

· 基础研究 ·

人源抗TLR4抗体IgG2对对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤的保护作用

姚传霞¹, 王怡雯², 龚丹丹³, 李丽莉¹, 马 艳⁴, 匡 衡¹, 周婷婷^{2*}, 汪茂荣^{5*}

¹安徽医科大学解放军八一临床学院肝病中心, 安徽 合肥 230000; ²东部战区疾病预防控制中心, 江苏 南京 210002; ³南京医科大学附属妇产医院妇产科, 江苏 南京 210004; ⁴南京中医药大学附属解放军八一医院肝病中心, 江苏 南京 210002; ⁵东部战区总医院秦淮医疗区肝病中心, 江苏 南京 210002

[摘要] 目的: 研究人源抗TLR4抗体IgG2(human-TLR4 IgG2, hTLR4 IgG2)对对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)诱导肝损伤的保护效应, 探讨其在药物性肝损伤中的保护作用。方法: 以人源抗TLR4抗体Fab基因为模板, 扩增其可变区基因, 构建人源抗TLR4抗体IgG2真核表达载体, 转染CHO-S细胞, 筛选稳定表达细胞株, 收集细胞上清, Protein G柱纯化抗TLR4抗体IgG2。将18只C57BL/6J小鼠随机分成3组: 生理盐水组、APAP(600 mg/kg)组和APAP+hTLR4 IgG2(5 mg/kg)组, 统计小鼠腹腔注射APAP后24 h的存活率; 重复上述实验分组, 检测小鼠腹腔注射APAP 8 h后, 血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达水平, 取肝脏做病理分析并使用Western blot检测凋亡蛋白的表达。结果: 成功构建并表达纯化人源抗TLR4抗体IgG2; ELISA结果显示, 抗体效价为1:204 800。与APAP组相比, APAP+hTLR4 IgG2组小鼠的24 h存活率显著增加($P < 0.05$); 血清AST、ALT以及炎症细胞因子的表达水平显著降低, 具有统计学意义($P < 0.05$); 病理分析结果显示, 与模型组相比, 人源抗TLR4抗体IgG2治疗组的小鼠肝组织炎症细胞浸润、充血和坏死等症状明显改善; Western blot结果显示凋亡相关蛋白的表达减少。结论: 人源抗TLR4抗体IgG2能够抑制炎症因子的表达及细胞凋亡, 对APAP诱导的小鼠肝损伤有显著的保护作用。

[关键词] 人源抗TLR4抗体IgG2; 对乙酰氨基酚; 炎症因子; 细胞凋亡

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)05-645-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20200506

Protection effects of hTLR4 IgG2 on acetaminophen-induced acute liver injury in mice

YAO Chuanxia¹, WANG Yiwen², GONG Dandan³, LI Lili¹, MA Yan⁴, KUANG Heng¹, ZHOU Tingting^{2*}, WANG Maorong^{5*}

¹Institute of Liver Disease, Anhui Medical University Affiliated with Bayi Clinical College, Hefei 230000; ²Center of Eastern Theater for Disease Control and Prevention, Nanjing 210002; ³Department of Obstetrics and Gynecology, Women's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210004; ⁴Institute of Liver Disease, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine Affiliated with Bayi Clinical College, Nanjing 210002; ⁵Institute of Liver Disease, Eastern Theater General Hospital, QinHuai Medical Area, Nanjing 210002, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to observe the protective effect of human-TLR4 IgG2 (hTLR4 IgG2) on acetaminophen (APAP) induced liver injury, and to investigate the protective mechanism of hTLR4 IgG2 in drug induced liver injury. **Methods:** The hTLR4 Fab plasmid in our laboratory were used as templates to amplify the variable region genes, and the hTLR4 IgG2 eukaryotic expression vector was constructed and transfected into CHO-S cells. The stable transfectants strains and culture supernatants were collected. Finally, hTLR4 IgG2 was purified using a protein G column. Total 18 C57BL/6J mice were randomly divided into three

