提高 LPS/D-Gal 诱导的 ALF 小鼠的存活率, 改善小鼠的肝脏病理损伤, 降低血清肝酶和促炎细胞因子水平, 发挥肝脏保护作用。

2.4 生物信息学揭示 PH797804 调控的基因功能和信号通路

分析转录组测序结果, b 组的聚类模式较 a 组差异明显, 而 a 组和 c 组基因表达的聚类模式相似, 这说明 LPS/D-Gal 暴露

后可引起大量的基因表达改变,而 PH797804 处理可改善这种变化,使其接近于生理盐水对照组水平。如图 3-A 和 3-B 所示,与 a 组相比,b 组显著上调了 3201 个基因,显著下调了 2459 个基因;c 组和 b 组相比,c 组显著上调了 215 个基因,显著下调了 595 个基因。在这之中我们重点关注的目标基因为:

与正常对照组相比,ALF 模型组 LPS/D-Gal 暴露后显著诱导上调,而 PH797804 预处理后显著下调的基因。依据条件 ($P\text{-adjust} < 0.05$ & $|\log_2\text{FC}| \geq 1$) 共筛选出 548 个差异基因(见图 3-C)。提示这 548 个基因可能参与了 PH797804 改善 ALF 小鼠肝损伤的过程。

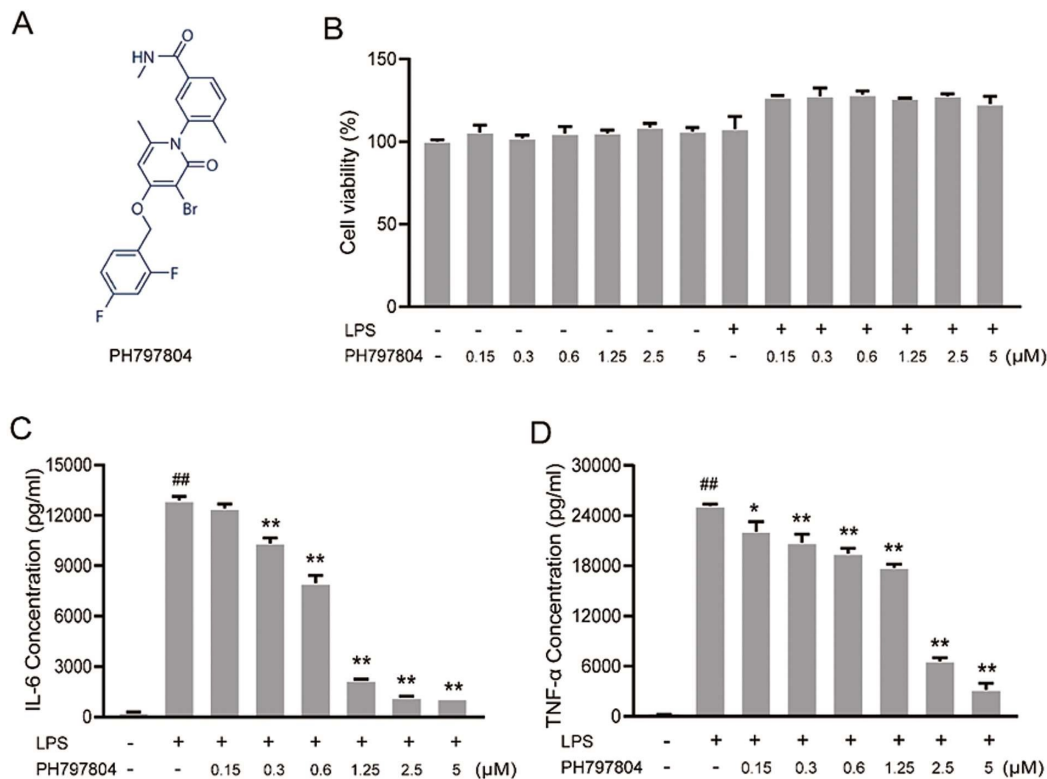


图 1 PH797804 抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞促炎因子的产生

Fig.1 PH797804 inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells

注:A:PH797804 的化学结构;B:PH797804 对 RAW264.7 细胞活力的影响;C:PH797804 对 LPS 诱导 RAW264.7 分泌 TNF-α 的影响;

D:PH797804 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响;"+" 代表 LPS 终浓度 500 ng/mL;"-" 代表不添加 PH797804 或 LPS;

