

[文章编号] 1000-4718(2009)06-1142-05

## 槲皮素对 LPS 诱导的体外培养肝细胞损伤的影响及机制\*

矫强<sup>1</sup>, 郭竹英<sup>△</sup>, 徐芒华, 王世婷, 高丰厚  
(上海交通大学医学院附属第三人民医院实验中心, 上海 201900)

**[摘要]** 目的: 通过体外观察槲皮素对脂多糖(LPS)所致肝细胞损伤和肿瘤坏死因子(TNF-α)表达的影响, 探讨槲皮素的作用及其机制。方法: 胶原酶灌注分离培养大鼠肝细胞, 40 mg/L LPS 诱导损伤, 同时用 0.5-10 μmol/L 浓度槲皮素进行干预, 作用 24 h 后, 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)、PI-AnnexinV 染色检测肝细胞的增殖凋亡比例, 测定上清液乳酸脱氢酶含量, ELISA、RT-PCR 方法检测 TNF-α 表达。结果: 40 mg/L LPS 作用于原代培养大鼠肝细胞 24 h 后, 与对照组相比, 细胞生长抑制率达 27%, 细胞总凋亡率 30.2%, 培养上清液 LDH 含量增加 20 倍, TNF-α mRNA 和蛋白表达明显增加(P<0.05)。给予 0.5-10 μmol/L 槲皮素后, 各项指标有明显下降, 且呈量效关系。结论: 0.5-10 μmol/L 槲皮素拮抗 LPS 所致的肝细胞损伤, 其保护作用的机制可能与抑制 TNF-α 的表达有关。

**[关键词]** 槲皮素; 肝细胞; 脂多糖类; 肿瘤坏死因子  
**[中图分类号]** R363.2 **[文献标识码]** A

### Effects of ouercetin on lipopolysaccharide induced hepatocyte injury *in vitro*

JIAO Qiang, GUO Zhu-ying, XU Mang-hua, WANG Shi-ting, GAO Feng-hou  
(Experimental Center, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China. E-mail: zyguoo@126.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study the effects of quercetin on lipopolysaccharide (LPS) induced hepatocyte injury and the expression of TNF-α *in vitro*. **METHODS:** Hepatocytes were isolated from male Sprague-Dawley rats by collagenase perfusion. LPS at concentration of 40 mg/L was used to induce injury to the cultured cells, and 0.5-10 μmol/L quercetin was added at the same time. After 24 h of incubation, the cell apoptosis rates were detected by MTT and PI-AnnexinV. LDH and TNF-α were measured by kits. **RESULTS:** 40 mg/L LPS caused a 27% growth inhibition. The apoptosis rate was 30.2%. LDH leakage was 20 folds higher than normal. TNF-α expression significantly increased. Treated with quercetin at doses of 0.5-10 μmol/L, the apoptosis rate, LDH leakage and TNF-α expression in hepatocytes were attenuated in a dose dependent manner. **CONCLUSION:** 0.5-10 μmol/L of quercetin protects hepatocytes from injury induced by LPS, which is associated with suppression of the inflammatory cytokine TNF-α.

**[KEY WORDS]** Quercetin; Hepatocytes; Lipopolysaccharides; Tumor necrosis factor

肝脏是人体生物转化和解毒最重要的脏器, 同时与肠道存在密切的血供联系。因此, 在机体发生严重感染、休克、严重创伤等情况下, 肝脏也首当其冲面临来自肠道的细菌和毒素的侵袭<sup>[1]</sup>。肝脏在机体清除大肠杆菌等产生的内毒素过程中具有重要作用, 而内毒素中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)成分与其受体结合后又可通过多种途径引起肝细胞损害<sup>[2,3]</sup>。随着内毒素信号通路的研究进展, 使用药物