[基金项目] 国家“十二五”规划项目(2013ZX09J13110-05B); 江苏省社会发展项目资助(BE2018617); 中国重点技术重点项目基金(2018YFC1200603)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: maorongwang@126.com

groups: saline group, APAP (600 mg/kg) and the APAP+hTLR4 IgG2 (5 mg/kg) group. The survival rate of mice after 24 hours intraperitoneal injection with APAP was compared. Repeat the above experimental grouping and modeling methods were repeated. Aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were also qualified, the liver was taken for pathological section and the expression of hepatic apoptosis protein was analyzed by Western blot after 8 hours intraperitoneal injection with APAP. **Results:** The hTLR4 IgG2 was successfully constructed and purified, and the results of ELISA showed that the antibody titer was 1:204 800. Compared with the APAP group, the 24-hour survival rate of mice in the APAP+hTLR4 IgG2 group was significantly increased ($P < 0.05$); the expression levels of AST, ALT and inflammatory cytokines in serum were significantly decreased ($P < 0.05$); pathological detection results showed that the inflammatory cell infiltration, hyperemia and necrosis of liver tissue were significantly improved in APAP+hTLR4 IgG2 group, and the expression of apoptotic protein was decreased in the APAP+hTLR4 IgG2 group by Western blot. **Conclusion:** hTLR4 IgG2 can effectively inhibit the expression of inflammatory factors and apoptosis, and protect liver against APAP-induced injury in mice.

[Key words] hTLR4 IgG2; acetaminophen; inflammation factor; apoptosis

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(05): 645-651]

对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是一种广泛使用的解热镇痛药, APAP可通过硫酸化和葡萄糖醛酸化,经尿液排出体外^[1]。但当人体摄入超出安全剂量时,会产生大量的N-乙酰基-p-苯醌亚胺(N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI), NAPQI能够与谷胱甘肽(glutathione, GSH)结合,导致GSH的消耗增加,引发线粒体氧化应激反应,导致细胞凋亡和肝细胞坏死^[2]。静脉注射N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是治疗APAP过量的有效方法^[3],但NAC只在APAP诱导的急性肝损伤的早期发挥作用,因此,研发更有效的药物治疗APAP诱导的急性肝损伤是当前临床研究的热点之一。

Toll样受体4(Toll-like receptors 4, TLR4)是一种先天性免疫系统中的细胞跨膜受体和病原模式识别受体,同时也是传递炎症信号的门户蛋白,可以通过识别外来的微生物和入侵的病原体,激活机体免疫应答。TLR4作为模式识别受体之一,能够结合对应的配体,启动参与炎症反应相关的基因转录,进而释放炎症因子,在炎症反应中发挥重要作用^[4-5]。本研究拟制备人源抗TLR4抗体IgG2阻断TLR4所在信号通路的传导,降低机体炎症反应,旨在探讨其在预防APAP诱导的急性肝损伤中的保护作用及其机制,为开发APAP的临床治疗药物提供更多的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究经由东部战区疾病预防控制中心实验动物伦理委员会审批(批号:2019016),符合实验室动物管理与使用准则。入组小鼠由海斯莱克动物有限

公司提供[许可证号SCXK(沪)2007-0005],检疫合格,雌雄各半。

CHO-S细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞库);限制性内切酶EcoR I、Not I (Invitrogen公司,美国);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)试剂盒,ELISA试剂盒(Sigma公司,美国);caspase-3、p53、Bcl-2和Bax抗体(Cell Signaling Technology公司,美国);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体、羊抗鼠抗体(Cell Signaling Technology公司,美国);硝酸纤维素膜(Bio-Rad公司,美国);脱脂奶粉(上海生工);Protein G亲和纯化柱(GE公司,美国);ECL化学发光液(上海生工);Western blot转膜槽(GIBCO公司,美国);SDS-聚丙烯酰胺凝胶(上海生工);蛋白电泳仪(GIBCO公司,美国);细胞培养箱(ESCO公司,新加坡);Lab system全波长酶标仪(Thermo公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

CHO-S细胞用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,培养条件为:CO₂浓度8%,细胞摇床转速120 r/min,培养温度37℃。

1.2.2 人源抗TLR4抗体IgG2真核表达载体的构建

以本实验室保存的表达人源抗TLR4抗体Fab的质粒为模板,经过PCR扩增获得重链(hTLR4-IgG2-H)和轻链(hTLR4-IgG2-L)的全基因编码序列,经Not I和EcoR I双酶切后与同样双酶切的pMH3载体相连,转化DH5 α ,通过Not I和EcoR I双酶切和测序鉴定获得人源抗TLR4抗体IgG2真核表达载体。

1.2.3 人源抗TLR4抗体IgG2的表达、纯化和鉴定

通过电转染将测序正确的重链和轻链质粒共转染进CHO-S细胞,用含G418(浓度2 mg/mL)的DMEM/F12培养液和Dot blot法进行筛选,筛选高效表达细胞株,培养定株。将定株后的细胞重悬培养,收集细胞上清液,细胞上清经0.22 μ m滤膜过滤,使用蛋白纯化系统和Hitrap Protein A预装柱按标准操作步骤纯化蛋白。洗脱液使用分子量为30 000的超滤离心管浓缩。BCA法测定蛋白浓度后分装,于-70 $^{\circ}$ C保存。SDS-PAGE鉴定人源抗TLR4抗体IgG2的纯度。