与正常对照组(LPS-/PH797804-)相比,^{##} $P < 0.01$;与 LPS 组(LPS+/PH797804-)相比,^{*} $P < 0.05$;^{**} $P < 0.01$ 。

Note: A: The chemical structure of PH797804; B: The effect of PH797804 on the viability of RAW264.7 cells;

C: The effect of PH797804 on LPS-induced RAW264.7 secretion of TNF-α; D: The effect of PH797804 on LPS-induced RAW264.7 secretion of TNF-α;

"+": LPS 500 ng/mL; "-": Without adding LPS or PH797804; Compared with NC group (LPS-/PH797804-), ^{##} $P < 0.01$;

Compared with LPS group (LPS+/PH797804-), ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$.

我们将这些差异基因进行 GO(Gene Ontology)功能聚类 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway 富集分析,如图 4A 所示,GO 功能聚类结果表明:548 个差异基因主要富集于炎症、趋化、细胞粘附等生物学过程中;KEGG pathway 富集分析结果表明(图 4-B):差异基因主要与白细胞 经内皮细胞迁移、细胞因子受体间相互作用以及 FcγR- 介导的 吞噬作用等信号通路有关。这为我们进一步探索 PH797804 发挥 肝脏保护作用的机制提供了思路 and 方向。

2.5 Real-time PCR 验证测序结果

为了验证 RNA-seq 的结果,将富集在炎症、趋化等生物学 过程中表达差异显著的基因(CCL4, CCL5, TNF-α, IL-1β)进行 Real-time PCR 分析。结果显示:如图 5 所示,d 组 CCL4, CCL5, TNF-α 以及 IL-1β 的表达水平与 a 组无明显差异;b 组较 a 组 相比 CCL4, CCL5, TNF-α 和 IL-1β 表达均明显上调 ($P < 0.01$);而 PH797804 预处理可显著下调上述因子($P < 0.01$),综

上所述,Real-time PCR 结果与转录组测序结果一致,提示我们 可以依据转录组测序结果进一步筛选 PH797804 可能作用的 靶点。

3 讨论

LPS 诱导巨噬细胞产生促炎细胞因子是被广泛认可的能 够模拟炎症条件的细胞模型。LPS 能够刺激巨噬细胞活化,触 发炎症级联反应,导致释放各种炎症介质和细胞因子,炎症介 质和细胞因子的表达水平与炎症反应的严重程度成正比^[17]。 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞模型通常用来评价药物的体外抗炎 作用和机制^[18-21]。前期我们利用该细胞炎症模型从一个临床前 / 临床药物库中筛选到小分子化合物 -PH797804。PH797804 是 一种高选择性的 P38α 激酶抑制剂,PH797804 的效力、选择性、 生化效率、体内功效和药代动力学等特征均证明 PH797804 是 一种具有潜在抗炎作用的临床候选药物,其安全性较好,不良

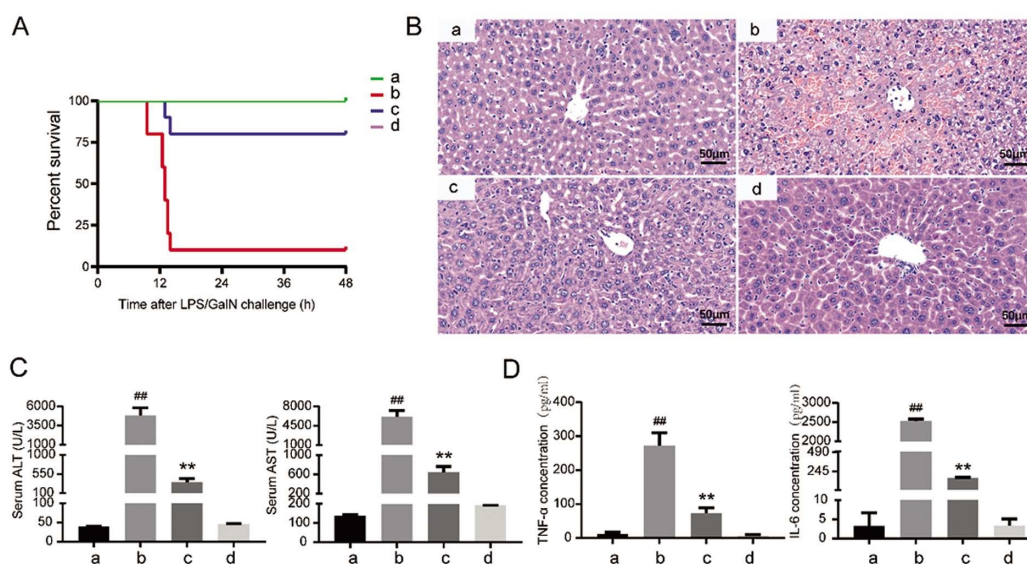


图 2 PH797804 处理可显著改善 LPS/D-Gal 诱导的急性肝衰竭小鼠的肝脏损伤

Fig.2 Treatment with PH797804 significantly improved liver damage in LPS/D-Gal-induced ALF mice