阻断早期肝细胞凋亡的研究已成为一种趋势, 如何从中药有效成分中发掘具有相应作用的药物是当前研究的热点之一。中药成分槲皮素在既往许多研究中被证实具有抗炎、抗氧化、抗癌等多种生物学活性<sup>[4]</sup>。其对抗内毒素对机体损伤的作用近来亦屡见报道<sup>[5]</sup>。本文通过体外观察槲皮素对 LPS 所致肝细胞损伤和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF-α)表达的影响, 对槲皮素的作用及机制进行

[收稿日期] 2008-06-10 [修回日期] 2008-11-17

\* [基金项目] 上海市第三人民医院科研基金资助项目(No. sy206-14)

△通讯作者 E-mail: zyguoo@126.com

探讨。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物与材料

200g 左右雄性 SD 大鼠购自上海西普尔 - 比凯实验动物有限公司,合格证 SCXK(沪)2003-0002。LPS、槲皮素、胶原酶 IV 均购自 Sigma。LPS 以三蒸水配制成 2 g/L 储存液,分装冻存于 -20 ℃,临用前用培养液稀释至终浓度。槲皮素用 DMSO 配制成 10 mmol/L 储存液,1 周内使用,临用前用培养液稀释至终浓度。Annexin V - FITC 凋亡检测试剂盒购自上海晶美公司,ReverTra Ace RT - PCR 试剂盒购自 Toyobo。TNF -  $\alpha$  ELISA 检测试剂盒购自 Biosource。

### 2 方法

**2.1 大鼠原代肝细胞分离及培养** 取 200 g 雄性 SD 大鼠 1 只,3% 戊巴比妥麻醉,无菌条件下打开腹腔,按文献<sup>[6]</sup>采用 0.5 g/L 胶原酶 IV 两步法原位灌流消化分离肝细胞,台盼蓝染色计数细胞活力 >85%,含 10% 胎牛血清和 20 U/L 胰岛素的 DMEM 培养液 (Gibco) 洗涤后重悬,并调整细胞密度至  $1 \times 10^8$  cells/L,接种于鼠尾胶包被的培养板。第 2 d 换液,去除未贴壁的细胞。细胞贴壁 48 h 后状态良好,成多边形,细胞较大,胞浆丰富,核仁明显,部分细胞片状融合,可以用于实验。

**2.2 LPS 对原代培养大鼠肝细胞损伤作用及槲皮素的作用** 细胞贴壁 48 h 后更换不含胰岛素的 DMEM 培养液,加入终浓度为 40 mg/L LPS 诱导肝细胞损伤并设空白对照组,同时加入终浓度为 0.5、1、5、10  $\mu$ mol/L 槲皮素进行干预,孵育 24 h 后进行检测。

① MTT 实验 按如上所述分组接种肝细胞于 96 孔板,每组 6 复孔,孵育 24 h 后,每孔加 5 g/L MTT 试剂 20  $\mu$ L,孵育 4 h 后小心吸干培养液,每孔加 150  $\mu$ L DMSO 并振荡 30 min 溶解沉淀,于酶标仪 490 nm 处读取吸光度值,根据公式:抑制率 =  $1 - \frac{\text{处理组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}}$ ,计算肝细胞生长抑制率<sup>[7]</sup>。

② 细胞培养上清液乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 含量测定 按如上所述分组接种肝细胞于 24 孔板,每组 6 复孔,孵育 24 h 后吸取各孔培养上清液 0.5 mL,在全自动生化仪上进行 LDH 含量测定。

③ 肝细胞凋亡检测 按如上所述分组接种肝细胞于 6 孔板,每组 3 复孔,孵育 24 h 后,各组细胞用 0.05% 胶原酶消化、离心, PBS 洗涤,按 Annexin V - FITC 凋亡检测试剂盒说明,用缓冲液重悬,加 An-

nexin V - FITC 和 PI 染液各 5  $\mu$ L,室温避光孵育 15 min,于 EPICS - XL 流式细胞仪上进行检测。结果判定: Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> 为正常细胞; Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> 为早期凋亡细胞; Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> 为晚期凋亡及坏死细胞。

