

许智玲,张斌,张顺财. NOD2 促进二乙基亚硝胺诱导小鼠肝组织炎症的机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 730-737.

Xu ZL, Zhang B, Zhang SC. Mechanism of NOD2 on the inflammation of mouse liver induced by diethylnitrosamine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 730-737.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.004

# NOD2 促进二乙基亚硝胺诱导小鼠肝组织炎症的机制研究

许智玲<sup>1</sup>,张斌<sup>1\*</sup>,张顺财<sup>2\*</sup>

(1. 复旦大学附属中山医院青浦分院感染科,上海 201700; 2. 复旦大学附属中山医院消化科,上海 200032)

**【摘要】** 目的 探讨肝细胞中的模式识别受体 NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2, NOD2) 在肝炎症反应过程中的作用及机制。方法 以二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 注射的 NOD2 基因敲除小鼠为 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组, DEN 注射的 B6/JNju-*Nod2*<sup>em1Cflox</sup>/Gpt(*Nod2*<sup>fl/fl</sup>) 小鼠为 *Nod2*<sup>fl/fl</sup> 模型组, 未注射 DEN 的 NOD2 基因敲除小鼠为 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 组, 未注射 DEN 的 *Nod2*<sup>fl/fl</sup> 小鼠为 *Nod2*<sup>fl/fl</sup> 组。使用 HE 染色检测肝病理损伤, 使用 ALT 和 AST 试剂盒检测血清中 ALT 和 AST 水平变化; 对小鼠的肝组织进行 F4/80 免疫组化染色检测肝炎细胞的数量以及 qPCR 法检测肝细胞炎症因子的基因表达水平及肝细胞 NOD2 的表达水平; Ki67 免疫组化染色和 TUNEL 染色检测 DEN 对肝细胞增殖及凋亡的影响; Western Blot 检测肝组织中 NF-κB、MAPK 和 STAT3 信号通路相关蛋白分子的表达。**结果** 与 *Nod2*<sup>fl/fl</sup> 模型组相比, *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组小鼠肝损伤情况明显减轻, 表现为细胞坏死及空泡形成明显减少, 血清 ALT 和 AST 水平均明显下降 ( $P < 0.01$ ); 另外与 *Nod2*<sup>fl/fl</sup> 模型组相比, *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组中肝组织炎症因子 TNF-α、IL-6、IFN-γ 和 IL-1β 的基因表达水平、肝组织 F4/80 染色阳性细胞数及肝细胞的增殖及凋亡水平均明显下降 ( $P < 0.01$ ); Western Blot 表达结果表明, *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组小鼠肝组织中的 P38、ERK、JNK、p65 以及 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化水平较 *Nod2*<sup>fl/fl</sup> 模型组明显下降 ( $P < 0.05$ ), 而用于对照的 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 组小鼠与 *Nod2*<sup>fl/fl</sup> 组小鼠上述各项指标均无明显异常。**结论** 肝 NOD2 缺失有减轻小鼠肝细胞炎症及坏死的作用, 其机制可能与其下调肝组织 NF-κB、MAPK 和 STAT3 信号通路相关因子的表达有关。

**【关键词】** 核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2; 肝炎症; 信号通路; 机制

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0730-08

## Mechanism of NOD2 on the inflammation of mouse liver induced by diethylnitrosamine

XU Zhiling<sup>1</sup>, ZHANG Bin<sup>1\*</sup>, ZHANG Shuncaï<sup>2\*</sup>

(1. Department of Infection Disease, Qingpu Branch, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201700, China.

2. Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032)

Corresponding author: ZHANG Bin. E-mail: zhxy2010@163.com; ZHANG Shuncaï. E-mail: zhang.shuncaï@zs-hospital.sh.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role and mechanism of NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2, NOD2), a pattern recognition receptor in liver cells, in the process of liver inflammation. **Methods** NOD2 liver-specific knockout mice were used, and diethylnitrosamine (DEN) was used to construct an acute liver injury model.

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目 (81871934)。

Funded by the General Program of NSFC (81871934).