注:A:各组小鼠 48 小时存活率;B:病理检测各组小鼠肝脏损伤情况;C:生化学检测各组小鼠血清肝酶的表达式;D:酶联免疫法检测各组小鼠血清中促炎因子的表达式;a:生理盐水对照组;b:LPS/D-Gal 诱导模型组;c:LPS/D-Gal 诱导和 PH797804 干预组;d:PH797804 处理对照组。与生理盐水对照组(a)相比,### $P < 0.01$;与 LPS/D-Gal 诱导模型组(b)相比,** $P < 0.01$ 。

Note: A: The 48 h survival rate of mice in each group; B: Pathological examination of liver damage in mice of each group; C: Biochemical detection of serum liver enzyme expression in each group of mice; D: The expression of serum pro-inflammatory cytokines in each group of mice; a: Normal saline control group, b: LPS/D-Gal induction model group, c: LPS/D-Gal induction and PH797804 treatment group, d: PH797804 control group. Compared with the group a, ### $P < 0.01$; Compared with the group b, ** $P < 0.01$.

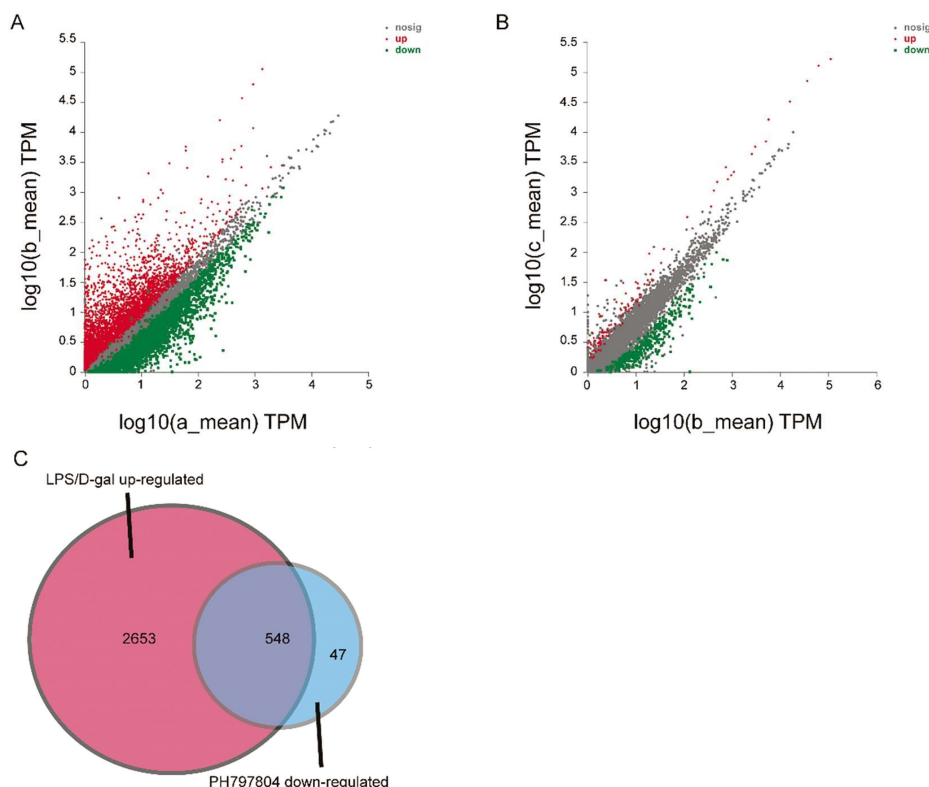


图 3 RNA 测序筛选 PH797804 调控基因

Fig.3 RNA sequencing identified the regulatory gene of PH797804

注:A:a 组和 b 组表达量差异散点图;B:b 组和 c 组表达量差异散点图;C:PH797804 抑制因 LPS/D-Gal 诱导上调的基因数目;a:生理盐水对照组;b:LPS/D-Gal 诱导模型组;c:LPS/D-Gal 诱导和 PH797804 干预组。

Note: A: The scatter plot of expression differences between groups a and b; B: The scatter plot of expression differences between groups b and c; C: PH797804 inhibits the number of genes up-regulated by LPS/D-Gal; a: Normal saline control group, b: LPS/D-Gal induction model group, c: LPS/D-Gal induction and PH797804 treatment group, d: PH797804 control group.

