

- 88- 91.
- [9] Josep M, Pique. Portal hypertensive gastropathy [ J]. Clin Gastroenterol, 1997, 11(2): 257- 270.
- [10] Tdashi Iwao. Portal- hypertensive gastropathy develops less in patients with cirrhosis and fund varices[ J]. J Hepatol, 1997, 269(5): 1235- 1241.
- [11] Leung FW, Robert A, Guth PH. Gastric mucosal blood flow in rats after administration of 16, 16- dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> at a cytoprotective dose[ J]. Gastroenterology, 1985, 88(9): 1948- 1953.
- [12] John L, Wallace. Mechanisms of protection and healing: Current knowledge and future research[ J]. Am J Med, 2001, 110(1): 19- 23.
- [13] Ken- ichi Katsu, Satoru Yabe. Comparison of gastric mucosal surface pH reponse times after intravenous administration of histamine<sub>2</sub>- receptor antagonists[ J]. Clin Ther, 1995, 17(3): 433- 440.
- [14] Hideki I, Masashi Y, Go Y, et al. Effects of famotidine, a histamine type 2 receptor antagonist, on microcirculatory disturbance of the stomach induced by full- thickness burn injuries as a model for surgical stress in rats[ J]. Curr Ther Res, 2004, 65(4): 373- 382.

中国病理生理杂志 Chinese Journal of Pathophysiology 2005, 21(6): 1154-1166

[ 文章编号 ] 1000- 4718(2005)06- 1154- 02

## 槲皮素抑制离体大鼠肝星状细胞增殖

卢春风, 陈廷玉, 王淑秋, 王淑香  
(佳木斯大学基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

**[ 摘 要 ]** 目的: 研究酪氨酸蛋白激酶抑制剂槲皮素对肝星状细胞增殖的影响。方法: 用链酶蛋白酶和胶原酶原位灌注消化正常大鼠肝脏, Nycodenz 密度梯度离心分离肝星状细胞, 采用 MTT 比色法, 流式细胞术检测细胞增殖水平。结果: 槲皮素处理组可显著地抑制肝星状细胞的增殖并呈剂量依赖性关系; 可使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多, S 期细胞减少。结论: 槲皮素可明显抑制肝星状细胞增殖。

**[ 关键词 ]** 肝; 槲皮素 **[ KEY WORDS ]** Liver; Quercetin  
**[ 中图分类号 ]** R363 **[ 文献标识码 ]** A

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝纤维化中细胞外间质(extracellular matrix, ECM)的主要产生细胞,其大量增殖在肝纤维化的发生中起核心作用,抑制其增殖是抗肝纤维化的重要对策<sup>[1]</sup>。而HSC的增殖依赖多种生长因子的作用,尤其是血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)<sup>[2]</sup>。PDGF能够强烈刺激HSC的增殖、迁移,促使其胶原的产生和沉积,在肝纤维化发生发展中起着非常重要的作用。槲皮素(Quercetin)是酪氨酸蛋白激酶抑制剂,广泛存在于植物界的黄酮类化合物,毒性很低,具有多种生物学活性<sup>[3]</sup>。槲皮素抑制HSC增殖的机制目前仍不十分明了。本实验主要观察槲皮素对体外培养大鼠HSC增殖的影响,旨在探讨其在防治肝纤维化中的可能作用。

### 材 料 和 方 法

#### 1 实验动物

Wistar 雄性大鼠, 体重 400- 450 g, 购自佳木斯大学实验动物中心。

#### 2 主要试剂

链酶蛋白酶为 Merck 公司产品; IV型胶原酶、Nycodenz、槲

皮素为 Sigma 公司产品; 小牛血清为 Gibco 公司产品; MTT 购自上海华舜生物工程有限公司。

#### 3 HSC 分离与培养<sup>[4]</sup>

采用胶原酶与链酶蛋白酶原位消化, Nycodenz 密度梯度离心分离 HSC, 将细胞以  $1 \times 10^9$  cells/L 浓度接种在培养瓶中, 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养, 24 h 细胞贴壁后换液, 以后每 3- 4 d 更换 1 次培养液。

#### 4 槲皮素对 HSC 细胞增殖的影响

采用 MTT 法。将生长良好的 HSC 用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,  $1 \times 10^7$  cells/L 接种于 96 孔培养板, 每组设 3 个复孔, 分别加入不同浓度的槲皮素(10、20、40 和 80 μmol/L)。在酶标仪上测定 595 nm 处的吸光度(A)值。细胞增殖率(proliferation rate, PR)的换算式为:  $PR = T/C \times 100$ , 其中 T 为处理孔 A 值, C 为对照孔 A 值。

#### 5 槲皮素对 HSC 细胞周期的影响

取对数生长期 HSC 接种于 6 孔板( $1 \times 10^5$  cells/well), 24 h 后加无血清 DMEM 培养液培养 24 h, 再加入槲皮素(10、20、40 和 80 μmol/L)作用 48 h 后(每组设 3 个复孔), 胰酶消化, 磷酸缓冲液(PBS)清洗, 70% 冷乙醇悬浮固定细胞, - 20 ℃ 过夜。

[4] 刘思明,叶任高,汪涛,等. 腹腔内液体容量对腹膜功能的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2001, 17(3): 151-155.

