

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210928001

桑灵丽, 王扬眉, 李宏慧, 等. TLR4/Akt 相关分子在 DMF 暴露小鼠肝损伤中的作用[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(4): 386-394

Sang L L, Wang Y M, Li H H, et al. Role of TLR4/Akt related molecules in liver injury of mice exposed to DMF [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(4): 386-394 (in Chinese)

TLR4/Akt 相关分子在 DMF 暴露小鼠肝损伤中的作用

桑灵丽, 王扬眉, 李宏慧, 肖静*

南通大学公共卫生学院职业卫生与环境毒理学教研室, 南通 226019

收稿日期: 2021-09-28 录用日期: 2021-12-26

摘要: 二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)可通过呼吸, 皮肤及消化道等途径进入机体, 经肝脏细胞色素 P450 家族成员 2E1 的代谢, 生成活性代谢产物发挥多系统毒性。建立 DMF 暴露 ICR 小鼠模型, 观察 DMF 对肝脏影响及潜在机制。80 只雌雄各半 ICR 小鼠适应性喂养后随机分为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组, 分别以 0、350、700 和 1 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的 DMF 灌胃 90 d。记录体质量, 苏木精-伊红(HE)、油红 O 染色法观察小鼠肝脏病理学改变, 化学比色法测量肝脏谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)含量变化。蛋白质免疫印迹法(Western blotting, WB)检测 Toll 样受体 4(toll-like receptors 4, TLR4)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)活性。ELISA 法检测小鼠肝脏中白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、白介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子的水平。结果表明, 高剂量组小鼠体质量从第 5 周开始显著降低, 不同剂量组小鼠肝脏系数均显著增加($P < 0.05$), 暴露组 HE 染色结果可见不同程度炎症损伤, 油红 O 染色结果可见暴露组小鼠肝脏充斥着大量脂肪滴。和对照组相比, DMF 引起肝脏 ALT、AST 和 ALP 含量显著上升($P < 0.05$), TG 和 TC 的水平均在高剂量组出现显著增高。WB 结果显示, TLR4 水平及其下游分子 Akt、NF- κ B 磷酸化活性显著增高($P < 0.05$)。ELISA 结果显示, 与对照组相比, 暴露组小鼠 IL-1、IL-6、TNF- α 水平随着 DMF 暴露剂量的增加而显著增加($P < 0.05$)。以上结果表明, DMF 亚慢性暴露通过诱导 TLR4/Akt 信号通路激活, 影响肝脂代谢, 促进 NF- κ B 活化并介导免疫和炎症因子应答, 诱导肝细胞凋亡, 最终引起肝脏损伤。

关键词: 二甲基甲酰胺; ICR 小鼠; 肝损伤; Toll 样受体

文章编号: 1673-5897(2022)4-386-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Role of TLR4/Akt Related Molecules in Liver Injury of Mice Exposed to DMF

Sang Lingli, Wang Yangmei, Li Honghui, Xiao Jing*

Department of Occupational Medicine and Environmental Toxicology, School of Public Health, Nantong University, Nantong 226019, China

Received 28 September 2021 accepted 26 December 2021

Abstract: N,N-dimethylformamide (DMF) can enter the body through ingestion, respiration and skin contact, and is oxidized by CYP2E1 into toxic intermediates in liver. The aim of this study was to establish an effective ICR

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82173554); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20201444); 南通市科技项目(JC2020029); 南通大学大型仪器开放基金资助项目(K20220523000054)

第一作者: 桑灵丽(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: sanglingli301@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: xiaoj_1980@163.com

mouse model of DMF exposure and to identify potential mechanism of its hepatotoxicity. 80 ICR mice were randomly divided into a control group and three exposure groups (350, 700 and 1 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹). DMF was administered by oral gavage for 90 d. Body weight was recorded weekly. Levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) of each group were measured. The hematoxylin-eosin (H&E) and oil red O staining were performed. Total protein was extracted from the liver tissues. The expression of toll-like receptors 4 (TLR4), protein kinase B (Akt), and nuclear factor kappa-B (NF-κB) was tested by Western blotting (WB). The contents of inflammatory factors such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were measured by ELISA. The results showed that the body weight of the 1 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ group was significantly decreased from the 5th week and the liver coefficient increased significantly in all DMF exposure groups ($P<0.05$). The H&E staining showed different degrees of inflammatory damage in the exposed groups. The accumulation of lipid droplets was observed in the livers of all DMF exposure groups. In addition, a significant increase was recorded in AST, ALT and ALP levels in DMF groups ($P<0.05$). Compared with the control, the levels of TG and TC increased significantly in the 1 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ group. The Western blot results showed that the expression of TLR4, p-Akt and p-NF-κB was significantly increased after exposure ($P<0.05$). Moreover, the levels of IL-1, IL-6, and TNF-α increased significantly in all exposed groups compared with the control group ($P<0.05$). Above results indicate that subchronic exposure to DMF leads to liver damage by inducing the activation of TLR4/Akt signaling pathway, interfering with lipid metabolism and promoting inflammatory responses.

