

山柰酚抵抗对乙酰氨基酚引起的肝细胞损伤研究

张伟贤^{1,2} 兰 天^{1,3} 董嘉乐³ 郭 姣^{1,2}

(1 广东省代谢病中西医结合研究中心,广州,510006; 2 广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室,广州,510006; 3 广东药科大学药学院,广州,510006)

摘要 目的:探究山柰酚(KA)抵抗对乙酰氨基酚(APAP)诱导的肝细胞损伤的作用。方法:CCK-8 法检测 KA 对肝细胞活性的影响,检测细胞 LDH 释放比率确定 APAP 诱导肝细胞损伤模型的浓度和时间;CCK-8 法检测肝细胞活性,检测肝细胞释放的 LDH,观察肝细胞形态评估 KA 对对乙酰氨基酚诱导肝细胞损伤的影响;Western Blot 检测 p-JNK、JNK、EndoG 蛋白表达。结果:本研究采用 5 mmol/L APAP 诱导肝细胞 24 h 建立药物肝损伤细胞模型。与 APAP 组比较,KA 组肝细胞细胞的形态明显改善,凋亡细胞明显减少($P < 0.01$),LDH 释放比率明显下降($P < 0.001$),Western Blot 结果表明经 KA 治疗后,肝 p-JNK 和 Endo G 蛋白表达明显下调。结论:该研究表明 KA 通过抑制 p-JNK 和 Endo G 来抵抗 APAP 诱导肝细胞凋亡以达到肝细胞的保护作用。

关键词 山柰酚;对乙酰氨基酚;凋亡;肝细胞保护

Protective Effects of Kaempferol Against Acetaminophen in Hepatocytes-Induced Injury

Zhang Weixian^{1,2}, Lan Tian^{1,3}, Dong Jiale³, Guo Jiao^{1,2}

(1 Institute of Chinese Medicinal Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006; 2 Guangdong Metabolic Disease Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine, Guangzhou 510006, China; 3 Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract **Objective:** To investigate the protective effects of kaempferol against acetaminophen in hepatocytes-induced injury. **Methods:** Cholecystokinin-8 (CCK-8) was used to detect the vitality of hepatocytes treated by kaempferol. The lactate dehydrogenase (LDH) released ratio was detected, which could determine the concentration and time of acetaminophen (APAP)-induced hepatocytes injury model. CCK-8 and LDH released ratio were used to detect the vitality of hepatocytes treated by APAP and kaempferol. In the meanwhile, hepatocyte morphology was to be record. P-Jun N-terminal kinase (P-JNK), Jun N-terminal kinase (JNK), Endo G protein expression were detected by Western Blot searching. **Results:** The APAP concentration was determined to be 5 mmol/L and the time was 24 hours to induce liver injury cell with drug. Compared with the APAP group, the morphology of hepatocytes was significantly improved. The ratio of apoptotic cells decreased significantly ($P < 0.01$), and the ratio of released LDH content decreased significantly ($P < 0.001$). Western Blot showed that P-JNK and Endo G were significantly down-regulated. **Conclusion:** This experiment demonstrates that kaempferol has a protective effect on APAP-induced hepatocytes injury.

Key Words Kaempferol; Acetaminophen; Apoptosis; Hepatocyte protection

中图分类号:R996 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.01.008

对乙酰氨基酚(Acetaminophen, APAP)又名扑热息痛,是常用的解热镇痛药物,也是引起肝功能衰竭最常见的药物。过量的 APAP 在肝脏经过细胞色素 P450 酶(主要是 CYP2E1、CYP1A2)代谢产生的活性产物 N-乙酰基-对苯醌亚胺(N-acetyl-4-benzoquinone imine, NAPQI)是损伤肝细胞的毒素^[1]。NAPQI 过度消耗肝脏还原型谷胱甘肽(Glutathione, r-glutamyl Cysteingl + glycine, GSH),并且 NAPQI 与线粒体膜上蛋白质形成加合物,破坏线粒体结构,进而导致线粒体氧化应激、线粒体功能障碍和核 DNA 碎片化,导