1.2.4 人源抗TLR4抗体IgG2免疫学特性分析

用重组表达的TLR4蛋白包板(0.5 μ g/mL)4 $^{\circ}$ C过夜,5%脱脂奶粉溶液封闭后,加入梯度稀释抗体,100 μ L/每孔,37 $^{\circ}$ C孵育1 h,PBST(PBS+0.5% Tween-20)洗5遍。以标记HRP的羊抗人Fc(1:2 000)为二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1 h,PBST洗5遍。加入显色液50 μ L/孔,显色约5 min加入1 mol/L H_2SO_4 终止液终止显色。用酶标仪测量450 nm的吸光度值,同时以其他抗体作为阴性对照。

1.2.5 实验动物分组、处理和鉴定

将18只C57BL/6J小鼠(体重18~22 g)随机分成3组,即生理盐水组、APAP(600 mg/kg)组和APAP+hTLR4 IgG2(5 mg/kg)组,小鼠腹腔注射APAP(600 mg/kg)前2 h,抗体组小鼠腹腔注射人源抗TLR4抗体IgG2(5 mg/kg),生理盐水组小鼠腹腔注射等量的生理盐水。24 h内密切观察监测小鼠的存活状态,计算各组的小鼠死亡率。重复上述实验分组和造模方法,在腹腔注射APAP后8 h,摘眼球取血,12 000 g离心10 min,分离血清,于-20 $^{\circ}$ C保存,分离肝组织置于福尔马林中或置于-70 $^{\circ}$ C备用。

1.2.6 肝功能指标及炎性细胞因子的检测

取上述分离的血清标本,采用全自动生化分析仪测定各组ALT和AST的表达;ELISA法测定各组炎性细胞因子:白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达水平。

1.2.7 肝组织凋亡蛋白的表达水平检测

取适量肝组织,加入RIPA裂解液,使用玻璃研磨器研磨组织,提取蛋白。BCA蛋白质试剂盒测定蛋白质浓度。调整蛋白浓度,取相同体积的蛋白质样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移到硝酸纤维素膜上。在室温下用5%脱脂奶粉溶液封闭1 h,分别与GAPDH、p53、caspase 3、Bcl-2、Bax一抗

孵育过夜。TBST洗涤3次,每次15 min。以辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠或辣根过氧化物酶标记的羊抗兔(1:2 000)作为二抗,室温孵育1 h。TBST洗3次,每次15 min,加入ECL显色液用全自动化学发光分析仪(上海Tanon公司)检测目标蛋白质的表达变化,并使用Image J软件分析条带灰度值。

1.2.8 HE染色和检测

小鼠脱颈处死后,沿中线切开腹壁暴露腹部组织,小心分离肝脏。用生理盐水冲洗肝脏后,肉眼观察肝脏形态,取肝脏左叶距离边缘小组织块0.5 cm,用浓度为10%甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,切片后在倒置显微镜下观察肝脏组织HE染色病理变化情况。

1.3 统计学方法

使用SPSS 25.0统计软件进行统计学分析,所有数据经过正态性检验,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用单因素方差(ANOVA)分析数据,两两比较采用LSD法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建了人源抗TLR4抗体IgG2真核表达载体

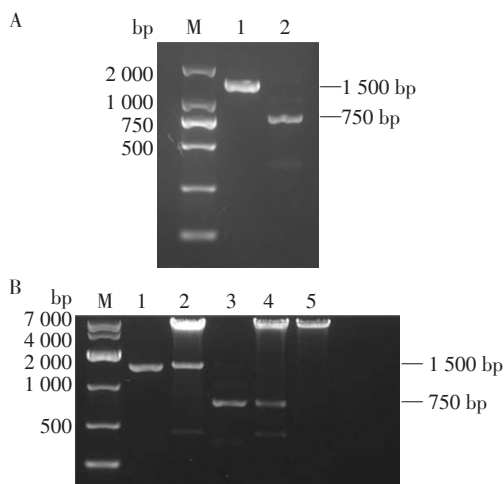
分别以抗TLR4抗体Fab质粒为模版,经过PCR扩增出hTLR4-IgG2-H和hTLR4-IgG2-L全长基因,片段大小分别为1 500 bp、750 bp,电泳结果显示目的条带与预期结果一致(图1A)。将上述PCR产物双酶切后与载体pMH3连接,筛选阳性克隆。提取质粒经Not I和EcoR I双酶切鉴定后,送公司测序,获得人源抗TLR4抗体IgG2真核表达载体(图1B)。