Keywords: N,N-dimethylformamide; ICR mouse; liver injury; Toll-like receptor

二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)因其理化性质优良而在工业生产和生活消费领域广泛应用,使用或生产过程中 DMF 可向土壤、水体和大气等环境介质扩散蓄积,并通过呼吸、皮肤或消化等途径进入机体^[1]。代谢动力学实验表明 DMF 主要经肝细胞色素 P450 家族成员 2E1 代谢生成异氰酸甲酯等活性代谢产物,从而引起肝脏、肾脏和心脏等多系统毒性,其中尤以肝脏损害最为显著^[2-4]。体内实验均证实 DMF 可引起肝细胞凋亡、肝酶异常,还可增加机体对其他外源化合物的敏感性^[5-7]。对此有研究归结于活性氧(ROS)有关的氧化应激级联反应,但同时也有研究通过基因敲除小鼠和人群丙二醛水平分析等结果推测,在 DMF 暴露中存在与氧化应激无关的损伤方式^[7-9],但迄今为止 DMF 肝损害效应的具体途径和相关分子尚不明确。

Toll 样受体 4(toll-like receptors 4, TLR4)作为一种先天免疫因子,已被证明在汞、砷和环境有机污染物等多种外源化学物所致肝损伤中发挥作用,可在内、外源信号诱导下,通过宿主继发危险相关分子模式激活下游靶标如核因子 κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt),诱发与肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor, TNF-α)、白介素 1 和白介素 6 等相关的炎症反应,还可经 p38

丝裂原活化蛋白激酶-自噬蛋白 P62 信号轴,通过 c-jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)级联活化方式诱导肝细胞自噬和炎症反应,最终造成肝细胞损伤^[10-12]。研究报道 DMF 暴露动物在出现消化道损害同时,可伴随 S24-7、类杆菌科、理肯菌科和消化链球菌科等菌群数量改变,并推测此现象可能会间接影响 Toll 受体相关信号而诱导肝脑损害^[13-14]。但截至目前,对于 TLR4 是否在 DMF 所致肝损伤中发挥作用及其涉及的具体分子尚不清楚。

鉴于以上原因,拟通过动物实验考察 DMF 对小鼠肝脏损害效应表现及对 TLR4 相关分子表达的影响,借此探讨 DMF 肝损伤的潜在机制与可能途径,为 DMF 生态毒理学研究提供基础数据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 试剂与仪器

试剂:DMF(Assay LC-MS 98%, Sigma-Aldrich 公司,美国);RT-PCR 试剂及引物(TaKaRa 大连宝生物公司,中国);丙氨酸转氨酶试剂盒、谷草转氨酶试剂盒和碱性磷酸酶试剂盒(Applied Biosystems 公司,美国);白细胞介素-1、白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子-α Elisa 试剂盒(江苏酶免实业有限公司,中国);其他试剂均为国产分析纯。

仪器:5332 型 PCR 仪(Eppendorf 公司,德国)、MODEL550 酶标仪(Bio-Rad 公司,美国)、RM2126 切片机(Leica 公司,德国)、CK40 显微镜(Olympus 公司,日本)、CFI60 数码相机(Nikon,日本)。

1.2 动物模型建立

雌雄各半 ICR 小鼠 80 只,雄性(23 ± 2) g,雌性(20 ± 2) g,上海西普尔必凯实验动物有限公司提供(SCXK 沪 2008-0016),实验室驯养 1 周后随机分为对照组($0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=20$)、低剂量组($350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=20$)、中剂量组($700 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=20$)和高剂量组($1400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=20$)。

1.3 指标检测

1.3.1 脏器系数

小鼠处死前称量质量,处死后用预冷生理盐水漂洗肝脏,滤纸吸干称取肝质量计算脏器系数:脏器系数=脏器质量(g)/小鼠体质量(g) $\times 100\%$ 。

1.3.2 肝脏病理观察

肝脏组织用 10% 中性福尔马林溶液固定,常规脱水后石蜡包埋制备 4 μm 切片,苏木精-伊红(HE)、油红 O 染色后显微镜观察其病理学变化。

1.3.3 肝脏组织匀浆中指标的检测

按照试剂盒说明书进行操作,测定肝脏组织匀浆中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性以及总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)含量。

1.3.4 肝脏蛋白质提取及蛋白印迹反应(Western blotting, WB)

称取约 100 mg 小鼠肝脏组织进行蛋白质提取,置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅蛋白变性 10 min,并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。根据实验目的,配制不同浓度的 SDS-PAGE 胶,80 V 电压下分离 30 min 左右,直至 marker 颜色分开,切换至 120 V 电压直至结束,对蛋白质进行电泳分离。电泳结束后,在湿转膜缓冲液中将 SDS-PAGE 胶上的蛋白转移至甲醇活化的 PVDF 膜上,100 V,湿转 70 min。转膜结束后,加入适量含 5% 牛奶的 TBST,室温轻摇封闭 1 h,结束后一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,一抗回收, TBST 清洗(5 min $\times 3$ 次)。HRP 偶联二抗室温孵育 1 h, TBST 清洗(5 min $\times 3$ 次)。用 ECL 发光液孵育约 3 min,放入 Tanon-5200 全自动化学发光图像分析系统拍摄,后用 Image J 软件分析。

