

论著·基础研究

重组人白介素 1 受体拮抗剂对肝细胞的保护作用

郑 滢, 肖欣怡, 杨卓一, 周美琪, 陈 会, 袁运生

上海交通大学药学院细胞工程及抗体药物教育部研究中心, 上海 200240

[摘要] **目的**·利用 HepG₂ 细胞建立 D-氨基半乳糖 (D-galactosamine, D-GalN) 体外肝细胞损伤模型, 研究重组人白介素 1 受体拮抗剂 (recombinant human IL-1Ra, rhIL-1Ra) 对肝细胞的保护作用。**方法**·建立 D-GalN 诱导 HepG₂ 细胞损伤模型, 将 HepG₂ 细胞放置于含有不同浓度的 D-GalN 培养基中 (0.02、0.2、2、4 mg/mL), 在第 1、2 和 3 日分别观察细胞形态和活力变化, 优化 D-GalN 浓度和处理时间; 研究不同 IL-1Ra 浓度 (10、20、50 μg/mL) 处理的 D-GalN 损伤模型细胞形态变化, 测定细胞活力; 分析各组细胞凋亡情况和各组胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 运用荧光实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测各组细胞中凋亡诱导相关细胞因子白介素 1β (interleukin-1β, *IL-1β*)、IL-6 (interleukin-6, *IL-6*) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, *TNF-α*) 的 mRNA 水平, 并采用 ERK1/2 通路抑制剂 (SCH772984) 检测 IL-1Ra 是否是通过促进肝损伤细胞 ERK1/2 磷酸化的方式来保护肝细胞。**结果**·采用 4 mg/mL 浓度的 D-GalN 处理 HepG₂ 细胞 2 d 后, 细胞活力显著下降; rhIL-1Ra 显著提高损伤模型细胞的存活率, 减少细胞中 ROS 的生成, 显著抑制 D-GalN 诱导的细胞内凋亡诱导相关细胞因子的表达; ERK1/2 信号途径在介导 IL-1Ra 保护肝细胞的损伤过程中有一定的作用。**结论**·rhIL-1Ra 可直接靶向肝细胞, 并通过在细胞内上调 ERK1/2 信号通路的活化水平, 抑制细胞凋亡, 发挥对肝损伤细胞的保护作用。

[关键词] HepG₂ 细胞; 肝损伤; rhIL-1Ra; D-GalN; 活性氧簇; ERK1/2

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.10.003 **[中图分类号]** R915 **[文献标志码]** A

Protective effect of recombinant human IL-1Ra on hepatocytes *in vitro*

ZHENG Ying, XIAO Xin-yi, YANG Zhuo-yi, ZHOU Mei-qi, CHEN Hui, YUAN Yun-sheng

Engineering Research Center of Cell and Therapeutic Antibody, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective**·To evaluate protective effects of recombinant human IL-1Ra (rhIL-1Ra) on acute liver injury *in vitro* by using D-galactosamine (D-GalN) and HepG₂ cells to establish the D-galactosamine (D-GalN)-induced HepG₂ cells injury models. **Methods**·Models of HepG₂ cells injury induced by D-GalN was established. HepG₂ cells were maintained in mediums which contained different concentration of D-GalN (0.02, 0.2, 2 or 4 mg/mL) for different time (1, 2 or 3 d). Optimized concentration and time of D-GalN were used to analyze cell viability and morphology. A serial dose of rhIL-1Ra (10, 20 or 50 μg/mL) was used to treat HepG₂ cells which were challenged with D-GalN. Cell apoptosis and the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were analyzed in different treatment groups. Real-time PCR was employed to analyze the mRNA levels of *IL-1β*, *IL-6* and *TNF-α* in cells. ERK1/2 inhibitor (SCH772984) was used to confirm whether ERK1/2 phosphorylation played a critical role in IL-1Ra protecting hepatocytes or not. **Results**·Cell viability was significantly decreased by D-GalN whose concentration was 4 mg/mL in HepG₂ cells after 2 d. Compared with the control group, rhIL-1Ra could significantly improve cell survival and down-regulate the level of ROS in the cells. RhIL-1Ra also could suppress expression of pro-apoptotic cytokines factors (*IL-1β*, *IL-6* and *TNF-α*) induced by D-GalN in HepG₂ cells. The results also showed that erk1/2 signaling pathways have certain effect on mediating the injury of rhIL-1Ra to protect hepatocytes. **Conclusion**·RhIL-1Ra can protect hepatocytes from toxins by directly targeting hepatocytes and inhibit cells apoptosis by activating ERK1/2 pathway in HepG₂ cells.