④ 培养上清 TNF -  $\alpha$  蛋白 ELISA 检测 按如上所述分组接种肝细胞于 96 孔板,每组 6 复孔,孵育 24 h 后吸取培养上清液,按试剂盒说明书操作,每孔加培养上清 50  $\mu$ L,并做标准曲线,经与抗体孵育 2 h,生物素亲和素放大 30 min,加显色液 20 min 终止后,于酶标仪 490 nm 处读取数据,根据标准曲线计算各孔 TNF -  $\alpha$  浓度。

⑤ TNF -  $\alpha$  mRNA 表达的检测 引物委托北京鼎国生物公司合成, TNF -  $\alpha$  引物 636 bp,正义链 5' - ACT CGA GTG ACA AGC CCG TA - 3',反义链 5' - TGG AAG ACT CCT CCC AGG TA - 3';  $\beta$  - actin 引物 602 bp,正义链 5' - CAT TTG CGG TGC ACG ATG GAG - 3',反义链 5' - GCC ATC CTG CGT CTG GAC CTG - 3'; Trizol 试剂提取总 RNA,按 ReverTra Ace RT - PCR 试剂盒在 MyCycler PCR 仪上进行两步法 RT - PCR。目的片段循环扩增 35 次,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析系统扫描测定目的片段和  $\beta$  - actin 扩增产物的吸光度值,并计算 TNF -  $\alpha$ / $\beta$  - actin 比值。

### 3 统计学处理

用 SPSS 11.5 统计学软件进行分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用单因素方差分析,均数的两两比较采用 *t* 检验。

## 结 果

### 1 细胞形态学观察 (图 1)

可见对照组肝细胞较大,胞浆丰富,核仁明显。40 mg/L LPS 作用 24 h 后肝细胞出现空泡、皱缩、碎裂等表现,许多细胞核仁消失。加槲皮素干预组肝细胞较 LPS 损伤组空泡明显减少,基本无碎裂,大部分核仁可见。

### 2 MTT 实验

经计算 LPS 损伤组生长抑制率达 27.0%,而加入 10  $\mu$ mol/L 槲皮素可使细胞生长抑制率降至 7.2%,  $P < 0.05$ ,见图 2。

### 3 细胞培养上清液 LDH 含量

40 mg/L LPS 作用 24 h 后肝细胞培养上清 LDH 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 0.5 - 10  $\mu$ mol/L 槲皮素干预后 LDH 明显下降,且呈量效关系。

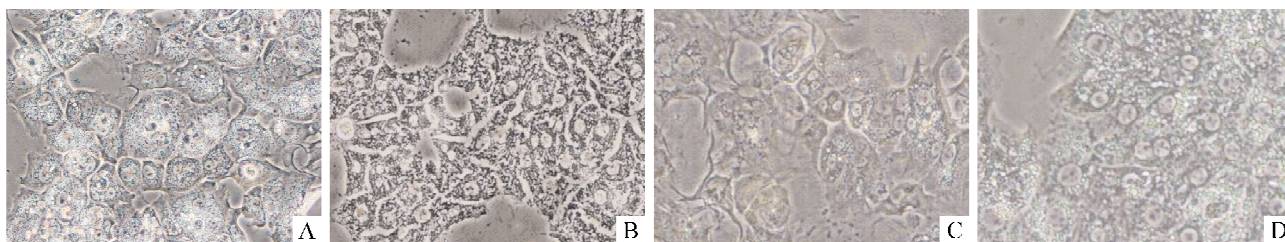


Fig 1 Morphology of unstained hepatocytes ( $\times 200$ ). A: control; B: treated with 40 mg/L LPS; C: treated with 40 mg/L LPS + 1  $\mu\text{mol/L}$  quercetin; D: treated with 40 mg/L LPS + 10  $\mu\text{mol/L}$  quercetin.

