

吲哚丙酸通过促进调节性 T 细胞水平 减轻硫代乙酰胺诱导的急性肝损伤

周波, 阮一, 朱宏达, 杨勇, 杨沔

【摘要】目的 探讨吲哚丙酸(IPA)减轻硫代乙酰胺(TAA)诱导急性肝损伤(ALI)的潜在机制,并分析调节性 T 细胞(Treg)在其中发挥的作用。**方法** 将 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠按随机数表法分为对照组(注射 0.9% 氯化钠注射液)、TAA 组(TAA 100 mg/kg 腹腔注射)、IPA 组(TAA 建模后 IPA 20 mg/kg 灌胃),每组 10 只。24 h 后取小鼠血清和肝组织,ELISA 法检测各组丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转氨酶(AST)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、转化生长因子- β (TGF- β)及 IL-10 的水平,病理学鉴定肝损伤情况,免疫组织荧光检测肝内 Treg 水平。体外实验获取小鼠脾脏并分选幼稚 T 细胞(Naïve T)诱导 Treg,培养过程加入 IPA,ELISA 检测处理后的 TGF- β 、IL-10 及相对 RNA 表达水平。**结果** IPA 能显著降低 TAA 诱导的 ALI 水平,IPA 组 ALT、AST 及病理评分(Suzuki)明显低于 TAA 组,免疫荧光显示 IPA 组肝内表现更高的 Treg 水平(均 $P < 0.05$)。ELISA 检测结果显示 IPA 组小鼠肝脏促炎因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 显著下降,抑炎因子 TGF- β 、IL-10 水平明显上调(均 $P < 0.05$)。体外实验显示 IPA 能促进 Treg 分化并表达更高的叉状头转录因子 3(Foxp3)水平,同时促进抑炎因子 TGF- β 、IL-10 分泌及相应 RNA 表达。**结论** IPA 通过促进 Treg 的分化及抑炎因子 TGF- β 、IL-10 分泌,调节肝内免疫平衡,抑制肝内炎症反应进而减轻 TAA 诱导的 ALI。

【关键词】 吲哚丙酸;调节性 T 细胞;硫代乙酰胺;肝损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.05.004

【中图分类号】 R657.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)05-0576-06

Indolepropionic acid alleviates thioacetamide induced acute liver injury by promoting regulatory T cell levels

ZHOU Bo, RUAN Yi, ZHU Hongda, YANG Yong, YANG Mian (Ningbo Medical Centre Lihuili Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the potential mechanisms of indolepropionic acid (IPA) in mitigating thioacetamide (TAA)-induced acute liver injury, and analyze the role of regulatory T cells (Treg) in this process. **Methods** SPF-grade male C57BL/6 mice were randomly divided into a control group (injected with saline), a TAA group (TAA 100 mg/kg intraperitoneal injection), and an IPA group (TAA-induced model followed by IPA 20 mg/kg gavage), with ten mice in each group. Mouse serum and liver tissues were collected after 24 hours. alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), pro-inflammatory factors [interferon(IFN- γ), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin(IL)-1 β , IL-6], and anti-inflammatory factors [transforming growth factor(TGF- β), IL-10] levels were measured by ELISA. Liver injury was assessed by histologically, and liver resident Treg levels were detected by immunofluorescence. In vitro, mice spleen was obtained and Naïve T cells (Naïve T) were selected to induce Treg. IPA was added during the culture process to explore its effect on Treg differentiation. ELISA was used to measure the secretion levels of anti-inflammatory factors TGF- β , IL-10 and the corresponding RNA expression levels. **Results** IPA significantly reduced TAA-induced acute liver injury. Liver function index ALT, AST, and pathological scores in the IPA group were significantly lower than those in the TAA group (all $P < 0.05$). Immunofluorescence revealed higher level of Treg in the liver of the IPA group ($P < 0.05$). ELISA results showed that pro-inflammatory factors IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 in the liver of mice in the IPA group significantly decreased, while anti-inflammatory factors