[Key words] HepG₂; liver injury; rhIL-1Ra; D-GalN; reactive oxygen species; ERK1/2

急性肝损伤 (acute liver failure, ALF) 包含急性肝炎和肝衰竭等多种急性肝病的共同病理特征^[1-3]。引起 ALF 的病因众多, 根据病原特点可以分为病毒性、免疫性、化学性和不明原因型。ALF 主要表现为肝细胞凋亡

和肝组织正常组织形态受到破坏。目前临床治疗策略以针对病因和保肝治疗为主, 尚缺乏有效的治疗药物^[4]。有报道^[5]表明, 急性肝衰竭患者的预后与白介素 1 受体拮抗剂 (interleukin-1Ra, IL-1Ra) 的水平呈正相关。重组人 IL-

[基金项目] 国家自然科学基金 (31671388, 81302825); 上海市浦江人才计划 (16PJ1405000); 上海交通大学医工交叉项目 (YG2015MS64) (National Natural Science Foundation of China, 31671388, 81302825; Shanghai Pujiang Program, 16PJ1405000; Medical-Engineering Joint Project of Shanghai Jiao Tong University, YG2015MS64)。

[作者简介] 郑 滢 (1995—), 女, 硕士生; 电子信箱: zhengy1108@163.com。

[通信作者] 袁运生, 电子信箱: yunsheng@sjtu.edu.cn。

1Ra (recombinant human IL-1Ra, rhIL-1Ra) 是已经被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于临床治疗风湿性关节炎的药物。动物实验表明, rhIL-1Ra 能显著提高化学药物诱导 ALF 小鼠的存活率^[6-7]。rhIL-1Ra 是否通过直接作用于肝实质细胞发挥抗肝细胞凋亡作用尚不清楚。肝母细胞瘤 HepG₂ 细胞仍然保留肝实质细胞的特征, 如药物代谢系统、血清蛋白分泌和支持乙型肝炎病毒增殖等特点, 其被广泛地用于建立肝损伤体外细胞模型和体外评价药物护肝效果方面的研究^[8-9]。

本研究利用 D-氨基半乳糖 (D-galactosamine, D-GalN) 处理 HepG₂ 细胞, 观察细胞形态及生存率的变化, 构建体外肝损伤细胞模型。通过检测 rhIL-1Ra 对损伤模型细胞的存活率和细胞凋亡水平的影响来评价 rhIL-1Ra 对肝细胞的直接保护效果。此外, 本研究考察 rhIL-1Ra 对损伤模型细胞内的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS), 凋亡诱导相关细胞因子白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的 mRNA 水平及抗凋亡蛋白的影响来揭示 rhIL-1Ra 保护肝细胞损伤作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝母细胞瘤 HepG₂ 细胞株购于中国科学院细胞库, DMEM 高糖培养基和胎牛血清 (FBS) 均购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司, rhIL-1Ra 购于上海伍洋生物医药有限公司, D-GalN 购于美国 Sigma-Aldrich 公司, Cell Counting Kit-8 购于日本东仁化学科技 (上海) 有限公司, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司, Hoechst 33342 购于上海 Sigma-Aldrich 贸易公司, ROS 检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司, 总 RNA 提取试剂盒购于康为世纪有限公司, RNA 反转录试剂盒购于宝日医生物技术有限公司, Fast Start Universal SYBR Green Master 购于瑞士罗氏公司, ERK1/2 抑制剂 SCH772984 购于美国 MedChemExpress 公司, ERK、p-ERK、 β -actin 一抗和二抗均购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 HepG₂ 细胞培养在含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂。建立 D-GalN 诱导肝细胞损伤模型时, 将 HepG₂ 细胞接种

于 96 孔板中 (4×10^4 /孔); 培养过夜后, 在各细胞的培养基中分别添加 0.02、0.2、2、4 mg/mL D-GalN, 每种浓度 5 个复孔; 细胞加药后继续培养, 分别在第 1、2 和 3 日时观察细胞形态变化, 并用 CCK-8 试剂盒分析细胞活力变化。细胞凋亡检测、ROS 水平测定和荧光实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析样品进行细胞处理时, 将 HepG₂ 接种于 6 孔板中 (1×10^6 /孔), 过夜培养后, 按照正常对照组 (PBS 对照)、D-GalN 组 (4 mg/mL)、rhIL-1Ra 处理组 (D-GalN 4 mg/mL, rhIL-1Ra 50 $\mu\text{g/mL}$) 进行加药后继续培养, 按照分析要求进行采样。

1.2.2 rhIL-1Ra 对 D-GalN 诱导损伤模型肝细胞的保护作用 将 HepG₂ 细胞接种于 96 孔板 (4×10^4 /孔) 中过夜培养, 细胞被分为模型对照组 (D-GalN) 和 rhIL-1Ra 处理组 (D-GalN 结合 10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 rhIL-1Ra, 即先加入 rhIL-1Ra, 1 h 后加入 D-GalN, 如果观察超过 1 d, 每隔 24 h 换液和重新加药 1 次)。分别于加药后的 1、2 d 观察细胞变化及用 CCK8 试剂盒测定细胞存活率。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞被加药处理 48 h 后, 收集各组细胞, 按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒说明书操作。用冷 PBS 进行洗涤后, 用 FITC 标记的 Annexin V 和 PI 染液染色后, 采用 CytExpert 流式细胞仪 (美国贝克曼公司) 在 1 h 内检测。

1.2.4 ROS 水平测定 将 HepG₂ 接种于 6 孔板中 (1×10^6 /孔), 过夜培养后, 按照正常对照组 (PBS 对照)、D-GalN 组 (4 mg/mL)、rhIL-1Ra 处理组 (D-GalN 4 mg/mL, rhIL-1Ra 50 $\mu\text{g/mL}$) 进行加药后继续培养 6 h, 用活性氧探针 (DCFH-DA) 标记细胞 15 min, 用冷 PBS 洗涤细胞后, 加入 Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g/mL}$) 染色 2 min, 用 PBS 洗涤 3 次后, 在荧光显微镜下观察和分析荧光强度变化情况。

