

牛乳铁蛋白对热射病大鼠肝损害的保护作用

夏新宇 李 磊 王少康 许硕贵 王美堂

摘 要 **目的** 研究预口服牛乳铁蛋白 (bovine lactoferrin, BLF) 对于热射病 (heat stroke, HS) 大鼠急性肝损伤的保护作用。**方法** 64 只大鼠按照完全随机化分组方式分为对照组 ($n = 16$)、热射病组 (HS 组, $n = 16$)、低剂量干预组 (LBLF 组, $n = 16$) 和高剂量干预组 (HBLF 组, $n = 16$)。对照组及 HS 组大鼠以磷酸盐缓冲液灌胃 1 周, LBLF 组及 HBLF 组分别以 100、200mg/kg BLF 灌胃 1 周后建立热射病大鼠模型, 排除死亡大鼠后, 最终每组各 8 只大鼠用于样本的收集。获取大鼠的血清测定丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartateamino transferase, AST)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 浓度。获取肝脏组织制作病理组织切片, 比较各组大鼠病理切片的病理评分。**结果** 与 HS 组比较, LBLF、HBLF 组其核心体温到达 HS 发病标准 (42°C) 的平均时间均显著延长 ($P < 0.001$), HBLF 组显著改善 HS 大鼠 ALT、AST、LDH 指标 ($P < 0.05$), HBLF 组大鼠和 HS 组大鼠比较, SOD 活性显著提高 ($P < 0.001$), MDA 含量显著下降 ($P < 0.001$)。**结论** 口服 BLF 可以提高大鼠热耐力, 缓解 HS 大鼠肝脏脂质过氧化水平, 减轻肝损伤。

关键词 乳铁蛋白 热射病 肝损伤 脂质过氧化

中图分类号 R135.3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.01.021

Protective Effect of Bovine Lactoferrin on Acute Liver Injury in Rats with Heat Stroke. XIA Xinyu, LI Lei, WANG Shaokang, et al. The Third Affiliated Hospital of Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract **Objective** To study the protective effect of oral bovine lactoferrin (BLF) on acute liver injury in rats with heat stroke (HS). **Methods** Sixty - four rats were randomly divided into control group ($n = 16$), HS group ($n = 16$), low - dose BLF intervention (LBLF) group ($n = 16$), high - dose BLF intervention (HBLF) group ($n = 16$) using random number table. Control group and HS group were intragastrically administrated with phosphate buffer for 1 week, while LBLF group and HBLF group were intragastrically administrated with 100 and 200mg/kg BLF for 1 week, respectively, to establish a heat emission disease rat model. After excluding dead rats, 8 rats in each group were finally collected for sample collection. Serum activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured. Liver tissue and pathological tissue sections were obtained, and the pathological scores of each group were compared. Compared with HS group, the average time for core body temperature to reach the onset standard of HS (42°C) in LBLF and HBLF groups was significantly extended ($P < 0.001$), and the indexes of ALT, AST and LDH of HS rats in HBLF group were significantly improved ($P < 0.05$). SOD activity was significantly increased ($P < 0.001$), MDA content was significantly decreased ($P < 0.001$). **Results** The intervention group could delay the onset of HS compared with HS group. Meanwhile, biochemical indexes and oxidative stress related indexes were improved in HS rats. **Conclusion** BLF oral can improve the thermal endurance of rats, alleviate the level of lipid peroxidation and liver injury in HS rats.

Key words Bovine lactoferrin; Heat stroke; Liver injury; Lipid peroxidation

热射病 (heat stroke, HS) 是重症中暑中最为严重的一种分型, 以核心体温 $> 40.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 中枢系统病变 (如谵妄、惊厥、昏迷等), 系统性炎症及多脏器损害为特征^[1]。即使该类患者给予积极治疗后, 仍有 75% 病患发展至多脏器衰竭^[2]。肝损伤在 HS 中常见, 通常损伤较轻, 但是在治疗过程中有可能发展成为急性肝衰竭, 导致患者的死亡^[3, 4]。

牛乳铁蛋白 (bovine lactoferrin, BLF) 是一种 80kDa 的低分子铁结合糖蛋白, 广泛存在于哺乳动物组织和体液内, 具有调节免疫、抗炎、抗氧化等作用^[5]。不同物种之间的 LF 具有高度同源性^[6, 7]。本研究聚焦口服牛乳铁蛋白 (bovine lactoferrin, BLF) 对 HS 大鼠肝损伤

