

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001745

FK866在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤中的  
保护作用及机制研究蒋师放<sup>1</sup>, 陈倩竹<sup>2</sup>, 马 磊<sup>1</sup>, 范克瑞<sup>1</sup>, 胡 凯<sup>1</sup>, 陈 益<sup>3</sup>, 许娟娟<sup>1</sup>, 姜 蓉<sup>3</sup>, 李龙江<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室、重庆医科大学干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室、  
重庆医科大学干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**探讨 FK866 在对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)诱导小鼠急性肝损伤(acute liver injury, ALI)中的保护作用及机制。**方法:**24 只 6 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、FK866 组、APAP 组、FK866 加 APAP 组。通过比色法检测血清中丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)活性; HE 染色观察肝组织病理学变化; 酶联免疫法检测血清中白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )含量; Western blot 检测尼克酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyl-transferase, NAMPT)的蛋白表达水平。**结果:**FK866 加 APAP 组中, ALT 和 AST 分别为(13.969  $\pm$  0.290)、(7.150  $\pm$  0.669) IU/L, 较 APAP 组明显降低(ALT:  $F=364.709$ ,  $P=0.000$ ; AST:  $F=130.398$ ,  $P=0.000$ ), 可见肝脏组织小叶结构较清晰, 细胞变性轻微, 无明显淤血; 炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  检测值分别为(176.333  $\pm$  0.775)、(79.765  $\pm$  1.000)、(147.083  $\pm$  1.000) pg/mL, 较 APAP 组含量明显减少(IL-6:  $F=207.106$ ,  $P=0.000$ ; IL-1 $\beta$ :  $F=165.027$ ,  $P=0.000$ ; TNF- $\alpha$ :  $F=118.636$ ,  $P=0.000$ ); NAMPT 蛋白表达水平较 APAP 组下调。**结论:**FK866 在 APAP 诱导的 ALI 中对肝脏具有保护作用, 其机制可能与抗炎效应相关。

**【关键词】**FK866; 对乙酰氨基酚; 急性肝损伤**【中图分类号】**R99**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-12-27Protective effect of FK866 on acute liver injury induced  
by acetaminophen and its mechanismJiang Shifang<sup>1</sup>, Chen Qianzhu<sup>2</sup>, Ma Lei<sup>1</sup>, Fan Kerui<sup>1</sup>, Hu Kai<sup>1</sup>, Chen Yi<sup>3</sup>, Xu Juanjuan<sup>1</sup>, Jiang Rong<sup>3</sup>, Li Longjiang<sup>1</sup>

(1. Teaching and Research Section of Pathophysiology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the protective effect of FK866 on acute liver injury (ALI) induced by acetaminophen (APAP) and its mechanism. **Methods:** Twenty-four male C57BL/6 mice (6-week-old) were randomly divided into the control group, FK866 group, APAP group and FK866+APAP group. The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were determined by colorimetric method, the pathological changes of liver by HE (hematoxylin eosin) staining, the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) by ELISA, and the expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) by Western blot. **Results:** In the FK866+APAP group, the serum activities of ALT and AST were (13.969  $\pm$  0.290) and (7.150  $\pm$  0.669) IU/L respectively and significantly lower than those of the APAP group (ALT:  $F=364.709$ ,  $P=0.000$ ; AST:  $F=130.398$ ,  $P=0.000$ ). The lobular structure was clear, the cell degeneration was mild, and no obvious congestion was observed in FK866-treated group. Furthermore, the serum levels of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were (176.333  $\pm$  0.775), (79.765  $\pm$  1.000) and (147.083  $\pm$  1.000) pg/mL respectively, indicating the inflammatory factors were notably inhibited by FK866 ( $F=207.106$ ,  $P=0.000$ ;

 $F=165.027$ ,  $P=0.000$ ;  $F=118.636$ ,  $P=0.000$ ). The expression of NAMPT protein was also down-regulated. **Conclusion:** FK866 can protect against the acute liver injury induced by APAP, and the anti-inflammatory effects may be involved in it.**【Key words】**FK866; acetaminophen; acute liver injury