图1 肝细胞形态学观察

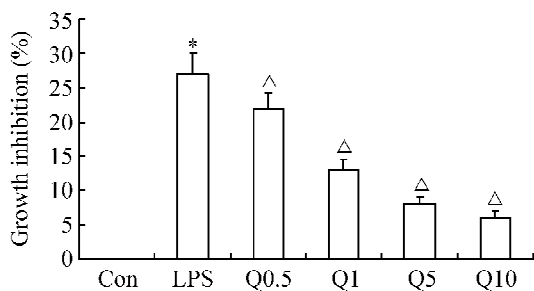


Fig 2 The inhibition rates of hepatocytes growth.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs LPS group. Con: control; LPS: treated with 40mg/L LPS; Q0.5 - Q10: treated with 40mg/L LPS + 0.5 - 10  $\mu\text{mol/L}$  quercetin.

图2 肝细胞生长抑制率

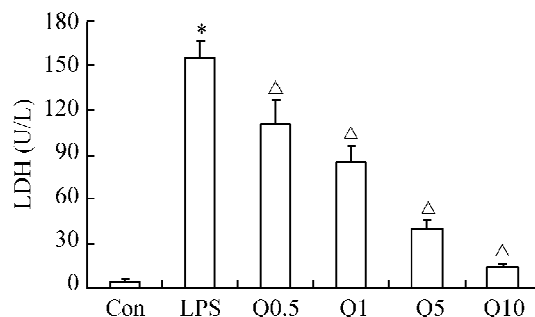


Fig 3 LDH activity in the culture supernatant of hepatocytes.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs LPS group. Con: control; LPS: treated with 40 mg/L LPS; Q0.5 - Q10: treated with 40 mg/L LPS + 0.5 - 10  $\mu\text{mol/L}$  quercetin.

图3 肝细胞培养上清 LDH 活性

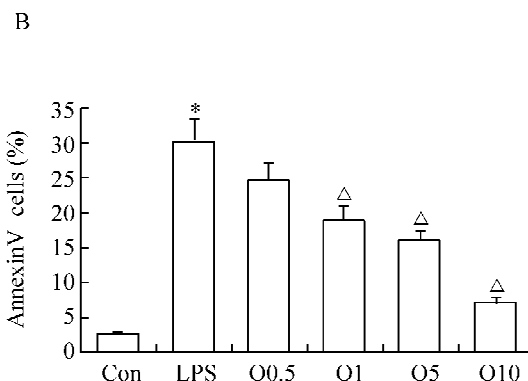
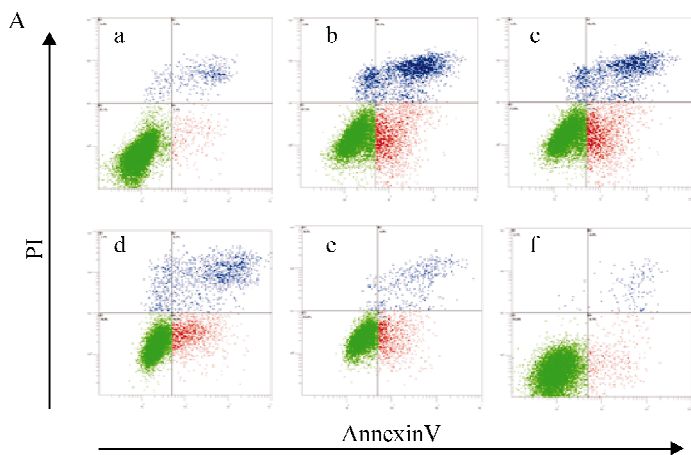


Fig 4 Hepatocytes apoptosis (AnnexinV<sup>+</sup> cells) rates.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs LPS group. A: dot plots from flow cytometry. a: control; b: treated with 40 mg/L LPS; c - f: treated with 40 mg/L LPS + 0.5 - 10  $\mu\text{mol/L}$  quercetin. B: histograms of statistics data.