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2021KY1036);宁波市科技计划项目(2023J231)

作者单位: 315040 宁波,宁波市医疗中心李惠利医院

通信作者: 杨沔, Email: lhyangmian@nbu.edu.cn

TGF- β , IL-10 levels significantly increased(all $P < 0.05$). In vitro experiments showed that IPA promoted Treg differentiation and expressed higher levels of Foxp3, as well as promoting the secretion and corresponding RNA expression of anti-inflammatory factors TGF- β , IL-10. **Conclusions** IPA alleviated TAA induced acute liver injury by promoting the differentiation of Treg and the anti-inflammatory factor(TGF - β , IL-10) secretion, regulating liver immune balance and inhibiting liver inflammatory response.

【Key words】 Indolepropionic acid; Regulatory T cells; Thioacetamide; Liver injury

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(5):576-581]

急性肝损伤(acute liver injury, ALI)是指病毒、药物、酒精、缺血再灌注损伤和自身免疫性肝病等多种因素导致的急性肝脏功能异常,严重或持续的肝损伤最终导致肝功能衰竭。区域免疫异常和紊乱是 ALI 发病和进展的重要因素,直接导致肝细胞合成、解毒和转化等功能障碍和衰竭。肠道通过门静脉系统与肝脏直接相连,很多肝脏疾病都与肠道黏膜损伤相关;肠道微生物也在多种肝病中发挥免疫调节作用^[1-2]。随着科学研究的不断深入,越来越多的文献报道将机体的免疫系统与肠道菌群联系起来,认为肠道菌群与免疫系统密切关联,共同影响疾病的发生发展^[3]。

肠道菌群及其代谢产物的免疫调控作用是目前免疫学术界的前沿热点。既往研究提示肠道代谢产物吲哚丙酸(indolepropionic acid, IPA)在维持肠道免疫稳态方面发挥重要的作用。IPA 通过结合芳香烃受体调节肠道免疫,维持免疫平衡,自 2009 年被发现以来就得到了针对组织炎性损伤等方面的广泛研究^[4-5]。然而 IPA 在肝脏免疫中的作用及机制尚未完全阐明。本研究通过硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)建立 ALI 小鼠模型,进一步探讨肠道菌群产物 IPA 通过肠-肝轴入肝后对肝内免疫系统的影响及其可能的分子机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠(6~8 周龄、20~25 g)30 只,由南京医科大学实验动物中心提供,实验动物使用许可证:SYXK(苏)2020-0022。所有动物在建模之前至少在饲养环境中适应 2 d。饲养环境:SPF 级环境,温度控制在 20~25℃,空气湿度控制在 50%~70%,正常昼夜更替采用 12 h 光照-12 h 无光照交替进行的方式模拟,自由摄食饮水,食物及饮水均符合动物饲养场所的相关标准。本研究动物实验通过南京医科大学实验

动物福利伦理委员会批准(伦理批号:IACUC-2402002)。

1.2 材料和试剂 DMEM 细胞培养基、RPMI 细胞培养基、胎牛血清(美国赛默飞公司);转化因子- β (TGF- β)、白介素-10(IL-10)等 PCR 引物(上海捷瑞生物工程公司);HE 染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(浙江迈新公司);RNA 逆转录试剂盒、SYBR[®]Premix(南京诺唯赞生物公司)、蛋白裂解液、聚丙烯酰胺凝胶配置试剂盒(南通碧云天生物公司)。

1.3 动物模型制备 ALI 模型建立主要采用 TAA(美国 MCE 公司)诱导。随机分为对照组(注射 0.9%氯化钠注射液)、TAA 组(TAA 200 mg/kg 腹腔注射)、IPA 组(TAA 建模后 IPA 20 mg/kg 灌胃),每组 10 只,24 h 后处死获取小鼠血清和肝脏组织。肝脏组织甲醛固定 24 h 后切片,进行 HE 染色及免疫荧光检测。

