

槲皮黄酮对酒精性肝损伤大鼠的治疗研究

冯莉芳 张玲莉

摘要 目的 探讨槲皮黄酮对酒精性肝损伤大鼠的治疗效果及其作用机制。**方法** 将 30 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、低剂量槲皮黄酮治疗组、中剂量槲皮黄酮治疗组、高剂量槲皮黄酮治疗组,每组 6 只大鼠。用酒精 + 0.5ml 鱼油灌胃诱导酒精性肝损伤模型,治疗组分别给予 40、80、160mg/kg 槲皮黄酮灌胃治疗,6 周后处死大鼠,观察各组大鼠间肝脏病理变化,测定血清转氨酶(ALT)及血浆内毒素水平,采用 ELISA 试剂盒测定细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-18 含量,并利用 Western blot 法检测大鼠肝组织 CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 蛋白表达水平。**结果** 相对正常对照组而言,组织切片检测发现模型大鼠出现肝细胞脂肪变性、点状坏死、伴随炎性细胞浸润,血清 ALT、TNF- α 、IL-1、IL-18 及血浆内毒素含量显著升高(P 均 <0.05),并且肝组织中 CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 蛋白表达水平明显上升(P 均 <0.05);槲皮黄酮治疗后发现肝损伤大鼠肝细胞脂肪变性仍存在,但点状坏死和炎性细胞浸润消失,血液中 TNF- α 、IL-1、IL-18 及内毒素含量明显降低(P 均 <0.05),并且肝组织中 CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 蛋白表达水平显著降低(P 均 <0.05)。**结论** 槲皮黄酮可以缓解酒精性肝损伤大鼠肝脏的炎症和坏死,其作用机制与降低内毒素水平、抑制库普弗细胞活化和下调促炎细胞因子表达有关。

关键词 槲皮黄酮 酒精性肝损伤 内毒素 细胞因子

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.034

Impacts of Quercetin on Alcoholic Liver Injury in Rats. Feng Lifang, Zhang Lingli. Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To study the impacts of quercetin on alcohol-stimulated liver injury in rats. **Methods** Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into control, model, quercetin treatment (40mg/kg, 80mg/kg, 160mg/kg) groups. Ethanol plus 0.5ml fish oil were used to induce alcoholic liver injury for 6 weeks. Liver injury was evaluated using pathological examination and serum ALT levels. The plasma endotoxin and serum TNF- α , IL-1 and IL-18 levels were analyzed by ELISA method. The expression of CD14, LBP, TNF- α , IL-1 and IL-18 proteins in the liver were measured by Western blot. **Results** The increased serum ALT, fatty degeneration, focal necrosis and inflammatory cell infiltration in the liver were investigated in model group. In addition, plasma endotoxin, serum TNF- α , IL-1, IL-18 levels, and the expression levels of CD14, LBP, TNF- α , IL-1, and IL-18 proteins significantly elevated in model group compared with control group ($P < 0.05$). However, quercetin treatment improved histological changes, and significantly reduced the levels of plasma endotoxin and serum TNF- α , IL-1, IL-18, as well as the expression of CD14, LBP, TNF- α , IL-1 and IL-18 proteins (P all < 0.05). Fatty degeneration was still investigated in quercetin treatment group, but focal necrosis and inflammatory cell infiltration disappeared. **Conclusion** Quercetin can protect liver against necrosis and inflammation induced by alcohol, and the mechanism may involve its effect on the reduction of plasma endotoxemia, and inhibition of Kupffer cell activity and proinflammatory cytokine expression.