作者介绍: 蒋师放, Email: 408831772@qq.com,

研究方向: 药物性肝损伤。

通信作者: 李龙江, Email: lljlyy2003@163.com。

基金项目: 重庆市渝中区科委科技计划资助项目(编号: 20150119)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.1614.054.html>

(2018-05-25)

对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是临床上常用的解热镇痛药,但过量服用可致急性肝损伤(acute liver injury, ALI)、肝衰竭,甚至死亡<sup>[1]</sup>。因而,如何防治 APAP 诱导的 ALI,尤其是通过药物进行干预成为该领域关注的热点。

过量的 APAP 在肝细胞中通过细胞色素 P450 介导产生中间产物 N-乙酰苯醌亚胺(N-acetylbenzoquinoneimine, NAPQI),其强氧化性可导致线粒体功能障碍及氧化应激损伤,从而引起肝细胞死亡<sup>[2]</sup>。死亡的细胞和氧化应激损伤产物又可刺激炎症细胞活化,产生和释放各种炎症因子,显著加速加重肝脏损伤<sup>[3]</sup>。因而,炎症反应是 APAP 诱导 ALI 发病机制中的重要环节,或可从中寻找防治的靶点。

尼克酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyl-transferase, NAMPT)是尼克酰胺生物合成尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)补救合成途径的限速酶。NAMPT 除了在机体正常的能量代谢过程中发挥关键作用,它还在肿瘤发生发展中扮演重要的角色。并且, NAMPT 的抑制剂 FK866 被研发出来了,表现出良好的抗肿瘤效应<sup>[4]</sup>。此外, NAMPT 也被认为是一种炎症因子<sup>[5]</sup>。因此, FK866 也表现出显著的抗炎作用,它对盲肠结扎穿孔诱导的败血症及肺炎有较好的治疗效应<sup>[6]</sup>,也可通过抗炎效应保护缺血损伤的神经<sup>[7]</sup>,以及作为急性肠炎的有效治疗手段<sup>[8]</sup>。

鉴于炎症是 APAP 发病的重要机制,故而 FK866 有可能抗 APAP 诱导的 ALI。本研究旨在小鼠体内确认 FK866 抗 ALI 效应,并从炎症反应角度探讨其初步机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

FK866(购自 SIGMA-ALDRICH 公司);APAP(购自生物工程股份公司);丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒(购自南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(interleukin, IL)-6 和 IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒(购自欣博盛生物科技有限公司);兔抗小鼠抗体 NAMPT(购自 abcam 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 药物配制 FK866 首先溶于 DMSO,配制成 25 mg/mL

的存储液,存储于-20℃。实验时,以 PBS 稀释成 1 mg/mL 的工作液行小鼠腹腔注射。APAP 加入到预热至 70℃的 PBS 溶液中,配制成 20 mg/mL 的工作液,按照 600 mg/kg 的剂量注射入小鼠腹腔。依据上述方法配制对照试剂。

1.2.2 动物分组及处理 24 只 6 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠,16~20 g,购自重庆医科大学实验动物中心,动物使用许可证号:SKXK(渝)2012-0001,标准条件饲养。小鼠随机分为 4 组:对照组、FK866 组(10 mg/kg)、APAP 组(600 mg/kg)、FK866 加 APAP 组,每组 6 只。其中, FK866 加 APAP 组,先用 10 mg/kg 的 FK866 予小鼠腹腔注射,1 h 后,再在腹腔注射剂量为 600 mg/kg 的 APAP。6 h 后内眦静脉取血,处死小鼠,采集肝组织。全血于 4℃, 5 000 r/min 离心 15 min,取上清液。另取部分肝组织放入 10%中性福尔马林固定,余下肝组织冻存-80℃备用。上述实验重复 3 次。

1.2.3 血清 ALT、AST 活性检测 血清标本以 10 倍生理盐水稀释,按照说明书所示步骤依次加入样本和相关试剂,在 505 nm 波长下测定吸光度(absorbance, A)值,根据标准曲线计算各样本 ALT、AST 活性。检测时,每个血清标本设 3 个复孔。

1.2.4 肝组织 HE 染色 肝组织在 10%中性福尔马林中固定 24 h,然后依序脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜下观察肝组织结构。