**【作者简介】** 许智玲 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肝病的发病机制。Email: 1138372147@qq.com

**【通信作者】** 张斌 (1967—) 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 肝病的诊治。Email: zhxy2010@163.com;

张顺财 (1964—) 男, 博士, 教授, 研究方向: 肝病的发病机制。Email: zhang.shuncaï@zs-hospital.sh.cn。

\* 共同通信作者

NOD2 knockout mice injected with DEN were used as the *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> model group, and injected with DEN B6/JNju-Nod2em1Cflo<sub>x</sub>/Gpt (*Nod2*<sup>f/f</sup>) mice are *Nod2*<sup>f/f</sup> model group, NOD2 knockout mice without DEN injection are *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> group, *Nod2*<sup>f/f</sup> mice without DEN injection are *Nod2*<sup>f/f</sup> group. He staining was used to detect the effect of DEN on liver pathological damage, ALT and AST kits were used to detect the changes of serum ALT and AST levels; F4/80 immunohistochemical staining was used to detect the number of hepatitis cells and real-time quantitative qPCR was used to detect the gene expression level of inflammatory factors in liver cells; Ki67 immunohistochemical staining and TUNEL staining were used to detect the effects of den on liver cell proliferation and apoptosis Western blot was used to detect the expression of NF-κB, MAPK and STAT3 signaling pathway related proteins **Result** Compared with *Nod2*<sup>f/f</sup> model group, *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> model group mice liver tissue pathological damage was significantly reduced, manifested as cell necrosis and vacuolization, and *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> model group mice serum ALT and AST levels Significantly decreased ( $P < 0.01$ ). In addition, compared with *Nod2*<sup>f/f</sup> model group, the inflammatory factors TNF-α, IL-6, IFN-γ and IL-1β expression levels, the number of F4/80 staining positive cells in liver tissue, the proliferation and apoptosis levels of the hepatocytes in *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> model group were significantly reduced ( $P < 0.01$ ); Western blot expression result showed that the P38, ERK, JNK, p65 and JAK2/STAT3 protein phosphorylation levels in the liver tissue of the *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> model group were significantly lower than those of the *Nod2*<sup>f/f</sup> model group. However, the *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> group mice and *Nod2*<sup>f/f</sup> group mice used for control had no obvious abnormalities in the above indicators. **Conclusions** Loss of NOD2 in the liver can significantly inhibit the inflammation and necrosis of hepatocytes in mice, its mechanism maybe related to the down-regulation of expression of NF-κB, MAPK and STAT3 signaling pathways related factors in liver tissue.

**【Keywords】** nucleotide-binding oligomerization domain 2; liver inflammation; signal pathway; mechanism

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝作为人体最大的消化器官,受各种有害因素的影响可造成肝损伤。肝损伤早期多表现为肝组织的炎症,若早期肝细胞炎症得不到及时诊治,会逐步发展为肝纤维化,严重会进展为肝硬化,甚至肝癌<sup>[1-2]</sup>。因而在肝病防治方面,积极探索肝早期炎症反应的机制具有非常重要的临床意义。有研究发现,机体天然免疫系统通过各种模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病原成分,进一步启动宿主应答免疫防御反应。其中, NOD2 是 PRRs 家族的重要成员,它主要识别细胞内细菌肽聚糖的降解产物胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP),是一种存在于所有革兰阳性菌和阴性菌细胞壁的成分,可以介导宿主抵抗入侵细菌的免疫和炎症反应<sup>[3]</sup>,因此, NOD2 与炎症反应关系密切。既往有学者发现, NOD2 表达除了与克罗恩病的炎症发生密切相关外,肠源性 MDP 的刺激可激活肝细胞 NOD2 受体并增加其表达,与肝病发生自发性细菌性腹膜炎密切相关<sup>[4-6]</sup>,但 NOD2 在肝炎性疾病中的具体作用及机制仍不明确。为进一步探索其机制,本研究应用 NOD2 肝特异性敲除小鼠,使用 DEN 构建急性肝损伤模型<sup>[7]</sup>,以探讨肝细胞 NOD2 受体在肝炎症反应中的作用及可能机制,为肝炎症的诊治提供重要的作用靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

20 只 6 周龄的 SPF 级雄性 B6/JNju-Nod2<sup>em1Cflo<sub>x</sub>/Gpt</sup>(*Nod2*<sup>f/f</sup>)小鼠,体重 19 ~ 21 g,由南京大学模式动物公司提供【SCXK(苏)2018-0008】,随机选择其中 10 只与 Albumin-Cre 小鼠杂交,获得 NOD2 肝特异性敲除小鼠(*Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup>):基因敲除的过程按照文献的方法操作<sup>[8]</sup>,由南京大学模式动物公司执行。饲养于复旦大学实验动物部【SYXK(沪)2020-0032】,饲养及实验过程遵守动物的 3R 原则,小鼠均分笼饲养,每笼 5 只,采用标准饲料喂养,自由饮水,光照与黑暗各 12 h 交替处理,湿度为 50% ~ 60%,温度为 20 ~ 22℃,适应性喂养 1 周。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

DEN 和三辛酸甘油酯由美国 Sigma 公司提供。总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。PCR 试剂购自上海生工,ALT、AST 测定试剂盒及病理染色试剂购自南京建成公司。P38/p-P38、ERK/p-ERK、JNK/p-JNK、p65/p-p65、JAK2/p-JAK2、STAT3/p-STAT3 等抗体购自美国 Abcam 公司。

超低温冰箱(Thermo 公司,美国);荧光显微镜

(Nikon 公司, 日本); 高速低温离心机 (Sigma 公司, 美国); 实时荧光 PCR 仪 (Eppendorf 公司, 德国); 凝胶扫描成像系统 (Bio-Bod 公司, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组

