

# 对乙酰氨基酚对大鼠原代肝细胞的损伤机制

鞠雷<sup>1,2</sup>, 王宝杰<sup>2</sup>, 马玉忠<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学动物科技学院, 保定 071001; <sup>2</sup>山东畜牧兽医职业学院, 潍坊 261061)

**摘要:** 胶原酶两步灌注法获取 SD 大鼠的原代肝细胞, 并用不同剂量的对乙酰氨基酚处理, MTT 法测定肝细胞的存活率, 分光光度法测定培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的含量。Western blotting 法测定大鼠肝细胞中细胞色素 P450 酶 2E1(CYP2E1)的表达水平。结果表明, 对乙酰氨基酚可导致肝细胞存活率降低, LDH 含量显著升高, CYP2E1 表达增加。说明达到一定的剂量时, 对乙酰氨基酚可引起肝细胞的损伤。

**关键词:** 大鼠; 原代肝细胞; 对乙酰氨基酚; 损伤机制

中图分类号: S854 文献标识码: A

## Mechanism of Rat Primary Cultured Hepatocyte Injury by Acetaminophen

Ju Lei<sup>1,2</sup>, Wang Baojie<sup>2</sup>, Ma Yuzhong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001;

<sup>2</sup>Shandong Vocational College of Animal Science and Veterinary Medicine, Weifang 261061)

**Abstract:** Rat hepatocytes were obtained from SD rats by two step collagenase perfusion, and treated with different concentration of acetaminophen. The hepatocyte viability was measured by MTT, the activities of lactate dehydrogenase (LDH) was analyzed by spectrophotometer, and the expression of CYP 2E1 were measured by western blotting. With induction of acetaminophen, the hepatocyte viability decreased, the activity of LDH increased, the expression of CYP 2E1 increased. It demonstrated that acetaminophen could lead to hepatocyte injury when acetaminophen reached to higher dose.

**Key words:** rat, primary cultured hepatocytes, acetaminophen, mechanism

肝脏是机体重要的消化营养、新陈代谢、内分泌和免疫器官<sup>[1]</sup>, 对维持动物机体的生命活动具有重要意义。目前很多原因可导致畜禽肝脏损伤, 其中毒物(过量的药物、饲料中霉菌毒素和环境中的有毒物质等)所致肝损伤在畜禽生产中较为多见。

许多学者用对乙酰氨基酚制备经典的肝损伤模型, 来研究肝损伤的机制, 保障人类和动物的健康<sup>[2]</sup>。对乙酰氨基酚(Acetaminophen, 简称 AP)又名醋氨酚, 商品名扑热息痛, 是临床常用的解热镇痛药。在正常治疗剂量时, 对乙酰氨基酚可达到较好的效果。当对乙酰氨基酚服用过量时, 使肝脏对抗氧化应激的能力下降, 从

而导致严重肝损伤<sup>[3]</sup>。

细胞色素 P450 酶在药物代谢中具有非常重要的作用。作为细胞色素 P450 酶家族中的一员, CYP2E1 可代谢许多物质, 如乙醇、对乙酰氨基酚等, 这些物质可使 CYP2E1 活性增强<sup>[4]</sup>。因而, CYP2E1 的活性是鉴别肝损伤的重要指标之一。

动物品种和个体千差万别, 怎样使用合适剂量的对乙酰氨基酚治疗畜禽的疾病, 更好地为畜牧业服务, 是每个畜牧兽医科技工作者努力的方向。笔者利用原代培养的大鼠肝细胞作为研究对象, 通过肝细胞存活率、LDH 和 CYP 2E1 等指标的变化, 来探索对乙酰氨

基金项目: 河北农业大学校长基金“中兽药药物代谢的分子机制研究”(2005-710)

第一作者简介: 鞠雷, 男, 1981 年出生, 硕士, 主要从事兽医学方面的研究。通信地址: 071001 河北省保定市灵雨寺街 289 号河北农业大学动物科技学院, Tel: 0312-7528443, Email: zhyjul@sina.com。