1.2.5 血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量检测 按试剂盒说明书所示步骤依次加入样本和各试剂,在 450 nm 波长下测定 A 值,根据标准曲线计算各样本 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量。

1.2.6 NAMPT 表达水平检测 肝组织匀浆,离心取上清液,测定蛋白浓度,调整上样量,SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,4℃孵育一抗(1:3 000)过夜,次日在 37℃条件下孵育相应二抗(1:3 000),1 h 后 ECL 发光,根据灰度值检测目标蛋白的表达水平。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。所得到的数值均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间的差异比较采用单因素方差分析,随后采用 Turkey's 检验进行组间两两比较。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 FK866 对血清 ALT、AST 活性的影响

APAP 腹腔注射后,其 ALT、AST 值分别为 153.328、35.795 IU/L,与对照组相比明显增加(ALT:  $F=364.709$ ,  $P=0.000$ ; AST:  $F=130.398$ ,  $P=0.000$ ),表明过量的 APAP 对肝脏有损伤。剂量为 10 mg/kg 的 FK866 预处理后,ALT 和 AST 分别为  $(13.969 \pm 0.290)$ 、 $(7.150 \pm 0.669)$  IU/L,较 APAP 组明显降低(ALT:  $F=364.709$ ,  $P=0.000$ ; AST:  $F=130.398$ ,  $P=0.000$ )(图1)。

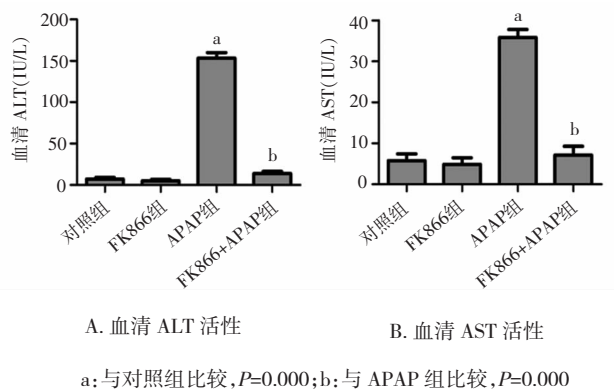


图 1 FK866 对 APAP 诱导急性肝损伤血清 ALT、AST 水平的影响

## 2.2 FK866 对肝组织病理变化的影响

显微镜下观察, 对照组中形态结构正常。10 mg/kg FK866 组与对照组相比无明显差别。肝小叶边界清晰, 肝细胞轮廓清楚。细胞核体积较大, 呈圆形, 位于细胞中央。中央静脉结

构正常, 无淤血。提示药物在该剂量下无明显毒性。APAP 组肝脏出现显著的病理变化, 小叶结构破坏, 肝细胞水样变形, 并有出血表现(图 2 中箭头所示)。10 mg/kg FK866 预处理后, 肝脏病理异常变化明显减轻, 小叶结构较清晰, 细胞变性轻微, 无明显淤血(图 2)。

2.3 FK866 对血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量的影响

APAP 组中, 血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量各为 456.755、138.795、229.343 pg/mL, 与对照组相比较含量均明显增加 (IL-6:  $F=207.106$ ,  $P=0.000$ ; IL-1 $\beta$ :  $F=165.027$ ,  $P=0.000$ ; TNF- $\alpha$ :  $F=118.636$ ,  $P=0.000$ )。10 mg/kg FK866 预处理后, 血清中炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  检测值分别为 (176.333  $\pm$  0.775)、(79.765  $\pm$  1.000)、(147.083  $\pm$  1.000) pg/mL, 较 APAP 组含量明显减少 (IL-6:  $F=207.106$ ,  $P=0.000$ ; IL-1 $\beta$ :  $F=165.027$ ,  $P=0.000$ ; TNF- $\alpha$ :  $F=118.636$ ,  $P=0.000$ ) (图 3)。