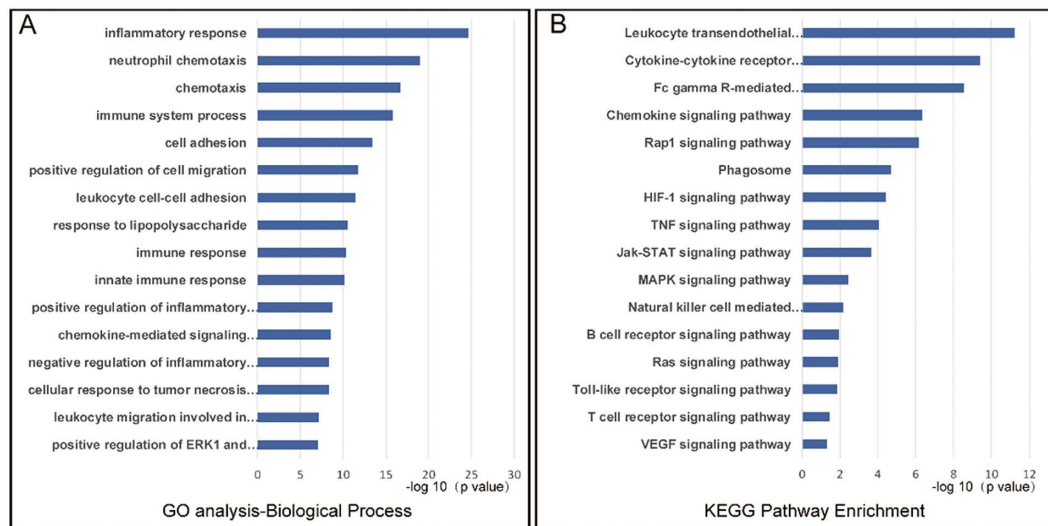


图 4 生物信息学揭示 PH797804 调控的基因功能和信号通路

Fig.4 Bioinformatics reveals gene function and signaling pathway regulated by PH797804

注:A:目标基因的 GO 功能分类;B:目标基因的 KEGG 富集分析。

Note: A: GO analysis of differential expressed genes; B: KEGG pathways analysis of differential expressed genes.

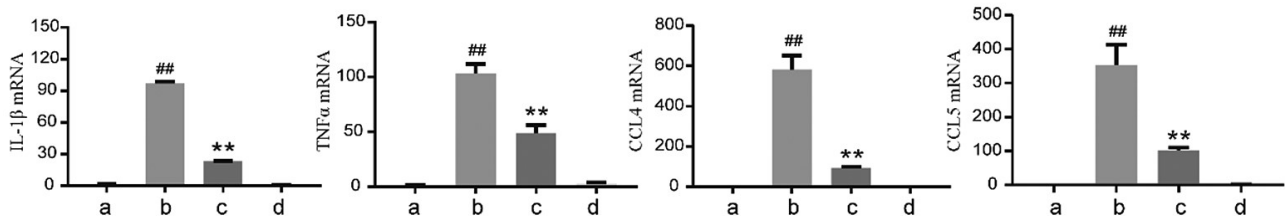


图 5 Real-time PCR 验证测序结果

Fig.5 Real-time PCR validates sequencing results

注:a:生理盐水对照组;b:LPS/D-Gal 诱导模型组;c:LPS/D-Gal 诱导和 PH797804 干预组;d:PH797804 处理对照组。与生理盐水对照组(a)相比, ^{##} $P < 0.01$;与 LPS/D-Gal 诱导模型组(b)相比, ^{**} $P < 0.01$ 。

Note: a: Normal saline control group, b: LPS/D-Gal induction model group, c: LPS/D-Gal induction and PH797804 treatment group, d: PH797804 control group. Compared with the group a, ^{##} $P < 0.01$; Compared with the group b, ^{**} $P < 0.01$.