1.4 幼稚 T 细胞(Naïve T)的分选 小鼠处死后脾脏迅速切除并研磨成细胞悬液。使用 Naïve T 分选试剂盒(美国美天旎公司)从细胞悬液中分离 CD4⁺CD45RA⁺ Naïve T 细胞。将 Naïve T 细胞诱导为 Treg。Naïve 用完全培养基(10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素溶液的淋巴细胞无血清培养基)在 5×10⁵/ml 下培养 CD4⁺T 细胞。向 10⁶ 个细胞中加入 25 μ l 小鼠 T-Activator CD3/CD28 Beads(美国赛默飞公司)、100 IU/ml IL-2(美国赛默飞公司)、1 ng/ml TGF- β (美国赛默飞公司)、100 nmol/ml 维甲酸(美国赛默飞公司),IPA 组需加入 50 μ mol/L IPA(美国 MCE 公司)。孵育 48 h 后,加入 1 体积完全培养基。在总体积中加入 300 IU/ml IL-2 和 50 nmol/ml 雷帕霉素(美国赛默飞公司)。每天观察培养液,如果颜色变黄,则同前加入 IL-2、维甲酸和完全培养基。

1.5 酶联免疫分析(ELISA)检测 造模完成后,经小鼠眼眶取得全血,静置 2 h 后,4℃ 1 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液于 EP 管中。采用 ELISA(江

苏晶美生物科技有限公司)进行 ALT、AST 测定。采用 ELISA (R&D Systems 公司)检测血清 IL-10、TGF-β、TNF-α、IL-1β 及 IL-6 水平。所有操作步骤遵照试剂盒中说明书。

1.6 HE 染色与免疫荧光 小鼠肝组织采用 4% 甲醛固定,分级乙醇脱水,并包埋在石蜡中。4 μm 厚度切片后进行 HE 染色,根据 Suzuki 评分评价肝损伤程度。切片用一抗 4% 的 NDS/PBST 中稀释过夜,用二抗在 2% NDS/PBST 中稀释 2 h 后,用 PBS 冲洗,采用奥林巴斯 Fluoview 1000 共聚焦显微镜成像。使用的一抗为兔抗 Foxp3 抗体(美国默克公司),按 1:500 稀释;二抗为辣根过氧化物酶山羊抗兔 IgG (美国默克公司),按 1:500 稀释。

1.7 流式细胞检测 采用流式细胞术分析 IPA 诱导 Naïve T 细胞分化为 iTreg 细胞的效果。淋巴细胞染色前用 PBS 洗涤 2 次,4℃ 进行抗 CD4-BUV395 和抗 CD25-BV605 表面染色 30 min。在固定和通透化之后,加入抗 Foxp3 -BB700 荧光抗体,并在 4℃ 孵育 30 min。细胞分选使用 FACS 细胞仪(美国碧迪公司)。所有抗体均购自美国赛默飞公司。数据分析采用 FlowJo(美国 Tree Star 公司,版本号 10.0.7)。

1.8 逆转录和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析 按说明书使用 Trizol 试剂(美国赛默飞公司)提取

RNA,并使用逆转录试剂盒(南京诺唯赞公司)逆转录为 cDNA。采用 SYBR green(南京诺唯赞公司)在 Step OnePlus real-time PCR 系统(瑞士罗氏公司)上进行实时定量 PCR。以 GAPDH 作为内对照,用相对定量法计算表达量的变化倍数,引物序列见表 1。