基金项目: 上海市军民融合发展专项基金资助项目 (2019 - jmrh1 - kj52)

作者单位: 200433 上海, 中国人民解放军海军军医大学第三附属医院 (夏新宇); 201805 上海, 中国人民解放军海军军医大学第一附属医院 (李磊、王少康、许硕贵、王美堂)

通信作者: 王美堂, 电子信箱: wmt88@sina.com

害为特征^[1]。即使该类患者给予积极治疗后, 仍有 75% 病患发展至多脏器衰竭^[2]。肝损伤在 HS 中常见, 通常损伤较轻, 但是在治疗过程中有可能发展成为急性肝衰竭, 导致患者的死亡^[3, 4]。

牛乳铁蛋白 (bovine lactoferrin, BLF) 是一种 80kDa 的低分子铁结合糖蛋白, 广泛存在于哺乳动物组织和体液内, 具有调节免疫、抗炎、抗氧化等作用^[5]。不同物种之间的 LF 具有高度同源性^[6, 7]。本研究聚焦口服牛乳铁蛋白 (bovine lactoferrin, BLF) 对 HS 大鼠肝损伤

的改善情况,以期找到一种减轻 HS 危害的防治方法。

材料与方法

1. 动物和材料:64 只成年雄性 Sprague - Daw 大鼠(7~8 周龄,体质量为 250~300g)购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[生产许可证号:SCXK(沪)2008-0016]。购得大鼠饲养于中国人民解放军海军军医大学无特定病原体级动物实验中心,每笼 6 只,室内温度为 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 $50\% \pm 5\%$,保持 12h 白天/12h 黑夜昼夜节律。BLF 购自湖北威德利化学科技有限公司(CAS 编号:112163-33-4,500 克/袋,纯度:98%)。本研究通过中国人民解放军海军军医大学动物伦理学委员会审批(伦理审批号:SMMU—2017324)。

2. 分组和干预:64 只大鼠按照完全随机化分组方式分成 4 组,即对照组($n=16$)、热射病组(HS 组, $n=16$)、低剂量干预组(LBLF 组, $n=16$)和高剂量干预组(HBLF 组, $n=16$)。对照组及 HS 组大鼠以磷酸盐缓冲液 10ml/kg 灌胃 1 周,LBLF 及 HBLF 组分别以 100、200mg/kg BLF 灌胃 1 周。

3. HS 造模:本研究采用恒温恒湿箱将造模环境温度稳定在 $40.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,相对湿度稳定在 $60\% \pm 5\%$ 。在腹腔植入测温胶囊监测大鼠核心体温的变化,造模和监测方法同前^[8]。以大鼠核心体温到达 42°C 为 HS 发病的标准^[9]。对照组置于 $25.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,湿度 $50\% \pm 5\%$ 环境中 1h,禁食禁水。

4. 样本收集:造模开始至造模后 3h 内,若存活大鼠少于每组最低要求($n=8$),补充实验达到数量要求。最终每组各 8 只,共 32 只大鼠用于样本的收集。造模后 3h,以异氟烷气道麻醉大鼠,经腹主动脉采集血液样本, 4°C 下,以 3000r/min 离心 10min,收集上清液于 -80°C 冰箱冻存待测。获取血清样本后,打开大鼠腹腔,充分暴露肝脏获取部分肝脏组织,立即浸泡于 4% 多聚甲醛溶液,以既往使用方法处理后分析病理情况^[8]。再次获取肝脏组织,吸水纸吸干表面液体,冻存于 -80°C 冰箱冻存,根据需要取对应重量制备肝脏组织匀浆测定丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量,超氧化物歧化酶(superoxidismutase,SOD)活性。

5. 指标测定:(1)血清生化数据的测定:用全自动生化分析仪(日立 7080,日本日立公司)测定血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)水平。(2)脂质过氧化反应水平和 SOD 的测定:用

MDA 试剂盒(货号:A003-1,南京建成生物工程研究所)测定肝脏匀浆中 MDA 浓度反应脂质过氧化水平。用 SOD 试剂盒(货号:A001-3,南京建成生物工程研究所)测定肝脏组织匀浆中 SOD 活力。方法参照 Deng 等^[10]的研究。(3)肝脏病理评分:随机选取每张肝脏切片的 8 个区域在 200 倍光镜下参照 Zhou 等^[11]的研究进行病理评分。