Key words Quercetin; Alcoholic liver injury; Endotoxin; Cytokine

槲皮黄酮是广泛存在于植物中的黄酮类化合物,具有广泛的药理作用,主要包括抗炎症、抗氧化应激、清除氧自由基、抗血栓形成、抗黏附、抗病毒以及免疫调节作用,能够治疗和预防多种疾病^[1-5]。其来源广泛、价格低廉、药效突出、给药途径方便等优势。有关研究证实槲皮黄酮可以缓解肝损伤的作用^[6]。对其

作用机制研究发现它可以通过下调 NF- κ B 信号通路,进一步抑制炎症反应,在抗炎、抗肝纤维化方面有良好的应用前景^[7]。

肝细胞凋亡在酒精性肝损伤中的作用地位越来越受到重视,酗酒引起的内毒素血症是肝细胞凋亡的作用机制之一^[8,9]。内毒素可进一步作用于库普弗细胞膜上的受体 CD14 结合而活化库普弗细胞,从而激活级联反应,促发炎症反应,导致肝损伤^[10,11]。因此,防止内毒素血症是预防酒精性肝损伤的一个

作者单位:430060 武汉大学人民医院感染科(冯莉芳);药学部(张玲莉)

重要途径。本实验以酒精加鱼油灌胃大鼠来构建酒精性肝损伤大鼠模型,观察槲皮黄酮对酒精性肝损伤的影响,主要检测了槲皮黄酮对肝组织 CD14、TNF- α 、IL-1、IL-18 表达及对血浆中内毒素水平的影响。

材料与方法

1. 材料:SPF 级 SD 雄性大鼠购自湖北省疾控中心,体重 152 ± 13 g;乙醇和鱼油购自武汉中百仓储;肝功能试剂盒购自合肥艾力科生物技术有限公司;大鼠肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素 1(IL-1)、白介素(IL-18)ELISA 试剂盒购自华美生物科技有限公司;内毒素测定试剂盒购自联科生物有限科技公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自武汉谷歌生物有限公司; β -actin、CD14、LBP、TNF- α 、IL-1 和 IL-18 单克隆抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;二抗羊抗兔 IgG 购自美国 LI-COR Biosciences 公司;槲皮黄酮购自美国 Sigma 公司(批号 20141012)。

2. 酒精性肝损伤大鼠模型的构建及药物治疗:30 只 SD 雄性大鼠随机分成 5 组,分别为正常对照组、模型组、低剂量槲皮黄酮治疗组、中剂量槲皮黄酮治疗组和高剂量槲皮黄酮治疗组,将买来的大鼠放置动物房适应新环境 1 周后便可开始实验。正常对照组按照平时的饲养方法继续喂养并每日灌等热量的葡萄糖 + 0.5ml 鱼油;而其他 4 组大鼠每日用乙醇 + 0.5ml 鱼油灌胃,乙醇初始剂量为 6g/kg,1 周内递增 8g/kg,继续饲养 4 周。同时药物治疗组给予 40、80、160mg/kg 槲皮黄酮灌胃,模型组灌等量水。期间,所喂养的 30 只大鼠未发生死亡。在这期间,大鼠自由饮水,标准饮食,所有大鼠于低 5 周末麻醉后处死,腹主动脉采集血液标本,分离出血清和血浆用于相关指标的检测,可检测前置于 -20℃ 冰箱保存。取血完成后,腹部取出肝脏,部分肝组织放入 40g/L 甲醛固定用于组织病理学检测,部分肝组织 -70℃ 冻存用于做 Western blot 法检测。

3. 肝组织病理切片检测:将肝组织标本剪成体积约为 0.6cm × 0.6cm × 0.4cm,放入 40g/L 甲醛固定 12~24h,然后脱水、脱水透明,石蜡包埋,切片,HE 染色后,便可用于观察肝组织的脂肪变性、炎症坏死等病理变化。

4. 血清 ALT、TNF- α 、IL-1 和 IL-18 水平检测:收集血清后,采用日本西门子全自动生化分析仪检测 ALT 含量;ELISA 试剂盒检测血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 和 IL-18 含量,具体步骤及注意事项

参考 ELISA 试剂盒说明书进行,利用酶标仪在 490nm 处测定吸光度值,并建立标准曲线方程换算相关因子的浓度。

5. 血浆内毒素含量测定:取 100 μ l 血浆,加入无热原生理盐水 200 μ l、Tris-HCl 缓冲液 200 μ l 混匀,置于 100℃ 水浴加热 10min 去除潜在内毒素抑制剂,然后 3000r/min 离心 10min,取上清液检测。具体步骤及注意事项参考试剂盒说明书进行,利用酶标仪在 545nm 处测定吸光度值,并建立标准曲线方程换算内毒素的浓度。