2.2 人源抗TLR4抗体IgG2的表达和纯化

将人源抗TLR4抗体IgG2的重组质粒转染至CHO-S细胞,经G418压力筛选和Dot blot鉴定,筛选出高表达人源抗TLR4抗体的细胞株(图2A)。将定株后的细胞扩大重悬培养,收集细胞上清,经Protein G亲和层析柱纯化,获得人源抗TLR4抗体IgG2,经SDS-PAGE凝胶电泳检测,抗体纯度达到98%以上,浓度为3 mg/mL(图2B)。

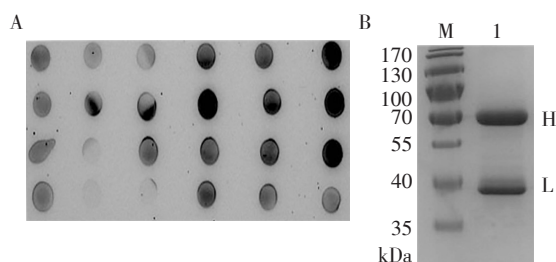
2.3 人源抗TLR4抗体IgG2免疫学特性分析

以本室表达的重组TLR4蛋白,梯度稀释(10至0.05 ng/mL)检测人源抗TLR4抗体IgG2的活性,结果显示人源抗TLR4抗体IgG2与TLR4蛋白具有良好的结合能力(图3)。



A: 1: hTLR4-IgG2-H; 2: hTLR4-IgG2-L; M: DL 2 000 bp DNA 标准分子量。B: 1: hTLR4-IgG2-H; 2: 酶切 pMH3-TLR4-H 得 hTLR4-IgG2-H; 3: hTLR4-IgG2-L; 4: 酶切 pMH3-TLR4-L 得 hTLR4-IgG2-L; 5: 线性 pMH3 质粒; M: DL 10 000 bp DNA 标准分子量。

图1 人源抗 TLR4 抗体 IgG2 真核表达载体的构建与鉴定
Figure 1 Construction and identification of hTLR4 IgG2



A: hTLR4 IgG2 的 Dot blot 检测; B: hTLR4 IgG2 的 SDS-PAGE 检测。M: Marker; 1: 人源抗 TLR4 抗体 IgG2。

图2 人源抗 TLR4 抗体 IgG2 的纯化与鉴定

Figure 2 Purification and identification of hTLR4 IgG2

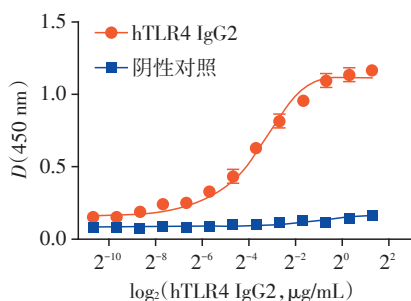


图3 ELISA 检测人源抗 TLR4 抗体 IgG2 与抗原的结合活性

Figure 3 ELISA analysis of the binding activity of hTLR4 IgG2

2.4 人源抗 TLR4 抗体对 APAP 诱导的急性肝损伤有保护作用

与对照组 100% 的存活率相比, APAP 组 24 h 存活率仅为 33.3%, 明显下降, 两组差异有统计学意义

($P < 0.05$, 图 4), 说明成功构建 APAP 诱导的急性肝损伤模型; 而 APAP + hTLR4 IgG2 组的 24 h 存活率是 83.3%, 与 APAP 组相比, 增加明显, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明腹腔注射人源抗 TLR4 抗体能降低小鼠的死亡率, 保护 APAP 诱导的急性肝损伤。与对照组相比, APAP 组血清 ALT、AST 明显升高; 与 APAP 组相比, APAP + hTLR4 IgG2 组 ALT、AST 表达水平显著降低, 抑制率分别是 68.92% 和 59.39%, 两组差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 5)。组织病理学检查显示, 与对照组相比, APAP 组肝脏有明显的病理变化, 如广泛出血、坏死、炎症细胞浸润等; 与 APAP 组相比, APAP + hTLR4 IgG2 组中的这些病理改变显著改善, 甚至与对照相比, 无显著差异 (图 6)。