使用 DEN 构建急性肝损伤模型, 以 DEN 注射的 NOD2 基因敲除小鼠为 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组, DEN 注射的 B6/JNju-Nod2<sup>em1C<sub>fllox</sub></sup>/Gpt (*Nod2*<sup>f/f</sup>) 小鼠为 *Nod2*<sup>f/f</sup> 模型组, 未注射 DEN 的 NOD2 基因敲除小鼠为 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 组, 未注射 DEN 的 *Nod2*<sup>f/f</sup> 小鼠为 *Nod2*<sup>f/f</sup> 组, 每组 5 只。DEN 具体使用方法如下: 75% 乙醇消毒小鼠腹部后, 单次腹腔注射 DEN (100 mg/kg, 三辛酸甘油酯溶解) 后 1 周处死小鼠, 取材进行后续实验。全部实验过程未出现小鼠死亡。

### 1.2.2 组织病理学观察

新鲜肝组织用 4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋。石蜡切片厚 5 μm, 苏木精-伊红 (HE) 以及 TUNEL 染色。为进行免疫组织化学染色, 石蜡切片在进行脱蜡、抗原修复及封闭后, 分别孵育 Ki67 (1:500, Abcam, 英国)、F4/80 (1:100, CST, 美国) 抗体, 显微镜下拍照并应用 ImageJ 软件 (NIH, 美国) 统计分析。

### 1.2.3 血清 ALT 和 AST 水平检测

小鼠麻醉后取静脉血至 1.5 mL 离心管中, 室温静置离心收集血清, 根据 ALT 和 AST 试剂盒说明书检测血清中 ALT 和 AST 水平变化。

### 1.2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR)

NCBI 网站搜索 GenBank 中已有的大鼠 IL-6、TNF-α、IL-1β、IFN-γ 及 NOD2 基因序列设计相应引物, 以 GAPDH 为内参基因, 由上海捷瑞生物设计合成, 序列见表 1。应用 TRIzol 试剂盒裂解提取小鼠肝组织中的总 RNA, 应用 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒 (日本 TaKaRa) 进行逆转录反应合成 cDNA。根据 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书 (日本 TaKaRa), 冰上配制 20 μL 反应体系, 随后使用 ABI7500 仪器进行扩增反应。

### 1.2.5 免疫蛋白印迹实验 (Western Blot)

肝组织使用含有蛋白酶抑制剂 PMSF (碧云天, 上海) 和磷酸酶抑制剂 (Roche 公司) 的 RIPA 裂解液进行裂解提取总蛋白。配置 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离蛋白、转膜、封闭随后一抗孵育过夜: P38/p-P38 (1:1000, CST)、ERK/p-ERK (1:1000, CST)、JNK/p-JNK (1:1000, CST)、p65/p-p65 (1:1000, CST)、JAK2/p-JAK2 (1:1000, CST)、STAT3/p-STAT3 (1:1000, CST) 和 GAPDH (1:1000, 碧云天), 对应二抗室温孵育 1 h 后 ECL 发光检测结果。

## 1.3 统计学分析

应用 SPSS 20.0 进行统计学分析, 计量资料以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NOD2 肝特异性敲除小鼠模型的鉴定

通过对 *Nod2*<sup>f/f</sup> 组和 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 组 NOD2 的 mRNA 及蛋白质的表达水平比较, 发现 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 组 NOD2 的 mRNA 及蛋白质的表达水平均显著下调 ( $n = 5, P < 0.05$ , 图 1)。表明 NOD2 肝特异性敲除小鼠的模型建立成功。

### 2.2 肝特异性敲除 NOD2 对 DEN 诱导的小鼠急性肝损伤的影响

HE 染色结果显示, 作为对照的 *Nod2*<sup>f/f</sup> 组和 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 组均无明显肝炎症坏死等表现, 而经过 DEN 处理的 *Nod2*<sup>f/f</sup> 模型组和 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组均有显著的肝炎症、坏死表现, 进一步对两个模型组比较, 发现 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组小鼠肝组织损伤情况显著减轻, 表现为细胞坏死及空泡形成显著减少 (图 2A)。对小鼠血清中 ALT 和 AST 的水平检测结果显示, *Nod2*<sup>f/f</sup> 组和 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 组无显著性异常, 而 *Nod2*<sup>f/f</sup> 模型组和 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组均高于 *Nod2*<sup>f/f</sup> 组和 *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 组 ( $P < 0.01$ ), 同时, 通过对模型组的比较发现, *Nod2*<sup>Δ<sub>hep</sub></sup> 模型组血清 ALT 及 AST 均低于 *Nod2*<sup>f/f</sup> 模型组 ( $P < 0.01$ ) (图 2B)。

表 1 相关引物序列

Table 1 Related primer sequence

基因名称 Gene name	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
GAPDH	TGTGTCCGTCCTGGATCTGA	TTCGTGTTGAAGTCGCAGGAG
IL-6	TCCATCCAGTTGCCCTTCTTG	TTCCACGATTTCCCAGAGAAC
TNF-α	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GGTCTGGCCATAGAAGCTGA
IL-1β	TGGCTCAGGCTCACAAGAAA	CATCAGAGCAAGGAGGAAAAAC
IFN-γ	ATGAACGCTACACACTGCATC	CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC
NOD2	TGGTTCAGCCTCTCAGGATGA	AGGACTCTCGAAGCCTT