## 2.4 FK866 对 NAMPT 表达水平的影响

APAP 组的 NAMPT 表达水平较对照组明显升高, 而 FK866 可使增高的蛋白表达水平有所下调(图 4)。

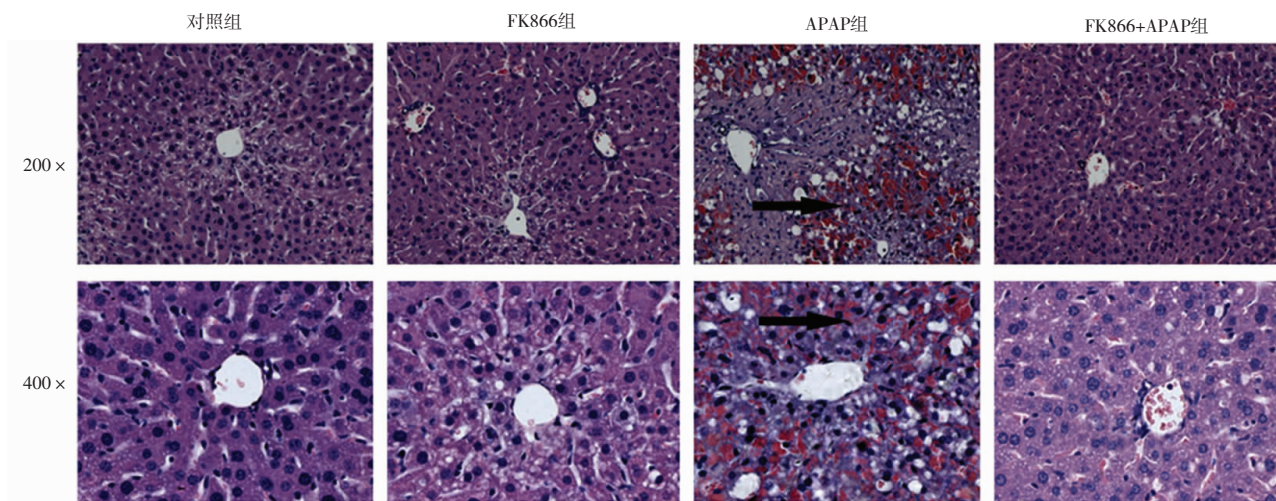
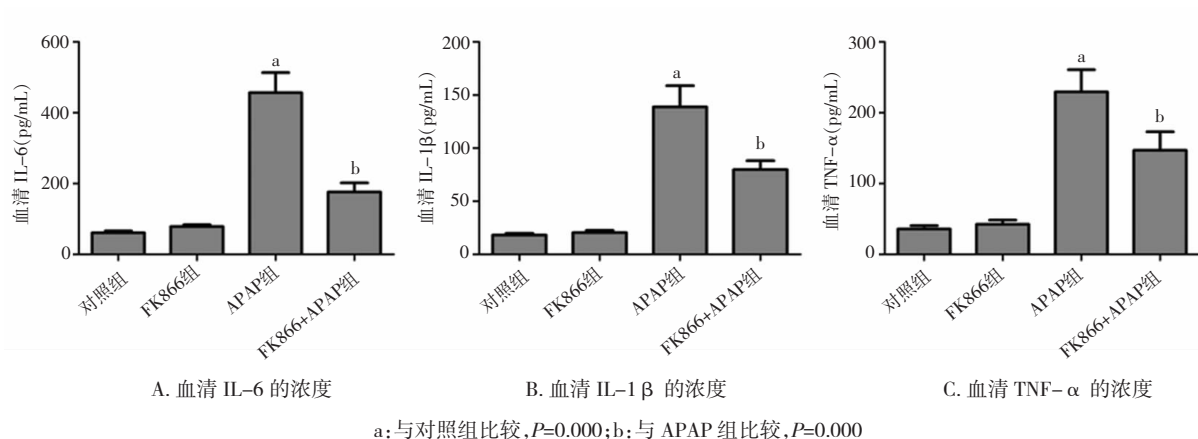


图 2 FK866 对 APAP 诱导的急性肝损伤肝组织病理学变化的影响(HE 染色)