6. Western blot 法检测 CD14、TNF- α 、IL-1、IL-18 表达:提取肝组织蛋白,采用 BCA 方法检测提取的蛋白浓度。向所提取的蛋白溶液中加入蛋白上样缓冲液,于 100℃ 加热煮沸 7min。每孔加入 30 μ g 蛋白上样,在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离,分离胶电泳时电压设置为 70V,浓缩胶电泳分离时电压设置为 120V;分离完成后在 200mV 电流转膜 100min;再将 PVDF 膜用 5% BSA 室温封闭 1h;一抗孵育 PVDF 膜过夜后,再二抗避光孵育 1h,用 TBST 洗膜 3 次,用 Odyssey infrared imaging system 双色红外激光成像系统扫膜分析蛋白表达水平。

7. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肝组织病理切片结果:正常对照组肝组织结构正常,肝细胞形态饱和有光泽,排列规则有序,少见脂肪滴,而未发现炎症与坏死细胞。模型组大鼠肝组织结构杂乱无章,肝细胞出现较多脂肪滴,部分呈点状坏死灶,间质中还发现炎性细胞浸润。槲皮黄酮高、中、低剂量处理组大鼠肝组织仍然存在少部分脂肪滴,但是炎性细胞浸润及肝细胞坏死消失,结果如图 1 所示。

2. 血清 ALT、TNF- α 、IL-1、IL-18 及血浆内毒素水平检测结果:模型组大鼠血清中 ALT 水平显著高于正常对照组及槲皮黄酮高、中、低剂量治疗组(P 均 < 0.05),而槲皮黄酮高、中、低剂量治疗组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型大鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 和 IL-18 水平明显高于正常对照组和治疗组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05),而槲皮黄酮高、中、低剂量治疗组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常对照组血浆内毒

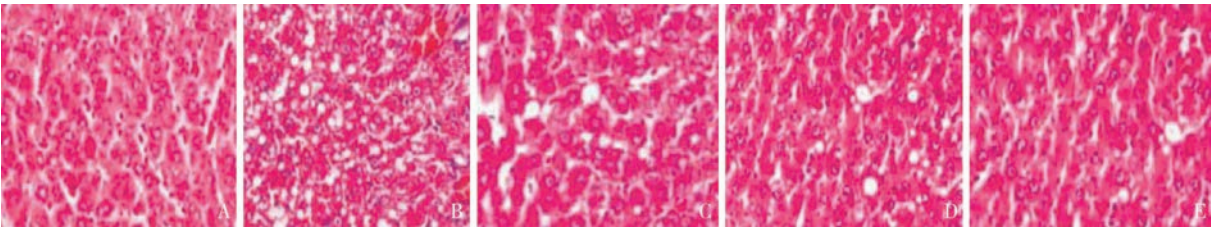


图 1 肝组织病理变化 (HE, ×40)
A. 正常对照组;B. 模型组;C. 低剂量槲皮黄酮治疗组;D. 中剂量槲皮黄酮治疗组;E. 高剂量槲皮黄酮治疗组

素含量为 $(0.09 \pm 0.02) \times 10^3$ EU/L,而模型组大鼠血浆内毒素水平上升到 $(0.44 \pm 0.13) \times 10^3$ EU/L,显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而经过槲皮黄酮高、中、低剂量治疗之后,大鼠血浆中内毒素含量明显降低,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠血液 ALT、TNF-α、IL-1、IL-18 和内毒素含量

组别	ALT(nkat/L)	TNF-α(ng/L)	IL-1(ng/L)	IL-18(ng/L)	内毒素(×10 ³ EU/L)
对照组	1109.32 ± 104.54	3.94 ± 0.54	2.91 ± 0.17	39.87 ± 0.21	0.09 ± 0.02
模型组	2518.64 ± 592.45 [*]	12.48 ± 0.19 [*]	3.94 ± 0.14 [*]	46.47 ± 2.01 [*]	0.44 ± 0.13 [*]
低剂量组	1642.74 ± 483.51 [#]	6.54 ± 0.07 [#]	3.14 ± 0.09 [#]	35.63 ± 2.13 [#]	0.26 ± 0.09 [#]
中剂量组	1439.87 ± 451.44 [#]	4.62 ± 0.13 [#]	2.94 ± 0.14 [#]	31.54 ± 2.74 [#]	0.24 ± 0.08 [#]
高剂量组	1156.93 ± 397.65 [#]	4.51 ± 0.06 [#]	2.65 ± 0.06 [#]	28.94 ± 1.97 [#]	0.21 ± 0.05 [#]