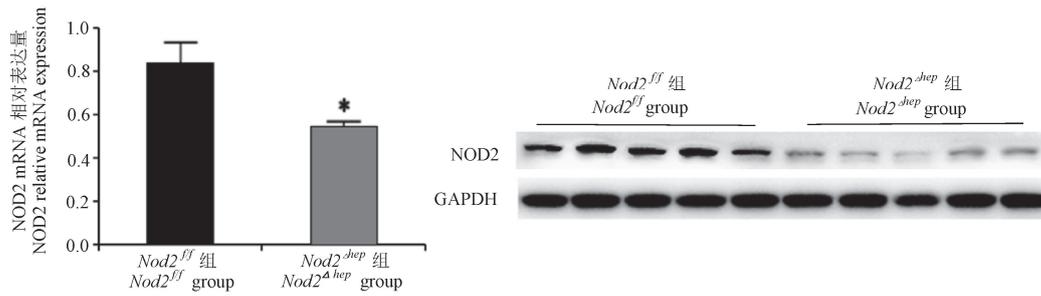
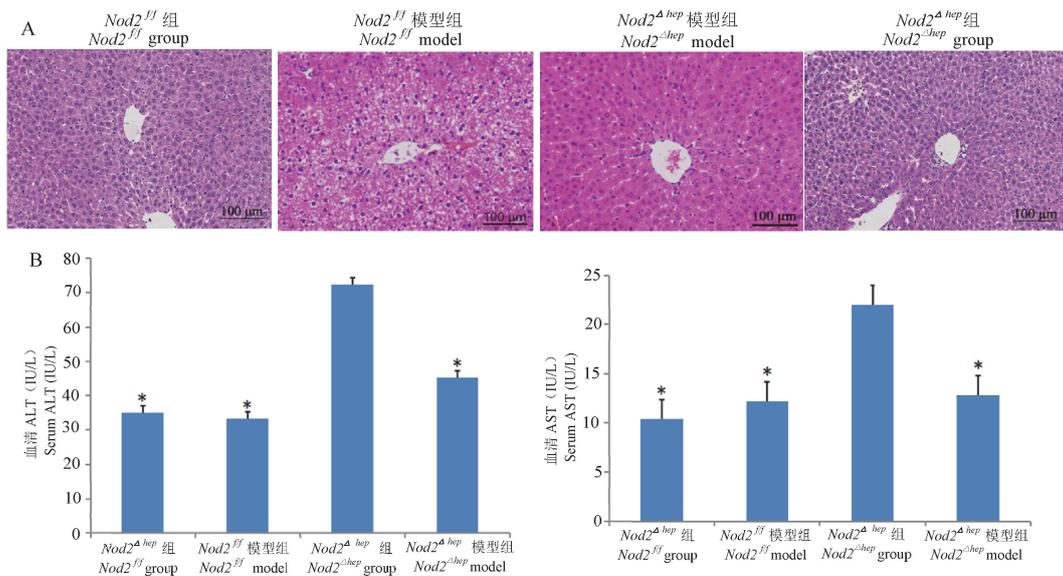


图 1 NOD2 基因敲除小鼠的基因表达及 NOD2 蛋白表达

Figure 1 Gene expression and NOD2 protein expression in NOD2 knockout mice



注:A:各组小鼠肝 HE 染色代表性图片;B:各组小鼠血清 ALT 和 AST 水平变化;与 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 模型组相比, \*  $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导的小鼠肝损伤的影响( $n=5$ )

Note. A. Representative pictures of HE staining of mouse liver in each group. B. Changes in serum ALT and AST levels of mice in each group. Compared with *Nod2<sup>fl/fl</sup>* model group, \*  $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Effect of loss of NOD2 on DEN induced liver injury in mice( $n=5$ )

### 2.3 肝特异性敲除 NOD2 对 DEN 诱导的小鼠肝炎症的影响

对小鼠肝组织炎症因子表达水平比较,发现 *Nod2<sup>Δhep</sup>* 模型组肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 相对表达量均低于 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 模型组( $P < 0.01$ )(图 3A)。进一步对小鼠肝组织进行 F4/80 免疫组化染色进行研究,发现 *Nod2<sup>Δhep</sup>* 模型组 F4/80 染色阳性细胞数也显著低于 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 模型组( $P < 0.01$ )(图 3B)。而作为对照的 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 组和 *Nod2<sup>Δhep</sup>* 组肝组织均无显著性异常。