致肝细胞坏死^[2,3],最终大量的肝细胞坏死造成急性肝衰竭。目前 N-乙酰半胱氨酸(N-Acetyl-L-cysteine, NAC)是急性肝衰竭的特定治疗药物,但治疗时间窗口窄,不少患者因缺乏及早发现肝衰竭的诊断标志物而错过治疗的最佳时间,最后导致肝衰竭。对 APAP 造成肝损伤严重的病例,唯一的治愈性治疗选择是肝移植,而前 5 年存活率约为 70%。因此,临床上急需替代治疗方案^[4-5]。那么,开发早期预防和治疗 APAP 导致肝衰竭的药物也具有重要的临床意义。

基金项目:广东省科技厅实验室建设项目(2017B030314064);广东省科技厅国际合作基地建设项目(2016B050501003)

作者简介:张伟贤(1992.09—),男,硕士研究生在读,研究方向:中药药理学, E-mail: zhangweixian10086@163.com

通信作者:郭姣(1961.11—),女,博士,教授,主任医师,研究方向:中西医结合防治糖脂代谢病, E-mail: guojiao@gdpu.edu.cn

山柰酚(Kaempferol, KA)属于黄酮类化合物,微溶于水,溶于热乙醇、乙醚和碱,广泛分布于韭菜、洋葱、绿豆、南瓜、马铃薯、番茄、草莓等多种蔬菜与水果,以及连翘、迷迭香、金合欢、银杏叶、含羞草、桂皮等传统中草药^[6],近年研究表明,KA具有抗氧化、抗炎、抗癌、解毒等多种药理活性作用^[7-12],本研究旨在探究KA对APAP诱导肝细胞损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝源细胞株(LO2)由中山大学黄河清教授实验室赠送。

1.1.2 药物 KA,纯度 $\geq 98\%$ (南京朗泽科技有限公司,生产批号:520-13-8);APAP,纯度 $\geq 99\%$ (上海麦克林生化科技有限公司,货号:103-90-2)。

1.1.3 试剂与仪器 DMEM培养基(赛默飞世尔科技(中国)有限公司,货号:21600-034, Gibco);胎牛血清(Hyclone公司,货号:SV30087.01);青霉素和链霉素溶液(Hyclone公司,货号:SV30010);CCK-8试剂盒(艾美捷科技有限公司,货号:KTC011001);triton X-100(上海生工生物工程有限公司,生产批号:9002-9-31);LDH试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,货号:A020-2);脱脂奶粉(上海生工生物工程有限公司,货号:E306BA0007);p-JNK一抗(武汉博士德生物工程有限公司,货号:BM4380);JNK一抗(武汉博士德生物工程有限公司,货号:BM4329);EndoG一抗(Affinity Biosciences公司,货号:DF8541);HRP标记的山羊抗兔抗体(普洛麦格(北京)生物技术有限公司,货号:W4018)。3111CO₂细胞培养箱(Thermo公司);BDS系列倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);LEG-END MICRO 17R 冷冻高速离心机(Thermo公司);WD-9405B 水平摇床(北京市六一仪器厂);Trans-blott turbo 转膜系统(Bio-RAD公司);QB-206 多用途旋转摇床(上海市其林贝尔仪器制造有限公司);3300029-7Q 化学发光仪(上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 LO2 细胞培养 含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM完全培养基,在37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱培养。

1.2.2 APAP 诱导 LO2 细胞损伤模型建立 每孔预先加入100 μL 完全培养基,将对数生长的LO2细胞10⁵个/mL的密度接种于96孔板,每个孔100 μL,在细胞培养箱中培养24 h,更换新鲜无血清培

养基在培养箱培养12 h。配制0,2.5,5,10 mmol/L APAP 的无血清培养基,分别处理12、16、24 h 后分别检测上清液和上清液等体积的1% tritonX-100 溶液裂解细胞,计算LDH 释放比率。

$$\text{LDH 释放比率} = \frac{\text{上清液 LDH}}{(\text{上清液 LDH} + \text{细胞裂解液 LDH})} \times 100\%$$

1.2.3 CCK-8 检测 KA 对 LO-2 细胞活性的影响

每孔预先加入100 μL 完全培养基,将对数生长的LO2 细胞10⁵个/mL的密度接种于96孔板,每个孔100 μL,在细胞培养箱中培养24 h,更换新鲜无血清培养基在培养箱培养12 h。加入不同浓度的KA(0, 12.5, 25, 50, 100 μmol/L),每个浓度设置3个复孔,培养箱培养24 h,吸去培养基,每孔加入90 μL 无血清培养基和10 μL CCK-8 溶液,在细胞培养箱3 h 后检测酶标仪450 nm 吸光度。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A(\text{加药}) - A(\text{空白})}{A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})} \times 100\%$$