与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

3. 肝组织 CD14、LBP、TNF-α、IL-1、IL-18 蛋白表达水平: Western blot 法检测发现 CD14、LBP、TNF-α、IL-1、IL-18 蛋白在正常对照组大鼠肝组织中有少量的表达,而经乙醇 + 0.5ml 鱼油灌胃处理的模型组大鼠肝组织中 CD14、LBP、TNF-α、IL-1、IL-18 蛋白表达水平显著升高,与对照组和槲皮黄酮治疗组比较差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。而槲皮黄酮高、中、低剂量治疗组之间比较,差异无统计学意义,不呈剂量依赖性。结果见图 2。

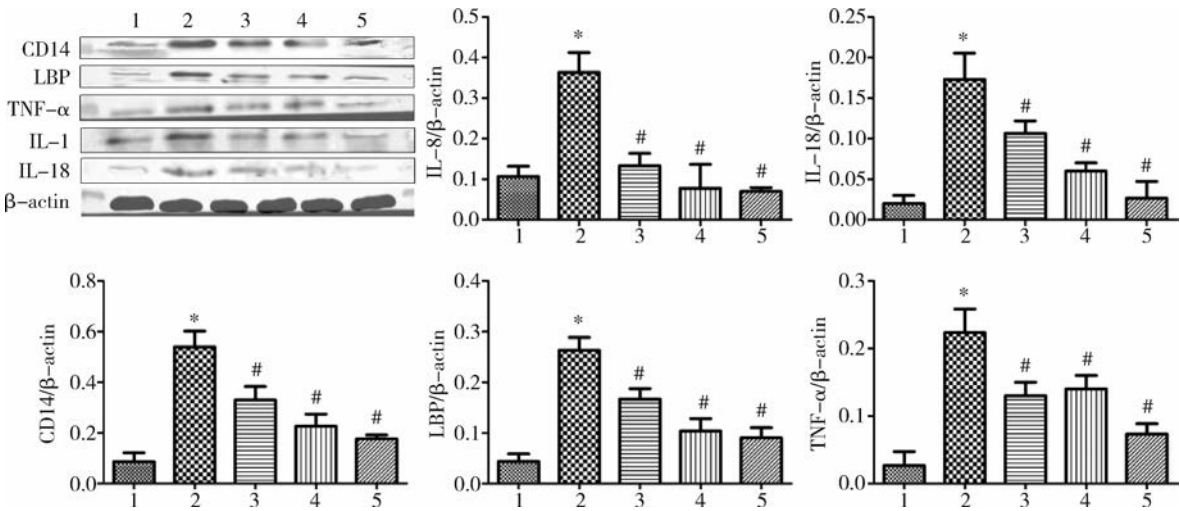


图 2 各组肝组织中蛋白表达分析
1. 正常对照组;2. 模型组;3. 低剂量槲皮黄酮治疗组;4. 中剂量槲皮黄酮治疗组;5. 高剂量槲皮黄酮治疗组。
与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

讨 论

酒精摄取时间过长会导致肠源性内毒素血症^[12]。实验结果显示模型鼠血浆中内毒素含量显著高于对照组。内毒素不仅能够直接对肝细胞进行损害,还可结合内毒素结合蛋白(LBP)形成复合物,该复合物进一步结合到库普弗细胞膜上的 CD14 受体激活库普弗细胞。LBP 在生理条件下合成较少,在肝脏受到应激情况下合成明显增加。研究发现 LBP、CD14 水平升高与酒精性肝损伤程度存在显著相关性,LBP 抑制剂可以通过下调 LBP 含量减少内毒素对巨噬细胞的活化。本实验结果发现模型大鼠肝组织中 LBP、CD14 表达水平显著升高,同时炎症因子的表达也明显上升。本实验结果还发现酒精性肝损伤大鼠血清中 TNF- α 、IL-1、IL-18 水平相对于对照组显著升高,差异有统计学意义。Western blot 法检测分析结果同样表明,TNF- α 、IL-1、IL-18 蛋白表达水平也显著高于对照组。除此之外,病理切片结果发现酒精性肝损伤大鼠肝组织呈中毒脂肪变性,发现少量点状坏死,并伴随着炎症细胞的浸润。上面结果说明乙醇刺激引起的内毒素血症激活库普弗细胞释放促炎因子引起肝损伤。