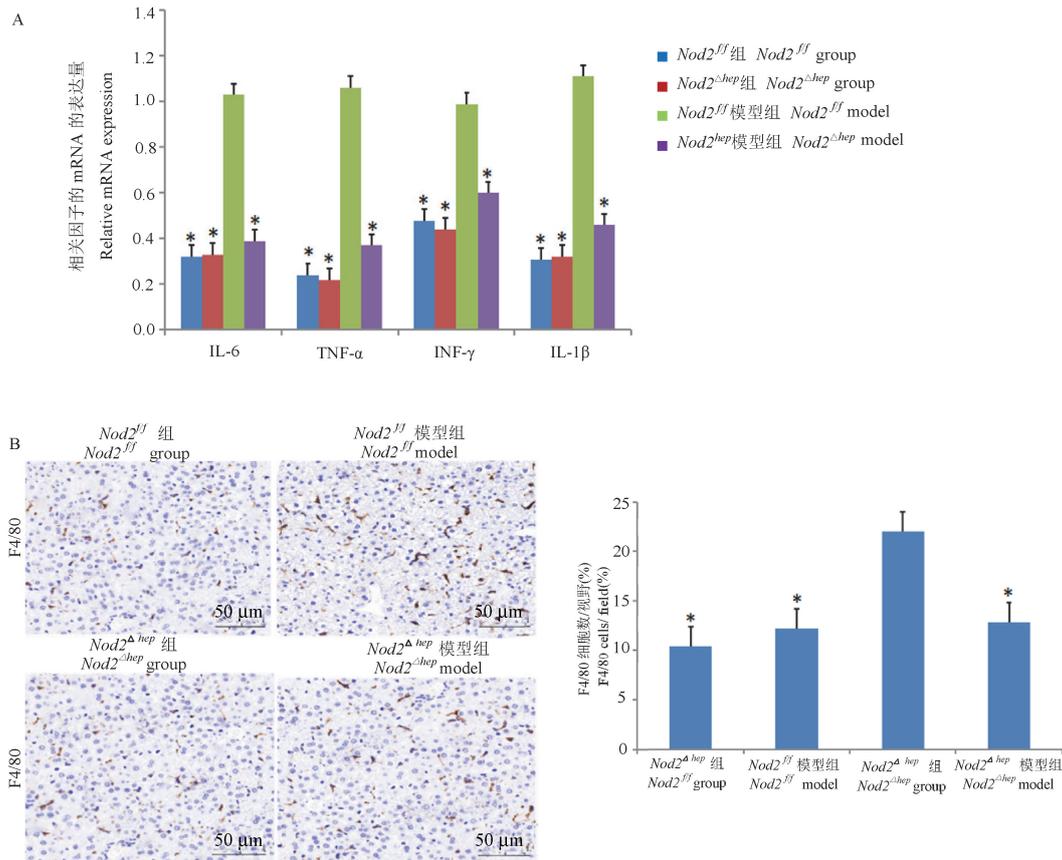
### 2.4 肝特异性敲除 NOD2 对 DEN 诱导的小鼠肝细胞增殖和凋亡的影响

研究发现,与 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 组和 *Nod2<sup>Δhep</sup>* 组比较, *Nod2<sup>Δhep</sup>* 模型组及 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 模型组肝组织中 Ki67 染色

阳性细胞数及肝细胞凋亡细胞数显著增多( $P < 0.01$ ),同时对两个模型组比较发现, *Nod2<sup>Δhep</sup>* 模型组肝组织 Ki67 染色阳性细胞数及肝细胞凋亡细胞数明显少于 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 模型组( $P < 0.01$ )(图 4,5)。

### 2.5 肝特异性敲除 NOD2 对 DEN 诱导后炎症相关信号通路的影响

通过对肝组织中 P38、ERK、JNK、p65 以及 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化水平的比较,发现 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 模型组和 *Nod2<sup>Δhep</sup>* 模型组均显著高于 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 组和 *Nod2<sup>Δhep</sup>* 组,进一步对两个模型组进行比较,发现 *Nod2<sup>Δhep</sup>* 模型组肝组织中 P38、ERK、JNK、p65 以及 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化水平显著低于 *Nod2<sup>fl/fl</sup>* 模型组( $P < 0.05$ )。表明肝 NOD2 缺失可下调 NF- $\kappa$ B、MAPK 和 STAT3 信号通路相关蛋白的表达(见图 6)。