1.2.4 KA 对 APAP 诱导 LO2 细胞损伤的影响

实验分为6组,分别是空白对照组,模型组(APAP:5 mmol/L)、阳性对照组(黄芩苷, Baicalin, 缩写 BA:10 μmol/L)和KA低、中、高剂量3个实验组(APAP:5 mmol/L, KA:5, 10, 20 μmol/L)。将对数生长的LO2 细胞10⁵个/mL的密度接种于6孔板,每个孔2 mL,细胞培养箱中培养24 h,更换无血清培养基在培养箱培养12 h,确保细胞密度在70%左右,APAP 和给药干预24 h,观察肝细胞形态学变化,检测上清液和LO2 细胞裂解液LDH,计算LDH 释放比率。

1.2.5 Western Blot 检测 p-JNK、JNK、EndoG 蛋白

表达情况 按照以上既定的KA对APAP诱导肝损伤的实验方法进行实验,在药物干预24 h后弃掉细胞上清液,PBS轻轻洗涤细胞3次,加入100 μL 细胞裂解液(RIPA:PMSF = 100:1),用细胞刷收集细胞到1.5 mL EP管,放冰上裂解30 min,4℃ 12 000 r/min 离心15 min,取上清。BCA法测定蛋白浓度,配制相同各组蛋白浓度,制备Western Blot 上样样品,每个样品上20 μg 蛋白,进行电泳。电泳结束,PVDF膜用甲醇活化5 min,浸入转膜液中10 min,根据仪器的规范转膜方法进行操作,250MA 恒流转膜90 min;转膜结束后PVDF膜使用1% TBST洗3次,10 min/次,5%脱脂奶粉封闭1 h, TBST洗膜后4℃ 孵育一抗12 h, p-JNK、JNK、EndoG、GADPH 抗体(抗体:一抗稀释液 = 1:1 000)孵育, TBST洗膜后二抗(1:5 000)室温孵育1 h, TBST洗膜,最后加入化学发光液显影。

1.3 统计学方法 实验所得数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,

数据统计由 GraphPad Prism 6 软件处理,组间比较用单因素 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 检测 KA 对 LO2 细胞活性的影响 为确定 KA 对 LO2 的安全浓度范围,本实验用 CCK-8 检测 KA(0、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 在 24 h 对 LO2 细胞的毒性作用,根据细胞存活率要高于 90%,因此,选择了低、中、高 3 个安全浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 进行后续实验。见图 1。

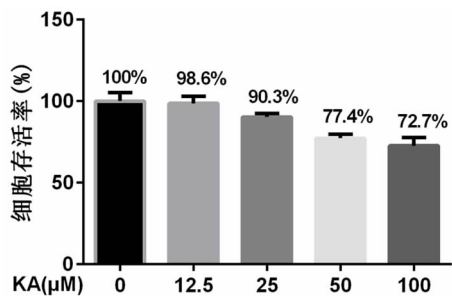


图 1 KA 对 LO2 细胞活性的影响

2.2 APAP 诱导 LO2 细胞损伤模型的建立 为确定 APAP 诱导 LO2 细胞损伤模型的浓度和时间,本实验设计了不同的 APAP 浓度(0、2.5、5、10 mmol/L) 和不同处理时间(12 h、16 h、24 h) 双因素,以 LDH 释放率来确定造模条件。结果表明,APAP 浓度为 5 mmol/L ,时间为 24 h 时 LHD 释放比率为 40%,数值升高明显而稳定,以此为造模条件进行后续实验。见图 2。

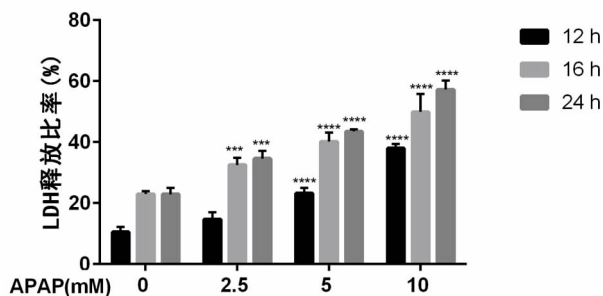
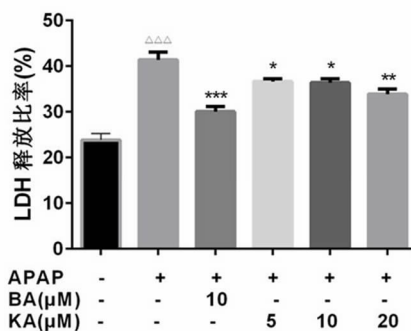