通讯作者: 马玉忠, 男, 1968 年出生, 教授, 博导。通信地址: 071001 河北省保定市灵雨寺街 289 号河北农业大学动物科技学院, Tel: 0312-7528443, Email: dkma@hebau.edu.cn。

收稿日期: 2008-07-28, 修回日期: 2008-08-28。

基酚肝细胞损伤的机制,为保障畜禽健康和促进畜牧业发展提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 成年 SD 大鼠, 雄性, 清洁级, 体重 200~250g, 购自河北省实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 WME 培养基购自 Sigma 公司; 胶原酶 I 购自 Gibco 公司; 对乙酰氨基酚购自中国药品生物制品检定所; 兔抗大鼠 CYP2E1 抗体为 Chemicon 公司产品; 羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥公司; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.1.3 试验时间和地点 试验时间为 2007 年 1 月至 2008 年 4 月, 地点为河北农业大学动物科技学院。

### 1.2 试验方法

1.2.1 大鼠肝实质细胞的原代培养与处理 采用胶原酶两步灌流法分离大鼠肝实质细胞。先灌入含有 0.5mM EGTA 的无钙 Hanks 溶液漂洗肝脏, 然后灌入 0.06% 胶原酶 I 消化, 再用 Hanks 溶液漂洗后取出肝脏, 分离肝细胞, 1000rpm 离心 5min, 除去红细胞及其它组织。肝细胞用 WME 培养基洗涤 3 次, 台盼蓝染色, 计数, 用含 10% 血清的 WME 制备成肝细胞悬液。

1.2.2 对乙酰氨基酚处理大鼠原代肝细胞 将肝细胞悬液铺于大鼠尾胶原处理过的 24 孔 (3×10<sup>5</sup>/孔) 和 96 孔 (3×10<sup>4</sup>/孔) 细胞培养板中, 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 4h, 然后换成无血清的 WME 培养基培养 24h。待细胞稳定后, 用 2-20mM 对乙酰氨基酚处理肝细胞, 3、6、9、24h 后检测 LDH 活性。

1.2.3 MTT 法测定肝细胞存活率 在每个时间段后, 小心吸出 96 孔板内的培养基, WME 培养基洗涤两次。每孔中加入含有 MTT 的 WME 培养基(0.5mg/ml)继续培养 4h, 吸去培养液, 加入 150μl DMSO, 室温下静置 10min, 酶标仪测定光吸收, 测定波长为 492nm, 参考波长为 630nm。由下面的公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{试验孔 } OD_{492} - \text{试验孔 } OD_{630}}{\text{对照孔 } OD_{492} - \text{对照孔 } OD_{630}} \times 100\%$$

1.2.4 LDH 测定 吸取各孔中培养液, 5000rpm 离心

5min, 取上清液, 按照试剂盒的说明测定 LDH 的活性。

1.2.5 Western blotting 法检测 CYP2E1 表达 每孔加蛋白 10μg, 12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干式转膜法转移至硝酸纤维素膜上, 5%的脱脂奶封闭, 加入一抗 (1:2000 兔抗大鼠 CYP2E1) 4℃ 孵育过夜, 1×TBST 漂洗 3×10min, 加入二抗 (1:2000 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG) 室温下孵育 60min, 1×TBST 漂洗 3×10min, NBT/BCIP 显色并照相。

1.3 数据分析 所得数据采用 SPSS11.0 软件进行分析和处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠原代肝细胞数量和成活率