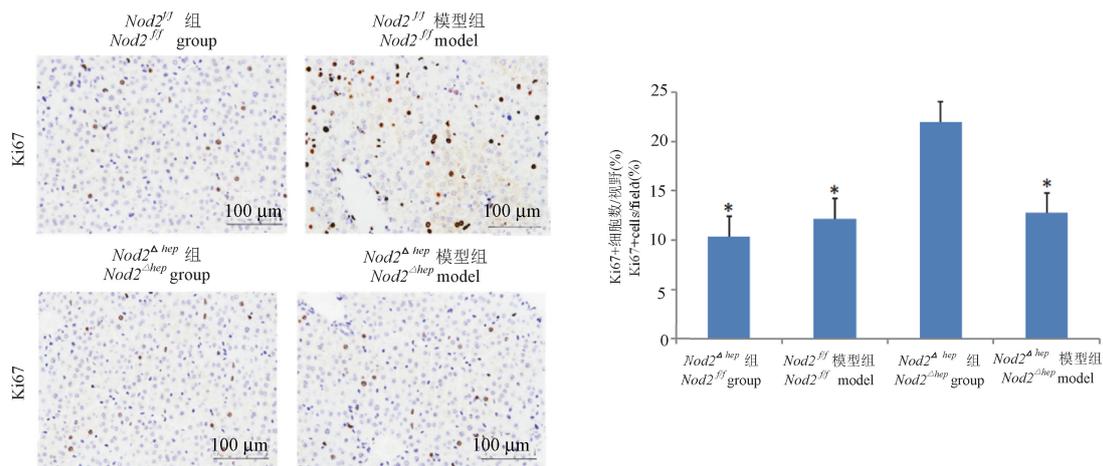


注:A;qPCR 检测各组小鼠肝组织中炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达水平;B:各组小鼠肝组织中 F4/80 的表达变化。

图 3 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导的小鼠肝炎症的影响 ( $n=5$ )

Note. A. qPCR detects the mRNA expression levels of inflammatory factors IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  in the liver tissues of mice in each group. B. Changes in the expression of F4/80 in the liver tissues of mice in each group.

Figure 3 Effect of loss of NOD2 on DEN induced liver inflammation in mice ( $n=5$ )

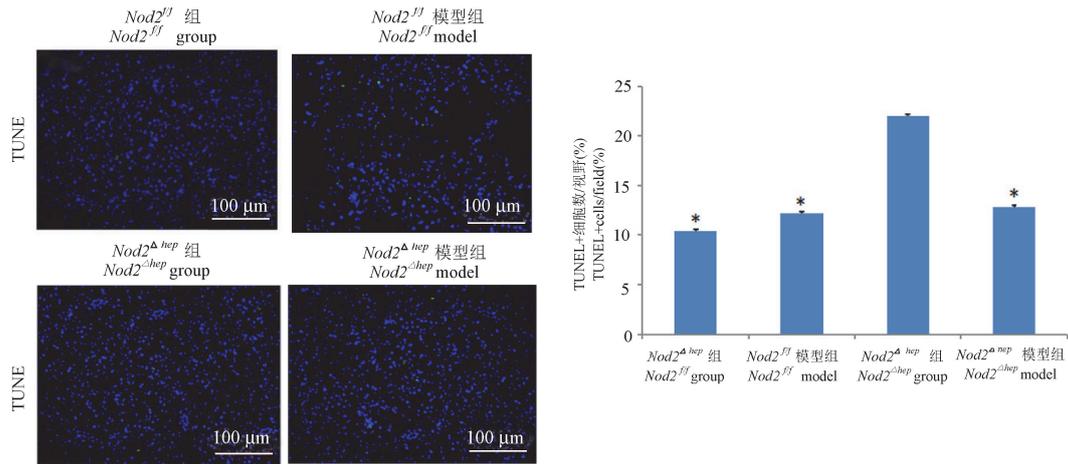


注:免疫组化检测各组小鼠肝组织中 Ki67 表达变化。

图 4 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导的小鼠肝细胞增殖的影响 ( $n=5$ )

Note. The expression of Ki67 in the liver tissue of mice in each group was detected by immunohistochemistry.

Figure 4 Effects of NOD2 deficiency on DEN induced hepatocyte proliferation and apoptosis in mice ( $n=5$ )



注: TUNEL 实验检测各组小鼠肝细胞凋亡。

图 5 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导的小鼠肝细胞凋亡的影响 (n=5)

Note. Immunohistochemical detection of TUNEL expression in the liver tissues of mice in each group.

Figure 5 Effects of NOD2 deficiency on DEN induced hepatocyte apoptosis in mice (n=5)