1.2.5 qRT-PCR 分析 将 HepG₂ 接种于 6 孔板中 (1×10^6 /孔), 过夜培养; 按照正常对照组 (PBS 对照)、D-GalN 组 (4 mg/mL)、rhIL-1Ra 处理组 (D-GalN 4 mg/mL, rhIL-1Ra 50 $\mu\text{g/mL}$) 加药后继续培养 48 h; 收集细胞, 用冷 PBS 洗涤, 提取各组细胞的总 RNA, 并对总 RNA 的浓度进行测定和质量检测; 用 TAKARA 的反转录试剂盒合成 cDNA; 根据 Fast Start Universal SYBR Green Master 试剂盒要求, 用 ABI 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR, 检测每组细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平, 引物序列见表 1; 每组 3 个复孔, 以 β -actin 为内参^[10-11], PCR 结果采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab 1 Primers of qRT-PCR

引物名称	引物序列
<i>IL-1β</i> 正向引物	5'-TTGTTGCTCCATATCCTGTCC-3'
<i>IL-1β</i> 反向引物	5'-CACATGGGATAACGAGGCTT-3'
<i>IL-6</i> 正向引物	5'-GGAGACTTGCCTGGTGAA-3'
<i>IL-6</i> 反向引物	5'-GCATTGTGGTTGGGTCA-3'
<i>TNF-α</i> 正向引物	5'-CACTAAGAATTCAAAGTGGGGC-3'
<i>TNF-α</i> 反向引物	5'-GAGGAAGGCCTAAGGTCCAC-3'
β -actin 正向引物	5'-TGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3'
β -actin 反向引物	5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3'

1.2.6 SCH772984 抑制 IL-1Ra 的保护作用观察 将细胞分别接种于 96 孔板 (4×10^4 /孔) 和 6 孔板 (1×10^6 /孔) 中, 分为正常对照组、肝细胞损伤组 (D-GalN)、rhIL-1Ra 组 (D-GalN+rhIL-1Ra)、SCH772984 组 (肝损伤细胞模型 +rhIL-1Ra+SCH772984)、DMSO 对照组 (与 SCH772984 等体积的 DMSO)。过夜培养后, SCH772984 组和 DMSO 组分别加入抑制剂或 DMSO 预处理培养 24 h, 各实验组再加入相应的药物, 继续培养 24 h, 检测细胞存活率变化。同时, 分别收集 6 孔板中各组细胞总蛋白, Western blotting 分析 ERK1/2 蛋白水平和磷酸化水平

(phosphorylation-ERK1/2, pERK1/2) 的变化。

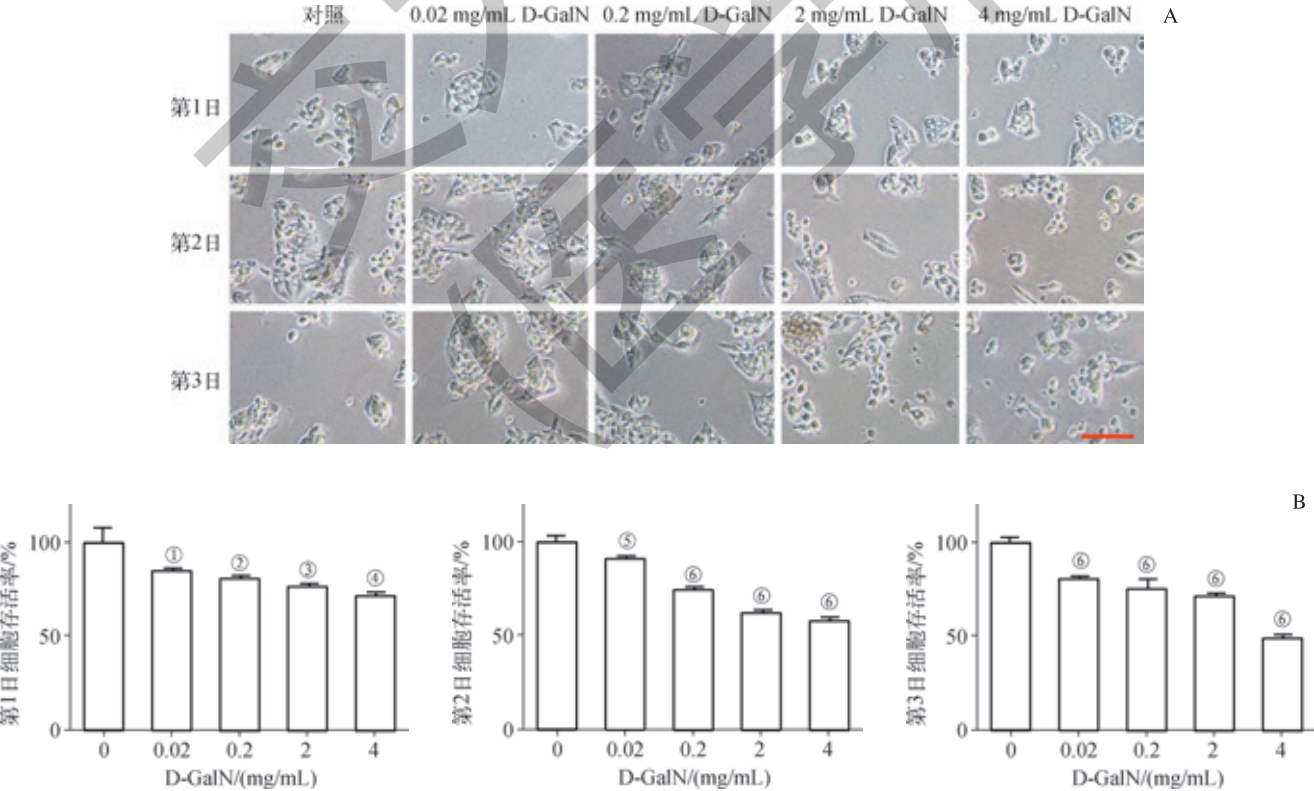
1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 和 GraphPad 5.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。2 组比较采用两独立样本的 t 检验, 多组比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 D-GalN 诱导的肝细胞损伤模型的建立