1.3.5 ELISA 法测小鼠肝脏中炎症因子水平

称取小鼠肝脏组织约 100 mg 匀浆,用 ELISA 法测试小鼠肝脏中炎症因子白介素 1(IL-1)、白介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的活性。将试剂盒在室温下放置 20 min 后,从铝箔袋中取出所需板条。在标准品孔、空白孔、样品孔按照说明书加入所需试剂及待测样品,将带有辣根过氧化物酶标记的抗体加入每个孔中,空白孔除外,然后用封板膜封住反应孔并于恒温箱温育 60 min 或水浴锅水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 。弃去液体,残余水分拍干后加入洗涤液,放置 1 min,弃去洗涤液,拍干,重复洗 5 次。在每个孔中加入 A 液和 B 液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min 后,加入终止液,于 15 min 内在 450 nm 波长处测 OD 值。

1.4 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 24.0 统计软件分析数据。采用单因素方差分析,方差齐性用 Least-significant difference 进行检验,组间比较用 Student-Newman-Keuls 法检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果(Results)

2.1 DMF 暴露对小鼠一般状况的影响

DMF 暴露小鼠均出现不同程度活动迟缓,伴随毛发暗淡,脱毛。随暴露剂量及周期增长,出现明显易激惹,个别实验动物出现腹泻,鼻衄。

如表 1 所示,实验第 5 周时,高剂量组小鼠体质量(35.96 ± 5.24) g 与对照组(40.61 ± 5.77) g 相比开始出现显著降低,低、中剂量组小鼠虽也出现了体质量减少((40.06 ± 5.55) g, (38.81 ± 5.29) g),但与对照组相比差异并不显著。第 12 周时中、高剂量组小鼠体质量分别为(41.82 ± 6.12) g 和(39.62 ± 6.19) g,相比对照组(46.87 ± 6.90) g 分别降低了约 10.79% 和 15.48% ($P < 0.05$)。此同时,DMF 暴露造成小鼠肝质量的增加,不同剂量组小鼠肝脏系数与对照组相比均显著增加($P < 0.05$),如表 2 所示。

2.2 DMF 暴露对小鼠肝脏形态影响

对各组小鼠肝脏形态进行比较,光镜下 HE 染色如图 1 所示,肝索排列整齐,细质均匀,细胞核着色清晰可见,DMF 暴露组可见不同程度炎细胞浸润迁移,细胞空泡出现和细胞核偏移。油红 O 染色结果如图 2 所示,与对照组相比,暴露组小鼠细胞质及细胞间隙充斥着大量脂肪滴。

2.3 DMF 暴露对小鼠肝脏代谢酶水平影响

对 DMF 暴露后小鼠肝脏匀浆中肝功能相关酶

活性进行了检测,结果如表 3 所示,和对照组相比 DMF 暴露造成中、高剂量组 ALT、AST 和 ALP 含量显著上升($P<0.05$),其中 ALT 和 AST 随暴露剂量增加而显著上升。对肝脏代谢产物的检测发现,TG 和 TC 的水平都在 DMF 暴露组出现了增加,但 TC 仅在高剂量组出现显著增高,其中高剂量组和低剂量组相比也表现出显著的增加。

2.4 DMF 暴露对小鼠肝脏中相关蛋白水平的影响

如图 3 所示,通过对 DMF 暴露小鼠 TLR4 相关通路蛋白质表达水平的检测发现,TLR4 的表达随着 DMF 剂量增加显著上升,分别约是对照组的 1.30 倍、1.55 倍和 1.98 倍,其下游分子 Akt 和 NF- κ B 的

磷酸化改变趋势与之类似,均随着 DMF 剂量的增加而显著增高($P<0.05$)。

2.5 DMF 暴露对小鼠肝脏中炎症因子的影响

如表 4 所示,ELISA 结果显示小鼠肝脏中炎症因子 IL-1、IL-6 和 TNF- α 随着 DMF 暴露剂量的增加而增加。与对照组相比,IL-1 水平在中、高剂量组出现显著升高,尤其高剂量组中达到最高,约为对照组 4 倍左右($P<0.05$)。此外,和对照组相比,低剂量组、中剂量组和高剂量组 IL-6 活性分别升高约 1.15 倍、1.35 倍和 1.86 倍,并有随着剂量在组间逐渐上升的趋势($P<0.05$)。TNF- α 水平在中、高剂量组相较对照组也分别升高约 1.86 倍和 2.76 倍($P<0.05$)。

表 1 二甲基甲酰胺 (DMF) 暴露对小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 1 Effect of N,N-dimethylformamide (DMF) exposure on body weight of mice ($\bar{x}\pm s, n=20$)