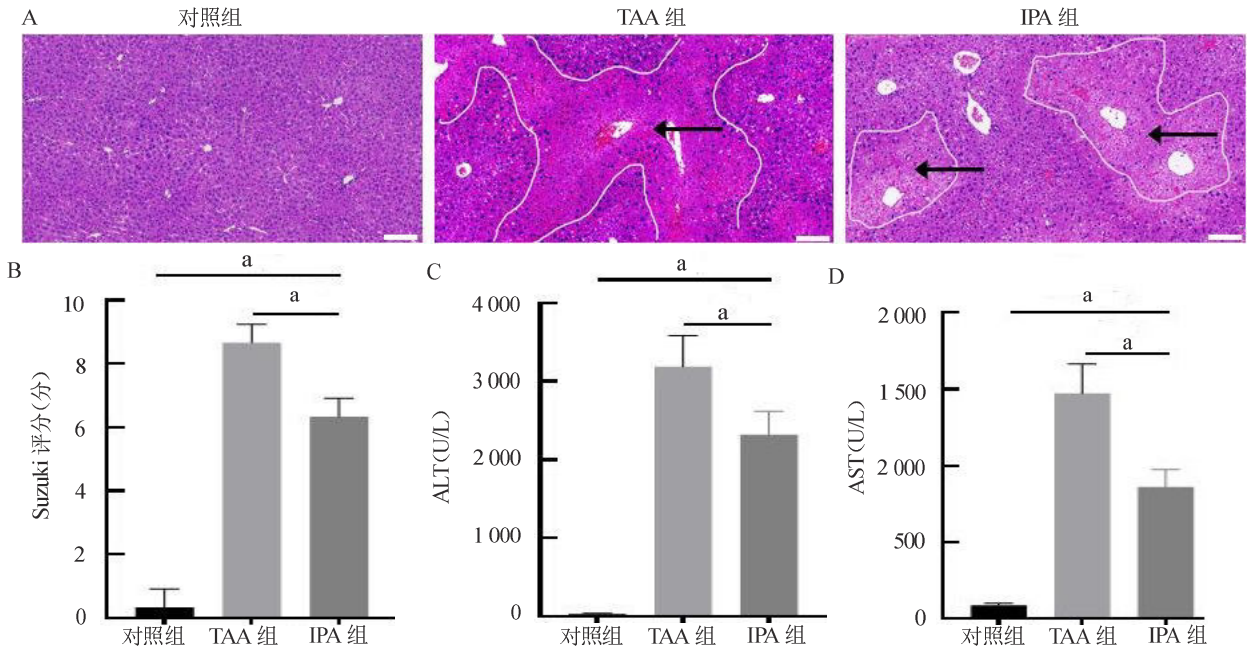
1.9 统计方法 采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism (version 9.3.1)进行数据分析,计量资料以均数±标准差表示,采用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IPA 对 ALI 的影响 TAA 可以造成严重的 ALI,HE 染色显示肝细胞明显疏松化,中央静脉周围出现点状坏死,分布较广,汇管区有少量炎性细胞浸润。IPA 组小鼠肝损伤程度、病理 suzuki 评分明显低于 TAA 组,血清 ALT、AST 水平均低于 TAA 组,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05),见图 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列表(5'→3')
TGF-β	上游引物:5'-CCACCTGCAAGACCATCGAC-3'
	下游引物:5'-CTGGCGAGCCTTAGTTTGAC-3'
IL-10	上游引物:5'-CTTACTGACTGGCATGAGGATCA-3'
	下游引物:5'-GCAGCTCTAGGAGCATGTGG-3'
GAPDH	上游引物:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
	下游引物:5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'



注: A 为 0.9%氯化钠注射液、TAA、TAA+IPA 处理 C57BL/6 小鼠的肝组织(HE 染色,×20); B 为 0.9%氯化钠注射液、TAA、TAA+IPA 处理 C57BL/6 小鼠的肝组织 suzuki 评分; C~D 为 0.9%氯化钠注射液、TAA、TAA+IPA 处理 C57BL/6 小鼠的血清 ALT、AST 表达水平。a*P* < 0.05