正常组细胞呈梭形并聚集生长, 胞体形态饱满, 立体感较强。0.02、0.2 mg/mL D-GalN 组细胞状态和形态均没有明显变化。2、4 mg/mL D-GalN 组细胞内空泡增多 (脂滴增多), 代谢异常, 并随着时间的变化细胞明显变圆, 细胞间连接减少, 非贴壁细胞较多; 4 mg/mL 的 D-GalN 组的细胞变化更为明显 (图 1A)。细胞存活率检测结果显示, 在加药后的第 2 日各组显示出较大差异, 对照组与 4 mg/mL D-GalN 组比较, 差异有统计学意义 [$(100.00 \pm 2.41) \%$ vs $(49.13 \pm 0.75) \%$, $P = 0.000$] (图 1B)。



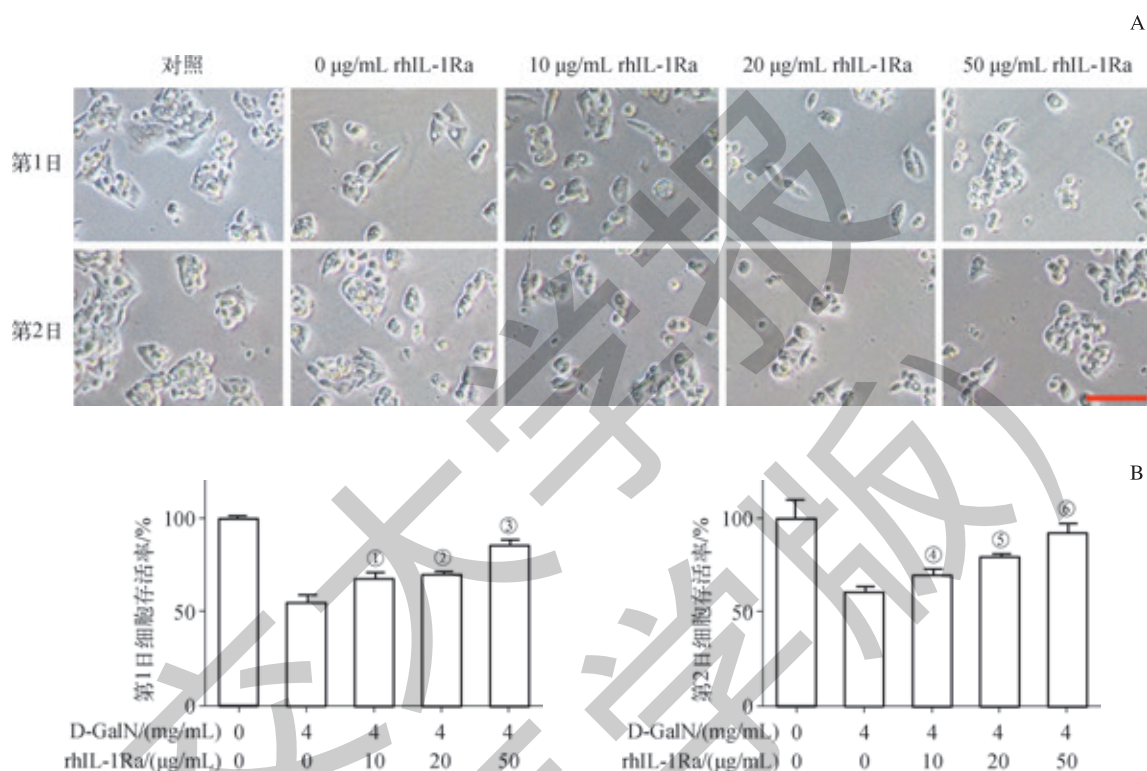
注: A. 细胞形态变化 (标尺为 100 μ m); B. 细胞存活率变化 ($^{\circ}P=0.032$, $^{\circ}P=0.017$, $^{\circ}P=0.009$, $^{\circ}P=0.017$, $^{\circ}P=0.005$, $^{\circ}P=0.000$, 与正常对照组比较)