暴露时间/周 Exposure time/week	对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
0	29.52 $\pm$ 3.64	29.64 $\pm$ 3.38	30.12 $\pm$ 4.37	29.71 $\pm$ 1.94
1	32.49 $\pm$ 5.33	32.84 $\pm$ 3.29	32.64 $\pm$ 4.59	32.28 $\pm$ 3.54
2	34.51 $\pm$ 5.74	34.21 $\pm$ 4.16	33.82 $\pm$ 4.93	33.45 $\pm$ 3.53
3	36.29 $\pm$ 5.86	36.26 $\pm$ 3.11	35.64 $\pm$ 5.28	34.68 $\pm$ 3.76
4	38.92 $\pm$ 6.48	38.36 $\pm$ 5.10	37.17 $\pm$ 5.53	35.70 $\pm$ 4.86
5	40.61 $\pm$ 5.77	40.06 $\pm$ 5.55	38.81 $\pm$ 5.29	35.96 $\pm$ 5.24*
6	42.11 $\pm$ 6.52	41.49 $\pm$ 5.79	40.07 $\pm$ 5.68	36.73 $\pm$ 5.67*
7	43.63 $\pm$ 6.74	42.40 $\pm$ 4.47	40.71 $\pm$ 6.45	36.94 $\pm$ 5.71*#
8	44.42 $\pm$ 6.24	43.37 $\pm$ 5.34	40.97 $\pm$ 6.03	38.39 $\pm$ 6.03*#
9	45.23 $\pm$ 6.93	43.83 $\pm$ 6.01	42.07 $\pm$ 4.89	39.01 $\pm$ 5.98*#
10	45.94 $\pm$ 6.58	44.54 $\pm$ 6.35	41.84 $\pm$ 6.09	38.98 $\pm$ 6.27*#
11	46.79 $\pm$ 6.78	45.47 $\pm$ 5.80	42.16 $\pm$ 5.23	38.83 $\pm$ 5.84*#
12	46.87 $\pm$ 6.90	46.14 $\pm$ 5.95	41.82 $\pm$ 6.12*#	39.62 $\pm$ 6.19*#
13	44.37 $\pm$ 5.75	43.93 $\pm$ 2.85	38.48 $\pm$ 6.30*#	37.17 $\pm$ 5.52*#

注: *与对照组相比, $P<0.05$; #与低剂量组相比, $P<0.05$ 。

Note: * indicates $P<0.05$ compared with control group; # indicates $P<0.05$ compared with low-dose group.

表 2 DMF 暴露对小鼠肝质量和脏器系数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 2 Effect of DMF exposure on liver weight and organ index of mice ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别 Group	肝质量/g Liver weight/g	肝脏系数/% Liver organ coefficient/%
对照组 Control group	1.76 $\pm$ 0.51	4.46 $\pm$ 0.40
低剂量组 Low-dose group	1.84 $\pm$ 0.34	4.88 $\pm$ 0.32*
中剂量组 Medium-dose group	1.93 $\pm$ 0.39	5.02 $\pm$ 1.41*
高剂量组 High-dose group	2.12 $\pm$ 0.48*#	5.46 $\pm$ 0.21*

注: *与对照组相比, $P<0.05$; #与低剂量组相比, $P<0.05$ 。

Note: * indicates $P<0.05$ compared with control group; # indicates $P<0.05$ compared with low-dose group.

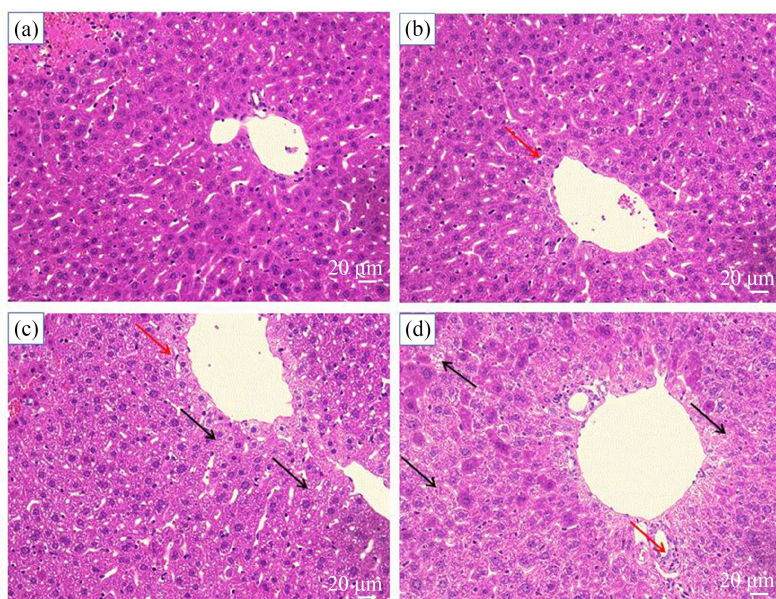


图 1 DMF 暴露后小鼠肝脏 HE 染色

注:(a)、(b)、(c)和(d)分别代表对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组($\times 400$), $n=20$;黑色箭头表示空泡,红色箭头表示炎性细胞。

Fig. 1 HE staining of mouse liver after DMF exposure

Note: (a), (b), (c), and (d) represent the control group, low-dose group, medium-dose group, high-dose group ($\times 400$), $n=20$; the black arrows indicate vacuoles, and the red arrows indicate inflammatory cells.