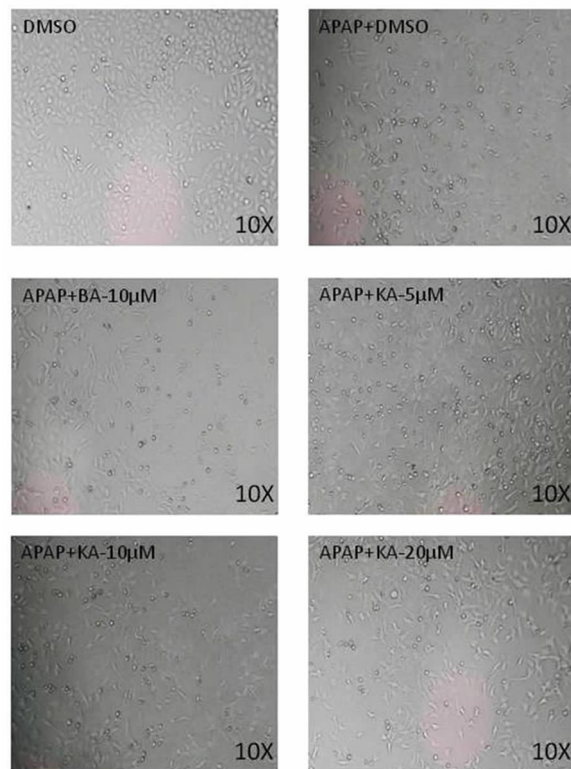
图 2 不同 APAP 浓度及不同作用时间对 LO2 细胞 LDH 释放比率的影响

注:与 0 mmol/L 组比:*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$

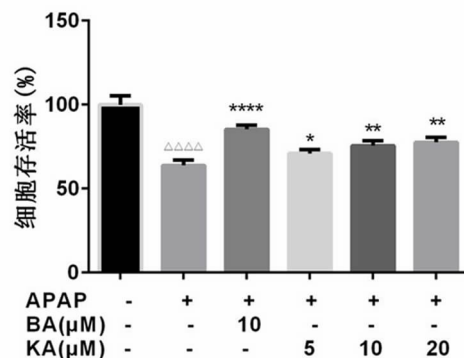
2.3 KA 对 APAP 诱导 LO2 细胞损伤的保护作用 LDH 释放比率实验结果显示,相比于空白对照组,模型组 LDH 释放比率明显升高($P < 0.001$);阳性对照组对比模型组 LDH 释放比率更高,3 个不同浓度 KA 处理组的 LDH 释放比率都有不同程度的下降($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),呈剂量依赖,以高剂量组的下降最明显,表明 KA 对 APAP 诱导的肝细胞损伤有一定的保护作用。见图 3A。



A.



B.



C.

图 3 KA 对 APAP 诱导肝细胞损伤的保护作用

注:A. LDH 释放比率;B. APAP 诱导的 LO2 形态(原始放大 100 倍);C. APAP 诱导下的 CCK-8。与空白对照组比,△△△ $P < 0.001$,△△△△ $P < 0.0001$,与模型组,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$

形态学观察发现,空白对照组细胞生长良好,密度大,背景清晰,透明度大,遮光性均匀;模型组发生明显的凋亡,细胞数量减少,细胞皱缩变圆;阳性对照组对比模型组细胞形态明显改善,凋亡细胞数量少,大多数细胞呈梭形。相比于模型组,中剂量组和高剂量组细胞状态有所改善,细胞数量有所增加,凋亡细胞数量减少。高剂量组细胞透明度大,背景清晰。表明 KA 对 APAP 诱导的 LO2 细胞损伤有一定程度的保护作用。见图 3B。

CCK-8 检测结果显示,模型组中的细胞存活率明显降低($\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$),阳性对照组中的细胞存活率对比模型组明显提高($**** P < 0.0001$),3 个不同浓度 KA(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)实验组均能提高细胞的存活率($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$),而且呈现剂量依赖性,高剂量的 KA 提高 LO2 细胞存活率的作用最大。表明 KA 对 APAP 诱导的细胞损伤具有保护作用,与细胞形态学观察结果一致。见图 3C。