图 1 不同浓度 D-GalN 下 HepG₂ 细胞的形态和存活率变化
Fig 1 Morphology and cell viability of HepG₂ cells at different concentration of D-GalN

2.2 rhIL-1Ra 促进 D-GalN 诱导的肝损伤细胞存活

模型组的细胞在第2日时, 细胞明显皱缩变形, 连接减小, 非贴壁细胞增多。加入 10 $\mu\text{g/mL}$ rhIL-1Ra 后有效减轻 D-GalN 对 HepG₂ 细胞的损伤和形态改变, 50 $\mu\text{g/mL}$ rhIL-1Ra 组细胞与正常对照组相似 (图 2A)。在细胞存活率方面, rhIL-1Ra 处理组与 D-GalN 模型组的细胞相比, 50 $\mu\text{g/mL}$ rhIL-1Ra 处理组在 24 h 后显著提高 HepG₂ 细胞

的存活率, 并随着 rhIL-1Ra 的浓度增加, 细胞存活率均显著增高。第2日, D-GalN 组与 50 $\mu\text{g/mL}$ rhIL-1Ra 组比较, 细胞存活率的差异有统计学意义 [(55.21 \pm 3.99)% vs (85.54 \pm 3.08)%, $P=0.009$] (图 2B)。该结果显示, rhIL-1Ra 对 D-GalN 诱导的肝细胞损伤模型具有保护作用, 并呈浓度梯度依赖性。



注: A. 细胞形态变化 (标尺 100 μm); B. 细胞存活率变化; (^① $P=0.018$, ^② $P=0.009$, ^③ $P=0.003$, ^④ $P=0.024$, ^⑤ $P=0.011$, ^⑥ $P=0.003$, 与模型组细胞比较)

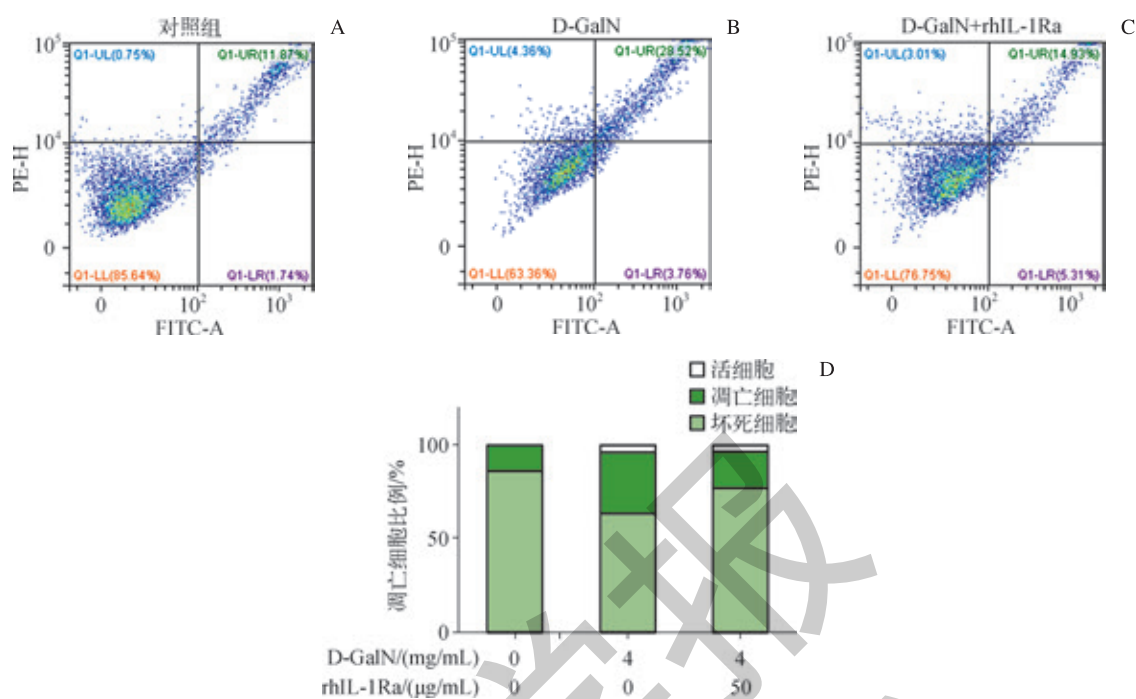
图2 不同浓度 rhIL-1Ra 下 HepG₂ 的细胞形态和存活率变化

Fig 2 Morphology and cell viability of HepG₂ cells at different concentration of rhIL-1Ra

2.3 rhIL-1Ra 减少 D-GalN 诱导的肝细胞凋亡

采用流式细胞仪分析各组细胞凋亡情况, 结果显示, 正常对照组的凋亡细胞比例为 13.61%, D-GalN 肝细胞损伤组的凋亡细胞比例显著增加, 为 32.25%。加入 rhIL-

1Ra 后可以明显减轻 D-GalN 对肝细胞的损伤, 凋亡细胞比例降低至 19.61%; 与模型组相比, 死亡细胞的比例也有所下降 (4.36% vs 3.01%) (图 3)。