[5] 刘思明,叶任高,汪涛,等. 一种简单的慢性腹膜透析高通透性大鼠模型[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(2): 186-189.

[6] 刘思明,叶任高,郭群英,等. 戊巴比妥腹腔内注射对腹膜转运功能的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 1(1): 5-9.

[7] Zakaria ER, Carlsson O, Rippe B. Limitation of small- solute ex- change across the visceral peritoneum: effects of vir-

bration[J]. Perit Dial Int, 1997, 17(1): 72- 79.

[8] Flessner MF, Lofthouse J. Blood flow does not limit peritoneal transport[J]. Perit Dial Int, 1999, 19(Suppl 2): S102- S105.

[9] Flessner MF. Small solute transport across specific peritoneal tissue surfaces in the rat[J]. J Am Soc Nephrol, 1996, 7(2): 225- 233.

[10] Krediet RT, Lindholm B, Rippe B. Pathophysiology of peritoneal membrane failure[J]. Perit Dial Int, 2000, 20(Suppl 4): S22- S42.

(上接第 1154 页)

加入等量 PBS 再洗 2 遍, 65 mg/L 碘化丙啶 (PI) 避光 4 ℃ 显色 1 h, 流式细胞仪检测。

### 6 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 *t* 检验判断差异的显著性。

## 结 果

### 1 槲皮素对 HSC 细胞增殖的影响

由表 1 可知槲皮素能明显抑制 HSC 增殖, 呈剂量依赖性关系。

表 1 槲皮素对 HSC 增殖的影响

Tab 1 Effect of quercetin on proliferation of HSC( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

Group	A	PR(%)
Control	0.91 ± 0.06	100.00
Quercetin ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )		
10	0.84 ± 0.04	92.31
20	0.77 ± 0.03*	84.62
40	0.68 ± 0.05*	74.73
80	0.57 ± 0.04**	62.64

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs control.

### 2 槲皮素对 HSC 细胞周期的影响

加药组随浓度增加, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例逐渐增多, 而 S 期细胞比例逐渐下降, G<sub>2</sub> 期变化不明显(表 2)。

## 讨 论

槲皮素是酪氨酸蛋白激酶特异性抑制剂, 竞争性抑制酪氨酸蛋白激酶活性<sup>[5]</sup>, 从而阻断 PDGF 诱导的 HSC 细胞增殖。本实验结果显示: 槲皮素能抑制 HSC 的增殖并呈剂量依赖性关系; 可使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多, S 期细胞减少, 表明槲皮素可阻滞 HSC 由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期进入 S 期, 抑制了 HSC 的增殖。在细胞水平上证明了槲皮素可抑制 HSC 增殖, 相应减少 ECM 的合

表 2 槲皮素对 HSC 细胞周期的影响

Tab 2 Effect of quercetin on cell cycles of HSC( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

Group	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control	60.4 ± 0.5	17.8 ± 1.2	21.8 ± 1.0
Quercetin			
10	62.8 ± 3.5	16.7 ± 2.0	20.5 ± 4.9
( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )			
20	61.7 ± 0.6	14.3 ± 1.5	24.0 ± 0.9
40	63.5 ± 1.0*	10.8 ± 2.0*	25.7 ± 3.2
80	69.0 ± 1.1**	7.6 ± 0.6**	23.4 ± 1.5

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs control.

成, 从而阻断了肝纤维化的形成, 表明槲皮素具有体外抗肝纤维化作用。相信随着对其作用机制的深入研究, 槲皮素将成为临床上一种抗肝纤维化的新药。

### [参 考 文 献]

[1] Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis: role of hepatic satellite cell activation[J]. Med Gen Med, 2002, 15(3): 419- 427.

[2] 陆翠华. 血小板源生长因子在肝星状细胞内的信号传导机制[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(6): 469- 471.

[3] 王艳芳, 王新华, 朱宇同. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 171- 173.

[4] 卢春风, 陈廷玉, 陶佳南. 大鼠肝星状细胞的分离和培养[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(2): 41- 42.

[5] Kawada N, Seki S, Inoue M, et al. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N- acetylcysteine, on the function of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells[J]. Hepatology, 1998, 27(5): 1265- 1274.