图 1 IPA 处理减轻 TAA 诱导的急性肝损伤表现

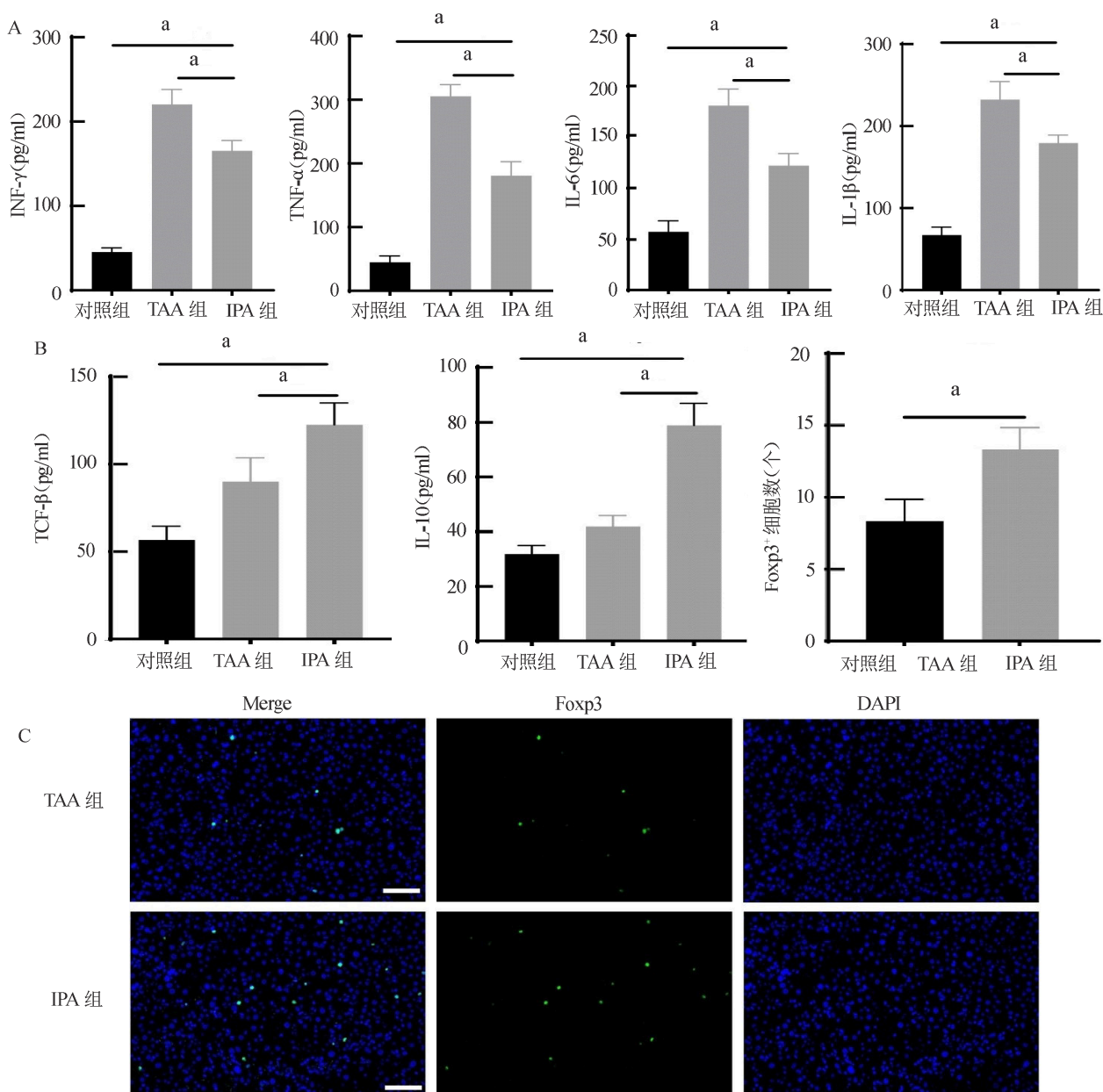
2.2 IPA 对肝脏内 Treg 水平及相应抑炎因子的影响 IPA 组的小鼠促炎因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 显著下降,抑炎因子 TGF- β 、IL-10 水平明显上调(均 $P < 0.05$),见图 2A ~ B。免疫荧光检测发现 IPA 灌胃干预后能够增加肝脏内 Treg 细胞数量(均 $P < 0.05$),见图 2C。