2.4 KA 对 APAP 诱导 LO2 细胞凋亡的保护作用

Westren Blot 结果显示,相对于空白对照组,模型组 p-JNK 和 Endo G 蛋白表达量都显著上调;对比模型组,阳性对照组 p-JNK 和 Endo G 蛋白表达都明显下调;与模型组比较,KA 低中高组 p-JNK 表达均有下调,高剂量最明显,呈剂量依赖;与模型组比较,高剂量组 Endo G 表达明显下调。见图 4。

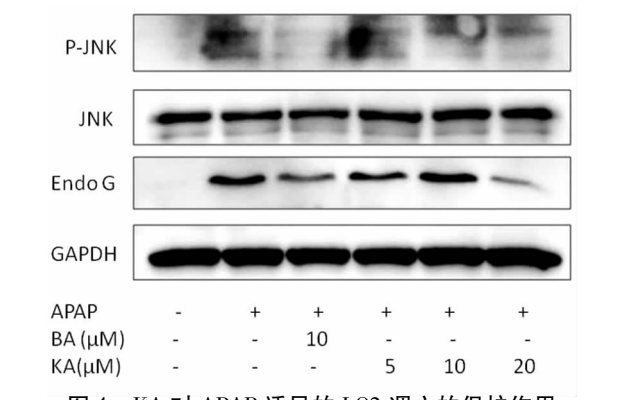


图 4 KA 对 APAP 诱导的 LO2 凋亡的保护作用

3 讨论

摄入过量 APAP 是目前药物性肝衰竭最主要的原因。不少患者因缺乏及早发现肝衰竭的诊断标志物而错过治疗的最佳时间,最后导致肝衰竭。对 APAP 造成肝损伤严重的病例,唯一的治愈性治疗选择是肝移植,而前 5 年存活率约为 70%。因此,临床上急需替代治疗方案,开发早期预防和治疗 APAP 导致肝衰竭的药物也具有重要的临床意义。

人肝源细胞(LO2 细胞)是筛选保肝药物的常用

细胞^[13]。本实验建立稳定的 APAP 诱导 LO2 细胞损伤的模型,探究不同 APAP 浓度(0、2.5、5、10 mmol/L)和诱导时间(12、16、24 h)对 LO2 细胞的损伤程度,发现 APAP(5 mmol/L),诱导 24 h,LO2 细胞 LDH 释放比率提高到 40%,提高值明显且稳定,所以确定 5 mmol/L ,24 h 作为造模条件。CCK-8 法(Cell Counting Kit-8,细胞增殖-毒性检测试剂盒)是可以直接进行细胞增殖和毒性分析的一种方法,该方法广泛应用于药物筛选,细胞增殖测定以及细胞毒性测试等。本实验使用 CCK-8 法检测了 KA 对 LO2 细胞活性以确定 KA 干预 LO2 的安全浓度范围,实验结果表明,KA 在 12.5 ~ 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 24 h 细胞活力在 90% 以上,因此确定了 KA 低、中、高 3 个浓度(5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$)作为后续实验研究。

LDH 可做为肝细胞损伤的标志物,当 LO2 细胞损伤时会释放 LDH 到细胞外,此时检测上清液和细胞内的 LDH,计算出 LDH 释放比率,可评估 LO2 细胞的损伤程度^[14]。本研究显示,对比模型组,3 个 KA 干预组的 LDH 比率明显降低($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$),且具有剂量依赖性。观察各组细胞形态,空白对照组细胞生长良好,密度大,背景清晰,透明度大,遮光性均匀;模型组发生明显的凋亡,细胞数量减少,细胞皱缩变圆;不同浓度 KA 对 LO2 细胞有不同程度的保护作用,对中剂量组和高剂量组的保护作用明显,细胞数量有所增加,凋亡细胞数量减少,高剂量组细胞透明度大,背景清晰;CCK-8 检测结果显示,模型组中的细胞存活率明显降低($P < 0.0001$),阳性对照组中的细胞存活率对比模型组明显提高($P < 0.0001$),KA 低中高 3 个剂量组(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)均能提高细胞的存活率($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$),高剂量组药效为最佳。以上结果表明 KA 能抑制 APAP 诱导的 LO2 损伤和凋亡。