6. 统计学方法:应用 GraphPad Prism 8.3 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 核心体温变化:与 HS 组($57.75 \pm 4.71\text{min}$)比较,LBLF 组($71.00 \pm 5.29\text{min}$)、HBLF 组($90.88 \pm 3.56\text{min}$)核心体温到达 HS 发病标准(42°C)的平均时间均显著延长($P < 0.001$)。

2. 血清生化指标的变化:在 HS 发生 3h 后,HS 组血清 ALT、AST、LDH 均较对照组显著升高。与 HS 组比较,LBLF 组稍有改善,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而 HBLF 组显著改善了这 3 项指标水平($P < 0.05$,表 1)。

表 1 4 组大鼠血清生化指标水平变化($\text{U/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT	AST	LDH
对照组	8	32.45 ± 9.37	80.61 ± 16.19	428.30 ± 233.50
HS 组	8	$56.60 \pm 12.88^*$	$247.40 \pm 59.76^*$	$1323.00 \pm 249.30^*$
LBLF 组	8	38.54 ± 26.48	208.60 ± 59.71	1004.00 ± 395.30
HBLF 组	8	$32.18 \pm 11.83^{\#}$	$115.60 \pm 46.86^{\#}$	$665.90 \pm 416.80^{\#}$
<i>P</i>		0.019	< 0.001	< 0.001

与对照组比较,* $P < 0.05$;与 HS 组比较, $^{\#}P < 0.05$

3. 肝脏组织匀浆脂质过氧化水平和 SOD 活性变化:HS 组 MDA 含量较对照组显著升高,但是 SOD 活力比较差异无统计学意义。LBLF 组对于 SOD 活性以及 MDA 含量影响比较,差异无统计学意义,HBLF 组和 HS 组比较,SOD 活性显著提高,同时 MDA 含量也显著下降(表 2)。

表 2 4 组大鼠 SOD 活性和 MDA 含量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
对照组	8	45.69 ± 7.82	4.74 ± 0.48
HS 组	8	50.47 ± 10.07	$8.83 \pm 1.09^*$
LBLF 组	8	57.99 ± 11.97	7.79 ± 0.81
HBLF 组	8	$98.09 \pm 10.57^{\#}$	$5.65 \pm 0.52^{\#}$
<i>P</i>		< 0.001	< 0.001

与对照组比较,* $P < 0.001$;与 HS 组比较, $^{\#}P < 0.001$

4. 肝脏病理评分改变:HS 组肝脏病理切片可见肝细胞大量坏死,细胞核深染,嗜酸性粒细胞增多,细胞质呈圆形空泡,局部胆管周围粒细胞浸润。LBLEF

组中,肝脏病理破坏好转,HBLEF 组进一步改善(图 1)。LBLEF 组、HBLEF 组均较 HS 组病理评分显著下降(5.95 ± 0.44 、 3.00 ± 0.49 、 8.22 ± 0.31 分, $P < 0.001$)。

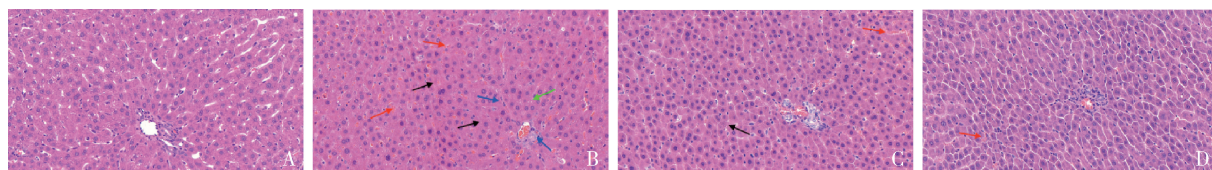


图 1 4 组大鼠肝脏病理切片变化(HE 染色, ×200)

A. 对照组肝脏病理切片:肝细胞索间界清晰,细胞质界线明显,细胞质内偶有小空泡;B. 热射病组肝脏病理切片:肝细胞肿胀明显,索间界模糊,肝细胞细胞核染色加深,细胞质内空泡显著增多,细胞周围炎性细胞浸润及充血;C. LBLEF 组肝脏病理切片:肝细胞索间界较清晰,细胞质内空泡减少,细胞周围炎症及充血减轻;D. HBLEF 组肝脏病理切片,肝细胞索间界清晰,肝细胞无肿胀,炎性细胞减少,充血显著减轻。黑色箭头所示为肝细胞肿胀坏死;绿色箭头所示为细胞质空泡;蓝色箭头所示为炎性细胞浸润;红色箭头所示为充血