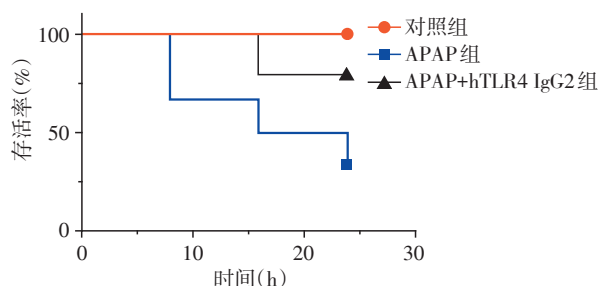


图4 人源抗 TLR4 抗体 IgG2 对 APAP 诱导小鼠肝脏损伤的小鼠存活率的影响

Figure 4 Effect of hTLR4 IgG2 on survival rate of APAP-induced liver injury in mice

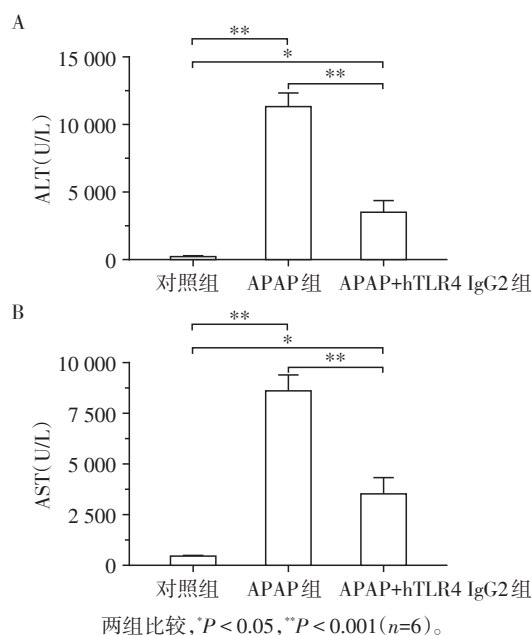


图5 人源抗 TLR4 抗体 IgG2 对 APAP 诱导小鼠肝脏损伤的血清 AST、AST 水平的影响

Figure 5 Effect of hTLR4 IgG2 on serum AST and AST levels in APAP-induced liver injury in mice

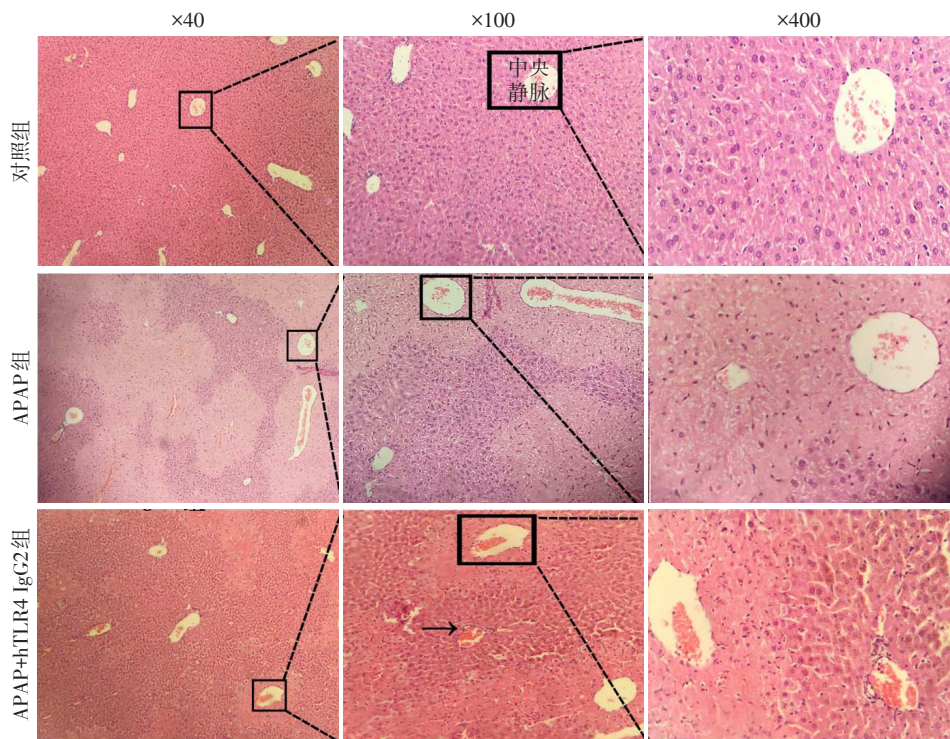


图6 HE染色观察人源抗TLR4抗体IgG2抗体对APAP诱导小鼠肝脏损伤的形态学变化
Figure 6 Morphological changes of hTLR4 IgG2 on APAP-induced liver injury in mice(HE)