本实验采用槲皮黄酮高、中、低剂量治疗模型大鼠后,药物处理组大鼠中血浆内毒素水平相对模型组显著降低,CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 蛋白表达均明显下调,改善了酒精引起的促炎-抗炎因子之间的平衡,抑制可酒精性肝损伤,表现为血清 ALT 含量下调、肝细胞坏死消失、炎症减轻。然而,高、中、低剂量槲皮黄酮治疗组之间比较差异无统计学意义,可能是低剂量槲皮黄酮酒精性肝损伤治疗效果已经较好,因此增大剂量也并不能明显的提高疗效,还可能是因此大鼠之间差异性较大,导致组间治疗效果差异不明显。总体而言,槲皮黄酮能够缓解酒精性肝损伤,其作用机制包括降低内毒素血症,抑制库普弗细胞活化与促炎因子的表达和分泌。

参考文献

- 1 Truong VL, Ko SY, Jun M, *et al.* Quercitrin from *toon* *sinensis* (Juss.) M. Roem. attenuates acetaminophen-induced acute liver

toxicity in HepG2 cells and mice through induction of antioxidant machinery and inhibition of inflammation[J]. *Nutrients*, 2016, 8(7): E431

- 2 Li J, Liu QT, Chen Y, *et al.* Involvement of 5-HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of quercitrin and evidence of the involvement of the monoaminergic system[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 20(16): 6530-6536
- 3 Zhi K, Li M, Bai J, *et al.* Quercitrin treatment protects endothelial progenitor cells from oxidative damage via inducing autophagy through extracellular signal-regulated kinase[J]. *Angiogenesis*, 2016, 19(3): 311-324
- 4 Lu J, Zheng YL, Luo L, *et al.* Quercetin reverses d-galactose induced neurotoxicity in mouse brain[J]. *Behav Brain Res*, 2006, 171(3): 251-260
- 5 Kempuraj D, Castellani M, Petrarca C, *et al.* Inhibitory effect of quercetin on tryptase and interleukin-6 release, and histidine decarboxylase mRNA transcription by human mast cell-1 cell line[J]. *Clin Exp Med*, 2006, 6(5): 150-156
- 6 Shoskes DA. Effect of bioflavonoid quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents[J]. *Transplantation*, 2009, 66: 147-152
- 7 Dok-Go H, Lee K H, Kim HJ, *et al.* Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*[J]. *Brain Res*, 2013, 965: 130-136
- 8 Gomez-Florit M, Pacha-Olivenza MA, Fernández-Calderón MC, *et al.* Quercitrin-nanocoated titanium surfaces favour gingival cells against oral bacteria[J]. *Sci Rep*, 2016, 1(6): 224-234
- 9 Urbaschek R, Mcuskey RS, Rudi V, *et al.* Endotoxin, endotoxin-neutralizing-capacity, sCD14, sICAM-1, and cytokines in patients with various degrees of alcoholic liver disease[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001, 25: 261-268
- 10 Li W, Li H, Zhang M, *et al.* Quercitrin ameliorates the development of systemic lupus erythematosus-like disease in a chronic graft-versus-host murine model[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 11(1): F217-226
- 11 Wheeler MD. Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease[J]. *Alcohol Res Health*, 2003, 27: 300-306
- 12 Gómez-Florit M, Monjo M, Ramis JM. Quercitrin for periodontal regeneration: effects on human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 12(5): 165-173

(收稿日期:2016-12-19)

(修回日期:2017-01-12)

欢迎订阅

欢迎赐稿