2.3 IPA 对 Treg 的体外分化及抑炎因子分泌的影响 流式检测发现 IPA 能够促进 Foxp3 表达进而导致 Treg 分化增加,见图 3A。同时 ELISA 检测显示 TGF- β 、IL-10 分泌明显增加,抑炎因子对应的 RNA

水平表达水平显著上调,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 3B ~ C。

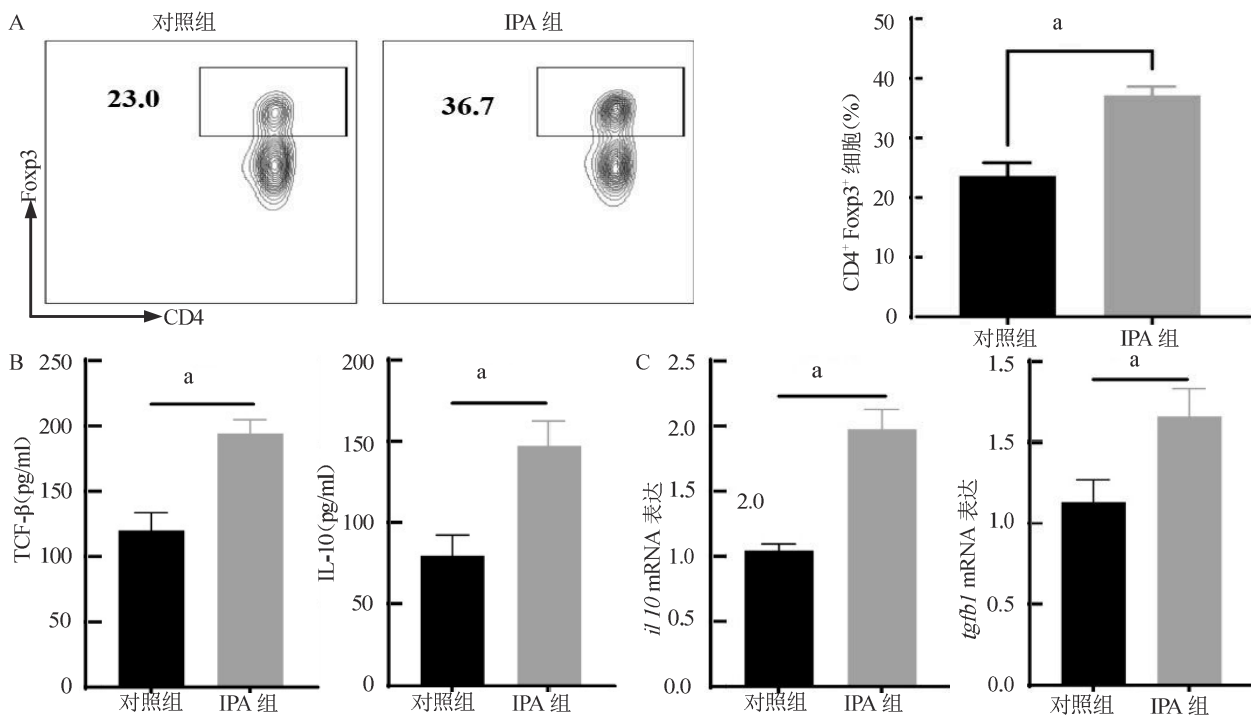
3 讨论

越来越多的研究表明,肠道微生物对肝脏生理和代谢稳态具有关键作用^[6]。肝脏与肠道在解剖结构和生理功能上密切相关,肠道通过门静脉与肝脏直接相连,肠道吸收的营养物质、毒素以及肠道菌群产物等等都经门静脉入肝;此外,肝脏理论上也通过胆管与肠道直接相通。这一相互关联紧密联系的系