注: A ~ C. 流式细胞检测结果; D. 各期细胞的比例

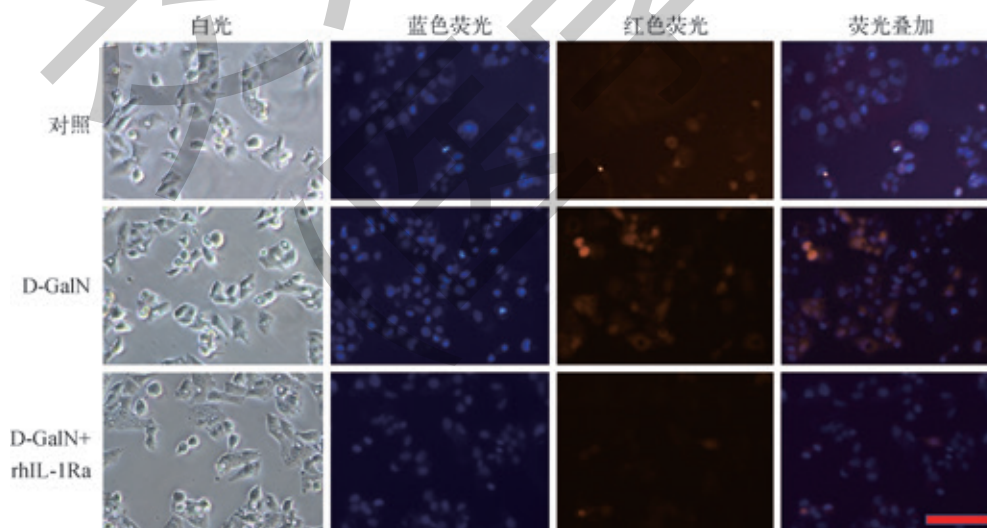
图 3 rhIL-1Ra 对 D-GalN 诱导的 HepG₂ 细胞凋亡的影响

Fig 3 Effect of rhIL-1Ra on D-GalN-induced apoptosis in HepG₂ cells

2.4 IL-1Ra 降低 ROS 水平

在 D-GalN 诱导的肝细胞损伤模型中, 肝细胞损伤组与正常对照组相比, 细胞内的 ROS 水平明显升高

(0.068 ± 0.011 vs 0.345 ± 0.073 , $P=0.023$); 而 rhIL-1Ra 处理组与肝细胞损伤组相比, 细胞内 ROS 荧光强度明显降低 (0.345 ± 0.073 vs 0.141 ± 0.029 , $P=0.021$) (图 4)。



注: 蓝色荧光为 Hoechst 标记细胞核, 红色荧光为细胞内的 ROS 探针 DCF 信号; 标尺为 100 μm

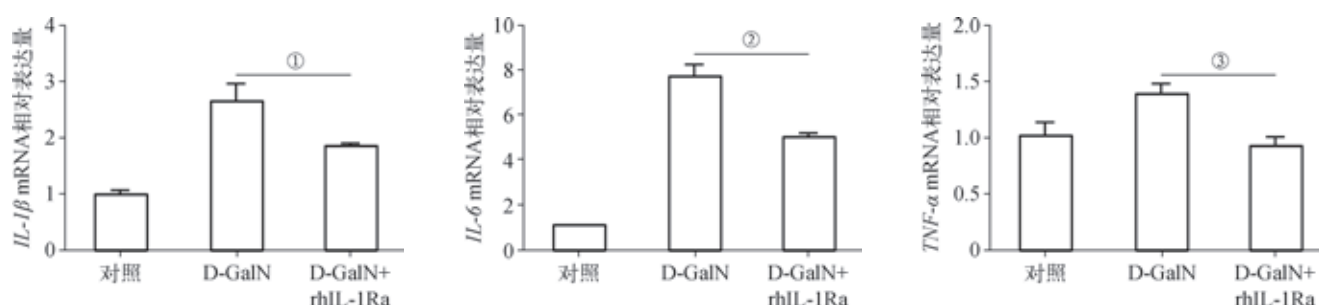
图 4 HepG₂ 细胞内 ROS 水平变化

Fig 4 ROS level in HepG₂ cells

2.5 IL-1Ra 通过降低 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平保护细胞

与正常对照组比较, D-GalN 诱导的肝损伤模型细胞中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 水平均显著升高; 而