反应较少,最常见的与治疗相关的不良事件是痤疮皮疹,但通常耐受性较好,停止治疗后可消退^[9]。TNF- α 和 IL-6 是对 LPS 反应的关键促炎细胞因子^[22,23],我们研究发现 PH797804 可以显著降低 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-6 的浓度,并且在一定范围内呈浓度依赖性,证实 PH797804 在体外能够发挥显著的抗炎作用。

目前尚没有相关研究探讨 PH797804 是否对 ALF 具有保护作用,基于炎症在 ALF 中的核心作用,我们利用 LPS 和 D-Gal 诱导的小鼠 ALF 模型探讨 PH797804 处理对实验性小鼠 ALF 的保护作用及可能机制。LPS/D-Gal 联合给药可在数小时内诱导实验动物肝细胞大量死亡,肝脏生理功能严重受损^[24-26]。我们研究发现 PH797804 处理显著提高了 LPS/D-Gal 诱导的 ALF 小鼠 48 小时存活率,血清学和组织病理学研究证实,PH797804 对 LPS/D-Gal 诱导的小鼠 ALF 具有显著的保护作用。

肝脏中先天性和适应性免疫系统细胞产生的细胞因子是炎症反应和驱动炎症疾病的关键介质。值得注意的是,在 LPS/D-Gal 所致急性肝衰竭的病理研究中发现 LPS 所致的炎症因子对人体的损害远大于 LPS 所造成的直接损害^[27,28]。单核

-巨噬细胞系细胞是肝脏中宿主防御系统的重要组成部分^[29]。单核巨噬细胞系统产生的 TNF- α 是引起肝损伤的重要介质,不仅直接刺激肝细胞的死亡,而且还能引起炎症细胞的浸润,浸润的炎症细胞进一步引起肝细胞损伤并最终导致肝衰竭^[30,31]。体内实验结果与细胞模型中观察到的结果一致,PH797804 处理可显著降低 ALF 小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的浓度。

此外,我们对筛选的差异表达基因进行的 GO 功能聚类 and KEGG pathway 分析表明,PH797804 对肝脏保护的作用可能主要通过白细胞经内皮细胞迁移、细胞因子受体间相互作用以及 Fc γ R-介导的吞噬作用等信号通路发挥作用。我们使用 Real-time PCR 验证了这些差异表达的基因从而确认了测序结果的准确性。然而抑制剂的作用是复杂的,PH797804 具体如何发挥肝脏的保护作用及潜在的抗炎治疗作用,仍需要对测序结果进行进一步的挖掘和分析。

综上所述,我们研究证实 PH797804 对 LPS/D-Gal 诱导的小鼠急性肝衰竭具有保护作用,其作用机制可能跟抑制炎症反应有关,这为治疗急性肝衰竭提供了新的思路和方法。

参考文献 (References)