2.5 人源抗TLR4抗体IgG2保护APAP诱导肝损伤的机制分析

ELISA 检测结果显示,APAP组促炎因子IL-1、IL-6、TNF- α 的分泌明显增加,APAP+hTLR4 IgG2组IL-1、IL-6、TNF- α 的表达水平较APAP组显著降低,抑制率分别是43.86%、70.44%和30.82%,两组差异具有统计学意义($P < 0.05$,图7)。Western blot结果显示,用APAP处理的小鼠肝脏中凋亡蛋白caspase 3、p53、Bax 和 Bcl-2 的表达水平高于对照组;与APAP组相比,APAP+hTLR4 IgG2组肝脏相关凋亡蛋白caspase 3、p53、Bax 和 Bcl-2 的表达降低($P < 0.05$,图8)。以上结果表明,人源抗TLR4抗体可以通过抑制细胞凋亡和炎症因子的表达来保护由APAP引起的肝损伤。

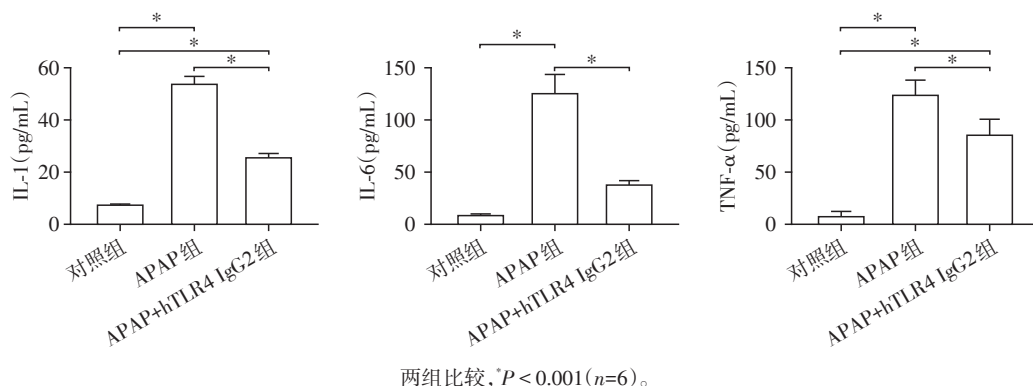
3 讨论

药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是指由各类处方或非处方的化学药物、生物制剂、传统中药、保健品及其代谢产物等所诱发的肝损伤^[6]。DILI作为临床上最常见的药物不良反应(adverse drug reactions, ADR)之一,发生率逐年增高^[7]。APAP是一种广泛使用的解热镇痛药,在治疗剂量下使用时,大部分通过葡萄糖醛酸化和硫酸化代谢,少量通过细胞色素P450系统,特别是CYP2E1

转化为活性代谢物NAPQI,与GSH结合后从肝内代谢清除,对机体不造成任何伤害。但当机体摄入过量的APAP,葡萄糖醛酸化和硫酸化代谢不堪重负,过量的APAP通过细胞色素P450系统代谢,产生高水平的NAPQI,然后消耗细胞GSH形成线粒体蛋白质加合物,抑制线粒体电子传递链(electron transport chain,ETC),导致电子泄漏和氧化应激,从而导致肝脏损伤^[8-9]。

TLR是一类在炎症反应的发生中起重要作用的受体家族,可识别PAMP和DAMP,能够调节促炎细胞因子和趋化因子的表达^[10]。许多研究表明,由炎症反应驱动的免疫系统可导致细胞凋亡,加速细胞衰老,促进组织硬化,最终导致肝肾功能障碍^[11]。哺乳动物抗体库包含具有不同功能特性的多个同种型和亚类的免疫球蛋白分子(Ig)。其中IgG类抗体包含4个单独的同种型或亚类,分别是IgG1(约60%)、IgG2(约25%)、IgG3(约10%)和IgG4(约5%),这4个亚类具有相似的结构,都是2个抗原结合(Fab)臂通过铰链区连接到单个恒定域(Fc),所以功能也相似,但是,IgG2具有独特的治疗作用,因为它主要与细菌荚膜多糖结合^[12]。此外,研究发现,IgG2比IgG1耐药性更佳^[13]。