rhIL-1Ra 可以显著抑制 D-GalN 诱导的肝损伤模型细胞中 3 种促凋亡细胞因子的表达水平 (图 5)。



注: ① $P=0.042$, ② $P=0.022$, ③ $P=0.012$

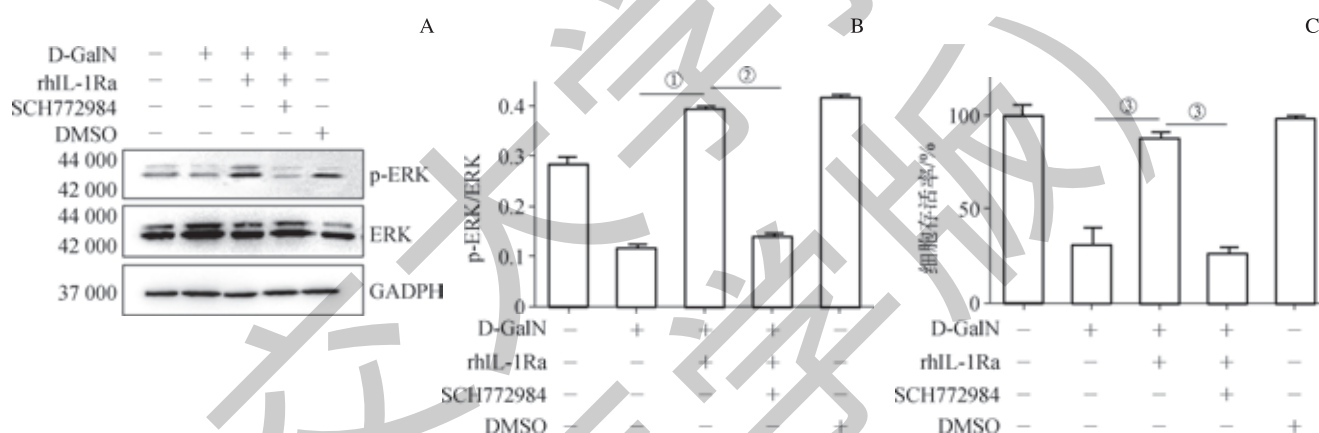
图5 rhIL-1Ra 对 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 和 $TNF-\alpha$ mRNA 表达水平的影响

Fig 5 Effects of rhIL-1Ra on expressions of $IL-1\beta$, $IL-6$ and $TNF-\alpha$ mRNA

2.6 ERK1/2 抑制降低 IL-1Ra 的保护作用

结果显示, D-GalN 可以降低 HepG₂ 细胞内 p-ERK1/2 水平; 在肝损伤模型细胞中加入 rhIL-1Ra 后, 可以显著提高 HepG₂ 细胞内 p-ERK1/2 水平 (图 6A); 但 rhIL-1Ra

上调 HepG₂ 细胞内的 p-ERK1/2 功能可以被 ERK 信号通路抑制剂 SCH772984 完全阻断; 此外, rhIL-1Ra 促进肝损伤模型细胞的存活功能可以被 SCH772984 显著抑制 (图 6B)。



注: A、B 各组 p-ERK1/2 蛋白表达水平的检测及比较 (① $P=0.018$, ② $P=0.009$); B 各组细胞存活率的比较 (③ $P=0.000$)

图6 rhIL-1Ra 对模型细胞中 ERK1/2 的磷酸化水平和细胞存活的影响

Fig 6 Effect of rhIL-1Ra on ERK1/2 phosphorylation and hepatocytes survival

3 讨论

D-GalN 诱导的动物肝损伤模型作为临床前药效评价推荐模型之一, 广泛用于护肝药物的药效学研究; D-GalN 也常用于诱导体外肝细胞株建立肝细胞损伤体外模型。根据研究需要, 多种浓度的 D-GalN 用于建立 HepG₂ 损伤模型, 浓度范围可以从 10 mmol/L 提高至 50 mmol/L^[12-13]。本研究建模采用 4 mg/mL (18.6 mmol/L) D-GalN, 可以显著地抑制 HepG₂ 细胞的活力。

众所周知, 无论是临床上 ALF 患者还是动物模型, 在 ALF 发生过程中, 外周循环和肝脏中的 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 和 $TNF-\alpha$ 水平都呈现异常升高^[14]。这些细胞因子与急性期蛋白水平的升高、肝损伤早期的大量肝实质细胞凋亡或坏

死以及细胞增殖的抑制具有显著的相关性^[15]。已有报道显示 $IL-1Ra$ 对多种原因诱导的肝损伤均有减轻作用^[6, 16], 肝脏特异性敲除 $IL-1RI$ 受体, 阻断 $IL-1$ 信号通路可以有效降低肝损伤模型动物肝脏内和循环系统中的 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 和多种炎症趋化因子的水平^[17]。本研究在模型细胞中加入不同浓度的 rhIL-1Ra, 结果表明 rhIL-1Ra 不仅通过循环与肝脏内的单核细胞分泌诱导细胞凋亡的炎症细胞因子 (如 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$)^[18], 还可以直接通过作用于 HepG₂ 细胞, 下调细胞内 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ 的表达水平。肝实质细胞内的 ROS 累积是肝损伤过程中肝细胞凋亡的关键诱因之一^[19-20]。体内研究显示, 细菌脂多糖 (LPS)/D-GalN 诱导小鼠 ALF 模型中, 肝脏内的 ROS 水平会急剧上升^[21-23]。本研究建立的模型中也

观察到模型组 HepG₂ 细胞内的 ROS 水平显著高于正常的 HepG₂ 细胞, 与其他可以降低细胞内 ROS 水平的化合物可以保护 ALF 模型动物体内的肝细胞一样, rhIL-1Ra 可以显著地抑制 D-GalN 诱导 HepG₂ 细胞内产生异常的 ROS。这表明 rhIL-1Ra 保护肝细胞损伤的作用可能与抗氧化活性有关。细胞内过高的 ROS 可以显著抑制细胞内 ERK 信号通路的活性。ERK 信号通路作为细胞内重要的抗凋亡信号通路之一, 参与多种细胞压力环境下的存活调控^[24]。本研究通过在 rhIL-1Ra 处理组细胞中加入 ERK 信号通路的抑制剂 SCH772984, 有效阻断 rhIL-1Ra