通过胶原酶两步灌流法共获得 7.5~9×10<sup>7</sup> 个肝细胞, 成活率在 90%以上, 说明所分离到的肝细胞可以用于后续试验。

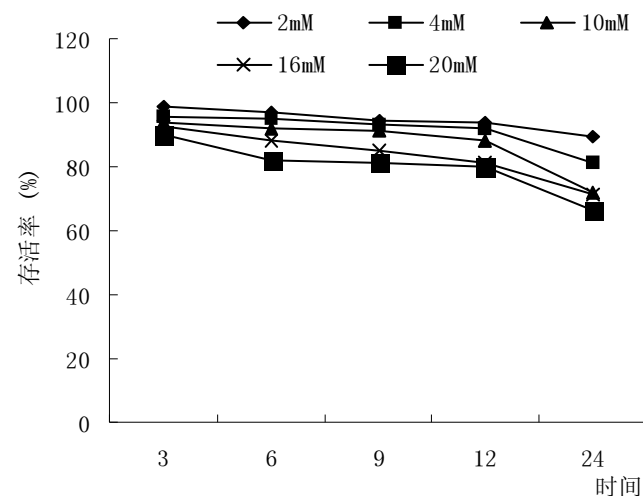


图 1 AP 诱导肝损伤细胞存活率的变化

### 2.2 对乙酰氨基酚对肝细胞存活率的影响

不同剂量的 AP 均可使肝细胞存活率降低。当剂量为 2mM 时, 对肝细胞的存活率影响较小。10mM AP 时, 9~24h 时间段对肝细胞的损伤较大。16mM AP 时, 肝细胞存活率随处理时间的延长而呈线性下降趋势。

### 2.3 对乙酰氨基酚对肝细胞 LDH 的影响

不同剂量的对乙酰氨基酚在不同时间段对肝细胞 LDH 的影响见表 1。

表 1 肝细胞损伤后 LDH 含量变化(U/L)

组别	3h	6h	9h	24h
A 对照组	101.33 ± 5.93	152.69 ± 55.14 <sup>DEF</sup>	152.69 ± 32.18 <sup>DEF</sup>	66.74 ± 12.04 <sup>DEF</sup>
B 2mM 组	292.80 ± 193.66	174.70 ± 38.96 <sup>DEF</sup>	170.51 ± 36.31 <sup>DEF</sup>	70.93 ± 19.48 <sup>DEF</sup>
C 4mM 组	482.88 ± 228.85	407.41 ± 79.33 <sup>DEF</sup>	382.25 ± 40.36 <sup>DEF</sup>	291.08 ± 29.72 <sup>DEF</sup>
D 10mM 组	504.89 ± 275.21	646.40 ± 19.67 <sup>ACDF</sup>	722.92 ± 87.24 <sup>ACDF</sup>	654.79 ± 85.31 <sup>ABCDF</sup>
E 16mM 组	534.59 ± 376.71	742.84 ± 47.25 <sup>ABD</sup>	749.13 ± 73.62 <sup>ABD</sup>	722.92 ± 55.87 <sup>ABD</sup>
F 20mM 组	544.38 ± 389.88	717.68 ± 113.90 <sup>ABD</sup>	739.69 ± 100.83 <sup>ABD</sup>	756.47 ± 77.64 <sup>ABD</sup>

注: 同一列中各组比较, 大写字母代表 P<0.01, 小写字母代表 P<0.05。

各 AP 处理组皆使 LDH 升高。处理 3h, 各剂量组与对照组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。处理 6、9、24h, 10mM、16mM 和 20mM AP 组同对照组、2mM 和 4mM AP 各组之间差异均极显著 ( $P < 0.01$ )。

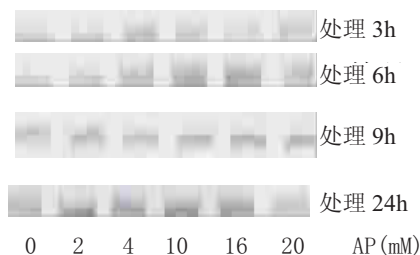


图 2 AP 诱导肝细胞 CYP 2E1 表达的变化

#### 2.4 对乙酰氨基酚对大鼠肝细胞 CYP2E1 的影响

由图 2 可知, 处理 3h 时, 各处理浓度的 AP 与对照组的 CYP 2E1 表达水平差别不大。处理 6h 时, CYP 2E1 的表达水平随 AP 浓度的升高而增强; 但 20mM 时 CYP 2E1 的表达水平下降。处理 9h 和 24h 时, CYP 2E1 的表达程度大体一致。