图4 肝细胞凋亡率

#### 4 肝细胞凋亡

40 mg/L LPS 作用 24 h 后肝细胞凋亡达 30.2%，10  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素干预后凋亡率明显下降 ( $P < 0.05$ )。

#### 5 培养上清 TNF- $\alpha$ 蛋白的表达

图 5 示 LPS 刺激后，肝细胞 TNF- $\alpha$  蛋白表达明显增加，槲皮素对 TNF- $\alpha$  蛋白表达具有抑制作用。

#### 6 TNF- $\alpha$ mRNA 表达 (图 6)

LPS 刺激后肝细胞 TNF- $\alpha$  mRNA 表达明显增加，槲皮素对 TNF- $\alpha$  mRNA 表达具有抑制作用。

### 讨 论

内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁成分，其主要对人体产生毒性作用的成分是脂多糖。在休克、缺

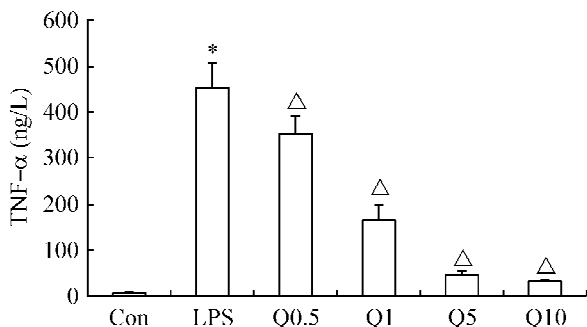


Fig 5 TNF -  $\alpha$  level in the culture supernatant of hepatocytes.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs LPS group. Con: control; LPS: treated with 40 mg/L LPS; Q0.5 - Q10: treated with 40 mg/L LPS + 0.5 - 10  $\mu\text{mol/L}$  quercetin.

图 5 肝细胞培养上清 TNF -  $\alpha$  含量

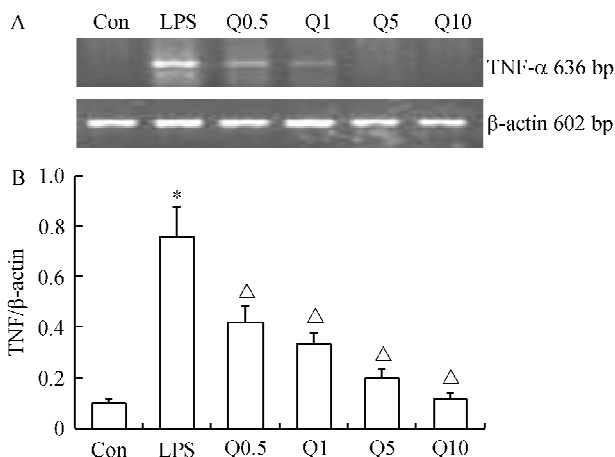


Fig 6 Expression of TNF -  $\alpha$  mRNA in hepatocytes treated with LPS or/and quercetin.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs LPS group. A: TNF -  $\alpha$  mRNA expression of the rats. Con: control; LPS: treated with 40 mg/L LPS; Q0.5 - Q10: treated with 40mg/L LPS + 0.5 - 10  $\mu\text{mol/L}$  quercetin. B: histograms of statistics data.

图 6 TNF -  $\alpha$  mRNA 表达

血 - 再灌注胃肠衰竭、创伤和严重烧伤等重症患者, 内毒素血症是很常见的。肝硬化、急、慢性及重症肝炎等肝病患者往往合并有肠源性内毒素血症。许多研究表明内毒素血症可能是肝功能衰竭发生的外源性物质基础<sup>[8]</sup>。由于 LPS 在机体内引起的生物学效应极其广泛而复杂, 而各种永生代肝细胞株均经过转化, 与正常肝细胞在特性上有一定差别。Jeschke 等<sup>[9]</sup>的研究表明, HepG2、C3A、HL - 7702 等多种肝细胞株对 LPS 的刺激都没有反应。这使得对 LPS 对肝脏损伤机制和防治的研究非常困难。为解决这一问题, 我们采用大鼠肝原代细胞体外培养的方法, 建立 LPS 损伤的体外模型, 对其进行探讨。