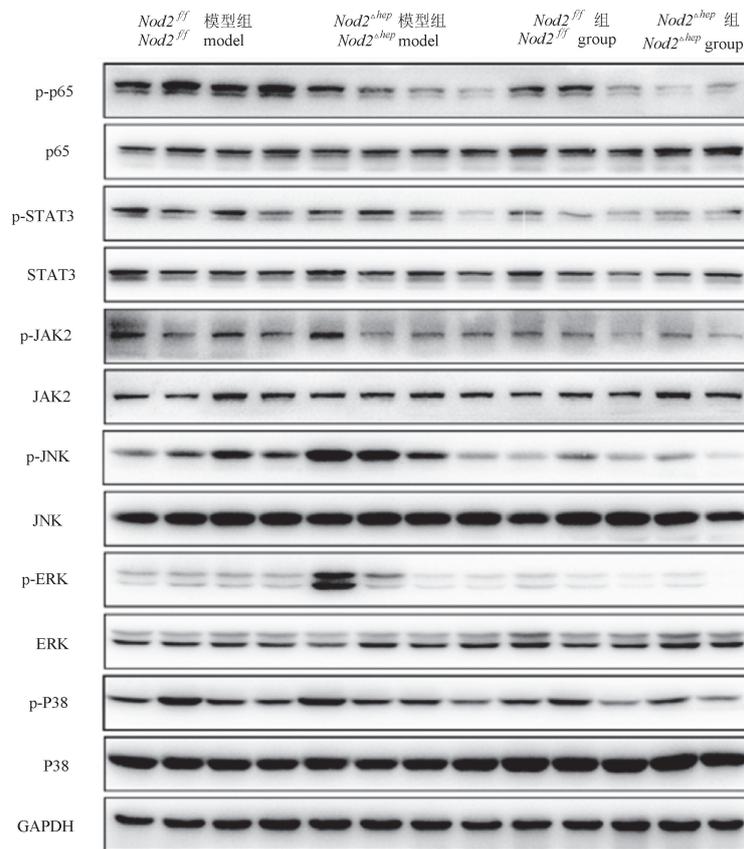


图 6 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导后小鼠肝 NF-κ B、MAPK 和 STAT3 信号通路的影响 (n=5)

Figure 6 Effects of NOD2 deficiency on NF-κ B, MAPK and STAT3 signaling pathways in the liver of DEN induced mic (n=5)

### 3 讨论

肝病是常见的疾病,许多肝病因为得不到及时诊治,会从早期的肝炎,逐步进展到肝硬化,甚至肝

癌,是造成患者死亡的主要原因。肝作为最大的消化腺,容易受到代谢物、毒性物质及微生物等多种因素的损伤,造成肝细胞的炎症,严重的可以发生肝细胞坏死。同时肝具有强大的再生修复能力,研

究发现肝切除手术或毒物造成肝损伤后,残肝细胞能迅速由静止状态进入细胞周期,通过 DNA 合成和有丝分裂补偿丢失的肝组织,恢复肝功能。在肝细胞的坏死-再生循环中,炎症是诱发肝疾病的常见原因,是机体快速响应感染或损伤的一种固有免疫,适度的炎症反应能够保护机体免受进一步的损伤。但是,慢性炎症和过度的炎症反应通常是有害的,不仅对机体形成二次打击,也会损伤机体的正常功能<sup>[9]</sup>,如得不到及时诊治,会进一步形成肝硬化,甚至肝癌。正常情况下,肝可通过各种免疫细胞清除由肠道经门静脉系统到达感知各种细菌成分,但是肝出现损伤后,可以引起肠道菌群失调和肠道通透性增加,肠源性细菌成分通过门静脉系统到达肝增多而清除减少,逐渐累积的细菌成分可持续激活肝免疫反应,加重肝炎症反应和 DNA 损伤,促进肝疾病发展<sup>[10]</sup>。肝通过调控促炎和抗炎细胞因子间的平衡,发挥炎症调节作用,在肝再生和肝坏死中也发挥重要的调节作用。因而积极探索肝炎症的免疫机制,有重要的理论意义和临床应用价值。

许多研究证实,有 20% ~ 75% 的慢性肝病患者发生肠道菌群失调<sup>[11]</sup>,特别是小肠细菌过度生长,使得门脉中内毒素(LPS)水平明显升高的情况下更易发生;另有学者发现,肝硬化患者肠道上皮紧密连接蛋白 ZO-1 表达水平下降,黏膜屏障功能受损,渗透性增加,移位到肝的细菌或其代谢成分增多,容易发现肝炎症,进一步可以加重肝损伤,他们应用抗生素利福昔明抑制肠道细菌过度生长可一定程度缓解肝性脑病和肝硬化失代偿期患者的病情<sup>[12]</sup>。学者研究发现,在不同肝炎症模型中,肠源性细菌产物可以诱导肝 NOD2 表达增加,促进机体 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的表达,有促进肝炎症反应的作用<sup>[13-14]</sup>。NOD2 作为 PRRs 家族的重要成员,可以通过识别肠源性细菌产物 MDP 而被激活,从而启动宿主免疫和炎症反应。学者研究发现,在不同肝炎症模型中,肠源性细菌产物可以诱导肝 NOD2 表达增加,促进机体 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的表达,有促进肝炎症反应的作用<sup>[15-16]</sup>。NOD2 作为 PRRs 家族的重要成员,可以通过识别肠源性细菌产物 MDP 而被激活,从而启动宿主免疫和炎症反应,但是对 NOD2 在肝炎症中的机制还不完全清楚。因而积极探索 NOD2 与肝炎症发生中的作用及机制具有重要的意义。为探索 NOD2 在肝炎症发病中的作用,我