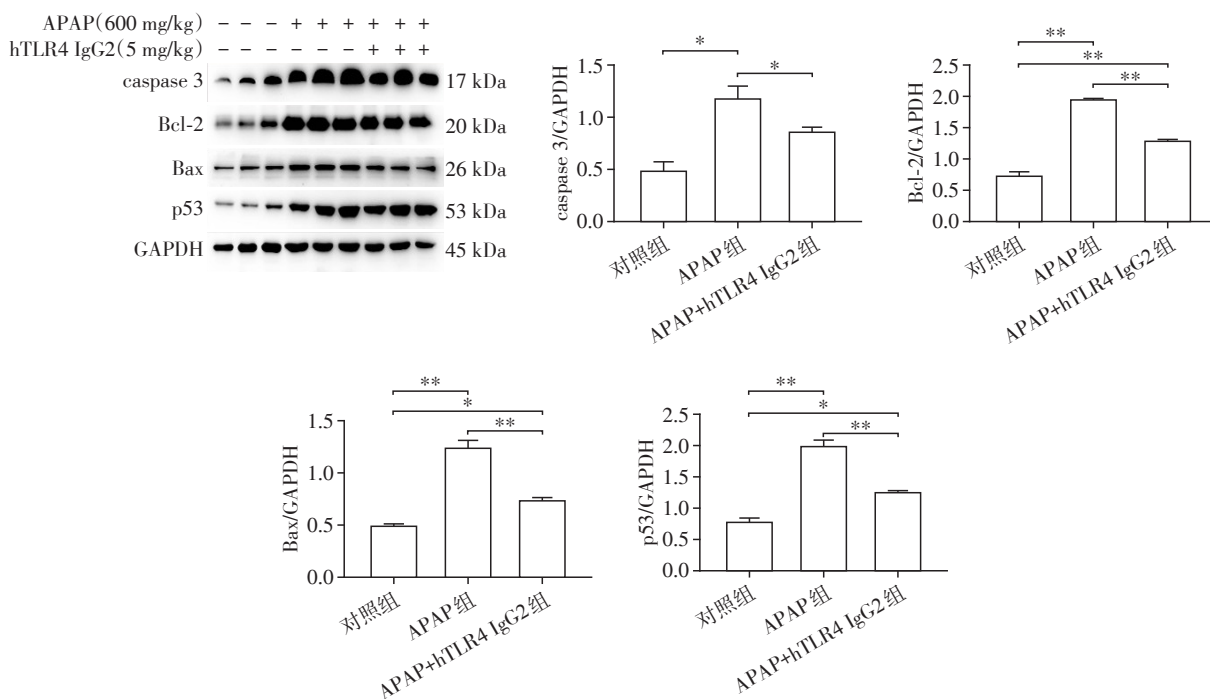
急性肝损伤以小叶炎症性坏死(点灶状、融合、桥接或多小叶坏死)为特点,可伴有细胞凋亡,病变



两组比较, * $P < 0.001$ ($n=6$)。

图7 人源抗TLR4抗体IgG2对APAP诱导小鼠肝脏损伤的血清炎症因子IL-1、IL-6、TNF-α水平的影响

Figure 7 Effect of hTLR4 IgG2 on serum levels of inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF-α induced by APAP in mice



两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图8 人源抗TLR4抗体IgG2对APAP诱导小鼠肝脏损伤的肝脏凋亡蛋白caspase3、Bcl-2、BAX、p53表达水平的影响

Figure 8 Effect of hTLR4 IgG2 on the expression levels of hepatic apoptosis proteins caspase3, Bcl-2, BAX and p53 induced by APAP in mice with liver injury

主要累及小叶中心。本研究的小鼠肝脏病理检查显示, APAP可导致肝脏发生广泛出血、坏死、炎症细胞浸润等变化; 而人源抗TLR4抗体IgG2可以明显减少肝组织出血、坏死及炎症细胞浸润等症状。血清中ALT和AST的表达水平可以作为反映肝损伤的敏感指标, 本研究ELISA结果显示, 腹腔单独注射APAP能够引起小鼠血清ALT和AST的表达显著增加, 而人源抗TLR4抗体IgG2可以抑制ALT和AST的表达。本研究还发现, APAP组小鼠血清中炎症因子IL-1、IL-6和TNF-α的表达明显增加, 而人源

抗TLR4抗体IgG2预处理组小鼠血清中IL-1、IL-6和TNF-α的表达降低, 表明人源抗TLR4抗体IgG2能够抑制APAP诱导的炎症反应。本研究结果显示, TLR4抗体IgG2对APAP诱导的肝损伤有显著的保护作用。

肝细胞凋亡主要由细胞死亡受体途径引起的, 外部损伤信号激活自杀相关因子配体(factors associated suicide ligand, FasL)与自杀相关因子受体(factors associated suicide, Fas)的结合, 触发受体的三聚化, 形成死亡诱导信号复合物, 通过衔接分子