槲皮素是一种在植物界分布广泛, 具有多种生物活性的黄酮类化合物。其抗炎、抗氧化作用已得到了众多研究者的肯定, 常作为研究新药物有无抗炎抗氧化作用的阳性对照药<sup>[10]</sup>, 但对于原代培养的肝实质细胞的 LPS 损伤有何影响, 目前研究尚少。在本实验中, 40 mg/L LPS 作用于原代培养大鼠肝细胞 24 h 后, 与对照组相比, 许多细胞核仁消失、细胞内出现大量空泡, 部分细胞固缩, 细胞生长抑制率达 27%, 细胞总凋亡率 30.2%, 培养上清液 LDH 含量增加 20 倍, 与 LPS 在体内引起的肝细胞损伤病理变化相似。给予 0.5 - 10  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素后, 反映细胞损伤各项指标有明显改善, 且呈量效关系。这表明槲皮素对 LPS 所致肝细胞损伤有明确的保护作用。

TNF -  $\alpha$  已是公认的最主要的炎症因子之一, 不仅可以直接作用于肝细胞表面的 TNF -  $\alpha$  受体, 对其造成损伤, 还可以通过诱导各种炎症细胞趋化因子、细胞间黏附分子、血管黏附分子的生成, 将损伤作用进一步放大<sup>[11,12]</sup>。本实验也显示 LPS 诱导肝细胞损伤后 TNF -  $\alpha$  mRNA 和蛋白表达明显增加, 而槲皮素可使 TNF -  $\alpha$  mRNA 和蛋白表达上调受到抑制, 其保护作用可能与抑制 TNF -  $\alpha$  表达有关。本研究过程中还发现 25  $\mu\text{mol/L}$  剂量以上的槲皮素保护作用没有增强, 反而随剂量增加显示促进肝细胞凋亡的表现(结果未显示)。这提示槲皮素在小剂量时保护作用明显, 使用时应控制剂量。

[参 考 文 献]

[1] Efstathopoulos N, Tsaganos T, Giamarellos - Bourboulis EJ, et al. Early apoptosis of monocytes contributes to the pathogenesis of systemic inflammatory response and of bacterial translocation in an experimental model of multiple trauma[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 145(1):139 - 146.

[2] Zhou Z, Wang L, Song Z, et al. Abrogation of nuclear factor - kappa B activation is involved in zinc inhibition of lipopolysaccharide - induced tumor necrosis factor - alpha production and liver injury [J]. Am J Pathol, 2004, 164(5):1547 - 1556.

[3] Su C, Teitelman M. Anti - TNF therapy: Is this our answer to pyoderma gangrenosum [J]. Gastroenterology, 2006, 131(4):1347 - 1349.

[4] 张继红, 梁力建, 黄洁夫. Quercetin 调节肝癌 HepG2 细胞 Fas 表达诱导细胞凋亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(5):997 - 1001.

[5] Hougee S, Sanders A, Faber J, et al. Decreased pro - inflammatory cytokine production by LPS - stimulated PBMC upon *in vitro* incubation with the flavonoids apigenin, lute-