讨 论

据统计,HS 的发生率有逐年升高的趋势,即使救治得当,仍有较高的病死率^[12]。因此,寻求有效措施预防 HS 的发生显得尤为重要。肝脏作为机体的重要解毒器官,在 HS 的病程中常受到损害^[13]。早期保护肝功能,可以更有效地维持机体免疫调节能力。严重的肝损害是 HS 脏器损害的一个重要特征,高热、低血压、脏器血流再分配都是引起肝损害的原因^[14]。高热具有细胞毒性,往往在早期引起肝脏的损伤^[3]。LF 具有抑制促炎性细胞因子、促进抗炎性细胞因子产生的作用^[15]。目前尚无研究探索预口服 LF 对于 HS 肝损害的保护作用。本研究通过给予 SD 大鼠预口服高低剂量的 BLF 后建立 HS 模型,通过分析大鼠造模时达到目标体温时间、血清生化水平、肝脏组织匀浆 SOD 活力、MDA 含量及病理评分等相关因素的变化,评估 BLF 对于 HS 大鼠肝脏的保护作用。在给予 BLF 预口服后,大鼠核心温度达到 HS 标准的时间明显延长,而且随着口服 BLF 浓度的增高进一步延长。可以得出结论,高、低剂量 BLF 均可以有效提高大鼠的热耐力。

肝细胞破坏时,ALT、AST、LDH 大量释放入血,其升高程度和肝细胞破坏呈正相关,过度的肝细胞破坏会导致肝功能进一步受损。LBLEF 组、HBLEF 组的生化指标显著下降提示 BLF 可以使得 HS 大鼠肝细胞破坏减少,尽可能在 HS 早期保留肝脏功能。LF 可以通过核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)和 MAP 激酶这两条信号通路,在细胞水平上调节细胞免疫^[15]。HS 发生后,肠源性内毒素血症导致内毒素进入体循环加重机体的炎症损伤^[16, 17]。Geng 等^[4]研究发现,HS 激活了肝脏中的

炎性小体,活化的炎性小体诱导肝细胞凋亡,加重肝脏损伤。综上所述,LF 可能通过其抗炎作用,缓解肝脏损伤。

MDA 是脂质过氧化反应的终末产物,通过测定其水平高低可以反映脂质过氧化反应严重程度^[18]。Zhang 等^[19]研究发现,红景天苷可以抑制 HS 大鼠肝脏内脂质过氧化反应改善肝损害。本研究结果显示,HS 组大鼠肝脏组织匀浆中 MDA 浓度的显著提高。LF 可以通过清除一氧化氮和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基而发挥抗氧化活性^[20]。口服 LF 可以显著提高 SOD 的活性^[21]。

综上所述,给予 BLF 预口服的大鼠在 HS 发生后肝脏组织匀浆 SOD 显著升高,MDA 含量下降,提示脂质过氧化反应的减轻。预口服 BLF 可以有效改善 HS 大鼠肝脏的脂质过氧化反应水平,改善病理损伤,提高大鼠热耐力,提示口服 BLF 可能是防治 HS 的一种有效措施。本课题组拟设计更多实验进一步探讨 BLF 在 HS 肝脏损伤中的保护机制。

参考文献

- Epstein Y, Yanovich R. Heatstroke[J]. N Engl J Med, 2019, 380(25): 2449-2459
- Varghese GM, John G, Thomas K, et al. Predictors of multi-organ dysfunction in heatstroke[J]. Emerg Med J, 2005, 22(3): 185-187
- Al Mahri S, Bouchama A. Heatstroke[J]. Handb Clin Neurol, 2018, 157: 531-545
- Geng Y, Ma Q, Liu YN, et al. Heatstroke induces liver injury via IL-1 β and HMGB1-induced pyroptosis[J]. J Hepatol, 2015, 63(3): 622-633
- Campione E, Cosio T, Rosa L, et al. Lactoferrin as protective natural barrier of respiratory and intestinal mucosa against coronavirus infection and inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4903