们借助动物研究所的平台,构建了 NOD2 肝特异性敲除小鼠(*Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>),并采用 PCR 和 Western Blot 技术对 NOD2 基因敲除小鼠进行鉴定,通过对 *Nod2*<sup>+/+</sup>组和 *Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>组肝组织 NOD2 mRNA 及蛋白质相对表达量的比较,发现 *Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>组 NOD2 的 mRNA 及蛋白质的表达水平均显著下调,表明 NOD2 肝特异性敲除小鼠的模型建立成功。为了使小鼠形成肝炎,选择 DEN 对其干预,当一次性注射 DEN 后可以造成小鼠急性肝损伤,能较好满足小鼠肝炎研究的需要。进一步对其机制进行了探索,发现与 *Nod2*<sup>+/+</sup>模型组比较,*Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>模型组小鼠肝组织细胞坏死及空泡形成明显减少,*Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平明显下降( $P < 0.01$ ),而 *Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>组小鼠与 *Nod2*<sup>+/+</sup>组小鼠肝组织病理及肝功能均无明显异常。另外通过对各组肝组织炎症因子表达情况进行比较,发现与 *Nod2*<sup>+/+</sup>模型组相比,*Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>模型组中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  和 IL-1 $\beta$  的基因表达水平及肝组织 F4/80 染色阳性细胞数明显减少( $P < 0.01$ ),而 *Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>组小鼠与 *Nod2*<sup>+/+</sup>组小鼠炎症因子表达水平无明显改变;进一步对各组肝细胞增殖凋亡情况进行了比较,发现与 *Nod2*<sup>+/+</sup>模型组相比,*Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>模型组中肝细胞的增殖及凋亡水平下降,而 *Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>组小鼠与 *Nod2*<sup>+/+</sup>组小鼠增殖及凋亡水平无明显改变;Western Blot 表达结果表明,*Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>模型组小鼠肝组织中的 P38、ERK、JNK、p65 以及 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化水平较 *Nod2*<sup>+/+</sup>模型组明显下降,而 *Nod2* <sup>$\Delta$ hep</sup>组小鼠与 *Nod2*<sup>+/+</sup>组小鼠肝组织中相关蛋白磷酸化水平均低于模型组。表明肝 NOD2 缺失可显著抑制 DEN 诱导的小鼠肝炎症因子生成和巨噬细胞聚集,减少了肝细胞死亡,有助于减轻肝损伤程度,其机制可能与其下调肝组织 NF- $\kappa$ B、MAPK 和 STAT3 信号通路相关因子的表达有关,值得进一步深入研究。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Tonya MH, Michael AP, Lilia GR, et al. Evaluation of performance characteristics of hepatitis B e antigen serologic assays [J]. J Clin Virol, 2018, 109: 22-28.
- [2] Boege Y, Malehmir M, Healy ME, et al. A dual role of Caspase-8 in triggering and sensing proliferation-associated DNA damage, a key determinant of liver cancer development [J]. Cancer cell, 2017, 32(3): 342-359.
- [3] Feerick CL, Mckernan DP. Understanding the regulation of pattern recognition receptors in inflammatory diseases-a 'Nod' in the right direction [J]. Immunology, 2017, 150(3): 237-247.
- [4] Scott MJ, Chen C, Sun Q, et al. Hepatocytes express functional

- NOD1 and NOD2 receptors; a role for NOD1 in hepatocyte CC and CXC chemokine production [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(4): 693-701.
- [ 5 ] Wang L, Hartmann P, Haimerl M, et al. Nod2 deficiency protects mice from cholestatic liver disease by increasing renal excretion of bile acids [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1259-1267.
- [ 6 ] Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2010, 51(4): 1327-1333.
- [ 7 ] 吕超, 石清兰, 覃倩, 等. 小鼠实验性肝损伤模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 107-113.  
Lyu C, Shi QL, Qin Q, et al. A review of experimental liver injury models in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(1): 107-113.
- [ 8 ] Zhou Y, Hu L, Tang W, et al. Hepatic NOD2 promotes hepatocarcinogenesis via a RIP2-mediated proinflammatory response and a novel nuclear autophagy-mediated DNA damage mechanism [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 9.
- [ 9 ] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 428-435.
- [ 10 ] Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(7): 397-411.
- [ 11 ] 易宏淦, 臧梦雅, 吴志远, 等. 慢性肠道炎症促进肝癌的发展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(5): 1-4.  
Yi HG, Zang MY, Wu ZY, et al. Chronic colitis induced by irritant dextran sodium sulphate promote hepatoma development in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(5): 1-4.
- [ 12 ] Vlachogiannakos J, Viazis N, Vasiannopoulou P, et al. Long-term administration of rifaximin improves the prognosis of patients with decompensated alcoholic cirrhosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 450-455.
- [ 13 ] Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 949157.
- [ 14 ] Chaudhry S, Emond J, Griesemer A. Immune cell trafficking to the liver [J]. *Transplantation*, 2019, 103(7): 1323-1337.
- [ 15 ] Rex J, Lutz A, Faletti LE, et al. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  differentially influence NF- $\kappa$ B activity and FasL-induced apoptosis in primary murine hepatocytes during LPS-induced inflammation [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 117.
- [ 16 ] Motta V, Soares F, Sun T, et al. NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(1): 149-178.

[ 收稿日期 ] 2020-09-12