域蛋白(fas associated death domain protein, FADD)连接procaspase 8,通过自催化处理产生caspase 8, caspase 8将Bcl-2凋亡家族成员Bid切割形成tBid,并转移到线粒体,启动由Bax和Bak促进的线粒体外膜透化,引发细胞色素C的释放,促进凋亡小体的形成^[14]。有研究表明肝脏可以通过激活TLR4信号通路上的调脂球蛋白A从而介导APAP诱导的肝损伤^[15]。通过抑制炎症和细胞凋亡可以减轻急性肝损伤^[16-18]。本研究结果显示,与对照组比较,APAP组凋亡相关蛋白caspase 3、p53、Bax和Bcl-2的表达显著增加;用人源抗TLR4抗体IgG2预处理后,caspase 3、p53、Bax和Bcl-2的表达水平显著下降。由此可见,人源抗TLR4抗体IgG2可以通过调节肝脏中caspase 3、p53、Bax和Bcl-2的表达来抑制APAP诱导的肝细胞凋亡,从而对APAP诱导的急性肝损伤发挥保护作用。

综上所述,人源抗TLR4抗体IgG2对APAP诱导的急性肝损伤具有保护作用,其机制可能是通过抑制炎症因子的表达和细胞凋亡从而起到保护肝脏的作用。因此,人源抗TLR4抗体IgG2可以作为一种候选药物,为开发APAP的临床解毒剂提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] BUNCHORNTAVAKUL C, REDDY K R. Acetaminophen-related hepatotoxicity [J]. Clin Liver Dis, 2013, 17(4): 587-607
- [2] TRETTIN A, BATKAI S, THUM T, et al. Trapping of NAPQI, the intermediate toxic paracetamol metabolite, by aqueous sulfide (S(2)(-)) and analysis by GC-MS/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 963: 99-105
- [3] VALE JA, MEREDITH T J, CROME P, et al. Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice in paracetamol poisoning? [J]. Br Med J, 1979, 2(6202): 1435-1436
- [4] KORDJAZY N, HAJ-MIRZAIAN A, ROHANI M M, et al. Role of toll-like receptors in inflammatory bowel disease [J]. Pharmacol Res, 2018, 129: 204-215
- [5] 杨 柳, 宋红丽. Toll样受体4与肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中华肝病杂志, 2019, 27(6): 473-476
- [6] BJÖRNSSON E S. Epidemiology, predisposing factors, and outcomes of drug induced liver injury [J]. Clin Liver Dis, 2020, 4(1): 1-10
- [7] 王若飞, 郝坤艳, 于乐成. 江苏地区药物性肝损伤回顾性分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(11): 1554-1557
- [8] HINSON J A, ROBERTS D W, JAMES L P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis [J]. Handb Exp Pharmacol, 2010, 196: 369-405
- [9] MCGILL M R, JAESCHKE H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis [J]. Pharm Res, 2013, 30: 2174-2187
- [10] BAJT M L, FARHOOD A, LEMASTERS J J, et al. Mitochondrial bax translocation accelerates DNA fragmentation and cell necrosis in a murine model of acetaminophen hepatotoxicity [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324: 8-14
- [11] WADA J, MAKINO H. Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(1): 13-26
- [12] BARRETT D J, AYOUB E M. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides [J]. Clin Exp Immunol, 1986, 63(1): 127-134
- [13] KENNETH W W, HOSSEIN S M, GREGORY E A, et al. Pharmacokinetic comparison of a diverse panel of non-targeting human antibodies as matched IgG1 and IgG2 isotypes in rodents and non-human primates [J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0217061
- [14] TUNG C L, JU D T, Velmurugan B K, et al. Carthamus tinctorius L. extract activates insulin-like growth factor-I receptor signaling to inhibit FAS-death receptor pathway and suppress lipopolysaccharides-induced H9c2 cardiomyoblast cell apoptosis [J]. Environ Toxicol, 2019, 34(12): 1320-1328
- [15] LEE K Y, LEE W, JUNG S H, et al. Hepatic upregulation of fetuin-A mediates acetaminophen-induced liver T injury through activation of TLR4 in mice [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 166: 46-55
- [16] YU H, ZHENG L, YIN L, et al. Protective effects of the total saponins from Dioscorea nipponica Makino against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(2): 233-244
- [17] ZHANG J, SONG Q, HAN X, et al. Multi-targeted protection of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by tannic acid [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 47: 95-105
- [18] LEE H C, YU H P, LIAO C C, et al. Escin protects against acetaminophen-induced liver injury in mice via attenuating inflammatory response and inhibiting ERK signaling pathway [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(8): 5170-5182

[收稿日期] 2019-10-11