图 3 FK866 对 APAP 诱导的急性肝损伤中血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

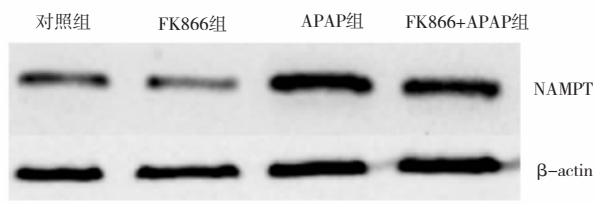


图4 FK866对APAP诱导的急性肝损伤中NAMPT表达水平的影响

### 3 讨论

APAP诱导ALI中,肝细胞一旦坏死,细胞中氨基转移酶便释放入血,引起血清中ALT、AST水平升高,可用以判断肝脏损伤的严重程度<sup>[9]</sup>。同时光镜下可观察到肝小叶结构破坏、肝细胞水样变形、明显出血等病理学改变。本实验结果发现,APAP引起小鼠血清ALT、AST水平明显升高,病理学也呈现典型的ALI形态学改变。由此,成功建立APAP诱导的ALI模型。

FK866作为NAMPT的抑制剂,具有确切的抗炎效应。但是,它是否能在APAP诱导的ALI中发挥抗炎作用,从而减轻肝损伤,保护肝脏呢?这是一个必须首先明确的问题。本研究结果显示,剂量为10 mg/kg的FK866预处理均可降低APAP损伤肝细胞后ALT和AST活性的升高。在该浓度作用下,光镜下观察到,肝脏的病理组织学损伤得以减轻(图2)。以上两方面结果均证实,FK866具有抗APAP引起的ALI效应。

那么,FK866对肝脏的保护作用是否与其抗炎效应相关呢?结果表明,APAP可导致血清中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量明显增高,同时NAMPT的蛋白表达也增加。而FK866能抑制上述炎症因子升高的程度,并减弱NAMPT的蛋白表达水平,提示其很可能是通过抗炎效应来发挥肝脏保护作用,这与Moschen等在内毒素/D-氨基半乳糖和刀豆蛋白A诱导的急性实验性肝炎模型中获得的结果相吻合<sup>[10]</sup>。但是,NAMPT和其他炎症因子关系如何?它们的变化是由于上游信号通路调控的结果,还是相互之间本身就有调控关系?NAMPT是由肝脏自身的

细胞产生,如肝细胞、枯否细胞、血管内皮细胞,抑或来自血液中的免疫细胞?这些问题都有待进一步深入研究。

FK866的抗肿瘤作用是研究的热点,但其抗炎效应研究才刚刚开始,只在少数几种炎症性疾病中得以证实。深入阐明其抗炎作用机制,不仅为APAP诱导的ALI的防治提供了理论依据,也为其将来应用于众多炎症性疾病开辟了广阔的空间。

### 参 考 文 献

- [1] Larson AM, Polson J, Fontana RJ, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter prospective study[J]. *Hepatology*, 2005, 42(6): 1364-1372.
- [2] McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, et al. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(4): 1574-1583.
- [3] Krenkel O, Mossanen JC, Tacke F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2014, 3(6): 331-343.
- [4] Schuster S, Penke M, Gorski T, et al. FK866-induced NAMPT inhibition activates AMPK and downregulates mTOR signaling in hepatocarcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(2): 334-340.
- [5] Sun Z, Lei H, Zhang Z. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF), a cytokine with multiple physiological functions[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(5): 433-442.
- [6] Huang P, Lee MW Jr, Sadrafi K, et al. MC-PPEA as a new and more potent inhibitor of CLP-induced sepsis and pulmonary inflammation than FK866[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 629-641.
- [7] Chen CX, Huang J, Tu GQ, et al. NAMPT inhibitor protects ischemic neuronal injury in rat brain via anti-neuroinflammation[J]. *Neuroscience*, 2017, 356: 193-206.
- [8] Gerner RR, Klepsch V, Macheiner S, et al. NAD metabolism fuels human and mouse intestinal inflammation[J]. *Gut*, 2018, 67(10): 1813-1823.
- [9] Dong Y, Huang J, Lin X, et al. Hepatoprotective effects of Yulangsan polysaccharide against isoniazid and rifampicin-induced liver injury in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 201-206.
- [10] Moschen AR, Gerner R, Schroll A, et al. A key role for Pre-B cell colony-enhancing factor in experimental hepatitis[J]. *Hepatology*, 2011, 54(2): 675-686.

(责任编辑:冉明会)