[1] Rajaram P, Subramanian R. Acute Liver Failure [J]. Semin Respir Crit

- Care Med, 2018, 39(5): 513-522
- [2] Rutter K, Horvatits T, Drolz A, et al. Acute liver failure [J]. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2018, 113(3): 174-183
- [3] Khan R, Koppe S. Modern Management of Acute Liver Failure [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2018, 47(2): 313-326
- [4] Olivo R, Guarrera JV, Pysopoulos NT. Liver Transplantation for Acute Liver Failure [J]. Clin Liver Dis, 2018, 22(2): 409-417
- [5] Krawitz S, Lingiah V, Pysopoulos NT. Acute Liver Failure: Mechanisms of Disease and Multisystemic Involvement [J]. Clin Liver Dis, 2018, 22(2): 243-256
- [6] Puengel T, Tacke F. Repair macrophages in acute liver failure [J]. Gut, 2018, 67(2): 202-203
- [7] Triantafyllou E, Pop OT, Possamai LA, et al. MerTK expressing hepatic macrophages promote the resolution of inflammation in acute liver failure [J]. Gut, 2018, 67(2): 333-347
- [8] Astolfi A, Manfroni G, Cecchetti V, et al. A Comprehensive Structural Overview of p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase in Complex with ATP-Site and Non-ATP-Site Binders [J]. ChemMedChem, 2018, 13(1): 7-14
- [9] Qu J, Zhou C, Hao N, et al. Development of a validated UPLC-MS/MS method for quantification of p38 MAPK inhibitor PH-797804: Application to a pharmacokinetic study in rat plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1134-1135: 121877
- [10] Casadomé-Perales Á, Matteis L, Allewa M, et al. Inhibition of p38 MAPK in the brain through nasal administration of p38 inhibitor loaded in chitosan nanocapsules [J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14(18): 2409-2422
- [11] Hope HR, Anderson GD, Burnette BL, et al. Anti-inflammatory properties of a novel N-phenyl pyridinone inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase: preclinical-to-clinical translation [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 331(3): 882-895
- [12] Watz H, Barnacle H, Hartley BF, et al. Efficacy and safety of the p38 MAPK inhibitor losmapimod for patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Lancet Respir Med, 2014, 2(1): 63-72
- [13] Jones DS, Jenney AP, Joughin BA, et al. Inflammatory but not mitogenic contexts prime synovial fibroblasts for compensatory signaling responses to p38 inhibition [J]. Sci Signal, 2018, 11(520): eaal1601
- [14] Singh D, Siew L, Christensen J, et al. Oral and inhaled p38 MAPK inhibitors: effects on inhaled LPS challenge in healthy subjects [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2015, 71(10): 1175-1184
- [15] MacNee W, Allan RJ, Jones I, et al. Efficacy and safety of the oral p38 inhibitor PH-797804 in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised clinical trial [J]. Thorax, 2013, 68(8): 738-745
- [16] Chaudhary O, Narayan V, Lelis F, et al. Inhibition of p38 MAPK in combination with ART reduces SIV-induced immune activation and provides additional protection from immune system deterioration [J]. PLoS Pathog, 2018, 14(8): e1007268
- [17] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease [J]. Nature, 2013, 496(7446): 445-455
- [18] Islam SU, Lee JH, Shehzad A, et al. Decursinol Angelate Inhibits LPS-Induced Macrophage Polarization through Modulation of the NF κ B and MAPK Signaling Pathways [J]. Molecules, 2018, 23(8): 1880
- [19] Venkatesan T, Choi YW, Lee J, et al. Falcariindiol inhibits LPS-induced inflammation via attenuating MAPK and JAK-STAT signaling pathways in murine macrophage RAW 264.7 cells [J]. Mol Cell Biochem, 2018, 445(1-2): 169-178
- [20] Somensi N, Rabelo TK, Guimarães AG, et al. Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- κ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105743
- [21] Nagaraj A, Samiappan S. Presentation of Antibacterial and Therapeutic Anti-inflammatory Potentials to Hydroxyapatite via Biomimetic With Azadirachta indica: An in vitro Anti-inflammatory Assessment in Contradiction of LPS-Induced Stress in RAW 264.7 Cells [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1757
- [22] Chae BS. Pretreatment of Low-Dose and Super-Low-Dose LPS on the Production of In Vitro LPS-Induced Inflammatory Mediators [J]. Toxicol Res, 2018, 34(1): 65-73
- [23] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-6440
- [24] Li L, Yin H, Zhao Y, et al. Protective role of puerarin on LPS/D-Gal induced acute liver injury via restoring autophagy [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(3): 957-965
- [25] Liu TG, Sha KH, Zhang LG, et al. Protective effects of alpinetin on lipopolysaccharide/d-Galactosamine-induced liver injury through inhibiting inflammatory and oxidative responses [J]. Microb Pathog, 2019, 126: 239-244
- [26] Peng J, Li J, Huang J, et al. p300/CBP inhibitor A-485 alleviates acute liver injury by regulating macrophage activation and polarization [J]. Theranostics, 2019, 9(26): 8344-8361
- [27] Jing ZT, Liu W, Xue CR, et al. AKT activator SC79 protects hepatocytes from TNF- α -mediated apoptosis and alleviates d-Gal/LPS-induced liver injury [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 316(3): G387-G396
- [28] Karampatou A, Han X, Kondili LA, et al. Corrigendum to "Premature ovarian senescence and a high miscarriage rate impair fertility in women with HCV" [J]. J Hepatol, 2018, 68(4): 867
- [29] Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology [J]. Hepatology, 2014, 59(5): 2034-2042
- [30] Liu A, Shen Y, Du Y, et al. Esculin prevents Lipopolysaccharide/D-Galactosamine-induced acute liver injury in mice [J]. Microb Pathog, 2018, 125: 418-422
- [31] Lai WY, Wang JW, Huang BT, et al. A Novel TNF- α -Targeting Aptamer for TNF- α -Mediated Acute Lung Injury and Acute Liver Failure [J]. Theranostics, 2019, 9(6): 1741-1751