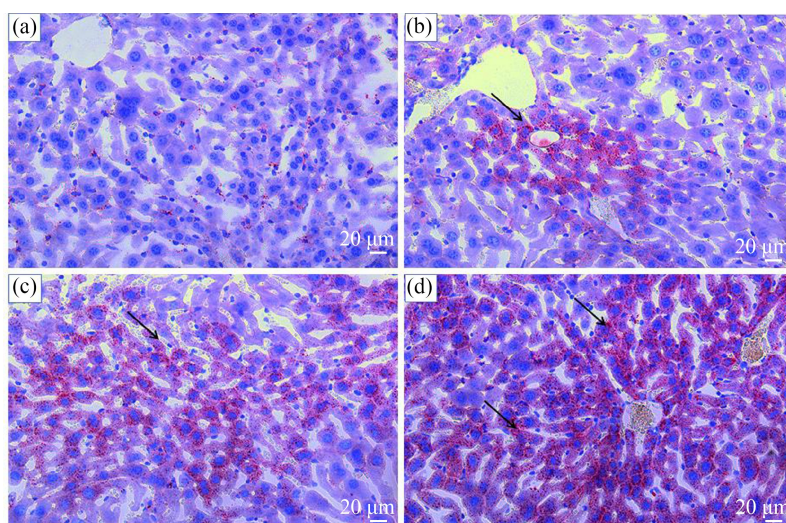


图 2 DMF 暴露后小鼠肝脏油红 O 染色

注:(a)、(b)、(c)和(d)分别代表对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组($\times 400$), $n=20$;黑色箭头表示脂肪滴。

Fig. 2 Mice liver oil red O staining after DMF exposure

Note: (a), (b), (c), and (d) represent the control group, low-dose group, medium-dose group, high-dose group ($\times 400$), $n=20$; the black arrow shows the fat drop.

3 讨论 (Discussion)

DMF 属于人类健康领域优先研究的 4 种污染物之一,具有明显的肝脏毒性,但具体机制未明^[15]。本次实验发现 DMF 能引起小鼠肝脏酶学及形态学的显著改变,伴随脂质代谢产物的水平升高,这与前

人对不同途径接触 DMF 的啮齿类及人、兔等种属研究的结果类似^[16-17],提示亚慢性 DMF 暴露可造成以肝脂代谢紊乱为特征的肝损伤表现。为进一步了解 DMF 毒效应机制,对 TLR4 及相关分子表达进行了检测。

TLR4 属于宿主应答反应中的一种细胞表面受体分子,在天然免疫和炎症反应中具有中心枢纽作用^[18]。除了其经典配体脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)外,近年研究发现 TLR4 也可被包括环境内分泌干扰物在内的多种外源化合物所响应,通过识别病原相关分子模式及危险相关分子模式活化下游衔接分子如髓样分化因子 88、 β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白等,最终调节信号依赖性转录因子活性,参与后续肝脏炎性损伤,被认为是急性肝损伤中重要一环^[10-11, 19-21]。

TLR4 的损伤效果与其对下游分子 Akt 的调控活化关系密切(图 4)。TLR4 可通过转录调节或诱导胞内磷脂酰肌醇激酶调节亚基 P85 活化来上调 Akt 磷酸化水平。活化的 Akt 通过上调固醇调节元件结合蛋白 1c 核积累、激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白受体、诱导肝 X 受体活化的方式上调脂肪酸合成酶和乙酰辅酶 A 羧化酶等表达促进脂质合成。研究发现野生型 C3H/HeN 小鼠和 TLR4 基因突变的 C3H/HeJ 小鼠相比具有更高的肝脏脂肪蓄积和炎症改变^[22]。此外 PM_{2.5} 暴露研究也发现 TLR4 可通过调

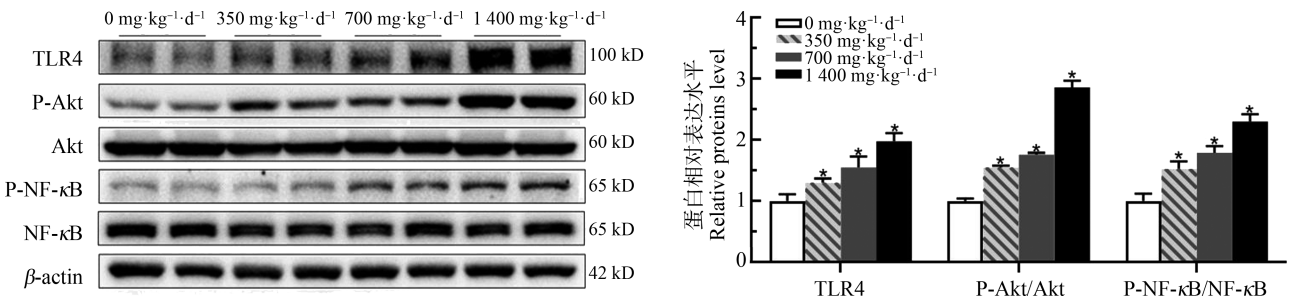


图 3 DMF 对小鼠蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=20$)
注: * 与对照组相比, $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of DMF on mouse protein expression level ($\bar{x}\pm s, n=20$)
Note: * indicates $P<0.05$ compared with control group.