持续的 JNK 激活循环在 APAP 诱导的急性肝损伤和细胞凋亡中有着十分重要的作用。过量的 APAP 在肝脏经过细胞色素 P450 酶(CYP2E1、CY1A2 等)代谢产生的活性产物 NAPQI,NAPQI 过度消耗肝细胞中线粒体还原型谷胱甘肽(GSH),随后 NAPQI 会与线粒体膜上的蛋白共价结合形成 NAPQI 加合物,导致线粒体功能中度障碍和 ROS 释放^[12]。JNK 是一种与应激有关的促分裂原活化蛋白激酶,由活性氧(ROS)激活。其中 JNK 激活(即 JNK 磷酸化为 p-JNK)的幅度和持续时间是造成 APAP 急性肝损伤的主要因素^[11]。JNK 激活会加重

线粒体障碍,进一步释放 ROS,形成 JNK 激活循环导致线粒体持续损伤。线粒体功能障碍导致 ATP 下降,最终引发肝细胞死亡;发生功能障碍的线粒体释放核酸内切酶(EndoG)到细胞质中,EndoG 转位到细胞核中使 DNA 断裂诱发细胞凋亡^[15]。Western Blot 结果显示,KA 能抑制 p-JNK 和下调 EndoG 蛋白表达,提示 KA 通过抑制 JNK 激活改善线粒体功能而达到肝细胞的保护作用。

综上所述,KA 通过抑制 JNK 磷酸化,降低肝细胞氧化应激,保护线粒体功能,抵抗 DNA 断裂诱发细胞凋亡,从而达到保护过量 APAP 导致的肝细胞损伤;其作用效果可以利用体内实验作进一步验证。KA 可作为开发治疗 APAP 导致肝损伤的潜在药物。

参考文献

- [1] Lee SS, Buters JT, Pineau T, et al. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen [J]. J Biol Chem 1996, 271 (20): 12063-12067.
- [2] Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity [J]. Toxicol Lett 2003, 144 (3): 279-288.
- [3] McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, et al. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation [J]. J Clin Invest 2012, 122 (4): 1574-1583.
- [4] Oliver Krenkel, Jana C. Mossanen, et al. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure [J]. Hepatobiliary Surg Nutr 2014, 3 (6): 331-343.
- [5] Adebayo D, Mookerjee RP and Jalan R. Mechanistic biomarkers in acute liver injury; are we there yet [J]. J Hepatol 2012, 56 (5): 1003-1005.
- [6] Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol [J]. Mini Rev Med Chem, 2011, 11 (4): 298-344.
- [7] 汤利华, 方超, 王浩然, 等. 山奈酚对高糖诱导的糖尿病肾病大鼠肾功能和组织病理损伤的保护作用 [J]. 免疫学杂志, 2018, 34 (12): 1041-1046.
- [8] 康桂兰, 景增秀. 山奈酚通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路缓解 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34 (4): 525-530.
- [9] Qi-Sheng Yang, Li-Ping He, Xian-Long Zhou, et al. Kaempferol pretreatment modulates systemic inflammation and oxidative stress following hemorrhagic shock in mice [J]. Chinese Medicine, 2015, 10 (1): 6-13.
- [10] Wenzhen Liao, Luying Chen, Xiang, et al. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 114: 24-32.
- [11] Seung-Hee Kim, Kyung-A Hwang, Kyung-Chul Choi. Treatment with kaempferol suppresses breast cancer cell growth caused by estrogen and triclosan in cellular and xenograft breast cancer models [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 28: 70-82.
- [12] 仇炜, 林俊, 张磊, 等. 山奈酚抑制顺铂诱导的心肌细胞凋亡 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2017, 17 (1): 1992-1995.
- [13] 贺兰芝, 孟雅坤, 韩延忠, 等. 木犀草素对乙酰氨基酚诱导的 L02 肝细胞损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (22): 4234-4239.
- [14] Kunimaro Furuta, Yuichi Yoshida, Satoshi Ogura, et al. Gab1 Adaptor Protein Acts As a Gatekeeper to Balance Hepatocyte Death and Proliferation During Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice [J]. Hepatology, 2016, 63 (4): 1340-1355.
- [15] Mingzhu Yan, Yazhen Huo, Shutao Yin, et al. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions [J]. Redox Biology, 2017, 17: 274-283.

(2018-12-10 收稿 责任编辑: 徐颖)