- 6 Fernandes KE, Carter DA. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2
- 7 Liu SH, Ma K, Xu XR, *et al*. A single dose of carbon monoxide intraperitoneal administration protects rat intestine from injury induced by lipopolysaccharide[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2010, 15(5): 717 – 727
- 8 Li L, Wang M, Chen J, *et al*. Preventive effects of bacillus licheniformis on heat stroke in rats by sustaining intestinal barrier function and modulating gut microbiota[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 630841
- 9 Lin X, Lin C, Liu R, *et al*. Myricetin against myocardial injury in rat heat stroke model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110194
- 10 Deng Y, Wang W, Yu P, *et al*. Comparison of taurine, GABA, Glu, and Asp as scavengers of malondialdehyde in vitro and in vivo[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2013, 8(1): 1 – 9
- 11 Zhou YP, Xia Q. Inhibition of miR – 103a – 3p suppresses lipopolysaccharide – induced sepsis and liver injury by regulating FBXW7 expression[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(9): 1798 – 1810
- 12 Knapik JJ, Epstein Y. Exertional heat stroke: pathophysiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention[J]. *Spec Oper Med*, 2019, 19(2): 108 – 116
- 13 Kawasaki T, Okamoto K, Kawasaki C, *et al*. Thrombomodulin improved liver injury, coagulopathy, and mortality in an experimental heatstroke model in mice[J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2014, 118(5): 956 – 963
- 14 Liu SY, Song JC, Mao HD, *et al*. Expert consensus on the diagnosis and treatment of heat stroke in China[J]. *Mil Med Res*, 2020, 7(1): 1
- 15 Kanwar JR, Roy K, Patel Y, *et al*. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions[J]. *Molecules*, 2015, 20(6): 9703 – 9731
- 16 Tong H, Chen R, Yin H, *et al*. Mesenteric lymph duct ligation alleviating lung injury in heatstroke[J]. *Shock*, 2016, 46(6): 696 – 703
- 17 Selkirk GA, McLellan TM, Wright HE, *et al*. Mild endotoxemia, NF – kappaB translocation, and cytokine increase during exertional heat stress in trained and untrained individuals[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 295(2): R611 – R623
- 18 Borsai O, Hassan MA, Negruşier C, *et al*. Responses to salt stress in portulaca: insight into its tolerance mechanisms[J]. *Plants*; Basel, 2020, 9(12): 1660
- 19 Zhang W, Peng M, Yang Y, *et al*. Protective effects of salidroside on mitochondrial functions against exertional heat stroke – induced organ damage in the rat[J]. *Evidence – Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 1 – 11
- 20 Habib HM, Ibrahim WH, Schneider – Stock R, *et al*. Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities[J]. *Food Chem*, 2013, 141(1): 148 – 152
- 21 Farid AS, El Shemy MA, Nafie E, *et al*. Anti – inflammatory, anti – oxidant and hepatoprotective effects of lactoferrin in rats[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2021, 44(3): 286 – 293

(收稿日期: 2022 – 03 – 29)

(修回日期: 2022 – 03 – 31)

(上接第 88 页)

- 12 Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, *et al*. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit[J]. *Invest Radiol*, 2000, 35(10): 581 – 588
- 13 Burnett WD, Kontulainen SA, McLennan CE, *et al*. Knee osteoarthritis patients with more subchondral cysts have altered tibial subchondral bone mineral density[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2019, 20(1): 14 – 22
- 14 Ota S, Chiba D, Sasaki E, *et al*. Symptomatic bone marrow lesions induced by reduced bone mineral density in middle – aged women: a cross – sectional Japanese population study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 113 – 121
- 15 Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis[J]. *Bone*, 2012, 51(2): 204 – 211
- 16 Chen Y, Wang T, Guan M, *et al*. Bone turnover and articular cartilage differences localized to subchondral cysts in knees with advanced osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(12): 2174 – 2183
- 17 Zhu S, Zhu J, Zhen G, *et al*. Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3): 1076 – 1093
- 18 Lo GH, Merchant MG, Drihan JB, *et al*. Knee alignment is quantitatively related to periarticular bone morphometry and density, especially in patients with osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(2): 212 – 221
- 19 Wang SP, Wu PK, Lee CH, *et al*. Association of osteoporosis and varus inclination of the tibial plateau in postmenopausal women with advanced osteoarthritis of the knee[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2021, 22(1): 223 – 231
- 20 Linde KN, Puhakka KB, Langdahl BL, *et al*. Bone mineral density is lower in patients with severe knee osteoarthritis and attrition[J]. *Calcif Tissue Int*, 2017, 101(6): 593 – 601

(收稿日期: 2022 – 02 – 24)

(修回日期: 2022 – 04 – 01)