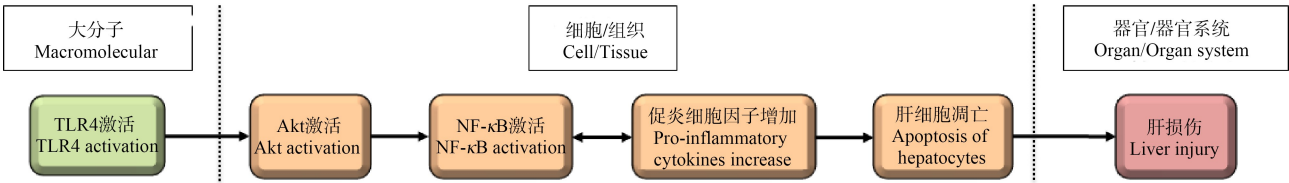


图 4 TLR4 相关分子在 DMF 致小鼠肝损伤中的作用方式

Fig. 4 TLR4 activation leading to liver injury with DMF exposure

表 3 DMF 暴露对小鼠血清肝代谢酶的影响($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 3 Effect of DMF on liver metabolic enzyme activity in serum of mice ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	ALT	AST	ALP	TC	TG
Group	/(U·g ⁻¹)	/(U·g ⁻¹)	/(King unit·g ⁻¹)	/(mmol·g ⁻¹)	/(mmol·g ⁻¹)
对照组 Control group	152.33±20.37	44.26±10.74	0.58±0.06	0.07±0.01	0.13±0.03
低剂量组 Low-dose group	159.83±33.15	47.59±9.42	0.67±0.09	0.07±0.03	0.15±0.05
中剂量组 Medium-dose group	191.38±37.50*	58.84±8.97*	0.68±0.08*	0.07±0.03	0.18±0.08*
高剂量组 High-dose group	230.94±40.22* [#] ^Δ	74.80±21.46* [#] ^Δ	0.70±0.05*	0.08±0.01*	0.27±0.11* [#]

注: * 与对照组相比, $P<0.05$; # 与低剂量组相比, $P<0.05$; Δ 与中剂量组相比, $P<0.05$; ALT 表示丙氨酸氨基转移酶, AST 表示谷草转氨酶, ALP 表示碱性磷酸酶, TC 表示总胆固醇, TG 表示甘油三酯。

Note: * indicates $P<0.05$ compared with control group, # indicates $P<0.05$ compared with low-dose group, Δ indicates $P<0.05$ compared with medium-dose group; ALT stands for alanine aminotransferase, AST stands for aspartate aminotransferase, ALP stands for alkaline phosphatase, TC stands for total cholesterol; TG stands for triglyceride.

表 4 DMF 对小鼠炎症因子活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)Table 4 Effect of DMF on the activity of inflammatory factors in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)(pg·mL⁻¹)

组别 Group	IL-1	IL-6	TNF- α
对照组 Control group	5.01±0.66	6.72±0.38	0.58±0.06
低剂量组 Low-dose group	6.34±1.17	7.74±0.49 [*]	0.67±0.09
中剂量组 Medium-dose group	8.01±1.41 [*]	9.08±0.15 ^{*#}	0.68±0.08 [*]
高剂量组 High-dose group	21.18±8.34 ^{*#Δ}	12.47±1.59 ^{*#Δ}	0.70±0.05 ^{*#}

注: * 与对照组相比, $P<0.05$; # 与低剂量组相比, $P<0.05$; Δ 与中剂量组相比, $P<0.05$ 。Note: * indicates $P<0.05$ compared with control group; # indicates $P<0.05$ compared with low-dose group; Δ indicates $P<0.05$ compared with medium-dose group.

节 Akt 反馈调节因子 STAT3 水平影响肝脏瘦素分泌,造成脂代谢异常^[23-24]。反之,TLR4 拮抗剂或敲除沉默均对缓解或阻断与下游 Akt 相关的脂毒性反应有效^[25-26]。但同时作为增殖调控和糖脂代谢的交叉调节分子,细胞代谢失衡可促使 Akt 招募活化 I κ B 激酶(I κ B kinase, IKK)复合物并降解 NF- κ B 抑制蛋白(inhibitor of nuclear factor kappa-B, I κ B),使其转位入核调节下游靶基因转录,促进炎症免疫^[27]。Shen 等^[28]通过药物抑制 TLR4 表达,发现能缓解 Akt/NF- κ B 激活的炎症反应,从而降低大鼠卵巢细胞凋亡。此外 TLR4 下游分子 MyD88 的抑制剂可通过阻滞 Akt 磷酸化及下调 I κ B 活性的方式减少 NF- κ B 活化,抑制 RAW 264.7 细胞中 LPS 所引起的炎症损伤^[29]。在本次实验中随着 DMF 暴露剂量的增加,TLR4 表达水平出现明显增加,同时伴随下游 Akt/NF- κ B 磷酸化水平的提升,与之同步的是血清中 TG 和 TC 的上升及肝细胞中脂滴数量的增加。由此推断,DMF 首先通过激活 TLR4/Akt 造成了脂代谢通路的亢进,引起细胞中脂肪蓄积增多,正常情况下,肝系统通过加快转运和脂肪酸氧化来对抗脂肪合成,但随着血中游离脂肪酸水平及细胞脂变性加重超过机体代偿,又作为外源性诱因刺激 Akt 加快上调 NF- κ B,触发终末炎症反应回路。

作为炎症网络的中心环节,NF- κ B 活化后将通过转录因子调控方式上调促炎细胞如 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-10 等的表达。作为最早最重要的炎症介质,TNF- α 能激活中性粒细胞和淋巴细胞促使白介素合成与释放,生成的 IL-1 和 IL-6 不仅刺激 T 细胞、巨噬细胞分泌各种趋化因子,还能增加肝细胞合成急性期蛋白引起肝细胞凋亡^[30]。与此同时,以上促炎因子也能介由二酰基甘油和神经酰胺等第二信