注: A ~ B 为各组血清促炎因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及抑炎因子 TGF- β 、IL-10 表达水平; C 为 TAA、TAA+IPA 处理 C57BL/6 小鼠 Foxp3⁺细胞的免疫荧光图(免疫荧光染色, $\times 40$)。a $P < 0.05$

图 2 IPA 处理调控 ALI 组织的细胞因子及增加 Treg 细胞数量



注:A为IPA处理NaïveT细胞诱导Treg第3天的CD4⁺Foxp3⁺流式图及频率统计图;B为IPA处理NaïveT细胞诱导Treg第3天的体外培养体系上清液中TGF-β与IL-10表达水平;C为IPA处理NaïveT细胞诱导Treg第3天的细胞*Tgfb1*与*il10*的mRNA表达水平。 $aP < 0.05$

图3 体外培养IPA对Treg分化及功能的影响

统被称为肠-肝轴,肠道微生态就是通过肠-肝轴来调控肝脏的免疫和代谢,影响疾病的发生发展^[7]。

肠道代谢产物IPA是由产孢梭菌、拟杆菌等肠道共生菌代谢色氨酸产生,是一种具有临床应用价值的天然化合物。既往研究表明IPA在多种疾病的病理生理中发挥重要作用。有研究发现IPA可以抑制NF-κB信号传导,降低促炎细胞因子水平,如IFN-γ、TNF-α、IL-1β和IL-6,从而抑制肝脏炎症和肝损伤^[8];另有研究发现IPA具有细胞抑制特性,能降低乳腺肿瘤细胞的增殖、运动和转移形成^[9];IPA还可以促进先天免疫系统巨噬细胞的吞噬功能从而减轻脓毒症^[10]。可见IPA在免疫微环境中似乎扮演着重要的负性调控角色,但IPA在ALI中的作用尚无明确的研究。

本研究通过TAA建立经典的ALI模型,然后通过IPA灌胃干预,通过检测AST、ALT和HE染色,发现IPA可以明显减轻TAA诱导的ALI。既往研究发现清除Treg细胞导致促炎加重肝损伤,过继转移Treg细胞能减轻乙酰氨基酚诱导的肝损伤^[11]。IPA在减少肾脏Th17细胞和增加Treg细胞方面的起直接作用,进而改善钠处理和降低血压^[12]。Treg是一种具有免疫调节功能的T细胞亚群,它的特征是表

达谱系特异性转录因子Foxp3,主要分为天然型调节性T细胞(nTreg)和诱导型调节性T细胞(iTreg)。Treg主要通过抑制其他免疫细胞(例如Teff细胞、自然杀伤细胞和抗原呈递细胞)的能力来调节免疫反应,同IPA一样发挥免疫负性调控作用^[13]。本研究通过免疫荧光检测,发现IPA能逆转并上调TAA处理后肝内Treg细胞水平。

虽然本研究确立了Treg在组织内的数量增加,但是必须明确免疫抑制功能也同样提高。Treg通过分泌抑炎细胞因子IL-10、TGF-β发挥免疫抑制作用^[14-15],并且IL-10、TGF-β在组织中的表达增高有利于减轻对乙酰氨基酚诱导的肝损伤^[16]。所以本研究从该角度探究Treg功能的水平变化,通过获取IPA处理的肝组织进行ELISA检测两种抑炎因子水平,发现与Treg数量变化一致,都出现明显的增高,提示IPA在促进Treg在肝损伤组织中的富集存在重要作用。

本研究通过体外实验,为进一步明确IPA与Treg之间的具体联系。构建体外Treg诱导培养体系,发现IPA可以促进Treg诱导分化,同时培养上清中TGF-β、IL-10分泌明显增加,两种抑炎因子对应的RNA水平表达水平显著上调。所以IPA无论是在体外还是体内环境都可以促进IL-10、TGF-β两种抑