### 3 讨论

离体培养的原代肝细胞系统及其体外损伤模型, 既可排除整体水平时神经体液的调节作用, 又可排除离体器官水平时不同细胞之间的相互影响, 从而可以观察各种药物对肝细胞的直接作用。实验用胶原酶灌注在体肝脏的方法分离获取大鼠原代肝细胞, 用不同剂量的对乙酰氨基酚处理肝细胞。

由 MTT 试验可知, 低剂量(2mM, 4mM)的 AP 对肝细胞的影响较小, 中剂量(10mM)的 AP 对肝细胞的影响增大, 特别用药一段时间后, 肝细胞损伤严重; 当用大剂量(16mM, 20mM)的 AP 时, 用药后 6h 即可出现肝细胞损伤, 后期肝损伤十分严重。当超过一定的剂量后, 肝细胞随 AP 浓度的增加和作用时间的延长而损伤作用增强。

肝细胞制造和分泌胆汁, 合成糖原、胆固醇、胆盐、脂蛋白和血浆蛋白; 灭活和转化内源性或外源性的有毒物质<sup>[5]</sup>。试验中, AP 使肝细胞存活率下降, 使肝细胞的功能受到影响, 进而降低动物的生产性能。

LDH 主要存在于组织细胞内, 以肝和肾中含量最高, 主要催化乳酸生成丙酮酸, 继而合成葡萄糖, 供给肌肉 ATP<sup>[6]</sup>。当肝细胞膜破裂或者通透性增加时, LDH 就从肝细胞中释放出来, 因此 LDH 是鉴定肝损伤的重

要指标。试验中, 较低剂量的 AP 时, 肝细胞存活率降低较少, 但 LDH 显著升高, 说明 AP 通过某些体内介质以及其代谢产生的小分子物质引起肝细胞膜通透性增加, 这与 Hearse<sup>[7]</sup>的研究结果相一致。

作为细胞色素 P450 酶家族中的一员, CYP2E1 代谢许多环境中的有毒物质、致癌物以及前致癌物<sup>[8]</sup>。试验中, CYP 2E1 的表达水平随 AP 浓度的增加而升高, 说明高剂量的 AP 可诱导 CYP2E1 的高效表达, CYP2E1 的升高引起代谢作用增强, 从而产生大量的毒性物质, 进而引起肝细胞的严重损伤。当 AP 的浓度为 20mM 时, 所产生的大量毒性物质导致肝细胞大量死亡, 因而 CYP 2E1 的表达水平较弱。

迄今发现所有 CYP2E1 的底物在各种动物中都是相同的<sup>[9]</sup>。因此研究大鼠 CYP 2E1 对其它动物具有重要的指导意义。笔者通过大鼠原代肝细胞存活率、LDH 和 CYP 2E1 等指标的变化, 探索了对乙酰氨基酚对肝细胞的损伤机制, 为对乙酰氨基酚的合理利用, 为保肝药物的筛选提供了依据, 因而具有较为重要的意义。

### 参考文献

- [1] 时维静, 李立顺, 俞浩. 柴芪颗粒抗菌及保肝作用研究. 畜牧兽医学报, 2005, (5): 502-505.
- [2] Aleksunes LM, Slitt AM, Cherrington NJ, et al. Differential Expression of Mouse Hepatic Transporter Genes in Response to Acetaminophen and Carbon Tetrachloride. *Toxicological Sciences*, 2005, 83:44-52.
- [3] Pearce B, Grant IS. Acute liver failure following therapeutic paracetamol administration in patients with muscular dystrophies. *Anaesthesia*, 2008, 63(1):89-91.
- [4] Chen C, Krausz KW, Idle JR, et al. Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and Cyp2e1-null mice. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(8): 4543-4559.
- [5] 王树迎, 王政富. 动物组织学与胚胎学. 北京: 中国农业出版社, 2000: 133.
- [6] 周顺伍. 动物生物化学. 北京: 中国农业出版社, 1999: 94
- [7] Hearse DJ, Tosaki A. Free radicals and calcium: simultaneous interacting triggers as determinants of vulnerability to reperfusion induced arrhythmias in the rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1988, 20:213-223.
- [8] Tanaka E, Terada M, Misawa S. Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 2000, 25:165-175.
- [9] Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J*, 1992, 6:724-730.