使作用激活丝裂原活化蛋白激酶通路,反向上调 NF- κ B 并形成炎症环路^[31]。在前人开展的体外实验中 DMF 可通过诱导高水平促炎因子如 TNF- α 、IL-1 等分泌造成 H9c2 细胞凋亡,以往发现的 DMF 相关肝损伤模型中,同样存在 TNF- α 、IL-1 等的显著上升^[32-33]。据此有理由推断 DMF 有能力通过上调 TLR4/Akt/NF- κ B 途径激活细胞炎症反应,并形成 NF- κ B 与促炎因子的自调节反馈环路,造成炎症关系网的恶性往复,延长炎症反应时间,最终导致肝细胞凋亡和肝脏损伤的不良结局。

综上所述,通过本研究发现 DMF 亚慢性暴露可造成 ICR 小鼠出现肝脏脂代谢紊乱、肝细胞凋亡,最终出现肝损伤的不良结局。我们推测 DMF 诱导 TLR4 的表达上调是这一现象的开端,此后 TLR4 通过上调 Akt 活性影响下游 NF- κ B 相关的炎症反应网络,造成肝脏免疫炎症调控失代偿而最终导致肝脏损伤的结局。

通讯作者简介:肖静(1980—),女,博士,副教授,主要研究方向为环境内分泌干扰物。

参考文献 (References):

- [1] Hu Z Y, Chang J, Guo F F, et al. The effects of dimethylformamide exposure on liver and kidney function in the elderly population: A cross-sectional study [J]. *Medicine*, 2020, 99(27): e20749
- [2] Kim T H, Kim S G. Clinical outcomes of occupational exposure to N,N-dimethylformamide: Perspectives from experimental toxicology [J]. *Safety and Health at Work*, 2011, 2(2): 97-104
- [3] Ding R, Chen D J, Yang Y J. Liver and heart toxicity due to 90-day oral exposure of ICR mice to N,N-dimethylformamide [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacol-*

- ogy, 2011, 31(3): 357-363
- [4] Zhao K, Wen L B. DMF attenuates cisplatin-induced kidney injury via activating Nrf2 signaling pathway and inhibiting NF- κ B signaling pathway [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(24): 8924-8931
- [5] Zhang Z, Zhu W, Liu Z Q, et al. Aberrant expression of miRNA-192-5p contributes to N,N-dimethylformamide-induced hepatic apoptosis [J]. *Journal of Applied Toxicology*: JAT, 2020, 40(12): 1683-1693
- [6] Kim T H, Kim Y W, Shin S M, et al. Synergistic hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide with carbon tetrachloride in association with endoplasmic reticulum stress [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 184(3): 492-501
- [7] 李明君, 董婧, 曾涛. 氧化应激和枯否细胞介导的炎症在二甲基甲酰胺致小鼠急性肝损伤中的作用[C]//中国毒理学会呼吸毒理专业委员会, 中华预防医学会卫生毒理分会. 2019 全国呼吸毒理与卫生毒理学术研讨会论文集. 厦门: 中国毒理学会呼吸毒理专业委员会, 中华预防医学会卫生毒理分会, 2019: 43
- [8] Liu Z Q, He Q M, Liu Y, et al. Hsa_circ_0005915 promotes N,N-dimethylformamide-induced oxidative stress in HL-7702 cells through NRF2/ARE axis [J]. *Toxicology*, 2021, 458: 152838
- [9] Wu Z J, Liu Q, Wang L, et al. The essential role of CYP2E1 in metabolism and hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide using a novel Cyp2e1 knockout mouse model and a population study [J]. *Archives of Toxicology*, 2019, 93(11): 3169-3181
- [10] Dong L, Liu Y L, Wang D P, et al. Imbalanced inflammatory response in subchronic arsenic-induced liver injury and the protective effects of *Ginkgo biloba* extract in rats: Potential role of cytokines mediated cell-cell interactions [J]. *Environmental Toxicology*, 2021, 36(10): 2073-2092
- [11] Jin R R, Liu L, Zhu W C, et al. Iron oxide nanoparticles promote macrophage autophagy and inflammatory response through activation of toll-like Receptor-4 signaling [J]. *Biomaterials*, 2019, 203: 23-30
- [12] 张弦. TLR4 介导的信号通路对肝细胞凋亡的影响及氧化苦参碱的干预机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2016: 42-47
- Zhang X. Effect of TLR4 mediated signal pathway on apoptosis of liver cells and intervention mechanism of oxymatrine [D]. Suzhou: Soochow University, 2016: 42-47 (in Chinese)
- [13] Zhang M, Zheng M, Wu Z J, et al. Alteration of gut microbial community after N,N-dimethylformamide exposure [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2017, 42(2): 241-250
- [14] 张蔓, 郑敏, 吴智君, 等. 二甲基甲酰胺暴露对大鼠肝脏损伤及肠道菌群的动态影响[C]//中国环境科学学会. 2017 环境与公共健康学术会议暨中国环境科学学会环境医学与健康分会, 中国毒理学会生化与分子毒理专业委员会 2017 年年会论文集. 广州: 中国环境科学学会, 2017: 67
- [15] Moorman W J, Ahlers H W, Chapin R E, et al. Prioritization of NTP reproductive toxicants for field studies [J]. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N Y), 2000, 14(4): 293-301
- [16] Lynch D W, Placke M E, Persing R L, et al. Thirteen-week inhalation toxicity of N,N-dimethylformamide in F344/N rats and B₆C₃F₁ mice [J]. *Toxicological Sciences*, 2003, 72(2): 347-358
- [17] Kennedy G L. Acute and subchronic toxicity of dimethylformamide and dimethylacetamide following various routes of administration [J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 1986, 9(2): 147-170
- [18] Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2021, 78(4): 1233-1261
- [19] Feng D, Zhang H M, Jiang X, et al. Bisphenol A exposure induces gut microbiota dysbiosis and consequent activation of gut-liver axis leading to hepatic steatosis in CD-1 mice [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 265(Pt A): 114880
- [20] 徐万鹏, 林军, 梁英琴, 等. 4-羟基-苯丙噁唑-2-酮对非酒精性脂肪肝病模型大鼠炎症和凋亡信号通路的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(11): 1298-1303
- Xu W P, Lin J, Liang Y Q, et al. Effects of 4-hydroxy-2 (3H)-benzoxazolone on inflammatory and apoptosis signaling pathways in nonalcoholic fatty liver disease model rats [J]. *China Pharmacy*, 2021, 32(11): 1298-1303 (in Chinese)
- [21] Kang H H, Kim I K, Lee H I, et al. Chronic intermittent hypoxia induces liver fibrosis in mice with diet-induced obesity via TLR4/MyD88/MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 490(2): 349-355
- [22] Uesugi T, Froh M, Arteel G E, et al. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice [J]. *Hepatology*, 2001, 34(1): 101-108
- [23] Campolim C M, Weissmann L, Ferreira C K O, et al. Short-term exposure to air pollution (PM_{2.5}) induces hypothalamic inflammation, and long-term leads to leptin resistance and obesity via Tlr4/Ikbke in mice [J]. *Scientific*