炎细胞因子的分泌。上述结果说明,IPA 不仅可以增加肝损伤组织中 Treg 的数量,还能增强其免疫抑制功能。

综上所述,IPA 可以减轻 TAA 诱导的急性肝损伤,其通过肠-肝轴,经门静脉入肝,介导肝脏特异性 Treg 生成,同时降低促炎细胞因子水平,增加抑炎细胞因子 TGF- β 、IL-10 分泌,最终形成肝内特异性免疫平衡,抑制免疫和炎症反应,缓解肝组织损伤。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 周波、阮一:实验操作、论文撰写;朱宏达、杨勇:数据整理、统计学分析;周波、杨沔:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] PABST O, HORNEF M W, SCHAAP F G, et al. Gut-liver axis: Barriers and functional circuits[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(7): 447-461.
- [2] ZHANG X, COKER O O, CHU E S, et al. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites[J]. *Gut*, 2021, 70(4): 761-774.
- [3] WU G Y, WINS, THAN T A, et al. Gut microbiota and liver injury (I)—Acute liver injury [M]//*Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer Singapore, 2020: 23-37.
- [4] CAO B, ZHAO R Y, LI H H, et al. Oral administration of asparagine and 3-indolepropionic acid prolongs survival time of rats with traumatic colon injury[J]. *Military Med Res*, 2022, 9: 37.
- [5] VENKATESH M, MUKHERJEE S, WANG H, et al. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4[J]. *Immunity*, 2014, 41(2): 296-310.
- [6] LI M M, ZHOU Y, ZUO L, et al. Dietary fiber regulates intestinal flora and suppresses liver and systemic inflammation to alleviate liver fibrosis in mice[J]. *Nutrition*, 2021, 81: 110959.
- [7] SINGH T P, KADYAN S, DEVI H, et al. Gut microbiome as a therapeutic target for liver diseases[J]. *Life Sci*, 2023, 322: 121685.
- [8] ZHAO Z H, XIN F Z, XUE Y Q, et al. Indole-3-propionic acid inhibits gut dysbiosis and endotoxin leakage to attenuate steatohepatitis in rats[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(9): 1-14.
- [9] SKRIZ, MIKÓE, KOVÁCS T, et al. Indolepropionic acid, a metabolite of the microbiome, has cytostatic properties in breast cancer by activating AHR and PXR receptors and inducing oxidative stress[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(9): E2411.
- [10] HUANG Z B, HU Z, LU C X, et al. Gut microbiota-derived indole 3-propionic acid partially activates aryl hydrocarbon receptor to promote macrophage phagocytosis and attenuate septic injury[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1015386.
- [11] WANG X, SUN R, CHEN Y, et al. Regulatory T cells ameliorate acetaminophen-induced immune-mediated liver injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 25(2): 293-301.
- [12] BARANWAL G, GOODLETT B L, ARENAZ C M, et al. Indole propionic acid increases T regulatory cells and decreases T helper 17 cells and blood pressure in mice with salt-sensitive hypertension[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9192.
- [13] DONG Y, YANG C, PAN F. Post-translational regulations of Foxp3 in Treg cells and their therapeutic applications[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 626172.
- [14] ZHU J F, PAUL W E. Paul CD4 T cells: fates, functions, and faults[J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1557-1569.
- [15] MANGODT T C, VAN HERCK M A, NULLENS S, et al. The role of Th17 and Treg responses in the pathogenesis of RSV infection[J]. *Pediatr Res*, 2015, 78(5): 483-491.
- [16] MONTI-ROCHA R, CRAMER A, GAIO LEITE P, et al. SOCS2 is critical for the balancing of immune response and oxidative stress protecting against acetaminophen-induced acute liver injury[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 3134.

收稿日期:2024-03-07

(本文编辑:吴迪汉)