- olin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(2):241-248.
- [6] Soars MG, Grime K, Sproston JL, et al. Use of hepatocytes to assess the contribution of hepatic uptake to clearance *in vivo*[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(6):859-865.
- [7] Matsuda H, Ninomiya K, Morikawa T, et al. Protective effects of amide constituents from the fruit of Piper chaba on D-galactosamine/TNF- $\alpha$ -induced cell death in mouse hepatocytes[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(6):2038-2042.
- [8] Leifeld L, Fielenbach M, Dumoulin FL, et al. Inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase expression in fulminant hepatic failure[J]. *J Hepatol*, 2002, 37(5):613-619.
- [9] Jeschke MG, Klein D, Thasler WE, et al. Insulin decreases inflammatory signal transcription factor expression in primary human liver cells after LPS challenge[J]. *Mol Med*, 2008, 14(1-2):11-19.
- [10] 何煜舟,丁美萍. 木犀草素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤的血管内皮细胞的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(7):1285-1288.
- [11] Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease[J]. *J Pathol*, 2008, 214(2):149-160.
- [12] Francis F, James P, Luyendyk, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide/ranitidine-induced inflammatory liver injury[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 100(1):267-280.

中国病理生理学会 2009 年活动计划表

序号	活动名称	主要内容	时间	规模(人)	地点	联系人	电话
1	中国病理生理学会动物病理生理专业委员第十五次学术研讨会	1.以猪病、禽病为主研讨近年进展,并交流各单位研究情况;2.动物病理学,特别是病理生理学教学经验交流;3.评选青年优秀论文;4.参观山东农业大学和青岛农业大学等。	2009年8月中旬	120-140	山东省泰安市	郑世民	0451-55190405
2	中国病理生理学会休克专业委员会第八届暨微循环专业委员会第十三届学术大会	开展学术交流 休克专业委员会改选	2009年10月下旬	100-150	广州 (南方医科大学 基础医学院)	陈波 黄巧冰	020-61648233 转 829 020-61648186
3	第七届海峡两岸心血管会议	学术交流	2009年8月	300	昆明医学院	朱广瑾	010-65296476
4	全国第12届实验血液学会议	学术交流	2009年	600	四川大学华西医院	刘霞 刘艳荣	010-8832598
5	2009国际病理生理教学研讨会	学术交流	2009年11月	100	上海	卢建	021-65509792
6	中国病理生理学会大中专教育工作委员会第二次会议	(1)各省大中专病理教学组织建设; (2)第六版临床医学专业、第二版五年一贯制护理专业《病理学与病理生理学》教材的启用的讨论;(3)论文交流; (4)委员增补	2009年8月10日- 2009年8月14日	100	厦门	张薇 谢琳琳	13965019455 0551-3818368 13866710720 0551-3818222
7	中国病理生理学会炎症感染发热低温专业委员会和中医病理生理专业委员会第12届全国学术会议	学术交流	2009年8月7日-11日	100	乌鲁木齐	戚仁斌	020-85228071
8	第十次全国动脉粥样硬化性疾病学术研讨会	动脉粥样硬化基础与临床最新研究进展	2009年8月		内蒙古呼和浩特市	任俊芳	15073488189
9	消化专业委员会委员会议	研讨组织发展、课题合作、下一次全国学术会议等事宜	2009年6月	20左右	济南	李永渝、王要军	021-65985447
10	中国病理生理学会第八届四次常务理事会议	研讨组织发展,讨论筹备2010年国际会议相关事宜	2009年8月	20左右	青海	高钰琪	023-68752331
11	中国病理生理学会微循环专业委员会委员会会议	微循环专业委员会工作小结,讨论下届会议内容/时间/地点/承办单位	2009年10月	30	广州	李玉珍	010-66939774
12	微循环新理论和技术学习班	微循环新理论和技术	2009年9月	60	北京	徐菲菲	010-66939774
13	IAS 中国行		2009年1-12月		全国各大城市	任俊芳	15073488189
14	AS 斑块稳定、血管炎症及血栓论坛;代谢综合征;脑动脉粥样硬化病变及临床事件研究进展论坛;外周动脉粥样硬化病变及临床事件研究进展;心血管疾病的一级预防		2009年3-12月		全国各大城市	任俊芳	15073488189
15	糖尿病教育管理学习班	培训	2009年5月	200	北京	钱利波	010-68003939
16	中国动脉硬化杂志编委会会议		2009年6月		衡阳	任俊芳	15073488189