- Reports, 2020, 10(1): 10160
- [24] Ya P, Xu H G, Ma Y M, et al. Liver injury induced in Balb/c mice by PM_{2.5} exposure and its alleviation by compound essential oils [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 105: 590-598
- [25] Jiang W P, Deng J S, Huang S S, et al. *Sanghuangporus sanghuang* mycelium prevents paracetamol-induced hepatotoxicity through regulating the MAPK/NF- κ B, Keap1/Nrf2/HO-1, TLR4/PI3K/Akt, and CaMKK β /LKB $_1$ /AMPK pathways and suppressing oxidative stress and inflammation [J]. Antioxidants, 2021, 10(6): 897
- [26] Xu X L, Liu X D, Yang Y C, et al. Resveratrol exerts anti-osteoarthritic effect by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway via the TLR4/Akt/FoxO1 axis in IL-1 β -stimulated SW1353 cells [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2020, 14: 2079-2090
- [27] 瞿梅, 沈薇. PI3K/Akt 对饱和脂肪酸诱导肝细胞脂变内质网应激及脂性凋亡的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2015(3): 194-199
- Qu M, Shen W. Role of PI3K/Akt pathway in endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by saturated fatty acid in human steatotic hepatocytes [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2015(3): 194-199 (in Chinese)
- [28] Shen H R, Xu X, Li X L. Berberine exerts a protective effect on rats with polycystic ovary syndrome by inhibiting the inflammatory response and cell apoptosis [J]. Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E, 2021, 19(1): 3
- [29] Noman A S, Koide N, Hassan F, et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production via down-regulation of MyD88 expression [J]. Innate Immunity, 2009, 15(1): 33-41
- [30] Lv Y Y, Jin Y, Han G Z, et al. Ursolic acid suppresses IL-6 induced C-reactive protein expression in HepG2 and protects HUVECs from injury induced by CRP [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, 45(1-2): 190-194
- [31] Schütze S, Machleidt T, Krönke M. The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction [J]. Journal of Leukocyte Biology, 1994, 56(5): 533-541
- [32] 荣青秀, 杨永坚, 张婉婉, 等. 二甲基甲酰胺诱导 H9c2 心肌细胞凋亡机制的初步实验研究[C]. 哈尔滨: 中华预防医学会, 2016: 5-7
- Rong Q X, Yang Y J, Zhang W W, et al. Preliminary experimental study on the mechanism of H9c2 cardiomyocyte apoptosis induced by dimethylformamide [C]. Harbin: Chinese Preventive Medicine Association, 2016: 5-7
- [33] 张蔓, 郑敏, 吴智君, 等. 二甲基甲酰胺对大鼠肝脏抗氧化能力及 PPAR mRNA 的影响[J]. 卫生研究, 2018, 47(3): 352-357
- Zhang M, Zheng M, Wu Z J, et al. Effects of N,N-dimethylformamide on hepatic antioxidant capacity and liver PPARs mRNA levels in rats [J]. Journal of Hygiene Research, 2018, 47(3): 352-357 (in Chinese) ◆