上调 ERK1/2 的磷酸化, 同时 SCH772984 也阻断了 rhIL-1Ra 对 HepG₂ 细胞的保护功能。该结果表明 ERK1/2 信号途径在介导 IL-1Ra 保护肝细胞的损伤过程中有一定的作用。

本研究结果初步证明了 IL-1 信号通路的拮抗剂 rhIL-1Ra 能够保护 HepG₂ 细胞, 减轻 D-GalN 对 HepG₂ 细胞的损伤, 并进一步揭示了 rhIL-1Ra 可以直接靶向肝细胞, 通过降低细胞内的 ROS 水平和抑制促凋亡细胞因子的表达以及上调细胞内的 ERK 磷酸化水平, 发挥促进 HepG₂ 细胞存活的作用。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Gonzalez SA, Keefe EB. Acute liver failure [M]//Friedman LS, Keefe EB. Handbook of liver disease. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2012, 20-33.
- [2] Xiao JQ, Shi XL, Ma HC, et al. Administration of IL-1Ra chitosan nanoparticles enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell transplantation in acute liver failure[J]. Arch Med Res, 2013, 44(5): 370-379.
- [3] Zhang DY, Friedman SL. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 2012, 56(2): 769-775.
- [4] Castaldo ET, Chari RS. Liver transplantation for acute hepatic failure[J]. HPB (Oxford), 2006, 8(1): 29-34.
- [5] Sekiyama KD, Yoshida M, Thomson AW. Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis[J]. Clin Exp Immunol, 2010, 98(1): 71-77.
- [6] Hu J, Yan D, Gao J, et al. RhIL-1Ra reduces hepatocellular apoptosis in mice with acetaminophen-induced acute liver failure[J]. Lab Invest, 2010, 90: 1737.
- [7] Zhu R-Z, Xiang D, Xie C, et al. Protective effect of recombinant human IL-1Ra on CCl₄-induced acute liver injury in mice[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(22): 2771-2779.
- [8] López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, et al. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line[J]. Hum Pathol, 2009, 40(10): 1512-1515.
- [9] Wei L, Jun L, Yasuhiro T, et al. Plasma from patients with acute liver failure dampens HepG₂ cells to epidermal growth factor induced proliferation response[J]. Hepatogastroenterol, 2014, 61(135): 2021-2027.
- [10] Zheng SC, Zhu XX, Xue Y, et al. Role of the NLRP3 inflammasome in the transient release of IL-1 β induced by monosodium urate crystals in human fibroblast-like synoviocytes[J]. J Inflamm (Lond), 2015, 12: 30-38.
- [11] Zhang K, Watanabe M, Kashiwakura Y, et al. Expression pattern of REIC/Dkk-3 in various cell types and the implications of the soluble form in prostatic acinar development[J]. Int J Oncol, 2010, 37(6): 1495-1501.
- [12] Bao XQ, Liu GT. Bicyclol protects HepG₂ cells against D-galactosamine-induced apoptosis through inducing heat shock protein 27 and mitochondria associated pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(2): 219-226.
- [13] 付再林, 郑英, 陶蓉, 等. BAPTA-AM 脂质体通过恢复胞质钙稳态抑制 D-GalN 致 HepG-2 细胞凋亡[J]. 解放军药学报, 2014(4): 288-291.
- [14] Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, et al. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(25): 3086.
- [15] Sekiyama KD, Yoshida M, Thomson AW. Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis[J]. Clin Exp Immunol, 1994, 98(1): 71-77.
- [16] Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(4): 323-340.
- [17] Gehrke N, Hövelmeyer N, Waisman A, et al. Hepatocyte-specific deletion of IL-1RI attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation. [J]. J Hepatol, 2018;68(5): 986-995.
- [18] Guo G, Zhu Y, Wu Z, et al. Circulating monocytes accelerate acute liver failure by IL-6 secretion in monkey[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(9): 4056-4067.
- [19] Weng D, Lu Y, Wei Y, et al. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice[J]. Toxicology, 2007, 232(1-2): 15-23.
- [20] Bhogal RH, Curbishley SM, Weston CJ, et al. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation[J]. Liver Transpl, 2010, 16(11): 1303-1313.
- [21] Lu Y, Bao X, Sun T, et al. Triptolide attenuate the oxidative stress induced by LPS/D-GalN in mice[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(3): 1022-1033.
- [22] Pan CW, Pan ZZ, Hu JJ, et al. Mangiferin alleviates lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced acute liver injury by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 770: 85-91.
- [23] 朱晨岑, 郑滢, 肖欣怡, 等. 重组人白细胞介素-1 受体拮抗剂对急性肝衰竭小鼠肝脏保护作用的评价[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(3): 320-324.
- [24] Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis[J]. IUBMB Life, 2010, 58(11): 621-623.

[收稿日期] 2019-01-30

[本文编辑] 徐 敏

